

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM
FOTÔMETRO/FLUORÍMETRO MICROCONTROLADO À
BASE DE LED RGB PARA A DETERMINAÇÃO DE
ESPÉCIES DE INTERESSE ANALÍTICO

Thiago Brito Guerreiro

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

São Carlos - SP
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

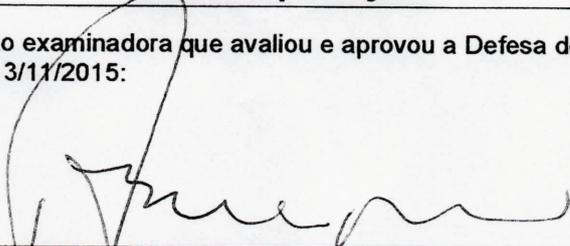
G934d Guerreiro, Thiago Brito
Desenvolvimento e aplicação de um
fotômetro/fluorímetro microcontrolado à base de LED RGB
para a determinação de espécies de interesse analítico
/ Thiago Brito Guerreiro. -- São Carlos : UFSCar,
2015.
113 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2015.

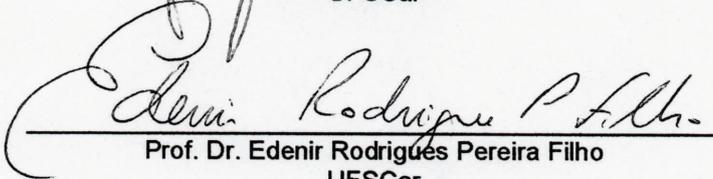
1. Baixo custo. 2. Fotômetro. 3. Fluorímetro. 4.
Microcontrolador. I. Título.

Folha de Aprovação

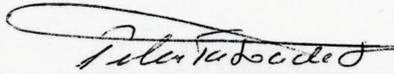
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Thiago Brito Guerreiro, realizada em 13/11/2015:



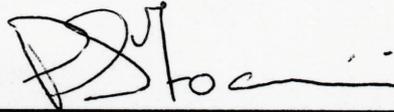
Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
UFSCar



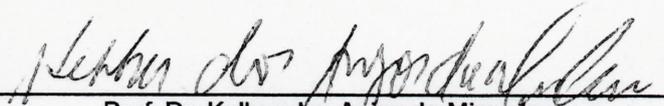
Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
UFSCar



Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
UNESP



Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini
UFSCar



Prof. Dr. Kelber dos Anjos de Miranda
UNESP

DEDICATÓRIA

Ao carinho e apoio dos meus pais que
em todo tempo fizeram dos meus sonhos os seus.
Pastor Antônio Guerreiro e M^a. Ivanilza

AGRADECIMENTOS

A Deus que nos fez prosperar em cada dia.

Aos meus pais que além de muitas outras formas de apoio arcaram com o financeiro sempre que necessário.

Aos meus irmãos, Ana Paula e J. Levy, que em tempos bons estão sempre perto, e quando os tempos não eram bons não se ausentaram. Também ao Eluzai, Eliabe, Sara e Eder.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho pela constante orientação e presença em todo tempo, por sua disposição e também por não me deixar desistir.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria pelo espaço físico em seu laboratório, amizade e algumas dicas sempre de grande valor.

À Profa. Dra Rose Maria Carlos que concedeu o fluorímetro e aos amigos alunos Paulo, Edjane e Debora.

Ao Dr. Vagner Bezerra dos Santos pelas dicas de grande importância nesse trabalho e pelos anos que caminhamos juntos e as discussões científicas. Um amigo distante, mas sempre presente.

Ao Dr. Osmundo Dantas Pessoa Neto e Amália Gama Pessoa, mais que amigos, uma família.

Ao Dr. André Afonso, que é sempre uma boa proza filosófica. Além de um bom amigo.

Ao Elson Luiz Fava que sempre esteve presente aos sábados e domingos de trabalho.

À Vera e seus colaboradores na Ka and Ma.

Ao Dr. Fernando Campanhã Vicentini (Avaré) pela colaboração na escrita dessa tese de doutorado e amizade.

Ao pessoal do LABBES que sempre foram amigos, e pela colaboração direta ou indireta, Ademar, Amanda, Anderson, Bárbara, Bruna, Bruno, Cássio, Cláudia, Elson, Fernando (Avaré), Geiser, Gisela, Laís, Luiz (Cyber), Marina, Oneide, Paola, Patrícia e Tiago Almeida, e ainda tem mais gente que não me vem na memória.

Aos colegas do LABIE, sempre companheiros, com quem desde 2007 tenho trabalhado. Foi um grande prazer conhecê-los: André, Andreia, Camila, Camila, Camila Nara, Carolina, Caroline, Estela, Mariele, Natalia, Osmundo, Paulo, Quésia, Ricardo, Tássia, Taís e Vitória.

Aos colegas e professores do GQA: Edenir, Renato, Flávinha, Frederico, Jorge, Bolaji (Jamaica), Leidaiany (Leidy), Loriz e Marcos (Marcão).

Ao pessoal das repúblicas que me aturaram: Fábio, Rodrigo Cesar, Edinei, Rodrigo, Candice, Diego, Sidrônio, Francisco, Marcelo, João, "Fidel" e Murilo.

Ao meu amigo Josué Justino e Josinalva, minha família em São Carlos.

Ao Thiago Correia e Família, gente do coração.

Ao Prof. Fernando Lanças, Proteus, NST com quem trabalhei (entre 2011 e 2012), permitindo ausentar-me alguns dias da semana para desenvolver as pesquisas do doutorado.

Ao Felix e o Marcelo da KEME, bem como, toda a equipe de projetistas da qual tenho participado desde 2013, e também estamos em grandes projetos em 2015.

Ao PPGQ-UFSCar pela formação de qualidade comprovada pelo conceito alcançado.

LISTA DE ABREVIATURA

A/D	Analógico-Digital
AB	Azul Brilhante
APD	Do inglês, <i>Avalanche Photodiode</i>
AM	Azul de Metileno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BTX	Benzeno, Tolueno e Xileno
CCD	Do inglês, <i>Charge-Coupled Device</i>
CI	Do inglês, <i>integrated-circuit</i>
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FDI	Fotodetectores inteligentes
FL	Fluoresceína
LCD	Do inglês, <i>Liquid Crystal Display</i>
LD	Limite de Detecção
LED	Do inglês, <i>Light Emitting Diode</i>
LQ	Limite de Quantificação
O-Fen	o-fenantrolina
P2FM	Protótipo Fotômetro/Fluorímetro Microcontrolado
PID	Do inglês, <i>Product Identify</i>
PLS-1	Do inglês, <i>Partial Least Squares</i>
R6G	Rodamina 6G
REM	Radiação eletromagnética
TAOS	Do inglês, <i>Texas Advanced Optoelectronic Solutions</i>
TT	Tartrazina

USB	Do inglês, <i>Universal Serial Bus</i>
UV/Visível	Ultravioleta-Visível
VCC	Tensão de Corrente Contínua
VID	Do inglês, <i>Vendor Identify</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Exemplo de técnicas espectroscópicas. Interação da REM com a amostra	3
TABELA 1.2 - Instrumentos microcontrolados em química analítica.....	18
TABELA 1.3 - Fórmulas químicas e números de identificação dos agentes sulfitantes.....	23
TABELA 1.4 - Limites máximos permitidos para adição de agentes sulfitantes em bebidas, conforme legislação brasileira vigente ⁷⁹	23
TABELA 3.1 - Controle da escala de frequência do TCS-3200.....	42
TABELA 3.2 - Controle dos terminais para seleção dos filtros do sensor TCS-3200.....	43
TABELA 4.1 - Configuração adotada no software para teste de estabilidade do P2FM	56
TABELA 4.2 - Características dos corantes utilizados na calibração do sistema.....	58
TABELA 5.1 - Teste de estabilidade da potência dos LEDs com o P2FM configurado no modo fotométrico.....	62
TABELA 5.2 - Teste de estabilidade da potência dos LED com o P2FM configurado no modo fluorimétrico.....	63
TABELA 5.3 - Características dos corantes utilizados na calibração do sistema.....	68
TABELA 5.4 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando-se o cromóforo azul brilhante.....	69
TABELA 5.5 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando-se o corante amaranto.	71
TABELA 5.6 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos frente ao cromóforo tartrazina.....	72
TABELA 5.7 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando-se a fluoresceína.....	77
TABELA 5.8 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando R6G	78
TABELA 6.1 - Volume de soluções de Fe^{2+} $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e de α -fen $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ adicionados, concentração final e proporção.....	82
TABELA 6.2 - Resultados obtidos usando-se o método da razão molar com o P2FM	83
TABELA 6.3 - Comparação dos valores de R, LD, LQ e S entre instrumentos para o método de determinação de sulfito	91
TABELA 6.4 - Algumas substâncias adicionadas e encontradas em bebidas alimentícias. Concentrações selecionadas para estudo de interferentes.....	92

TABELA 6.5 - Efeito de aditivos comuns em bebidas	93
TABELA 6.6 - Resultado da determinação de sulfito em amostras comerciais.....	94
TABELA 6.7 - Estudo de adição e recuperação de sulfito ($70,0 \text{ mg L}^{-1}$) em amostras comerciais.	95
TABELA 6.8 - Comparação dos valores de R, LD, LQ, S e faixa de resposta para concentrações de Ca^{2+} em solução KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) contendo calceína ($19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em instrumentos diferentes.	101
TABELA 6.9 - Determinação da concentração total dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} em amostras de água mineral em diferentes instrumentos	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Esquema representativo do posicionamento da fonte de REM e do fotodetector no método: a) fotométrico e b) fluorimétrico.....	10
FIGURA 1.2 - Gráfico hipotético para razão estequiométrica de um complexo: $Mx:Ly$	21
FIGURA 1.3 - Distribuição das espécies ionizadas de dióxido de enxofre em função do pH. Figura adaptada de Vicentini ⁸⁰	25
FIGURA 3.1 - Representação esquemática do instrumento desenvolvido com os principais componentes conectados a um microcontrolador PIC-18F2455.....	32
FIGURA 3.2 - Representação da alimentação do microcontrolador via interface USB.....	33
FIGURA 3.3 - Microcontrolador PIC18F2455.....	35
FIGURA 3.4 - Espectro de emissão do LED RGB. Comprimentos de onda de maior intensidade. Blue = 470 ± 22 nm, Green = 528 ± 33 nm, e Red = 621 ± 14 nm.	36
FIGURA 3.5 - Resposta do sensor TCS-3200 em função da REM. Canal: 1) λ_{max} 735 nm; 2) λ_{max} - 410 e 735 nm; 3) λ_{max} - 475 e 845 nm; 4) λ_{max} - 540 e 830 nm.	37
FIGURA 3.6 - Placa de gravação de microcontrolador Microgênio [®] , modelo MicroLCDzif.	40
FIGURA 3.7 - Representação do sistema de alimentação do microcontrolador e interface USB. X1 = cristal oscilador de 4MHZ, J1 = Conector macho USB.....	41
FIGURA 3.8 - Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para conexão do detector TCS-3200 às portas dos microcontrolador PIC-18F2455.	42
FIGURA 3.9 - Esquema do circuito eletrônico dos LEDs tricolores. Fonte de radiação: LD01-RGB e LD02-RGB, conectados as portas RD7, RD6, D5, D4, D3 e D2 do PIC18F2455.....	44
FIGURA 3.10 - Circuito eletrônico do sensor de temperatura LM35 com saída de sinal no terminal VO (3) conectado à entrada analógica RA0 do microcontrolador.	44
FIGURA 3.11 - Figura representativa do suporte de amostragem.	45
FIGURA 3.12 - Projeto do suporte de amostragem nas vistas: a) Inferior; b) Lateral; c) Interna; d) Superior.	46
FIGURA 3.13 - Fotografia do instrumento desenvolvido conectado ao <i>notebook</i> via interface USB.	47
FIGURA 3.14 - Plataforma de desenvolvimento do <i>software</i> : <i>Visual Studio Express</i>	49

FIGURA 3.15 - Tela principal do <i>software</i> de controle. A - Sensor/Filtro; B – Registro do Sinal; C – Sinal em função do tempo; D – Curva analítica.	50
FIGURA 3.16 - <i>Group box</i> de acionamento da fonte de REM e canal do sensor.....	51
FIGURA 3.17 - <i>Group box</i> do registro do sinal: Escuro, Branco, Sinal.	51
FIGURA 3.18 - <i>Group box</i> para obtenção dos parâmetros de desempenho analítico.....	52
FIGURA 3.19 - Caixa para estudo do sinal em função do tempo.....	53
FIGURA 5.1 - Espectro de absorvância obtido para o azul de metileno $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	64
FIGURA 5.2 - Registro do sinal de azul de metileno em função do tempo. A) Água destilada, B) $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, C) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, D) $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, E) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, F) $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, G) $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	65
FIGURA 5.3 - Curva analítica obtida para o azul de metileno utilizando-se o P2FM, configuração do <i>software</i> : Sensor = Livre; LED = 621 nm; Frequência = 10000 (10 s).....	66
FIGURA 5.4 - Espectro de absorvância de azul brilhante $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, amaranço $6,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e tartrazina $6,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa. UV/Vis-2550.	67
FIGURA 5.5 - Curva analítica do azul brilhante em instrumentos diferentes: UV-Vis-2550, USB-2000 e P2FM.....	69
FIGURA 5.6 - Curva de calibração de solução de amaranço em três instrumentos diferentes: UV-Vis-2550, USB-2000 e P2FM.....	70
FIGURA 5.7 - Curva analítica da tartrazina em três instrumentos diferentes: UV-Vis-2550, USB-2000 e P2FM. Máxima absorvância em 430 nm.	72
FIGURA 5.8 - Espectro de absorvância de soluções de FL ($4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e R6G ($2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	74
FIGURA 5.9 - Espectro de emissão fluorescente normalizado de soluções de FL ($\lambda = 490 \text{ nm}$, $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e R6G ($\lambda = 560 \text{ nm}$, $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).	75
FIGURA 5.10 - Curvas analíticas obtidas para a fluoresceína ($\lambda_{\text{exc.}} 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 515 \text{ nm}$) em três instrumentos diferentes: RF5301-PC, USB-2000 e P2FM.	76
FIGURA 5.11 - Curva analítica da Rodamina G ($\lambda_{\text{exc.}} 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 553 \text{ nm}$) em três instrumentos diferentes: RF5301-PC, USB-2000 e P2FM.	78
FIGURA 6.1 - Absorvância em função da adição de o-Fen ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) contendo Fe^{2+} ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).....	84
FIGURA 6.2 - Gráfico de concentrações do íon sulfito em solução de $[\text{Fe}(\text{o-Fen})_3]^{3+}$ ($6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).....	89

FIGURA 6.3 – Curvas analíticas do íon sulfito em solução de íons complexo $[\text{Fe}(\text{o-Fen})_3]^{3+}$ ($6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH – 4,5)	90
FIGURA 6.4 - Absorbância de uma solução de calceína ($1,93 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em hidróxido de potássio ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$).	98
FIGURA 6.5 - Espectro de fluorescência do complexo calceína ($19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Concentrações de Ca^{2+} : $1,2 \times 10^{-6}$ a $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Comprimento de onda para excitação – 495 nm.....	99
FIGURA 6.6 - Curvas analíticas para o Ca^{2+} em solução de calceína ($19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$), obtidas empregando-se os instrumentos P2FM, USB-2000 e RF5301/PC.....	100

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM FOTÔMETRO/FLUORÍMETRO MICROCONTROLADO À BASE DE LED RGB PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE INTERESSE ANALÍTICO. Um fotômetro/fluorímetro microcontrolado (P2FM) multifuncional, portátil, comunicado via USB 2.0, robusto, de fácil operação e com baixo consumo de energia foi desenvolvido neste trabalho. O P2FM foi construído utilizando-se um microcontrolador (PIC-18F2455) como unidade central de processamento (CPU), dois LEDs tricolores (470, 528, 621 nm) como fonte de radiação, um sensor multicanal (TCS3200), e o programa de gerenciamento escrito em Visual Studio. Um dos LED foi utilizado como fonte de radiação para o modo fotométrico e o outro para o modo fluorimétrico. O TCS-3200 é um sensor multicanal com quatro faixas fotossensíveis: 480, 540, 750 e 830 nm, sendo que a seleção da faixa é realizada via programa de controle. O programa de gerenciamento atua no envio de funções para o microcontrolador, registro de dados e armazenamento do sinal (*.txt) através da porta USB 2.0 (5,0 VCC, 300 mA). O P2FM é compacto, com dimensões de 3,5 cm x 7,0 cm x 8,5 cm e massa de 159,4 g, configurando-se um instrumento portátil. No programa é selecionado o modo de funcionamento: fotométrico ou fluorimétrico. Nos testes de desempenho analítico no modo fotométrico foram empregadas soluções dos corantes amaranto (AM), azul brilhante (AB) e tartrazina (TT). Os limites de detecção obtidos foram $1,6 \times 10^{-7}$, $5,4 \times 10^{-7}$ e $1,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para AM, AB e TT, respectivamente. Os limites de quantificação obtidos foram $4,8 \times 10^{-7}$, $1,6 \times 10^{-6}$ e $5,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para AM, AB e TT, respectivamente. Os coeficientes de correlação foram: AM = 0,997, AB = 0,975 e TT = 0,994. O desempenho analítico no modo fluorimétrico foram realizados empregando-se soluções de fluoresceína (FL) e Rodamina 6G (R6G), sendo obtidos um limite de detecção de $8,3 \times 10^{-8}$ e $4,79 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente para FL e R6G. Os coeficientes de correlação foram 0,997 para FL e 0,999 para R6G. Ademais, o instrumento proposto foi aplicado com sucesso na determinação de sulfito em bebidas, dureza total em água e determinação da constante de estabilidade e estequiometria de um complexo cromogênico, objetivando mostrar algumas aplicações do fotômetro/fluorímetro. A constante de formação obtida ($5,04 \times 10^{18}$) está em consonância com aquela apresentada na literatura, $6,2 \times 10^{18}$. Na determinação de sulfito em oito amostras

de bebidas, o teste *t*-pareado mostrou que método de referência e o método fotométrico usando P2FM foi de 0,66 menor do que o valor crítico (2,36, $\alpha = 0,05$). A dureza da água foi determinada empregando-se o método fluorimétrico, sendo que o P2FM apresentou melhor sensibilidade $8,94 \times 10^6$ que a determinada empregando-se o espectrofluorímetro (RF5301/PC). O teste *t*-pareado ($\alpha = 0,05$) mostrou que não há diferença significativa, *t* crítico (0,36) menor que o *t* crítico (2,01).

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A PHOTOMETER/FLUOROMETER MICRO-CONTROLLED WITH LED RGB FOR DETERMINATION OF ANALYTES OF ANALYTIC INTEREST. In this work, a photometer/fluorometer micro-controlled (P2FM) multifunctional, portable, communicated by USB 2.0, robust, easy handling and with low consumption of energy was developed. The P2FM was built using a micro-controlled (PIC-18F2455) as central unit of process (CPU), two tricolors LEDs (470, 528, 621 nm) as source of radiation, a multichannel sensor (TCS3200) and the management program wrote in Visual Studio. One of the two LED was used as radiation source for photometric mode. The TCS-3200 is a multichannel sensor with four photosensitive tracks: 480, 540, 750 e 830 nm, being that selection of track is performed by program controlled. The management program operates sending functions for microcontroller, record of dates and storage of signal (*.txt) through of USB port 2.0 (5.0 VCC, 300 mA). The P2FM is compact, with 3.5 cm × 7.0 cm × 8.5 cm size and 159.4 g of weight, considered as a portable device. In the program is selected of function mode: photometer or fluorimeter. In the analytic performance test by photometric mode, were used three solutions amaranth (AM), blue light (AB) and tartrazine (TT). The detection limits obtained were 1.6×10^{-7} , 5.4×10^{-7} e 1.9×10^{-6} mol L⁻¹ for AM, AB and TT, respectively. The quantification limits obtained were 4.8×10^{-7} , 1.6×10^{-6} e 5.9×10^{-6} mol L⁻¹ for AM, AB and TT, respectively. The correlation coefficients were AM = 0.997, AB = 0.975 and TT = 0.994. The analytic performance for fluorometric mode was carried using in both fluorescein (FL) and Rodamine 6G (R6G) solutions, were obtained a detection limit of 8.3×10^{-8} and 4.79×10^{-8} mol L⁻¹, respectively for FL and R6G. The correlations coefficients were 0.997 for FL and 0.999 for R6G. Also, the proposed device was successfully used to sulphite determination in drinks, total hardness in water, determination of stability constant and study of stoichiometry of a chromogenic complex, aiming to show any applications of photometer/fluorimeter. The constant of formation obtained was 5.04×10^{18} is concordant with that presented in previous reports 6.2×10^{18} . In sulphite determinations on eight samples of drinks, the paired student's t-test showed that reference method and photometric method using P2FM was 0.66 times smaller than critic value (2.36, $\alpha = 0.05$). The total hardness in water was determined by

fluorometric method, being that the P2FM showed best sensibility 8.94×10^6 that a determination using the RF5301/PC spectrofluorometer. The paired student's t-test ($\alpha = 0.05$) no showed significant differences, calculated t (0.36) small than tabulated t (2.01).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
SUMÁRIO.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Técnica espectrofotométrica.....	4
1.1.1 Lei de Lambert-Beer.....	6
1.1.2 Relação entre a fluorescência e a concentração.....	8
1.2 Instrumentação.....	9
1.2.1 Componentes básicos de fotômetros e fluorímetros.....	10
1.2.2 Fonte de radiação.....	11
1.2.3 Fotodetector.....	12
1.2.4 Compartimento de amostragem.....	13
1.2.5 Conjunto óptico para seleção do comprimento de onda.....	13
1.2.6 Sistema de controle e aquisição de dados.....	15
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.3.1 Fotômetros com LED.....	16
1.3.2 Fluorímetros com LED.....	18
1.3.3 Instrumentação microcontrolada em Química Analítica.....	18
1.4 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS FOTOMÉTRICO E FLUORIMÉTRICO.....	19
1.4.1 Determinação da estequiometria de um complexo.....	19
1.4.2 Determinação de sulfito.....	22
1.4.3 Determinação de cálcio em água mineral.....	26
2 OBJETIVO.....	28
3 DESENVOLVIMENTO DO FOTÔMETRO/FLUORÍMETRO MICROCONTROLADO.....	30
3.1 Estudo dos componentes.....	31

3.1.1	Fonte de alimentação.....	33
3.1.2	Microcontroladores.....	34
3.1.3	LED-RGB.....	35
3.1.4	Detector TCS-3200.....	36
3.1.5	Sensor de temperatura LM35.....	38
3.1.6	Interface USB 2.0.....	38
3.1.7	Placa de gravação.....	39
3.2	Desenvolvimento do CIRCUITO eletrônico Do p2fm.....	40
3.2.1	Fonte de alimentação e interface USB.....	40
3.2.2	Microcontrolador.....	41
3.2.3	Detector TCS-3200.....	41
3.2.4	LED.....	43
3.2.5	Sensor de monitoramento da temperatura.....	44
3.3	Parte Mecânica.....	45
3.4	Desenvolvimento do programa embarcado.....	47
3.5	Software de controle em plataforma Windows.....	48
3.5.1	Página Principal.....	50
3.5.2	Estabilidade do instrumento.....	52
4	EXPERIMENTAL.....	54
4.1	Estudo da estabilidade do protótipo.....	55
4.2	Estudo do software desenvolvido.....	56
4.3	Calibração.....	56
4.3.1	Calibração fotométrica.....	57
4.3.2	Calibração fluorimétrica.....	58
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Estudo de estabilidade do protótipo.....	62
5.2	Estudo do software desenvolvido.....	63
5.3	CompAração do desempenho analítico com instrumentos comerciais..	67
5.3.1	Teste de desempenho do fotômetro.....	67
5.3.2	Teste de desempenho do fluorímetro.....	73
6	APLICAÇÕES.....	79
6.1	Determinação estequiométrica de UM complexo.....	80

6.1.1	Objetivo específico	80
6.1.2	Soluções e reagentes	80
6.1.3	Aparatos e instrumentação	81
6.1.4	Procedimento analítico.....	81
6.1.5	Resultados e discussões	82
6.2	Determinação de sulfito	86
6.2.1	Objetivo específico.....	86
6.2.2	Soluções e reagentes	86
6.2.3	Instrumentos e aparatos	87
6.2.4	Procedimento experimental	87
6.2.5	Resultados	88
6.2.6	Determinação de sulfito em amostras alimentícias	93
6.2.7	Estudo do efeito da matriz	94
6.3	Determinação de cálcio e magnésio em água mineral.....	95
6.3.1	Objetivo específico.....	95
6.3.2	Soluções e reagentes	96
6.3.3	Instrumentos e aparatos	96
6.3.4	Procedimento analítico.....	96
6.3.5	Resultados e discussão	97
7	CONCLUSÕES	103
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

1 Introdução

"O Deus dos céus é quem nos fará prosperar"

Neemias

A interação da radiação eletromagnética (REM) com um material pode resultar em fenômenos como: absorção, emissão ou espalhamento da radiação. A forma como a REM interage com o material é de grande interesse para o estudo físico-químico de materiais, fenômenos estudados pela espectroscopia.

O sol é um bom exemplo como fonte de REM. Essa fonte por sua vez emite radiação na faixa do ultravioleta (UV) e visível (VIS) do espectro. Quando esta REM interage com o meio em que vivemos, somos capazes de diferenciar e/ou identificar os materiais pela cor e intensidade por inspeção visual e com melhor acurácia empregando um instrumento adequado.

Geralmente, a cor dos objetos é consequência da absorção seletiva do objeto por uma determinada faixa de comprimento de onda. Além da absorção da radiação, outros fenômenos envolvendo a REM também são capazes de dar a sensação de cor como a interferência, a dispersão, a reflexão e a fluorescência. A fluorescência é um caso especial onde após a absorção da REM, parte dessa energia é liberada em outro comprimento de onda, processo conhecido com emissão.

Dependo da região do espectro da REM, têm-se vários tipos de radiação como os raios γ , os raios X, ultravioleta (UV), visível (VIS), infravermelho (IR), micro-ondas e radiofrequência (RF). Na TABELA 1.1 são apresentadas algumas técnicas espectroscópicas de análise.

Para um espectro de absorção molecular UV/Vis, o comprimento de onda absorvido tem correlação direta com a transição eletrônica, e conseqüentemente, com o tipo de ligação química na molécula, por exemplo, ligações π conjugadas, presentes em estruturas ressonantes, ou ligações σ . Contudo, outros tipos de energias estão envolvidos, como as energias de rotação e vibração, gerando comprimentos de onda próximos à energia da transição eletrônica. Por isso, dependendo do estado físico e do solvente são observadas bandas de absorção. Assim, a banda de absorção é formada pela combinação de muitas diferentes linhas resultantes da energia vibracional, rotacional e da transição eletrônica podendo formar uma banda espectral contínua^{1,2}.

TABELA 1.1 - Exemplo de técnicas espectroscópicas. Interação da REM com a amostra

Tipo de transferência de energia	Região da REM	Técnica espectroscópica
Absorção	Raio γ	Espectroscopia de Mössbauer
	Raios X	Absorção de raios X
	UV/Vis	Espectroscopia UV/Vis
	IR	Espectroscopia infravermelho Espectroscopia Raman
	Micro-ondas	Espectroscopia micro-ondas
	Radiofrequência	Espectroscopia de ressonância de spin eletrônico Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
Emissão (excitação térmica)	UV/Vis	Espectroscopia de emissão
Fotoluminescência	Raios X	Fluorescência de raios X
	UV/Vis	Espectroscopia de fluorescência Espectroscopia de fosforescência
		Espectroscopia de fluorescência atômica
Quimiluminescência	UV/Vis	Espectroscopia de quimiluminescência

Quando a radiação eletromagnética UV/Vis incide sobre um cromóforo no comprimento de onda em que ocorre a absorção, a molécula passa do estado fundamental para o estado excitado. Nesse processo, ocorre promoção de um elétron ou mais elétrons do estado fundamental para níveis de energia mais elevados e, em seguida, retorna para o estado fundamental por um processo de relaxação não-radiativa.

Entretanto, quando um átomo ou molécula no estado excitado retorna ao estado fundamental e o excesso de energia é liberado na forma de fótons, ocorre de forma geral a luminescência. Nesse caso, chama-se de fotoluminescência, pois a excitação se deu pela absorção de radiação eletromagnética UV/Vis. Existem outras classes de luminescência, como por exemplo: termoluminescência, sonoluminescência, triboluminescência, radioluminescência, eletroluminescência e quimiluminescência²⁻⁴.

Outra forma de classificação pode ser usada. Nesse caso, considera-se o tipo de transição eletrônica presente na molécula, classificadas como

fluorescentes ou fosforescentes. Essa molécula capaz de emitir radiação na forma de fóton é denominada de fluoróforo.

De forma simplificada, um fluoróforo pode ser classificado como fluorescente ou fosforescente levando-se em consideração o tempo necessário para liberar a energia, na forma de fóton, ao retornar ao estado fundamental. Para fluorescência, esse tempo é da ordem de 10^{-15} s, enquanto que para a fosforescência esse tempo está na ordem de microssegundos a segundos^{5,6}.

Essa grande diferença entre a fluorescência e a fosforescência no tempo para se completar o ciclo, isto é, da excitação até a emissão do fóton, deve-se a mudança da orientação do spin no elétron no processo de excitação. Na fluorescência, a transição eletrônica dá-se do estado singleto S_0 para um outro estado singleto de maior energia, S_1 , com o spin do elétron na mesma orientação. No entanto, para fosforescência, a orientação do spin é invertida, denominado tripleto, T_1 , estado de maior energia. Assim, para retornar ao estado fundamental, uma espécie fosforescente requer maior tempo, pois a mesma deve assumir a orientação que possuía quando estava no estado fundamental.

Parte da energia absorvida é liberada por um processo denominado de relaxação não-radiativa que são classificadas em: relaxação vibracional e conversão interna. Na relaxação vibracional a perda de energia se dá pelas colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente, enquanto que a conversão interna se dá pela passagem de níveis mais altos para os respectivos subníveis de energia menores mais próximos. Estes dois processos, resultam em um aumento da temperatura do meio. Além disso, a relaxação vibracional faz com que espectro de fluorescência seja maior que o espectro de absorção segundo a regra de Stokes, onde a energia liberada é menor que a energia usada para excitação da espécie².

1.1 TÉCNICA ESPECTROFOTOMÉTRICA

A espectrofotometria utiliza-se da interação da radiação eletromagnética com a espécie de interesse na faixa do ultravioleta e visível (UV/Vis) que corresponde à faixa da REM de comprimentos de onda entre 190 nm e 780 nm².

A quantização da energia envolvida no processo de absorção, isto é, que leva a molécula do seu estado fundamental para o estado excitado, pode ser de acordo com a EQUAÇÃO 1.1^{1,7}.

$$E_{ab} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (1.1)$$

Onde, E_{ab} é a energia absorvida, E_{el} é a energia devido à transição eletrônica, E_{vib} é a energia vibracional e E_{rot} é a energia rotacional.

No espectro de absorção, a principal contribuição energética é devido à energia eletrônica, mas energias associadas a transições vibracional e rotacional também ocorrem, no entanto, em menor proporção.

A radiação eletromagnética possui uma frequência (ν , Hz), dada por um período T (s), que é o tempo entre dois pontos idênticos da função senoidal que descreve a propagação da REM. Por sua vez, a distância em unidades de comprimento entre estes dois pontos idênticos é denominada de comprimento de onda (λ). Através do comprimento de onda, da frequência (ν) da REM e utilizando a constante de Planck ($h = 6,62 \times 10^{-34}$ J s) e a velocidade (c) de propagação do fóton no vácuo ($\sim 3 \times 10^8$ m s⁻¹), pode-se calcular a energia referente ao fóton absorvido ou emitido. Assim, a energia (E) de um fóton é igual ao produto da constante de Planck e da frequência, EQUAÇÃO 1.2.

$$E = h \nu = h c / \lambda \quad (1.2)$$

Os elétrons em uma molécula podem ser compartilhados de diferentes formas, originando a seguinte classificação:

- Elétrons em uma ligação covalente σ , fortemente ligados, necessitam, portanto, de altas energias para excitação;
- Elétrons localizados em orbitais não ligantes na forma de pares livres ou isolado como, por exemplo, nos átomos de Cl, O, e N que podem ser excitados por radiação de energia mais baixa;
- Elétrons em ligação dupla ou tripla (π) que podem ser excitados com certa facilidade, sendo então promovidos por radiação de energia ainda menor.

Um cromóforo constitui um grupo ou conjunto de átomos que interage com a REM, sendo assim uma espécie de sítio de absorção de REM, geralmente na região do UV/Vis. Este grupo tem invariavelmente ligações duplas ou triplas, pares de elétrons isolados e/ou podem estar associados a grupos funcionais, tais como: o grupo nitro, carbonila, entre outros. O cromóforo quando conjugado com ligações insaturadas múltiplas, requererá a absorção de REM com menor energia, sendo assim, ocorrerá em comprimentos de onda maior².

1.1.1 Lei de Lambert-Beer

Os pesquisadores Johann Heinrich Lambert e August Beer propuseram uma forma de quantificação de espécies químicas em solução, que ficou conhecida como Lei de Lambert-Beer^{1,2,8}.

A definição proposta por essa lei estabelece que a REM monocromática absorvida pela espécie química, denominada de absorbância, $A(\lambda)$, é produto do coeficiente de absortividade molar (ϵ , mol⁻¹ cm⁻¹), comprimento do caminho óptico (l , cm) e a concentração do cromóforo (C , mol L⁻¹)^{1,9}.

Em uma solução, uma determinada parcela da REM, com um dado comprimento de onda (luz monocromática) é absorvida, cuja unidade é conhecida como absorbância. A absorbância descrita pela lei de Lambert-Beer é representada matematicamente pela EQUAÇÃO 1.3.

$$A(\lambda) = \epsilon l C \quad (1.3)$$

Experimentalmente, a absorbância² é encontrada pelo logaritmo da radiação transmitida, I_λ , pela radiação incidente, I_λ^0 , conforme a EQUAÇÃO 1.4.

$$A(\lambda) = -\log \frac{I_\lambda}{I_\lambda^0} \quad (1.4)$$

Considerando que, o caminho óptico e a absortividade molar são constantes, resta apenas a concentração como variável. Assim, a absorbância torna-se diretamente proporcional a concentração da espécie em solução (analito de interesse).

Rearranjando as EQUAÇÕES 1.3 e 1.4, pode-se obter o coeficiente de absorvidade molar a partir de dados experimentais, dada pela EQUAÇÃO 1.5.

$$A(\lambda) = -\log \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda}^0} = \varepsilon l C \quad (1.5)$$

Para a determinação da concentração de uma determinada espécie, o método da curva analítica pode ser empregado. Neste método, tomam-se os dados de absorbância de soluções padrões que contenham concentrações conhecidas do analito de forma a se construir a respectiva curva analítica. Graficamente, a faixa dinâmica da curva analítica pode ser representada pela EQUAÇÃO 1.6, que relaciona o sinal analítico de absorbância com a concentração do analito.

$$A(\lambda) = a C \quad (1.6)$$

Onde a , é o coeficiente angular da reta e representa a sensibilidade analítica do método. Sendo assim, quanto maior o coeficiente angular, maior será a sensibilidade do método.

Obtendo-se a curva analítica para um dado cromóforo, pode-se fazer a leitura do sinal de absorbância do analito em uma amostra de concentração desconhecida e determinar qual é a concentração da espécie de interesse em solução.

Os cromóforos possuem diferentes intensidades de absorção, devido a diferentes absorvidades molares, que dependem das características de cada molécula. Para obter o espectro de absorção de um dado cromóforo, são utilizados instrumentos capazes de verificar a absorbância na faixa de comprimentos de onda da faixa UV/Vis do espectro.

A obtenção do espectro de absorção de um cromóforo se dá basicamente variando-se o comprimento de onda da REM incidente sobre a amostra com um conjunto óptico contendo um prisma ou uma rede de difração.

Durante os ensaios, identifica-se o comprimento de onda que apresenta a maior absorbância, pois, quanto maior a absorbância mais elevada

poderá ser a sensibilidade analítica e maior a probabilidade de atender a lei de Beer pois a absorvância é quase constante.

Entretanto, quando um dado cromóforo de interesse apresenta baixa absorvância, pode-se utilizar como alternativa cubetas de longo caminho óptico. Deste modo, como apresentado anteriormente, a absorvância é proporcional ao caminho óptico que contém a solução e isto deverá compensar a baixa absorvância molar do analito alvo.

1.1.2 Relação entre a fluorescência e a concentração

O método fluorimétrico tem como vantagens principais sua elevada sensibilidade e seletividade. Além disso, apresenta a possibilidade do uso de fibra óptica, permitindo diversas vantagens do uso da técnica⁵.

A intensidade da radiação fluorescente depende de alguns fatores. Os principais são o rendimento quântico (ϕ) e a concentração (mol L^{-1}) do fluoróforo em solução. O rendimento quântico representa a fração de moléculas que foram excitadas e que ao retornarem aos estados de menor energia emitem fótons fluorescentes em determinado comprimento de onda. Vale salientar que o solvente, o pH do meio (concentração hidrogeniônica) e a viscosidade também podem interferir no ϕ .

Experimentalmente, a intensidade da radiação fluorescente emitida, I_F , é medida em função de um determinado comprimento de onda, $I_F(\lambda_F)$, sendo proporcional ao rendimento quântico (ϕ) e a intensidade absorvida em um determinado comprimento de onda. A intensidade da REM absorvida corresponde a diferença entre as intensidades das REM incidente, I_λ^0 , e transmitidas, I_λ . Onde, a fluorescência é representada pela EQUAÇÃO 1.7.

$$I_F = K\phi (I_\lambda^0 - I_\lambda) \quad (1.7)$$

Onde K é um fator de proporcionalidade. Esse fator depende da configuração óptica do instrumento que inclui o monocromador, largura das fendas de entrada e saída da REM, radiação espúria entre outros.

Rearranjando-se a equação proposta por Lambert-Beer, EQUAÇÃO 1.5, obtém-se a intensidade da REM transmitida, I_λ , EQUAÇÃO 1.8.

$$I_\lambda = I_\lambda^0 10^{-\varepsilon l C} \quad (1.8)$$

Substituindo os termos da EQUAÇÃO 1.8 na EQUAÇÃO 1.7 obtém-se a intensidade de radiação fluorescente.

$$I_F = K \phi_\lambda I_\lambda^0 (1 - 10^{-\varepsilon l C}) \quad (1.9)$$

Aplicando-se a expansão do termo $10^{-\varepsilon l C}$, a EQUAÇÃO 1.9 é convertida na EQUAÇÃO 1.10.

$$I_F = K \phi_\lambda I_\lambda^0 \left[2,3\varepsilon l C - \left(\frac{2,3\varepsilon l C}{2!} \right)^2 - \left(\frac{2,3\varepsilon l C}{3!} \right)^3 \right] \quad (1.10)$$

No entanto, se o produto de $\varepsilon l C = Ab(\lambda)$ for menor que 0,05 o primeiro termo dentro dos colchetes, $2,3\varepsilon l C$, pode-se desprezar os termos quadráticos, cúbicos etc resultando em uma nova constante, K'' . Simplificando, tem-se²:

$$I_F = K'' C \quad (1.11)$$

1.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os métodos fotométricos e fluorimétricos têm como princípio o emprego da REM incidente sobre a amostra⁹. No entanto, eles diferem quanto ao tipo de interação da REM com a espécie química de interesse. No método fotométrico⁹, parte da REM é absorvida por uma espécie química, atenuando a REM transmitida que atinge o fotodetector, que se encontra a um ângulo de 180° em relação a fonte de REM, FIGURA 1 (a). No método fluorimétrico⁹, a espécie

fluorescente absorve parte da REM incidente e, emite fótons radialmente entre 0 a 360°. Estes fótons estão associados a uma REM que possui um comprimento de onda maior que aquele da radiação incidente. Convencionalmente, o fotodetector é posicionado a um ângulo de 90° em relação à fonte de excitação, FIGURA 1 (b).

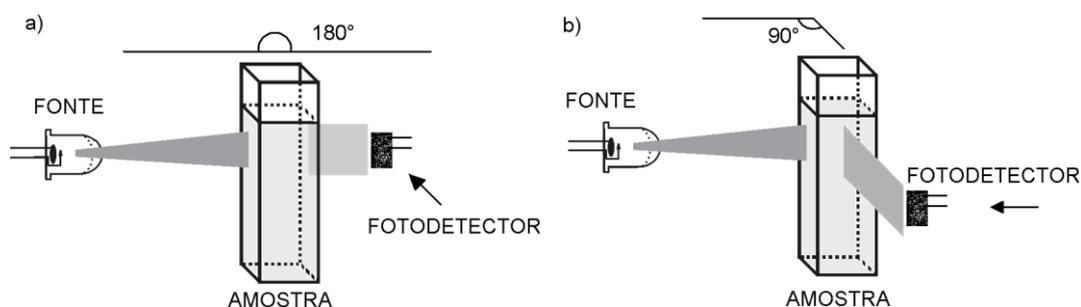


FIGURA 1.1 - Esquema representativo do posicionamento da fonte de REM e do fotodetector no método: **a)** fotométrico e **b)** fluorimétrico.

Na FIGURA 1.1, pode-se ver um esquema resumido de como é o princípio essencial de funcionamento de um fotômetro e de um fluorímetro. Vale lembrar que além da fonte de radiação, fotodetector e da cubeta, os seguintes dispositivos são necessários: componentes ópticos, sistema de controle e aquisição de dados.

1.2.1 Componentes básicos de fotômetros e fluorímetros

Para medir-se a absorbância dos cromóforos em solução podem-se usar os seguintes instrumentos: fotômetros e espectrofotômetros, e no caso da fluorescência: fluorímetros ou espectrofluorímetros.

O princípio de funcionamento de cada um desses instrumentos são basicamente os mesmos, sendo estes constituídos essencialmente por:

- Fonte de REM;
- Conjunto óptico: monocromador ou filtro óptico;
- Cubeta da amostra;
- Fotodetector;
- Registrador de sinal, monitor ou dispositivo de interface humana.

As fontes de REM emitem geralmente em uma faixa de comprimentos de onda, exceto o *laser*. Dessa forma, por não empregar uma REM monocromática, estas conduzem a desvios de linearidade na lei de Lambert-Beer, e também interferindo indiretamente na sensibilidade analítica. Por isso, é essencial o uso de um conjunto óptico, pois somente o comprimento de onda de máxima absorvância deve interagir com a espécie química de interesse, alcançando o fotodetector. Neste sentido, o conjunto óptico mais eficiente é baseado no uso de monocromador, sendo os filtros ópticos os de menor eficiência. A REM selecionada pelo monocromador ou uma estreita faixa de λ permitida pelo filtro óptico é, transmitida pela cubeta alcançando o fotodetector, que por sua vez, atua como transdutor, enviando os dados para o registrador de sinal.

Geralmente no procedimento experimental, o que se registra são as intensidades incidentes (I_{λ}^0) e transmitidas (I_{λ}). A intensidade incidente será registrada quando na cubeta contiver a solução sem a presença do cromóforo de interesse. Este procedimento é realizado para que REM espúrias sejam eliminadas, como também amenizar a influência de efeitos reflexivos e espalhamento, inerentes do próprio instrumento. Essa solução é chamada de solução de branco. Em seguida, a I_{λ} das amostras contendo o cromóforo com diferentes concentrações são obtidas e empregadas na construção de uma curva analítica.

Nos tópicos seguintes serão descritos a funcionalidade e algumas das principais características de cada um destes componentes de interesse instrumental e químico.

1.2.2 Fonte de radiação

As principais propriedades que se espera de uma fonte de REM é que seja estável e com uma longa vida útil. Essas fontes são classificadas em contínuas e de linhas¹⁰.

Uma fonte contínua emite radiação em uma faixa de comprimentos de onda ampla, onde apresenta uma variação relativamente suave. As fontes de linhas emitem a maior parte de sua radiação em comprimentos de onda discretos. Abaixo são apresentadas algumas fontes^{2,3,11}.

Fontes contínuas de REM:

- Lâmpada de filamento de tungstênio, 320-2400 nm, iniciando em um comprimento de onda útil a partir de 350 nm.
- Lâmpadas de halogênio-tungstênio, também chamada de lâmpada de quartzo halógenas, 240-2500 nm, que apresentam emissão em parte do ultravioleta e visível.
- Lâmpada de cátodo ôco.

Lâmpada de deutério, 160-380 nm, emitindo REM com elevada intensidade na faixa do ultravioleta;

- Lâmpada de arco de xenônio possui emissão que se estende de 190 nm até 1000 nm;
- LED (do inglês, *Light Emitting Diode*) apresentam emissão entre 240 nm e 850 nm.

Fontes de linhas:

- Lâmpada de mercúrio;
- *Laser*, fontes de REM que possuem emissão de radiação intensa em comprimento de onda característico que dependem do elemento químico em sua composição: 694,3 nm (Cr), 532 nm (Nd), 514,5nm (Ar⁺), 351 nm (Kr⁺) e 193 nm (ArF).

1.2.3 Fotodetector

Os fotodetectores são componentes eletrônicos capazes de fazer a conversão da potência radiante emitida por uma fonte de REM que incide em sua superfície, em sinal elétrico (analógico), sendo assim, fototransdutores. Por sua vez, os sinais elétricos são coletados e interpretados por um sistema de controle e aquisição de dados.

Os principais parâmetros para a escolha de um fotodetector, além de se considerar a relação custo/benefício, são:

- Sensibilidade;
- Tempo de resposta;
- Coeficiente de temperatura;
- Diferença de potencial na alimentação;
- Tempo de estabilização;
- Ganho;
- Faixa de resposta;
- Custo.

Alguns trabalhos científicos encontrados fornecem orientações sobre os principais sensores e suas funcionalidades. Dentre os fotodetectores mais utilizados estão: as células fotomultiplicadoras, fotodiodos, ADP (*Avalanche Photodiode*), CCD (*Charge Coupled Device*) e fotodetectores inteligentes (FDI)^{3,12}.

Os FDIs são componentes eletrônicos fotossensíveis capazes de pré-processar o sinal da radiação eletromagnética, resultando em menor nível de interferência na transdução do sinal, sendo então, coletado diretamente pelo dispositivo de aquisição e processamento dos dados¹³⁻¹⁵.

1.2.4 Compartimento de amostragem

A cubeta é um pequeno frasco de faces internas e externas planas, pelo qual a radiação é transmitida. Geralmente a distância entre as faces é de 10 mm. Os principais materiais usados em cubeta são o quartzo, o vidro e o plástico que sejam transparentes a REM de interesse. Cubetas de quartzo são as que possuem melhor qualidade, por não possuírem significativa absorção de REM na região do ultravioleta.

1.2.5 Conjunto óptico para seleção do comprimento de onda

Em princípio faz-se necessário um conjunto óptico para a seleção da radiação eletromagnética de trabalho, isto é, aquela que interage com a espécie de interesse, seja a REM incidente ou emitida. A faixa de comprimentos de onda ou a

REM monocromática deve ser separada daquelas que advenham da fonte de REM policromática.

Em um seletor de comprimento de onda ideal não há perdas na transmissão da REM transmitida e apresenta estreita banda passante. Uma alta transmissão é desejada, pois quanto mais fótons passam, menor será o ruído. A estreita banda passante garante melhor resolução, onde características espectrais serão mais bem resolvidas.

1.2.5.1 Filtros ópticos

São componentes ópticos mais simples que permitem a transmissão de REM em um intervalo de comprimento de onda. Eles são classificados basicamente em filtros de absorção ou de interferência⁹. Com uso de filtros ópticos nos métodos fotométricos seleciona-se uma faixa de comprimentos de onda que interage com as espécies em solução.

Geralmente os fotodetectores apresentam ampla faixa de resposta no espectro eletromagnético, que os tornam susceptíveis a ruídos, por isso, filtros ópticos são indispensáveis para obtenção de bons resultados.

Os filtros de absorção, em geral, apresentam faixas espectrais de 20 a 50 nm de largura e suas transmitâncias máximas estão entre 5 a 20 %. Filtros de interferência são mais caros do que os filtros de absorção, mas têm larguras de banda mais estreita, tipicamente 10 a 20 nm, com perda de transmitância de cerca de 40%.

Como as fontes de radiação de instrumentos de fluorescência são geralmente potentes, os filtros ópticos são úteis para impedir a passagem de radiação espúria, e até mesmo a saturação do sinal do fotodetector.

1.2.5.2 Monocromadores

Os monocromadores são componentes ópticos que formam um sistema capaz de dispersar ou difratar os comprimentos de onda constituintes de REM policromáticas em uma ampla faixa de comprimentos de onda.

Nos espectrofotômetros e espectrofluorímetros esses componentes são essenciais para a varredura de comprimento de onda para obtenção de um

espectro característico de absorvência de uma dada espécie permitindo que apenas comprimentos de ondas discretos incidam sobre o fotodetector. De forma similar, o mesmo pode ser utilizado na obtenção do espectro característico de um dado fluoróforo durante a fluorescência.

Um monocromador é constituído basicamente de uma fenda de entrada, de um elemento de dispersão de radiação e de uma fenda de saída. A REM passa pela fenda de entrada e ao incidir sobre o elemento de dispersão e na fenda de saída tem-se o comprimento de onda desejado.

Os monocromadores podem ser divididos em dois grupos: prismáticos ou reticulares. Estes podem incluir os seguintes componentes ópticos: lentes, espelhos, fendas, prismas e redes de difração. Nos monocromadores prismáticos feixes de REM passam pela fenda de entrada e incidem sobre a face do prisma, sofrendo, portanto, dispersão refrativa que, seguido por uma fenda de saída, seleciona-se o comprimento de onda incidente sobre o fotodetector.

O principal componente de dispersão nos monocromadores reticulares é a rede de difração. Este componente tem como princípio a difração da radiação baseado no fenômeno de interferência. O comprimento de onda de uma REM policromática incidente sobre este elemento resulta em comprimentos de onda discretos espaçados. Sendo, portanto, selecionados pela fenda de saída. As redes de difração possuem um poder de resolução mais elevado que os prismas e podem ser utilizadas em todas as regiões espectrais⁹.

1.2.6 Sistema de controle e aquisição de dados

Segundo o “*Orange Book*”¹⁶ os instrumentos utilizados no processamento e aquisição de dados são classificados considerando-se o tipo dos dados de saída. Nesse caso, os dados de saída podem ser na forma de transmitância, absorvência, fluorescência etc., podendo estar na forma de sinal analógico ou digital. No processamento dos dados podem ser aplicadas equações para a média intensidade de radiação, a relação sinal/ruído e ajuste da linha base.

Além disso, o sistema de controle pode atuar no ajuste da intensidade da fonte de REM, no ajuste do conjunto óptico, acionamento do sensor e envio do sinal processado a interface máquina-usuário.

Atualmente todas as funcionalidades necessárias para a formação de um sistema de controle podem ser reunidas em um único dispositivo eletrônico, o microcontrolador^{17,18}. Este dispositivo engloba circuito eletrônico de controle, interface analógica/digital, memória e processamento de dados. Além disso, é reprogramável, possibilitando flexibilização em aplicações diversas.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O primeiro espectrofotômetro foi feito pela empresa Beckman Coulter Inc. em 1940. Este instrumento foi desenvolvido pelo químico Arnold O. Beckman (1900 - 2004) em um projeto sob liderança do engenheiro Howard Cary (1908 - 1991)¹⁹.

A empresa *Cecil Instruments* foi também uma das grandes contribuintes no desenvolvimento de espectrofotômetros. Em 1975, foram desenvolvidas versões de espectrofotômetros de duplo feixe. Em 1981, produziu-se um espectrofotômetro controlado por um microprocessador, tornando-o um dispositivo automatizado e mais rápido²⁰.

Nos anos 90, estes instrumentos passaram a ser controlados por computador, que exibiam na tela os espectros resultantes por meio de software. Esses avanços devem-se às novas tecnologias em componentes eletrônicos como: conversor analógico-digital (A/D), microprocessador e amplificadores eletrônicos.²¹

Nas últimas décadas encontram-se na literatura fotômetros e fluorímetros^{9,17} com novas características como: portabilidade, baixo custo e baixo consumo de energia^{17,22-30}. Esse bom desempenho foi possível devido ao surgimento de componentes eletrônicos de menor custo e baixo consumo de corrente, entre eles, destacam-se os microcontroladores^{22,31}, LED^{32, 23,33}, fotodetectores e mostradores digitais LCD (do inglês, *Liquid Crystal Display*).

1.3.1 Fotômetros com LED

Palma e colaboradores³⁴ desenvolveram um fotômetro portátil para a determinação de potássio e nitrato. O circuito eletrônico desenvolvido para o instrumento foi implementado para compensar possíveis alterações do sinal devido a

mudanças de temperatura. Um programa simples foi desenvolvido e gravado no microcontrolador viabilizando o uso do instrumento para aplicação em campo por pessoal não treinado. Obteve-se uma faixa linear de trabalho para o íon nitrato de 2×10^{-6} a 1 mol L^{-1} com $R = 0,9998$ e para o íon potássio foi obtido uma faixa linear de trabalho de 5×10^{-6} a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com $R = 0,9998$.

Lima³⁵ desenvolveu um fotômetro NIR (do inglês, *Near Infrared Region*) portátil usando dois LEDs, com máxima emissão em 1300 nm e 1689 nm, como fontes de radiação. O instrumento desenvolvido foi aplicado à determinação de compostos aromáticos (BTX, Benzeno, Tolueno e Xileno) em amostras de água contaminada por gasolina. Comparando-se o desempenho do instrumento desenvolvido com instrumentos comerciais, os resultados foram compatíveis há um nível de confiança de 95%.

Fonseca e Raimundo Jr.³⁶ desenvolveram um método simples para discriminação de água utilizando um fotômetro multi-LED (emissão em 470, 500, 525, 562, 590, 612, 636 e 654 nm), reagentes cromogênicos (murexida, eriocromo T e 4-(2-pyridylazo) resorcinol) e ferramentas quimiométricas. As ferramentas quimiométricas utilizadas foram PCA (do inglês, *Principal Component Analysis*), HCA (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) e SIMCA (do inglês, *Soft Independent Modelling of Class Analogy*) próprias para a classificação. Nesse estudo as principais espécies que contribuíram para o modelo foram os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Além do uso típico de LEDs como fonte de radiação Tymecki e colaboradores³⁷ desenvolveram um fluorímetro usando LED como sensor para determinação de riboflavina. Para tanto, utilizaram-se dois LEDs como fonte de excitação das espécies, e o terceiro como sensor do instrumento. Em outro trabalho, Pokrzywnicka e colaboradores³⁸ desenvolveram o conceito de um fotômetro/fluorímetro usando um LED como fonte de radiação e outros dois LEDs como sensor. Segundo a configuração proposta, um dos LED/sensor foi posicionado a 180° em relação a fonte de REM, e o outro a 90° . Atendendo, portanto, a configuração básica de um fotômetro e de um fluorímetro, respectivamente.

Baseado no efeito Schlieren, Diniz *et al.*³⁹ desenvolveram um sistema fotométrico usando LED para determinação de NaCl, KCl e glicose em drogas injetáveis. Os dados das amostras foram processados com a ferramenta quimiométrica PLS (do inglês, *Partial Least Squares*).

1.3.2 Fluorímetros com LED

Muitos fluorímetros têm sido desenvolvidos usando-se LEDs³² como fonte de REM para excitação das espécies fluorescentes.

Wigton e colaboradores⁴⁰ demonstraram como desenvolver um fluorímetro de baixo custo para uso em laboratórios de ensino. O mesmo foi aplicado na determinação de vitamina B1 em amostras comerciais. O instrumento desenvolvido apresentou bom desempenho e o custo total foi de cerca de U\$ 80,00.

Pokrzywicka e colaboradores⁴¹ desenvolveram um fluorímetro compacto para determinação de cálcio em fluxo. O instrumento possuía três LEDs, onde dois atuaram como fonte de excitação (475 nm) e o outro como fotodetector (630 nm). A célula em fluxo deste sistema possuía capacidade de 60 µL, onde foram analisadas amostras de água mineral e fluidos fisiológicos humano (soro e urina) contendo cálcio. Para isso, usou-se a calceína como fluoróforo, sendo o sistema capaz de analisar cerca de 60 amostras por hora.

Heart e Jiji⁴² desenvolveram um método espectrofluorimétrico utilizando uma matriz de LEDs (370, 430, 470, 505, 530, 590 e 636 nm) em série para excitação das espécies fluorescentes, e uma câmera CCD com resolução de 1024 x 256 pixel como dispositivo de detecção. Usando o instrumento multi-LED aliado ao método quimiométrico foram estudadas sete espécies fluorescentes: fluoresceína monoaniônica, fluoresceína dianiônica, Rodamina B, di-n-fenilantraceno, vermelho do Nilo (Nile Red), 9-10-bis(feniletinil)antraceno e safranina. Com o trabalho proposto limites de detecção menores que 5 ppb e elevada sensibilidade analítica.

1.3.3 Instrumentação microcontrolada em Química Analítica

Nas últimas décadas, os microcontroladores têm sido o principal componente usado para controle de instrumentos de análises químicas. Na TABELA 1.2 são apresentados alguns instrumentos desenvolvidos com este dispositivo.

TABELA 1.2 - Instrumentos microcontrolados em química analítica

Autor	Ano	Instrumento	Microcontrolador
Veras et al.	2009	Espectrofotômetro	PIC16F877 ²³

Neelamegam et al.	et	2010	Potenciometro	ATmega8535 ⁴³
Sourouraddin al.	et	2011	Fotocolorímetro	MC2051 ³⁰
Devaraju et al.		2011	Analizador termogravimétrico	PIC16F877A ⁴⁴
Santos et al.		2011	Nefelômetro	PIC18F4550 ⁴⁵
Esrabili et al.		2012	Cromatógrafo líquido	AVR ⁴⁶
Santos et al.		2012	Turbidímetro	PIC18F4550 ⁴⁷
Laskar et al.		2013	Refratômetro	ATmega 32 ⁴⁸
Dias et al.		2014	Fotômetro	PIC18F4550 ⁴⁹
Cruz et al.		2014	Potenciostato	BeagleBone ⁵⁰
Koczor et al.		2015	Ressonância magnética	BeagleBone ⁵¹

1.4 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS FOTOMÉTRICO E FLUORIMÉTRICO

1.4.1 Determinação da estequiometria de um complexo

A medida ou a quantidade de elementos químicos é definida como estequiometria. Essa terminologia foi introduzida por Richter, um químico alemão que publicou em 1792 um trabalho intitulado "*Lei das proporções recíprocas*", que permite obter a fórmula química dos compostos^{52,53}. Assim, por meio de cálculo estequiométrico pode-se calcular as quantidades de matéria das substâncias que participam de uma reação química a partir de outras quantidades de matéria (ou massa) conhecidas⁵⁴.

Partindo desse princípio, introduzido por A. L. Lavoisier em 1774⁵⁵, conhecido como a Lei da Conservação das Massas, verificou-se que a massa dos reagentes numa reação era a mesma massa encontrada nos produtos, após a reação.

Em seguida, surgiu a Lei das Proporções Constantes que foi introduzida pelo químico L. J. Proust em 1801. Essa lei diz: "Uma determinada substância composta é formada por substâncias mais simples, unidas sempre na mesma proporção em massa". Assim, a partir da Lei de Proust deu-se origem aos cálculos estequiométricos⁵⁶.

Existem alguns métodos que podem ser utilizados para se obter informação sobre a estequiometria de formação de complexos como o método de Yoe & Jones (ou método razão molar)⁵⁷, método de Job (ou método das variações contínuas) e diagrama de Scatchard^{58,59}. Esses métodos podem determinar se um ligante polidentado, L_y , coordena-se com um, dois, ou mais íons metálicos, M_x . Estes métodos permitem também a determinação da constante de formação de um complexo estável com um ligante, M_xL_y ⁶⁰. No entanto, o método desenvolvido por Job é preferível para reações em que as proporções do metal:ligante sejam de 1:1⁶¹.

Muitos dos complexos formados por M_xL_y são cromóforos. Desta forma, o produto da reação pode ser determinado por medidas de absorvância. Assim, pode-se fazer um estudo da razão metal:ligante mantendo-se constante a concentração total das espécies $[M_x]$ e $[L_y]$. Nessa metodologia, quando a estequiometria do complexo é alcançada a absorvância se mantém constante.

1.4.1.1 Método da razão molar

A orto-fenantrolina (*o*-Fen) é um ligante bidentado (L_y) que forma um complexo com o ferro(II) (M_x). Este complexo apresenta máxima absorvância em 510 nm ao ser formado⁶². Para fins didáticos, considera-se a razão metal:ligante desconhecida, como mostrado na EQUAÇÃO 1.12^{63,64}.



No método das razões molares, representa-se a absorvância da solução contendo uma concentração fixa de um dos reagentes em função do volume do outro. Um gráfico similar ao apresentado na FIGURA 1.2 é obtido. No ponto de intersecção das duas retas, encontra-se o ponto em que as concentrações atingiram proporções estequiométricas.

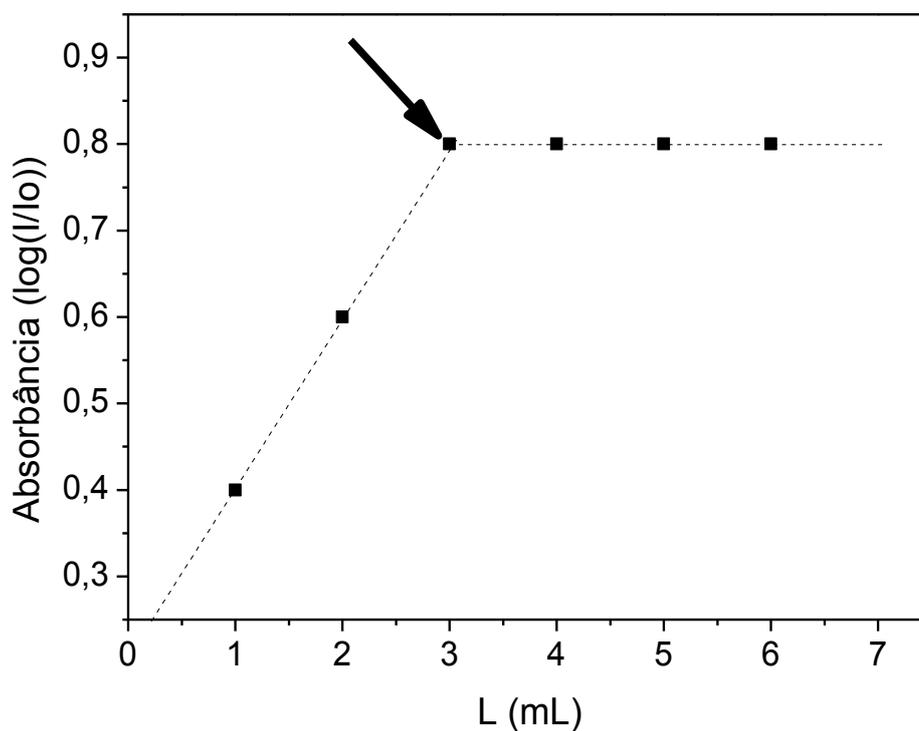


FIGURA 1.2 - Gráfico hipotético para razão estequiométrica de um complexo: $M_x:L_y$.

Após a obtenção da estequiometria da reação, utilizando-se EQUAÇÃO 1.12 pode-se determinar a constante de formação pela equação do equilíbrio químico, EQUAÇÃO 1.13.

$$K_{M_xL_y} = \frac{[M]^x[L]^y}{[M_xL_y]} \quad (1.13)$$

Para se calcular $K_{M_xL_y}$, deve-se conhecer as concentrações dos reagentes e produtos no equilíbrio. Assim, pode-se tomar como referência o ponto de intersecção, em destaque na FIGURA 1.2. Partindo-se da lei de Lambert-Beer, EQUAÇÃO 1.14.

$$A = \varepsilon b[M_xL_y] \quad (1.14)$$

Obtém-se a concentração do complexo.

$$[M_xL_y] = \frac{\varepsilon \cdot b}{A} \quad (1.15)$$

Rearranjando, obtém-se o coeficiente de absorvidade molar, ε .

$$\varepsilon = \frac{A}{b \cdot [M_xL_y]} \quad (1.16)$$

Onde A , é a absorvância e b , o caminho óptico.

Sabendo que a concentração do produto atinge um limite, isto é, um dos reagentes é o limitante, conseqüentemente, a absorvância torna-se constante. A partir desse valor de absorvância e, da concentração da espécie formada, pode-se calcular o coeficiente de absorvidade molar, EQUAÇÃO 1.16.

Então, pode-se estabelecer um balanço de massa para a concentração de M (C_M) e do ligante (C_L). Onde $C_M = [M] + [M_xL_y]$ e $C_L = [L] + [M_xL_y]$. Rearranjando tem-se:

$$[M] = C_M - [M_xL_y] = C_M - X \left(\frac{A}{\varepsilon b} \right) \quad (1.17)$$

$$[L] = C_L - [M_xL_y] = C_L - Y \left(\frac{A}{\varepsilon b} \right) \quad (1.18)$$

Substituindo na equação da constante de estabilidade tem-se:

$$K_{M_xL_y} = \frac{\frac{\varepsilon \cdot b}{A}}{\left(C_M - X \left(\frac{A}{\varepsilon b} \right) \right)^x \cdot \left(C_L - Y \left(\frac{A}{\varepsilon b} \right) \right)^y} \quad (1.19)$$

1.4.2 Determinação de sulfito

Dentre os agentes químicos utilizados em alimentos para conservação, têm-se os “agentes sulfitantes”, TABELA 1.3⁶⁵⁻⁶⁷. Eles são utilizados como agentes redutores, podendo ser adicionados em alimentos e produtos farmacêuticos^{65,68,69}. Estes compostos inibem a ação provocada pelas bactérias, fungos e leveduras em

alimentos ácidos e na inibição de reações enzimáticas durante o processo de estocagem.

TABELA 1.3 - Fórmulas químicas e números de identificação dos agentes sulfítantes

Substância	Fórmula	INS*
hidrogenossulfito de cálcio	$\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$	227
hidrogenossulfito de potássio	KHSO_3	228
hidrogenossulfito de sódio	NaHSO_3	222
dióxido de enxofre	SO_2	220
metabissulfito de potássio	$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$	224
metabissulfito de sódio	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	223
sulfito de cálcio	$\text{CaSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	226
sulfito de potássio	K_2SO_3	225
sulfito de sódio	Na_2SO_3	221

* INS - Sistema internacional de numeração de aditivos alimentares. Tabela adaptado de TOLEDO⁷⁰.

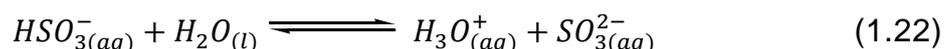
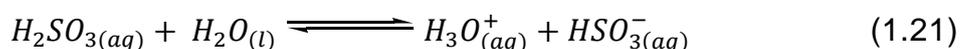
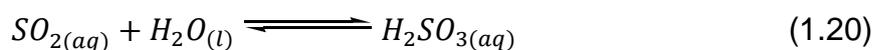
A presença deste aditivo nos alimentos pode proporcionar efeitos diversos à saúde humana, a saber: crise asmática, distúrbios neurológicos, náuseas, irritação gástrica local e urticária⁷¹⁻⁷⁷. Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) limita a concentração de agentes sulfítantes em alimentos^{78,79}, TABELA 1.4.

TABELA 1.4 - Limites máximos permitidos para adição de agentes sulfítantes em bebidas, conforme legislação brasileira vigente⁷⁹

Bebidas	Limite máximo (mg/L) (expresso em SO_2)
Cerveja	20,0
Cooler	350

Licor de frutas	100,0
Refrigerantes	40,0
Saquês	350
Sidras	350
Suco de frutas	200
Vinhos	350
Vinhos de frutas	350

As EQUAÇÕES 1.20-1.22 representam o equilíbrio do dióxido de enxofre que apresenta solubilidade em água de $1,242 \text{ mol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A reação do dióxido de enxofre em água resulta na formação do ácido sulfuroso, HSO_3^- , SO_3^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ dependendo do pH⁷¹.



O metabissulfito ($\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$) presente nos aditivos INS 223 e 224 quando em solução são convertidos em hidrogenossulfito (HSO_3^-), EQUAÇÃO 1.23.



Os valores dos pK_a s para o ácido sulfuroso são 1,91 (pK_{a1}) e 7,18 (pK_{a2}), sendo considerado um ácido fraco. A FIGURA 1.3 apresenta as frações das espécies formadas a partir da dissociação do ácido sulfuroso em função do pH. Em pH inferior a 1,8 as moléculas de SO_2 estão em maior concentração, enquanto que,

na faixa de pH que se estende de 1,9 a 7,2 o hidrogenossulfito encontra-se em concentrações superiores, já em pH superior a 7,2, o íons sulfito prevalecem.

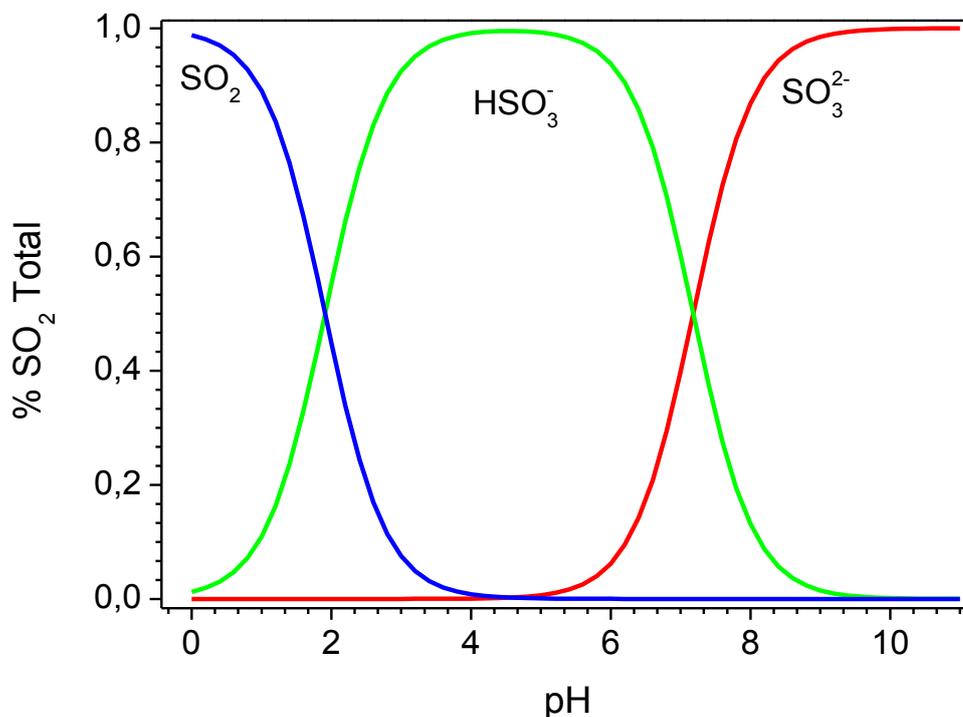
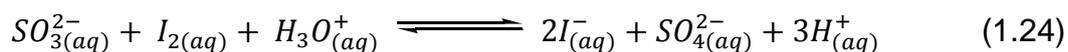


FIGURA 1.3 - Distribuição das espécies ionizadas de dióxido de enxofre em função do pH. Figura adaptada de Vicentini⁸⁰.

1.4.2.1 Método de referência para determinação de sulfito

O método de referência indicado pela *Association of Official Analytical Chemists* é a iodimetria^{81,82}. Esse método consiste na titulação da amostra por uma solução padrão de iodo em iodeto de potássio, usando suspensão de amido como indicador redox. Faz-se o uso de uma solução padrão de iodo (I₂), preparada mediante dissolução do iodo em solução aquosa de iodeto de potássio (KI)⁸³. O iodo é usado diretamente na titulação como oxidante.

Ao final da titulação, o excesso de iodeto reage com a molécula de amido, e uma cor azul escura é observada, indicando o final da titulação, EQUAÇÃO 1.24.

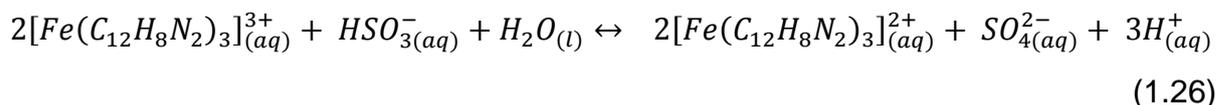
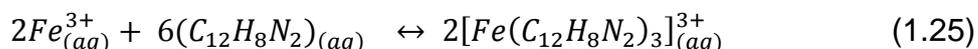


A partir dos volumes consumidos, calcula-se a concentração de sulfito (SO_2) nas amostras.

1.4.2.2 Método fotométrico para a determinação do teor de SO_3^{2-} total

A determinação de sulfito pelo método oficial indicado pela *Association of Official Analytical Chemists*, a iodimetria^{81,82}, envolve uma reação redox mostrada na EQUAÇÃO 1.24.

No método fotométrico desenvolvido em nosso grupo de pesquisa para a determinação deste analito, o sulfito reage com Fe^{3+} complexado com a *o*-fenantrolina ($[Fe(o-Fen)_3]^{3+}$), EQUAÇÃO 1.25, reduzindo este complexo, formando sulfato e um complexo cromogênico ($[Fe(o-Fen)_3]^{2+}$)⁶⁴, EQUAÇÃO 1.26, que possui máxima absorvância em 510 nm⁸⁴⁻⁸⁸.



1.4.3 Determinação de cálcio em água mineral

Um dos parâmetros utilizados para avaliar a qualidade da água, dependendo de suas finalidades, são os níveis de concentração dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . A presença destes íons em água, conhecida como dureza da água, é um dos parâmetros de interesse industrial e consumo humano. O conhecimento da concentração destes íons em água é imprescindível para o destino da mesma, e para que seja realizado o adequado tratamento.

Na indústria, elevadas concentrações desses íons podem causar incrustações nas tubulações, e para o consumo humano apresentar sabor desagradável e efeito laxativo. A dureza da água, geralmente está relacionada ao solo da qual ela foi retirada⁸⁹⁻⁹¹.

Para determinação da dureza da água, a norma brasileira indica o método titulométrico^{89,90,92} usando o EDTA (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*). Um método alternativo para determinação da dureza total está no uso da calceína^{41,93}, um reagente fluorescente.

A reação entre a calceína e os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} segue a mesma estequiometria, resulta também, no mesmo efeito na emissão do fluoróforo⁹⁴. Assim, este método é útil para a determinação da concentração total de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} .

2 Objetivo

Chute o balde, mas não derrame água!

Na literatura não existem instrumentos híbridos fotométricos, tais como fotômetro/fluorímetro usando LED tricolor, microcontrolador e sensor multicanal.

Partindo dessas características, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um instrumento híbrido capaz de funcionar como fotômetro ou fluorímetro. Este instrumento deve dispensar o uso de filtros e monocromadores, empregando LED como fonte de REM e um microcontrolador como unidade central de processamento e controle. Além destas características, ele deve possuir também as seguintes vantagens:

- Portabilidade;
- Baixo custo;
- Compacto;
- Baixo consumo de energia;
- Conexão USB;
- Programa de controle de fácil manipulação.

O *software*, desenvolvido além do controle do instrumento e da aquisição dos dados, deve possibilitar ao usuário ferramentas indispensáveis para a obtenção dos parâmetros analíticos, tais como: curva analítica, equação da reta, coeficiente de correlação linear, sensibilidade analítica, limite de detecção e de quantificação.

Além do que foi exposto, o instrumento híbrido desenvolvido deverá ser uma alternativa viável para utilização em campo, em lugares remotos, e apresente desempenho analítico satisfatório, possibilitando aplicações em estudos de interesse químico. Para isso, o mesmo foi aplicado na determinação da constante de estabilidade e estequiometria de um complexo cromogênico, determinação de sulfito em bebidas, e concentração total de Ca^{2+} e Mg^{2+} em água mineral e a fim de demonstrar algumas alternativas de aplicações do fotômetro/fluorímetro desenvolvido.

3 Desenvolvimento do fotômetro/fluorímetro microcontrolado

Só existe crise, quando há necessidade de mudança!

Para o desenvolvimento do instrumento proposto será apresentado inicialmente um estudo das características dos componentes básicos necessários ao protótipo (P2FM, fotômetro/fluorímetro microcontrolado) e, em seguida, as partes eletrônicas, mecânicas e programação.

3.1 ESTUDO DOS COMPONENTES

Para melhor entendimento das partes que constituem o P2FM proposto, tem-se na FIGURA 3.1 uma representação esquemática dos principais componentes. Nessa representação, há um microcontrolador que atua como unidade de gerenciamento no controle de todos os periféricos a ele conectado. Todavia, os comandos e a transmissão de dados são realizados por uma interface USB, bem como a alimentação do instrumento.

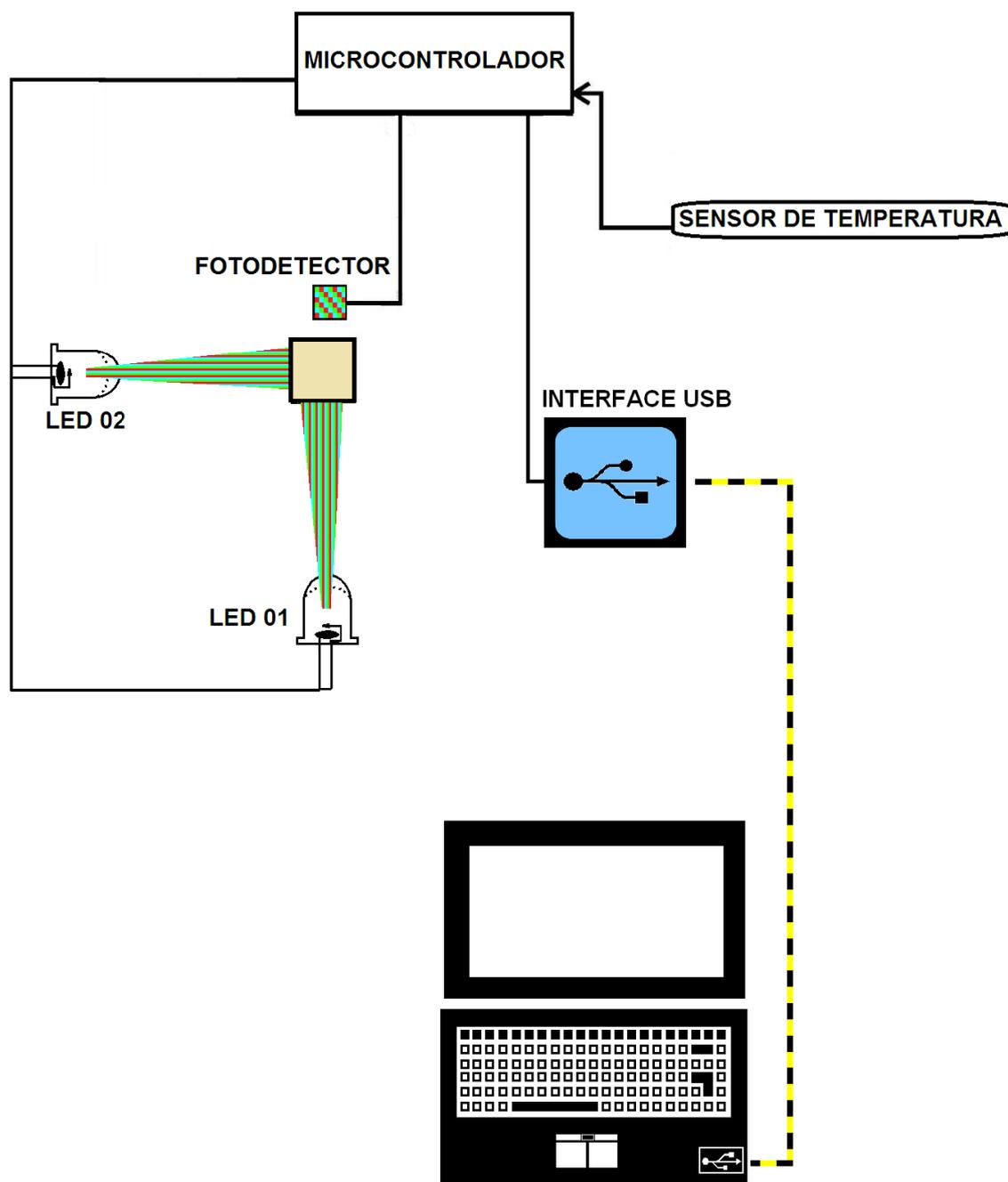


FIGURA 3.1 - Representação esquemática do instrumento desenvolvido com os principais componentes conectados a um microcontrolador PIC-18F2455.

3.1.1 Fonte de alimentação

As fontes de alimentação de dispositivos elétricos/eletrônicos são constituídas por componentes elétricos e eletrônicos configurados de forma a fornecer uma diferença de potencial estável e adequada. Em computadores de bancada ou portáteis, a diferença de potencial é de 5,0 VCC (potencial de corrente contínua). Essas fontes podem fornecer essa diferença de potencial a partir da rede de distribuição, que no Brasil é 110 V ou 220 V com frequência de 60 Hz. Baterias como as usadas em *nobreak* também podem ser utilizadas.

Na FIGURA 3.2, tem-se um esquema representativo da alimentação elétrica de um microcontrolador via interface USB 2.0 de um microcomputador. Com o uso da interface via USB 2.0, que é padronizada para transmissão de dados em potencial de 5,0 VCC, uma corrente de até 300 mA fornece a alimentação do P2FM. Utilizou-se também nesse projeto componentes eletrônicos que operam nesse mesmo potencial.

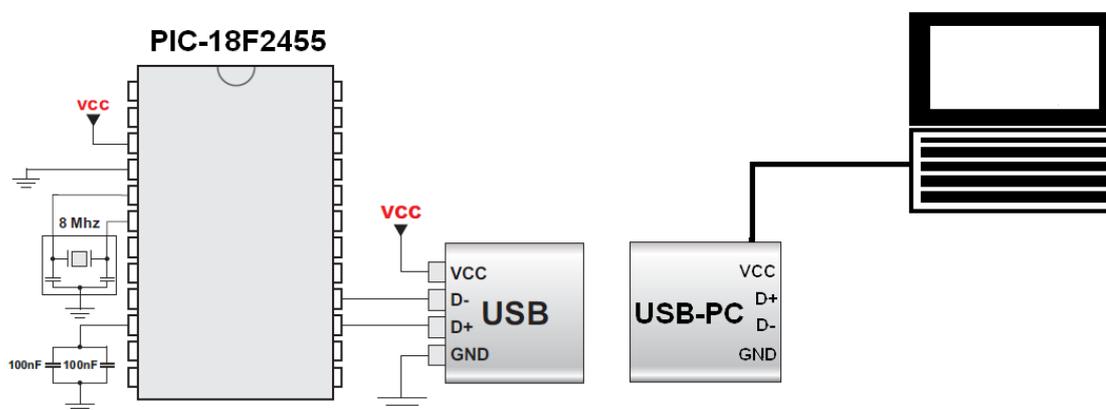


FIGURA 3.2 - Representação da alimentação do microcontrolador via interface USB.

3.1.2 Microcontroladores

Como unidade central de controle do P2FM, utilizou-se um microcontrolador da Microchip modelo PIC18-F2455. O uso deste componente é indispensável para o projeto do P2FM, atuando no controle dos periféricos, processamento e envio de dados. Para que todas essas funções sejam executadas, deve-se gravar previamente em sua memória interna uma rotina de cada uma das funções a serem executadas, por meio de um programa embarcado.

Os microcontroladores estão presentes desde sistemas simples como um relógio, até *Tablets* mais modernos.

Abaixo seguem as principais características do microcontrolador PIC18-F2455 utilizado:

- 2 kbytes de memória *RAM*;
- Tamanho da memória: 24 kbytes;
- Memória *EEPROM*: 256 bytes;
- 24 terminais disponíveis para entrada e/ou saída de dados e comandos;
- Interface *USB 2.0* com velocidade de 12 Mbit/s;
- Interface *RS 232*;
- Número de instruções: 12288;
- Dez conversores analógicos/digitais de 10 bits.

Na FIGURA 3.3, tem-se uma representação padrão do microcontrolador PIC-18F2455, onde são mostrados os 28 terminais. Alguns desses terminais podem ser configurados durante a programação para assumirem funções diferentes ao longo da execução de um programa.

Dentre as treze funções que podem ser adotadas, considerando-se as características de cada terminal, destacam-se: conversor analógico-digital (AD), interface *USB 2.0*, entrada ou saída de sinal.

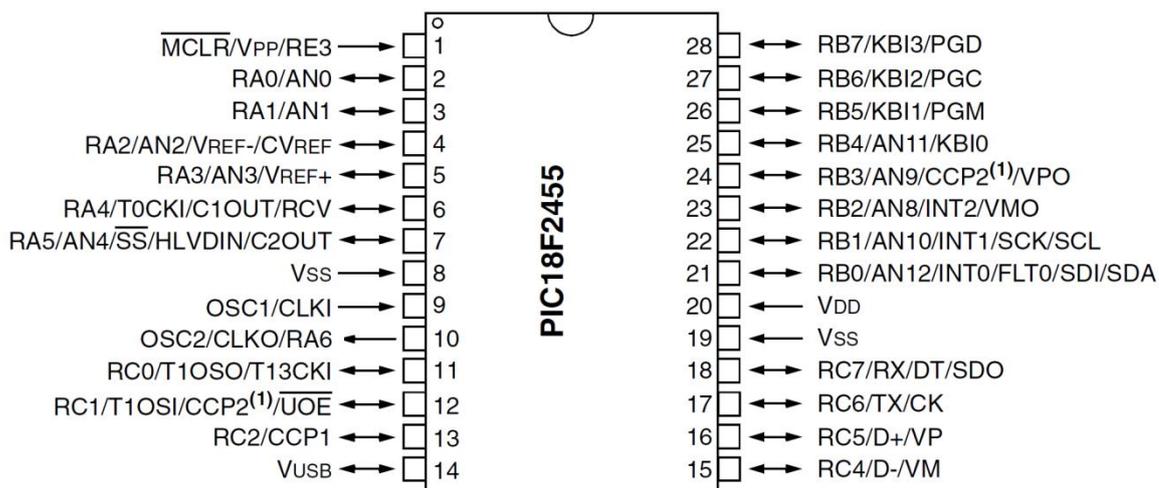


FIGURA 3.3 - Microcontrolador PIC18F2455.

Para que um microcontrolador possa executar suas devidas funções, este deve ter um programa gravado previamente em sua memória. Dentre as linguagens de programação utilizadas para este propósito tem-se principalmente: a linguagem C, Pascal, Basic e Assembly. Este programa é inserido na memória do microcontrolador por meio de uma placa de gravação, como aquela apresentada na seção 3.1.7.

3.1.3 LED-RGB

Os LEDs atuam como fontes de radiação do P2FM. Portanto, os que foram utilizados neste trabalho são de alta intensidade luminosa (mcd, milicandela) com emissão em comprimentos de onda na região visível do espectro, em três faixas, denominados tricolores ou RGB (do inglês, *red*, *green*, *blue*). Foi utilizado um LED tricolor da Avago Technologies[®], modelo ASMT-QTB0-0AA02⁹⁵. Na FIGURA 3.4, são apresentados os espectros de emissão para cada comprimento de onda distinto do LED-RGB: 470, 528 e 621 nm. Vale ressaltar que esse componente eletrônico apresenta baixo consumo de corrente (20 mA), boa estabilidade, alto brilho ($R = 450$,

B = 900, G = 224 / mcd) e baixo potencial de alimentação, 5 V, necessitando de um circuito simples para o acionamento com o microcontrolador.

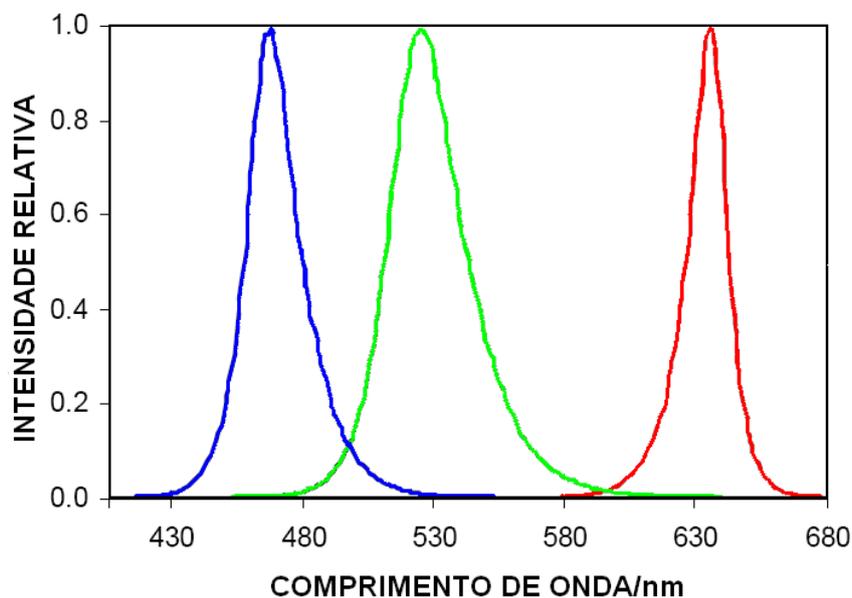


FIGURA 3.4 - Espectro de emissão do LED RGB. Comprimentos de onda de maior intensidade. Blue = 470 ± 22 nm, Green = 528 ± 33 nm, e Red = 621 ± 14 nm.

3.1.4 Detector TCS-3200

O fotodetector TCS-3200⁹⁶ da TAOS[®] (do inglês, *Texas Advanced Optoelectronic Solutions*) é um conversor de radiação em um sinal elétrico na forma de frequência. A frequência de saída do fotodetector é proporcional à intensidade de radiação incidente sobre sua superfície fotossensível. Este dispositivo é formado por um arranjo de 64 fotodiodos divididos em quatro grupos de 16 fotodiodos. Cada conjunto tem uma faixa fotossensível distinta, denominado de canal.

O canal desejado é selecionado por um comando elétrico em forma de código binário 2^2 . Nesse caso, a vantagem do fotodetector multicanal está na possibilidade de usar diferentes regiões do espectro, dispensando o uso de filtros ou redes de difração⁹⁷.

A tecnologia utilizada no TCS-3200 permite uma interface direta com o microcontrolador, pois a amplitude de potencial do sinal digital é a mesma de operação do microcontrolador, ou seja, de 5 V. O microcontrolador seleciona a faixa

espectral de trabalho e a frequência do sinal de resposta, através de um programa escrito em linguagem C.

A vantagem da utilização de um fotodetector com saída de sinal em formato digital e de conexão direta ao microcontrolador está em eliminar os ruídos gerados quando se usa um circuito amplificador, ou outros componentes eletrônicos. Na FIGURA 3.5 é apresentado o gráfico da resposta do sensor para cada arranjo de fotodiodos, cada um com máximos de sensibilidade em comprimento de onda distintos.

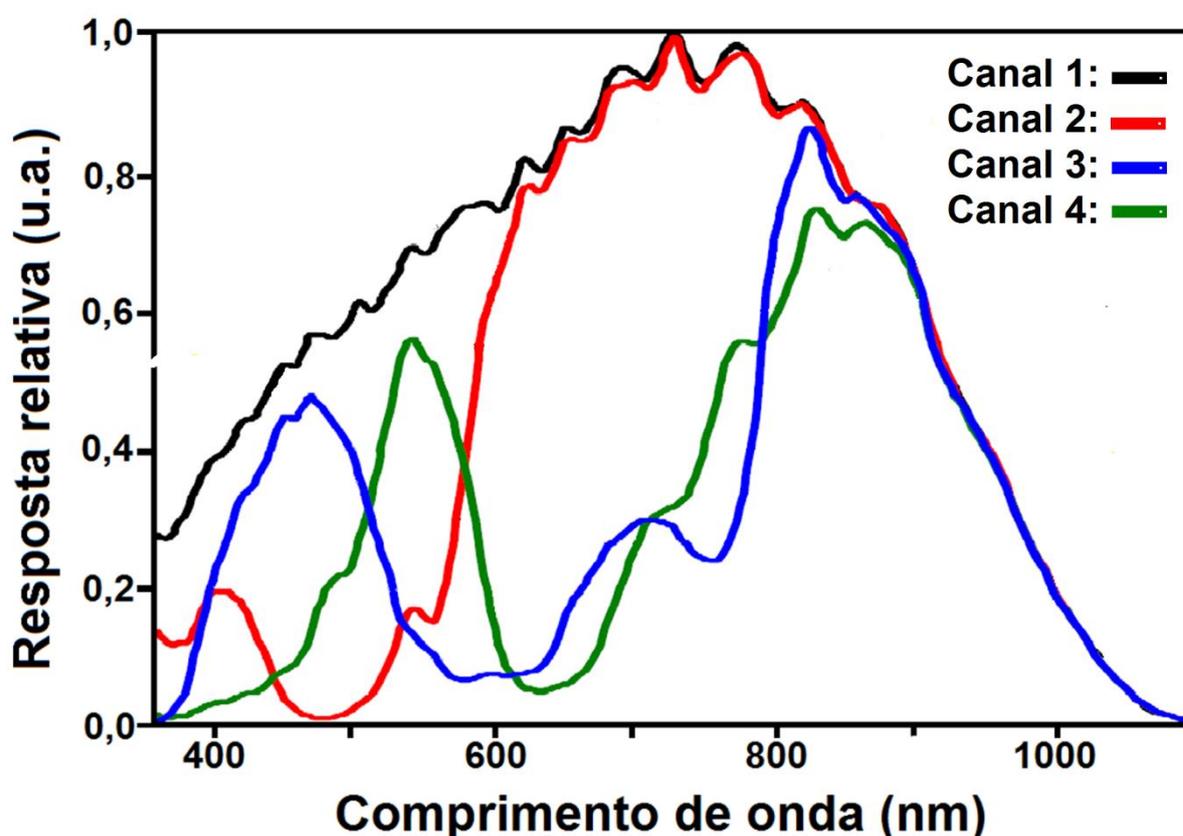


FIGURA 3.5 - Resposta do sensor TCS-3200 em função da REM. Canal: 1) λ_{max} 735 nm; 2) λ_{max} - 410 e 735 nm; 3) λ_{max} - 475 e 845 nm; 4) λ_{max} - 540 e 830 nm.

Na FIGURA 3.5 tem-se o espectro de fotossensibilidade em cada um dos quatro canais do sensor. A linha em preto representa o espectro do canal 1 que possui máxima sensibilidade em 735 nm. A linha em vermelho representa o canal 2, com máxima sensibilidade em 410 e 735 nm. De forma similar a linha em azul representa o canal 3 que têm dois picos de máxima sensibilidade em 475 e 830 nm.

A linha em verde representa o canal 4, e este por sua vez, possui máxima sensibilidade em 540 e 830 nm.

O uso do fotodetector multicanal TCS-3200 será principalmente para quando o instrumento estiver com o modo fluorimétrico ativado. Pois, em fluorimetria, sugere-se o uso de filtro para evitar a interferência do comprimento de onda da REM de excitação do cromóforo, justificando-se, desse modo, o uso do sensor multicanal.

3.1.5 Sensor de temperatura LM35

O sensor de temperatura LM35⁹⁸ é o componente eletrônico que responde a variações de temperatura sob o seu encapsulamento plástico, e que pode ser facilmente integrado a um circuito eletrônico. Este CI (do inglês, *integrated circuit*) comporta em único encapsulamento toda parte eletrônica, onde o mesmo conta com três terminais. Dois terminais são utilizados para a alimentação e o outro para saída do sinal em potencial (V), variando entre 0 - 30 V. Outras características:

- Resposta em graus Celsius;
- Variação linear, +10 mV/°C;
- Faixa de resposta, -55 °C a +150 °C;
- Baixo custo;
- Baixa impedância;
- Encapsulado plástico;
- Modelo de encapsulamento TO-220 e TO-92.

Além dessas características, o sensor pode ser conectado diretamente na entrada do conversor analógico/digital do microcontrolador, simplificando, portanto, o circuito eletrônico.

3.1.6 Interface USB 2.0

Dentre os principais tipos de conexão estabelecida entre dois instrumentos que se utilizam cabos tem-se a interface USB⁹⁹. Esse tipo de conexão teve uma grande aceitação no mercado, pois é entendida pelos usuários como um

tipo de interface “ligar e usar” o que anteriormente fazia-se necessário a instalação de softwares de interface que muitas vezes geravam conflitos.

O padrão proposto para uso no P2FM é USB 2.0 que possui velocidade de transmissão de 480 Mbps, cerca de 60 MB por segundo.

Além disso, no algoritmo existem dois termos, o VID (do inglês, *vendor identify*) e o PID (do inglês, *product identify*), que são os registros dos dispositivos conectados ao computador. A organização que controla os registros VID e PID liberou um número padrão destes que pode ser utilizado por qualquer desenvolvedor dispensando o registro.

3.1.7 Placa de gravação

Para que uma rotina de funções em um programa seja gravada na memória do microcontrolador, é necessário o uso de uma placa de gravação. Este dispositivo é indispensável para a verificação das funções gravadas no microcontrolador, e o seu correto funcionamento.

Os microcontroladores da Microchip[®] permitem regravação que podem ser realizadas em torno de dez mil vezes. Assim, testes de cada um dos periféricos como fotodetector, LED e sensor de temperatura podem ser executados, bem como o envio e processamento de dados.

Na FIGURA 3.6, tem-se uma placa de gravação desenvolvida por uma empresa brasileira, Microgênios[®], modelo MicroICD-Zif. Essa placa é conectada e alimentada pelo computador via porta USB.



FIGURA 3.6 - Placa de gravação de microcontrolador Microgênio®, modelo MicroICDzif.

3.2 DESENVOLVIMENTO DO CIRCUITO ELETRÔNICO DO P2FM

3.2.1 Fonte de alimentação e interface USB

Para contornar a necessidade de se desenvolver uma fonte de alimentação exclusiva para o P2FM, conforme descrito em 3.1.1, usou-se a conexão USB de um computador.

Na FIGURA 3.7, tem-se o esquema do circuito eletrônico utilizado para alimentação pelo terminal da interface USB 2.0. Para a interface é obrigatório o uso de um capacitor cerâmico de 470 μF (C4), segundo determinação do fabricante. No conector J1 há dois terminais responsáveis por disponibilizar a diferença de potencial necessária. O terminal 1 (J1) para +5,0 V e o terminal 4 (J1) para 0,0 V (GND). O capacitor C3 tem como função evitar possíveis oscilações. Os terminais 2 e 3 são exclusivos para transmissão de dados.

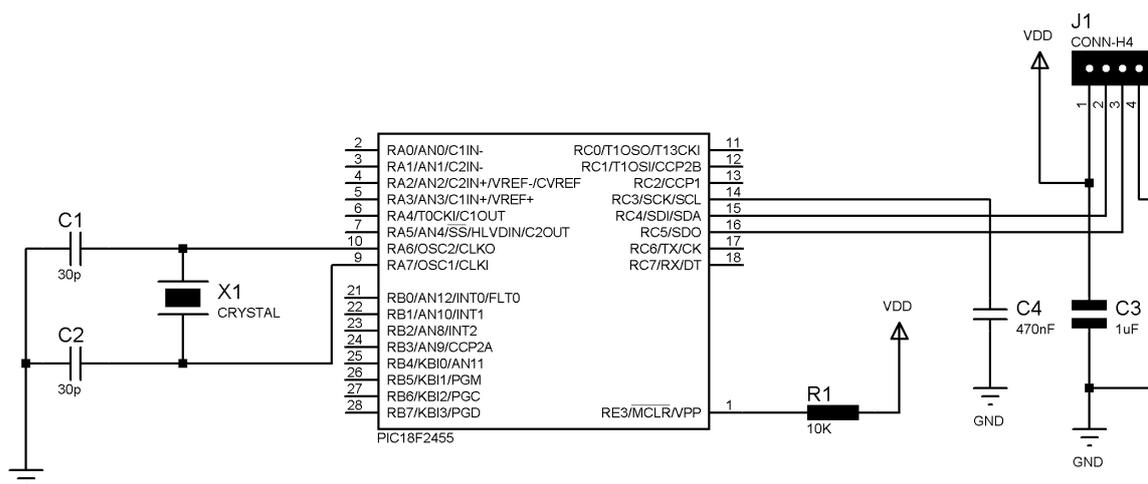


FIGURA 3.7 - Representação do sistema de alimentação do microcontrolador e interface USB. X1 = cristal oscilador de 4MHZ, J1 = Conector macho USB.

3.2.2 Microcontrolador

No tópico anterior foi apresentada a fonte de alimentação do microcontrolador PIC-18F2455. Um esquema do circuito eletrônico com os componentes básicos para funcionamento do PIC-18F2455 foi apresentado na FIGURA 3.2 onde, os componentes eletrônicos C1, C2 e X1 (cristal de quartzo) estão interligados de forma a gerar um sinal de oscilação com frequência de 4,0 MHz.

3.2.3 Fotodetector TCS-3200

A tecnologia utilizada no TCS-3200 permite uma interface direta com o microcontrolador, pois a amplitude do sinal digital é igual à utilizada na alimentação do microcontrolador, 5,0 V. O microcontrolador tem como função selecionar o arranjo de fotodiodos que responde a uma dada faixa espectral, e a frequência do sinal de resposta.

Na FIGURA 3.8 tem-se o esquema do circuito eletrônico do fotodetector e os terminais do microcontrolador. O TCS-3200 é dotado de 8 terminais, onde os terminais VCC (5,0 V) e GND (0 V) são exclusivos para alimentação. Os demais são utilizados para o controle e seleção dos filtros ópticos do fotodetector aplicando-se, 0 ou 5,0 V, para a seleção da frequência de trabalho.

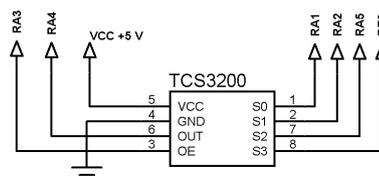


FIGURA 3.8 - Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para conexão do detector TCS-3200 às portas do microcontrolador PIC-18F2455.

Na TABELA 3.1 são apresentados os terminais para o controle do sinal de frequência (sinal digital na saída), sendo eles S0 e S1. A frequência média do sinal de resposta pode ser selecionada para 1,1; 11,1; 110,0 ou 550 KHz. Os terminais S0 e S1 estão conectados às portas RA1 e RA2 do microcontrolador, respectivamente.

TABELA 3.1 - Controle da escala de frequência do TCS-3200.

S0 (V)	S1 (V)	Frequência de resposta / KHz
0	0	~1,1
0	5	11
5	0	110
5	5	550

Legenda: S0 = S1 = terminal de controle da frequência de operação do sensor.

Os terminais S2 e S3 do TCS-3200 são utilizados para seleção do canal, conforme TABELA 3.2. Para seleção do canal desejado, deve-se aplicar uma tensão nos terminais S2 e S3 de 0 ou 5 V, equivalente a seleção apresentada na TABELA 3.1. Os terminais S2 e S3 são conectados as portas RA5 e RE0 do microcontrolador, respectivamente.

TABELA 3.2 - Controle dos terminais para seleção dos filtros do sensor TCS-3200.

S2 / V	S3 / V	Filtro do sensor (nm)
0	0	480 – canal 3
0	5	540 – canal 4
5	0	750 – canal 1
5	5	750 – canal 2

Legenda: S2= S3 = terminal de controle dos filtros ópticos existentes no sensor.

3.2.4 LED

Na FIGURA 3.9, é apresentado o esquema eletrônico de conexão para cada um dos anodos de dois LEDs tricolores (LED01-RGB e LED02-RGB) que estão conectados respectivamente a seis portas do microcontrolador, a saber: RD7, RD6, D5, D4, D3 e D2 do PIC-18F2455. O LED01-RGB será utilizado no método fotométrico e o LED02-RGB no método fluorimétrico. A seleção do método desejado e o comprimento de onda do LED tricolor utilizado, será determinado por um programa embarcado gravado na memória do microcontrolador PIC-18F2455, tópico 3.3.

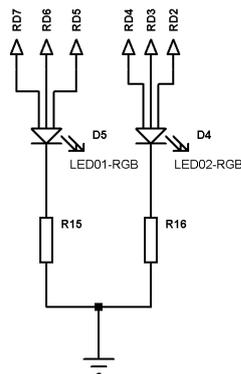


FIGURA 3.9 - Esquema do circuito eletrônico dos LEDs tricolores. Fonte de radiação: LD01-RGB e LD02-RGB, conectados as portas RD7, RD6, D5, D4, D3 e D2 do PIC18F2455.

3.2.5 Fotodetector de monitoramento da temperatura

O sistema de controle da temperatura é baseado no uso do sensor de temperatura LM35. Na FIGURA 3.10, tem-se o esquema de conexão utilizado para o sensor de temperatura. O sinal de variação de temperatura do sensor é indicado no terminal 3 (VO) com uma variação na diferença de potencial. Esse terminal está conectado na entrada analógica do microcontrolador RA0, que tem como função converter esta informação analógica em °C.

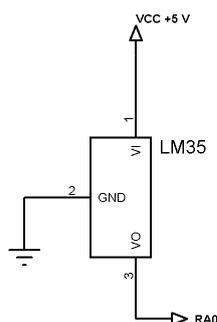


FIGURA 3.10 - Circuito eletrônico do sensor de temperatura LM35 com saída de sinal no terminal VO (3) conectado à entrada analógica RA0 do microcontrolador.

3.3 PARTE MECÂNICA

Os componentes que compõem a parte óptica do instrumento foram projetados para serem dispostos em distância e orientação previamente definida. Dessa forma, na FIGURA 3.11 tem-se uma representação do suporte de amostragem. Pode-se ver que na parte superior há um orifício para inserção de recipientes de amostragem em formato cilíndrico, um *vial* foi utilizado para este propósito. Além disso, está em destaque a posição em que estão dispostos os componentes ópticos do instrumento: LEDs e sensor.

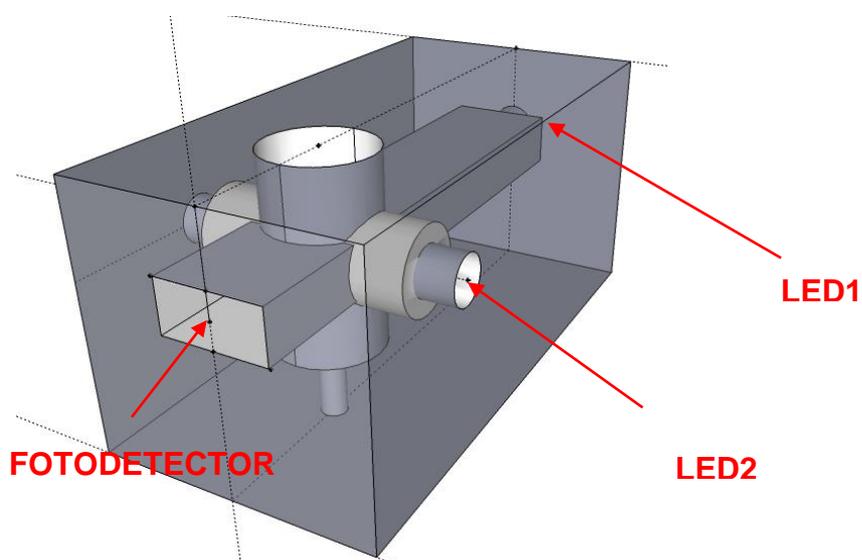


FIGURA 3.11 - Figura representativa do suporte de amostragem.

As dimensões reais do suporte de amostragem, FIGURA 3.12, são apresentadas em quatro vistas com suas respectivas posteriores. Vale ressaltar que, este suporte foi projetado para que as amostras estejam em um recipiente cilíndrico com diâmetro de 11,5 mm. Preferiu-se um suporte cilíndrico por apresentar maior facilidade de fabricação. Sendo assim, usou-se recipiente de amostragem cilíndrico de vidro (*vial*) transparente com capacidade de 2 mL.

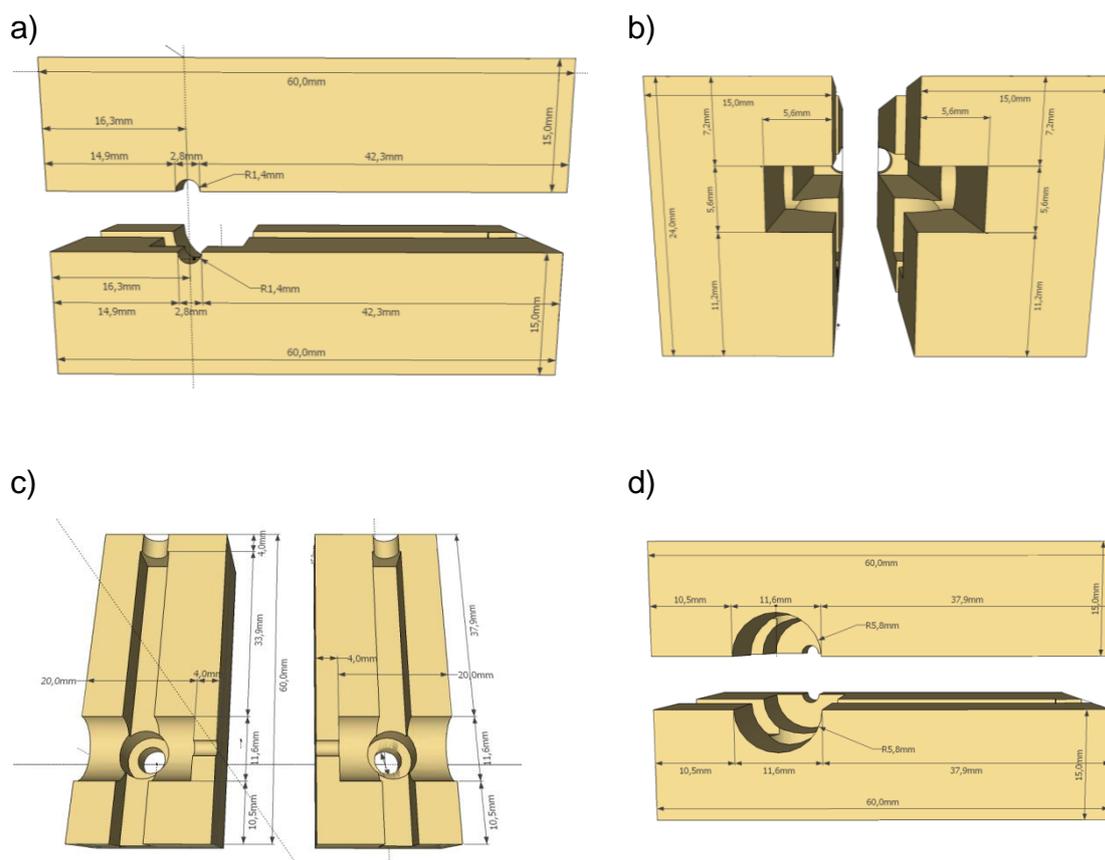


FIGURA 3.12 - Projeto do suporte de amostragem nas vistas: a) Inferior; b) Lateral; c) Interna; d) Superior.

O instrumento desenvolvido para este projeto foi montado em uma caixa Patola[®], modelo PB-201 (medidas: 40 x 70 x 85 mm).

Para melhor entendimento das dimensões deste instrumento e de sua conexão com o computador, uma fotografia é apresentada na FIGURA 3.13.

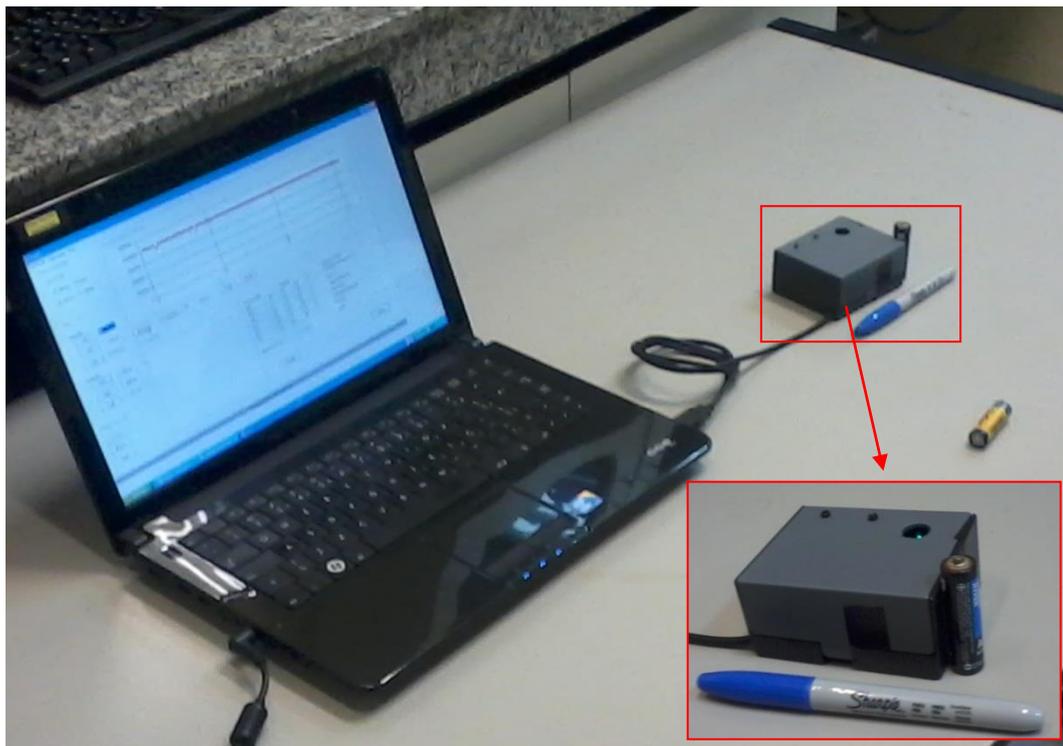


FIGURA 3.13 - Fotografia do instrumento desenvolvido conectado ao *notebook* via interface USB.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO PROGRAMA EMBARCADO

Programas embarcados são desenvolvidos em *softwares* com estrutura dedicada, onde são encontradas algumas rotinas e funções predefinidas. Um programa embarcado deve ser gravado na memória do microcontrolador para controle dos componentes eletrônicos conectados e dos dados recebidos, enviados e processados. Programas embarcados podem ser desenvolvidos em diferentes linguagens de programação, por exemplo: C, C⁺⁺, *assembly*, Pascal, dentre outras.

Nesse projeto, foi utilizado o software MikroC PRO, no qual programas em linguagem C são desenvolvidos.

No programa embarcado do P2FM, as seguintes rotinas foram desenvolvidas:

- Acionamento dos LEDs de emissão ou excitação;
- Acionamento do fotodetector e aquisição dos dados obtidos;

- Auto estabelecimento de interface USB com o microcomputador;
- Envio e recepção de dados e funções a serem executadas via interface USB.

3.5 SOFTWARE DE CONTROLE EM PLATAFORMA WINDOWS

Muitos instrumentos que apresentam um maior nível de complexidade possuem geralmente algum tipo de *software* (programa que depende de um sistema operacional), geralmente utilizado para o controle e ou tratamento dos dados. O Visual Studio é uma plataforma que permite o desenvolvimento de *softwares* em diversos tipos de linguagens de programação: *Visual Basic*, C, C++, C#, F#, J#, XML/XSLT, HTML/XHTML, JavaScript, CSS, Python e ASP.NET. Outra vantagem do Visual Studio é a possibilidade do controle de dispositivos conectáveis via interface USB, RS232, *Bluetooth*.

Na FIGURA 3.14 tem-se a tela principal do Visual Studio. Como pode-se ver, o mesmo possui do lado esquerdo, a “*Toolbox*”, isto é, uma caixa de ferramenta que contém ícones de suas funções predefinidas, como impressora, abrir arquivo, fechar, salvar, entre outras.

O “Form 1”, no centro da figura, é a base da interface gráfica comum em *softwares* de desenvolvimento de ferramentas que são apresentadas ao usuário. No lado direito, tem-se o “*Solution Explore*”, que são os locais e diretórios onde encontram-se as linhas de programação.

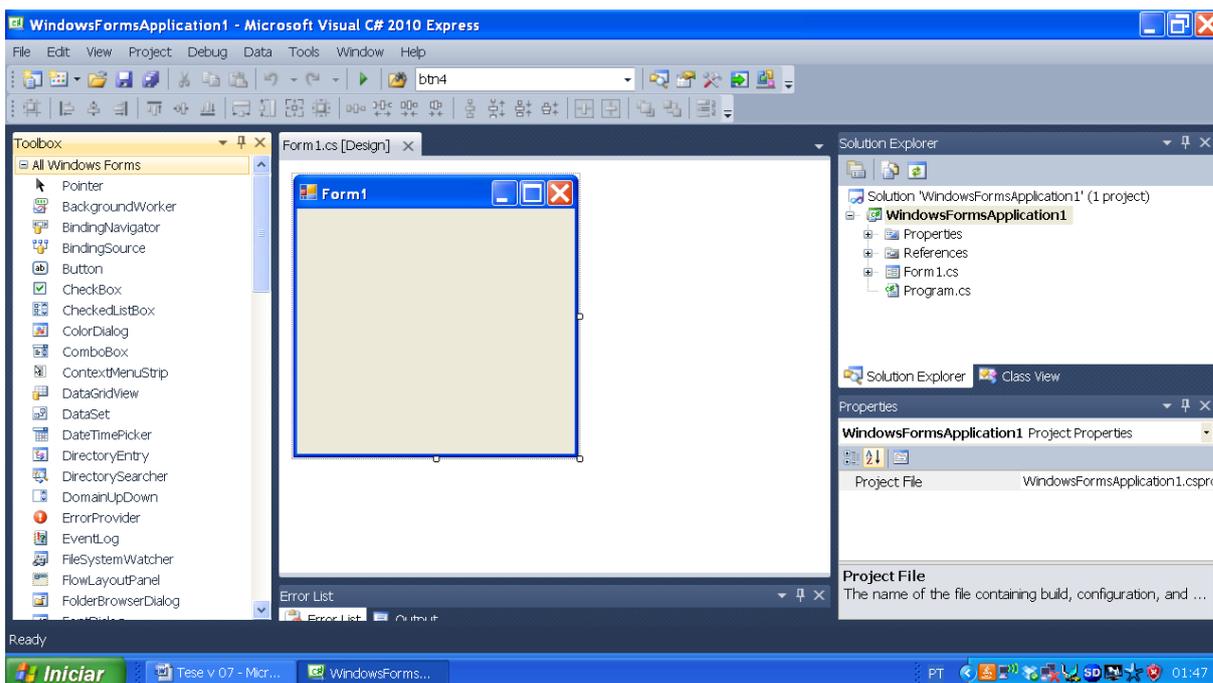


FIGURA 3.14 - Plataforma de desenvolvimento do *software*: *Visual Studio Express*.

Assim, com objetivo de estabelecer uma interface com o usuário foi desenvolvido um *software* de interface no Visual Studio. Vale ressaltar que o *software* desenvolvido pode ser instalado em computadores que possuam o sistema operacional Windows. Além disso, este *software* pode ser instalado também em dispositivos móveis que possuam o sistema operacional Windows Fone 7.

Na FIGURA 3.15, é apresentada a tela principal do *software* desenvolvido. Assim, o mesmo contém todos os itens necessários para o controle, aquisição e tratamento de dados do P2FM.

FIGURA 3.15 - Tela principal do *software* de controle. A - Sensor/Filtro; B – Registro do Sinal; C – Sinal em função do tempo; D – Curva analítica.

3.5.1 Página Principal

Na página principal do *software* de controle do P2FM existem quatro caixas em destaque, as “*group box*”. A funcionalidade de cada uma dessas caixas é descrita a seguir.

A caixa “1º Fonte de Radiação”, mostrada na FIGURA 3.16, está dividida em duas partes, “Sensor/Filtro” e “LED”. Na *group box* “Sensor/Filtro” faz-se a seleção da região do espectro eletromagnético, uma vez que o P2FM possui um sensor com quatro regiões distintas para detecção de REM, seção 3.1.4. Enquanto que, na *group box* “LED”, seleciona-se o comprimento de onda de máxima intensidade λ_{\max} da REM desejada, segundo o método que será utilizado, fotométrico ou fluorimétrico. Os comprimentos de onda selecionáveis são: 470, 528 e 621 nm.



FIGURA 3.16 - *Group box* de acionamento da fonte de REM e canal do sensor.

A *group box* “2º Registro do Sinal”, FIGURA 3.17, contém três botões: Escuro, Branco e Sinal. Ao ser pressionado “Escuro” os LEDs são desligados e o sinal de radiação espúria é registrado e coletado, sendo apresentado na caixa de texto ao lado. De forma similar, ocorre para “Branco” e “Sinal”. No entanto, estes registram o sinal com o LED ligado, que foi previamente selecionado.

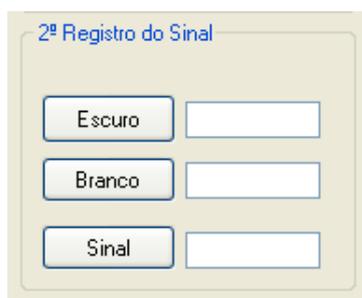


FIGURA 3.17 - *Group box* do registro do sinal: Escuro, Branco, Sinal.

No software a *group box*, “3º Curva Analítica”, tem o objetivo de facilitar a obtenção de parâmetros de desempenho analítico, FIGURA 3.18. Nesse sentido, possibilitará aos usuários, com um breve treinamento, coletar dados de um conjunto de amostras e obter o desempenho analítico do método em uso. Assim, deverão ser

preenchidas as caixas de texto no campo “Concentração” e o resultado referente ao valor da absorbância serão preenchidos automaticamente nas caixas de texto, “Réplicas”. Para isso, basta pressionar o botão que se encontra do lado da caixa de texto das réplicas. Ao se pressionar o botão “Calcular”, os dados referentes a cada parâmetro de desempenho são apresentados em suas respectivas caixas de texto. Esses dados podem ser salvos em “NOME.txt” (.txt formato ASCII) ao ser acionado o botão “Salvar”.

FIGURA 3.18 - Group box para obtenção dos parâmetros de desempenho analítico.

3.5.2 Estabilidade do instrumento

Uma das ferramentas desenvolvidas nesse *software* foi uma caixa gráfica para registro do sinal de um cromóforo ou fluoróforo ao longo do tempo, FIGURA 3.19. Para espécies que apresentam elevada cinética de reação foi inserido também uma opção de alteração de frequência de amostragem.

O botão “Frequência” envia a frequência em milissegundos da caixa de texto ao lado. Essa é a frequência com que são coletados os dados, salvos e apresentados.

A frequência de amostragem deverá ser inserida pelo analista. Além disso, após a obtenção dos dados, o analista poderá salvar os dados no formato *.txt para posterior visualização.



FIGURA 3.19 - Caixa para estudo do sinal em função do tempo.

4 Experimental

“Todas as substâncias são tóxicas. Não existe substância sem toxidade.
É unicamente a dose que determina esta toxidade”

Paracelso

Alquimista do século 1

No desenvolvimento de instrumentação ou de métodos analíticos uma das partes essenciais em tais estudos, é a verificação do desempenho analítico. Para tanto, utilizam-se ferramentas estatísticas, e com estas, obtêm-se os parâmetros que expressam o desempenho analítico^{59,100}.

Para o procedimento experimental proposto nesse trabalho foram realizados os seguintes testes: estabilidade do instrumento, teste do software desenvolvido, desempenho analítico do P2FM no modo fotométrico e fluorimétrico.

4.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PROTÓTIPO

A estabilidade é uma das características inerentes de cada instrumento que pode ser entendida como um parâmetro que trata das variações ou mudanças na resposta instrumental que ocorrem ao longo do tempo. Como o PF2M é um instrumento óptico, a estabilidade do mesmo é resultante de três componentes: fonte de alimentação, fonte de REM e sensor.

Como descrito anteriormente, o P2FM tem uma parte óptica que depende diretamente da orientação do feixe de REM, que depende também da estrutura mecânica que o sustenta. Assim, o P2FM pode sofrer mudanças no alinhamento das fontes de REM devido a impacto mecânico no instrumento.

Este protótipo possui dois LEDs tricolores idênticos. Cada um possui três ânodos responsáveis por emissões de REM nas regiões azul (470 nm), verde (528 nm) e vermelho (621 nm). Desta forma, existem seis fontes de radiação.

Conforme a configuração apresentada na TABELA 4.1 estudou-se a estabilidade do PF2M. Esse estudo foi realizado em ambiente com temperatura controlada em 25 ± 1 °C. Aplicou-se a seguinte sequência de procedimento para aquisição dos dados:

- Conexão do P2FM no microcomputador;
- Configuração, TABELA 4.1;
- Opção salvar, para adicionar o endereço;
- Frequência, 30000 ms;
- Ativou-se a coleta dos dados.

TABELA 4.1 - Configuração adotada no software para teste de estabilidade do P2FM

Fonte ^a / nm	Sensor ^b / nm
Modo: Absorção	
470	480
528	540
621	750
Modo: Excitação	
470	480
528	540
621	750

^aComprimento de onda de máxima intensidade. ^b Comprimento de onda de máxima sensibilidade.

4.2 ESTUDO DO SOFTWARE DESENVOLVIDO

O software desenvolvido para controlar o P2FM foi instalado em um notebook CCE modelo 25L+ com sistema operacional Windows XP. Para os testes, soluções aquosas do corante azul de metileno ($1,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) foram preparadas. Por diluição, concentrações menores dessa solução estoque foram obtidas.

Utilizou-se fotômetro Ocean Optics[®], modelo USB-2000 para registrar o sinal de máxima absorvância para configuração adequada do P2FM.

4.3 CALIBRAÇÃO

A calibração instrumental^{59,101,102}, no caso da química analítica quantitativa, tem por finalidade relacionar com precisão e exatidão a resposta analítica em função da concentração de uma espécie química de interesse (variável de entrada de dados). No processo de calibração instrumental busca-se controlar todas as condições a fim de se ter um bom desempenho.

A relação existente entre a resposta instrumental e a concentração, pode ser expressa por uma equação, a equação linear da curva analítica. Além da equação linear da reta, outros parâmetros podem ser obtidos utilizando-se o coeficiente angular da curva analítica (m , sensibilidade) e o desvio padrão (s) do sinal do branco. Calcula-se então, o limite de detecção (LD, $3s/m$), e o limite de quantificação (LQ, $10s/m$)^{4,59,102}.

4.3.1 Calibração fotométrica

Realizou-se a calibração da instrumentação proposta utilizando três soluções de corantes como padrão analítico: amaranço, azul brilhante e tartrazina.

4.3.1.1 Reagentes e soluções

O instrumento proposto foi calibrado utilizando-se os seguintes corantes: azul de coomassie – Azul Brilhante (Vetec), Amaranço (Aldrich) e Tartrazina (Sigma Aldrich), os quais foram dissolvidos em água destilada.

Uma solução estoque de azul brilhante ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se $267,1 \times 10^{-3} \text{ g}$ de azul brilhante para 500,0 mL de água. A solução estoque de amaranço ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada com $302,2 \times 10^{-3} \text{ g}$ do corante amaranço para 500,0 mL de água. Uma solução de tartrazina ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada adicionando-se $416,5 \times 10^{-3} \text{ g}$ de tartrazina para 500,0 mL de água. As soluções foram preparadas em balões volumétricos calibrados e, em seguida, foram transferidas para frascos opacos.

4.3.1.2 Instrumentos

Foi utilizada uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D. Outrossim, empregaram-se os seguintes espectrofotômetros: a) Shimadzu[®], modelo UV-2550, b) Ocean Optics[®], modelo USB-2000, que conta com um conjunto de fibras ópticas de transmissão de sinal de $50 \times 10^{-6} \text{ m}$ de diâmetro e 2,0 m de comprimento e c) o P2FM no modo fotométrico.

4.3.1.3 Procedimento Analítico

Inicialmente, utilizou-se o espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-Vis-2550, para obtenção do espectro de absorbância e identificação do comprimento de onda de máxima absorbância de cada um dos corantes.

A partir desses dados, identificou-se qual o LED-RGB que possui REM próximo ao comprimento de onda de máxima absorbância da espécie química. Detalhes para a escolha são apresentados TABELA 4.2, em que para o azul brilhante, amaranço e tartrazina foram acionados os seguintes LEDs com emissões em: 528, 621 e 470 nm, respectivamente, no modo fotométrico do P2FM. Os seguintes filtros do sensor 540, 760 e 480 nm foram também empregados, respectivamente.

TABELA 4.2 - Características dos corantes utilizados na calibração do sistema

Corante	Máxima absorbância / nm	LED / nm	Sensor / nm
Azul Brilhante	585	621	760
Amaranto	522	528	540
Tartrazina	430	470	480

No procedimento de calibração, as soluções estoque dos corantes amaranço, azul brilhante e tartrazina foram preparadas por diluições para obtenção da curva analítica em concentração entre $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

4.3.2 Calibração fluorimétrica

Dentre os compostos fluorescentes de uso comum em química analítica, tem-se a Rodamina 6G (R6G), que é utilizada em síntese e na identificação de espécies de interesse químico¹⁰³⁻¹⁰⁶, e a fluoresceína (FL)¹⁰⁷ que tem grande aplicação na determinação de cálcio, bário e estrôncio.

Estes corantes foram utilizados nos procedimentos para verificação do desempenho analítico do P2FM no modo fluorimétrico e comparação dos resultados obtidos empregando-se instrumentos comerciais.

4.3.2.1 Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução estoque de HCl (Merck) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com água purificada e deionizada por um sistema de purificação Milli-Q (com resistividade maior que $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), sendo padronizada convenientemente.

Uma solução estoque de fluoresceína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $188,15 \times 10^{-3} \text{ g}$ de fluoresceína (Sigma) em uma solução ácida (HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). A partir da solução estoque de fluoresceína foram preparadas por diluição em solução ácida (HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) soluções na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução estoque de R6G (Sigma) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $239,5 \times 10^{-3} \text{ g}$ de R6G em 500,0 mL de água. A partir da solução estoque foram preparadas por diluição para uma faixa entre $4,0 \times 10^{-3}$ e $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.2.2 Instrumentos

Um espectrofluorímetro Shimadzu[®], modelo RF5301/PC foi empregado para a seleção das condições experimentais e, também, para a comparação dos resultados obtidos com o instrumento proposto.

O P2FM, no modo fluorimétrico e os demais aparatos estão descritos na seção 4.3.1.2.

4.3.2.3 Procedimento Analítico

Foram obtidos os espectros de absorvância para cada uma das espécies fluorescentes em concentrações diluídas. A partir desses dados, identificaram-se quais os comprimentos de onda de máxima absorvância de cada espécie em estudo. Em seguida, o espectro de emissão para cada uma desses

fluoróforos foi registrado. Assim, após a identificação dos comprimentos de onda de máxima absorção e máxima emissão configurou-se o P2FM e analisou as concentrações diluídas em cada um dos instrumentos.

5 Resultados

“O simples pode ser mais difícil do que o complexo. Você tem que trabalhar duro para fazer seu pensamento ficar limpo o bastante para criar o simples.”

Steve Jobs

5.1 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO PROTÓTIPO

Como descrito na seção 4.1, o estudo de estabilidade do P2FM depende dos seguintes fatores: fonte de alimentação, fonte de REM e fotodetector. Assim, tomaram-se os valores de intensidade de cada uma das bandas de emissão dos LEDs registrando-se o sinal resultante em função do tempo.

Os dados apresentados nas tabelas (TABELA 5.1 e TABELA 5.2), representam a estabilidade do P2FM tomando-se como base os dados no modo fotométrico e fluorimétrico, conforme configuração apresentada na TABELA 4.1.

Inicialmente, foram registrados os sinais com as fontes de REM desligadas e, em seguida, estas foram acionadas e o sinal foi registrado por um período de 1,0 h. Os sinais apresentados foram normalizados com variação para uma escala de 0 a 100 para expressar todas as fontes de REM, pois os sinais registrados em cada um dos canais são diferentes.

TABELA 5.1 - Teste de estabilidade da potência dos LEDs com o P2FM configurado no modo fotométrico

Tempo / min	540 nm* / 528 nm**	480 nm* / 470 nm**	750 nm* / 621nm**
1	99,99928	99,97954	99,99831
2	99,99928	99,97958	99,99897
3	99,99923	99,97958	99,99908
4	99,99923	99,97949	99,99908
5	99,99923	99,97958	99,99913
10	99,99918	99,97945	99,99892
15	99,99918	99,97941	99,99882
20	99,99918	99,97945	99,99902
30	99,99918	99,97937	99,99897
40	99,99923	99,97932	99,99897
50	99,99989	99,97937	99,99908
60	99,99918	99,97932	99,99902

* Fotodetector, ** LED.

TABELA 5.2 - Teste de estabilidade da potência dos LED com o P2FM configurado no modo fluorimétrico

Tempo / min	540 nm* / 528 nm**	480 nm* / 470 nm**	750 nm* / 621nm**
1	99,99928	99,99949	99,99810
2	99,99923	99,99887	99,99810
3	99,99923	99,99825	99,99810
4	99,99964	99,99645	99,99810
5	99,99918	99,99645	99,99758
10	99,99918	99,99815	99,99845
15	99,99918	99,99634	99,99727
20	99,99918	99,99717	99,99753
30	99,99918	99,99696	99,99732
40	99,99912	99,99568	99,99799
50	99,99918	99,99753	99,99774
60	99,99989	99,99691	99,99810

* Fotodetector habilitador, ** LED acionado.

Nos dados apresentados, TABELA 5.1 e TABELA 5.2, os sinais registrados para o conjunto fonte de REM e sensor foram estáveis do início ao fim. Pode-se constatar que os ruídos para cada uma das fontes/sensor registrados encontram-se na terceira casa decimal.

Assim, com base nos dados apresentados no gráfico resultante da estabilidade que o instrumento pode ser utilizado imediatamente após ser ligado. Todavia, entende-se que, por segurança, o mesmo deve ser utilizado após 5 min.

5.2 ESTUDO DO SOFTWARE DESENVOLVIDO

No estudo de reposta do instrumento com o software de gerenciamento obteve-se um espectro de absorção do corante azul de metileno, FIGURA 5.1 com auxílio de um espectrofotômetro USB-2000, Ocean Optics®.

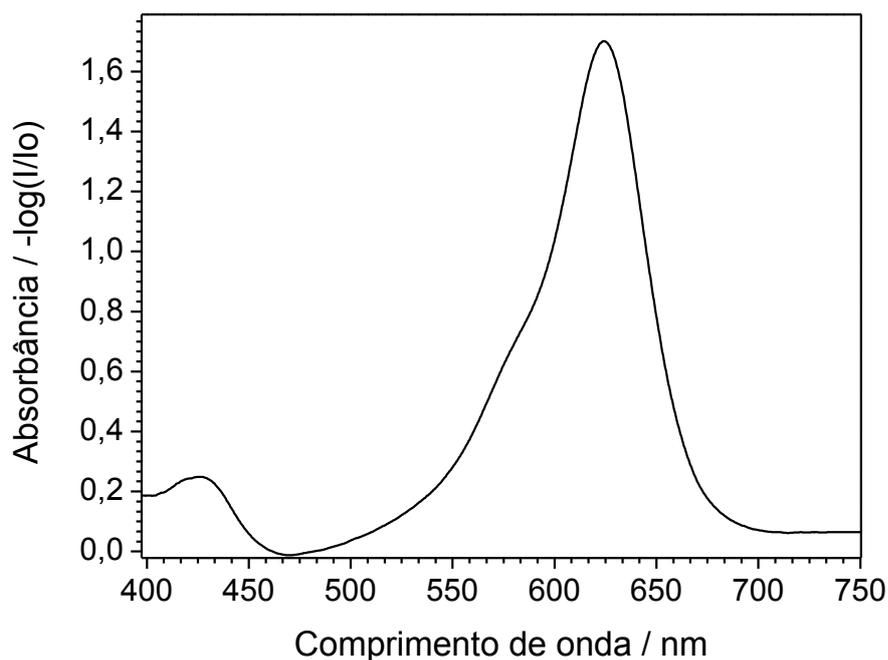


FIGURA 5.1 - Espectro de absorvância obtido para o azul de metileno $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser observado, a largura de banda de máxima absorção a meia altura do pico estende-se de 590 a 648 nm. Com base nesses dados, configurou-se o software de controle do P2FM da seguinte forma:

Fotodetector: sem filtro (livre)

LED (Absorção): 621 nm

Frequência: 10000 milissegundos (10 s)

Esta configuração pode ser vista na FIGURA 5.2. Detalhes dos resultados obtidos e dos sinais que foram registrados em função do tempo para o azul de metileno em concentrações entre $1,6 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Além dos dados apresentados na FIGURA 5.2, **um vídeo desse procedimento foi registrado (<http://youtu.be/r-ChcgIWAd0>).**

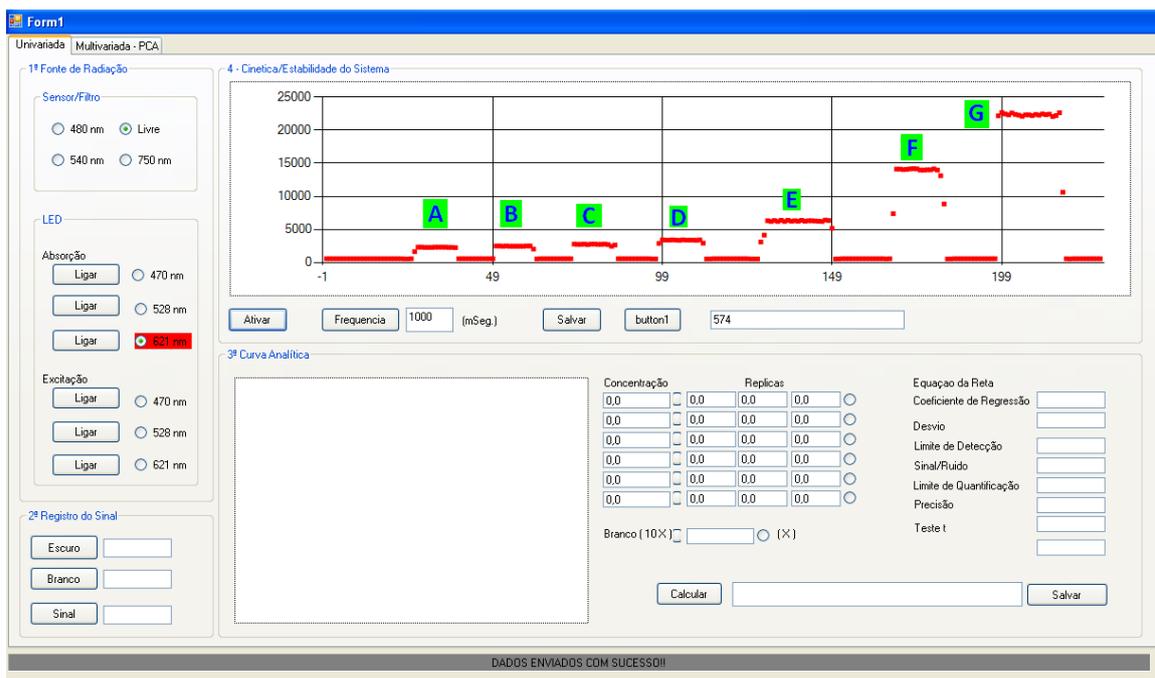


FIGURA 5.2 - Registro do sinal de azul de metileno em função do tempo. A) Água destilada, B) $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, C) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, D) $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, E) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, F) $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, G) $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser visto, FIGURA 5.2, com o aumento da concentração registra-se um sinal de maior magnitude, e este sinal está na sua forma digital, sem qualquer tratamento. O sinal que é registrado corresponde a frequência do sensor (seção 3.1.4). Pela estrutura do *software*, quanto menor a intensidade da REM que incide sobre o fotodetector, maior quantidade de pulsos são registrados.

Observa-se ainda que a fonte de radiação se encontra na faixa da cor vermelha do espectro, confirmando que a espécie em estudo, azul de metileno, absorve a cor complementar.

No início do gráfico, FIGURA 5.2, antes do ponto A, tem-se um patamar de sinal constante que representa o sinal inicial do P2FM, que foi habilitado para registrar o sinal a uma frequência de 1000 ms. Ao se adicionar a cubeta contendo a solução do branco, um sinal maior foi registrado, indicando uma absorção da intensidade luminosa, formando então o primeiro patamar, ponto A.

Este e os demais patamares, foram registrados obtendo-se 10 pontos para cada um. Assim, pode-se ver que ao se retirar a cubeta, o sinal registrado retorna para o seu menor nível até que uma nova solução seja adicionada.

Para a conversão dos dados de sinal digital em absorbância aplicou-se o logaritmo na razão entre o sinal de cada espécie pelo sinal do branco.

A partir dos dados obtidos nesse experimento construiu-se uma curva analítica, FIGURA 5.3.

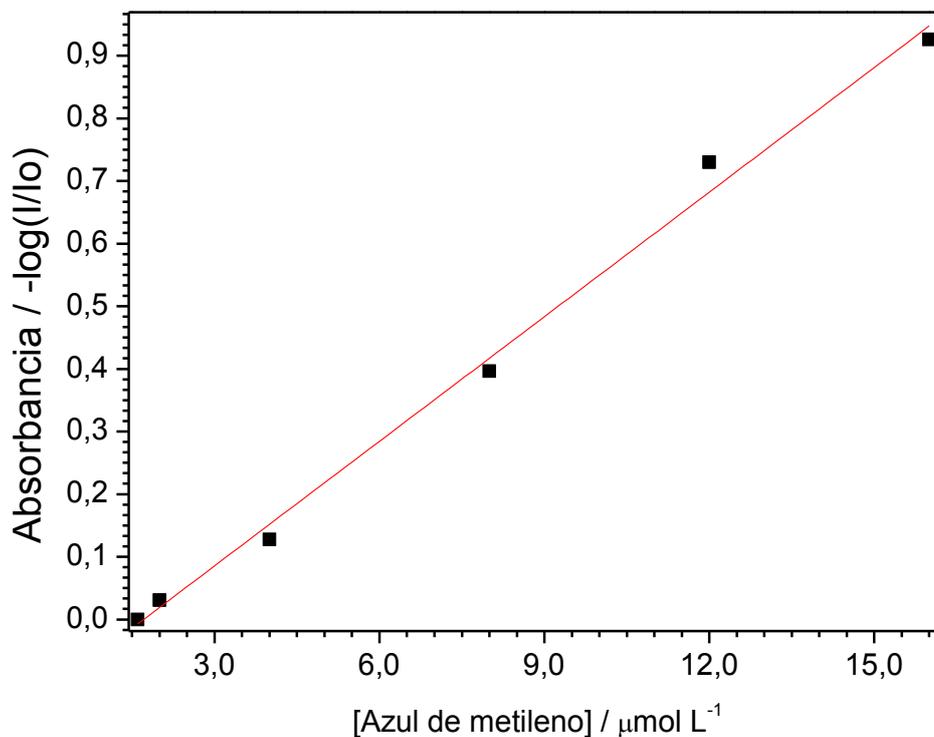


FIGURA 5.3 - Curva analítica obtida para o azul de metileno utilizando-se o P2FM, configuração do *software*: Sensor = Livre; LED = 621 nm; Frequência = 10000 (10 s).

Na FIGURA 5.3 tem-se uma curva analítica obtida com P2FM. Na curva analítica estão expressos os dados de concentração do corante azul de metileno para concentrações entre $1,6 \times 10^{-6}$ e $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os dados obtidos não foram realizados em replicatas, uma vez que a finalidade desse estudo foi mostrar o funcionamento do *software* de controle. Mesmo assim, obteve-se um coeficiente de regressão linear, 0,993, e sensibilidade de $6,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$.

5.3 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO COM INSTRUMENTOS COMERCIAIS

5.3.1 Teste de desempenho do fotômetro

No procedimento de calibração foram selecionados três corantes: tartrazina, amaranço e azul brilhante, utilizados para comparação do P2FM e outros espectrofotômetros comerciais. Os espectros de absorvância desses corantes são apresentados na FIGURA 5.4, e, como pode ser observado, a faixa total de interação dessas espécies com a REM encontra-se dentro do espectro fotossensível do sensor (TCS-3200) do P2FM.

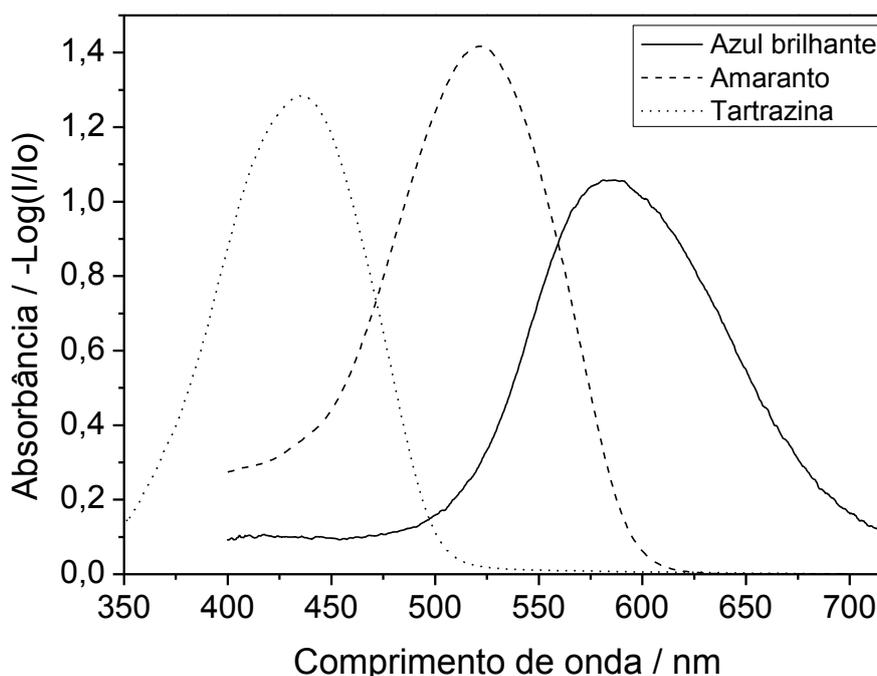


FIGURA 5.4 - Espectro de absorvância de azul brilhante $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, amaranço $6,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e tartrazina $6,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa. UV/Vis-2550.

A fim de testar os canais do sensor do P2FM correspondente aos comprimentos de onda de maior absorvância destes corantes, adotou-se a seguinte configuração apresentada na TABELA 5.3.

Para este estudo de calibração, as soluções estoque dos corantes amaranço, azul brilhante e tartrazina foram preparadas por diluições para obtenção da curva analítica em concentração entre $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

TABELA 5.3 - Características dos corantes utilizados na calibração do sistema

Corante	Máxima absorvância / nm	LED / nm	Sensor / nm
Azul Brilhante	585	621	750
Amaranto	522	528	540
Tartrazina	430	470	480

Na FIGURA 5.5 tem-se a curva analítica para o azul brilhante, e os parâmetros de desempenho analítico são apresentados na TABELA 5.4. Os dados mostram que a faixa linear de resposta para os instrumentos comerciais estendem-se de $2,24 \times 10^{-7}$ a $4,69 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O P2FM apresentou faixa linear dinâmica com limite inferior em $2,13 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e limite superior $4,69 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. No entanto, o desempenho dos instrumentos comerciais apresentaram-se próximo a uma década para o limite inferior. Esta diferença pode estar relacionada ao posicionamento da fonte de REM, do LED tricolor. Como as três fontes estão no mesmo componente, isto é, estão no mesmo sentido, porém com direção ligeiramente diferente⁹⁵.

Para alinhar o sinal dos três canais da REM do LED para um ponto em comum, o fotodetector, deveria ser adicionado um conjunto de lentes objetivando-se colimar para minimizar as diferenças entre as direções das REM do LED. A adição destes componentes conduz a ganhos positivos, pois sinais interferentes são reduzidos. Como o P2FM dispensa esse tipo de componente óptico, entende-se que o desempenho apresentado está dentro do esperado.

Os parâmetros LD, LQ e S para as faixas selecionadas apresentaram valores aproximados, especialmente quando comparado o P2FM com o USB-2000. Estes parâmetros são influenciados pela razão entre a concentração e o sinal registrado. Segundo a Lei de Lambert-Beer, essa relação será maior no comprimento de máxima absorvância do cromóforo. No caso do P2FM, o desempenho é

influenciado por três fatores: faixa fotossensível do sensor, espectro de emissão da REM selecionada e da região de absorbância do cromóforo. Assim, o P2FM pode ser aplicado dentro de sua faixa de resposta sem perda no desempenho.

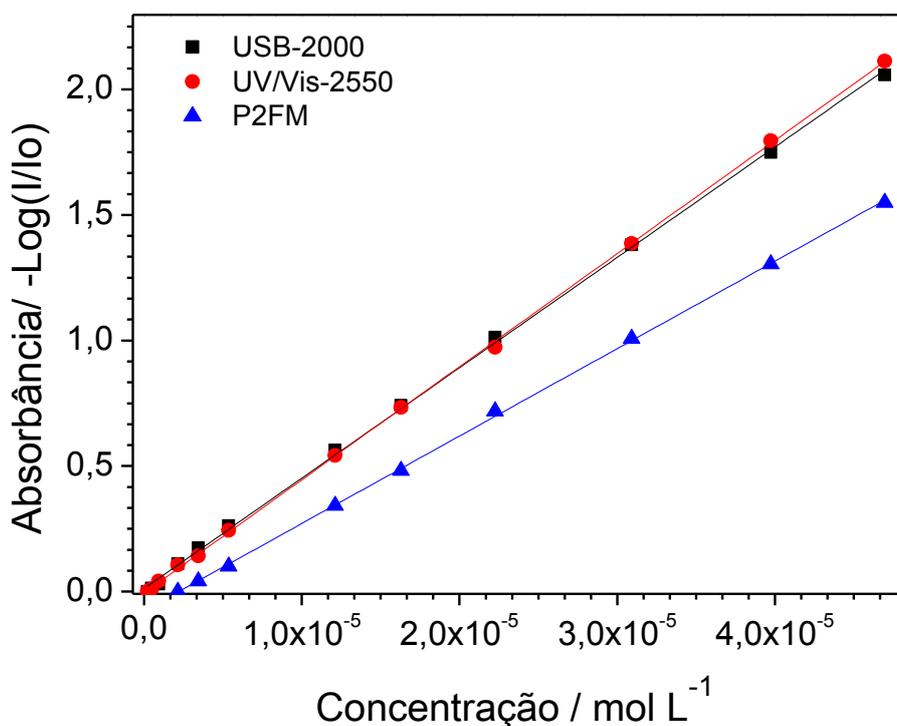


FIGURA 5.5 - Curva analítica do azul brilhante em instrumentos diferentes: UV-Vis-2550, USB-2000 e P2FM.

TABELA 5.4 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando-se o cromóforo azul brilhante.

Instrumento	R	LD / mol L ⁻¹	LQ / mol L ⁻¹	S / L mol ⁻¹	Faixa ** / mol L ⁻¹
UV/Vis-2550*	0,995	$3,1 \times 10^{-7}$	$9,3 \times 10^{-7}$	$4,5 \times 10^4$	$2,24 \times 10^{-7} /$ $4,69 \times 10^{-5}$
USB 2000*	0,991	$5,5 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^4$	$2,24 \times 10^{-7} /$ $4,69 \times 10^{-5}$
P2FM	0,975	$5,4 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^4$	$2,13 \times 10^{-6} /$ $4,69 \times 10^{-5}$

R - Coeficiente de correlação (R); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - Absorbância / 585 nm; ** faixa linear: Limite inferior/Limite superior.

A curva analítica para o amaranço, FIGURA 5.6, mostra que a inclinação da reta foi maior para os instrumentos comerciais, e o P2FM possui menor sensibilidade analítica. Entretanto, o limite inferior da faixa linear de resposta para o amaranço está em consonância com aqueles obtidos empregando-se os instrumentos comerciais que àquele realizado com o azul brilhante.

O cromóforo amaranço em parte tem maior vantagem que o azul brilhante porque o comprimento de onda fonte selecionada (LED, 528 nm) é bem próximo ao pico de máxima absorvância do amaranço (522 nm). Por outro lado, a fonte de REM do azul brilhante (LED, 621 nm) não encontra-se próxima ao pico de máxima absorvância (585 nm).

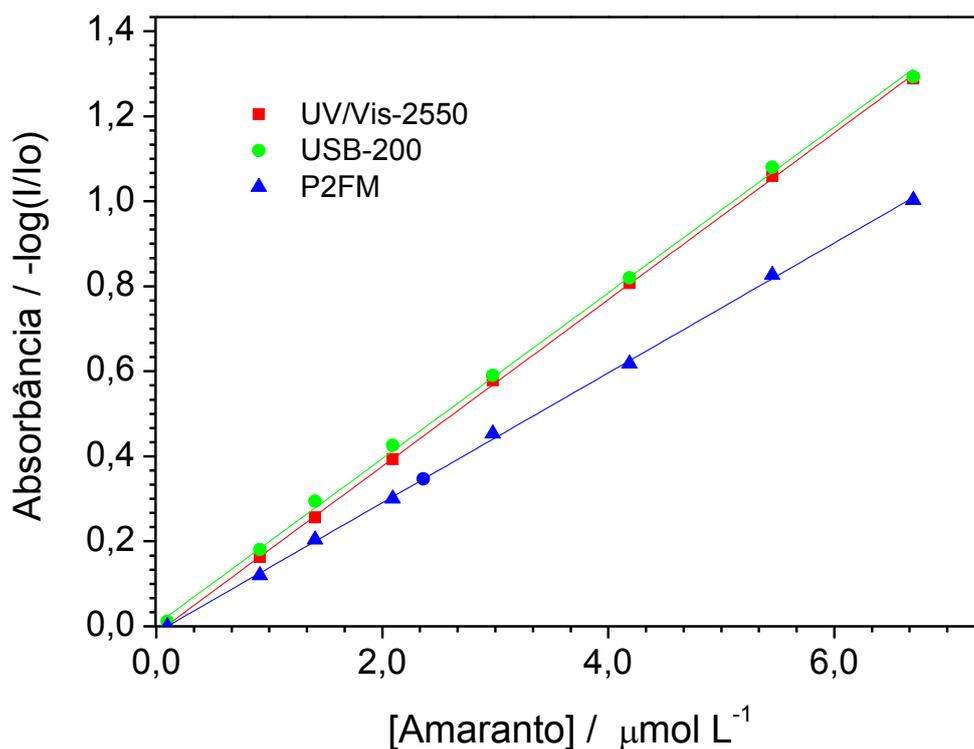


FIGURA 5.6 - Curva de calibração de solução de amaranço em três instrumentos diferentes: UV-Vis-2550, USB-2000 e P2FM.

TABELA 5.5 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando-se o corante amarantho.

Instrumento	R	LD / mol L ⁻¹	LQ / mol L ⁻¹	S / L mol ⁻¹	Faixa ** / mol L ⁻¹
UV/Vis- 2550*	0,991	$1,1 \times 10^{-7}$	$3,3 \times 10^{-7}$	$1,96 \times 10^5$	$4,94 \times 10^{-7} /$ $4,05 \times 10^{-5}$
USB 2000*	0,998	$6,6 \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-7}$	$1,95 \times 10^5$	$9,26 \times 10^{-7} /$ $4,05 \times 10^{-5}$
P2FM	0,997	$1,6 \times 10^{-7}$	$4,8 \times 10^{-7}$	$1,52 \times 10^5$	$1,22 \times 10^{-6} /$ $4,05 \times 10^{-5}$

R - Coeficiente de correlação (R); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - Absorbância / 522 nm, ** faixa linear: Limite inferior/Limite superior.

A curva analítica obtida para a tartrazina, FIGURA 5.7, e os parâmetros do desempenho analítico, TABELA 5.6, foram obtidos selecionando-se a configuração apresentada na TABELA 5.3.

Baseando-se no comprimento de onda de máxima absorbância, foram realizados os ensaios analíticos para comparação do desempenho analítico do protótipo proposto e dos instrumentos comerciais (UV/Vis-2550 e USB 2000), medindo-se a absorbância em 430 nm. No entanto, o P2FM foi configurado no modo absorbância ligando-se o LED em 470 nm e o sensor em 480 nm. Essa configuração pode ser utilizada, uma vez que a faixa de absorção da tartrazina é larga o suficiente para permitir uma boa sensibilidade, mesmo não realizando as medidas a 430 nm.

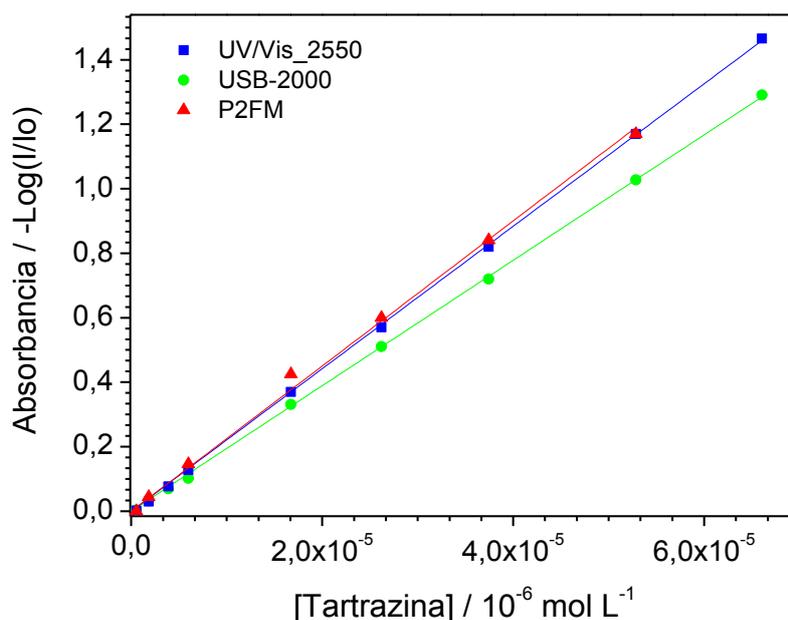


FIGURA 5.7 - Curva analítica da tartrazina em três instrumentos diferentes: UV-Vis-2550, USB-2000 e P2FM. Máxima absorbância em 430 nm.

TABELA 5.6 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos frente ao cromóforo tartrazina.

Instrumento	R	LD / mol L ⁻¹	LQ / mol L ⁻¹	S / L molL ⁻¹	Faixa ** / mol L ⁻¹
UV/Vis-2550*	0,999	$2,8 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^{-7}$	$2,23 \times 10^4$	$5,53 \times 10^{-7} /$ $6,60 \times 10^{-5}$
USB-2000*	0,999	$4,7 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$1,96 \times 10^4$	$5,53 \times 10^{-7} /$ $6,60 \times 10^{-5}$
P2FM	0,994	$1,9 \times 10^{-6}$	$5,9 \times 10^{-6}$	$2,21 \times 10^4$	$5,53 \times 10^{-7} /$ $5,28 \times 10^{-5}$

R - Coeficiente de correlação (R); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - Absorbância / 430 nm; ** faixa linear: Limite inferior/Limite superior.

A partir dos dados apresentados, o P2FM (modo fotométrico) apresentou um desempenho analítico próximo dos desempenhos obtidos empregando-se os instrumentos comerciais, mesmo sendo um instrumento constituído de um fotodetector e fonte de radiação simples, conferindo ao

instrumento desenvolvido um menor consumo energético e robustez para o seu emprego em campo (*in situ*).

O estudo para se encontrar a maior razão entre intensidade de REM do LED e a fotossensibilidade do sensor, pode levar a um maior desempenho do instrumento^{45,47}. No caso do P2FM, a maior razão da intensidade de REM e fotossensibilidade pode ser encontrada substituindo-se a resistência do LED, seção 3.2.4. Porém, esse estudo não foi realizado com P2FM, uma vez que o instrumento estava com todas as partes (óptica e eletrônica) acomodadas mecanicamente, não permitindo assim qualquer alteração do sistema: óptico, eletrônico ou mecânico para realização dos estudos seguintes.

Os instrumentos comerciais apresentados nesses estudos têm algumas características próprias. O espectrofotômetro USB-2000 (Ocean Optics®) que conta com uma fonte de radiação (SL-1)¹⁰⁸ de 6,5 W (lâmpada de halogênio, ~900h) e 1,5 A (5 VCC) tempo de estabilização de ~30 min. Enquanto o espectrofotômetro UV-VIS 2550¹⁰⁹, um equipamento de bancada, possui fonte de radiação de 50 W (lâmpada de halogênio, ~2000h) e consumo de energia de 250 VA (50/60 Hz, AC 100-220).

Levando-se em consideração o consumo energético e o desempenho apresentado (LQ, LD e faixa linear de resposta), o P2FM pode-se enquadrar como melhor alternativa para aplicações analíticas simples.

5.3.2 Teste de desempenho do fluorímetro

No procedimento de calibração foram tomados três compostos, azul de metileno (AM), fluoresceína (FL) e Rodamina 6G (R6G), utilizados na comparação de desempenho do P2FM frente aos instrumentos comerciais USB-2000 (Ocean Optics®) e RF5301/PC (Shimadzu®).

Nas FIGURAS 5.12 e 5.13 têm-se os gráficos de absorbância e fluorescência de FL e R6G obtidos com o espectrofotômetro UV/Vis-2550 (Shimadzu®) e o espectrofluorímetro RF5301/PC, respectivamente. Os comprimentos de onda de máxima absorbância encontram-se em 490, 527 nm, FIGURA 5.9, para FL e R6G, respectivamente. Utilizando estes comprimentos de onda, tem-se o espectro de emissão destas espécies, com máxima emissão em 515 nm e 553 nm, para FL e R6G, respectivamente.

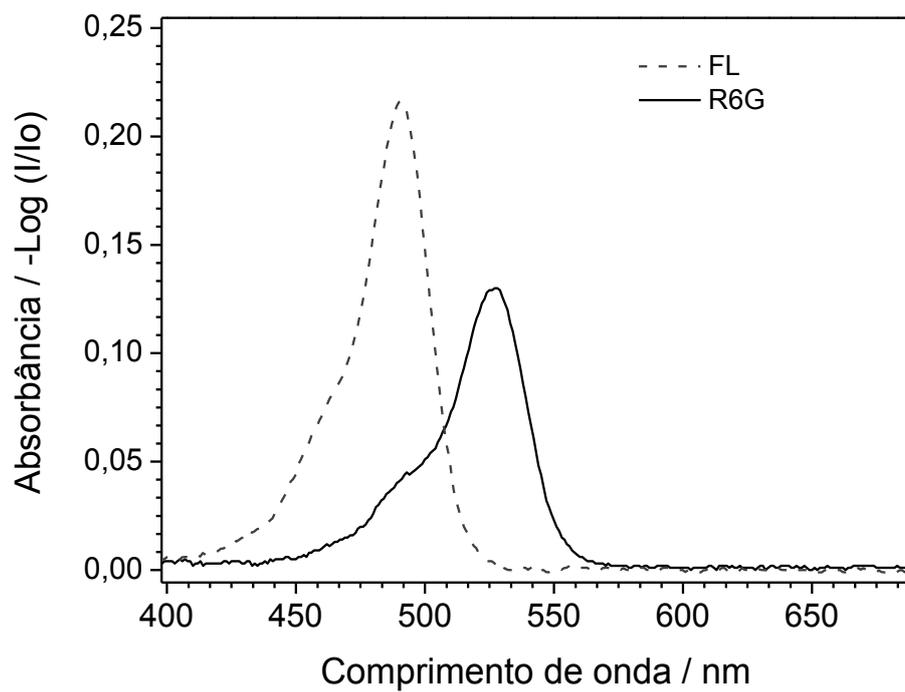


FIGURA 5.8 - Espectro de absorvância de soluções de FL ($4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e R6G ($2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

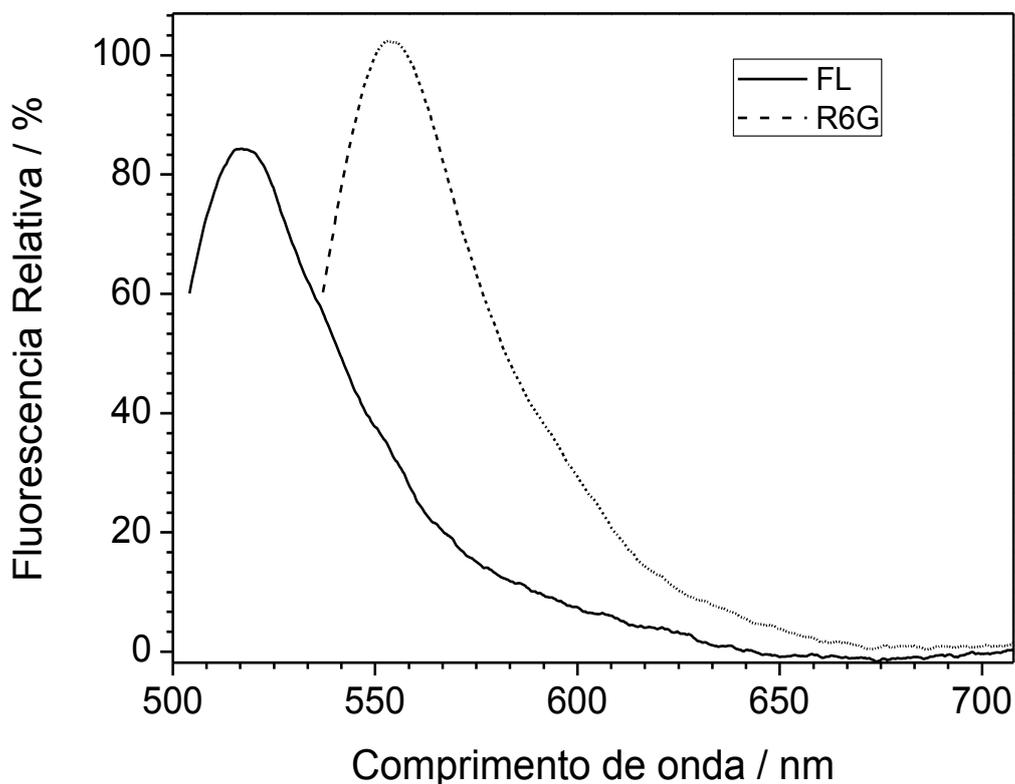


FIGURA 5.9 - Espectro de emissão fluorescente normalizado de soluções de FL ($\lambda = 490 \text{ nm}$, $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e R6G ($\lambda = 560 \text{ nm}$, $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

O deslocamento entre o pico de máxima absorbância e o de máxima fluorescência se devem ao desvio de Stokes. O desvio de Stokes para FL e R6G foi de 25 e 26 nm, respectivamente. Devido a este desvio apresentado pelos fluoróforos, torna-se mais fácil detectar os comprimentos de ondas da fluorescência.

A fluoresceína possui a largura de banda de máxima absorção a meia altura do pico entre 471,8 e 503,3 nm. Na FIGURA 5.10, tem-se o espectro de emissão da fluoresceína que foi excitada em 490 nm com comprimento de onda de máxima emissão em 515 nm. Com base nesses dados, buscou-se selecionar a melhor configuração do P2FM que responde a este fluoróforo. Assim, configurou-se o software de controle do P2FM da seguinte forma:

Fotodetector: 540 nm

LED (excitação): 470 nm

Frequência: 10000 milissegundos (10 s)

Na FIGURA 5.10 são apresentados os dados de uma curva analítica obtida com solução de fluoresceína com excitação em 490 nm e pico de máxima emissão em 515 nm, otimizando-se assim as melhores condições para os instrumentos comerciais.

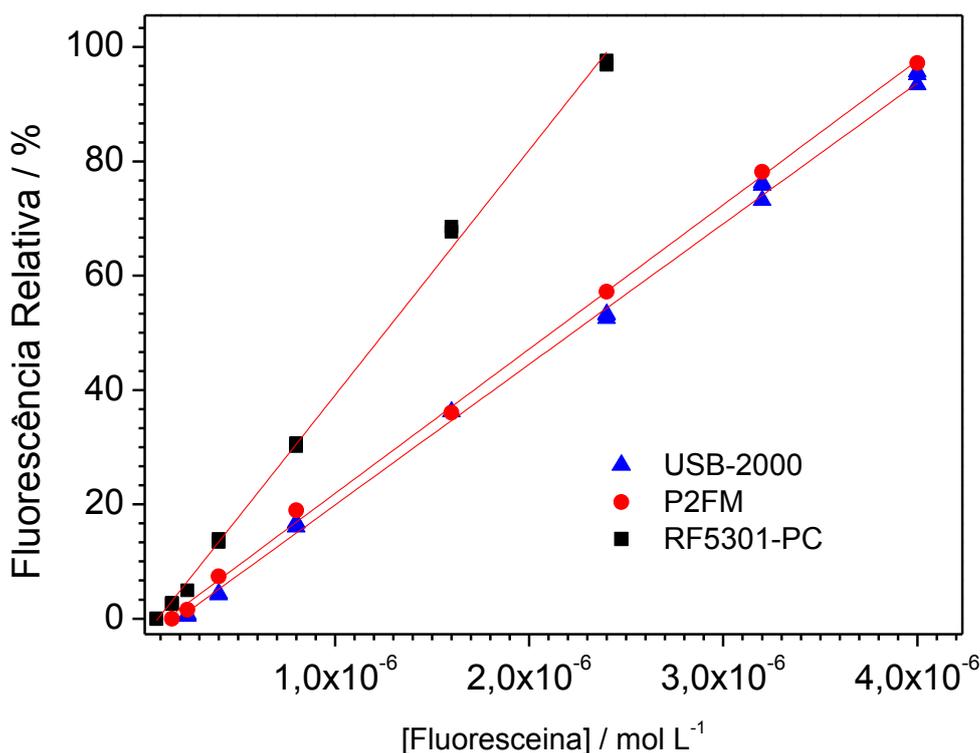


FIGURA 5.10 - Curvas analíticas obtidas para a fluoresceína (λ_{exc} . 470 nm, λ_{em} 515 nm) em três instrumentos diferentes: RF5301-PC, USB-2000 e P2FM.

Os parâmetros analíticos obtidos a partir dos dados apresentados na FIGURA 5.10 estão na TABELA 5.7. A faixa linear obtida para o instrumento que apresentou melhor resposta, RF5301-PC, estendeu-se de $1,60 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,40 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Por outro lado, o P2FM e o USB-2000 apresentaram desempenhos similares. No entanto, como o P2FM apresentou desvio menor que aqueles empregando-se o USB-2000, os LD, LQ e R foram melhores.

Como mostrado, o RF5301-PC apresentou uma curva analítica com maior coeficiente angular, isto é, respondendo mais intensamente à variação de concentração que os demais instrumentos (maior sensibilidade). Os resultados

obtidos são devidos a faixa de radiação fluorescente que incide sobre o fotodetector ter sido selecionada por um conjunto óptico com uma fenda, resultando assim, em uma maior sensibilidade.

TABELA 5.7 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando-se a fluoresceína

Instrumento	R	LD / mol L ⁻¹	LQ / mol L ⁻¹	S / L mol ⁻¹	Faixa ** / mol L ⁻¹
RF5301-PC*	0,999	$3,9 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$4,28 \times 10^7$	$1,60 \times 10^{-7}$ / $2,40 \times 10^{-6}$
USB 2000*	0,995	$1,2 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,46 \times 10^7$	$4,00 \times 10^{-7}$ / $4,60 \times 10^{-6}$
P2FM	0,997	$8,3 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-7}$	$2,52 \times 10^7$	$2,40 \times 10^{-7}$ / $4,60 \times 10^{-6}$

R - Coeficiente de correlação (R); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * λ_{exc} . 490 nm, λ_{em} 515 nm; ** faixa linear: Limite inferior/Limite superior.

No estudo da seleção da melhor configuração do P2FM para a detecção de R6G, configurou-se o software de controle do P2FM da seguinte forma:

Fotodetector: 750 nm

LED (excitação): 528 nm

Frequência: 10000 milissegundos (10 s)

Na FIGURA 5.11 são apresentados os dados de uma curva analítica obtida com soluções de Rodamina 6G com excitação em 530 nm e pico de máxima emissão em 553 nm. Os parâmetros analíticos obtidos a partir dos dados apresentados na FIGURA 5.11 estão apresentadas na TABELA 5.8.

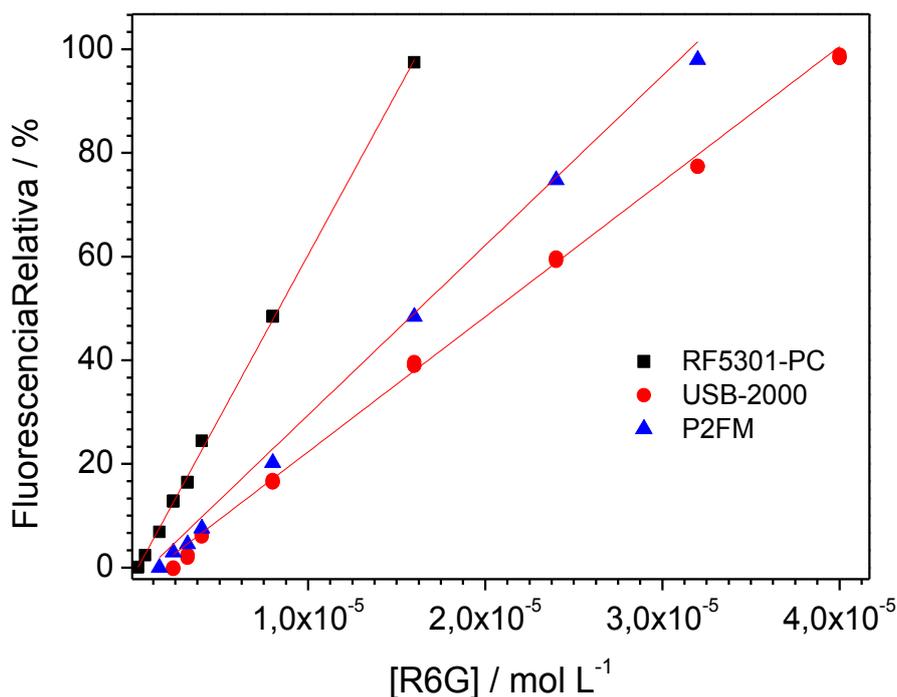


FIGURA 5.11 - Curva analítica da Rodamina G ($\lambda_{exc.}$ 530 nm, λ_{em} 553 nm) em três instrumentos diferentes: RF5301-PC, USB-2000 e P2FM.

Os parâmetros analíticos obtidos a partir dos dados apresentados na FIGURA 5.11 estão na TABELA 5.8. O instrumento que apresentou melhor resposta, RF5301-PC, obteve uma faixa linear que estendeu-se de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ao passo que, o P2FM e o USB-2000 apresentaram desempenhos similares. O P2FM apresentou parâmetros melhores que o USB-2000.

TABELA 5.8 - Dados do desempenho analítico dos instrumentos empregando R6G

Instrumento	R	LD / mol L ⁻¹	LQ / mol L ⁻¹	S / L mol ⁻¹	Faixa ** / mol L ⁻¹
RF5301-PC *	0,999	$1,97 \times 10^{-8}$	$6,58 \times 10^{-8}$	$5,27 \times 10^6$	$4,0 \times 10^{-6}$ / $1,6 \times 10^{-5}$
USB 2000*	0,998	$1,30 \times 10^{-7}$	$4,35 \times 10^{-7}$	$2,60 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-6}$ / $4,0 \times 10^{-5}$
P2FM	0,999	$4,79 \times 10^{-8}$	$1,60 \times 10^{-7}$	$3,27 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-6}$ / $3,2 \times 10^{-5}$

R - Coeficiente de correlação (R); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - $\lambda_{exc.}$ 530 nm, λ_{em} 553 nm ; ** faixa linear: Limite inferior/Limite superior.

6 Aplicações

Devemos dar algumas pérolas aos porcos para que um dia não digam
que não tiveram oportunidade.

Para demonstrar algumas das possíveis aplicações do P2FM envolvendo a multitarefa em um único instrumento, esse equipamento foi empregado em três procedimentos analíticos distintos para a: a) determinação da estequiometria de um complexo cromogênico, b) determinação de sulfito, e c) determinação de cálcio em água mineral.

6.1 DETERMINAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DE UM COMPLEXO

6.1.1 Objetivo específico

Teve-se como objetivo aplicar o P2FM no modo fotométrico como alternativa para a determinação da constante de estabilidade de um complexo, a razão estequiométrica empregando-se reagente comumente encontrado em laboratório de ensino de química: Fe^{2+} e *o*-fenantrolina (*o*-Fen).

6.1.2 Soluções e reagentes

Preparou-se uma solução de Fe^{2+} $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão ácido acético/acetato pH 4,5. Para isso, dissolveu-se 139,0 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) em tampão para 500 mL.

Uma solução de *o*-Fen ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se 90,2 mg de *o*-Fen (Synth) em 500 mL de uma solução de tampão ácido acético/acetato pH 4,5.

A solução tampão ácido acético/acetato (pH 4,5) foi preparada dissolvendo-se 8,2 g de acetato de sódio (Synth) diluído em 700 mL de água, em seguida, com auxílio de um pHmetro e sob agitação adicionou-se ácido acético (Synth) concentrado até que o alcançar o pH 4,5. Depois, transferiu-se essa solução para um balão volumétrico de 1,0 L e completou-se o volume⁸³.

6.1.3 Aparatos e instrumentação

A determinação do pH das soluções foi efetuada empregando-se um “pHmetro” digital ORION, modelo EA-940, conectado a um eletrodo combinado de vidro (Digimed) com um eletrodo de referência de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D (com precisão de $\pm 0,01 \text{ mg}$) foi utilizada na medição das massas dos reagentes.

Foi empregado o P2FM no modo fotométrico, com o LED selecionado para a REM em 528 nm e canal do sensor em 540 nm.

6.1.4 Procedimento analítico

O procedimento experimental foi realizado conforme apresentados na TABELA 6.1. Após a adição dos volumes dos reagentes, Fe^{2+} ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e o-Fen ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), o volume final (25,0 mL) foi obtido completando-se solução de tampão ácido acético/acetato pH 4,5, resultando em uma solução diluída.

TABELA 6.1 - Volume de soluções de Fe^{2+} $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e de *o*-fen $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ adicionados, concentração final e proporção.

Exp.	Volume adicionado (mL)		Concentração final (mol L^{-1})*		Proporção Fe^{2+} : <i>o</i> -Fen
	V(Fe^{2+})	V(<i>o</i> -fen)	Fe^{2+}	<i>o</i> -Fen	
1	1	1	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	1:1
2	1	2	$4,0 \times 10^{-5}$	$8,0 \times 10^{-5}$	1:2
3	1	3	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-4}$	1:3
4	1	4	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^{-4}$	1:4
5	1	5	$4,0 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-4}$	1:5
6	1	6	$4,0 \times 10^{-5}$	$2,40 \times 10^{-4}$	1:6
7	1	7	$4,0 \times 10^{-5}$	$2,80 \times 10^{-4}$	1:7
8	1	8	$4,0 \times 10^{-5}$	$3,20 \times 10^{-4}$	1:8
9	1	9	$4,0 \times 10^{-5}$	$3,60 \times 10^{-4}$	1:9
10	1	10	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-4}$	1:10

* Volume final = 25,0 mL.

6.1.5 Resultados e discussões

Conforme descrito no procedimento analítico, os resultados obtidos são apresentados na TABELA 6.2. A partir do terceiro experimento, o sinal de absorvância permaneceu constante, indicando que a quantidade máxima para a formação do cromóforo foi atingida. Desta forma, todo excesso adicionado não alterou o sinal de absorvância significativamente.

TABELA 6.2 - Resultados obtidos usando-se o método da razão molar com o P2FM

Exp	Volumes adicionados / mL		Absorbância			
	<i>o</i> -Fen	Fe ²⁺	Réplicas			Média
1	1	1	0,183	0,181	0,189	0,183
2	2	1	0,375	0,369	0,368	0,371
3	3	1	0,516	0,531	0,533	0,527
4	4	1	0,546	0,542	0,535	0,541
5	5	1	0,542	0,546	0,55	0,546
6	6	1	0,541	0,56	0,556	0,552
7	7	1	0,554	0,551	0,548	0,551
8	8	1	0,561	0,576	0,558	0,565
9	9	1	0,54	0,544	0,55	0,545
10	10	1	0,541	0,576	0,55	0,556

[*o*-Fen] = [Fe²⁺] = $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

A partir dos dados apresentados na TABELA 6.2, construiu-se um gráfico da absorbância do complexo formado em função da adição de *o*-Fen, FIGURA 6.1. Pode-se notar que para adições de *o*-Fen ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) maior ou igual a 3,0 mL os experimentos não apresentaram mudança significativa na absorbância, indicando que a reação atingiu a máxima formação do produto. Neste caso, operando-se numa situação fora da saturação do sensor, pode-se concluir que no ponto em que a adição de um dos reagentes não muda mais a absorbância, atingiu-se a razão entre as quantidades de matéria de *o*-Fen e Fe²⁺.

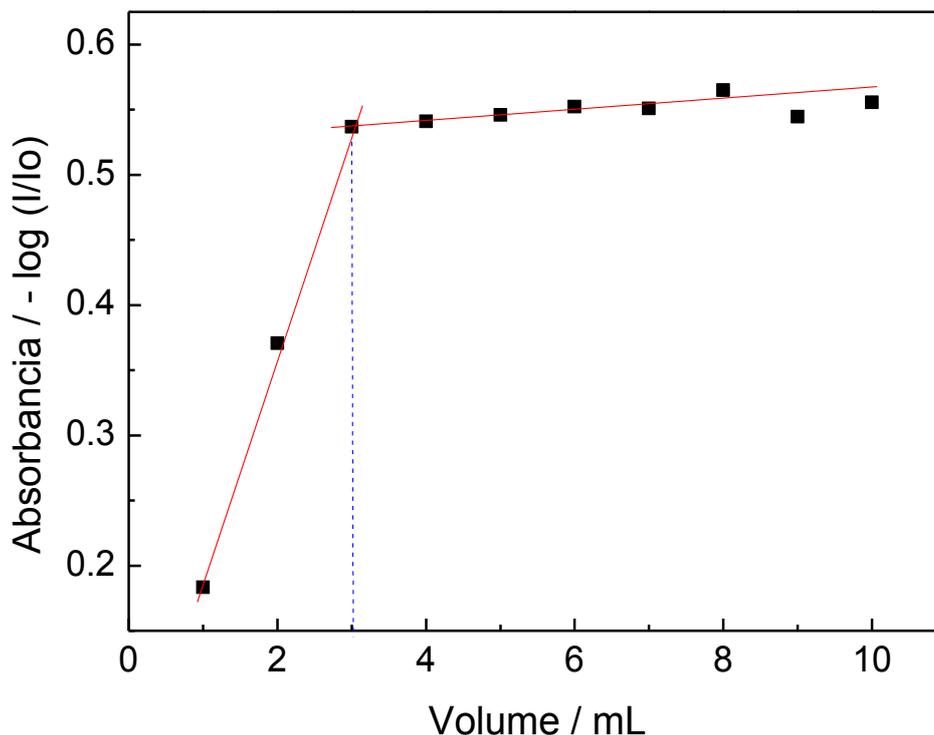
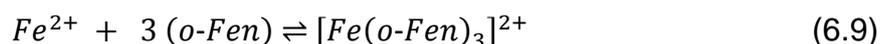


FIGURA 6.1 - Absorbância em função da adição de *o*-Fen ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) contendo Fe^{2+} ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

Em cada um dos experimentos foi adicionado 1,0 mL de solução de Fe^{2+} e, quando se adicionou 3,0 mL da solução de *o*-Fen, atingiu-se a maior absorbância, caracterizada pelo ponto de interseção. Neste ponto foi determinada a razão em quantidade de matéria de *o*-fenantrolina: Fe^{2+} , sendo igual a 3:1, como apresentado na EQUAÇÃO 6.9.



Conhecendo-se a razão em quantidade de matéria de *o*-fenantrolina e Fe^{2+} , foi possível calcular ϵ , $[\text{Fe}^{2+}]$ e $[\text{o-Fen}]$. Assim, tomou-se como referência a absorbância média das absorbâncias obtidas nos experimentos 3, 4, 5, 6 e 7. O valor encontrado foi igual a 0,546, ou seja, a partir da média de pontos após a

intersecção. Este valor foi empregado para no cálculo do coeficiente de absorvidade molar do complexo formado ($[Fe(o-Fen)_3]^{2+}$), empregando-se a EQUAÇÃO 6.10.

$$\varepsilon = \frac{A}{b.[ML_3]} = \frac{0,546}{1.(4,0.10^{-5})} = 1,365 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad (6.10)$$

No cálculo da concentração do ML_3 , $[ML_3]$, no ponto de intersecção, foi considerada a absorbância nesse ponto, $A = 0,536$, empregando-se a EQUAÇÃO 6.11:

$$[ML_3] = A/b.\varepsilon = \frac{0,537}{1 \times 1,36 \times 10^4} = 3,92 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \quad (6.11)$$

e também a concentração total de Fe^{2+} e de $o-Fen$ na solução são $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $12,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Assim, as concentrações das espécies livres de Fe^{2+} e de $o-Fen$ no equilíbrio são obtidas a partir das EQUAÇÕES 6.12 e 6.13.

$$[Fe^{2+}] = 4,00 \times 10^{-5} - 3,92 \times 10^{-5} = 7,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \quad (6.12)$$

$$[O - Fen] = 12,00 \times 10^{-5} - (3 \times 3,92 \times 10^{-5}) = 2,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \quad (6.13)$$

Aplicando-se os dados na EQUAÇÃO 6.14, obtém-se a constante de formação:

$$K_{ML_3} = \frac{3,92 \times 10^{-5}}{(7,3 \times 10^{-7}).(2,2 \times 10^{-6})^3} = 5,04 \times 10^{18} \quad (6.14)$$

A constante de estabilidade do complexo obtida empregando-se o equipamento desenvolvido foi igual a $5,04 \times 10^{18}$. Este valor é concordante com o valor da literatura de $6,2 \times 10^{18}$ ¹¹⁰⁻¹¹³.

6.2 DETERMINAÇÃO DE SULFITO

6.2.1 Objetivo específico

Determinar sulfito em amostras de bebidas e possíveis interferentes ao método fotométrico.

6.2.2 Soluções e reagentes

A solução tampão ácido acético/acetato (pH 4,5) e *o*-Fen ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foram preparadas conforme seção 6.1.3.

Uma solução de sulfito de sódio anidro ($1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹), Sigma-Adrich, foi preparada dissolvendo-se 0,6302 g do reagente em 500 mL de solução tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

Uma solução estoque de Fe(III) ($5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) foi preparada dissolvendo o sal (Fe(NO₃)₃.9H₂O, Sigma-Adrich), em solução de ácido sulfúrico, 95-98 % (Qhemis) 0,5 mol L⁻¹. Para aplicação, esta solução foi diluída para $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

As seguintes soluções para os testes de interferentes foram preparadas adicionando as massas de sacarose (500,0 mg, Aldrich), glicose (500,0 mg, Sigma), frutose (500,0 mg, Aldrich), aspartame (1,9 mg, Natural Pharma), ciclamato (3,3 mg, Sigma), sacarina (0,8 mg, Aldrich), ácido fumárico (50,0 mg, Aldrich), ácido ascórbico (2,5 mg, Sigma), ácido cítrico (7,5 mg, Dinâmica) e ácido tartárico (7,5 mg, Reagen) em tampão acetato, sendo então o volume completado para 25 mL com solução de sulfito (350 mg/L = $4,37 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

6.2.3 Instrumentos e aparatos

A determinação dos pHs das soluções foi realizada empregando-se um pHmetro digital ORION, modelo EA 940, conectado a um eletrodo combinado de vidro Digimed com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

Foram também empregados:

Um espectrofotômetro Shimadzu, modelo Uv/Vis-2550.

Um espectrofotômetro Ocean optics, USB-2000, dotado de um conjunto de fibras ópticas e suporte para cubeta de 1,0 cm.

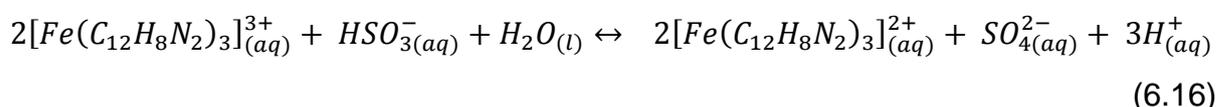
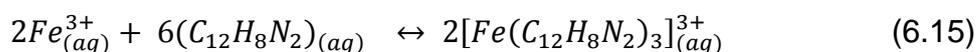
Uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D.

O P2FM, no modo fotométrico.

6.2.4 Procedimento experimental

A reação usada para determinação do sulfito se dá pela formação de um cromóforo de cor vermelho-amarelado indicado, referente ao complexo formado, $[Fe(o-Fen)_3]^{2+}$ ⁸⁸.

Primeiramente forma-se o complexo $[Fe(o-Fen)_3]^{3+}$, obtido a partir da reação entre Fe(III) e o-Fen ($C_{12}H_8N_2$), EQUAÇÃO 1.15⁸⁵. Este complexo apresenta-se translucido em solução, não absorvendo radiação eletromagnética na faixa visível do espectro. Em seguida, a adição de sulfito (HSO_3^-) em um meio contendo o complexo $[Fe(o-Fen)_3]^{3+}$, o sulfito reduz o Fe(III) do complexo $[Fe(o-Fen)_3]^{3+}$ a Fe(II), EQUAÇÃO 6.16. Após a reação da redução do ferro o complexo, $[Fe(C_{12}H_8N_2)_3]_{(aq)}^{2+}$, apresenta a cor vermelho-amarelado de máxima absorbância em 510 nm.



Para a obtenção da curva analítica, foram adicionados em balões volumétricos de 25,0 mL, 1,5 mL da solução de Fe(III) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ seguido pela adição de 5,0 mL de *o*-Fen $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após, adicionou-se o agente redutor (analito), solução do íon SO_3^{2-} $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em uma faixa de volume entre $10,0 \times 10^{-6} \text{ L}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ L}$. Em seguida, completou-se o volume do balão com o tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

Para determinação da concentração das amostras foram adicionados em balões volumétricos de 25 mL, 1,5 mL da solução de Fe(III) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 5 mL de *o*-Fen $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em seguida adicionou-se o volume de 1,0 mL das amostras e completou-se o volume com o tampão ácido acético/acetato (pH 4,5). As amostras que apresentaram concentração fora da curva analítica foram diluídas.

No estudo dos interferentes foram adicionados em um balão volumétrico de 25,0 mL, 1,5 mL da solução de Fe(III) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ seguido pela adição de 5,0 mL de *o*-Fen $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Após, adicionou-se 114,4 μL da solução de interferente. Em seguida, completou-se o volume do balão com o tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

6.2.5 Resultados

Na FIGURA 6.2 são apresentados os espectros obtidos da reação entre diferentes concentrações dos íons sulfito de $3,0 \times 10^{-4}$ a $10,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em concentração constante do íon complexo $[\text{Fe}(\text{O} - \text{Fen})_3]^{3+}$ ($6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH - 4,5) empregando-se com o espectrofotômetro UV/Vis-2550.

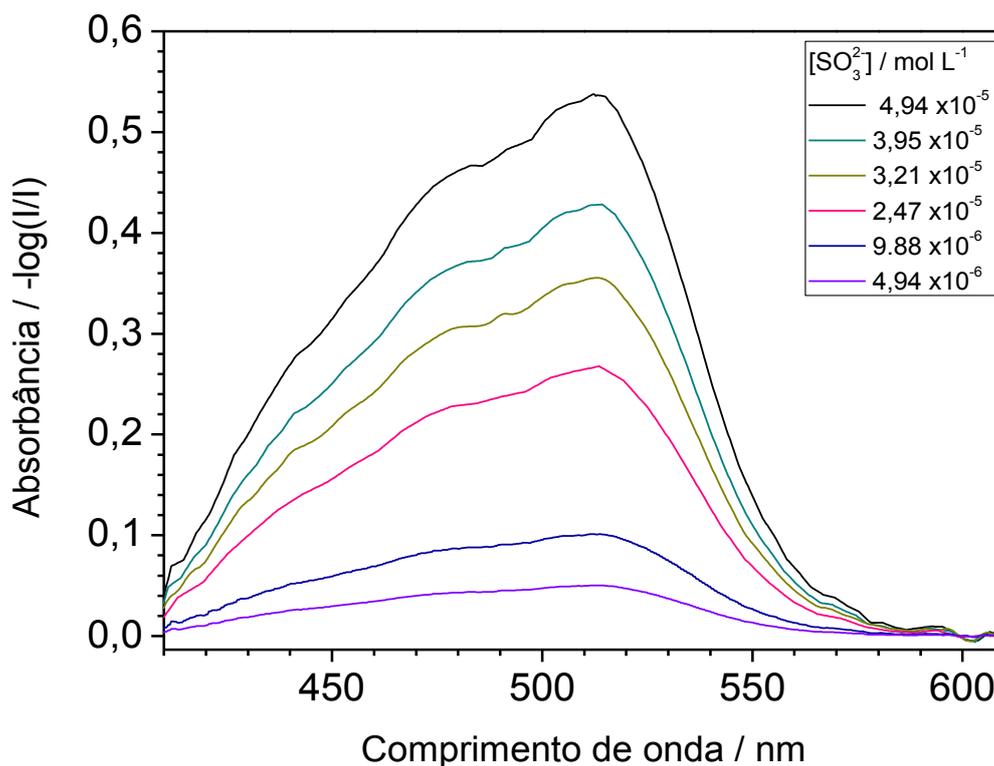


FIGURA 6.2 - Gráfico de concentrações do íon sulfito em solução de $[\text{Fe}(\text{o-Fen})_3]^{3+}$ ($6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH - 4,5).

Baseando-se no comprimento de onda de máxima absorção do cromóforo formado, como era esperado, foram realizados os estudos da curva analítica em 510 nm em três instrumentos distintos. Ao passo que, no P2FM configurou-se a fonte em 528 nm e o canal 1 do sensor (sem filtro).

Na FIGURA 6.3 são apresentados dados das curvas analíticas obtidas com instrumentos diferentes para concentrações do íon sulfito em solução contendo íon complexo, $[\text{Fe}(\text{O-Fen})_3]^{3+}$ ($6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

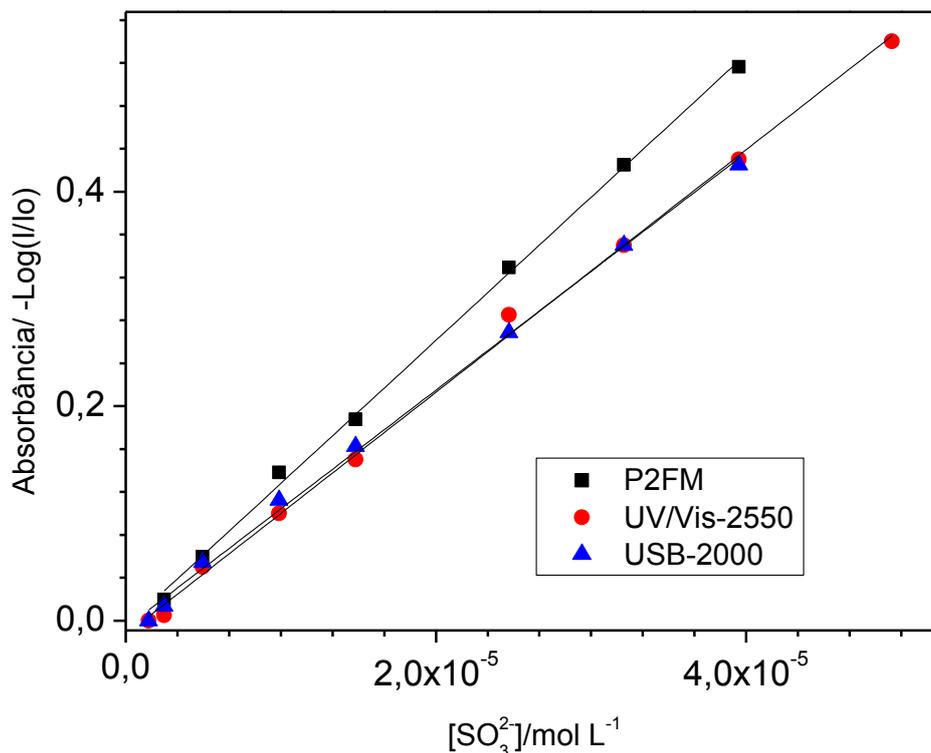


FIGURA 6.3 – Curvas analíticas do íon sulfito em solução de íons complexo $[\text{Fe}(\text{o-Fen})_3]^{3+}$ ($6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão ácido acético/acetato (pH – 4,5)

A curva analítica obtida com o instrumento P2FM foi a que apresentou maior coeficiente angular (sensibilidade). O maior coeficiente angular da curva analítica deve-se a alguns fatores como: a ampla faixa de absorvância no espectro do cromóforo e da seleção do canal 1 do sensor. A largura de banda a meia altura do complexo formado estende de 441 nm a 538 nm e o canal do sensor selecionado, canal 1, tem melhor fotossensibilidade.

Os parâmetros de desempenho analítico dos instrumentos nesse método foram calculados, e os resultados obtidos encontram-se na TABELA 6.3. Melhor desempenho do P2FM para LD, LQ e S estão diretamente relacionados ao canal do sensor selecionado.

TABELA 6.3 - Comparação dos valores de R, LD, LQ e S entre instrumentos para o método de determinação de sulfito

Instrumento	R	LD / mol L ⁻¹	LQ / mol L ⁻¹	S / L mol ⁻¹	F / mol L ⁻¹
UV/Vis- 2550*	0,997	1,4× 10 ⁻⁶	4,2× 10 ⁻⁶	11,3 × 10 ³	1,50 × 10 ⁻⁶ / 4,95 × 10 ⁻⁵
USB 2000*	0,994	1,3× 10 ⁻⁶	3,8× 10 ⁻⁶	11,1 × 10 ³	2,47 × 10 ⁻⁶ / 3,95 × 10 ⁻⁵
P2FM	0,963	1, 2× 10 ⁻⁶	3,7× 10 ⁻⁶	13,3 × 10 ³	2,47 × 10 ⁻⁶ / 3,95 × 10 ⁻⁵

R - Coeficiente de correlação (R); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; F - Faixa de resposta; * - Absorbância / 510 nm.

6.2.5.1 Testes de interferência em potencial

No teste dos interferentes em potencial foram estudadas algumas das principais substâncias concomitantes com os agentes sulfitantes em amostras de bebidas. Para o levantamento de amostras com essas características, buscou-se na norma brasileira^{92,114} referência das espécies e suas concentrações, TABELA 6.4.

A concentração das substâncias frutose, glicose e sacarose possuem apenas limite mínimo de concentração, dado em termo de Brix. Então, considerou-se um valor superior ao Brix¹¹⁴. Para as demais substâncias foram considerados seus valores máximos permitidos⁹².

O estudo de interferência do método foi realizado adicionando-se estas substâncias separadamente em solução contendo concentrações do íon sulfito 350 × 10⁻³ g L⁻¹, em tampão ácido acético/acetato (pH 4,5).

TABELA 6.4 - Algumas substâncias adicionadas e encontradas em bebidas alimentícias. Concentrações selecionadas para estudo de interferentes.

Interferente	Concentração / g L⁻¹	Tipo de amostra
Sacarose*	20,0	Bebidas naturais
Glicose*	20,0	Bebidas naturais
Frutose*	20,0	Bebidas naturais
Aspartame (artificial)**	0,075	Bebidas dietéticas
Ciclamato (artificial)**	0,130	Bebidas dietéticas
Sacarina (artificial)**	0,030	Bebidas dietéticas
Ácido fumárico**	2,0	Refrescos e refrigerantes
Ácido ascórbico**	0,1	Vinho
Ácido cítrico**	3,0	Bebidas alcoólicas mistas
Ácido tartárico**	3,0	Bebidas alcoólicas mistas

*MAPA - Portaria 544/1998 , ** Limite máximo segundo a CNS/MS Nº 4(1988).

Segundo os dados apresentados, TABELA 6.5, pode-se verificar que algumas substâncias apresentam interferências significativas. As substâncias que causaram maiores interferências em ordem decrescente foram o ácido tartárico, ácido cítrico e o ácido ascórbico, resultando nas concentrações 20,0, 15,6 e $0,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Nesse sentido verifica-se que o ácido tartárico embora em concentração em quantidade de matéria próxima ao do ácido cítrico, sua interferência foi mais do que três vezes maior.

O ácido ascórbico^{88,115}, outro agente redutor forte, apresentou uma interferência de 13,1%. No entanto, a concentração máxima permitida de $5,68 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ nestas amostras, é cerca de oito vezes menor que a concentração de sulfito ($4,37 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) nas amostras.

As demais substâncias não apresentaram interferência significativa (máximo de 5 %), mesmo estando em elevada concentração como é o caso da sacarina, ciclamato, aspartame, glicose, sacarose e frutose.

TABELA 6.5 - Efeito de aditivos comuns em bebidas

Aditivos (Interferentes)	Interferência (%)
Sacarose	3,3
Glicose	2,7
Frutose	4,8
Aspartame	2,5
Ciclamato	3,0
Sacarina	2,9
Ácido fumárico	2,3
Ácido ascórbico	13,1
Ácido cítrico	9,4
Ácido Tartárico	38,8

6.2.6 Determinação de sulfito em amostras alimentícias

Este método foi aplicado na determinação de sulfito em amostras alimentícias que contém agentes sulfitantes. As amostras foram adquiridas em mercado local, São Carlos – SP, TABELA 6.6

Para análise dessas amostras alguns cuidados foram tomados para garantir a origem do sinal referente à reação entre o agente sulfitante com Fe (III), seguido da reação com *o*-Fen.

Durante o experimento verificou que as amostras Am1, Am2, Am3 e Am8 apresentaram erro maior que o esperado. O procedimento realizado sem a adição de Fe II e verificou-se que essas amostras apresentavam coloração característica da formação do complexo $[\text{Fe}(\text{o-Fen})_3]^{2+}$. Além disso, para o suco de caju (Am3) descontou-se o sinal de turbidez ⁴⁷, realizando-se o procedimento sem a presença do agente complexante e, em seguida, subtraindo-se ao resultado obtido pelo método proposto.

TABELA 6.6 - Resultado da determinação de sulfito em amostras comerciais

Amostras	Método de referência / mg L ⁻¹	Método proposto / mg L ⁻¹	Erro relativo (%)
Am1 - cooler com vinho	109,2	110,4	+1,15
Am2 - vinho branco	198,9	191,8	-3,58
Am3 - suco de caju concentrado	348,7	356,7	+2,28
Am4 - água de coco	101,8	105,2	+3,71
Am5 - água de coco	247,7	246,4	-0,51
Am6 - água de coco	170,8	166,6	-2,46
Am7 - vinagre de álcool	59,4	59,9	+2,82
Am8 - vinagre de frutas	177,2	170,2	-3,55

(1) replicas = 3.

Após aplicar o teste *t*-pareado para os resultados obtidos empregando-se o método de referência e o método proposto, o valor de *t* calculado foi de 0,66 o qual é menor do que o valor crítico (2,36, $\alpha = 0,05$). Pode-se concluir então que não há diferença significativa entre os resultados obtidos, empregando-se os dois métodos analíticos, em um nível de confiança de 95%.

6.2.7 Estudo do efeito da matriz

As amostras foram submetidas ao teste de recuperação de sulfito para avaliar possíveis efeitos de matriz. Os testes foram realizados adicionando 70,0 mg L⁻¹ de SO₃²⁻, equivalente a 20% do máximo permitido, nas amostras. Os valores de recuperação para cada uma das amostras e o erro relativo podem ser vistos na TABELA 6.7.

TABELA 6.7 - Estudo de adição e recuperação de sulfito ($70,0 \text{ mg L}^{-1}$) em amostras comerciais.

Amostras	Adição / mg L^{-1}	Encontrado / mg L^{-1}	% Encontrado
Am1 - cooler com vinho	70,0	63,4	90,5
Am2 - vinho branco	70,0	70,5	100,7
Am3 - suco de caju	70,0	68,6	98,0
Am4 - água de coco	70,0	71,7	102,4
Am5 - água de coco	70,0	72,2	103,2
Am6 - água de coco	70,0	69,8	99,7
Am7 – vinagre de álcool	70,0	73,1	104,4
Am8 - vinagre de frutas	70,0	68,8	98,3

(1) replicas = 3.

O maior erro relativo foi obtido para a amostra Am1, sendo de 90,5 %. Os demais valores estão dentro da faixa de recuperação aceitável¹¹⁶.

6.3 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO EM ÁGUA

MINERAL

6.3.1 Objetivo específico

Determinar a concentração total de Ca^{2+} e Mg^{2+} em amostras de água mineral.

Demonstrar o desempenho do P2FM no modo fluorimétrico.

6.3.2 Soluções e reagentes

Preparou-se uma solução de hidróxido de potássio (Synth) $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ dissolvendo-se 11,22 g de KOH em 500,0 mL de água deionizada.

Uma solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada diluindo-se 4,2 mL de HCl (Synth) para 500 mL de água.

A solução padrão de carbonato de cálcio ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi obtida adicionando-se 250,2 mg de carbonato de cálcio (Sigma-Aldrich) em 500,0 mL de solução ácida (HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Uma solução padrão de calceína ($96,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se $15,0 \times 10^{-3} \text{ g}$ de calceína em 250 mL de solução básica (KOH, $0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Essa solução foi armazenada ao abrigo da luz e usada em até de 24 h apresentar baixa estabilidade.

A água utilizada neste trabalho foi purificada e deionizada por um sistema de purificação Milli-Q (com resistividade maior que $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

6.3.3 Instrumentos e aparatos

Os espectros de emissão foram obtidos sob temperatura controlada ($24 \text{ }^\circ\text{C}$) em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF5301/PC dotado de uma lâmpada de xenônio de 150 W e uma fotomultiplicadora do tipo R928.

Um fotômetro Ocean Optics modelo USB2000 configurado no modo fluorimétrico dotado de fibra óptica de $50 \times 10^{-6} \text{ m}$.

O protótipo P2FM, no modo fluorimétrico com LED para excitação com emissão em 470 nm acionado e o sensor configurado no canal 1 (opção “livre”).

6.3.4 Procedimento analítico

O espectro de máxima absorvância e máxima excitação de calceína ($1,93 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), obtidos a partir do volume de 5,0 mL de solução calceína ($9,64 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em balões de 25,0 mL. Em seguida, completou-se o volume com hidróxido de potássio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a obtenção da curva analítica foram preparados a partir de diluições de Ca^{2+} ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em balões de 25,0 mL contendo 5,00 mL da solução de calceína. Foram adicionados os seguintes volumes de Ca^{2+} ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$): 100, 125, 250, 375, 500, 625, 750, 900, e 1000 μL . Em seguida, completou-se o volume com solução de hidróxido de potássio ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$).

Seis amostras comerciais de água mineral de diferentes marcas foram analisadas no protótipo e nos instrumentos comerciais. As amostras foram preparadas em balões volumétricos de 25,0 mL, adicionando-se 5,00 mL de solução de calceína ($96,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e em seguida $1,0 \times 10^{-3} \text{ L}$ da amostra. Depois completou-se o volume dos balões com a solução de hidróxido de potássio ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$).

Os padrões foram preparados apenas com íons Ca^{2+} , uma vez que a reação entre a calceína e os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} segue a mesma estequiometria.

6.3.5 Resultados e discussão

A determinação dos íons cálcio e magnésio em solução com o agente complexante calceína formam um quelato fluorescente. Para tais estudos, obteve-se primeiramente o espectro de absorbância da calceína usando-se um espectrofotômetro UV-Vis-2550, FIGURA 6.4. Este espectro foi obtido para uma concentração de calceína $19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em hidróxido de potássio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$.

A partir do espectro confirmou-se que há uma elevada absorção da radiação eletromagnética, que ocorre entre 460 e 510 nm, com o pico de máxima absorbância em 495 nm^{93,117,118}.

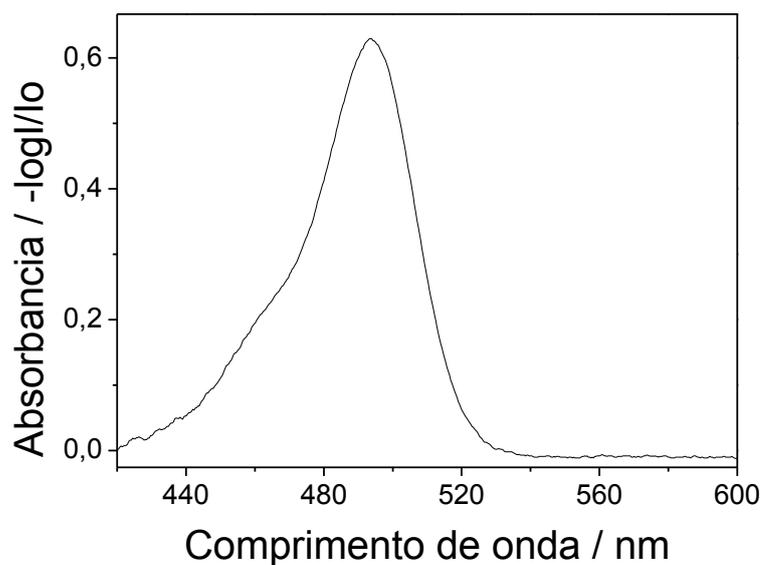


FIGURA 6.4 - Absorbância de uma solução de calceína ($1,93 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em hidróxido de potássio ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$).

Tomando-se como base o ponto de máxima absorvância da calceína foram configurados os parâmetros operacionais do fluorímetro, a fim de se obter os melhores resultados. No fluorímetro Hitach a fonte de excitação foi configurada para 495 nm, e os espectros registrados em concentrações de calceína de $1,2 \times 10^{-6}$ a $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$), FIGURA 6.5.

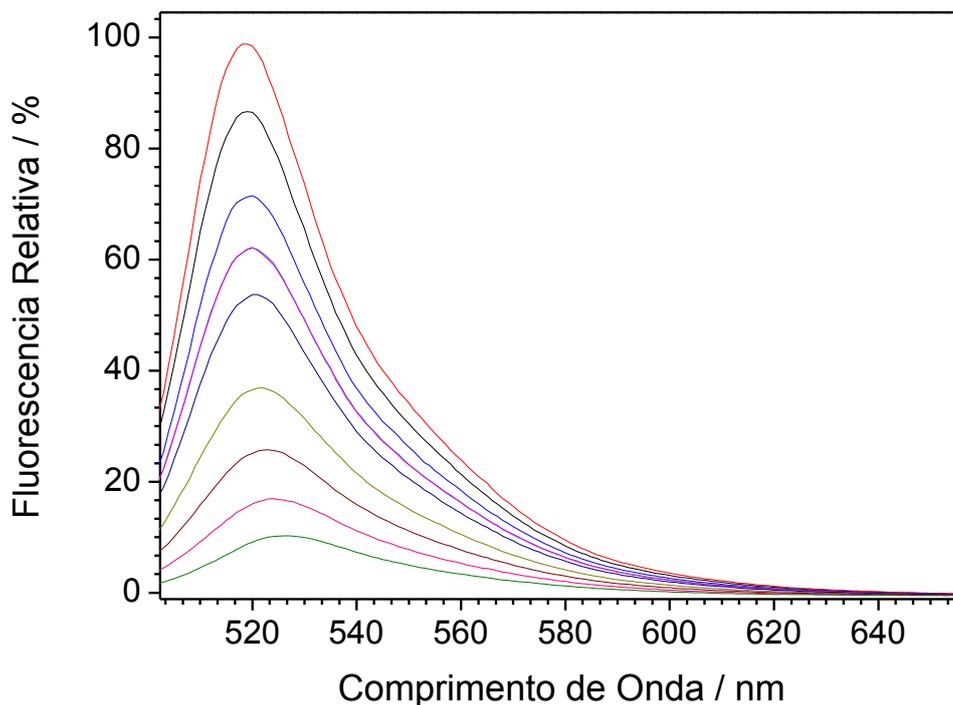


FIGURA 6.5 - Espectro de fluorescência do complexo calceína ($19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Concentrações de Ca^{2+} : $1,2 \times 10^{-6}$ a $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Comprimento de onda para excitação – 495 nm.

Os dados de desempenho analítico apresentados na TABELA 6.8 referem-se aos parâmetros analíticos calculados a partir da obtenção da curva analítica de Ca^{2+} em solução básica de KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$).

O P2FM foi configurado do modo fluorimétrico através do software de controle. A partir dos dados de excitação e emissão da calceína usou-se a seguinte configuração: LED 470 nm e o canal 1 do sensor.

Embora o pico de máxima intensidade da fonte selecionada é em 470 nm, a largura de banda de emissão a meia altura dessa fonte, LED 470 nm, incide sobre a faixa de excitação da calceína que está entres de 460 e 510 nm.

Na FIGURA 6.8 são apresentados os dados das curvas analíticas para Ca^{2+} em solução de calceína ($19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) obtidos nos seguintes instrumentos: P2FM, RF5103-PC e USB-2000.

A maior sensibilidade do método (coeficiente angular da curva analítica) foi obtida empregando-se o P2FM. No entanto, empregando-se este

equipamento, a linearidade da curva analítica foi menor, variando de $2,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5}$.

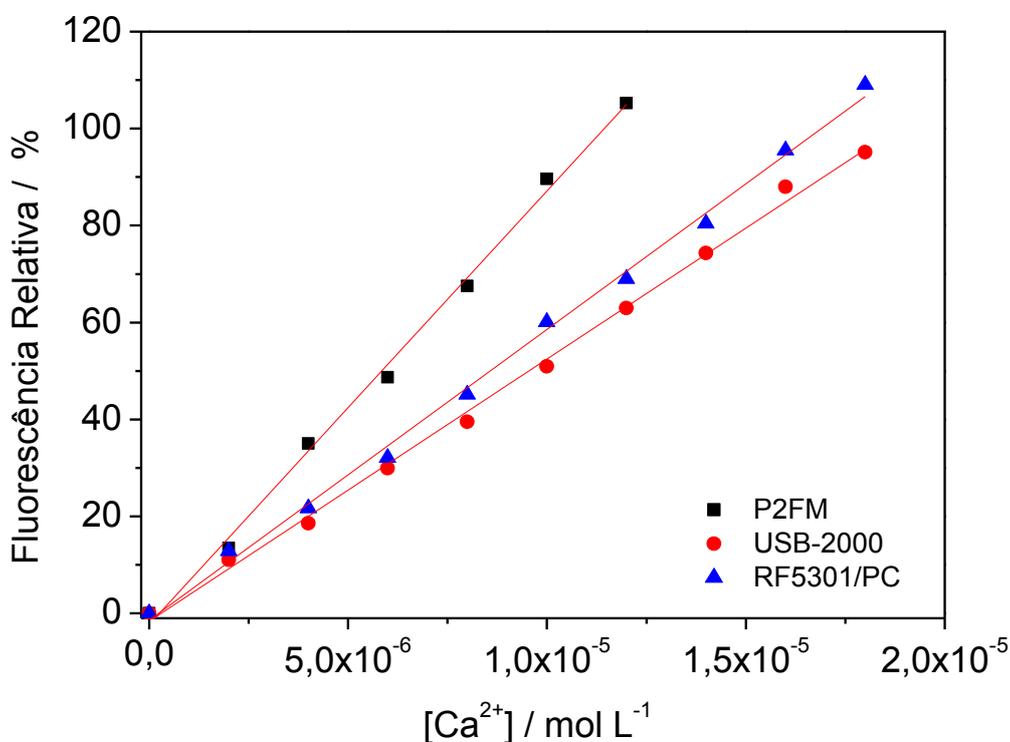


FIGURA 6.6 - Curvas analíticas para o Ca^{2+} em solução de calceína ($19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$), obtidas empregando-se os instrumentos P2FM, USB-2000 e RF5301/PC

A faixa linear de resposta obtida com o P2FM foi de $2,0 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto que para os demais instrumentos, estendeu-se até $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo os coeficientes de correlação obtidos similares. Como apresentados em seções anteriores, o P2FM, possui um nível de variação próprio do instrumento, sendo que esta variação reflete diretamente no LD e LQ.

Na TABELA 6.8 são apresentados os dados da aplicação do método fluorimétrico usando-se a calceína em meio básico como reagente fluorescente para determinação total dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} em água mineral. Os dados das quantidades foram obtidos em dois instrumentos comerciais e no protótipo.

TABELA 6.8 - Comparação dos valores de R, LD, LQ, S e faixa de resposta para concentrações de Ca^{2+} em solução KOH ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) contendo calceína ($19,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em instrumentos diferentes.

Instrumento	R	LD / mol L^{-1}	LQ / mol L^{-1}	S / mol L^{-1}	Faixa * / mol L^{-1}
P2FM	0,996	$6,0 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$8,94 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-6}$ / $1,2 \times 10^{-5}$
USB-2000	0,997	$6,4 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-6}$	$5,41 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-6}$ / $1,6 \times 10^{-5}$
RF5301/PC	0,996	$6,6 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$6,00 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-6}$ / $1,8 \times 10^{-5}$

R - Coeficiente de correlação (R); s - Desvio padrão do branco; LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * **Excitação**- 490/**Emissão** -514nm.

Na TABELA 6.9 encontram-se os valores da concentração total de Ca^{2+} e Mg^{2+} em amostras de água mineral. Nessa tabela podem ser comparados os valores de concentração obtidos utilizando cada um dos instrumentos e também aqueles descritos no rótulo.

TABELA 6.9 - Determinação da concentração total dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} em amostras de água mineral em diferentes instrumentos

Amostra	RF5301/PC / $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	USB-2000 / $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	P2FM / $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	ROTULO / $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
A1	9,68	9,68	9,29	6,4
A2	5,25	5,21	5,30	5,1
A3	16,16	17,12	15,11	16
A4	36,30	34,18	36,75	36
A5	20,21	19,76	19,13	18
A6	41,07	42,92	42,16	45

Das seis amostras analisadas, apenas uma apresentou valor consideravelmente distante do valor apresentado no rótulo, a amostra A1. Após aplicar o teste *t*-pareado para os resultados obtidos com o espectrofluorímetro RF5301/PC e o P2FM, o valor de *t* calculado foi de 0,36, sendo menor do que o valor crítico (2,01, $\alpha = 0,05$). Pode-se concluir então que não há diferença significativa entre os resultados obtidos, empregando-se os dois métodos analíticos, em um nível de confiança de 95%.

7 Conclusões

A melhor forma de constranger o mal inundando-o de bondade. Não é apenas querer o bem a quem te fez mal, mas fazer o bem a ponto de causar constrangimento.

No teste de estabilidade, o instrumento construído atingiu a estabilidade em menos de 5 min. Outra vantagem está na elevada vida útil do LED (10000 h) em comparação as lâmpadas (tungstênio, 3000 h) comumente usadas nesses instrumentos.

Nos testes de desempenho analítico no modo fotométrico, foram usados os seguintes corantes amaranço (AM), azul brilhante (AB) e tartrazina (TT), sendo obtidos os seguintes resultados: limites de detecção AM = $1,6 \times 10^{-7}$, AB = $5,4 \times 10^{-7}$ e TT = $1,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; limites de quantificação, AM = $4,8 \times 10^{-7}$, AB = $1,6 \times 10^{-6}$ e TT = $5,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹; coeficientes de correlação, AM = 0,997, AB = 0,975 e TT = 0,994.

O desempenho analítico no modo fluorimétrico com os corantes fluoresceína (FL) e Rodamina 6G (R6G) apresentou limite de detecção: FL = $8,3 \times 10^{-8}$ e R6G = $4,79 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Coeficiente de correlação: FL = 0,997 e R6G = 0,999.

O teste do protótipo em análises de interesse analítico como determinação da constante de estabilidade e estequiometria de um complexo cromogênico, determinação de sulfito em bebidas, e concentração total dos íons Ca²⁺ e Mg²⁺ em água mineral.

A constante de formação obtida, $5,04 \times 10^{18}$, ficou próximo ao apresentado na literatura, $6,2 \times 10^{18}$. Na determinação de sulfito em oito amostras de bebidas o teste t-pareado mostrou que método de referência e o método fotométrico usando P2FM foi de 0,66 menor do que o valor crítico (2,36, $\alpha = 0,05$). A concentração total dos íons Ca²⁺ e Mg²⁺ foi determinada pelo método fluorimétrico onde o P2FM apresentou melhor sensibilidade $8,94 \times 10^6$ que o RF5301/PC. O teste t-pareado mostrou que não há diferença significativa entre o t calculado = 0,36 e o t crítico (2,01, $\alpha = 0,05$).

Estas características como: desempenho analítico, portabilidade e programa dedicado, o instrumento pode ser uma alternativa viável para utilização em campo, em lugares remotos, e também como instrumento para pequenas demonstrações. Outra vantagem esta na interface USB e alimentação por meio da conexão do computador, dispensando qualquer outro tipo de fonte de alimentação.

O protótipo desenvolvido, P2FM, atendeu as expectativas de um instrumento híbrido fotômetro/fluorímetro para aplicações de interesse analítico, mantendo as características desejadas de desempenho, funcionalidade, portabilidade

(3,5 cm x 7,0 cm x 8,5 cm, 159,4 g), baixo custo, compacto, baixo consumo de energia, interface USB e programa de controle de fácil manipulação.

8 Referências bibliográficas

De que adianta a semente ser boa se a terra não é fértil. Portanto,
busque sempre lugares férteis para suas idéias e ideais!

1. J. INCZÉDY, T.L., A.M. URE, A. GELENCSE, A. HULANICKI *Compendium of Analytical Nomenclature* 3ed., 1997, IUPAC: Blackwell Science.
2. CANTO, M.E.D. & CANTO, E.R.D., *Métodos espectroscópicos de análises quantitativas*, 2005, UFSM: Santa Maria. 271.
3. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. & T.A., N., *Princípios de análise instrumental*, 2009, Bookman.
4. SKOOG, D.A., *Fundamentos de química analítica*. 8 ed., 2006, Pioneira Thomson Learning: São Paulo. 999.
5. VALEUR, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2001, Wiley-VCH.
6. LAKOWICZ, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2007, Springer.
7. MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D. & THOMAS, M.J.K., *Análise química quantitativa*, 2002, Livros Tecnicos e Científicos.
8. SWINEHART, D.F. "The Beer-Lambert Law". *Journal of Chemical Education*, **39** (7): 333, 1962.
9. SKOOG, D.A., *Princípios de análises instrumental*. 5 ed., 2006, Bookman: São Paulo. 838.
10. HARVEY, D., *Modern Analytical Chemistry*, 2000, McGraw-Hill.
11. BUI, D.A. & HAUSER, P.C. "Analytical devices based on light-emitting diodes – a review of the state-of-the-art". *Anal Chim Acta*, **853** (0): 46, 2015.
12. YOTTER, R.A. & WILSON, D.M. "A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems". *Ieee Sens J*, **3** (3): 288, 2003.
13. SCHAFFER, T.E. & MITKAS, P.A. "Smart photodetector array for page-oriented optical memory in 0.35- μ m CMOS". *Photonics Technology Letters, IEEE*, **10** (6): 866, 1998.
14. MEIJER, G.; MAKINWA, K. & PERTIJS, M., *Smart Sensor Systems: Emerging Technologies and Applications*, 2014, Wiley.
15. HUIJSING, J.; STEYAERT, M. & VAN ROERMUND, A., *Analog Circuit Design: Sensor and Actuator Interface Electronics, Integrated High-Voltage Electronics and Power Management, Low-Power and High-Resolution ADC's*, 2013, Springer US.
16. INCZÉDY, J.; LENGYEL, T. & URE, A.M., *Orange Book: Compendium of Analytical Nomenclature*, 1998, Blackwell Scientific Publications.
17. URBAN, P.L. "Universal electronics for miniature and automated chemical assays". *Analyst*, **140** (4): 963, 2015.
18. VASILEV, A.E. & KOLODEZNIKOV, I.V. "The Development and Use of Data Acquisition and Control Systems Based on Arm Microcontrollers". *Meas. Tech.*, **58** (3): 245, 2015.
19. SIMONI, R.D.; HILL, R.L.; VAUGHAN, M. & TABOR, H. "A classic instrument: The Beckman DU spectrophotometer and its inventor, Arnold O. Beckman". *J. Biol. Chem.*, **278** (49) 2003.
20. CECIL-INSTRUMENTS, *History*, 2010, Data de acesso: 09/07/2015.
<http://www.cecilinstruments.com/history.html>
21. INCORPORATED, T.I., *TI introduces first commercial silicon transistor*, 2015, Data de acesso: 09/07/2015.
<http://www.ti.com/corp/docs/company/history/timeline/semicon/1950/docs/54commercial.htm>
22. BERG, R.; KONIGER, M.; SCHJEIDE, B.M.; DIKMAK, G.; KOHLER, S. & HARRIS, G.C. "A simple low-cost microcontroller-based photometric instrument for monitoring chloroplast movement". *Photosynthesis Research*, **87** (3): 303, 2006.

23. VERAS, G.; SILVA, E.C.; LYRA, W.S.; SOARES, S.F.C.; GUERREIRO, T.B. & SANTOS, S.R.B. "A portable, inexpensive and microcontrolled spectrophotometer based on white LED as light source and CD media as diffraction grid". *Talanta*, **77**: 1155, 2009.
24. DUAN, Y.X.; SU, Y.X.; JIN, Z. & ABELN, S.P. "Design and development of a highly sensitive, field portable plasma source instrument for on-line liquid stream monitoring and real-time sample analysis". *Review of Scientific Instruments*, **71** (3): 1557, 2000.
25. MOREL, L.; SPECK, P. & DESEVAUX, P. "A low-cost LED system for fluorescent dye detection". *Instrumentation Science & Technology*, **28** (3): 253, 2000.
26. BEUTLER, M.; WILTSHIRE, K.H.; MEYER, B.; MOLDAEKE, C.; LURING, C.; MEYERHOFER, M.; HANSEN, U.-P. & DAU, H. "A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ". *Photosynthesis Research*, **72**: 39, 2002.
27. PONIKVAR, D. "Simple drive system for Mössbauer spectroscopy". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **187**: 555, 2002.
28. BACON, C.P.; MATTLEY, Y. & DEFRECE, R. "Miniature spectroscopic instrumentation: Applications to biology and chemistry". *Review of Scientific Instruments*, **75** (1) 2004.
29. CANTRELL, K.M. & INGLE, J.D. "The SLIM spectrometer". *Analytical Chemistry*, **75** (1): 27, 2003.
30. SOROURADDIN, M.-H.; ROSTAMI, A. & SAADATI, M. "A simple and portable multi-colour light emitting diode based photocolourimeter for the analysis of mixtures of five common food dyes". *Food Chemistry*, **127** (1): 308, 2011.
31. PALMA, A.J.; LOPEZ-GONZALEZ, J.; ASENSIO, L.J.; FERNANDEZ-RAMOS, M.D. & CAPITAN-VALLVEY, L.F. "Microcontroller-based portable instrument for stabilised optical oxygen sensor". *Sensors and Actuators B-Chemical*, **121** (2): 629, 2007.
32. DASGRUPTA, P.K.; EOM, I.; MORRIS, K.J. & JIANZHONG, L. "Light emitting diode-based detectors absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell". *Anal Chim Acta*, **500**: 337, 2003.
33. YEH, T.S. & TSENG, S.S. "A low cost LED based spectrometer". *Journal of the Chinese Chemical Society*, **53** (5): 1067, 2006.
34. PALMA, A.J.; ORTIGOSA, J.M.; LAPRESTA-FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ-RAMOS, M.D.; CARVAJAL, M.A. & CAPITÁN-VALLVEY, L.F. "Portable light-emitting diode-based photometer with one-shot optochemical sensors for measurement in the field". *Review of Scientific Instruments*, **79** (10): 103, 2008.
35. LIMA, K.M.G. "A portable photometer based on LED for the determination of aromatic hydrocarbons in water". *Microchem J*, **103**: 62, 2012.
36. FONSECA, A. & RAIMUNDO, I.M. "A simple method for water discrimination based on an light emitting diode (LED) photometer". *Anal Chim Acta*, **596** (1): 66, 2007.
37. TYMECKI, L.; REJNIS, M.; POKRZYWNICKA, M.; STRZELAK, K. & KONCKI, R. "Fluorimetric detector and sensor for flow analysis made of light emitting diodes". *Anal Chim Acta*, **721**: 92, 2012.
38. POKRZYWNICKA, M.; KONCKI, R. & TYMECKI, L. "A concept of dual optical detection using three light emitting diodes". *Talanta*, **82** (1): 422, 2010.
39. DINIZ, P.H.G.D.; DE MELO, K.D.T.; FAGUNDES, Y.N.M.; GOMES, A.D.; DO NASCIMENTO, E.C.L.; DOS SANTOS, S.R.B.; DE ALMEIDA, L.F. & DE ARAUJO, M.C.U. "Flow injection photometric determination of NaCl, KCl and

- glucose in injectable drugs exploiting Schlieren signals". *J Pharmaceut Biomed*, **62**: 172, 2012.
40. WIGTON, B.T.; CHOCHAN, B.S.; MCDONALD, C.; JOHNSON, M.; SCHUNK, D.; KREUTER, R. & SYKES, D. "A Portable, Low-Cost, LED Fluorimeter for Middle School, High School, and Undergraduate Chemistry Labs". *Journal of Chemical Education*, **88** (8): 1182, 2011.
 41. POKRZYWNICKA, M.; FIEDORUK, M. & KONCKI, R. "Compact optoelectronic flow-through device for fluorometric determination of calcium ions". *Talanta*, **93**: 106, 2012.
 42. HART, S.J. & JIJ, R.D. "Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy". *Analyst*, **127**: 1693, 2002.
 43. NEELAMEGAM, P.; MURUGANANTHAN, K.; RAGHUNATHAN, R. & JAMALUDEEN, A. "ATmega8535 MICROCONTROLLER BASED BLOOD SODIUM ANALYZER USING ISE DIRECT POTENTIOMETRY". *Instrumentation Science & Technology*, **38** (1): 63, 2010.
 44. DEVARAJU, J.T.; SURESHA, P.H.; RAMANI & RADHAKRISHNA, M.C. "Development of microcontroller based thermogravimetric analyzer". *Measurement*, **44** (10): 2096, 2011.
 45. SANTOS, V.B.D.; GUERREIRO, T.B.; SUAREZ, W.T.; FARIA, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "A Low-Cost Portable Microcontrolled Nephelometer for Potassium Determination". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **22**: 726, 2011.
 46. ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; GHAMBARIAN, M. & EBRAHIMPOUR, B. "Automated preconcentration and analysis of organic compounds by on-line hollow fiber liquid-phase microextraction–high performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, **1262**: 27, 2012.
 47. SANTOS, V.B.D.; GUERREIRO, T.B.; FARIA, R.C.; FATIBELLO-FILHO, O. & SUAREZ, W.T. "Construction and application of a portable microcontrolled turbidimeter for the in situ determination of sulfate". *Química Nova*, **35**: 802, 2012.
 48. LASKAR, S. & BORDOLOI, S. "Microcontroller-based instrumentation system for measurement of refractive index of liquid using bare, tapered and bent fibre as sensor". *IET Optoelectron.*, **7** (6): 117, 2013.
 49. DIAS, T.R.; ROHWEDDER, J.J.R.; BRASIL, M.A.S. & REIS, B.F. "Development of a high sensitivity photometric procedure for the determination of vanadium in mineral and fresh waters employing a downsized multicommutated flow analysis approach". *Analytical Methods*, **6** (24): 9667, 2014.
 50. CRUZ, A.F.D.; NORENA, N.; KAUSHIK, A. & BHANSALI, S. "A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis". *Biosensors and Bioelectronics*, **62**: 249, 2014.
 51. KOCZOR, B. & ROHONCZY, J. "PIC microcontroller based external fast analog to digital converter to acquire wide-lined solid NMR spectra by BRUKER DRX and Avance-I spectrometers". *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **66-67**: 21, 2015.
 52. DARMSTAEDTER, L. "Jeremias Benjamin richter". *Journal of Chemical Education*, **5** (7): 785, 1928.
 53. PADILLA, K. & FURIO-MAS, C. "The importance of history and philosophy of science in correcting distorted views of 'amount of substance' and 'mole' concepts in chemistry teaching". *Science and Education*, **17** (4): 403, 2008.
 54. BENSUAUDE-VINCENT, B. & STENGERS, I., *A History of Chemistry*, 1996, Harvard University Press.
 55. MAAR, J.H., *História da química: Dos primórdios a Lavoisier*, 2008, Conceito.

56. HARTOG, P.J. "The Berthollet-Proust Controversy and the Law of Definite Proportions [8]". *Nature*, **50** (1285): 149, 1894.
57. FATIBELLO-FILHO, O., ed. 4. *Equilíbrio de complexação e aplicações em química analítica*. Introdução aos conceitos e cálculos de química analítica Vol. 4. 2015, EdUFSCar: São Carlos.
58. VOSBURGH, W.C. & COOPER, G.R. "Complex Ions. I. The Identification of Complex Ions in Solution by Spectrophotometric Measurements". *Journal of the American Chemical Society*, **63** (2): 437, 1941.
59. HARRIS, D.C., *Análisis química quantitativa*, 2007, Reverté.
60. ASMUS, E. "Kritische Untersuchungen über die Grenzen der Anwendbarkeit der Methode der kontinuierlichen Variationen nach Job - I. Teil". *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, **183** (5): 321, 1961.
61. ROCHA, F.R.P.; MARTELLI, P.B. & REIS, B.F.D. "Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo". *Química Nova*, **23**: 119, 2000.
62. RAO, G.G. & VISWANATH, S.G. "Extraction-Spectrophotometric Determination of Traces of Antimony as Ferrous-Hexachloro-Antimonate(V) Complex". *Anal Chim Acta*, **94** (1): 169, 1977.
63. FATIBELLO-FILHO, O., *Introdução aos conceitos e cálculos de química analítica 4. Equilíbrio de complexação e aplicações em química analítica*. Primeira ed., 2015, EdUFSCAr: São Carlos. 139.
64. SABESP, Determinação de ferro total: Método da 1,10 fenantrolina. SABESP, Norma técnica NTS 010, 2001.
65. FATIBELLO-FILHO, O. & VIEIRA, I.D. "Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase". *Anal Chim Acta*, **354** (1-3): 51, 1997.
66. SARTORI, E.R.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Talanta*, **87** (0): 235, 2011.
67. RAWAL, R. & PUNDIR, C.S. "Development of electrochemical sulfite biosensor based on SOX/PBNPs/PPY modified Au electrode". *Biochemical Engineering Journal*, **71** (0): 30, 2013.
68. MISCHEK, D. & KRAPFENBAUER-CERMAK, C. "Exposure assessment of food preservatives (sulphites, benzoic and sorbic acid) in Austria". *Food Addit Contam A*, **29** (3): 371, 2012.
69. ERCAN, S.; OZTURK, N.; CELIK-OZENCI, C.; GUNGOR, N.E. & YARGICOGLU, P. "Sodium metabisulfite induces lipid peroxidation and apoptosis in rat gastric tissue". *Toxicol Ind Health*, **26** (7): 425, 2010.
70. MACHADO, R.M.D.T., M. C. F. "Sulphites in foods". *Brazilian journal of food technology*, **9** (4): 265, 2006.
71. GREEN, L.F. "Sulphur dioxide and food preservation—A review". *Food Chemistry*, **1** (2): 103, 1976.
72. TAKAHAMA, U. & HIROTA, S. "Effects of the Food Additive Sulfite on Nitrite-Dependent Nitric Oxide Production under Conditions Simulating the Mixture of Saliva and Gastric Juice". *J Agr Food Chem*, **60** (4): 1102, 2012.
73. LI, Y.J. & ZHAO, M.P. "Simple methods for rapid determination of sulfite in food products". *Food Control*, **17** (12): 975, 2006.

74. WINKLER, C.; FRICK, B.; SCHROECKSNADEL, K.; SCHENNACH, H. & FUCHS, D. "Food preservatives sodium sulfite and sorbic acid suppress mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells". *Food Chem Toxicol*, **44** (12): 2003, 2006.
75. SU, Y.C. & TAYLOR, S.L. "Sulfite Analysis of Food Ingredients - False-Positive Responses with Butter Flavorings in the Optimized Monier-Williams Method". *Food Addit Contam*, **12** (2): 153, 1995.
76. KIM, H.J.; KIM, Y.K. & SMITH, M. "Sulfite Analysis by Ion Exclusion Chromatography - Applications to the Food and Beverage Industries". *Food Technol-Chicago*, **42** (11): 113, 1988.
77. MAGEE, E.A.; EDMOND, L.M.; TASKER, S.M.; KONG, S.C.; CURNO, R. & CUMMINGS, J.H. "Associations between diet and disease activity in ulcerative colitis patients using a novel method of data analysis". *Nutr J*, **4** 2005.
78. BRASIL, Conselho nacional de saúde - CNS, Resolução CNS/MS N.º 04, 1988.
79. ABIA - Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. *in* Compêndio da legislação brasileira de alimentos. 2011.
80. VICENTINI, F.C., Desenvolvimento de biossensores a base de filmes poliméricos, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro. São Carlos, Química - UFSCar, 2013. 137 p.
81. CIESIELSKI, W. & ZAKRZEWSKI, R. "Iodimetric titration of sulfur compounds in alkaline medium". *Chem Anal-Warsaw*, **51** (5): 653, 2006.
82. AOAC, *Official Methods of Analysis of the AOAC International*, 2012, Association of Official Analytical Chemists: USA.
83. MORITA, T. & ASSUMPCÃO, R.M.V., *Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação*, 2007, Edgard Blücher.
84. WANG, J.G.; YU, J.M.; KONG, X.Z. & HOU, L.L. "Spectrophotometric determination of EDTA in aqueous solution through ferroin formation using sodium sulfite as the reducer". *Chemosphere*, **91** (3): 351, 2013.
85. ADHIKAMSETTY, R.K.; GOLLAPALLI, N.R. & JONNALAGADDA, S.B. "Complexation kinetics of Fe(2+) with 1,10-phenanthroline forming ferroin in acidic solutions". *Int J Chem Kinet*, **40** (8): 515, 2008.
86. LUZIA PIRES DOS SANTOS, B., DETERMINAÇÃO IN SITU DE ANALITOS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO EMPREGANDO TRATAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS DE SPOT TESTS. São Carlos, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - UFSCar, 2013. 78 p.
87. RIZVI, M.A.; TESHIMA, N. & PEERZADA, G.M. "1,10-Phenanthroline Modulated Redox Potentials Explored for Benign Iron Speciation Analysis". *Croat Chem Acta*, **86** (3): 345, 2013.
88. PIRES DOS SANTOS BENEDETTI, L.; BEZERRA DOS SANTOS, V.; SILVA, T.A.; BENEDETTI-FILHO, E.; MARTINS, V.L. & FATIBELLO-FILHO, O. "A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages". *Analytical Methods*, 2015.
89. BRASIL, Determinação da dureza em água (Método complexométrico). Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, NBR-5761, 1984.
90. SAÚDE, F.N.D., *Manual prático de análise de água*, 2004, FUNASA.
91. SENGUPTA, P. "Potential Health Impacts of Hard Water". *International Journal of Preventive Medicine*, **4** (8): 866, 2013.
92. BRASIL, Águas - Determinação da dureza total - Método titulométrico do EDTA - Na- Método de ensaio Associação brasileira de normas técnicas - ABNT, NBR-12621, 1992.

93. FONSECA, A.; RAIMUNDO, I.M.; ROHWEDDER, J.J.R.; LIMA, R.S. & ARAUJO, M.C.U. "A microfluidic device with integrated fluorimetric detection for flow injection analysis". *Anal Bioanal Chem*, **396** (2): 715, 2010.
94. SNELL, F.D., *Photometric and Fluorimetric Methods of Analysis*, 1978, New York.
95. AVAGOTECH, Data de acesso: 10/08/2015.
<http://www.avagotech.com/docs/AV02-1033EN>
96. TAOSINC, Data de acesso: 10/07/2015.
<http://www.taosinc.com>
97. LAMOGLIA, V., *Espectrometro academico*. Curitiba, Engenharia da computação - Centro Universitário Positivo, 2005. 112 p.
98. INCORPORATED, T.I., *LM35 Precision Centigrade Temperature Sensors*, INSTRUMENT, T., Editor. 1999.
99. USB.ORG, 2015, Data de acesso: 09/08/2015.
<http://www.usb.org>
100. RIBEIRO, F.A.D.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; DA SILVA, L.R. & SCHNEIDER, R.P. "Validation spreadsheet: A new tool for estimating the analytical figures of merit for the validation of univariate methods". *Quimica Nova*, **31** (1): 164, 2008.
101. BARROS NETO, B.D.; PIMENTEL, M.F. & ARAÚJO, M.C.U. "Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)". *Química Nova*, **25**: 856, 2002.
102. CARR, J.D.; HAGE, D.S. & YAMAMOTO, S.M., *QUIMICA ANALITICA E ANALISE QUANTITATIVA*, 2012, PEARSON BRASIL.
103. REDDY, M.C.S.; REDDY, M.L.P.; RAO, T.P.; IYER, C.S.P. & DAMODARAN, A.D. "Spectrophotometric determination of trace amounts of lead in high purity zinc materials with iodide and Rhodamine 6G". *Chem Anal-Warsaw*, **42** (5): 675, 1997.
104. JIE, N.Q.; ZHANG, Q.; YANG, J.H. & HUANG, X.R. "Determination of chromium in waste-water and cast iron samples by fluorescence quenching of rhodamine 6G". *Talanta*, **46** (1): 215, 1998.
105. MENG, Q.T.; ZHANG, Y.X.; HOU, D.Y.; XIN, G.; LI, T.C.; HE, C. & DUAN, C.Y. "Fluorimetric and colorimetric detection of nitric oxide in living cells by rhodamine derivatives assisted by Cu²⁺". *Tetrahedron*, **69** (2): 636, 2013.
106. PRATHISH, K.R.; JAMES, D.; JAISY, J. & RAO, T.P. "Dual optoelectronic visual detection and quantification of spectroscopically silent heavy metal toxins: A multi-measurand sensing strategy based on Rhodamine 6G as chromo or fluoro ionophore". *Anal Chim Acta*, **647** (1): 84, 2009.
107. KÖRBL, J.; VYDRA, F. & PŘIBIL, R. "The use of fluorescein complexone". *Talanta*, **1** (3): 281, 1958.
108. OCEANOPTICS, *LS-1 Series Tungsten Halogen Light Sources* Data de acesso: 10/08/2015.
<http://www.chem.ucla.edu/~craigim/pdfmanuals/manuals/ls1.pdf>
109. SHIMADZU, *UV-2450 UV-2550 Shimadzu UV-VIS Spectrophotometers*, Data de acesso: 10/08/2015.
<http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/spectroscopy/uv-24502550.pdf>
110. CHANDRA, R.S. & MM, M. "Thermodynamic studies on metal complexes of Fe(II), Co(II), Ni(II) and Cd(II) with 1,10-Phenanthroline in water, methanol and water-methanol binary solvent systems at 298.15 K and 308.15 K by Conductometric method ". *Indian Journal of Science*, **4** (11): 52, 2013.

111. LEE, T.S.; KOLTHOFF, I.M. & LEUSSING, D.L. "Reaction of Ferrous and Ferric Iron with 1,10-Phenanthroline .1. Dissociation Constants of Ferrous and Ferric Phenanthroline". *Journal of the American Chemical Society*, **70** (7): 2348, 1948.
112. LEE, T.S.; KOLTHOFF, I.M. & LEUSSING, D.L. "Reaction of Ferrous and Ferric Ions with 1,10-Phenanthroline .2. Kinetics of Formation and Dissociation of Ferrous Phenanthroline". *Journal of the American Chemical Society*, **70** (11): 3596, 1948.
113. ZUBKOV, I.R. & LYNCH, J.A. "Development of algorithms for automated spectrophotometric titrations". *Microchem J*, **90** (1): 13, 2008.
114. BRASIL, Ministério da agricultura pecuária e abastecimento - MAPA, Portaria 544, 1998.
115. BARRIL, C.; CLARK, A.C. & SCOLLARY, G.R. "Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine". *Anal Chim Acta*, **732**: 186, 2012.
116. BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L. & RIBEIRO, M.L. " Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão". *Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **129** (13) 2003.
117. DELANEY, P.; THOMAS, S.; ALLEN, J.; MCLAREN, W.; MURR, E. & HARRIS, M. *Fluorescence confocal endomicroscopy in biological imaging*. in *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. 2007.
118. GAO, Y.J.; LIU, Y.Y. & CHEN, J.P. "Determination of trace yttrium by fluorescence spectrophotometry with Y(III)-calcein-Tween 80 system". *Yejin Fenxi/Metallurgical Analysis*, **32** (6): 52, 2012.