

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

**Desenvolvimento de procedimento para determinação
fotométrica de etanol em bebidas destiladas sem uso de
reagentes explorando o efeito *Schlieren***

Diogo Santos Silva*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

*** Bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2015**

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

S586d Silva, Diogo Santos
Desenvolvimento de procedimento para determinação
fotométrica de etanol em bebidas destiladas sem uso
de reagentes explorando o efeito Schlieren / Diogo
Santos Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
52 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. Química analítica. 2. Injeção em fluxo. 3.
Fotometria. 4. Etanol. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Diogo Santos Silva, realizada em 23/07/2015:

Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis
USP

Prof. Dr. Emanuel Carrilho
IQSC/USP

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
Embrapa

Dedico esse trabalho à minha mãe Santana, meu apoio inabalável; ao meu pai Carlos, meu exemplo de como enxergar o mundo; ao meu irmão Marcelo, por minha determinação na busca do que almejo; e à Tatielli, companheira amada nessa vida.

A Deus, agradeço por permitir que houvesse vida em mim para assim poder gozar dos meus pais, irmão, amada e amigos.

A Santana Pereira da Silva Santos, agradeço não apenas por me trazer a vida, também por acreditar, persistir no apoio em todos os momentos e ser a minha pedra fundamental.

A Carlos dos Santos Silva, agradeço por mostrar que nunca se deixa de aprender com a vida, independente dos momentos.

A Marcelo dos Santos Silva, agradeço por me mostrar que nada nessa vida é fácil, e se quer algo, deve lutar, e se não conseguiu é porque não tentou o suficiente.

A Tatielli Gonçalves Gregório Barbosa, agradeço pela contribuição científica e técnica, tendo todo meu respeito profissional, admiração pessoal e carinho.

Ao professor Boaventura Freire dos Reis, agradeço não apenas pelo conhecimento que me foi transmitido, como também, pela oportunidade de tê-lo como amigo.

A técnica Sheila Roberta Wenzel Perdigão, agradeço pela contribuição científica e como pessoa, tem todo o meu respeito e carinho.

Ao colega de trabalho e amigo Marcos Augusto Stolf Brasil, agradeço pela contribuição técnica com seus conhecimentos eletrônicos e científicos.

Ao colega de trabalho e amigo Milton Katsumi Sasaki, agradeço pela contribuição técnica e científica com as medidas espectrais realizadas nesse trabalho.

A todos os colegas de trabalho, que nessa função me apoiaram e instigaram o meu aprendizado, e no papel de amigos permitiram minha participação em suas vidas e assim pude crescer ainda mais como pessoa.

A Secretaria de Pós-Graduação em Química UFSCAR, agradeço pelo trabalho diligente e competente.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABRADE: Associação Brasileira de Bebidas

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

CAS: *Chemical Abstracts Service*

CFA: *Continuous Flow Analysis*

CG: Cromatografia a Gás

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ddp: diferença de potencial

FIA: *Flow Injection Analysis* – Análise por Injeção em Fluxo

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* – União Internacional de Química Pura e Aplicada

°INPM: porcentagem de álcool em solução em peso

LED: *Light Emitting Diode*

MCFA: *Multi-Commutation Flow Analysis*

m/m: concentração percentual mássica

PnP: *Plug and Play*

Proálcool: Programa Nacional do Álcool

PWM: *Pulse-Width Modulation*

SICOBEB: Sistema de Controle da Produção de Bebidas da Receita Federal

SFA: *Segmented Flow Analysis*

USB: *Universal Serial Bus*

UARTs: *Universal Asynchronous Receiver-Transmitters*

V/V: concentração volumétrica

Lista de Tabelas

TABELA 1.1 - Tipos de fontes contínuas utilizadas em espectroscopia óptica.	10
TABELA 3.1 - Sequência de acionamento dos dispositivos.....	21
TABELA 4.1 - Resultados analíticos para comportamento convergente: sentido do fluido transportador.	32
TABELA 4.2 - Resultados analíticos do estudo do fluido transportador.	35
TABELA 4.3 - Resultados analíticos para diferentes fontes de radiação.	38
TABELA 4.4 - Resultados analíticos do estudo de celas de fluxo.	39
TABELA 4.5 - Resultados analíticos de estudo do comprimento do percurso.	41
TABELA 4.6 - Resultados analíticos do estudo do volume da amostra.	43
TABELA 4.7 - Resultados da determinação de etanol em amostras de bebidas sem interferentes especificados no rótulo.	45

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - Esquema de um LED.	7
FIGURA 1.2 - Tipos de monocromadores: (a) monocromador de rede baseado no desenho de Czerny-Turner; (b) monocromador de prisma baseado no desenho de Bunsen. Em ambos os casos, $\lambda_1 > \lambda_2$	9
FIGURA 1.3 - Esquema de uma bomba solenoide.	12
FIGURA 1.4 - Representação da formação de gradiente em sistema FIA: (a) dispersão com formação do gradiente de concentração, em fluxo laminar; (b) linhas de fluxo laminar; (c) difusão radial; (d) difusão axial.	14
FIGURA 1.5 - Refração do feixe incidente em diferentes condições de fluxo.	15
FIGURA 3.1 - Diagrama do fotômetro.	18
FIGURA 3.2 - Diagrama do módulo de análise.	19
FIGURA 3.3 - Placa <i>Arduino Due</i> utilizada no projeto, com componentes conectados.	21
FIGURA 3.4 - Picnômetro Brand com termômetro.	24
FIGURA 4.1 - Registros dos sinais gerados em função do efeito <i>Schlieren</i> . .	27
FIGURA 4.2 - Esquema dos fenômenos de refração e reflexão.	29
FIGURA 4.3 - Registros dos sinais gerados processando um conjunto de soluções de etanol.	29
FIGURA 4.4 - Registros dos sinais gerados processando unidirecionalmente um conjunto de soluções de etanol: (I) deslocamento da zona de amostra em sentido contrário ao da propagação do feixe de radiação incidente.	30
FIGURA 4.5 - Registros dos sinais gerados processando unidirecionalmente um conjunto de soluções de etanol. Deslocamento da zona de amostra a favor do sentido de propagação do feixe de radiação incidente.	31

FIGURA 4.6 - Curvas analíticas para comportamento de lente divergente em fluxos de deslocamento no mesmo sentido e no sentido oposto ao feixe de radiação incidente.	32
FIGURA 4.7 - Curvas analíticas para comportamento de lente convergente com fluxos de deslocamento no mesmo sentido e no sentido contrário ao feixe de radiação incidente; obtidas com valores máximos absolutos.	33
FIGURA 4.8 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol em diferentes fluidos transportadores.	35
FIGURA 4.9 - Resposta espectral para LEDs usados nos experimentos.	36
FIGURA 4.10 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol com diferentes fontes de radiação.	37
FIGURA 4.11 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol com diferentes comprimentos da cela de fluxo.	39
FIGURA 4.12 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol com diferentes comprimentos de percurso.	41
FIGURA 4.13 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol com diferentes comprimentos da alça de amostragem.	43
FIGURA 4.14 - Curva analítica com soluções padrões nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60% (v/v).	45

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE ETANOL EM BEBIDAS DESTILADAS SEM USO DE REAGENTES EXPLORANDO O EFEITO SCHLIEREN. O conhecimento e aplicações do efeito *Schlieren* no processo de análise por injeção em fluxo (FIA) demonstrou que empregar a variação do índice de refração, formado pelos gradientes de concentração durante a dispersão da amostra no fluido transportador para a determinação de etanol em bebidas destiladas é um método viável. Nesse sentido, foi desenvolvido um módulo de análise que realiza medidas fotométricas empregando cela de fluxo de longo caminho óptico. O método proposto proporcionou a determinação de etanol, sem o uso de reagentes. O controle dos dispositivos, incluindo válvulas e minibombas solenoide, foi realizado empregando um microcontrolador (*Arduino Due*) acoplado a um computador por intermédio de uma interface serial. O programa de controle e aquisição de dados foi escrito empregando as linguagens Visual Basic 6.0, C e C++. O módulo de análise desenvolvido para este trabalho permitiu uma frequência analítica de 110 determinações por hora, consumo de 400,2 μL de amostra e geração de 2,9 mL de efluente por determinação.

Abstract

DEVELOPMENT OF PROCEDURE FOR PHOTOMETRIC DETERMINATION OF ETHANOL IN DISTILLED DRINKS WITHOUT USING REAGENTS EXPLORING SCHLIEREN EFFECT. The knowledge and applications of *Schlieren* effect on the flow injection analysis process (FIA) showed that using the variation of refraction index, formed by concentration gradients during sample dispersion in carrier fluid is a practicable method for ethanol determination in distilled drinks. Based on this effect, we developed an analysis module that performs photometric measurements using flow cells of long optical path length. The method here proposed allowed the determination of ethanol without using reagents. Control of the devices, including solenoid valves and solenoid mini-pumps, was carried out by a microcontroller (*Arduino Due*) coupled to a microcomputer through serial interface. The control and data acquisition software was written using Visual Basic 6.0, C and C ++ languages. The flow analysis module developed for this study achieved an analytical frequency of 110 samples per hour, sample consumption of 400.2 μL and generation of 2.9 mL of effluent per determination.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	História da cana-de-açúcar no Brasil.....	1
1.2	Regulamentação e comércio de destilados.....	2
1.3	Álcool Etílico	3
1.4	Formas de determinação do teor alcoólico em bebidas	4
1.5	Análise em fluxo	5
1.6	Componentes de um sistema em fluxo	6
1.7	LED e fotometria	7
1.8	Fotometria e análise em fluxo	9
1.9	Multicomutação em análise em fluxo.....	11
1.10	Bomba solenoide como propulsor de fluido.....	12
1.11	Efeito <i>Schlieren</i>	13
1.12	Química verde	16
2	Objetivo	17
3	Parte Experimental.....	18
3.1	Equipamentos e acessórios	18
3.1.1	Sistema de detecção.....	18
3.1.2	Módulo de análise.....	19
3.1.3	Programa de controle.....	21
3.1.4	Método de referência	23
3.1.5	Detecção fotométrica baseada no efeito <i>Schlieren</i>	24
3.2	Preparo de Soluções	25
4	Resultados e Discussão.....	26
4.1	Sinais <i>Schlieren</i>	26
4.2	Estudo para a escolha do transportador	34
4.3	Estudos de fonte de radiação	36
4.4	Estudos do comprimento da cela de fluxo	38
4.5	Estudo do comprimento de percurso	40
4.6	Estudo para volume de amostra.....	42
4.7	Análise em amostras	44
5	Conclusões	47
	Referências	48

1 Introdução

1.1 História da cana-de-açúcar no Brasil

O Brasil teve seu primeiro contato com a cana-de-açúcar - planta do gênero *Sacharum*, da família *Poaceae*, originária da Ásia e da Oceania - no século XVI [1], período em que teve início a implantação do sistema de capitânicas hereditárias. O plantio de cana e os processos de preparo de açúcar e da rapadura^a foram importados de outras colônias portuguesas, como Ilha da Madeira. O açúcar teve importante participação na economia da colônia como renda para meeiros, arrendatários e como moeda de troca de contrabandistas de escravos [2].

A introdução da cana de açúcar no Brasil está, historicamente, vinculada a Martim Afonso de Souza [3], um dos 12 donatários de capitânicas hereditárias. As capitânicas foram grandes extensões de terras ofertadas pela Coroa Portuguesa através das chamadas cartas de doação do rei D. João III. E o cultivo de cana-de-açúcar e a implantação de engenhos de açúcar eram parte das atividades a serem exercidas pelos donatários das capitânicas hereditárias [4]. O vínculo histórico com Martim Afonso de Souza é reforçado devido ao prestígio de ser fundador da Capitania de São Vicente (1532), a qual foi posteriormente designada como a primeira vila brasileira de mesmo nome; além de ter tido sucesso na implantação de engenhos e ser considerado pioneiro em entradas, ou seja, explorações do interior da recém-colônia com o intuito de descobrir novos recursos.

Há referências de que o primeiro engenho de açúcar foi construído em 1516, na Feitoria de Itamaracá, criada pelo Rei D. Manuel no litoral pernambucano e confiada a Pero Capico, administrador colonial. Contudo, hoje é constatado que a primeira plantação de cana-de-açúcar no Brasil foi feita em 1504, pelo fidalgo judeu-português Fernão de Noronha, que recebeu a ilha que hoje leva seu nome para a exploração do pau-brasil. A prova documental dessa tese está nos registros de pagamento de tributo alfandegário sobre uma carga de açúcar, registrada como vinda de Pernambuco datado de 1526, encontrados em Lisboa [5].

Apesar de haver uma disputa pelo pioneirismo no plantio e extrativismo da cana-de-açúcar e especulações sobre a origem da bebida alcoólica derivada da

^a O caldo da cana era cozido até adquirir um estado viscoso, então derramado em formas que ao resfriar tomava a forma de um bloco.

mesma, não há uma preocupação sobre quem implantou a destilação do caldo da cana-de-açúcar fermentado. O processo de destilação de material vegetal era conhecido pelo homem muito antes do descobrimento do Brasil [1,6], portanto não seria estranho especular que alguém com conhecimento técnico, mesmo rudimentar, tenha testado o processo no caldo de cana-de-açúcar fermentado.

A cachaça não foi um produto importado para o Brasil. Em documentos históricos do período colonial brasileiro, há relatos do consumo e do comércio de bebida fermentada da cana-de-açúcar. O que a torna notória é, por se tratar de uma bebida entrelaçada à história da formação de um país, não haver comprovação documental ou registros da data e local de origem de seu desenvolvimento [1].

1.2 Regulamentação e comércio de destilados

Segundo a Associação Brasileira de Bebidas (ABRADE), há no mercado brasileiro pelo menos vinte categorias de bebidas alcoólicas, as quais podem ser classificadas em duas categorias genéricas: destiladas (cachaça, uísque, vodca, rum, gim, conhaque, tequila) e fermentadas (cerveja, vinho, saquê, sidra, champanhe, espumante). Dentre estas, a cachaça é a única bebida de origem brasileira, sendo responsável pelo faturamento de 5,95 bilhões de reais em 2013, segundo o Sistema de Controle da Produção de Bebidas da Receita Federal - SICOBE [7].

A legislação brasileira sobre bebidas é recente, e em vista disso está em processo de aperfeiçoamento para atender exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do mercado. Um exemplo desse processo é a regulamentação sobre os direitos de reconhecimento desse destilado. Um acordo bilateral entre Brasil e Estados Unidos [8] reconheceu a cachaça produzida do mosto fermentado de cana-de-açúcar^b como produto exclusivamente produzido no Brasil, afastando a possibilidade de generalização da bebida, como um destilado genérico, como a vodca e o rum, evitando assim sua produção fora do Brasil, o que reduziria o mercado consumidor e exportações.

Segundo a última regulamentação existente, Art. 53 do Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009, “*cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana-de-açúcar produzida no Brasil, com graduação alcoólica de*

^b Mistura de volumes de cana-de-açúcar fermentado.

trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a temperatura de vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ter adição de açúcar até seis gramas por litro". Caso haja adição de uma quantidade de açúcar superior a 6 g/L e inferior a 30 g/L é denominada de "cachaça adoçada".

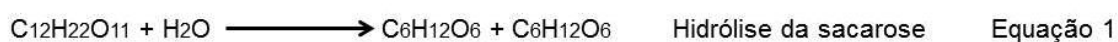
Esse mesmo decreto, Art. 51, trata propriamente da aguardente de cana-de-açúcar. "A aguardente é a bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento em volume, a temperatura de vinte graus Celsius, obtida com o rebaixamento do teor alcoólico do destilado alcoólico simples ou pela destilação do mosto fermentado". Caso haja adição de uma quantidade de açúcar superior a 6 g/L e inferior a 30 g/L é denominada de "aguardente adoçada". A regulamentação das bebidas, em especial as destiladas, além de fornecer parâmetros para o controle e fiscalização, foi uma salvaguarda do direito de propriedade ao nome do produto e aos interesses econômicos.

Disposições gerais para controle de bebidas estão na Lei nº 8.918, de 14 de Julho de 1994, a qual aborda a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas no território brasileiro. Essa lei é atualmente regulamentada pelo Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009.

1.3 Álcool Etílico

O álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é o componente alcoólico da cachaça, sendo que quimicamente é o nome comum para o derivado hidroxílico do hidrocarboneto etano. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*), o reconhece como etanol e seu número de registro no *Chemical Abstracts Service* (CAS) é 64-17-5 [9]. O etanol é um líquido aquoso, incolor, miscível em água, inflamável e produz vapor irritante. Apresenta as seguintes propriedades físico-químicas: ponto de fusão a $-114,14^\circ\text{C}$, ponto de ebulição a $78,29^\circ\text{C}$ e densidade de 0,789g/mL a 20°C .

Técnicas de produção do álcool etílico historicamente são oriundas de materiais agrícolas contendo amido, como milho, arroz, trigo e batata, os quais são convertidos por enzimas em açúcar. Este é, subsequentemente, convertido por leveduras em álcool e dióxido de carbono, compostos representados nas Equações 1 e 2 a seguir.



Devido à demanda pela produção do etanol combustível (bioetanol de cana), houve necessidade de ampliar a escala de produção e modificar o processo. Para obtenção do bioetanol, o caldo da cana-de-açúcar passa pelo processo de fermentação e destilação [10], para obter o etanol hidratado. Em seguida tem-se o processo de desidratação para alcançar o etanol anidro. Conforme a legislação brasileira, o etanol anidro pode ser utilizado para o abastecimento de veículos ou como aditivo [11].

1.4 Formas de determinação do teor alcoólico em bebidas

Bebidas são consumidas em larga escala e em vista disso é necessário dispor de métodos analíticos que indiquem a quantidade e a qualidade do produto, incluindo teor alcoólico rotulado. Atualmente, há diversos métodos analíticos para determinação de etanol em bebidas, podendo ser citadas: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [12], cromatografia a gás (CG) [13], espectrofotometria de infravermelho [14], potenciometria [15], eletroforese capilar [16], e espectrofotometria UV-Vis [16]. Entretanto, a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (*Association of Official Analytical Chemists - AOAC*) [17], considera como método oficial para determinação do teor de álcool etílico em bebidas como vinho, cerveja e destilados, os métodos clássicos de picnometria e densimetria.

Quando se consideram abordagens para a determinação de etanol que não sigam os métodos oficiais para bebidas alcoólicas, encontram-se outros métodos clássicos baseados em refratometria [18] e espectrofotometria [19]. Vale ressaltar que o método espectrofotométrico encontrado em literatura [20] utiliza a reação com dicromato de potássio para oxidar o etanol na presença de ácido sulfúrico, produzindo mudança de coloração na solução e permitindo o monitoramento por fotometria. O emprego do método de dicromato requer cuidados. O cromo (VI), constituinte do composto $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, em contato direto, causa irritação

na epiderme e na mucosa; a ingestão agrava o quadro com vômito, náusea e perda de consciência [21].

1.5 Análise em fluxo

A proposta de análise em fluxo surgiu primeiramente para análises clínicas com Skeggs [22] na década de 50, com o processo chamado *Continuous Flow Analysis* (CFA), sendo posteriormente denominada de *Segmented Flow Analysis* (SFA). Neste processo, as soluções dos reagentes eram bombeadas continuamente e a alíquota da solução da amostra era inserida durante um intervalo de tempo previamente estabelecido, através de controle eletromecânico; bolhas de ar eram inseridas sequencialmente, segmentando a zona da amostra. A inserção das bolhas de ar tinha como função isolar os reagentes do fluido transportador até o início da detecção e assim favorecer a mistura das soluções, além de minimizar a dispersão, sendo usados como reatores bobinas de vidro com diâmetro interno superior a 1 mm. Antes da detecção fotométrica, as bolhas de ar eram desviadas, evitando que entrasse na cela de fluxo o que causaria distorção do sinal gerado.

Em 1975, Ruzicka e Hansen propuseram um novo processo de análise em fluxo: a solução do reagente era bombeada continuamente e a alíquota da amostra, selecionada com seringa hipodérmica, era inserida no fluxo de reagente através de um dispositivo munido com um septo de borracha. O reator era constituído por tubo de polietileno de diâmetro estreito para minimizar a dispersão da amostra [23]. A mistura da amostra com a solução do reagente ocorria por dispersão no seio do fluido transportador, portanto era necessário encontrar o equilíbrio entre a dispersão necessária para a mistura e o desenvolvimento da reação, pois caso houvesse excesso ou pouca dispersão, haveria decréscimo do sinal analítico gerado pelo detector. O controle da dispersão foi encontrado variando o comprimento do reator. Quando um segundo reagente era necessário, este era adicionado por confluência usando um tubo de bombeamento adicional. O nome *Flow Injection Analysis* (FIA) derivou do uso de seringa hipodérmica para inserção da alíquota da amostra em um fluxo contínuo da solução de reagente [23].

A evolução do processo FIA permitiu que diversas etapas de procedimentos de análises como separação líquido-líquido [23], pré-concentração

[24] e diluição em linha [25] fossem incorporadas, além de poder explorar de forma mais eficiente parâmetros físico-químicos [26, 27] e cinéticos das reações [28, 29].

O sistema de análise em fluxo, em princípio, é um sistema hidrodinâmico combinado com um sistema de detecção, de forma que a amostra e os reagentes podem ser inseridos no sistema e conduzidos ao detector. A repetibilidade das alíquotas, ambiente reacional fechado, execução de etapas temporizadas, diminuição da intervenção do analista e diminuição da quantidade de reagente, acarretando em aumento na frequência analítica e diminuição na quantidade de resíduos, são características que fizeram do processo de análise em fluxo uma interessante ferramenta analítica.

1.6 Componentes de um sistema em fluxo

A injeção da amostra nos primeiros sistemas FIA empregava seringas hipodérmicas sem agulhas e um dispositivo de acrílico com septo de borracha [30]. A necessidade de lavar a seringa na troca da amostra, e a repetibilidade dependente da pressão de introdução de amostra, eram dificuldades que foram superadas com o emprego dos seguintes dispositivos: válvulas rotativas [30], injetor comutador [31], válvula solenoide de três vias [32], bomba solenoide [33] e bomba de seringa [34].

A implementação de um procedimento FIA requer um dispositivo para propulsão de fluidos. Nesse quesito, a bomba peristáltica foi e tem sido amplamente empregada. Entretanto, alternativas de propulsão de fluidos como bomba de seringas [35] e bomba solenoide [33] também foram testadas, apresentando como vantagem a redução do custo.

O processo de análise por injeção em fluxo tem sido empregado em várias técnicas de detecção, tendo seu maior universo de aplicação em análises com espectrofotometria na região UV-Vis [36]. A disponibilidade de diodos emissores de luz (LED - *Ligth Emitting Diode*), com alta intensidade de emissão na região visível do espectro eletromagnético com banda de emissão estreita ($\Delta\lambda \approx 25$ nm), fototransistores, fotodiodos, amplificadores operacionais de baixo custo e alto desempenho permitiram a construção de fotômetros com custo reduzido e com estrutura apropriada às aplicações com sistemas FIA, contribuindo para sua popularização.

1.7 LED e fotometria

O diodo emissor de luz (LED) visto na Figura 1.1 é um dispositivo eletrônico constituído de junção polarizada do tipo p (positivo) e do tipo n (negativo), denominada junção p-n, com uma região ativa entre elas, onde ocorre a liberação de fótons. Na Figura 1.1 abaixo são mostrados o LED como é fisicamente, incluindo a estrutura de montagem e o princípio de funcionamento.

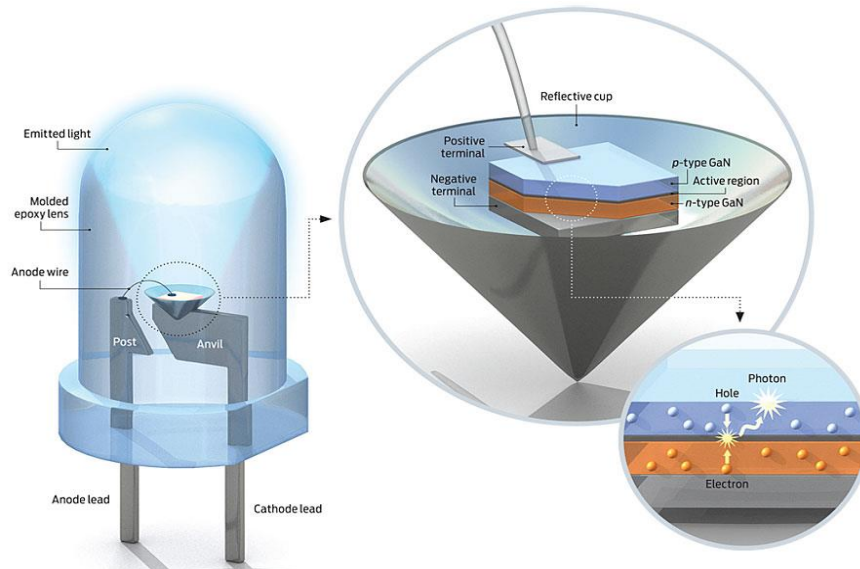


FIGURA 1.1 - Esquema de um LED. Figura adaptada [37].

Para obter a junção p-n, materiais semicondutores formados com o silício (Si) são dopados com elementos químicos que influenciam em suas propriedades elétricas. A adição de elementos com valência maior que a do material semicondutor, por exemplo, arsênio (As) que tem valência de cinco elétrons acrescentará um elétron livre à rede cristalina, conferindo caráter negativo. Fenômeno equivalente ocorre quando se utilizam elementos de valência inferior ao semicondutor, como o boro (B) com valência de três elétrons criando na rede cristalina do silício uma situação de falta de elétron (vacância ou buraco), conferindo caráter positivo. Ao aplicar uma diferença de potencial (ddp) entre ânodo e o cátodo, há uma recombinação de elétrons e buracos na junção, tendendo a se difundir por todo o material. A energia remanescente da recombinação é liberada na forma de radiação eletromagnética (fótons), que caracteriza a eletroluminescência da junção p-n. Assim, mudando a composição da junção P-N, tem sido possível produzir LEDs com máxima intensidade de emissão em diferentes comprimentos de onda [36].

A faixa de radiação emitida pelos LEDs depende do elemento dopante. Cada LED tem uma diferença de potencial limiar, para iniciar a emissão de radiação, em geral entre 1,8 e 2,5 V. A intensidade de emissão é função da intensidade da corrente que circula através do circuito de alimentação e da constituição física do LED.

O comprimento de onda da radiação que um LED pode emitir abrange as regiões ultravioleta a infravermelha do espectro eletromagnético. Entretanto, a disponibilidade no mercado é maior para a região visível (400 a 780 nm). O LED não é uma fonte monocromática, porém com o conhecimento químico sobre o composto e sua absorção, é possível escolher um LED com faixa de emissão de maior intensidade, dentro da faixa ótima de absorção do composto. Em geral, a banda de emissão do LED é mais estreita que a banda de absorção do composto, e isso possibilita que o LED seja empregado como fonte de radiação em detecção fotométrica, sem uso de filtros ópticos ou monocromadores.

O primeiro trabalho relacionado à fotometria de absorção molecular na região do espectro visível empregando fotômetro com LED foi proposto em 1973 por Flaschka et al [38]. Neste trabalho, foi proposto o acoplamento do LED diretamente à cela fotométrica, e colocado na extremidade oposta um fototransistor. O LED acoplado diretamente à célula fotométrica permitiu contornar problemas de focagem e alinhamento do feixe de radiação, diminuindo perdas de radiação incidente por espalhamento.

Protótipos de fotômetro baseado em LED como fonte de radiação, empregam fototransistor ou fotodiodo como transdutores de sinais, sendo ambos dispositivos semicondutores de silício dopado [38]. No caso do fototransistor, a intensidade da corrente elétrica drenada entre o coletor e o emissor pode ser controlada pela intensidade do feixe de radiação incidente sobre a janela de observação do fototransistor. Essa propriedade é empregada na detecção fotométrica. No caso de fotodiodo, as duas junções semicondutoras possuem a propriedade de variar a sua condutividade elétrica em função da intensidade da luz incidente na janela de observação. Para aproveitar essa propriedade em fotometria, é necessário o emprego de uma malha de transdução de sinal, formada pelo fotodiodo, um amplificador operacional e dois ou três resistores [39].

1.8 Fotometria e análise em fluxo

Os métodos espectrofotométricos são baseados na interação da radiação eletromagnética com a matéria, obedecendo à lei de Bouguer-Lambert-Beer [40], segundo a qual a absorção de radiação em um dado comprimento de onda obedece a Equação 3, sendo: A a absorbância, I_0 a intensidade do feixe de radiação incidente, I a intensidade do feixe de radiação após transpassar a amostra, ϵ a absortividade molar característica da espécie absorvente, b a distância percorrida pelo feixe de radiação através da amostra e c a concentração da espécie química absorvente [41].

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad \text{Equação 3}$$

O espectrofotômetro é um instrumento óptico capaz de relacionar a quantidade (intensidade) de radiação eletromagnética absorvida com a concentração da espécie absorvente na amostra. Quando dizemos a palavra espectrofotômetro, estamos nos referindo a um equipamento que possui em sua estrutura recursos para selecionar comprimento de onda dentro de uma faixa, usando um monocromador, como mostrado na Figura 1.2.

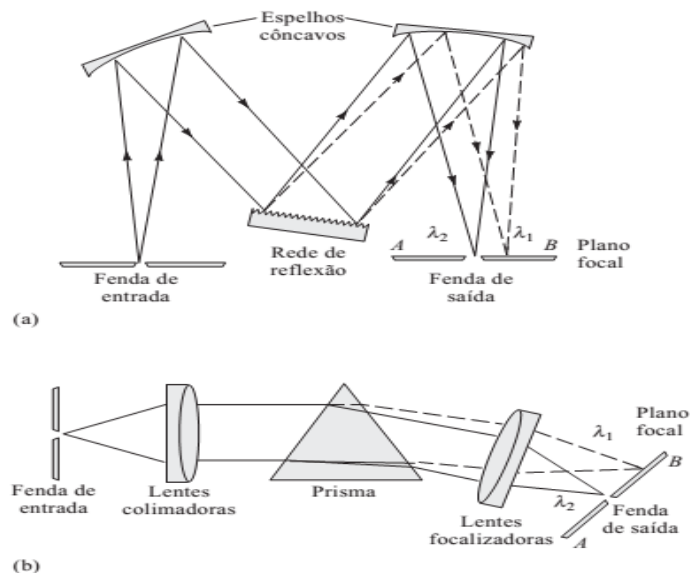


FIGURA 1.2 - Tipos de monocromadores: (a) monocromador de rede baseado no desenho de Czerny-Turner; (b) monocromador de prisma baseado no desenho de Bunsen. Em ambos os casos, $\lambda_1 > \lambda_2$. Figura adaptada. [41]

Na espectrofotometria [41], a conversão da intensidade da energia radiante em sinais elétricos é feita por fotodetectores (fotomultiplicadora, fotodiodo,

fototransistor), seguido por um estágio de amplificação. A razão entre os sinais gerados, branco de amostra com soluções da amostra, permite calcular a absorvância segundo a lei de Bouguer-Lambert-Beer apresentada na Equação 3.

As fontes de radiação utilizadas na espectrofotometria são divididas em duas categorias: fontes contínuas e fontes de linhas. Ambas cobrem a faixa do ultravioleta/visível (UV/Vis) e parte do infravermelho [41]. As fontes mais empregadas na espectrofotometria são as fontes contínuas. Na Tabela 1.1 são apresentadas algumas fontes contínuas para a espectroscopia óptica.

TABELA 1.1 - Tipos de fontes contínuas utilizadas em espectroscopia óptica. Tabela adaptada. [41]

Fonte	λ (nm)	Tipo de Espectroscopia
Lâmpada de xenônio	250 – 600	Fluorescência molecular
Lâmpada de H ₂ e D ₂	160 – 380	Absorção molecular no UV
Lâmpada de tungstênio/halogênio	240 – 2.500	Absorção molecular no UV/Vis/IV-próximo
Lâmpada de tungstênio	350 – 2.500	Absorção molecular no Visível/IV-próximo
Fonte de Nernst	400 – 20.000	Absorção molecular no IV
Fio de níquel-crômio	750 – 20.000	Absorção molecular no IV
Globar	1.200 – 40.000	Absorção molecular no IV

As fontes de linhas emitem um número limitado de linhas espectrais e cada uma cobre uma região limitada de comprimento de onda. Esse tipo de fonte tem ampla aceitação em espectroscopia de absorção atômica com as lâmpadas de cátodo oco e em detectores em cromatografia líquida com lâmpadas de arco de mercúrio a baixa pressão [41].

O fotômetro LED segue o mesmo princípio de interação da radiação eletromagnética com a matéria, contudo sua instrumentação é mais simples, pois não precisa selecionar o comprimento de onda. A faixa de emissão do LED é selecionada em função da faixa de absorção do composto de interesse. Quando se precisa monitorar outro composto, troca-se o LED. Então, os fotômetros são projetados para facilitar a troca do LED.

O LED é uma alternativa viável como fonte de radiação em fotometria tendo como vantagens: baixo custo de aquisição (inferior a R\$ 2,00, na maioria), baixo consumo de energia, ótima estabilidade do feixe de emissão e longa vida útil (100.000 horas, em média).

1.9 Multicomutação em análise em fluxo

O processo de análise por injeção em fluxo (FIA) foi baseado no conceito de comutação entre dois estados de repouso, sendo implementado com o uso de válvula rotativa, injetor comutador ou válvula de três vias. Mesmo tendo empregado o injetor com três seções de comutação no processo de zonas coalescentes, a comutação ainda era solidária entre apenas dois estados [42].

O processo de multicomutação em análise em fluxo (MCFA), foi proposto na década de 90 por Reis et al, tendo como base a inserção de pequenos volumes da amostra e do reagente no percurso analítico de forma alternada [30]. Esses volumes podem ser até da ordem de microlitros. Para a implementação do processo, o módulo de análise deve ser constituído por dispositivo de controle de fluido com acionamento discreto e ser realizado empregando válvula solenoide de três vias ou válvula de estrangulamento.

A válvula de três vias tem uma entrada e duas saídas. Estando desligada, o fluido inserido na entrada emerge pela saída da direita e, pela saída da esquerda quando está ligada. O acionamento de cada válvula pode ser individual e na ordem requerida para a inserção da solução de reagente.

O volume da alíquota é função do tempo de permanência ligada da válvula e da vazão de bombeamento. O sistema FIA clássico pode dispensar o uso de recursos de computação, entretanto no processo de multicomutação, o emprego de recursos de controle automático é imprescindível.

O processo de multicomutação em análise em fluxo tem como base o gerenciamento da inserção das alíquotas da amostra e das soluções de reagentes no percurso analítico, e requer um dispositivo para bombeamento, sendo comumente usada a bomba peristáltica. Adotaremos nesse trabalho, para facilitar a discussão, o termo percurso analítico como o caminho percorrido pela zona da amostra iniciando após a alça de amostragem até a entrada da cela de detecção.

1.10 Bomba solenoide como propulsor de fluido

A bomba solenoide é um dispositivo com amplo espaço interno empregado para a propulsão de fluidos em sistemas de análise em fluxo. Na Figura 1.3 é apresentado o esquema de uma bomba solenoide.

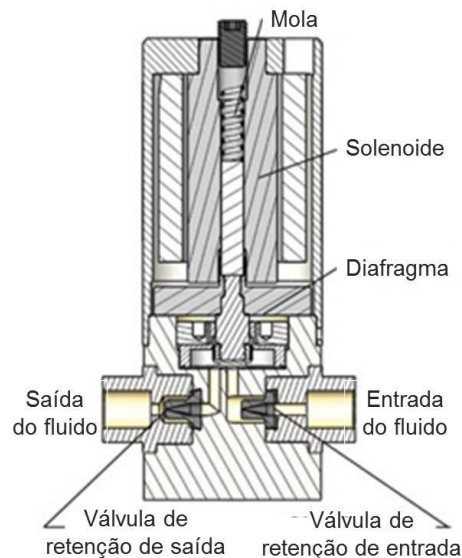


FIGURA 1.3 - Esquema de uma bomba solenoide. Figura adaptada [43].

A bomba solenoide tem como componentes básicos uma bobina solenoide, uma mola e um diafragma. Quando uma corrente elétrica circula através da bobina do solenoide, gera um campo eletromagnético e a bobina age como um eletroímã, o qual força a expansão do diafragma, comprimindo a mola. A expansão do diafragma gera vácuo no interior da bomba solenoide. Com este efeito, o líquido é sugado para o interior da cavidade. Ao cessar a circulação da corrente elétrica, o campo magnético é extinto e a mola empurra o diafragma de volta para a posição inicial, então o líquido sugado na etapa de expansão do diafragma, é expelido pelo orifício de saída. Na entrada e na saída de fluido da bomba há válvulas de retenção para manter o fluxo unidirecional, permitindo encher a cavidade pelo orifício de entrada e esvaziar pelo de saída.

A forma de acionamento da válvula solenoide é idêntica à empregada para uma bomba solenoide, podendo ser acoplada à mesma interface eletrônica, e controlada empregando programa de estrutura semelhante. Em geral, o módulo de análise emprega uma bomba solenoide para cada solução usada no procedimento analítico. O bombeamento da amostra e das soluções de reagentes pode ser

simultâneo ou sequencial, podendo a modalidade desejada ser definida pelo software de controle.

Em vista disso, um módulo de análise para implementar o processo de multicomutação em análise em fluxo pode ser construído sem o uso de bomba peristáltica. Neste caso, as vantagens exploradas incluem: redução de custo, de volume de amostra, de consumo de energia, do porte físico do sistema analítico e melhora da mistura entre alíquotas das soluções.

1.11 Efeito *Schlieren*

Robert Hooke viveu no século XVII e foi responsável por diversas descobertas e inventos em áreas distintas, sendo parte de suas pesquisas publicadas em seu livro *Micrographia*, em 1665 [44]. Em uma investigação sobre propriedades óticas, Hooke propôs um experimento envolvendo uma vela acesa e observou que esta interagia com o ambiente não apenas pela liberação de fumaça (CO₂). Uma alteração ocorreu na interface de contato entre o ar aquecido e o ar ambiente, mais frio, resultando em um efeito de distorção visível a olho nu. A distorção é causada pela mudança de direção na propagação da luz ao atravessar gases, cuja concentração não é homogênea, ocasionado pelo gradiente de temperatura. Apesar da descoberta desse fenômeno ter sido feita por Hooke, o mesmo não destacou sua descrição; então a descoberta foi atribuída por décadas a Léon Foucault (1859) e August Toepler (1864) que conseguiram explicar a origem do fenômeno [45].

Atualmente, o fenômeno é conhecido como efeito *Schlieren* [46], e é observado na passagem de um feixe por uma interface com diferentes índices de refração. Devido à alteração na velocidade de propagação do feixe de radiação eletromagnética (luz) no meio, há um desvio do ângulo de saída do feixe de radiação o que resultou em uma distorção.

Em sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA), o primeiro relato de perturbações na absorbância vinculadas ao efeito *Schlieren* ocorreu em 1977 [47], em que os autores comentaram sobre altos valores das leituras do sinal adotado como branco analítico. Em 1978, Betteridge et al, propuseram um método refratométrico baseado na formação de gradientes de índice de refração [48]. Foi empregado um fotômetro construído com LED como fonte de radiação e um

fototransistor como fotodetector, sendo cada um colocado em uma das extremidades de uma cela de fluxo feita com um tubo de plástico com caminho óptico de 30 mm. Este trabalho apresentou a primeira abordagem referente ao comportamento do fenômeno *Schlieren* em sistema FIA.

Em um sistema FIA, a alíquota da amostra inserida no fluido transportador, se dispersa ao percorrer o percurso analítico, formando gradientes de concentração na forma de parábola como mostrado no esquema da Figura 1.4. Betteridge demonstrou que há formação de características de lentes na solução em fluxo sendo originadas pela diferença de índice de refração entre o fluido transportador e a amostra [48].

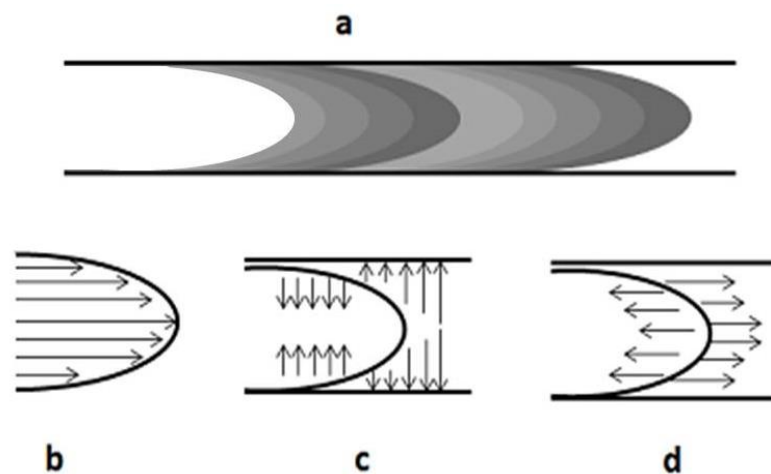


FIGURA 1.4 - Representação da formação de gradiente em sistema FIA: (a) dispersão com a formação do gradiente de concentração em fluxo laminar; (b) linhas de fluxo laminar; (c) difusão radial; (d) difusão axial. Figura adaptada [49].

Ao atravessar o fluido, o feixe de radiação incidente será refratado, podendo convergir ou divergir em relação ao detector. Esse fenômeno explicado por Betteridge, esquematizado na Figura 1.5, é dependente das dimensões da parábola, das características da cela de fluxo, da magnitude do gradiente dos índices de refração e do sentido do fluxo ao detector.

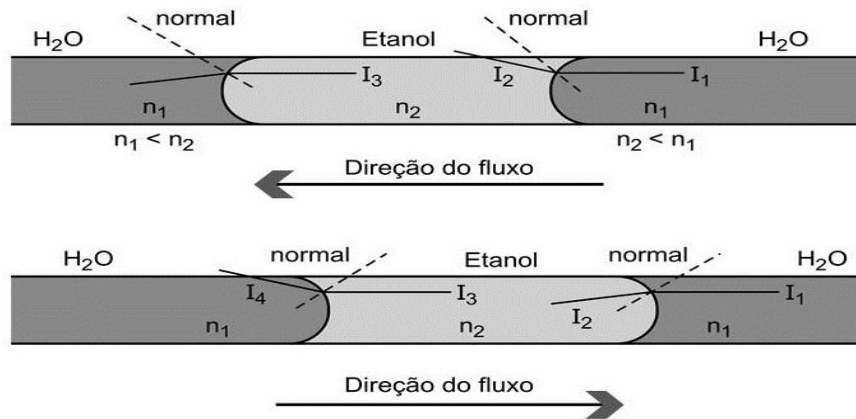


FIGURA 1.5 - Refração do feixe incidente em diferentes condições de fluxo. Legenda: n_1 = índice de refração do meio 1, n_2 = índice de refração do meio 2, I_1 = feixe incidente no fluido transportador, I_2 = feixe refratado, I_3 = feixe incidente na amostra, I_4 = feixe refratado.

O feixe, ao atravessar uma região de maior índice de refração para uma de menor ($n_2 > n_1$), é refratado para longe da normal em relação à superfície da parábola. O comportamento é invertido quando o feixe de radiação passa de uma região de menor índice de refração para uma região de maior valor ($n_1 > n_2$).

A direção do fluxo do fluido de transporte em relação ao sentido de propagação do feixe de radiação apresentará diferenças na quantidade do feixe de radiação refratado que chega ao detector. Quando o fluxo do fluido for contrário à propagação do feixe incidente, uma maior porção de feixe escapará do caminho óptico da cela de fluxo, portanto a magnitude dos sinais transientes do efeito *Schlieren* para o comportamento divergente serão maiores.

No sistema em fluxo, o efeito *Schlieren*, pode ser originado de duas formas: por perturbações no fluxo e por perturbações oriundas de propriedades físico-químicas e intrínsecas da matéria [46, 50]. Perturbações no fluxo do fluido afetam a formação dos gradientes de concentração e conseqüentemente a magnitude do fenômeno. Tais perturbações são ocasionadas por irregularidades na dispersão da amostra [51, 52].

A segunda forma de originar o efeito *Schlieren* está relacionada às propriedades da amostra e do fluido transportador. Preparar as soluções para que apresentem características similares entre si [53] é uma estratégia relatada em literatura para reduzir ou eliminar as perturbações causadas pelo efeito *Schlieren*.

A estratégia de manipular as soluções para compatibilização possui limitações, por exemplo, quando se tratam de características intrínsecas da matéria, não passíveis de manipulação. Em literatura, a maioria dos estudos tem o intuito de minimizar interferências causadas pelo efeito *Schlieren*, as anomalias nos sinais gerados e desvios na lei de *Bouguer-Lambert-Beer* [40, 53, 55]. Contudo, trabalhos baseados nos estudos de Betteridge et al [56, 57] abordaram a variação do índice de refração com fins analíticos, mantendo constante a propulsão e as características de soluções para produção regular do efeito *Schlieren* obtendo resultados relevantes.

1.12 Química verde

Discussões sobre questões ambientais tem tido espaço em diversas esferas de nossa sociedade. Na década de 90, a geração e manejo de resíduos químicos foram introduzidos no foco das discussões como um objetivo a ser mesclado ao desenvolvimento da ciência. Segundo a IUPAC, a química verde é “A invenção, desenvolvimento e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas” [58]. Desta forma, a química verde, ou química limpa, tenta nortear a implantação de processos que possam diminuir ou eliminar a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente [59].

Propostas que exploram o efeito *Schlieren* [56, 57] utilizam a variação do índice de refração como parâmetro para a determinação analítica. Mesmo não tendo uma intenção prévia de reduzir ou substituir reagentes tóxicos, essa metodologia se enquadra nas diretrizes da química verde [59].

A metodologia proposta nesse trabalho segue as diretrizes da química verde ao empregar etanol hidratado 92,8°INPM diluído com água para produzir os padrões em alternativa aos métodos que usam reagentes químicos para a determinação do teor alcoólico em bebidas.

2 Objetivo

Desenvolver um módulo de análise simples, de baixo custo e fácil manuseio, para determinação de etanol em bebidas destiladas baseado no processo de multicomutação em análise em fluxo e explorando o efeito *Schlieren*, sem uso de reagentes.

3 Parte Experimental

3.1 Equipamentos e acessórios

3.1.1 Sistema de detecção

O sistema de detecção construído, ilustrado na Figura 3.1, tem como fonte de radiação um LED de 5 mm de diâmetro, com máximo de emissão em $\lambda = 645,955$ nm, sendo empregado como detector o fotodiodo OPT301. A cela de fluxo tem caminho óptico de 150 mm, 1,2 mm de diâmetro interno e volume interno estimado de 170 μ L. A unidade de detecção foi acondicionada em uma caixa de madeira (42 cm de comprimento, 12 cm de altura e 15 cm de largura) para evitar a incidência de luz externa.

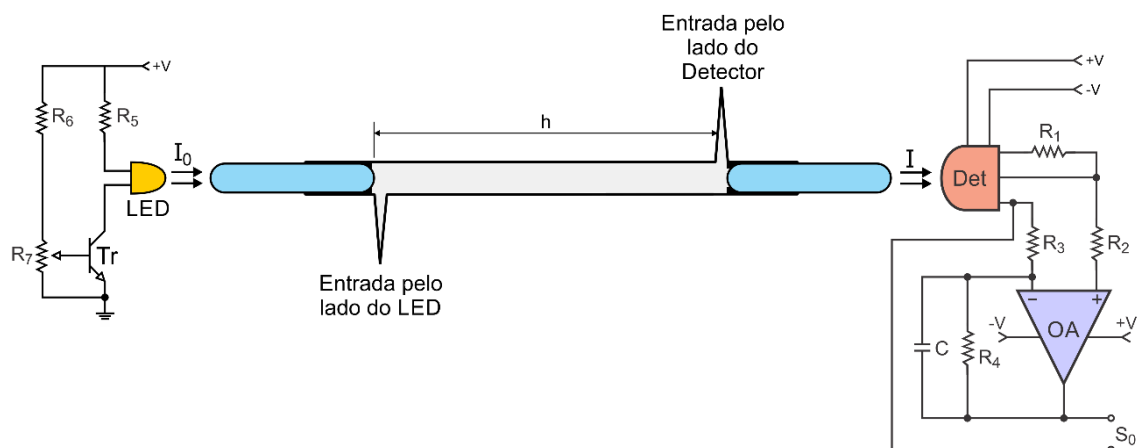


FIGURA 3.1 - Diagrama do fotômetro. Legenda: I_0 = feixe de radiação emitido, I = feixe de radiação transmitido, h = caminho óptico (150 mm), LED = Diodo emissor de luz ($\lambda = 645,955$ nm), Det = fotodetector OPT301.

Uma fonte de tensão contínua de 12V estabilizada com capacidade para fornecer intensidade de corrente de 2A foi utilizada para alimentar as válvulas e as bombas solenoide. Uma fonte simétrica de ± 12 V com capacidade para fornecer intensidade de corrente de 0,5A foi utilizada para alimentar o fotômetro. Estas fontes foram construídas no laboratório empregando reguladores de voltagem LM317 (positivo) e LM337 (negativo), montados em placas de circuito impresso em fibra de vidro.

3.1.2 Módulo de análise

O módulo de análise mostrado na Figura 3.2 foi construído com duas bombas solenoides (Bio-ChemValve, 120SP1240), três válvulas de três vias (NRResearch Inc. HP225T031), tubos de polietileno (diâmetro interno = 0,8 mm) e sistema de detecção fotométrica.

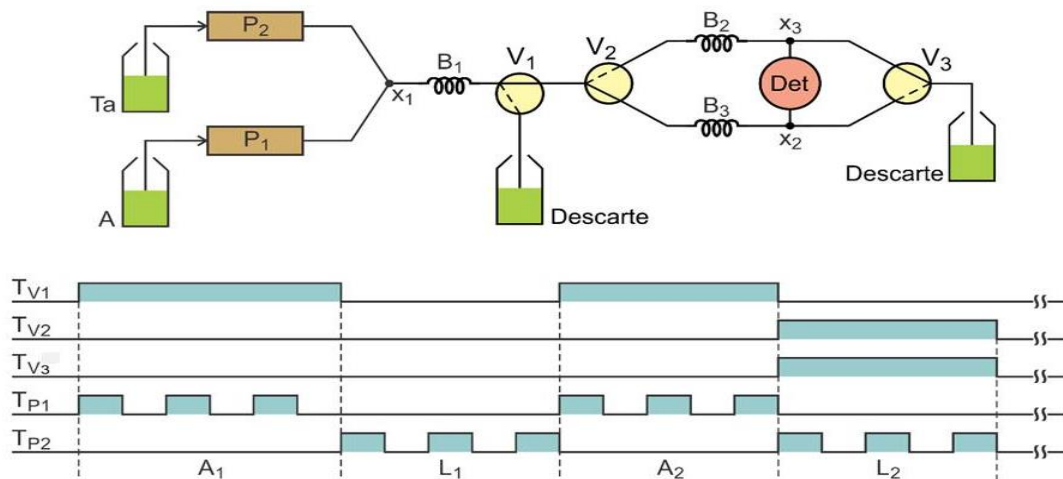


FIGURA 3.2 - Diagrama do módulo de análise. Legenda: Ta = transportador da amostra, A = amostra, P₁ e P₂ = bombas solenoides, V₁, V₂ e V₃ = válvulas solenoides de três vias, B₁ = alça de amostragem (20 cm), B₂ e B₃ = bobinas de dispersão (30 cm), x₂ = confluência para a entrada do fluxo na cela pelo lado do detector, x₃ = confluência para a entrada do fluxo na cela pelo lado do LED, Det = módulo de detecção fotométrica. Tv₁ = tempo de acionamento da válvula V₁, Tv₂ = tempo de acionamento da válvula V₂, Tv₃ = tempo de acionamento da válvula V₃, Tp₁ = tempo de acionamento da bomba P₁, Tp₂ = tempo de acionamento da bomba P₂, A₁ = amostragem com fluxo do transportador contrário ao feixe de radiação, A₂ = amostragem com fluxo do transportador no mesmo sentido do feixe de radiação, L₁ = limpeza do sistema quando o fluxo do transportador for contrário ao feixe de radiação, L₂ = limpeza do sistema com o fluxo do transportador no mesmo sentido do feixe de radiação. Linhas cheia e pontilhada nos símbolos das válvulas indicam o caminho de escoamento da solução quando a válvula está desligada ou ligada, respectivamente.

O módulo de análise foi projetado para trabalhar em linha única com um comprimento de percurso analítico de 50 cm, desde a válvula V₁ até a entrada da cela de fluxo. O lado de inserção da solução na cela de fluxo foi controlado pelas

válvulas solenoides de três vias V_2 e V_3 . Desta forma, para direcionar o fluxo para a entrada próxima ao detector, as válvulas V_2 e V_3 deveriam estar desligadas e, para direcionar o fluxo para a entrada próxima ao LED, V_2 e V_3 deveriam estar ligadas. A válvula V_1 era responsável pela etapa de enchimento da alça de amostragem com solução, ao acionar a bomba P_2 , desviando o excesso para o descarte.

A impulsão das soluções ocorreu em tempos distintos, como apresentado na parte inferior da Figura 3.2. A bomba P_2 impulsionava a amostra para encher a bobina B_1 , que funcionou como alça de amostragem. Nesta etapa, a válvula V_1 permaneceu ligada desviando o excesso de amostra para o descarte. Após a etapa de amostragem, a válvula V_1 foi desligada, e a bomba P_1 foi acionada para deslocar a amostra da alça de amostragem (B_1) em direção ao detector através da válvula V_2 e da bobina B_3 . A zona da amostra passou através do detector (Det) em direção ao descarte através da válvula V_3 . Este foi o primeiro modo de operação: a zona da amostra inserida na cela de fluxo pela entrada próxima ao LED foi deslocada na direção do fotodetector. Desta forma, o deslocamento da zona da amostra dentro da cela de fluxo era na direção contrária a propagação do feixe de radiação emitido pelo LED.

No segundo modo de operação, as válvulas solenoide V_2 e V_3 permaneciam ligadas durante a etapa de deslocamento da zona da amostra da alça de amostragem para o detector. Nessa configuração, a amostra foi deslocada em direção ao detector (Det) e através da bobina B_2 emergindo no detector no ponto de confluência X_2 , sendo deslocada para o descarte através da válvula V_3 . Como resultado, a zona da amostra era inserida na cela de fluxo através da entrada próxima ao fotodetector, portanto o deslocamento da zona da amostra dentro da cela fluxo era no sentido de propagação do feixe de radiação emitida pelo LED. A Tabela 3.1 contém as sequências de ativação dos componentes.

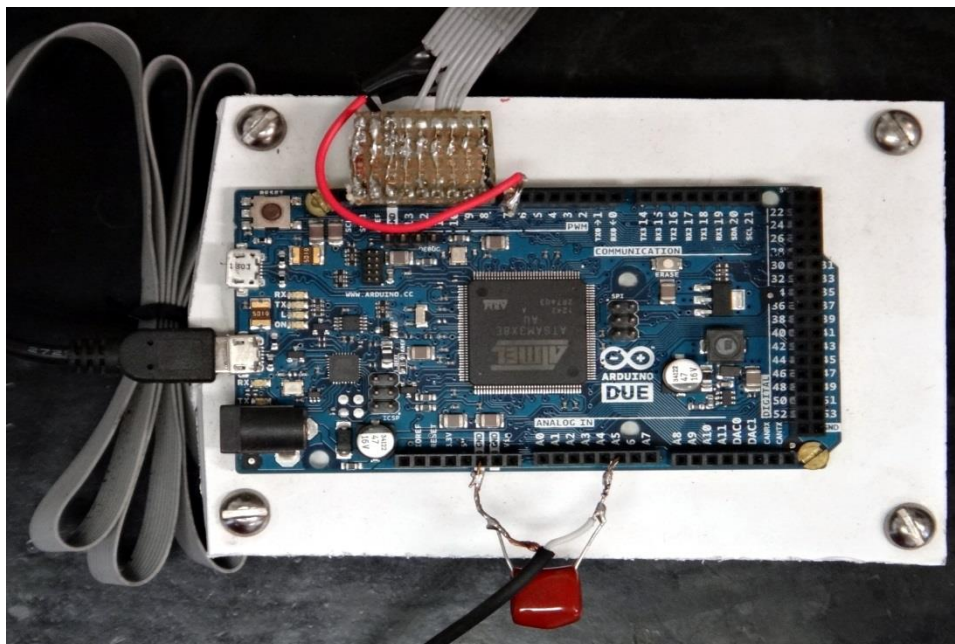
TABELA 3.1 - Sequências de acionamentos dos dispositivos

Etapa	Acionamento					Nº de ciclos
	V1	V2	V3	P1	P2	
Limpeza da alça de amostragem	1	0	0	1	0	20
Preenchimento da alça de amostragem	1	0	0	0	1	19
Calibração ao inserir pelo detector	0	0	0	0	0	10
Calibração ao inserir pelo LED	0	1	1	0	0	10
Inserção de amostra pelo detector	0	0	0	4	0	108
Inserção de amostra pelo LED	0	1	1	4	0	108

1_ ligado, 0_ desligado

3.1.3 Programa de controle

O *Arduino Due* mostrado na Figura 3.3 é uma das opções de placa de prototipagem da marca comercial *Arduino*. É uma interface compacta que oferece grande flexibilidade em aplicações tecnológicas, incluindo controle de dispositivos externos, leituras de sinais analógicos e digitais e comunicação com outras máquinas (computador) via interface serial.

FIGURA 3.3 - Placa *Arduino Due* utilizada no projeto, com componentes conectados.

O *Arduino Due* possui um microcontrolador Atmel SAM3X8E Cortex-M3, CPU baseado em um microcontrolador core ARM 32 bits com *clock* de 84 MHz, 54 portas (linhas) de entrada/saída digitais, 12 entradas analógicas, 2 saídas analógicas, 4 portas serial tipo UARTs (*Universal Asynchronous Receiver-Transmitters*), conversor analógico/digital configurado naturalmente (*by default*) com resolução de 10 bits, porém pode ser reconfigurado para 12 bits via software. Dentre as 54 portas digitais, 12 podem ser usadas como saídas PWM (*Pulse-Width Modulation*). É possível armazenar 512 Kb na memória flash interna. A comunicação externa da placa pode ser realizada por duas portas mini-USB, uma nativa e outra programável (*Native and Programming Port*) [60].

A resolução ótima na conversão de um sinal analógico para digital permite identificar com maior precisão valores entre duas medidas próximas, portanto é importante na instrumentação científica que haja a maior resolução possível. A resolução é definida pela Equação 4 a seguir, sendo *Sinal* o valor máximo que o dispositivo pode converter para digital e *n* o número de bits da conversão.

$$\text{Resolução} = \text{Sinal} / 2^n \quad \text{Equação 4}$$

No caso do *Arduino Due*, a diferença de potencial máxima (fundo de escala superior) é 3300 mV, a resolução então é de $3300/4096 = 0,8$ mV. Este valor é apropriado para detecção fotométrica.

O *Arduino Due* gera os sinais digitais no padrão TTL^c, com a intensidade de corrente em torno de 3 mA. Os dispositivos empregados no módulo de análise, baseado no processo de multicomutação em análise em fluxo, incluindo válvulas solenoide e bombas solenoide, requerem para seu funcionamento uma diferença de potencial de 12 volts e intensidade de corrente na faixa de 50 a 300 mA. Em vista disso, foi necessário empregar uma interface de potência, a qual recebe os sinais de controle gerados pelo *Arduino Due* e gera a partir dele a potência necessária para acionar o dispositivo selecionado pelo *Arduino Due*. Esse papel de interface de potência foi desempenhado por dois circuitos integrados ULN2803 [61], dispositivo com 8 linhas digitais, sendo que as entradas seguem o

^c O nível lógico 'baixo', 'zero' ou '*low*' é definido eletricamente por uma tensão de 0 a 0.8 volts. O nível lógico 'alto' ou '*high*' é definido eletricamente por uma tensão entre 2 e 5 volts

padrão TTL e as saídas são tipo coletor aberto, permitindo controlar diferenças de potencial de até 50 V e drenar corrente até 500 mA por linha de controle.

A ativação das válvulas e bombas solenoides foi feita através de um programa escrito no software *Arduino 1.5.6-r2* embarcado no microcontrolador do *Arduino Due*, contudo o controle da ativação foi realizado por programa escrito em *Visual Basic 6.0*. A escolha desse segundo software teve por objetivo registrar os sinais em tempo real e centralizar os controles de operação do sistema. A placa *Arduino Due* não possui recursos para o processamento gráfico, portanto para realizar essa tarefa foi necessário um segundo software incorporado ao computador. Os sinais transientes gerados pelo fotodetector em milivolts foram convertidos em número pelo conversor analógico/digital e enviados para o computador pela porta serial. O programa escrito em Visual Basic 6.0, capturou os dados enviados ao *Arduino* e realizou a compilação em forma de gráfico.

3.1.4 Método de referência

Para a metodologia de referência, picnometria, foi empregada uma balança analítica Metler Toledo AX304 e um picnômetro calibrado Brand de volume 25,021 mL, série 13-04-40, mostrado na Figura 3.4. Cessadas as determinações das soluções padrões e amostras pelo sistema desenvolvido, deu-se início as determinações pelo método de referência. A cada determinação, o picnômetro foi lavado com água destilada e em seguida com etanol P.A. Após secagem por evaporação natural, o picnômetro era pesado. Sendo a diferença de peso inferior a 0,05 % do peso do picnômetro totalmente seco, prosseguia-se com a determinação das demais soluções.

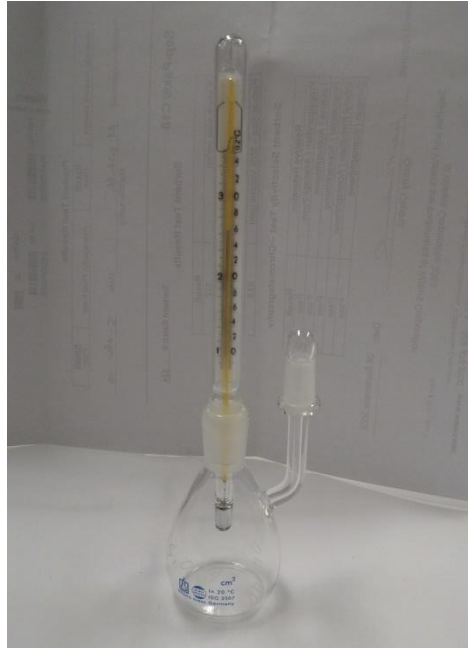


FIGURA 3.4 - Pícnômetro Brand com termômetro.

3.1.5 Detecção fotométrica baseada no efeito *Schlieren*

A saída do fotômetro foi acoplada em uma das entradas analógicas do microcontrolador *Arduino Due* e os sinais gerados pelo fotômetro em milivolt (mV) foram convertidos para sinais digitais. O conversor analógico/digital da placa foi configurado para trabalhar com 12 bits de resolução de forma que os valores possíveis com resolução de 12 bits estão compreendidos na faixa de 0 a 4095.

Na fase em que o efeito *Schlieren* causa divergência no feixe de radiação, a intensidade do feixe que chega ao detector sofreu atenuação, portanto o sinal gerado era menor que o da linha de base (negativo). E na fase em que o comportamento é convergente, o feixe que chegava ao detector era mais intenso, logo o sinal gerado pelo detector era maior que o da linha de base (positivo). Como o microcontrolador não trabalha com diferença de potencial negativa e o efeito *Schlieren* tem componente de sinal negativo, houve a necessidade de instruir o software de controle e aquisição de dados para realizar esse reconhecimento.

O fundo de escala do fotômetro foi ajustado para 2048 mV (leitura de referência) que é metade do fundo de escala do conversor analógico/digital (A/D) do microcontrolador. O programa escrito em linguagem Visual Basic 6.0 foi instruído para subtrair o valor 2048 da leitura do sinal gerado durante o processamento da

amostra. Este arranjo permitiu recuperar a polaridade dos sinais gerados em função do efeito *Schlieren*, embora o sinal bruto fosse sempre positivo.

O número de replicatas foi definido no programa de controle e aquisição como dado de entrada, assim como demais parâmetros, como pulsos das bombas solenoides e acionamento das válvulas. A diferença entre o sinal de referência e os sinais gerados pelos gradientes de concentração da amostra foram relacionados por uma equação matemática do tipo $y = ax + b$, usada para a obtenção da curva analítica.

3.2 Preparo de Soluções

Soluções padrão de etanol com concentração de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60% (v/v) foram preparadas diariamente em volumes de 50 mL, transferindo volumes necessários de etanol hidratado 92,8°INPM e água destilada para a diluição. As amostras foram transferidas para frascos âmbar de 50 mL. Após o preparo, as soluções foram tratadas em banho de ultrassom (Catel Thornton-T7) por oito minutos. Em seguida, ambientadas a 20°C por trinta minutos em um banho com controle de temperatura (Marconi MA-184).

Água destilada foi utilizada como fluido transportador e passou pelo mesmo procedimento empregado para as soluções padrão de etanol. Os frascos de 50 mL foram acomodados no banho de forma que as soluções estivessem completamente submersas. O recipiente contendo o transportador (Erlenmeyer de 500 mL) permaneceu submerso em água no mesmo ambiente das amostras. O etanol hidratado utilizado na preparação dos padrões teve seu teor alcoólico padronizado por picnometria.

4 Resultados e Discussão

A maior parte dos trabalhos que abordam o efeito *Schlieren* visam minimizar ou eliminá-lo [53], pois geralmente o efeito é visto como causa da perda de repetibilidade e precisão. Neste trabalho, o efeito *Schlieren* foi gerado pela variação do índice de refração em condições controladas pela dispersão da amostra no fluido transportador.

A metodologia oficial da AOAC, picnometria, emprega a determinação da densidade das soluções à temperatura de 20°C. Tendo em vista que a temperatura afeta o índice de refração, as amostras e o fluido transportador foram mantidos imersos em banho de água com temperatura controlada (20°C) buscando alcançar condições próximas da metodologia oficial. Empregando esta condição, o efeito *Schlieren* seria originado exclusivamente pelo gradiente de concentração formado nas interfaces ascendentes e descendentes da zona da amostra no fluido transportador.

Outro quesito crítico para obter o efeito *Schlieren* é a vazão do fluido transportador: em baixas vazões, propriedades como a viscosidade podem afetar a dispersão, pois há um aumento no tempo de contato nas interfaces das soluções [53]. Para minimizar esses efeitos, trabalhamos com vazão constante controlando com rigor a frequência de acionamento da bomba solenoide em $0,1 \text{ s}^{-1}$. O erro de temporização em função da frequência de *clock* do computador é menor do que um nanosegundo, portanto a variação da vazão dependente do tempo de resposta da bomba solenoide é constante.

Para o início dos testes de operação foi empregada a seguinte configuração: cela de fluxo de 100 mm, alça de amostragem de 40 cm, percurso analítico de 30 cm, fonte de radiação de $\lambda = 468,1 \text{ nm}$ (LED azul), e concentração dos padrões de etanol de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60% (v/v).

4.1 Sinais *Schlieren*

Os trabalhos encontrados na literatura que exploraram o efeito *Schlieren* empregaram espectrofotômetros com cela de fluxo com caminho óptico de 10 mm. Relataram que há dependência entre sinal e a geometria da cela fluxo e a formação de “lente” na solução.

Para este trabalho, foi empregado um fotômetro de LED e cela de fluxo de comprimento até 25 vezes maior que os citados em literatura [57, 62], para explorar o efeito *Schlieren* com fins analíticos. Na figura 4.1, é mostrado um conjunto de registros dos sinais obtidos empregando o fotômetro da Figura 3.1 e o módulo de análise da Figura 3.2.

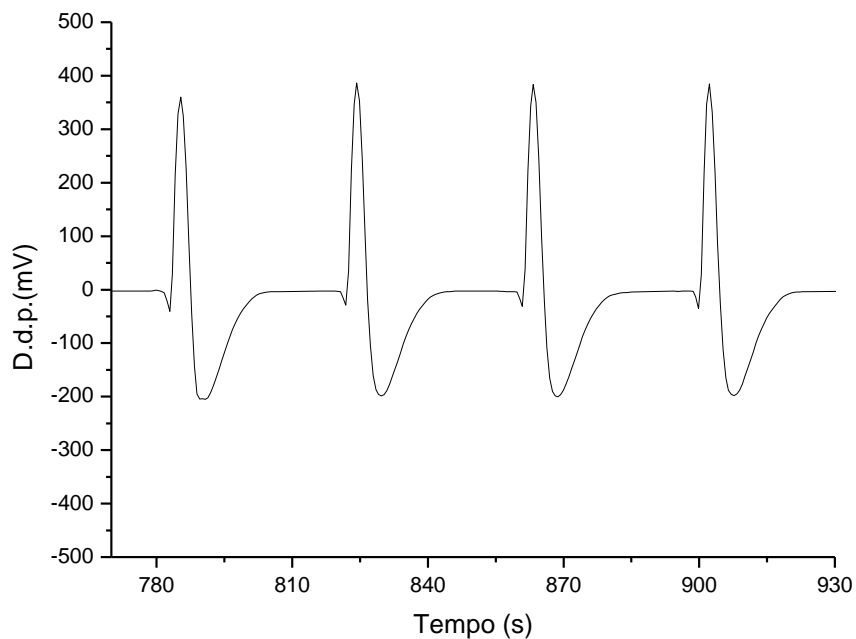


FIGURA 4.1 - Registros dos sinais gerados em função do efeito *Schlieren*. Condições operacionais: solução de etanol 30% (v/v), volume inserido de 20,1 μL , vazão do fluido transportador de 8,78 mL s^{-1} , fluxo da solução no mesmo sentido do feixe de radiação.

Quando a zona da amostra entra na cela de fluxo, o feixe de radiação incide na amostra e sofre refração. O ângulo em que o feixe é refratado faz com que parte da radiação incidente escape do caminho óptico da cela de fluxo. Em vista disso, a intensidade do feixe de radiação que chega ao detector é menor em relação à linha base, e é registrada como o primeiro pico negativo na Figura 4.1.

Quando a zona da amostra entra na cela de fluxo com o mesmo sentido de propagação do feixe de radiação, o gradiente de água para etanol é ascendente, isto é, aumenta a fração de etanol em relação a fração de água, portanto o gradiente de índice de refração aumenta em virtude do comportamento laminar do fluido e o comportamento óptico é semelhante a uma lente convergente. O comportamento óptico de lente concentra o feixe de radiação no interior da cela

de fluxo. Assim a magnitude do feixe de radiação que chega ao fotodetector aumenta, resultando no primeiro pico positivo mostrado na Figura 4.1.

Na saída da zona da amostra da cela de fluxo nesta condição de sentido igual ao da propagação do feixe de radiação, a formação do gradiente é decrescente, isto é, aumenta continuamente a fração de água e diminui a fração de etanol. Para o feixe de radiação incidente o efeito é semelhante a uma lente divergente. Assim, a intensidade do feixe de radiação incidente que chega ao fotodetector é menor e o sinal gerado é negativo em relação à linha de base, conforme mostra o segundo pico negativo na Figura 4.1. O sinal registrado chega a um máximo negativo e em seguida retorna à linha base com a retirada da mistura residual pelo fluido transportador. Observa-se que em termos absolutos a magnitude deste sinal é menor que a do segundo, enquanto que o tempo para retorna à linha base é bem maior. Estes dois efeitos estão relacionados com a dispersão da zona da amostra no fluido transportador.

O fenômeno físico que resulta no efeito *Schlieren* pode ser causado por refração e/ou por reflexão dependendo do ângulo de incidência da luz em relação à interface de índices de refração [63]. Nas condições utilizadas, o efeito *Schlieren* foi gerado pela dispersão da amostra no fluido transportador, onde ocorre a refração. A forma parabólica dos gradientes proporciona a convergência e/ou divergência do feixe em relação ao detector.

A relação entre feixe incidente, refração e reflexão na passagem do feixe entre meios de diferentes índices de refração é bem estabelecida na física óptica, sendo calculada de acordo com Lei de Snell ou Snell-Descartes, a qual relaciona os ângulos de incidência e o refratado com os índices de refração dos meios ($n_1 \cdot \text{sen } i = n_2 \cdot \text{sen } r$) [64].

O produto entre o índice de refração do meio (n_1) com o seno do ângulo incidente (i) em relação à reta normal (N) é igual ao produto entre o índice de refração do outro meio (n_2) com o seno do ângulo refratado (r) em relação à reta normal (N), que é perpendicular à interface das superfícies de diferentes índices de refração. Tal situação está representada simplificadamente na Figura 4.2.

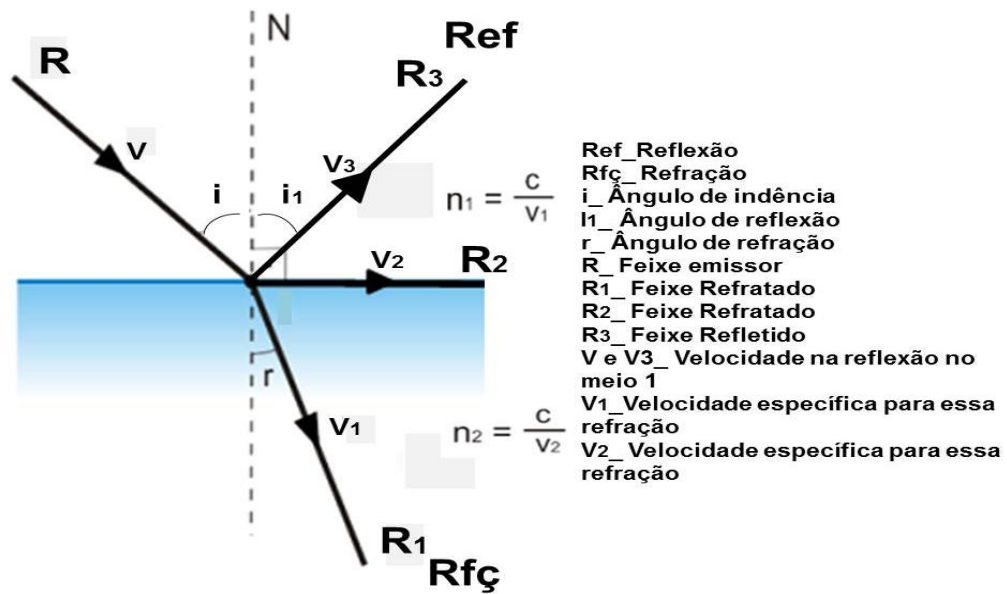


FIGURA 4.2 - Esquema dos fenômenos de refração e reflexão. Figura adaptada [65].

O conjunto de registros na Figura 4.1 mostra perfis idênticos, portanto o efeito *Schlieren* tem um comportamento reprodutível, contudo para se tornar uma ferramenta analítica foi necessário verificar se a resposta era proporcional à variação da concentração de etanol nas soluções. Os registros mostrados na Figura 4.3 foram obtidos processando um conjunto de soluções padrão de etanol com concentração de 5 a 50% (v/v).

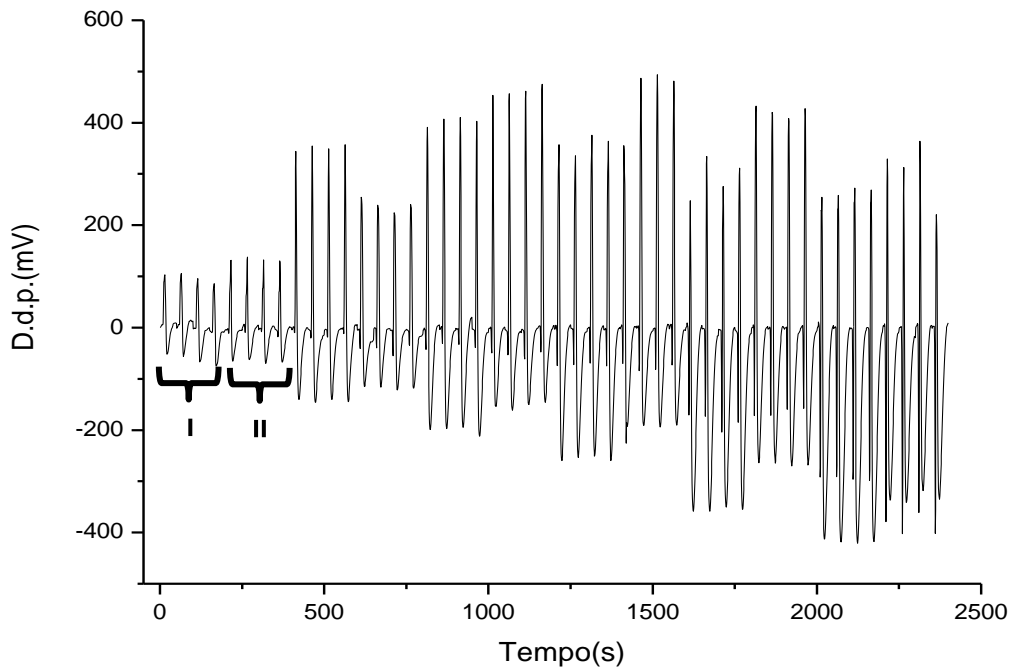


FIGURA 4.3 - Registros dos sinais gerados processando um conjunto de soluções de etanol. Amostra se desloca no sentido oposto ao do feixe de radiação (I) e no mesmo sentido (II) do feixe de radiação.

O módulo de análise mostrado na Figura 3.2 foi projetado para permitir a entrada da zona da amostra na cela de fluxo pela entrada próxima ao detector e saída pela parte próxima ao LED, ou vice-versa. Experimentalmente, essas sequências foram executadas sequencialmente, gerando os conjuntos de dados (I) e (II). Esse procedimento foi selecionado no programa de controle e aquisição de dados que também permitia selecionar separadamente o sentido do fluxo no módulo. A finalidade de inserir a zona da amostra por ambas as extremidades da cela de fluxo foi observar a existência de diferença no sinal relativa à alteração na direção de propagação do feixe de radiação através da amostra.

No primeiro caso, o deslocamento da amostra através da cela de fluxo segue a direção contrária à propagação do feixe de radiação dentro da cela até completar quatro replicatas. Em seguida, o mesmo experimento foi realizado invertendo o sentido de entrada da zona da amostra na cela. Para facilitar a visualização do comportamento dos sinais registrados na Figura 4.3, os conjuntos foram separados, cada um referente a um sentido de inserção da amostra na cela de fluxo, e são mostrados nas Figura 4.4 e Figura 4.5 a seguir.

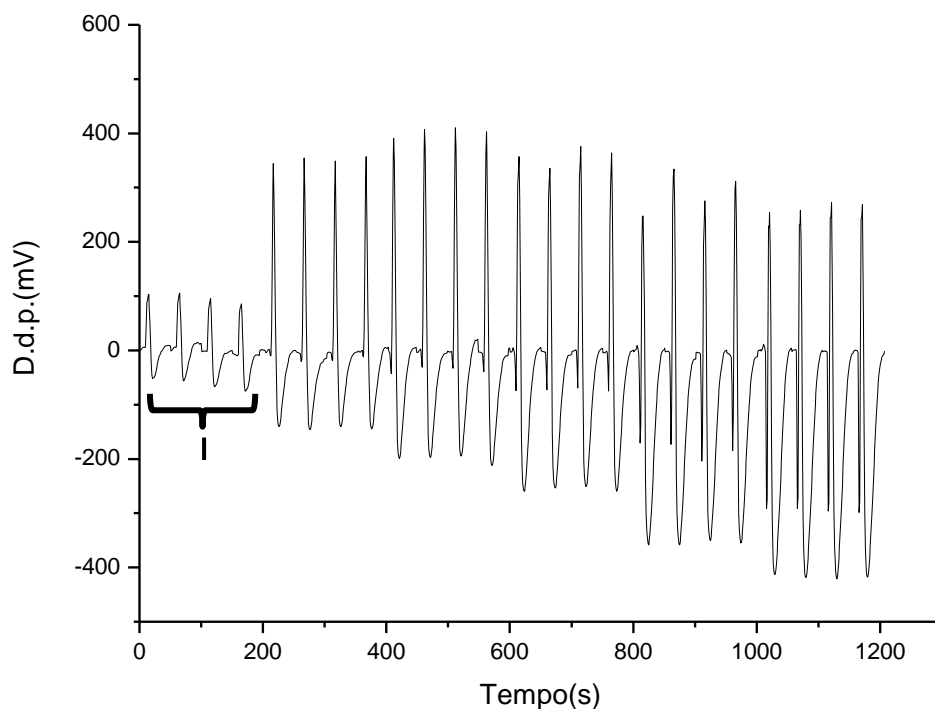


FIGURA 4.4 - Registros dos sinais gerados processando unidirecionalmente um conjunto de soluções de etanol: (I) deslocamento da zona de amostra em sentido contrário ao da propagação do feixe de radiação incidente.

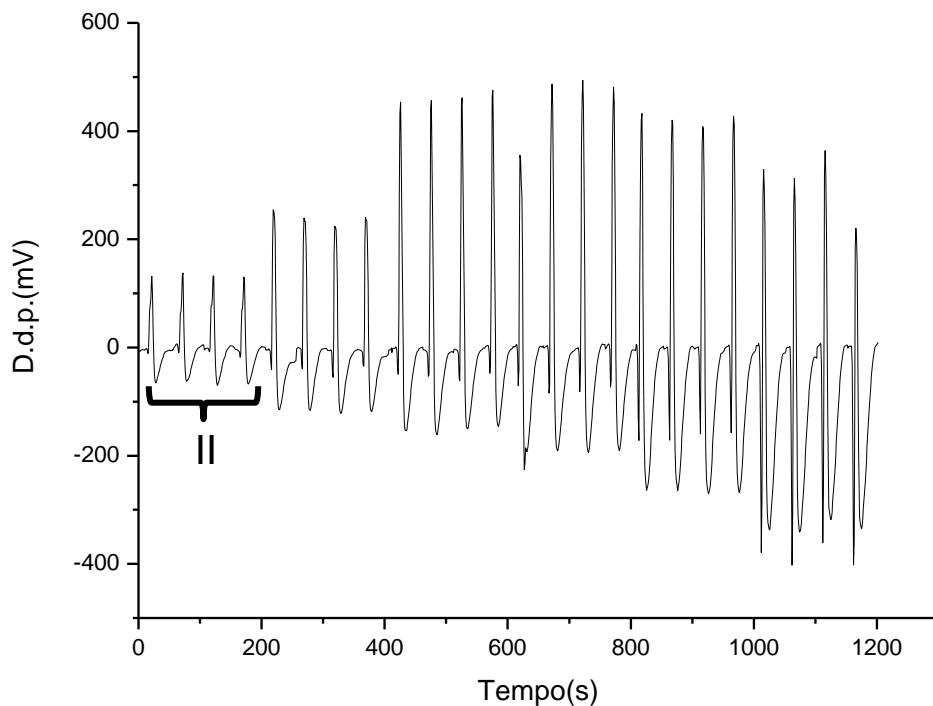


FIGURA 4.5 - Registros dos sinais gerados processando unidirecionalmente um conjunto de soluções de etanol. (II): deslocamento da zona de amostra no mesmo sentido de propagação do feixe de radiação.

Em literatura [57, 62], ao explorar o efeito *Schlieren* foram empregados celas de fluxo de caminho óptico de 10 mm e equipamentos com sistema óptico onde o feixe de radiação tenderia a ser paralelo. Neste trabalho empregamos um fotômetro que usa um LED como fonte de radiação emitindo um feixe de radiação com ângulo de abertura de 25° , empregando cela de fluxo com caminho óptico de 150 mm tendo guias de onda colocados nas extremidades da cela de fluxo. Ao empregarmos esse tipo de cela de fluxo com geometria distinta das empregadas em trabalhos anteriores [57, 62], esperávamos observar anormalidades na formação dos sinais.

Os registros com máximos negativos em relação a linha base correspondem ao comportamento de lente divergente comentado ao analisar os registros mostrados na Figura 4.1 e na Figura 4.3. Observa-se que em termos absolutos o comportamento foi mantido e a magnitude dos máximos negativos é menor em relação às magnitudes máximas positivas. Em uma inspeção visual nas Figuras 4.4 e 4.5, os registros negativos indicam a possibilidade de resposta linear;

essa consideração não pode ser realizada com os registros positivos os quais correspondem ao comportamento de lente convergente.

A linearidade e repetibilidade na formação dos registros abaixo da linha base, em ambos os sentidos de deslocamento do fluido transportador na cela de fluxo, foram compilados em curvas analíticas mostradas na Figura 4.6 e na Tabela 4.1. Observa-se que em ambos os sentidos de deslocamento, obteve-se resposta linear.

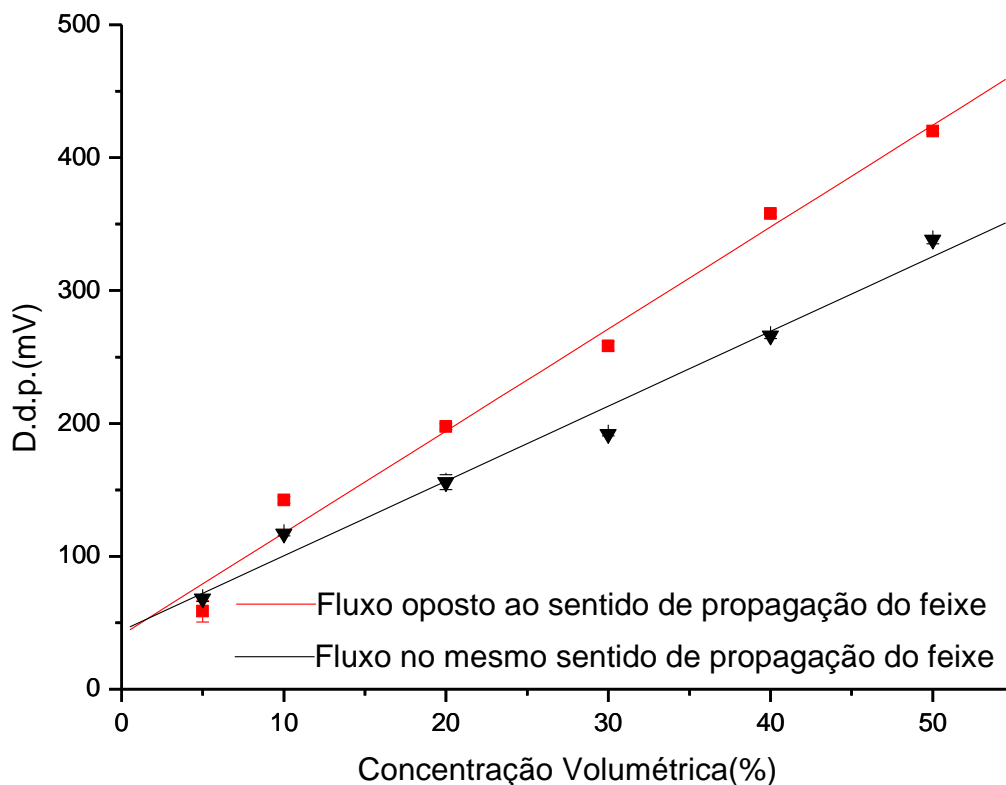


FIGURA 4.6 - Curvas analíticas para comportamento de lente divergente em fluxos de deslocamento no mesmo sentido e no sentido oposto ao feixe de radiação incidente.

TABELA 4.1 - Resultados analíticos para comportamento convergente: sentido do fluido transportador.

Sentido do fluido transportador em relação ao feixe de radiação	Curva analítica	R
Sentido oposto	$Y = 7,6700 \cdot X + 40,9394$	0,9926
Mesmo sentido	$Y = 5,6304 \cdot X + 44,1510$	0,9910

R = Coeficiente de correlação linear, Y = sinal medido (mV), X = concentração de etanol (%)

Ao analisar a Tabela 4.1 observa-se um aumento na sensibilidade em torno de 25 %, quando o deslocamento da zona da amostra tem sentido oposto ao da propagação do feixe de radiação incidente. Estes resultados indicam que o módulo de análise proposto permite explorar o efeito *Schlieren* com maior sensibilidade com o fluxo do fluido contrário a propagação do feixe, portanto esta configuração foi empregada para desenvolver o procedimento analítico para a determinação de etanol em bebidas destiladas.

O sentido de deslocamento da zona da amostra em relação à propagação do feixe de radiação afeta também a magnitude do sinal e o comportamento convergente na solução, como apresentado no gráfico da Figura 4.6. Enquanto o gráfico da Figura 4.6 mostra que parte da componente do efeito *Schlieren* pode ser usada com fins analíticos, o apresentado na Figura 4.7 não permite tal aproveitamento.

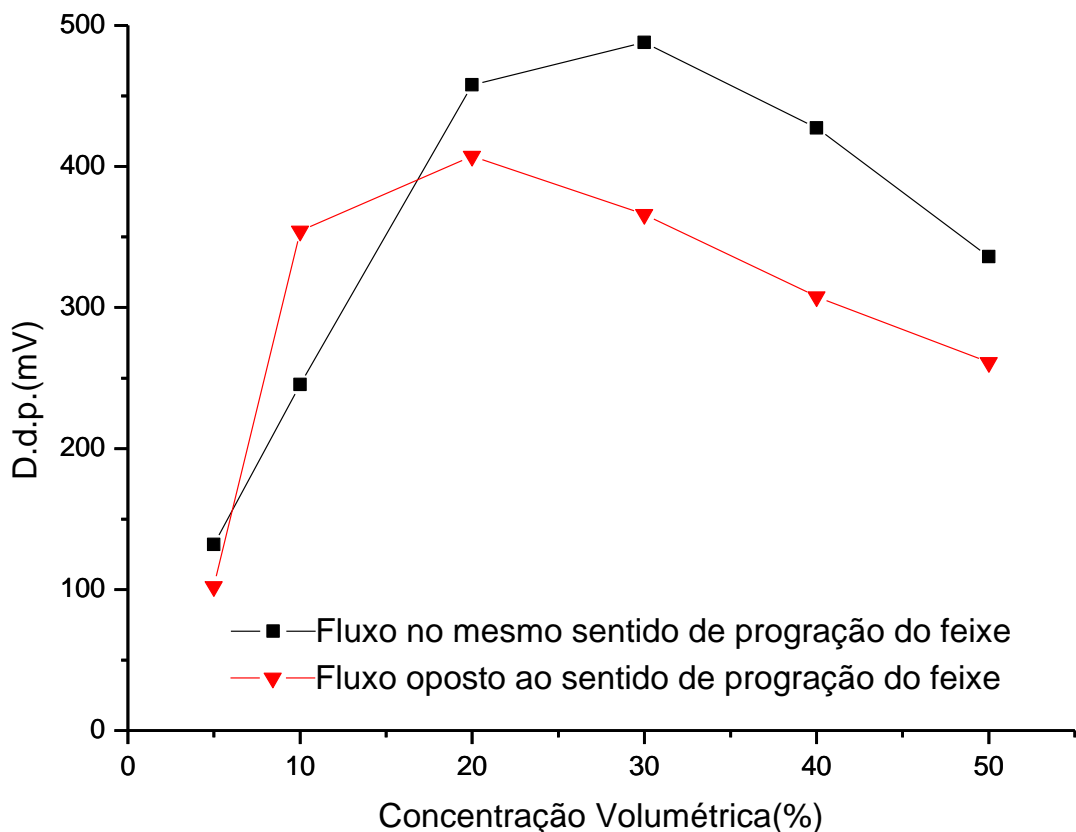


FIGURA 4.7 - Curvas analíticas para comportamento de lente convergente com fluxos de deslocamento no mesmo sentido e no sentido contrário ao feixe de radiação incidente; obtidas com valores máximos absolutos.

Os registros positivos mostrados na Figura 4.7 correspondem ao comportamento de uma lente convergente. Em ambos os sentidos de inserção, há faixas com tendências lineares, sendo possível observar que em dois pontos o comportamento de lente convergente destoa do de lente divergente, estes ainda não mencionados em literatura.

O primeiro ponto de anormalidade ocorreu com o padrão de etanol 10% (v/v) para o sentido de inserção do fluido a favor da propagação do feixe de radiação. Na Figura 4.3 pode ser visto de forma clara que as máximas magnitudes dos sinais, no sentido contrário e a favor do feixe de radiação, têm uma inversão de tendência. Os máximos dos sinais no sentido a favor da propagação do feixe tornam-se superiores em relação ao sentido contrário de propagação do feixe.

O segundo ponto de anormalidade é em relação às faixas com tendência linear. O comportamento convergente é relatado em literatura como ruidoso e não reproduzível [62]. Nas condições empregadas nesse trabalho, ao explorar o comportamento convergente pôde ser verificada linearidade, sendo as faixas com tendências lineares compiladas na Tabela 4.1. Considerando toda a região que apresenta o comportamento convergente, observam-se duas faixas, uma para cada sentido de inserção do fluido transportador.

4.2 Estudo para a escolha do transportador

Encontra-se na literatura trabalhos que, ao explorar o efeito *Schlieren* empregaram soluções ácidas como fluido transportador para aumentar a diferença de índice de refração em relação à amostra, o que implica em aumento na magnitude do sinal gerado [62]. Considerando essa possibilidade foi realizado um estudo empregando como transportadores fluidos com diferentes índices de refração. Foram selecionados água destilada, etanol hidratado 92,8° INPM e solução de H_2SO_4 com concentração de $0,25 \text{ molL}^{-1}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.8 e Tabela 4.2.

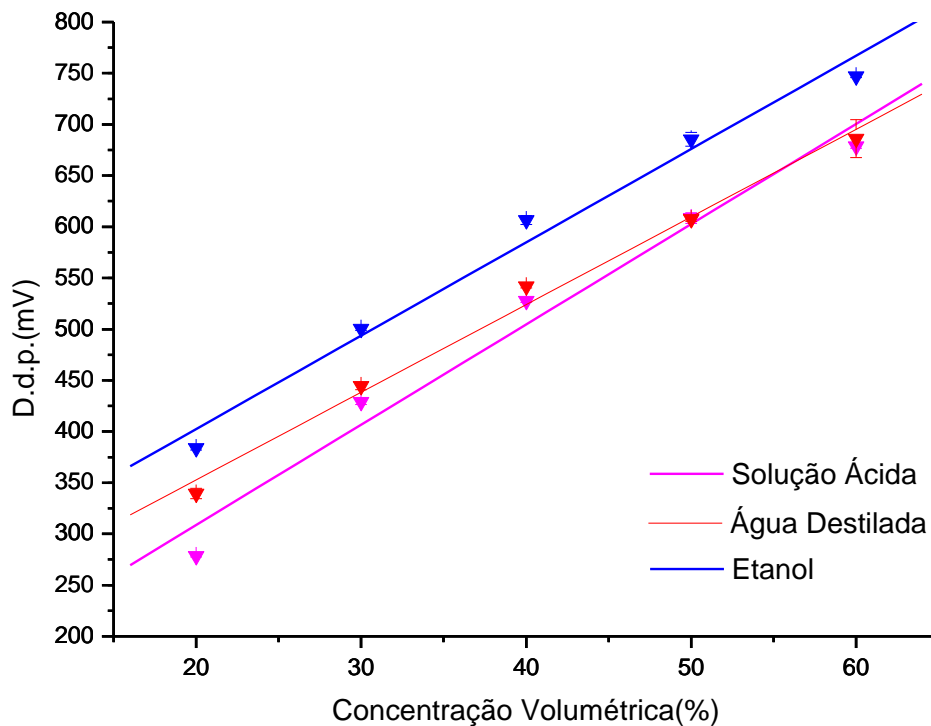


FIGURA 4.8 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol em diferentes fluidos transportadores. Configuração do módulo: caminho óptico de 100 mm, percurso analítico de 70 cm; alça de amostragem de 40 cm; fonte de radiação de 468,1 nm (LED azul); soluções padrão de etanol com concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 % (v/v).

TABELA 4.2 - Resultados analíticos do estudo do fluido transportador.

Transportador	Curva analítica	R
Solução Ácida	$Y = 9,7940 \cdot X + 112,8084$	0,9874
Água Destilada	$Y = 8,5637 \cdot X + 181,4004$	0,9958
Etanol	$Y = 9,1157 \cdot X + 220,1416$	0,9919

R=Coefficiente de correlação linear, Y=sinal medido (mV), X=concentração de etanol (%)

A análise dos dados da Tabela 4.2 indica que a linearidade da curva analítica obtida empregando água destilada como fluido transportador é superior à obtida com a solução de ácido sulfúrico, contudo a sensibilidade é inferior. Como mencionado em literatura [62], o emprego de solução de ácido sulfúrico como fluido transportador implicou em melhora na sensibilidade, visto que houve uma diferença de 13% em comparação a água destilada. Entretanto, considerando que este ganho

em sensibilidade não tem grande significado para o procedimento analítico que propomos optamos pelo uso de água destilada como fluido transportador. Além de melhor resposta linear, agrega como vantagens: redução do custo na análise e a geração de efluente sem restrição ambiental.

Com intuito de verificar o comportamento, o etanol hidratado foi testado apresentando desempenho intermediário entre a água destilada e a solução ácida.

4.3 Estudos de fonte de radiação

O efeito *Schlieren* é causado pela mudança no ângulo de saída do feixe de radiação ao atravessar interfaces com índices de refração distintos; há autores que atestam a independência desse fenômeno em relação ao comprimento de onda do feixe [46].

Os LEDs utilizados para estudo da fonte de radiação tiveram seus λ máximos de emissão determinados com um espectrofotômetro (Ocean Optics USB 4000). Com a finalidade de avaliar a resposta em todo o espectro visível, selecionou-se LEDs que emitem em comprimentos de onda nas faixas do: violeta, azul, verde, amarelo e vermelho. Os resultados obtidos com os LEDs selecionados são mostrados na Figura 4.9.

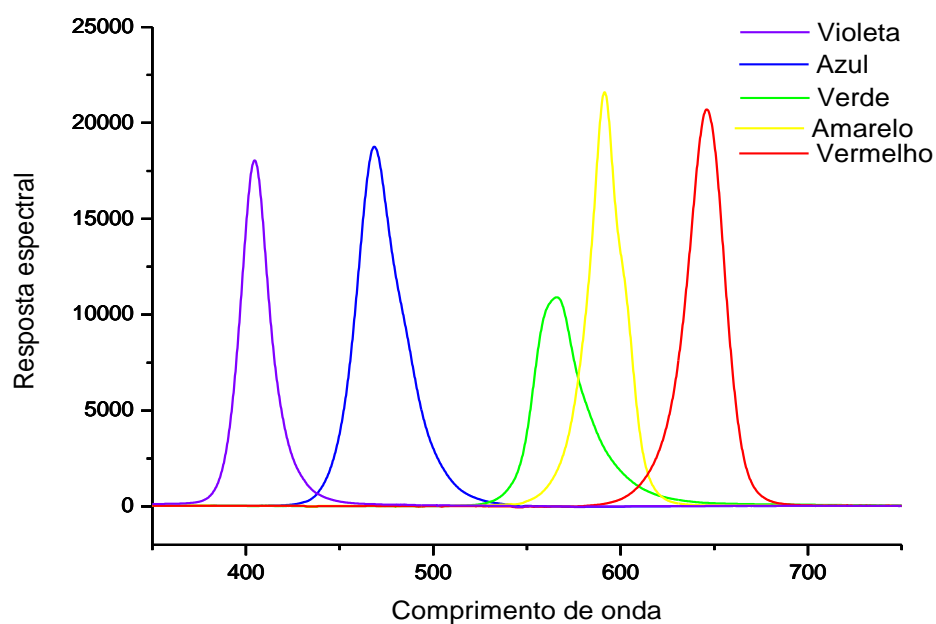


FIGURA 4.9 - Resposta espectral para LEDs usados nos experimentos.

O LED amarelo não mostrou ser uma alternativa viável como fonte de radiação pois, com os sinais gerados não foi possível obter correlação linear. O estudo do efeito do comprimento de onda da fonte de radiação foi realizado empregando LEDs de alto brilho e com emissão nas faixas correspondentes às cores violeta, azul, verde e vermelho, obtendo-se boa correlação linear entre concentração volumétrica das soluções padrão de etanol e resposta fotométrica. Os resultados são mostrados na Figura 4.10 e na Tabela 4.3.

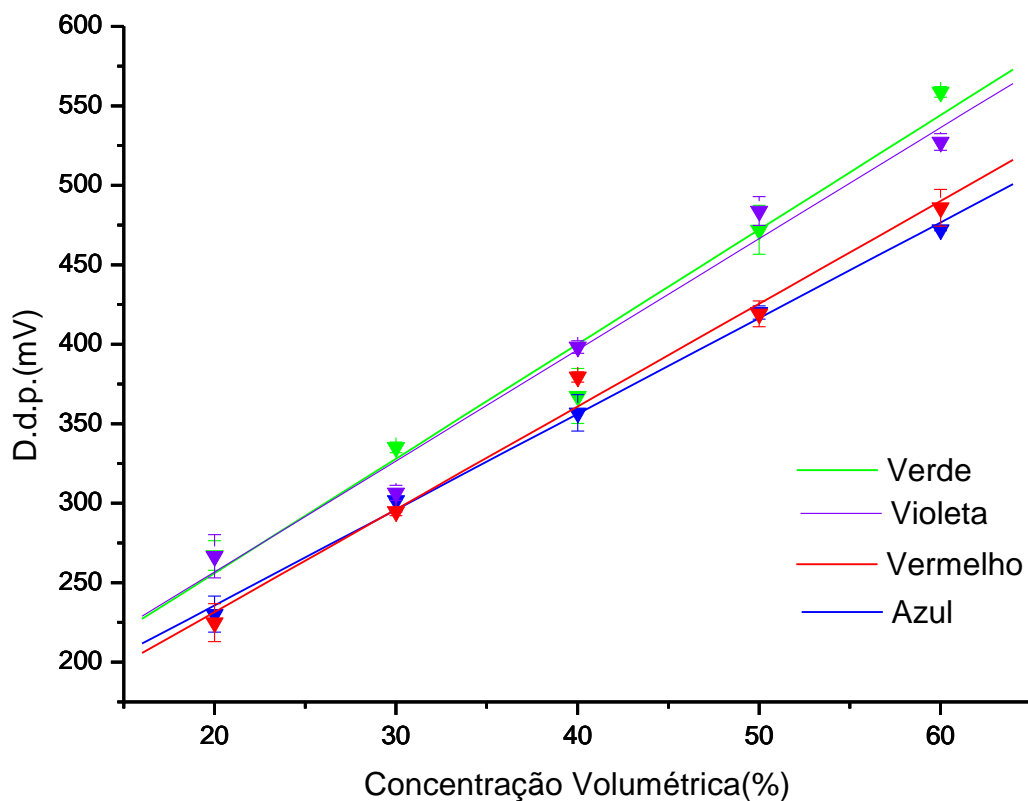


FIGURA 4.10 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol com diferentes fontes de radiação. Configuração do módulo: caminho óptico de 100 mm, percurso analítico de 70 cm; alça de amostragem de 40 cm; soluções padrão de etanol com concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 % (v/v).

LEDs magenta e branco de alto brilho, também disponíveis comercialmente, não foram empregados como opção nesse trabalho porque são formados por dois ou mais comprimentos de onda para composição da cor, o que poderia gerar interferência nas leituras, além de afetar a seletividade do detector.

TABELA 4.3 - Resultados analíticos para diferentes fontes de radiação.

LED	λ (nm)	Curva analítica	R
Verde	565,4	$Y = 7,2011 \cdot X + 112,0298$	0,9863
Violeta	404,7	$Y = 6,9843 \cdot X + 117,0854$	0,9910
Vermelho	645,9	$Y = 6,4635 \cdot X + 102,2508$	0,9946
Azul	468,1	$Y = 6,0221 \cdot X + 115,3032$	0,9987

R = Coeficiente de correlação linear, Y = sinal medido (mV), X = concentração de etanol (%)

Analisando os dados da Tabela 4.3 observa-se uma relação oposta entre sensibilidade e linearidade. A maior sensibilidade está na faixa de emissão do LED verde, cujo máximo de emissão é em torno de 565,4 nm, entretanto a melhor resposta linear foi obtida com o LED azul, com máximo de emissão em torno de 468,1 nm. Considerando a configuração de melhor correlação entre sensibilidade e linearidade, optou-se pelo LED vermelho com máximo de emissão em torno de $\lambda = 645,9$ nm. Outro quesito para escolha do LED vermelho como melhor opção foi o fotodetector empregado (OPT301) ter maior sensibilidade para emissão na faixa do vermelho [68]. Provavelmente esta característica tenha favorecido a alta correlação linear.

4.4 Estudos do comprimento da cela de fluxo

Nos trabalhos mencionados anteriormente [57, 62] que exploraram o efeito *Schlieren* com fins analíticos, foram empregados espectrofotômetros com cela de fluxo com caminho óptico de 10 mm, com geometria retangular, o que permitiu a incidência de feixe de radiação na janela de observação com um ângulo de 90°. Neste trabalho foi empregado cela de fluxo construída com tubo de vidro (borossilicato) e tendo uma geometria distinta das relatadas na literatura.

O aumento do comprimento do caminho óptico da cela de fluxo é uma estratégia empregada em espectrofotometria de absorção molecular para aumentar a sensibilidade do procedimento analítico. Caminho óptico mais longo aumenta a probabilidade de absorção de fótons do feixe de radiação pelas moléculas do analito. Entretanto, nesse trabalho o parâmetro de interesse analítico está relacionado à refração do feixe de radiação, portanto o aumento do caminho óptico

pode não corresponder ao ganho de sensibilidade, mas sim ao aumento do número de vezes que o processo de refração ocorre dentro da cela de fluxo. Visando encontrar essa resposta, um experimento foi realizado empregando celas de fluxo com caminho óptico de 100 até 250 mm e os resultados são mostrados na Figura 4.11 e na Tabela 4.4.

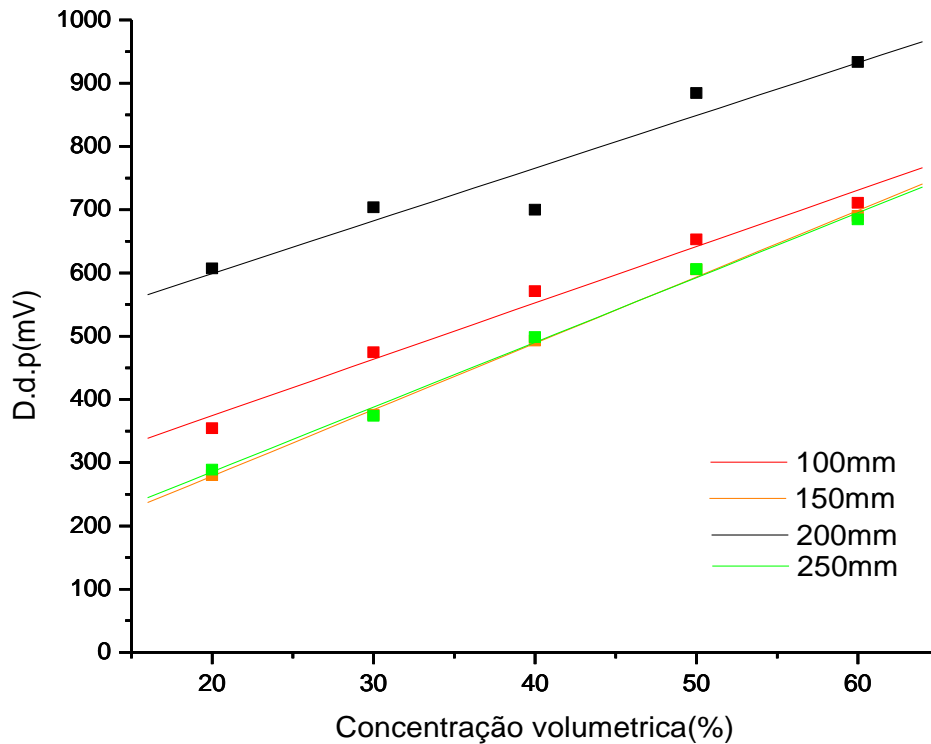


FIGURA 4.11 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol com diferentes comprimentos da cela de fluxo. Configuração do módulo: percurso analítico de 70 cm; alça de amostragem de 40 cm; fonte de radiação de $\lambda = 645,9$ nm (LED vermelho) soluções padrão de etanol com concentração de 20, 30, 40, 50, 60 % (v/v).

TABELA 4.4 - Resultados analíticos do estudo de celas de fluxo.

Cela (mm)	Volume (μL)	Curva analítica	R
100	113	$Y = 8,9155 \cdot X + 195,9111$	0,9914
150	170	$Y = 10,5012 \cdot X + 68,6741$	0,9987
200	226	$Y = 8,3356 \cdot X + 432,2586$	0,9589
250	283	$Y = 10,2376 \cdot X + 80,7565$	0,9974

R=coeficiente de correlação linear, Y=sinal medido (mV), X=concentração de etanol(%)

Analisando os valores na Tabela 4.4 e tomando a linearidade como parâmetro de otimização, observa-se que a melhor e a pior resposta foram obtidas com as celas de fluxo de 150 mm e de 200 mm, respectivamente. Tomando a sensibilidade como parâmetro, a pior e a melhor resposta foram obtidas com as celas de fluxo de 200 e 150 mm, respectivamente.

As celas de fluxo de 150 e 250 mm apresentaram desempenhos semelhantes, todavia optamos pela cela de fluxo de 150 mm por proporcionar melhor relação entre sensibilidade e linearidade permitindo aumento na frequência analítica e menor volume de efluente gerado. Uma cela de 50 mm foi testada, porém não promoveu condições para a formação de sinais do efeito *Schlieren* nas condições de estudo.

4.5 Estudo do comprimento de percurso

A proposta de procedimento analítico desenvolvida não envolve reação e o princípio de detecção é baseado na formação de gradientes de índice de refração gerados pela formação de gradientes da concentração que são dependentes da dispersão. Portanto, o comprimento do percurso analítico pode ter efeito significativo na geração do efeito *Schlieren*.

Os experimentos variando o comprimento da bobina de mistura foram realizados aplicando 4 ciclos de amostragem tendo um percurso mínimo de 30 cm. Para esse trabalho, é considerado comprimento do percurso analítico a distância entre a válvula V1 até a entrada cela de fluxo mostrado no esquema do módulo na Figura 3.2. Os resultados do estudo do comprimento do percurso são mostrados na Figura 4.12 e na Tabela 4.5.

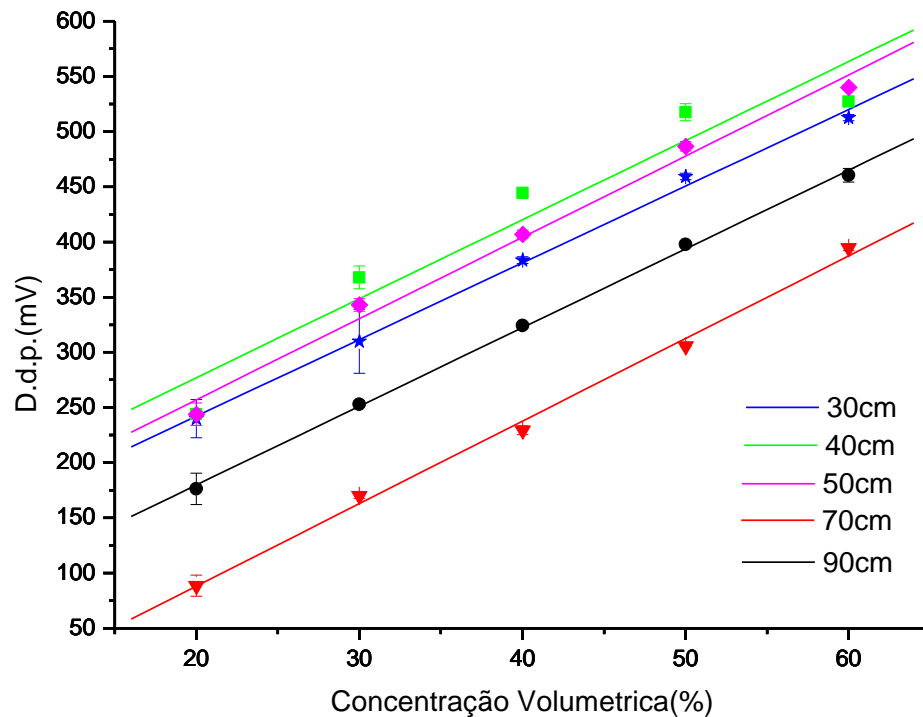


FIGURA 4.12 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol em diferentes comprimentos de percurso analítico. Configuração do módulo: cela de fluxo com caminho óptico de 150 mm; fonte de radiação de $\lambda = 645,9$ nm (LED vermelho); soluções padrão de etanol com concentração de 20, 30, 40, 50, 60 % (v/v).

TABELA 4.5 - Resultados analíticos de estudo do comprimento do percurso.

Percurso (cm)	Curva analítica	R
30	$Y = 6,9455 \cdot X + 103,2168$	0,9985
40	$Y = 7,1595 \cdot X + 133,7974$	0,9630
50	$Y = 7,3573 \cdot X + 109,8422$	0,9950
70	$Y = 7,4762 \cdot X + 61,3369$	0,9980
90	$Y = 7,1281 \cdot X + 37,2583$	0,9994

R = Coeficiente de correlação linear, Y = sinal medido (mV), X = concentração de etanol (%)

O aumento do comprimento do percurso analítico aumenta a dispersão da zona da amostra, que é um processo intrínseco da análise por injeção em fluxo. O parâmetro analítico explorado neste trabalho baseado no efeito *Schlieren* não

gera um composto para ser detectado, portanto o aumento da dispersão no gradiente de índice de refração poderia reduzir a magnitude dos sinais gerados.

Analisando os coeficientes angulares das curvas analíticas da Tabela 4.5 observa-se que, o aumento do percurso analítico e consequente dispersão, não afetaram a sensibilidade para bobinas mistura com comprimento na faixa de 30 a 90 cm.

Considerando a sensibilidade, os melhores resultados foram alcançados com os percursos de 50 e 70 cm, sendo que o ganho para o percurso de 70 cm na sensibilidade foi inferior a 2% quando comparado com o comprimento de 50 cm. As diferenças nas correlações lineares não foram consideradas significantes, no entanto, a fim de minimizar a quantidade de pulsos no fluido transportador e aumentar a frequência analítica, o comprimento de 50 cm para o percurso analítico foi selecionado.

4.6 Estudo para volume de amostra

Em sistemas por injeção em fluxo há sempre o intuito de reduzir o volume de amostra, desde que não ocorra perda significativa de sinal analítico, e dessa forma reduzir a geração de efluentes. Neste trabalho, o volume de amostra tem influência sobre as dimensões do sinal analítico sendo que a diminuição da dispersão afeta a magnitude dos sinais. O estudo variando o volume da amostra inserido no sistema foi realizado e os resultados são apresentados na Figura 4.13 e Tabela 4.6.

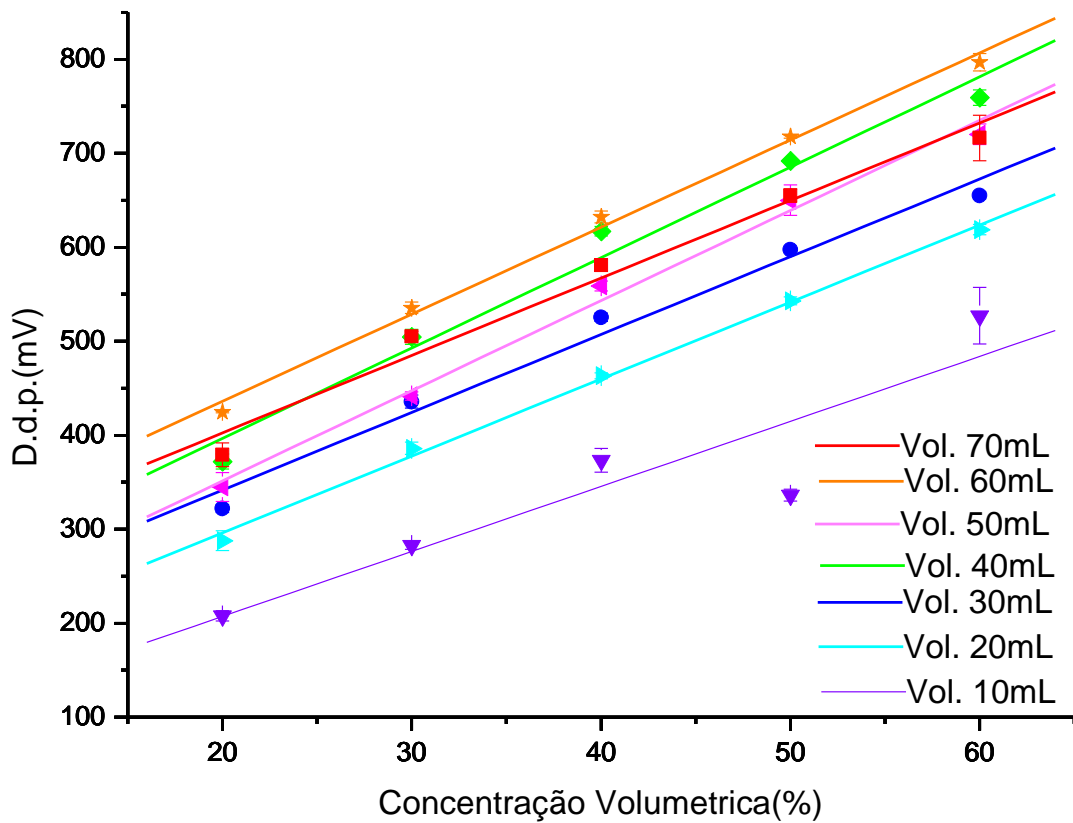


FIGURA 4.13 - Relação entre sinal detectado e concentração de soluções padrão de etanol com diferentes comprimentos da alça de amostragem. Configuração do módulo: cela de fluxo com caminho óptico de 150 mm; fonte de radiação de $\lambda = 645,9$ nm (LED vermelho); soluções padrão de etanol com concentração de 20, 30, 40, 50, 60 % (v/v).

TABELA 4.6 - Resultados analíticos do estudo do volume da amostra.

Alça (cm)	Volume (μ L)	Curva analítica	R
10	50,02	$Y = 6,9193 \cdot X + 68,7155$	0,9187
20	100,05	$Y = 8,1910 \cdot X + 132,1346$	0,9987
30	150,07	$Y = 8,2764 \cdot X + 176,0446$	0,9913
40	200,10	$Y = 9,6209 \cdot X + 204,1833$	0,9889
50	250,13	$Y = 9,5910 \cdot X + 159,6098$	0,9965
60	300,16	$Y = 9,2644 \cdot X + 250,8763$	0,9976
70	350,18	$Y = 8,2453 \cdot X + 237,5087$	0,9898

R = Coeficiente de correlação linear, Y=sinal medido (mV), X = concentração de etanol (%)

A variação de volume foi realizada por meio de alças de amostragem e teve início com a alça de 10 cm correspondente ao volume de 50,02 μL , quantidade mínima para a formação de gradientes homogêneos. A variação do volume foi realizada com o incremento do comprimento da alça em uma razão de 10 cm. O maior volume inserido no sistema foi de 350,18 μL , com a alça de 70 cm.

Analisando os coeficientes angulares das curvas analíticas mostradas na Tabela 4.6 observa-se que houve um aumento de sensibilidade até a alça de amostragem de 40 cm, que corresponde a um volume de 200,10 μL . A metodologia desenvolvida não tem a sensibilidade como um fator crítico, pois as amostras encontradas no mercado para destilados apresentam teor de etanol superior a trinta e seis por cento em volume. Ao avaliar outras figuras de mérito, como a correlação linear, geração de efluente e consumo de amostra, optou-se pelo volume de 100,50 μL com a alça de 20 cm.

4.7 Análise em amostras

A otimização do módulo de análise foi alcançada com a seguinte configuração: cela de fluxo com caminho óptico de 150 mm; percurso analítico de 50 cm; alça de amostragem de 20 cm; fonte de radiação de $\lambda = 645,9$ nm (LED vermelho); quatro ciclos de amostragem. Com essa configuração houve o processamento do conjunto de soluções padrão de etanol e obtida a curva analítica mostrada na Figura 4.14. O módulo de análise tem capacidade para executar 110 determinações por hora, com consumo de 400,2 μL de amostra e geração de volume de efluente de 2,9 mL por determinação. O coeficiente de correlação linear alcançado foi de 0,9967 para a equação $Y = 6,8432 * X + 172,8884$, sendo Y o sinal medido no detector fotométrico em milivolts e X a concentração da amostra em volume percentual.

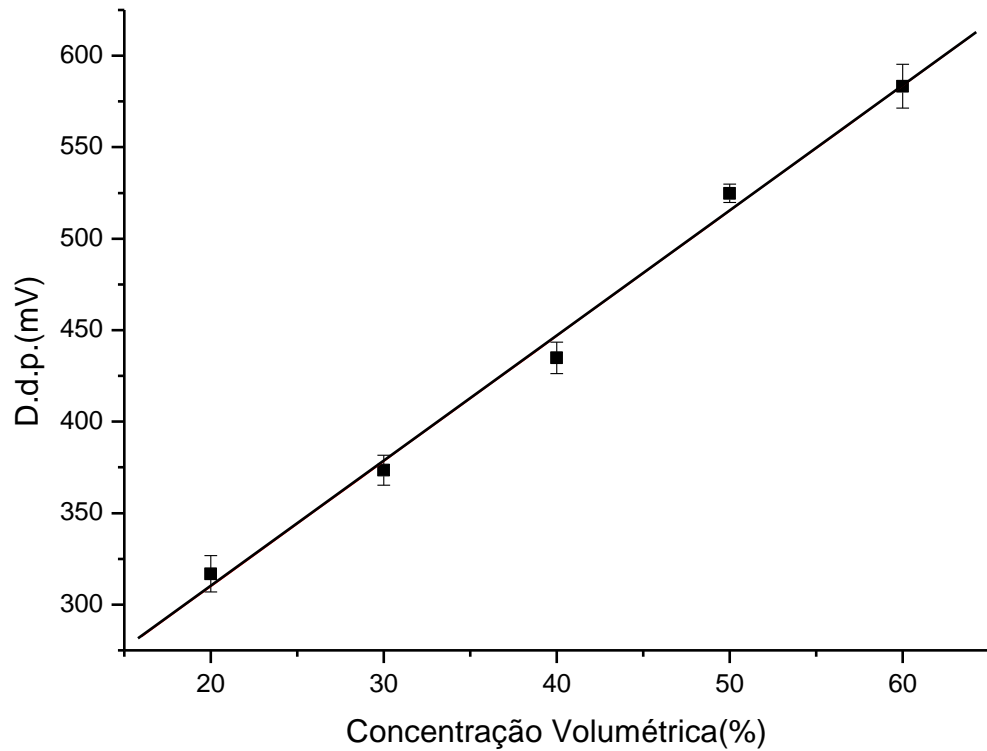


FIGURA 4.14 - Curva analítica com soluções padrões nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60% (v/v).

Como amostras, foram selecionados dois tipos de bebidas destiladas: vodca e cachaça. Partindo dos dados obtidos da curva mostrada na Figura 4.14 foi realizado o cálculo das concentrações de etanol nas amostras, e os resultados são mostrados na Tabela 4.7.

TABELA 4.7 - Resultados da determinação de etanol em amostras de bebidas sem interferentes especificados no rótulo.

Amostras	Teor rotulado (%)	M.R (%)	M.P (%)	Erro (%)
Vodca Kadov	37,5	38,1	38,50 ± 2,55	- 1,05
Vodca Leonoff	37,5	37,8	36,85 ± 1,95	1,60
Cachaça Sagatiba	38	38,7	37,03 ± 2,23	4,31
Cachaça Ypioca	39	37,8	35,03 ± 0,82	7,32
Cachaça Minha Deusa	40	40,1	38,29 ± 3,12	4,51

M.R = determinações com o picnômetro, M.P = Sistema Proposto, %Erro = Erro relativo do método proposto.

Analisando os dados da Tabela 4.7 observa-se que a diferença entre os valores determinados pelo método proposto e pelo método de referência é maior para as amostras de cachaça do que para as amostras de vodca. As amostras de cachaça possuem como parte de sua composição o chamado coeficiente de congêneres^d que é regulamentado pela instrução normativa Nº 13, de 29 de junho de 2005. Nesse coeficiente de congêneres são incluídos: acidez volátil (expressa em teor de ácido acético), aldeídos, ésteres totais, álcoois superiores, furfural e hidroximetilfurfural. A soma total dessas substâncias deve compreender a faixa entre 200 e 650 mg por 100 mL de etanol anidro.

A participação destas substâncias pode não ser suficiente para causar uma grande alteração na viscosidade, como visto no procedimento com o picnômetro, entretanto pode alterar o índice de refração gerando uma maior variação na magnitude do efeito *Schlieren* para as amostras de cachaça do que nas amostras de vodca. Uma alternativa para eliminar esses elementos que causam alteração na determinação tanto pelo método de referência como pelo método proposto seria destilar previamente as amostras, porém seguir essa estratégia eliminaria a vantagem de trabalhar com amostras *in natura*.

Visando determinar a exatidão do procedimento proposto foi aplicado o teste *t* pareado para cinco graus de liberdade e nível de confiança de 95%, obtendo-se o valor calculado de 0,40. Tendo em vista que o valor tabelado é 2,78 [41], conclui-se que não há diferença significativa entre os resultados obtidos empregando os dois métodos.

^d O Coeficiente de Congêneres (componentes voláteis "não álcool", ou substâncias voláteis "não álcool", ou componentes secundários "não álcool", ou impurezas voláteis "não álcool").

5 Conclusões

A determinação fotométrica de teor de etanol em bebidas destiladas explorando o efeito *Schlieren*, sem uso de reagentes, demonstrou ser viável para a análise de destilados puros. Em bebidas destiladas com incrementos como açúcar, coeficiente de congêneres e cromóforos, o método proposto pode apresentar resultados que tendem a se distanciar do obtido com o método de referência. Contudo, o método desenvolvido é viável para bebidas destiladas *in natura*, sem agentes cromóforos, e pode ser implementado com equipamento de baixo custo apresentando conformidade com as diretrizes da química verde.

Portanto, podemos afirmar que o método proposto é amigável do ponto de vista ambiental, pois não gera efluente tóxico. Além disso, o etanol pode ser facilmente recuperado por destilação, resultando como efluente água limpa. A alta frequência de amostragem é também uma vantagem em comparação com outros procedimentos para determinação de etanol em bebidas destiladas.

Referências

- 1 PINHEIRO, P. C.; LEAL, M. C.; ARAÚJO, D. A., "Origem, produção e composição química da cachaça". Química Nova na Escola, v.18, p. 3-8, 2003.
- 2 BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V., "Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre". Scientia Agricola, v. 57, p. 623-627, 2000.
- 3 PORCHAT, E. (1956), "Informações históricas sobre São Paulo no século de sua fundação". São Paulo, Iluminuras, p. 139-143, 1993.
- 4 CASTRO, E. "A Expedição de Martim Affonso de Sousa". F. Briguiet & Cia, p 54-60, 1932.
- 5 MARTINS, J. "Um pouco de história". Disponível em: <<http://www.ibraccachacas.org/index.php/o-ibrac/historico>>. Acesso em 11 de set. 2014.
- 6 LEAL, M. C.; ARAÚJO, D. A.; PINHEIRO, P. C., "Alcoolismo e educação química". Química Nova na Escola, v. 34 n. 2: p. 58-66, 2012.
- 7 ABRABE. "Categorias". Disponível em:< <http://www.abrabe.org.br/categorias/>>. Acesso em 23 de set. 2014.
- 8 BRASIL, Portal. "Cachaça é Reconhecida como Produto brasileiro pelos EUA". Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/governo/2013/03/cachaca-e-reconhecida-como-produto-brasileiro-pelos-eua>>. Acesso em 29 de out. 2014.
- 9 CAS. "Registry Number". Disponível em: <http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpviews/index.cfm?action=testarticle.properties&cas_number=64-17-5#3>. Acesso em 01 de out. 2014.
- 10 VALSECHI, O., "O processo melle-boinot de fermentação na sociedade de usinas de açúcar brasileira, de Piracicaba". Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz n. 1, p.139-157, 1944.
- 11 BNDES; CGEE, "Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável", Departamento de divulgação do BNDES, Rio de Janeiro, Editora S. Rio, 2008.
- 12 YARITA, T.; NAKAKIMAB, R.; OTSUKAC, S.; IHARAA, T.; TAKATSUA, A.; SHIBUKAWAB, M., "Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as mobile phase". Journal Chromatography A, v. 976 n.1-2, p. 387-91, 2002.
- 13 MEI-LING, W.; JIH-TERNG, W.; YOUK-MENG, C., "A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography". Journal of Food and Drug Analysis, v. 11, n. 2, p.133-140, 2002.
- 14 BARBOZA, F. D.; POPPI, R. J., "Determination of alcohol content in beverages using short wave near-infrared spectroscopy and temperature correction by transfer calibration procedures". Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 377, n. 4, p. 695-701, 2003.

- 15 LVOVAA, L.; PAOLESSE, R.; NATALE, C.; D'AMICO, A., "Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based electronic tongue". *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 118, n. 1-2, p. 439–447, 2006.
- 16 SADECKA, J.; POLONSKY, J., "Electrophoretic methods in the analysis of beverages". *Journal Chromatography A*, v. 880, n. 1-2, p. 243-279, 2000.
- 17 A. O. A. C., "Official method 942.06 - Alcohol by volume in distilled liquors pycnometer method", Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 2000.
- 18 PINYOU, P.; YOUNGVISES, N.; JAKMUNE, J., "Flow injection colorimetric method using acidic acetic nitrate as reagent for determination of ethanol". *Talanta*, v. 84, n.3, p. 745-751, 2011.
- 19 COMITRE, A. D.; REIS, B. F., "Automatic multicommutated flow system for ethanol determination in alcoholic beverages by spectrophotometry". *Laboratory Robotics and Automation*, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2000.
- 20 MATAIX, E.; CASTRO, L. M. D., "Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection". *Talanta*, v. 51 n. 3, p. 489-496, 2000.
- 21 CETESB, "Ficha de informação de produto químico - Dicromato de potássio". Disponível em:
<http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=DICROMATO%20DE%20POT%20C1SSIO>. Acessado 20 de out. 2014.
- 22 SKEGGS, L. T. J., "An automatic method for colorimetric analysis". *American Journal of Clinical Pathology*, v. 28, n. 3, p. 311-22, 1957.
- 23 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H., "Flow injection analysis", New York, Wiley, 1988.
- 24 KARLBERG, B.; PACEY, G. E., "Flow injection analysis: A practical guide". Elsevier Science, 1989.
- 25 ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G., "Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach". *Analytica Chimica Acta*, v. 310, n. 3, p. 447-452, 1995.
- 26 YOZA, N.; MIYAJI, T.; HIRAI, Y.; OHASHI, S., "Determination of complexing abilities of ligands for metal ions by flow injection analysis and high-performance liquid chromatography: I. Principle of the substitution reaction method". *Journal Chromatography A*, v. 283, p. 89-98, 1984.
- 27 BETTERIDG, D.; CHENG, W. C.; DAGLESS, E. L.; DAVID, P.; GOAD, T. G.; DEANS, D. R.; NEWTON, D. A.; PIERCE, T. B., "A highly sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuous-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at the parts per 10⁹ and a new method of refractometric determinations". *Analyst*, v. 108, n. 1282, p. 1-16. 1983.
- 28 NÓBREGA, J. A.; ROCHA, F. R. P., "Ionic strength effect on the rate of reduction of hexacyanoferrate(III) by ascorbic acid: A flow injection kinetic experiment". *Journal of Chemical Education*, v. 74, n. 5, p. 560, 1997.

- 29 RIOS, A.; CASTRO, D. L.; VALCARCEL, M., "Determination of reaction stoichiometries by flow injection analysis: A laboratory exercise". *J. Chem. Education*, v. 63, n. 6, p. 552, 1986.
- 30 REIS, B. F.; BERGAMIN, F. H., "Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo". *Química Nova*, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.
- 31 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; MOSBAEK, H.; KRUG, F. J., "Pumping pressure and reagent consumption in flow injection analysis. Comments". *Analytical Chemistry*, v. 49, n. 12, p. 1858-1861, 1977.
- 32 OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G., "Multicommutation in flow analysis. Part 4. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants". *Analytica Chimica Acta*, v. 332, n.2-3, p. 173-178, 1996.
- 33 LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. S.; REIS, B. F.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G., "Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities". *Analytica Chimica Acta*, v. 466, n. 1, p. 125-132, 2002.
- 34 MIRÓ, M.; CLADERA, A.; ESTELA, J. M.; CERDA, V., "Dual wetting-film multi-syringe flow injection analysis extraction: application to the simultaneous determination of nitrophenols". *Analytica Chimica Acta*, v. 438, n. 1-2, p. 103-116, 2001.
- 35 LOBINSKI, R.; MARCZENKO, Z., "Recent advances in ultraviolet-visible spectrophotometry". *Analytical Chemistry*, v. 23, n. 1-2, p. 55-111, 1992.
- 36 DASGUPTA, P. K; BELLAMY, H. S.; LIU, H.; LOPEZ, J. L.; LOREE, E. L.; MORRIS, K.; PETERSEN, K.; MIR, K. A., "Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors". *Talanta*, v. 40, n. 1, p. 53-74, 1993.
- 37 I. E. E. E., "Esquema do LED". Disponível em: <<http://spectrum.ieee.org/image/520290>>. Acessado em 10 de nov. 2014.
- 38 FLASCHKA, H.; MCKEITHAN, C.; BARNES, R., "Light emitting diodes and phototransistors in photometric modules". *Analytical Letters*, v. 6, n. 7, p. 585-594, 1973.
- 39 DIAS, T. R.; BRASIL, M. A. S.; FERES, M. A.; REIS, B. F., "A flow cell with a new design to improve the utilization of the radiation emitted by LED and employed as a radiation source for photometric detection". *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 198 p. 448-454, 2014.
- 40 BOTEV, I., "A new conception of Bouguer-Lambert-Beer's law". *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, v. 297, n. 5, p. 419, 1979.
- 41 SKOOG, D. A; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R., "Fundamentos de Química Analítica". 8ª ed., São Paulo, Ed. Thomson Learning, 2006.
- 42 REIS, B. F., BERGAMIN, F. H.; ZAGATTO, E. A. G. & KRUG, F. J., "Merging zones in flow injection analysis: Part 3. Spectrophotometric determination of aluminium in plant and soil materials with sequential addition of pulsed reagents". *Analytica Chimica Acta*, v. 107, p. 309-317, 1979.

- 43 COMPANY, H., "Solenoid operated micro-pumps". Disponível em: <[http://www.biochemfluidics.com/Products/micro-pumps.asp# operation](http://www.biochemfluidics.com/Products/micro-pumps.asp#operation). > Acessado em 2 de ago. 2014.
- 44 ROBERT, H., "Micrographia". 1667; Disponível em: <<http://digicoll.library.wisc.edu/cgibin/HistSciTech/HistSciTechidx?type=goto&id=HistSciTech.HookeMicro&size=M&submit=Go+to+page&page=1>. > Acessado em 04 de set. 2014.
- 45 RIENITZ, J., "Schlieren Experiment 300 Years Ago". Nature, v. 254, p. 293-295, 1975.
- 46 ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z.; JACINTHO, A. O.; MATTOS, I. L., "Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry". Analytica Chimica Acta, v. 234, p. 153-160, 1990.
- 47 KRUG, F. J.; BERGAMIN, F. H.; ZAGATTO, E. A. G.; JOGENSEN, S. S., "Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry". Analyst, v. 102, n.1216, p. 503-508, 1977.
- 48 BETTERIDGE, D.; DAGLESS, E.L.; FIELDS, B.; GRAVES, N.F., "A highly sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuous-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at the parts per 10^9 level and a new method of refractometric determinations". Analyst, v. 103, n. 1230, p.897-908, 1978.
- 49 ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; MARTINELLI, M.; KRUG, F. J.; BERGAMIN, F. H.; GINE, M. F., "Confluent streams in flow-injection analysis". Analytica Chimica Acta, v. 198, p. 153-163, 1987.
- 50 BERGAMIN, F. H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G., "New device for improving sensitivity and stabilation in flow-injection analysis". ANALYTICA CHIMICA ACTA, v. 97, n. 2, p. 427-431, 1978.
- 51 ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H., "Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (recomendações - IUPAC 1994)". Química Nova, v. 22, n. 1, p. 143-146, 1999.
- 52 SPINKS, T. L.; PACEY, G. E.; FÁBIAN I., "Confluent mixing efficiency in flow-injection systems". Analytica Chimica Acta, v. 234, n. 1-2, p. 209-213, 1991.
- 53 ROCHA, R. P. F.; NÓBREGA, J. A., "Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo". Química Nova, v. 19, n. 6, p. 636-640, 1996.
- 54 TYSON, J. F.; MARSDEN, A. B., "Factors affecting the detection limit of a flow-injection spectrophotometric procedure". Analytica Chimica Acta, v. 214, n.1-2, p. 447-453, 1988.
- 55 ROCHA, R. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F., "Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo". Química Nova, v. 23, n. 1, p. 119-200, 2000.
- 56 SILFWERBRANDLINDH, C.; NORD, L.; DANIELSON, L. G.; INGMAN, F., "The analysis of aqueous solutions with ethanol-soluble reagents in a flow injection system". Analytica Chimica Acta, v. 160, p. 11-19, 1984.

- 57 SANTOS, S. R. B.; ARAÚJO, M. C. U. & BARBOSA, R. A., "An automated FIA system to determine alcoholic grade in beverages based on Schlieren effect measurements using an LED-photocolorimeter". *Analyst*, v. 127, p. 324-327, 2002.
- 58 ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C., "Green chemistry: Theory and practice", Ed. Oxford University Press, 1998.
- 59 LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C., "Green chemistry - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa". *Química Nova*, v. 26, n. 1, 2003.
- 60 ARDUINO., "Arduino Due". Disponível em: <<http://www.arduino.cc/en/Main/ArduinoBoardDue>>. Acesso em 13 de dez. 2014.
- 61 TOSHIBA, "ULN2803,04APG/AFWG". Disponível em: <file:///C:/Users/Net/Downloads/ULN2803APG_datashet_en_20121126.pdf>. Acesso em 14 de nov. 2014.
- 62 ABREU, V. L. R. G.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C., "An automated single interface flow sytem for the spectrophotometric determination of ethanol in beverages based on schlieren effect". *Food Analytical Methods*, v. 5, n. 4, p. 867-873, 2012.
- 63 ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; TOWNSHEND, A.; WORFOLD, P. L., "Flow Analysis with Spectrophotometry and Luminometric Detection". Elsevier, p. 95-145, 2012.
- 64 HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J., "Fundamentos de física", São Paulo, Ed. LTC, p. 77-78, 2007.
- 65 BASTOS, K., "Lei de Snell-Descartes". Disponível em: <<http://fisikanarede.blogspot.com.br/2012/10/refracao-da-luz-indice-de-refracao.html>>. Acesso em 15 de nov. 2014.
- 66 FERRARO, N. G., "Refração-Lei de Snell-Descartes". Disponível em: <http://osfundamentosdafisica.blogspot.com.br/2012/09/cursos-do-blog-termologia-optica-e-ondas_25.html>. Acesso em 15 nov. 2014.
- 67 KRUG, F. J.; REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; FERREIRA, J. R.; JACINTHO, A. O., "Zone trapping in flow-injection analysis – spectrophotometric determination of low-levels of ammonium ion in natural-waters". *Analytica Chimica Acta*, v. 151, n. 1, p. 39-48, 1983.
- 68 Corporation, B., "OPT301". Disponível em: <<http://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/view/56813/BURR-BROWN/OPT301.html>>. Acesso em 08 de ago. 2014.