



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

Dissertação de Mestrado

Um estudo para titulação quimiluminescente em
fluxo-batelada com detecção por imagem digital

Flaviano Carvalho Leite

João Pessoa, PB - Brasil

Agosto/2016



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

Dissertação de Mestrado

**Um estudo para titulação quimiluminescente em
fluxo-batelada com detecção por imagem digital**

Flaviano Carvalho Leite*

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

Orientador: Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva

*** Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

João Pessoa, PB - Brasil

Agosto/2016

L533u Leite, Flaviano Carvalho.
Um estudo para titulação quimiluminescente em fluxo-
batelada com detecção por imagem digital / Flaviano Carvalho
Leite.- João Pessoa, 2016.
78f. : il.
Orientador: Edvan Cirino da Silva
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Química analítica. 2. Quimiluminescência. 3. Titulação.
4. Imagem digital. 5. Fluxo-batelada.

UFPB/BC

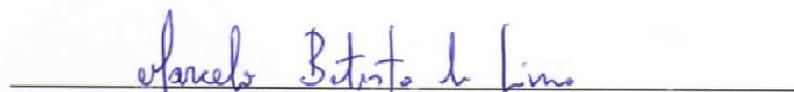
CDU: 543(043)

Um estudo para titulação Quimiluminescente em Fluxo-Batelada com detecção por Imagem Digital.

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Flaviano Carvalho Leite e aprovada pela banca examinadora em 29 de agosto de 2016.



Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Marcelo Batista de Lima
Examinador



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcante de Lima
Examinador

*Dedico esse trabalho ao meu
Pai João e minha mãe Maria que me trouxeram
a vida e com muito carinho cuidaram-me.*

Agradecimentos

- Inicialmente, agradeço a Deus por existir nessa vida.
- A toda minha família, pela constante presença, carinho e apoio.
- A minha esposa Liana pela honra de viver ao seu lado, pela força e apoio.
- Ao Professor Edvan Cirino da Silva pela orientação, dedicação, confiança em minha pessoa, contribuições acadêmicas, científicas, sugestões e seus ensinamentos.
- Aos Professores Luciano Farias, Ricardo Alexandre e Marcelo Batista, por aceitar participar da banca Pré-Defesa e Defesa de dissertação e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo pelo acolhimento, por ceder as instalações do LAQA, pela oportunidade de trabalho, pelo aprendizado profissional e pelos momentos de descontração.
- A todos os professores que contribuíram com meu aprendizado desde a graduação até o presente momento.
- A Wellington da Silva Lyra pelo conhecimento e contribuição nesse trabalho.
- Aos amigos Renato Alan, Stéfani lury, Pedro Lemos, pelas contribuições na parte experimental, científicas e pela amizade.
- Aos amigos do LAQA, Fátima Sanches, Sofacles, Aline Santos, Cleison Eloi, Lucas Alfredo, Kely, Daniel Jackson, Taynna Kevla, Marcelo Silva, Jonathan Pádua, Amália, Ivson, Maurício Monteiro, Willy Castro, Welma Vilar, Urijatan, Maria Ivanda, Adenilton Camilo, Dayvison Ribeiro, Karla Daniele, Mayara, Janete Clair, Hebert, Francisco Cunha, Julys Pablo, Eduardo Lima, Osmundo, Inakã Barreto, Márcio Rennan, por toda amizade e momentos de descontração. Pela ajuda com empréstimo de alguns utensílios de trabalho. A todos os demais membros do LAQA, pela amizade, convivência e bons momentos.
- Ao Programa de Pós-Graduação do DQ/CCEN/UFPB.
- A Universidade Federal da Paraíba.
- Aos funcionários do DQ/CCEN/UFPB.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), pela bolsa concedida para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Sumário

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Siglas e Abreviaturas	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
Capítulo 1	1
1. Introdução.....	1
1.1 Caracterização da problemática e a proposta de solução	2
1.2 Objetivo(s).....	4
1.2.1 Geral	4
1.2.2 Específicos	4
1.3 Quimiluminescência em química analítica.....	5
1.3.2 Uso do luminol, intensificadores do sinal quimiluminescente e mecanismo.....	7
1.3.1 Mecanismo envolvendo íons halogenetos na reação do luminol/H ₂ O ₂	11
1.3.3 Fundamentos das titulações quimiluminescentes.....	12
1.4 Imagem Digital	16
1.4.1 Modelo de cor RGB.....	17
1.5 A resposta analítica em termos da norma $ v $	19
1.5.1 Uso de imagem digital em quimiluminescência.....	19
1.6 Sistemas de análise em fluxo	23
1.6.1 O Analisador em Fluxo-Batelada	25
Capítulo 2	27
2. Material e Métodos	27
2.1 Reagentes, soluções e amostras	28
2.2 Materiais e equipamentos	29
2.2.1 Sistema titulométrico quimiluminescente em fluxo-batelada.....	29
2.3 Método de referência	34
2.4 Planejamento analítico quimiluminescente.....	35
2.4.1 O Sistema químico QL.....	35
2.4.2 O Sistema fluxo-batelada	35
2.5 Metodologia analítica	36
2.5.1 Titulação QL-BID – princípios e sinal quimiluminescente observado	36

2.6 Procedimento analítico	37
2.7 Validação da titulação quimiluminescente proposta	43
Capítulo 3	48
3. Resultados e Discussão	48
3.1 Estudo da vazão	49
3.2 Investigação do progresso do sinal quimiluminescente	50
3.3 Perfil da curva de titulação quimiluminescente proposta	51
3.4 Titulação QL-BID aplicada à determinação de Fe ²⁺ em sulfato ferroso.....	53
Capítulo 4	56
4. Conclusão	56
4.1 Conclusão	57
4.2 Propostas de trabalhos em continuação.....	58
Referências	59

Lista de Figuras

- Figura 1.1 – Publicações analíticas da reação quimiluminescente divididas pelas técnicas utilizadas desde 1945 até julho de 2016. **3**
- Figura 1.2 – Reações quimiluminescentes direta (i) e indireta (ii) – (A) precursor quimiluminescente e (B) Oxidante. Adaptado de: Garcia, et al., (2001). **6**
- Figura 1.3 – Mecanismo proposto por Albertin e colaboradores (1998) para a reação QL do luminol\H₂O₂ em meio alcalino e na presença do íon de um metal de transição (Mⁿ⁺). **9**
- Figura 1.4 – Diagrama de energia dos estados do endoperóxido (a) 3-aminofalato em (c), relacionando a energia do sistema com o rompimento da ligação dos átomos de oxigênio no intermediário eletronicamente excitado (b) adaptado de: (FERREIRA e ROSSI, 2002). . **10**
- Figura 1.5 – Mecanismo do sistema quimiluminescente M-Luminol-H₂O₂-Br⁻. Adaptado de: CHANG e PATTERSON, (1980). **13**
- Figura 1.6 – Perfis teoricamente esperados para as curvas de titulação QL - I_{QL}(a): Intensidade quimiluminescente gerada pelo analito, I_{QL}(t): Intensidade quimiluminescente gerada pelo titulante e I_{QL}(p): Intensidade quimiluminescente gerada pelo produto. **16**
- Figura 1.7– Representação geométrica do modelo RGB. **18**
- Figura 1.8 – Esquema de classificação das técnicas de análise em fluxo de acordo com a IUPAC. Inclusão do FBA na classificação dos métodos de análise em fluxo (IUPAC). Adaptado de: DINIZ, Paulo H.G.D. et al., (2012). **24**
- Figura 2.1 – Fotografia da disposição física dos componentes do sistema de titulação QL-BID (a) bomba peristáltica, (b) microcomputador, (c) válvulas solenoides, (d) acionador de válvulas com interface arduino, (e) caixa para isolamento da luz externa, (f) *webcam*, (g) câmara de mistura e (h) agitador magnético. **30**
- Figura 2.2– Interface do programa de controle do sistema fluxo-batelada quimiluminescente. **31**
- Figura 2.3 – Imagem de uma válvula solenoide de três vias utilizada no sistema automático titulométrico QL proposto. **32**
- Figura 2.4 – Diagrama esquemático do acionador de válvulas solenoides. Com representação dos pinos P0 – P6 de saída da interface Arduino e GND-P8 é o aterramento do circuito. Adaptado da dissertação de: ANDRADE, R. A. N. (2011). **33**
- Figura 2.5 – *Webcam* usada como fotodetector do sistema QL-BID proposto. **33**
- Figura 2.6 – Ilustração das dimensões da câmara de mistura com 7 canais para entrada de fluidos e 1 canal para descarte. (E) entrada e (D) saída de fluido. **34**
- Figura 2.7 – Diagrama do sistema fluxo-batelada para titulação QL-BID em modo de espera. (—) Linhas de fluxo vazia ou estacionada e (—) preenchida em fluxo; (- - -) Linha de fluxo alternativa; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura. **38**
- Figura 2.8 – Etapa de análise 2-i do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba

peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (C1) canal da amostra.....	39
Figura 2.9 – Etapa de análise 2-ii do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (C2) canal do titulante.....	39
Figura 2.10 – Etapa de análise 2-iii do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (C3) canal da água.....	40
Figura 2.11 – Etapa de análise 2-iv do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (AM) agitador magnético; (WC) webcam; (BM) barra magnética; (C4) canal do luminol + peróxido.....	41
Figura 2.12 – Etapa de análise 2-v do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (C5) canal de retirada dos resíduos.....	41
Figura 2.13 – Diagrama de tempos do analisador em fluxo para todas medidas.....	42
Figura 3.1 – Curvas do estudo da vazão para os canais de bombeamento de cada válvula solenoide.....	49
Figura 3.2 – Progresso do sinal QL em termos de (a) imagens digitais capturadas no sistema fluxo-batelada e (b) variação temporal do sinal nos canais R, G e B.....	50
Figura 3.3 – (a) Imagens digitais adquiridas durante uma titulação QL-BID e (b) Perfil da curva de titulação obtida a partir de medidas no ápice do sinal QL (Figura 3.2).....	52

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Resultados das análises, em triplicata, de dez amostras de xarope sulfato ferroso usando o método proposto (Titulação QL-BID) e o de referência..... 54

Tabela 3.2 – Resultados do teste de recuperação para dez amostras (não fortificadas e fortificadas), cujos valores são expressos em termos da concentração (n=3)..... 55

Lista de Siglas e Abreviaturas

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

QL – Quimiluminescência

QL-BID – Quimiluminescência baseada em imagem digital

CMYK – *Ciano, Magenta, Yellow and Black* (ciano, magenta, amarelo e preto)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

FBA – *Flow-batch analyzer* (analisador em fluxo-batelada)

FIA – *Flow injection analyzer* (analisador por injeção em fluxo)

HSL – *Hue, Saturation and Luminosity* (matiz, saturação e luminosidade)

HSV – *Hue, Saturation and Value* (matiz, saturação e valor)

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

MFA – *Multicommutation in flow analyser* (analisador em fluxo multicomutado)

MSFA – *Monosegmented flow analyser* (analisador em fluxo monosegmentado)

RBP – *Retinol Binding Protein* (Proteínas ligadas ao retinol)

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

SFA – *Segmented flow analyser* (analisador em fluxo segmentado)

SIA – *Sequential injection analyser* (analisador por injeção sequencial)

Resumo

Um estudo para titulação quimiluminescente em fluxo-batelada com detecção por imagem digital

Autor: Flaviano Carvalho Leite

Orientador: Edvan Cirino da Silva

A escassez de métodos quimiluminescentes (QL) baseados em imagem digital e analisadores em fluxo é uma motivação para novos estudos, especialmente quando não é encontrado na literatura nenhum artigo envolvendo titulação QL com imagem digital. Neste trabalho, desenvolveu-se o estudo de uma nova metodologia para titulação quimiluminescente baseada em imagem digital (QL-BID) cujo potencial analítico foi avaliado na determinação de Fe^{2+} em xarope de sulfato ferroso usando um analisador automático em fluxo-batelada. Denominada titulação QL-BID, esse método utiliza o próprio analito (Fe^{2+}) como catalisador na reação de oxidação do luminol/ H_2O_2 em meio básico na presença do intensificador brometo. Após a adição de cada incremento do titulante (KMnO_4) à amostra em meio ácido, parte do Fe^{2+} é convertido para Fe^{3+} e o remanescente contribui para o sinal QL que decresce linearmente com a concentração do Fe^{2+} . Quando todo Fe^{2+} for convertido para Fe^{3+} , o ponto final da titulação é atingido e o sinal QL permanece constante ao nível da radiação de fundo com a adição do titulante em excesso. A aquisição das imagens foi realizada por uma *webcam* acoplada sobre a câmara de mistura do sistema fluxo-batelada. Da imagem obtida antes e após cada adição do titulante foram extraídos os valores de R, G e B usados para calcular a resposta analítica, a qual é definida pela norma de um vetor no espaço tridimensional RGB. O valor da norma varia linearmente com a concentração do analito, sendo utilizada na construção da curva de titulação em que o ponto final é obtido pela extrapolação e interseção dos dois segmentos de reta. Os resultados das titulações de 10 (dez) amostras de xarope foram comparados com os obtidos pelo método espectrofotométrico baseado em curva analítica. Aplicando-se o teste-*t* emparelhado, não se observa nenhuma diferença sistemática, estatisticamente significativa, entre ambos os resultados ao nível de 95% de confiança. O sistema QL-BID apresentou uma frequência analítica de 18 titulações por hora e consumiu 0,2 mL de luminol e 2,4 mL de amostra por titulação ou análise. Assim, seu desempenho pode ser melhorado quando implementada uma otimização.

Palavras-chave: Quimiluminescência, titulação, imagem digital, fluxo-batelada

Abstract

A study for chemiluminescent titration in flow-batch with detection by digital image

Author: Flaviano Carvalho Leite

Supervisor: Edvan Cirino da Silva

The scarcity of chemiluminescent (CL) methods based on digital image and flow analyzers is motivation for novel studies, especially when it is not found in literature any paper involving CL titration with digital image. In this work, it is developed the study of a novel methodology for digital image-based quimiluminescent (DIB-CL) titration whose analytical potential is evaluated in determination of Fe^{2+} in ferrous sulfate syrupe using a flow-batch automatic analyzer. Termed DIB-CL titration, this method employs the own analyte (Fe^{2+}) as catalyst of the oxidation reaction of luminol/ H_2O_2 in alkaline medium and presence of bromide enhancement. After a increment of titrant (KMnO_4) to be added to sample in acid medium, a part of Fe^{2+} is oxidized to Fe^{3+} and remaining contributes to generate the CL signal that decreases linearly with the Fe^{2+} concentration. When the oxidation of Fe^{2+} is completed, the endpoint of titration is attained and the CL signal remained constant at the level of background radiation with the addition of titrant in excess. Images acquisition is performed by using a webcam coupled to the mixing chamber of flow-batch system. From image obtained before and after each addition of titrant were extracted the R, G, and B values used in order to calculate the analytical reponse, which is defined by vector norm in RGB tri-dimensional space. This norm values are linearly related to the analyte concentration, being employed for building of titration curve where the end point is found by intersection of the two extrapolated straight segments. By applying the paired *t*-test, titration results of ten samples of syrupe were compared with those obtained by a espectrophotometric method based on analytical curve. No systematic statistic difference has been observed between the both results at the 95% confidence level. DIB-CL system presented a analytical frequency of 18 titrations h^{-1} and consumes 0.2 mL of luminol and 2.4 mL of sample per titration or analysis. Thus, its performance can be improved by implementing a optimization.

Keywords: Chemiluminescence, titration, digital image, flow-batch

Capítulo 1

Introdução

1.1 Caracterização da problemática e a proposta de solução

A quimiluminescência (QL) tem despertado, nas últimas décadas, um interesse cada vez maior dos químicos analíticos como técnica espectroanalítica promissora para o desenvolvimento de métodos quantitativos (LARA, F. J. et al., 2016). Essa motivação pode ser imputada às suas características vantajosas, quais sejam: ampla faixa linear de resposta, alta sensibilidade, baixos limites de detecção e instrumentação simples e de baixo custo (SKOOG, D. A. et al., 2009).

As aplicações analíticas da quimiluminescência têm penetrado em outras áreas, tais como, ambiental, medicina, biologia, farmacologia, dentre outras (BAEYENS, W.R.G. et al., 1998). Além disso, essa técnica pode ser usada para determinar vários tipos de analitos (inorgânicos, orgânicos, bioquímicos, etc) em níveis de traço, sendo a quimiluminescência muito usada para avaliar a qualidade da água, alimentos, suplementos e medicamentos (BOWIE, A. R. et al., 1996). Essa técnica têm sido também usada para o desenvolvimento de métodos sensíveis baseando-se na distribuição espacial da luz emitida a partir de uma amostra problema (RICH, E. S. et al., 1981).

A literatura reporta diversos reagentes quimiluminescentes apropriados para implementação de métodos de análise quantitativa, porém observa-se o uso predominante do luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona): SANTOS, R.M.S. et al. (1993). Esse fato pode ser atestado na revisão de FERREIRA e ROSSI (2002), na qual é destacado o crescimento exponencial (na década de 1990) do número de trabalhos envolvendo o uso do luminol. Desde então, o uso desse reagente tem sido impulsionado para a análise quantitativa envolvendo diversas aplicações analíticas (KHAN, P. et al, 2014).

A automatização de métodos baseados em reações quimiluminescentes foi, pioneiramente, realizada utilizando a análise por injeção em fluxo (FIA, *Flow Injection Analysis*), FERREIRA e ROSSI (2002). Não obstante o aumento da velocidade analítica e diminuição do consumo de reagentes e amostras, os sistemas FIA não apresentam flexibilidade para implementar diferentes procedimentos analíticos sem modificação de sua configuração física. Essa limitação pode ser superada pelo sistema em fluxo-batela (*flow-batch system*), conforme reportado por DINIZ, P. H. G. D. et al., (2012).

Apesar do uso crescente da quimiluminescência para fins analíticos e do emprego do luminol como seu reagente, a literatura reporta poucos trabalhos sobre métodos baseados em titulação como pode ser observado na **Figura 1.1**. O gráfico reflete o resultado do levantamento bibliográfico, realizado no banco de dados eletrônicos da WEB OF SCIENCE, tal como realizado por FERREIRA e ROSSI em 2002. Em ambas as pesquisas bibliográficas, não foi encontrado nenhum trabalho envolvendo titulação quimiluminescente e o uso de imagem digital, como sistema de detecção.

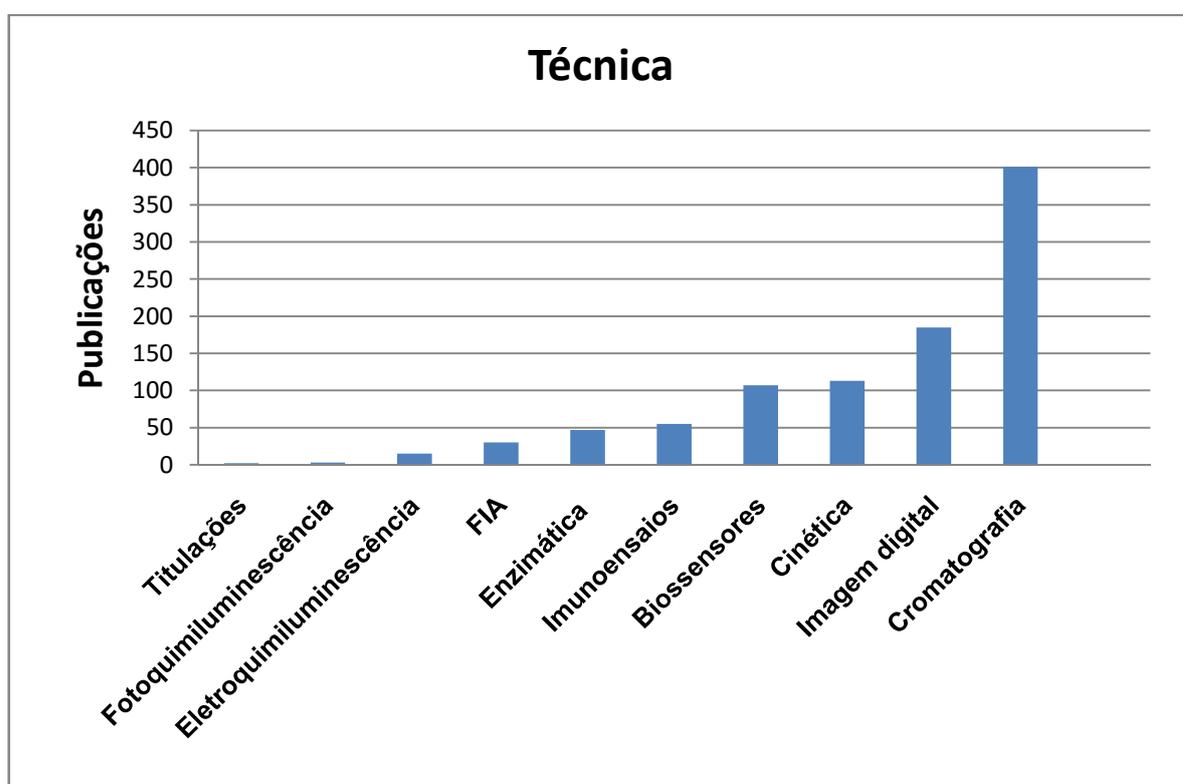


Figura 1.1 – Publicações analíticas da reação quimiluminescente divididas pelas técnicas utilizadas desde 1945 até julho de 2016.

No contexto da problemática acima, insere-se também a importância da titulação para determinações quimiluminescentes em virtude de suas vantagens comparadas à calibração, especialmente no tocante à exatidão. De fato, a titulação proporciona comumente um resultado melhor devido à especificidade que pode ser estabelecida na reação entre o analito e titulante (SKOOG, D. A. et al., 2009). Esse aspecto é particularmente interessante nas determinações quimiluminescentes, pois os instrumentos tipicamente usados não incorporam seletor de radiação. Assim, a medida do sinal QL do analito torna-se muito susceptível à interferência de radiação

envolvendo outra(s) espécie(s) concomitante(s) na matriz prejudicando a exatidão do método.

Diante dessa problemática propõe-se, neste trabalho, o uso combinado da quimiluminescência do luminol com a análise em fluxo-batelada para realização de um estudo objetivando o desenvolvimento de uma titulação QL-BID automatizada. Para avaliar o potencial do método proposto, elegeu-se inicialmente a determinação de Fe^{2+} em amostras de xarope de sulfato ferroso. Para esse propósito, foram estabelecidos os objetivos descritos na **Seção 1.2** apresentada a seguir.

1.2 Objetivo(s)

1.2.1 Geral

Desenvolver o estudo de um novo método de titulação quimiluminescente em fluxo-batelada baseado em imagem digital capturada com uma *webcam*.

1.2.2 Específicos

- Montar um sistema automático de análise em fluxo-batelada acoplado a uma *webcam* para realizar as titulações quimiluminescentes;
- Implementar um programa para controle do sistema e aquisição das imagens digitais;
- Relacionar as imagens com a concentração do analito Fe^{2+} na amostra (usando um modelo matemático baseado no sistema RGB) com o intuito de definir e testar a resposta analítica adotada para construção das curvas de titulação;
- Aplicar e avaliar o potencial analítico da titulação QL-BID em uma aplicação envolvendo a determinação de Fe^{2+} em amostras de xarope sulfato ferroso;

1.3 Quimiluminescência em química analítica

1.3.1 Fundamentos

Segundo DODEIGNE, C. et al. (2000), a luminescência é um termo de uso geral para designar a emissão de radiação eletromagnética (REM) por moléculas de um composto ou um material quando retornam de um estado eletrônico excitado para o fundamental. A seguir encontram-se citados diversos tipos de luminescência.

- ✓ Fotoluminescência (Fluorescência e Fosforescência);
- ✓ Radioluminescência;
- ✓ Triboluminescência;
- ✓ Termoluminescência;
- ✓ Eletroluminescência;
- ✓ Magnetoluminescência;
- ✓ Sonoluminescência;
- ✓ Bioluminescência;
- ✓ Quimiluminescência.

Quimiluminescência é um tipo de luminescência em que o fenômeno de emissão de REM origina-se de reações químicas não acompanhadas pela emissão de calor, as quais podem ocorrer em sistemas sólido, líquido ou gasoso. A radiação quimiluminescente (QL) abrange a faixa do espectro eletromagnético que se estende do ultravioleta ao infravermelho (ALBERTIN et al., 1998).

As reações QL podem ocorrer segundo dois mecanismos básicos: (i) reação direta e (ii) reação indireta, conforme esquematizado na **Figura 1.2**. No mecanismo direto (i) a REM é emitida diretamente pelo produto excitado P^* formado pela reação entre A e B na presença de um catalisador. Na reação indireta (ii), ocorre a transferência de energia do produto formado P^* para um acceptor Q que é levado para o estado eletronicamente excitado Q^* . Este, por sua vez, desativa para o estado fundamental Q, emitindo radiação quimiluminescente (GARCIA et al., 2001). A maioria das reações quimiluminescentes é relativamente mais complexas do que sugerido pelas modalidades descritas na **Figura 1.2**.

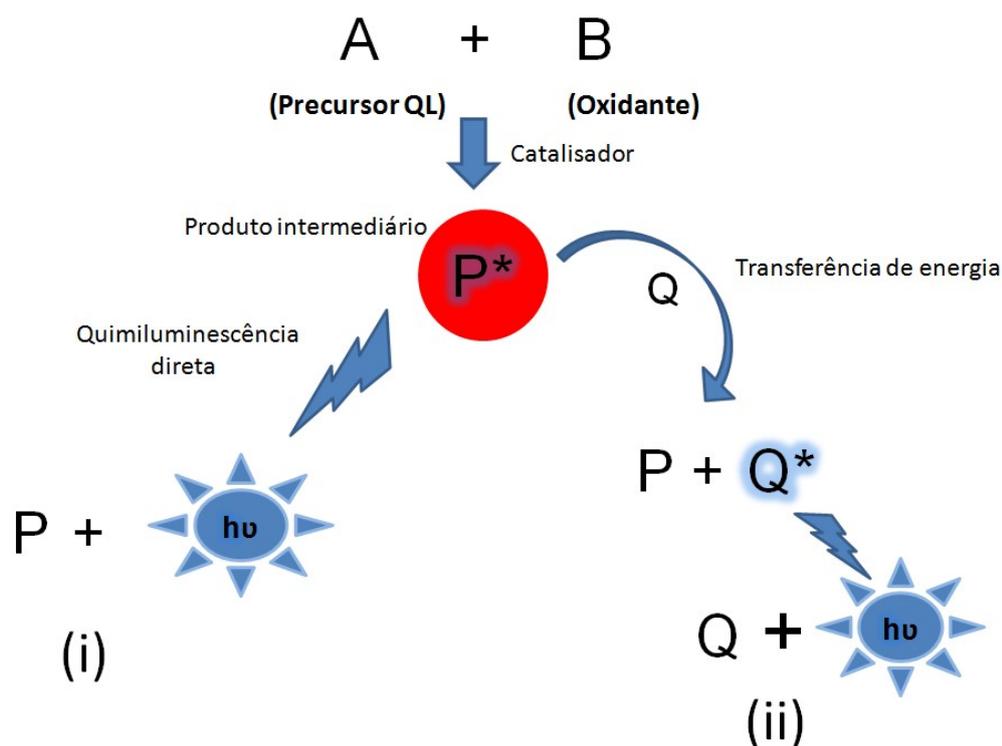


Figura 1.2 – Reações quimiluminescentes direta (i) e indireta (ii) – (A) precursor quimiluminescente e (B) Oxidante. Adaptado de: Garcia, et al., (2001).

A intensidade de radiação QL, I_{QL} (fótons emitidos por segundo), depende da eficiência quântica de quimiluminescência, Φ_{QL} (fótons emitidos por molécula que reagiu), e da velocidade da reação química (dC/dt). O termo Φ_{QL} é resultado do produto da eficiência quântica de excitação, Φ_{EX} (estado excitado por moléculas que reagiram) pela eficiência quântica de emissão, Φ_{EM} (fótons por moléculas levadas ao estado excitado). Essas relações podem ser representadas, matematicamente, pela **Equação (1.1)**. Em geral, os sistemas quimiluminescentes que apresentam valores de Φ_{QL} compreendidos entre 0,01 e 0,2 são os mais úteis em análises quantitativas (SKOOG, D. A. et al., 2009).

$$I_{QL} = \Phi_{QL} \cdot dC/dt = \Phi_{EX} \cdot \Phi_{EM} \cdot dC/dt \quad (1.1)$$

Em análises quimiluminescentes, diversos fatores experimentais influenciam o fenômeno e a magnitude do sinal (I_{QL}), entre os quais destacam-se (SKOOG, D. A. et al., 2009):

♦ *Concentração dos reagentes* - o sinal QL apresenta, geralmente, uma relação linear para uma ampla faixa de concentração do analito, podendo alcançar várias décadas ou ordens de magnitude;

♦ *pH do meio reacional* - o pH do meio reacional influencia significativamente na intensidade da emissão de luz em reações baseadas no sistema luminol/H₂O₂. Segundo a literatura (CHANG e PATTERSON, 1980), essas reações requerem um meio alcalino com pH usualmente na faixa de 10,1 a 11,1, para gerar o ânion peróxido responsável por oxidar a molécula do luminol;

♦ *Volume de amostra* - a quantidade de fótons emitidos no fenômeno depende também do volume de amostra usada para as medidas do sinal QL. Desde que a quantidade do luminol disponível seja estequiometricamente suficiente para reação, a intensidade é diretamente proporcional ao volume da amostra se os demais fatores forem mantidos constantes;

♦ *Velocidade de reação* - a reação pode se mostrar rápida ou lenta, dependendo do analito, tipo de molécula emissora e das condições em que essas reações ocorrem. Para reduzir o tempo das análises químicas, deve-se buscar a implementação de reações de cinética rápida;

♦ *Homogeneização* - a homogeneização dos componentes (reagentes, amostra, titulante, etc) devem ser reprodutíveis para todas as medidas do sinal QL.

A cor e a intensidade de radiação QL são também influenciadas pela velocidade de adição dos reagentes, ordem de entrada, estabilidade dos reagentes polaridade do solvente, temperatura e por outros processos físicos secundários.

Se todos os fatores mais relevantes forem controlados e mantidos constantes, a intensidade do sinal QL poderá ser relacionada linearmente com a concentração do analito proporcionando a base para análise quantitativa.

1.3.2 Uso do luminol, intensificadores do sinal quimiluminescente e mecanismo

O primeiro mecanismo de reação quimiluminescente a ser estudado com mais detalhes foi o da oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio em meio alcalino. Esse mecanismo foi proposto por ALBRECHT e colaboradores, em 1928, porém no

decorrer do século XX diversos autores propuseram outros caminhos mecanísticos para a oxidação do luminol. Todavia, ainda não foi reportado na literatura um mecanismo que compreenda os mesmos intermediários e etapas da reação baseada no sistema luminol/H₂O₂. Na última década, os aspectos termodinâmicos e cinéticos dessa reação ainda têm sido estudados com expansão para outros sistemas QL. (FERREIRA e ROSSI, 2002).

A proposta mecanística de ALBERTIN **Figura 1.3**, o luminol **(a)** em meio alcalino (**OH⁻**) forma a diazoquinona **(b)** na presença do catalisador redox **Mⁿ⁺**. A diazoquinona **(b)** reage com o ânion de H₂O₂ para formar o intermediário endoperóxido **(c)** até chegar na etapa mais importante da formação da molécula no estado eletronicamente excitado do 3-amino-ftalato em **(d)**. Na qual sofre o decaimento energético para a emissão da luminescência. A ocorrência dessa espécie obedece a certas condições do meio reacional, como pH, temperatura, concentração dos reagentes e composição do tampão. No mecanismo mostrado, o produto em **(e)** pode ser formado com luminescência pela desativação molecular (relaxação com emissão de radiação eletromagnética) da espécie eletronicamente excitada em **(d)** sem a luminescência devido a um processo não-radioativo, tais como, choques intermoleculares, transferências de energia ou conversão interna.

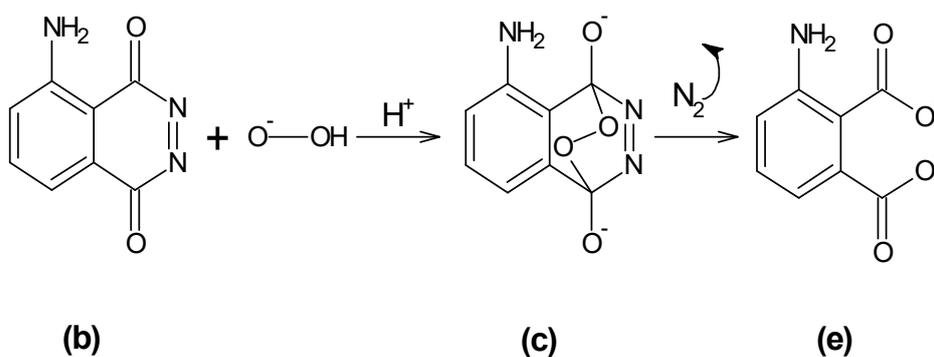
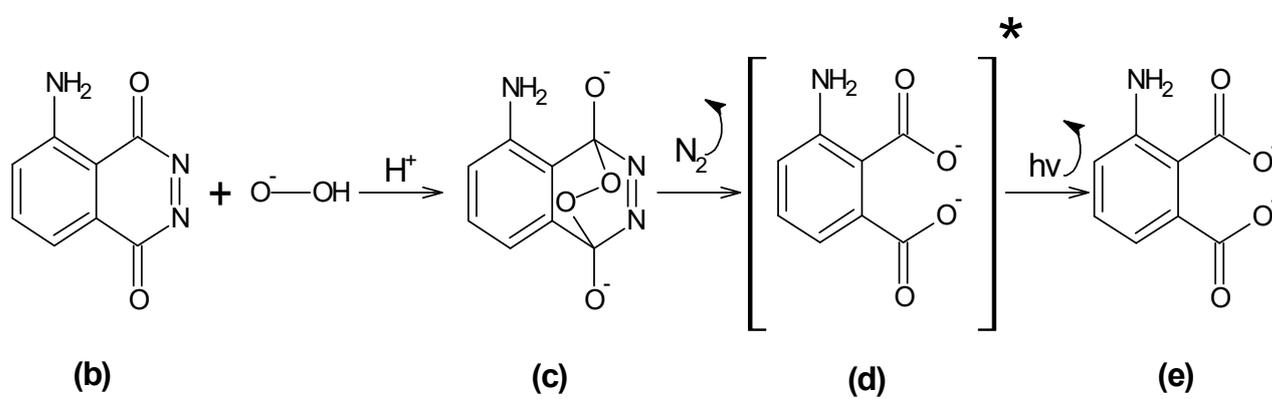
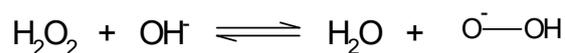
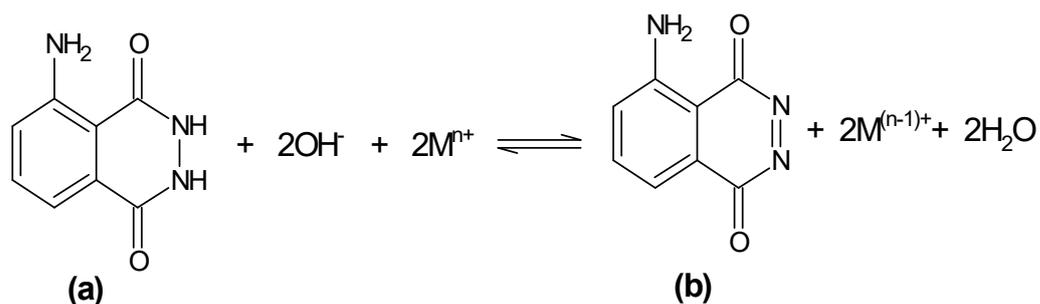


Figura 1.3 – Mecanismo proposto por Albertin e colaboradores (1998) para a reação QL do luminol/ H_2O_2 em meio alcalino e na presença do íon de um metal de transição (M^{n+}).

A oxidação do luminol com emissão de radiação eletromagnética está ligada à formação do produto no estado eletronicamente excitado (d), que pode ser formado mediante a decomposição do endo-peróxido (c). MICHL, J. 1977, explica a decomposição da espécie endo-peróxido (c), que acontece quando a ligação sigma entre os dois átomos de oxigênio na estrutura se rompe, com formação ou não do

produto excitado. Para ocorrência do produto excitado, provavelmente, não haveria tempo o suficiente para os elétrons se distribuírem entre os novos orbitais, mantendo o novo orbital LUMO ainda preenchido. Baseado nessa ideia, supõe-se que essas rotas de formação do produto excitado e não excitado pode alcançar, em algum instante, energias semelhantes. Nessa ocasião haveria um “cruzamento” entre esses caminhos, levando à formação do produto excitado, conforme ilustrado no diagrama da **Figura 1.4**.

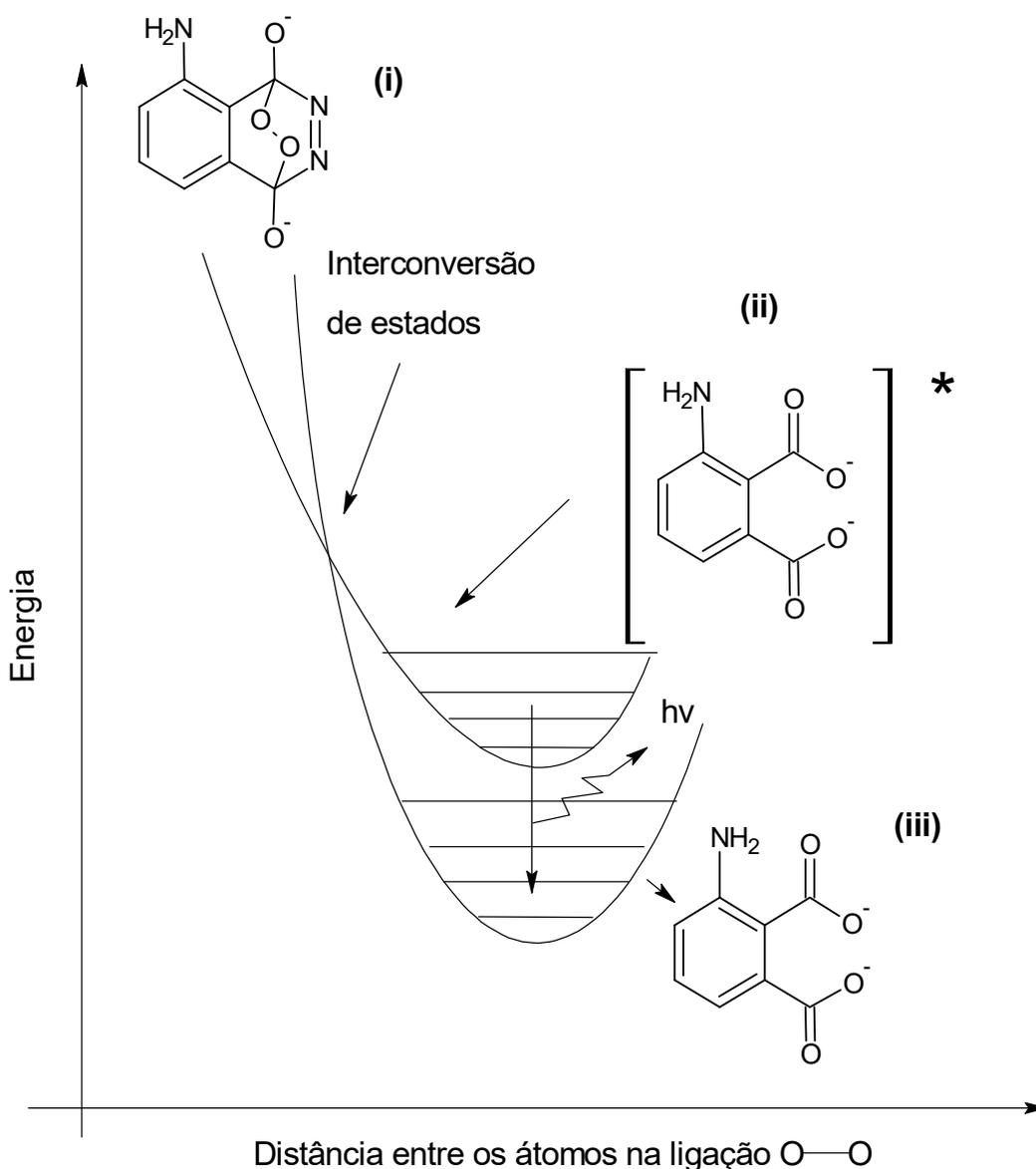


Figura 1.4 – Diagrama de energia dos estados do endoperóxido (a) 3-aminofalato em (c), relacionando a energia do sistema com o rompimento da ligação dos átomos de oxigênio no intermediário eletronicamente excitado (b) adaptado de: (FERREIRA e ROSSI, 2002).

Entre os reagentes quimiluminescentes mais estudados, o luminol é utilizado na maioria das aplicações analíticas (FERREIRA e ROSSI, 2002). O uso desse reagente é preponderante nas determinações de cátions de metais de transição, tais como Fe^{2+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ce^{4+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , entre outros (ROBARDS, et al 1992). Esses íons proporcionam uma expressiva ação catalítica contribuindo para aumentar a velocidade da reação para baixos níveis de concentrações desses cátions, assim como para elevar a sensibilidade das medidas.

No contexto da quimiluminescência, um reagente intensificador pode ser definido como uma espécie reagente que contribui para aumentar a magnitude do sinal QL. A literatura reporta o uso de Br^- , Cl^- , F^- e SO_4^{2-} , sendo o íon brometo o reagente que mais contribui para aumentar a intensidade do sinal (BAUSE, D.E. e PATTERSON, H. H., 1979). Esses autores observaram que as soluções concentradas de sais inorgânicos, em particular os íons halogenetos, podem causar um aumento da intensidade. Um teste mostrou que a concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de uma solução de Br^- origina um aumento de oito vezes na intensidade do sinal para o Cr^{3+} , em relação ao sinal sem a presença do brometo. Nesses estudos observou-se que o sinal QL manteve-se proporcional à concentração do Cr^{3+} , quando a mesma quantidade de Br^- era adicionada às soluções de calibração.

A literatura reporta ainda estudos mais apurados com os íons halogenetos, em especial com o Br^- e Cl^- , quando usados como intensificadores do sinal QL para vários íons metálicos. CHANG e PATTERSON (1980) estudaram a influência de Br^- e Cl^- na intensificação promovida por traços de íons de metais catalisadores da reação do luminol/ H_2O_2 . Os íons metálicos investigados foram: Cr^{3+} , Fe^{2+} e Co^{2+} . Os resultados mostraram que na presença de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de Br^- , teve aumento na intensidade do sinal de: 6,2 vezes para o Cr^{3+} , 3,5 para Fe^{2+} e 2,5 para Co^{2+} com o pH otimizado para análise.

1.3.1 Mecanismo envolvendo íons halogenetos na reação do luminol/ H_2O_2

Na **Figura 1.5** é esquematizado o mecanismo envolvendo íons halogenetos, proposto por CHANG e PATTERSON em 1980, para as reações quimiluminescentes baseadas no sistema luminol/ H_2O_2 . De acordo com esse mecanismo, o íon brometo associado ao complexo M-Peróxido facilita a transferência de elétrons na reação com o luminol, favorecendo a formação do íon aminoftalato* no estado excitado.

CHANG e PATTERSON (1980) declaram que existem pelo menos duas vias nesse mecanismo, quais sejam: uma não quimiluminescente **(a)** e a outra quimiluminescente **(b)**. Os íons halogenetos aumentam a eficiência quântica mediante aumento da constante (K_2) para a via QL. A clivagem catalítica de um complexo molecular ativado, que produz íons aminoftalato excitados, é proposto como passo fundamental do mecanismo. Os íons aminoftalato mais estimulados são produzidos por unidade de tempo na presença dos íons haletos para obter um sinal QL reforçado. A proposta de mecanismo é apresentada na **Figura 1.5**.

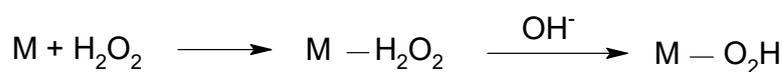
Além do reforço na intensidade da radiação QL, a manutenção da relação linear entre o sinal e a concentração do íon de vários metais "catalisadores" torna o uso do intensificador útil nas determinações ou especiações em níveis de traço de diversos íons metálicos no meio ambiente.

1.3.3 Fundamentos das titulações quimiluminescentes

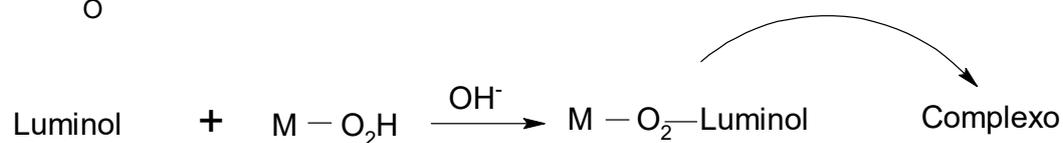
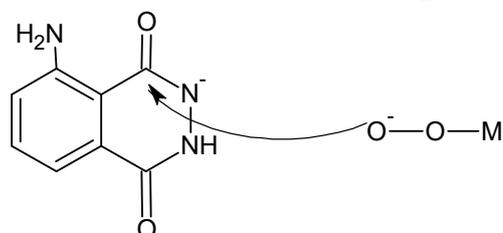
A titulação é um processo de análise química quantitativa que se baseia na reação entre o analito e um reagente padronizado (o titulante), o qual é adicionado até que a condição de equivalência química seja alcançada. Com o intuito de encontrar o ponto final da titulação, associado ao ponto de equivalência química, utiliza-se um meio de detecção apropriado.

Na titulação clássica (volumétrica ou gravimétrica), a chegada ao ponto final é assinalada pela mudança de cor de uma substância indicadora adicionada à amostra (SKOOG, D. A. et al., 2014). Por outro lado, nas titulações instrumentais o uso de indicador é normalmente dispensado. Neste caso, o ponto final é obtido por intermédio de uma curva construída a partir dos sinais medidos (originados no fenômeno ou propriedade em que a técnica se baseia) durante a titulação (SKOOG, D. A. et al. 2009).

i) Formação do complexo Metal-peróxido



ii) Formação do complexo Metal-O₂-Luminol



iii) Via de decomposição (a) e via de formação de íons aminofталatos excitados (b)

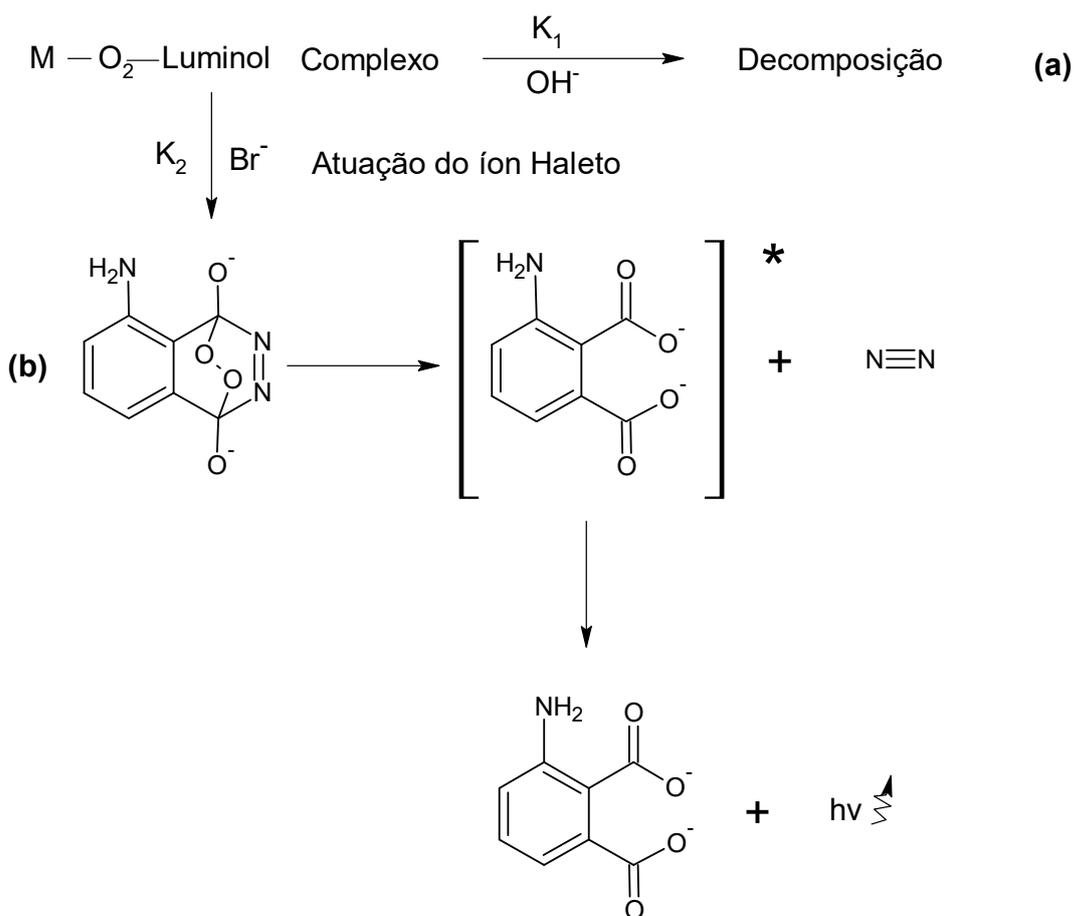


Figura 1.5 – Mecanismo do sistema quimiluminescente M-Luminol-H₂O₂-Br⁻. Adaptado de: CHANG e PATTERSON, (1980).

De acordo com o tipo de reação envolvida, as titulações podem ser classificadas em: titulações de neutralização, precipitação, oxidação-redução ou de complexação. No contexto da análise instrumental, as titulações também podem ser classificadas conforme a técnica utilizada, ou seja, em quimiluminescentes, espectrofotométricas, potenciométricas, coulométricas, etc. Para servir como princípio de uma titulação (clássica ou instrumental), a reação necessita satisfazer os requisitos básicos:

- ◆ *estequiometria definida e conhecida (essencial para a equivalência química e realização do cálculo estequiométrico da concentração do analito);*
- ◆ *meio apropriado para detecção do ponto final (indicador nas titulações clássicas e uma curva baseada no sinal analítico medido nas titulações instrumentais);*
- ◆ *completa (titulação clássica ou instrumental em sistemas em batelada);*
- ◆ *seletividade, ou seja, reação específica entre o titulante e o analito.*

No caso das titulações quimiluminescentes, as medidas podem ser usadas para construir uma curva de titulação relacionando o sinal QL versus volume do titulante adicionado. Para isso, faz-se necessário que determinada espécie envolvida na reação de titulação direta ou indireta (ver esquema da **Figura 1.2**) promova a emissão ou inibição de radiação QL. Alternativamente, pode-se usar um indicador que promova variações na emissão de luz, possibilitando assim a geração de um sinal QL que poderá ser usado para a construção da curva de titulação (SKOOG, D. A. et al., 2009).

Em tese, as curvas de titulação quimiluminescente devem compreender duas regiões lineares com inclinações distintas, sendo uma antes e a outra após do ponto final. A extrapolação dos dois segmentos de reta fornece, na abscissa correspondente ao ponto de interseção, o volume do ponto final ($V_{p.f.}$) da titulação.

A **Figura 1.6** mostra os possíveis perfis que, teoricamente, as curvas de titulação QL podem assumir:

- (i) nessa curva, o analito(a) e o titulante(t) emitem radiação QL. O analito possui intensidade de emissão (I_{QL}) superior ao do titulante em excesso após o ponto de equivalência. Podendo ser evidenciado por sua inclinação mais acentuada

no gráfico. No ponto de equivalência temos o consumo por completo do analito e do titulante, forma-se o produto(p) da reação que não emitem radiação QL.

- (ii) Nesse gráfico o analito(a) produz a radiação QL observada, enquanto que o produto(p) e titulante(t) não gera nenhuma luz. No decorrer do consumo do analito(a) teremos a inibição da radiação QL até o seu desaparecimento.
- (iii) Nesse gráfico de titulação temos uma reta linear crescente antes do ponto final, derivado do sinal QL gerado a partir da formação de um produto que gera luz. Depois do ponto final, tem-se uma reta constante devido ao produto da reação permanecer constante ao adicionar mais titulante, pois todo o analito já foi consumido. O analito e o titulante não emitem radiação.
- (iv) O produto(p) concebe radiação QL maior que a radiação gerada pelo o titulante(t), enquanto que o analito(a) não contribui para formação de luz.
- (v) O titulante(t) se apresenta com intensidade QL maior do que a intensidade gerada pelo produto(p), deste modo, é evidenciado pelas diferentes inclinações das retas no gráfico. O analito(a) não emite radiação QL.
- (vi) Nessa curva de titulação, analito(a) e produto(p) não emitem radiação QL, somente o excesso de titulante(t) contribui para o fenômeno, como é mostrado após o ponto de equivalência.

Dependendo da reação da titulação, o segmento de reta antes ou depois do ponto final pode ser ascendente ou descendente. Neste trabalho, o sistema de resposta quimiluminescente previsto é o perfil de curva (ii) que depende, assim como todos os outros, dos fatores que afetam a I_{QL} vistos na **seção 1.3.1** e dos requisitos básicos para se executar uma titulação, vistos nessa seção.

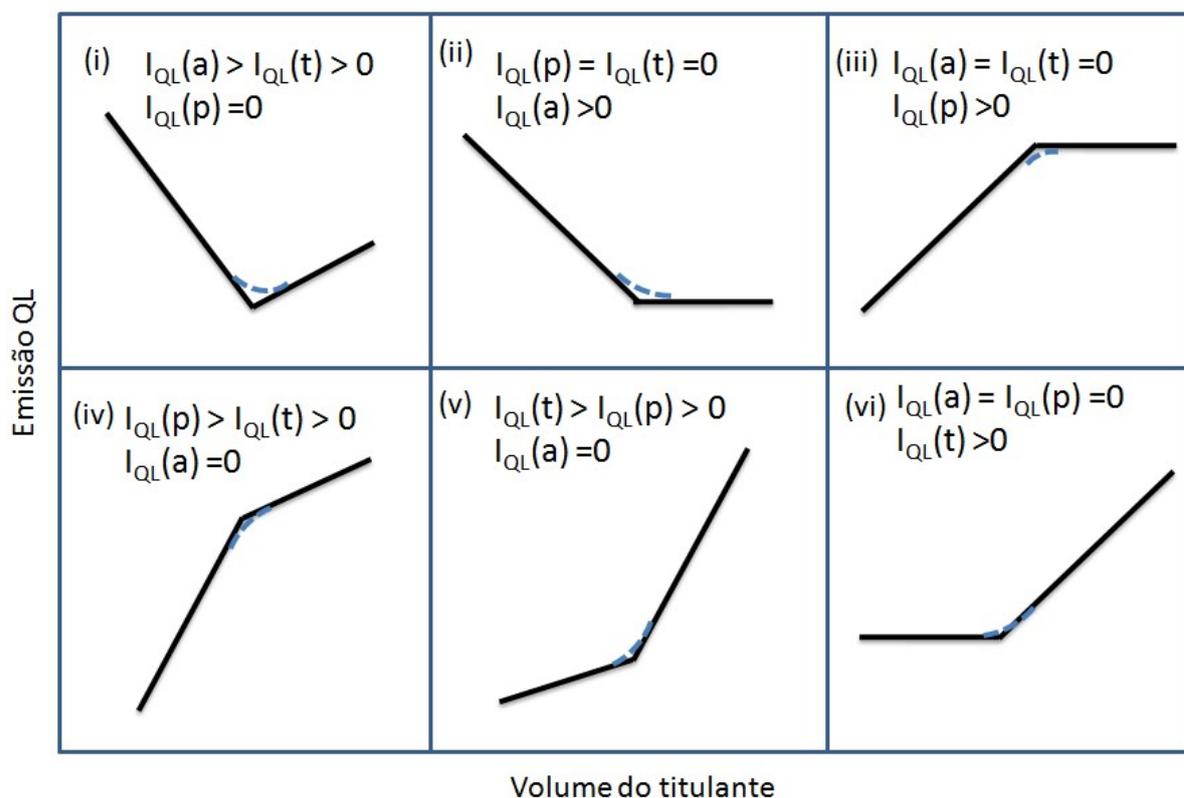


Figura 1.6 – Perfis teoricamente esperados para as curvas de titulação QL - $I_{QL}(a)$: Intensidade quimiluminescente gerada pelo analito, $I_{QL}(t)$: Intensidade quimiluminescente gerada pelo titulante e $I_{QL}(p)$: Intensidade quimiluminescente gerada pelo produto.

1.4 Imagem Digital

Imagem é a reprodução de um objeto real ou cena preservada em um meio (GELADI e GRAHN, 1996). Neste âmbito são exemplos de imagens: uma pintura, escultura, uma fotografia, etc. Na ciência, as imagens são produzidas objetivando expressar algumas propriedades objetivas do objeto ou cena de interesse (GELADI e GRAHN, 1996).

Para que as imagens analógicas possam ser utilizadas em dispositivos eletrônicos, é preciso que as mesmas sejam transformadas de uma imagem contínua para uma estrutura quadriculada. Cada quadrado desta estrutura recebe o nome de *pixel*. A imagem resultante deste processo é chamado então de imagem digital e podem ter duas ou três dimensões (2D ou 3D).

O número de *pixels* de que é formada a imagem digital define a sua resolução espacial. Normalmente são utilizados valores de resolução espacial de 256 x 256, 512 x 512, 1024 x 1024 e 2046 x 2046 *pixels*. A resolução e a intensidade de um

pixel numa imagem digital podem ter vários valores dependendo da área de aplicação. Por exemplo: para imagens fotográficas são utilizados valores inteiros de 0 a 255.

Para a utilização de imagens digitais em problemas analíticos, o valor de intensidade do *pixel* deve estar relacionado com algum modelo de cor. Todo modelo de cor tem como finalidade principal especificar as cores de algum modo padronizado e de aceitação geral. Em linhas gerais, um modelo de cor é uma especificação de um sistema de coordenadas tridimensionais e um subespaço dentro desse sistema onde cada cor é representada por um único ponto (GONZALES e WOODS, 2000).

Na atualidade a maioria dos modelos de cor estão orientados à hardwares (monitores coloridos e impressoras) ou aplicação na manipulação de cores (criação de gráficos de cores para animação).

Para *hardwares* os mais usados são o RGB (para monitores coloridos e câmeras de vídeo a cores), o CMY (para impressoras coloridas) e o YIQ (para transmissão de TV colorida).

Na manipulação de imagens coloridas os modelos mais utilizados são o HSI e o HSV. Já para o processamento de imagens são o RGB, o YIQ e o HSI (GONZALES e WOODS, 2000).

1.4.1 Modelo de cor RGB

O princípio de percepção de cores pelo olho humano é a base do modelo de cor RGB. O método de interpretação da cor usado pelos dispositivos é baseado diretamente na resposta do olho humano aos estímulos das luzes vermelha, verde e azul. Este modelo de cor é usado pelos fabricantes de escâneres a cores e monitores.

A mistura das cores dominantes (primárias), em diferentes combinações e níveis variados de intensidade pode simular todas as cores existentes no espectro da região do visível. Se a luz refletida contém a máxima intensidade das luzes vermelha, verde e azul, o olho percebe o branco, e se não existe luz, é percebido o preto (BERNS, 2000).

A representação geométrica desse modelo de cores em um espaço tridimensional gera um sólido conhecido como cubo de cor (**Figura 1.7**).

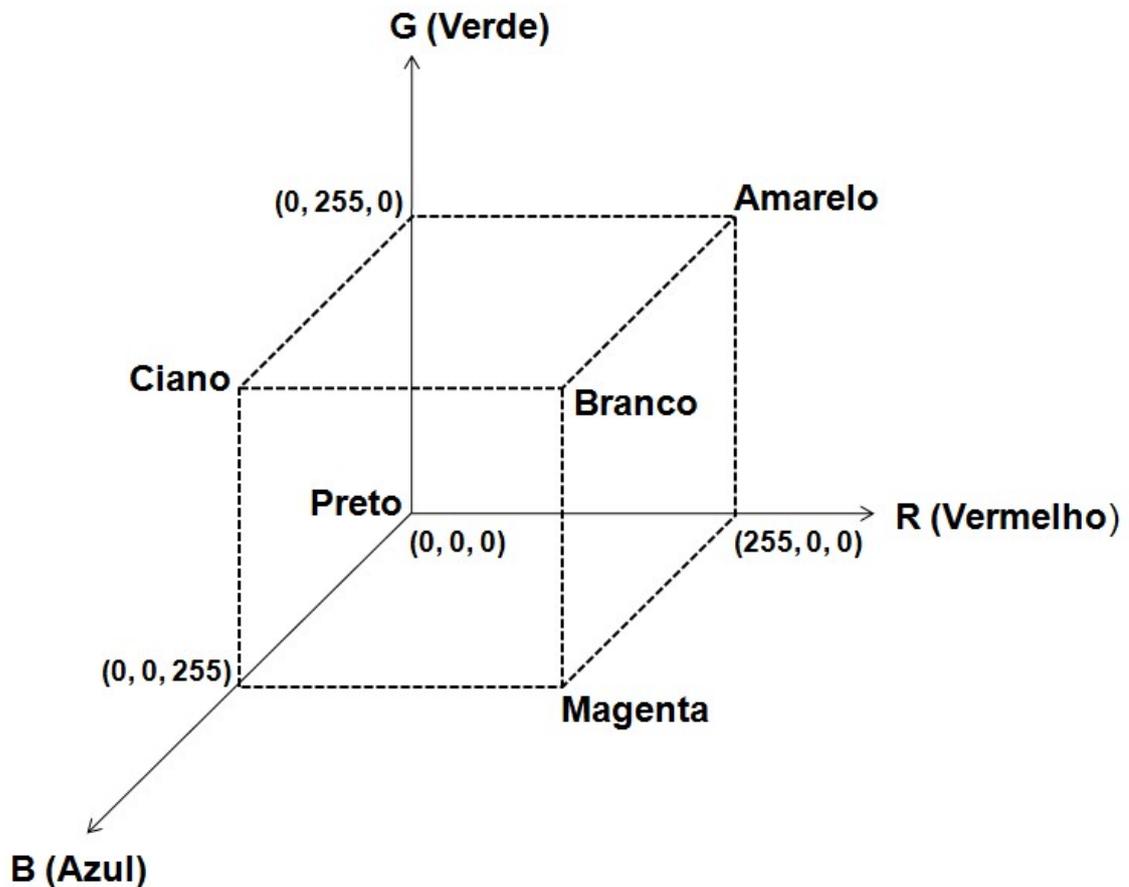


Figura 1.7– Representação geométrica do modelo RGB.

Neste cubo, cada eixo representa a contribuição de uma cor primária com intensidades variando na faixa 0 – 255 (8 bits) na formação das demais cores, ou seja, com 256 níveis de intensidade totalizando 16,7 milhões de cores. Cada par de eixos gera um plano em que são representadas as cores secundárias (contribuição eqüitativa de duas cores primárias) no vértice de cada plano. A interseção dos três planos define a cor preta (não há contribuição de nenhuma das cores primárias), já a cor branca fica no vertice oposto a origem do cubo (mistura eqüitativa das três cores primárias com a intensidade máxima). A diagonal principal deste cubo representa a escala de cinza.

No cubo de cores, podemos definir cada ponto neste espaço como sendo uma única cor com valores (coordenadas) de R, G e B que variam de 0-255 níveis de tonalidades.

1.5 A resposta analítica em termos da norma $||v||$

Em algebra linear a distância euclidiana é a distância entre dois pontos e pode ser descrita como um vetor no espaço tridimensional. O comprimento desse vetor é chamado de norma. No espaço vetorial RGB podemos descrever cada cor por meio de um vetor posição, cuja norma pode ser calculada pela distância euclidiana no espaço cúbico pela Equação 1.2.

$$||v|| = \sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad (1.2)$$

Portanto, podemos expressar um valor extraído matematicamente a partir de uma área selecionada na imagem digital em termos da norma do vetor $||v||$ e que pode ser usado para gerar a curva analítica e titulação, onde assume uma relação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito para estimar a concentração do analito em amostras de interesse (LYRA, W.S. et al., 2011).

$$||v|| = KC \quad (1.3)$$

A Equação 1.3 descreve uma relação linear entre a norma do vetor e a concentração do analito nas soluções e amostras. Onde K é o coeficiente de proporcionalidade que depende do número de fótons que chega ao detector, da eficiência quântica de quimiluminescência, da velocidade da reação química e demais fatores que afetam a intensidade QL. A norma do vetor V, $||v||$, é o valor adotado como resposta analítica empregada para a construção das curvas de titulação QL, abordado neste trabalho.

1.5.1 Uso de imagem digital em quimiluminescência

KAI, Masaaki et al. (1999) desenvolveram um novo método de calibração univariada e quimiluminescente para quantificação de ácidos nucleicos e ácido desoxiguanilico em membrana de *nylon*, utilizando imagem digital. Nesse sistema, o sinal quimiluminescente foi intensificado aumentando a concentração de ácido desoxiguanilico na molécula do analito.

MONEMI, Naghi et al. (1999) usaram uma câmera digital e a quimiluminescência (QL) para quantificar proteínas ligadas ao retinol (retinol-binding protein, RBP) via curva analítica. Um ensaio combinado de imunoabsorção

enzimática, ELISA (do inglês: enzyme-linked immunosorbent assay) foi desenhado com base nos anticorpos anti-RBP imobilizada por adsorção física sobre a superfície da sílica dos capilares de vidro pré tratados com sílica coloidal. O RBP ligado ao anticorpo (anti-RBP) foi detectado usando o anti-RBP-peroxidase de rábano (anti-RBP-HRP)/(horse-radish peroxidase, HRP). O sistema reacional que originou o sinal QL foi o HRP-H₂O₂-luminol-4, iodofenol. A radiação QL originada a partir dos capilares de vidro foi capturada por uma câmera digital com sensor CCD. Esse estudo tem aplicações na quantificação de RBP na urina, soro e outros fluidos biológicos para diagnóstico clínico.

MARCH, Carmen et al. (2005) estudaram uma nova forma de contagem rápida de bactérias lactas deteriorantes da cerveja usando ensaio imunoenzimático e quimiluminescência. Os pontos emissores de luz das colônias de bactérias foram detectados e contadas usando uma câmera digital com sensor CCD. A quantificação foi realizada via regressão linear entre pontos QL e o número de microcolônias.

LUO, Lirong et al. (2005) propuseram um método de calibração simples, baseado em imagem digital e quimiluminescência, com alta sensibilidade, para determinação do fator α recombinante de necrose tumoral humana, usando uma câmera digital com sensor CCD. As vantagens desse método são: especificidade dos ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), sensibilidade aumentada e de alto rendimento quântico.

RODA, Aldo et al. (2005) combinaram bio e quimiluminescência com técnicas de imagem para desenvolver um método de calibração com alta sensibilidade usando a capacidade dos dispositivos atuais de captura de imagem. Foram realizadas aplicações na biotecnologia por imagem, para ensaios quimiluminescentes *in vitro* e *in vivo*, contribuindo com avanços na medicina, na indústria farmacêutica e na biotecnologia. Por exemplo, a descoberta de novas proteínas bioluminescentes para monitorar em tempo real, processos biológicos, patológicos e infecções.

LUO, Lirong et al. (2006) desenvolveram um método simples e rápido para determinação de enterotoxina de estafilococos C1 (SEC1) por calibração univariada. Uma câmera digital com sensor CCD foi usada para captura das imagens QL, a qual foi acoplada a um conjunto de 96 capilares em uma microplaca. O método

apresentou vantagens como sensibilidade, especificidade dos ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e uso do luminol como reagente quimiluminescente. Sob condições controladas o aumento da intensidade QL é proporcional à concentração de SEC1 na faixa linear de 8,0-125,0 ng mL⁻¹ com limite de detecção de 0,5 ng mL⁻¹. O método foi aplicado, com sucesso, à determinação de SEC 1 em matrizes de leite e água.

KANG, Jonghoon et al. (2006) usaram uma câmera digital com sensor CCD para capturar imagens QL-EMSA (do inglês: electrophoretic mobility shift assay) para construir uma curva analítica com faixa de concentração 8-72 (fmol L⁻¹), de modo a obter um modelo linear por regressão pelo método dos mínimos quadrados e quantificar heparina biotinilada em amostras biológicas.

CHOUHAN, R. S. et al. (2006) abordaram uma metodologia baseada na técnica de imunoquimiluminescência e imagem digital para determinação do pesticida metil paration via curva analítica, com LOQ até 10 ppt. O reagente K₃Fe(CN)₆ foi empregado como um intensificador do sinal quimiluminescente para obter as imagens. Foram otimizados diferentes parâmetros, tais como, a concentração de K₃Fe(CN)₆, luminol, ureia, H₂O₂, o anticorpo, a sequência de entrada dos reagentes e tempo de reação, a fim de obter melhores sinais QL.

LUO, Lirong et al. (2007) imobilizaram a proteína recombinante humana interleucina-6 (rHu IL-6, recombinant human interleukin-6), em nanopartículas de ouro para conservar sua bioatividade. Depois quantificaram-na via curva analítica usando a quimiluminescência e detecção usando câmera digital com sensor CCD. Foram examinados os efeitos das concentrações de luminol, *p-iodophenol* (PIP), hemoglobina (Hb) e da solução tampão no sinal QL. O método foi aplicado, satisfatoriamente, à determinação de rHu IL-6 no soro humano e a precisão foi avaliada pelo teste de recuperação.

WANG, Li e ZHANG, Zhujun propuseram, em 2007, um método de calibração quimiluminescente sensível, rápido e de baixo custo, com base em imagem digital, usando a produção de microesferas sintetizadas por precipitação polimérica, para quantificação do trans resveratrol. A radiação QL produzido foi detectada usando uma câmera digital com sensor CCD de alta resolução.

XU, Hao et al. (2010) determinaram Co²⁺ e estudaram a transferência de energia de ressonância entre o luminol e corantes fluorescentes. Os corantes fluorescentes (aceitador) absorvem a energia QL do luminol (doador) em condições

off-ressonância, misturadas na solução. Eles compararam vários sistemas QL, o luminol-H₂O₂, luminol-H₂O₂ + fluoresceína e luminol-H₂O₂+ fluoresceína + DBS para determinar Co²⁺. Constataram para cada tipo de mistura, a presença de intensidades e picos de emissões diferentes. Um espectro tridimensional é obtido a partir de um sensor linear CCD e usado para contruir as curvas analíticas.

RODA, Aldo et al. (2011) desenvolveram um dispositivo de análise simples e versátil baseado em quimiluminescencia com detecção por sensor CCD. Foi aplicado para determinação simultânea de peroxidase de rábano, fosfatase alcalina e parvovírus B19, via curva analítica. O mesmo pode ser usado para diagnóstico simultâneo de diferentes tipos de marcadores biológicos, mesmo de natureza diferente (enzimas e substratos, antigénos, anticorpos e ácidos nucleicos).

DÍAZ, Aurora N. et al. (2012) fizeram uso da detecção quimiluminescente baseada em imagem digital para determinação de *triclopyr* por calibração, empregando o método ELISA (*do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

MIRASOLI, Mara et al. (2012) projetaram um dispositivo portátil para medidas no campo, alimentado com bateria e equipado com uma câmara CCD para obtenção das imagens no método quimiluminescente imunoensaio. O método faz uso de enzimas como agente catalisador no sistema quimiluminescente Luminol-peróxido. Foi aplicado para quantificar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) em amostras via curva analítica. Obtiveram um limite de detecção de 0,2 µg mL⁻¹ e recuperações que variam de 97% a 111% na análise de TNT em amostras reais. Suas aplicações incluem as áreas de segurança, forense e também pode ser usado para obter os primeiros sinais de poluição ambiental.

RODA, Aldo et al. (2014) relataram pela primeira vez o uso de um *smartphone* para análise quimiluminescente de fluidos biológicos envolvendo reações enzimáticas específicas. O instrumento adaptado para a análise, possui sensor CMOS (semicondutor de óxido metálico complementar) e captura as imagens digitais QL com resolução de 8 megapixels (8MP). As imagens foram processadas usando o software *ImageJ*. Os dados resultantes do tratamento foram usados para gerar uma curva analítica usada para quantificar o analito na amostra. Eles usaram dois sistemas: um bioluminescente (3α-hidroxi esteróides de hidrogenase co-imobilizadas com luciferase bacteriana) para determinação de ácidos biliares totais e outro quimiluminescente (luminol-H₂O₂-peroxidase de rábano) para determinar colesterol total em soro.

DONGGU, H. et al. (2015) usaram um método imunoenensaio baseado em quimiluminescência para detecção attomolar (10^{-18} molar) de interleucinas. Empregou-se um sensor CMOS para detecção da radiação quimiluminescente por imagem digital. O método proposto apresentou um limite de detecção de 0,074 fg/mL e faixa dinâmica de 1 fg/mL - 20 ng/mL para quantificação de interleucina-5 por curva analítica. O mesmo foi aplicado com êxito para detecção simultânea de quatro tipos diferentes de citocinas (interleucina-2, interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-6) usando o mesmo sistema.

ZANGHERI, M. et al. (2015) desenvolveram um biossensor baseado no método imunoenensaio para análise de cortisol salivar, utilizando-se um smartphone para aquisição e tratamento dos dados. A câmara do smartphone é usada como detector de luz, ou seja, da captura das imagens. A quimiluminescência é gerada usando o conjugado peroxidase de cortisol pela adição do substrato luminol/peróxido e quantificada por curva analítica. O método é simples e rápido, com limite de detecção de 0,3 ng/mL e faixa linear de 0,3-60 ng/mL.

ZENG, Z. et al. (2016) desenvolveram um protótipo de analisador digital compacto controlado por um smartphone para análise microfluídica. Foi desenvolvido um aplicativo (DIY-built) para captura e tratamento das imagens digitais com configuração personalizada. A câmara do smartphone é usada como detector da radiação quimiluminescente. A curva analítica se mostrou linear para quantificação de H_2O_2 na faixa de 1 a 20 mM, usando o sistema quimiluminescente luminol-peróxido- HRP.

1.6 Sistemas de análise em fluxo

Desde sua concepção, os analisadores em fluxo têm contribuído para tornar os procedimentos analíticos e tratamentos de amostras e reagentes mais eficazes. O que costumava ser manual, lento e propenso a erros, tornou-se automatizado, rápido e preciso. O uso amplo desses analisadores para automatização analítica é evidenciado no expressivo número de publicações de artigos reportados na literatura (DINIZ, Paulo H.G.D. et al., 2012) teses e livros acadêmicos (RUZICKA et al., 1988). Ademais, pode-se atestar também pelas várias empresas que investem na área de analisadores em fluxo para os diferentes tipos de análises (*SEAL Analytical, Skalar, FIALab Instruments* e etc.).

Embora se tenha implementado muitas melhorias e modificações nos analisadores em fluxo, um desenvolvimento considerado muito promissor tem sido demonstrado pelo analisador em fluxo batelada (FBA) por: DINIZ, Paulo H.G.D. et al., (2012). A sua evolução tem sido promovida, sobretudo, pelo uso de uma câmara de mistura que possibilita, por exemplo, a implementação de diversos procedimentos analíticos sem a necessidade de alteração significativa na montagem do sistema.

De acordo com publicação mais recente da IUPAC, os analisadores em fluxo mais conhecidos podem ser classificados conforme esquema apresentado na **Figura 1.8** reportado na referência (DINIZ, Paulo H.G.D. et al., 2012). Como se pode observar, adotou-se como critério principal o tipo de amostragem (contínua ou intermitente) para abrir a árvore de classificação das análises em fluxo. De acordo com esse esquema, os analisadores em fluxo batelada (FBA) se caracterizam por apresentar amostragem intermitente com comutação direta de amostras. Essas características motivaram o emprego desse analisador para implementar o método de titulação quimiluminescente proposta neste trabalho.

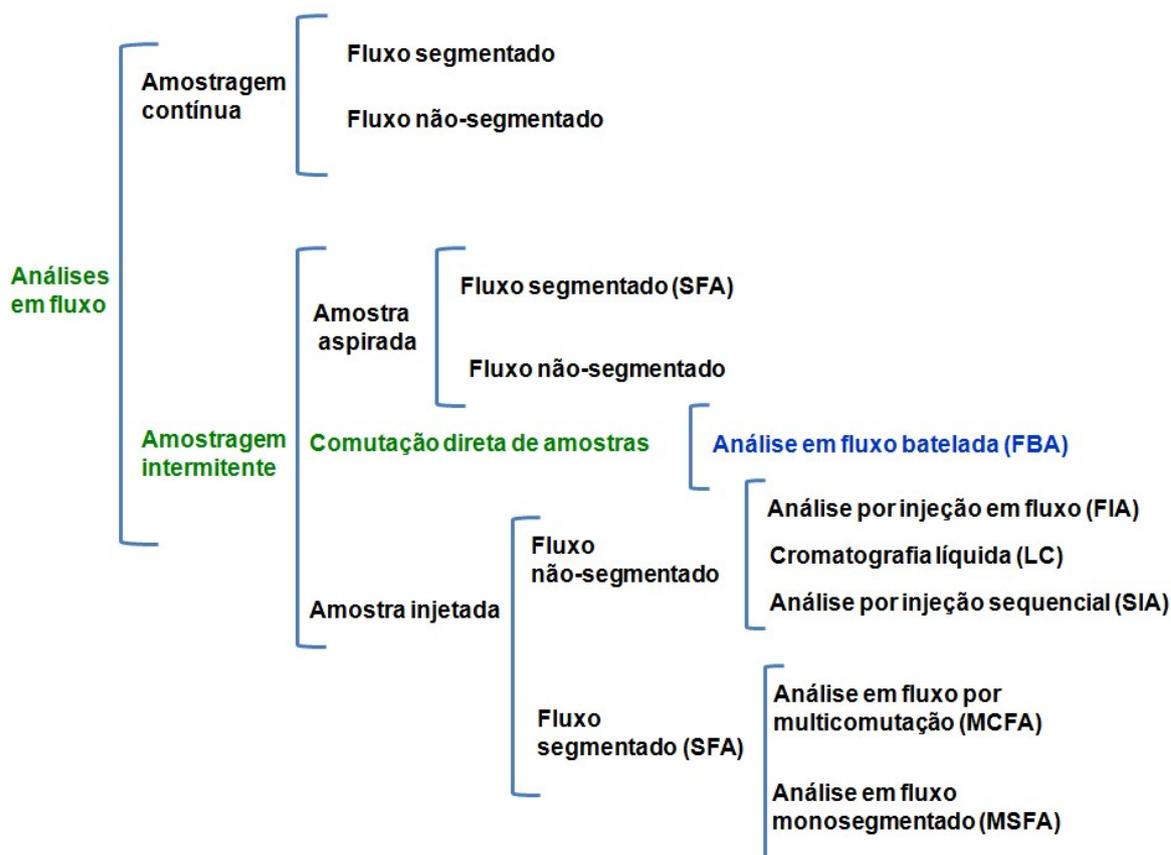


Figura 1.8 – Esquema de classificação das técnicas de análise em fluxo de acordo com a IUPAC. Inclusão do FBA na classificação dos métodos de análise em fluxo (IUPAC). Adaptado de: DINIZ, Paulo H.G.D. et al., (2012).

1.6.1 O Analisador em Fluxo-Batelada

O primeiro analisador desenvolvido com a denominação *Flow-Batch Analyser* (FBA) foi proposto em 1999 por HONORATO e colaboradores, como alternativa aos métodos automáticos já existentes. O FBA nesse trabalho, foi aplicado para implementar uma titulação ácido-base automatizada para determinação de acidez de vinhos (HONORATO, R.S. et al. 1999). Após essa aplicação, percebeu-se que esse sistema poderia ser usado para por exemplo: pré-tratamento da amostra, adição de padrão, análise *screening*, extração líquido-líquido, turbidimetria, análise nefelométrica, quimiluminescente, fluorescente e fotométrica (DINIZ, Paulo H.G.D. et al., 2012).

O uso do FBA tem permitido a implementação de procedimentos analíticos rápidos e precisos, com menor quantidade de reagentes e amostras, assim como baixa geração de resíduos. Ademais, sua utilização tem possibilitado a manipulação de soluções tóxicas, instáveis, etc, com mínima intervenção do analista (ANDRADE, S. I. E., 2012).

A seguir, são apresentadas as principais características dos analisadores em fluxo-batelada, MOREIRA, P. N. T. (2009):

1. *Usa-se uma câmara (para misturas e/ou como reator para reações químicas) e válvulas solenoides de três vias (para comutar os fluidos para o interior da câmara);*
2. *As amostras são processadas na câmara de forma discreta, característica dos sistemas em batelada. Assim, as medidas do sinal podem ser realizadas com alta sensibilidade. Isto ocorre devido aos equilíbrios físicos e químicos inerentes ao processo analítico que podem ser atingidos com ou sem dispersão e/ou diluição da amostra;*
3. *O sinal analítico pode ser medido em fluxo contínuo ou em fluxo interrompido, na própria câmara ou fora dela;*
4. *A câmara possibilita a implementação de diversos procedimentos, tais como: preparação de soluções de calibração ou adição de padrão, exploração de gradientes de concentração, etc., conferindo ao sistema muita versatilidade;*

5. *Os fluidos podem ser adicionados na câmara de mistura de forma simultânea e/ou sequencial de acordo com o procedimento analítico. Ex.: soluções de calibração, reagentes, amostras, diluentes, tampões, etc;*
6. *Apresenta grande versatilidade na implementação de diferentes processos analíticos com mínima alteração na configuração física do sistema. Essas características conferem um caráter multitarefa ao sistema, necessitando apenas de mudar ou adaptar o software de controle;*
7. *Alta flexibilidade na adaptação de diversas metodologias, as quais podem ser modificadas de forma conveniente para um determinado tipo de análise e/ou amostra. Por exemplo, pode-se trabalhar em uma faixa ampla de concentração, mudando apenas os parâmetros operacionais por meio do seu software de controle;*
8. *O computador controla todo o sistema via softwares e drivers de corrente elétrica que garantem uma precisão dos tempos de acionamentos das válvulas solenoides. Consequentemente, a adição de volumes precisos dos fluidos adicionados na câmara;*
9. *Oferece facilidade para automatização de métodos clássicos bem estabelecidos quando comparado a outros analisadores em fluxo;*
10. *Pode-se aplicar com/ou nenhum problema significativo na velocidade analítica, procedimentos que envolvam reações de cinética lenta. Assim como, os que são feitos em analisadores monosegmentados, que podem residir as reações químicas, por longos períodos de tempo.*
11. *Os analisadores fluxo-batelada reúnem as vantagens intrínsecas dos sistemas em fluxo com os discretos ou em batelada. Por essa razão incorporam a característica de universalidade de aplicações o que permite, a princípio, implementar qualquer procedimento analítico.*

Capítulo 2
Material e
Métodos

2.1 Reagentes, soluções e amostras

Inicialmente, as vidrarias e recipientes foram limpos empregando uma solução com 10% de HNO_3 . Todas as soluções para as análises foram preparadas usando reagentes de grau analítico (P.A.) e água sempre recém-destilada e deionizada. Para deionização, utilizou-se um sistema Milli-Q Plus® (*Millipore, Bedford, MA*) para purificar a água com resistividade específica de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$ a 25 °C.

Preparou-se uma solução com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de luminol em meio alcalino (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona, Sigma 97% P.A.). A mesma, foi preparada pela dissolução de 0,018 g do reagente em solução com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Hidróxido de sódio (NaOH, *Synth* 97% P.A.), à qual adicionou-se 100 μL de H_2O_2 (*Merck* 30% m/v) sendo o volume aferido para 100 mL. A solução resultante foi mantida sob refrigeração a 5°C. De acordo com MOREIRA, 2009, a solução de luminol deve ser preparada com antecedência mínima de 48 h para adquirir estabilidade química.

Uma solução estoque com 125 mg L^{-1} de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Vetec 99% P.A.) foi preparada a partir da dissolução de 0,1558 g do sal em 2,5 mL de H_2SO_4 para um volume de 250 mL água deionizada. Partindo dessa solução, preparou-se as soluções de calibração 2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 8,0 e 10,0 mg L^{-1} de Fe^{2+} para o método de referência.

Foi preparada uma solução estoque com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de permanganato de potássio (KMnO_4 , Vetec 99% P.A.) dissolvendo 0,016 g desse reagente em água deionizada e depois padronizado com oxalato de sódio em solução ácida de acordo com o manual de soluções (MORITA, et al, 2007). A solução resultante foi diluída de modo a obter as concentrações de $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em meio ácido.

Preparou-se uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KBr, dissolvendo-se 12,0 g do reagente em água deionizada até aferição em balão volumétrico de 1,0 L. A mesma é usada para fazer as diluições de todas as amostras de xarope.

Uma solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 4,1 g de NaOH (*Synth* 97% P.A.) em 1,0 L de água deionizada.

Tampão usado no método espectrofotométrico UV-VIS. Dissolveu-se 27,22 g de acetato de sódio (CH_3COONa) em água deionizada e o volume da solução foi aferido para 100 mL.

Preparou-se uma solução com 0,25% de 1,10-fenantrolina monohidratado ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$, Vetec Química Fina, 99,0%, PA), dissolvendo-se 0,25 g desse reagente em água deionizada até um volume de 100 mL.

Inicialmente, as dez amostras de xarope de sulfato ferroso (25.000 mg L^{-1} de Fe^{2+}) foram diluídas com solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KBr para dois níveis de concentrações: **(i)** Para $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe^{2+} em meio ácido $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. **(ii)** Posteriormente, as 10 amostras originais foram diluídas para $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe^{2+} em meio ácido $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. O primeiro conjunto de amostras diluídas foram usadas nas análises de comparação entre a titulação proposta e o método de referência. O segundo conjunto foi utilizado apenas para a realização do teste de recuperação.

Foram preparadas 10 amostras fortificadas com concentração final de $450 \mu\text{g L}^{-1}$ ($150 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão + $300 \mu\text{g L}^{-1}$ da amostra original) em meio ácido $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KBr a partir da diluição de $120 \mu\text{L}$ da solução estoque de $Fe^{2+} 125 \text{ mg L}^{-1}$ e 6 mL da amostra de $Fe^{2+} 5 \text{ mg L}^{-1}$ e aferida ao volume de 100 mL.

2.2 Materiais e equipamentos

2.2.1 Sistema titulométrico quimiluminescente em fluxo-batelada

Na **Figura 2.1** é mostrada uma fotografia do sistema de titulação QL-BID proposto, na qual são assinalados os componentes básicos. O sistema engloba um conjunto de dispositivos interconectados, tais como câmara de mistura, bomba peristáltica, válvulas solenoides, acionador de válvulas, agitador magnético, *webcam* e um microcomputador.

a) Bomba peristáltica e tubos

Como propulsor dos fluidos, utilizou-se uma bomba peristáltica *Ismatec*[®], modelo IPC, equipada com 12 roletes e capacidade para acomodação de 8 tubos de bombeamento. Foram usados dois tipos de tubos: uns destinados ao bombeamento e outros ao transporte das soluções dos reagentes, amostras e água. Para o bombeamento foram utilizados tubos de *Tygon*[®] com diâmetro interno de 1,14 mm e, para o transporte, foram usados tubos de *Teflon*[®] com 0,8 mm de diâmetro interno.

b) Microcomputador

Para o controle do sistema e armazenamento dos dados, foi empregado um microcomputador com processador *Intel*[®] Core2Duo de 2.2 GHz, memória RAM de 3 Gb e HD 500 Gb integrado a uma interface de controle Arduino, conforme **Figura 2.1**.



Figura 2.1 – Fotografia da disposição física dos componentes do sistema de titulação QL-BID (a) bomba peristáltica, (b) microcomputador, (c) válvulas solenoides, (d) acionador de válvulas com interface arduino, (e) caixa para isolamento da luz externa, (f) *webcam*, (g) câmara de mistura e (h) agitador magnético.

O computador realiza todas as funções usando *software*, cuja tela principal é apresentada na **Figura 2.2.** (i) No destaque em vermelho, tem-se o local onde se adiciona os valores dos tempos de abertura dos canais das válvulas solenóides juntamente com a escolha “seqüencial” ou “simultânea” dos acionamentos. Os locais de configuração dos tempos são referentes à: entrada de volume da amostra, titulante, água, luminol, descarte e homogeneização. (ii) No destaque em verde, pode-se configurar o número de repetições das análises, limpeza do sistema, acionamento da bomba peristáltica, tempo extra de captura do sinal QL e escolha da área selecionada na imagem para obtenção dos dados em termos do valor de RGB e da norma. (iii) No destaque em azul, podem-se armazenar os dados, monitorar em tempo real o sinal QL e visualizar o progresso quimiluminescente no gráfico.

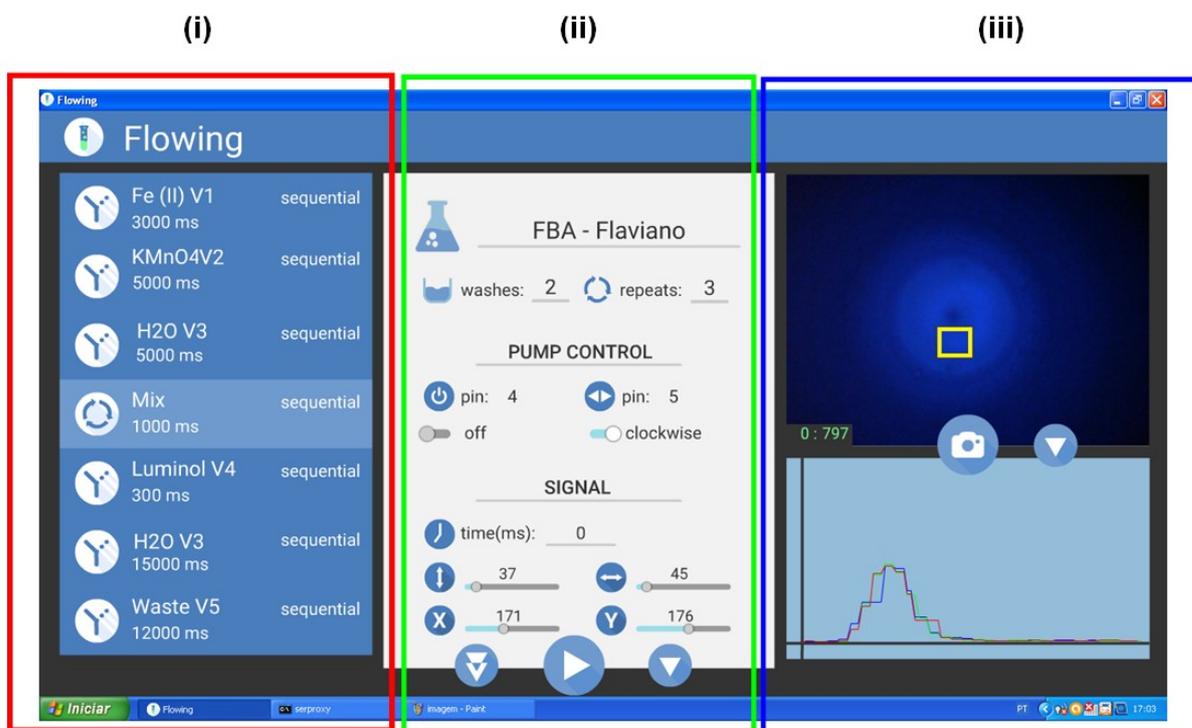


Figura 2.2– Interface do programa de controle do sistema fluxo-batelada quimiluminescente.

c) Características e funcionalidades do software de controle

O *software* de controle do sistema automático foi desenvolvido na plataforma Adobe Air para Desktop, programado em ActionScript 3.0. O software permite controlar as válvulas solenóides, a velocidade e direção da bomba peristáltica, a velocidade do agitador magnético e monitorar os sinais na webcam. Este software acessa as unidades internas da webcam, sendo capaz de capturar as imagens

digitais da radiação quimiluminescente e extrair as propriedades RGB da imagem. As imagens possuem extensão "bmp" em arquivo de formato não comprimido.

Para implementar o cálculo no software, o parâmetro analítico utilizado nas determinações por imagem digital, pode ser simplesmente o vetor posição normal calculados para o valor médio dos componentes nos canais vermelho (R), Verde (G) e azul (B) incluídos na Equação 1.4 (LYRA, W.S. et al., 2011): Para este vetor posição, sua norma $\|v\|$ é calculada pela distância euclidiana no espaço tridimensional RGB:

$$\|v\| = \sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad (1.4)$$

d) Válvulas solenoides

Para permutar os fluidos no sistema QL-BID, foram empregadas cinco válvulas solenoides de três vias da Cole *Parmer*[®], modelo RZ 01540-11 (**Figura 2.3**) com alimentação de 12 V e corrente de 150 mA. O controle delas é feito por um acionador de válvulas controlado pelo Arduino, este por sua vez é controlado pelo computador. Por meio deste dispositivo, podem-se direcionar os volumes das soluções para serem introduzidas na câmara de mistura com precisão e rapidez.



Figura 2.3 – Imagem de uma válvula solenoide de três vias utilizada no sistema automático titulométrico QL proposto.

e) Acionador de válvulas

Utilizou-se um acionador de válvulas baseado em circuito integrado ULN 2003 para controlar o acionamento das válvulas solenoides, cujo circuito elétrico é apresentado na **Figura 2.4**. Com capacidade para controlar até sete canais simultaneamente e de forma independente, o Arduino é usado como interface de controle do acionador de válvulas e suas saídas A\D são ligadas diretamente no acionador. O acionamento das válvulas é programado para receber uma tensão

maior que 3,8 V em suas entradas e convertida a 12 V em suas saídas. A corrente de 150 mA gerada é responsável por acionar o solenoide das válvulas durante o pulso elétrico.

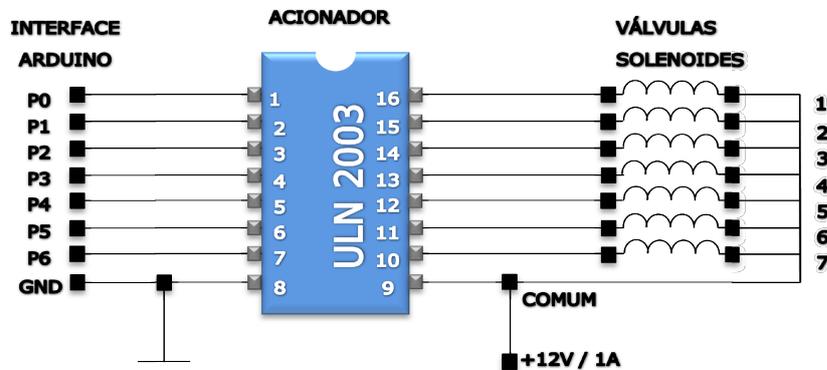


Figura 2.4 – Diagrama esquemático do acionador de válvulas solenoides. Com representação dos pinos P0 – P6 de saída da interface Arduino e GND-P8 é o aterramento do circuito. Adaptado da dissertação de: ANDRADE, R. A. N. (2011).

f) Caixa de isolamento

Para evitar erros nas medidas, a aquisição do sinal quimiluminescente deve estar menos susceptível à interferência da radiação ambiente. Por isso, utilizou-se uma caixa de isolamento em material plástico escuro para alocar a câmara de mistura, o agitador magnético e a *webcam*.

g) Detecção por *webcam*

Uma *webcam*, Microsoft® LifeCam 720p HD com sensor CMOS, foi usada para detecção da radiação quimiluminescente e captura das imagens digitais durante todo o procedimento analítico. Para possibilitar uma melhor captura das imagens do sistema reacional, a *webcam* foi colocada sobre a abertura superior da câmara de mistura, possibilitando uma melhor sensibilidade, iluminação, contraste, nitidez e reprodutibilidade. Na **Figura 2.5**, temos uma fotografia dessa *webcam*.



fonte: Microsoft

Figura 2.5 – *Webcam* usada como fotodetector do sistema QL-BID proposto.

h) Câmara de mistura

A câmara de mistura constitui uma das partes principais do sistema QL-BID, pois nela ocorrem as reações descritas na **Seção 2.5.1** que fundamentam a titulação quimiluminescente proposta. Conforme ilustrado na **Figura 2.6**, a câmara possui 7 canais de entrada e 1 para saída, assim como um volume interno total de 8,0 mL. Esse dispositivo foi confeccionado em PTFE (*Teflon*[®]) e abriga em seu interior uma barra magnética.

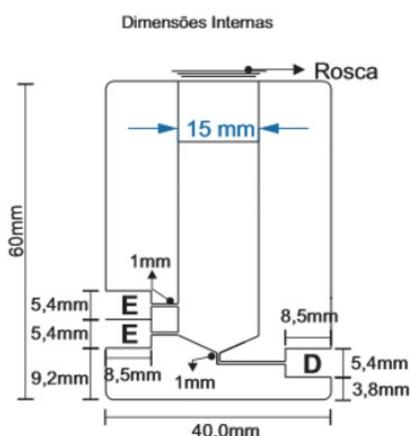


Figura 2.6 – Ilustração das dimensões da câmara de mistura com 7 canais para entrada de fluidos e 1 canal para descarte. (E) entrada e (D) saída de fluido.

i) Agitador magnético

Utilizou-se um agitador magnético no sistema fluxo-batelada destinado à homogeneização das soluções introduzidas na câmara de mistura com auxílio de uma barra magnética recoberta de *Teflon*[®].

2.3 Método de referência

Para validar o método proposto foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis da marca *Hewlett-Packard* (HP) com arranjo de fotodiodos, modelo 8453, para medir as absorbâncias conforme método descrito no *Standard Test Method for Iron in Trace Quantities Using the 1,10-Phenanthroline*. Para as medidas no equipamento, usou-se uma cubeta de quartzo com uma capacidade de aproximadamente 4,0 mL e caminho ótico de 1,0 cm. As medidas foram feitas explorando o máximo de absorbância no comprimento de onda de 511 nm.

2.4 Planejamento analítico quimiluminescente

Com o intuito de alcançar os objetivos apresentados neste trabalho, houve a necessidade de traçar os rumos para se trabalhar, a saber:

- ✓ Escolha do sistema químico QL apropriado para a titulação proposta, dos participantes da reação quimiluminescente, do meio químico (ácido ou alcalino), assim como da forma de adição e mistura;
- ✓ Montagem do sistema em fluxo-batelada levando-se em conta a melhor disposição e conexão dos componentes, bem como o uso da caixa de isolamento para prevenir a interferência da radiação ambiente.

2.4.1 O Sistema químico QL

Sabe-se que existem vários catalisadores reportados na literatura para viabilizar a quimiluminescência do luminol\H₂O₂, conforme descrito na **Seção 1.3.2**. Entre os catalisadores, têm-se o Fe²⁺ que foi escolhido neste trabalho como analito alvo da quantificação na mariz de xarope por meio da titulação QL proposta. O Fe²⁺ foi escolhido por contribuir para ampla faixa linear do sinal QL, pelos muitos estudos e determinações analíticas e apresentar uma fácil manipulação. Em virtude disso, esse cátion assumiu os dois papéis (analito e catalisador) na implementação das titulações quimiluminescentes por imagem digital. O xarope sulfato ferroso foi escolhido devido à importância da determinação do Fe²⁺, destinada ao controle de qualidade desse medicamento por meio de uma análise simples e de baixo custo.

2.4.2 O Sistema fluxo-batelada

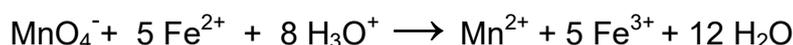
Montou-se um sistema automático de análise em fluxo-batelada acoplado-se uma webcam ao topo da câmara de mistura para realizar a captura da radiação QL. Esse sistema foi usado para implementar a titulação QL proposta para a derminação de Fe²⁺ nas amostras de xarope. As análises foram realizadas pelo analisador de forma a garantir uma precisão satisfatória nas medidas dos sinais QL. Além disso, permite obter uma maior sensibilidade das medidas em virtude do estabelecimento do equilíbrio químico e físico da reação (**Seção 1.6.1**).

2.5 Metodologia analítica

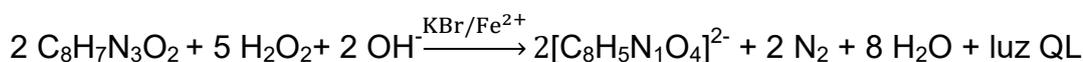
2.5.1 Titulação QL-BID – princípios e sinal quimiluminescente observado

A titulação QL-BID, proposta neste trabalho, se fundamenta nas reações descritas nas etapas abaixo:

- (i) Equação da reação entre o titulante (KMnO_4) e o analito (Fe^{2+})



- (ii) Equação da reação de oxidação do luminol pelo H_2O_2 (em meio alcalino) na presença do Fe^{2+} remanescente



Nota-se que o Fe^{2+} exerce dois papéis ao mesmo tempo, ou seja, constitui o analito de interesse na matriz da amostra e atua como catalisador da reação de oxidação do luminol conforme descrito na etapa (ii).

Antes de iniciar a titulação – isto é, antes de começar a adicionar o titulante à amostra – a concentração de Fe^{2+} presente na matriz é máxima e o sinal QL gerado terá a maior magnitude possível. Após cada incremento de volume do titulante, parte do Fe^{2+} é convertido para Fe^{3+} de acordo com a reação descrita em (i). Sendo assim, a concentração de Fe^{2+} diminui levando a uma diminuição da intensidade do sinal QL de maneira linear com o aumento do volume do titulante.

Quando todo o Fe^{2+} , inicialmente presente na matriz da amostra, for convertido para Fe^{3+} pela adição do titulante, a reação de oxidação do luminol pára e o ponto final da titulação é atingido. A adição de titulante em excesso não contribui para a geração do sinal QL, pois o Fe^{3+} não atua como catalisador na reação do luminol (GARCIA et al., 2001). Como resultado, obtém-se a curva de titulação com o perfil previsto na **Figura 1.6** e observado experimentalmente na **Figura 3.3**. A extrapolação dos dois segmentos de reta fornece, no eixo das abscissas, o valor do volume do titulante correspondente ao ponto final.

Conforme descrito na **Seção 1.3.1**, a presença de KBr exerce um papel muito importante como agente intensificador do sinal quimiluminescente, potencializando o efeito sobre o catalisador (CHANG, Cheng A. e PATTERSON, Howard H., 1980). É usado quando não se tem um sinal QL adequado para medição ou quando é muito baixo para ser detectado.

A radiação quimiluminescente gerada na reação é detectada por uma *webcam* acoplada à câmara de mistura (**Seção 2.2.1**). As imagens digitais obtidas são armazenadas em um microcomputador para posterior tratamento dos dados, conforme descrito na referência (LYRA, W.S. et al., 2011).

2.6 Procedimento analítico

Com o auxílio da **Figura 2.7**, o procedimento analítico pode ser descrito conforme etapas a seguir:

1) Etapa de pré-análise e modo de espera

Antes de iniciar o procedimento analítico propriamente dito, realizou-se a limpeza de todos componentes do sistema: válvulas, tubos e câmara de mistura, utilizando água deionizada.

Concluída a etapa de limpeza, posicionou-se todas as soluções, reagentes e água para serem bombeadas para enchimento dos respectivos canais. Em seguida, essas soluções foram introduzidas no sistema fluxo-batelada para realizar a titulação de acordo com o procedimento descrito a seguir.

No modo de espera, as válvulas solenoides e o agitador magnético estão desligados. Dessa forma, está assegurado o retorno contínuo dos reagentes para seus respectivos recipientes.

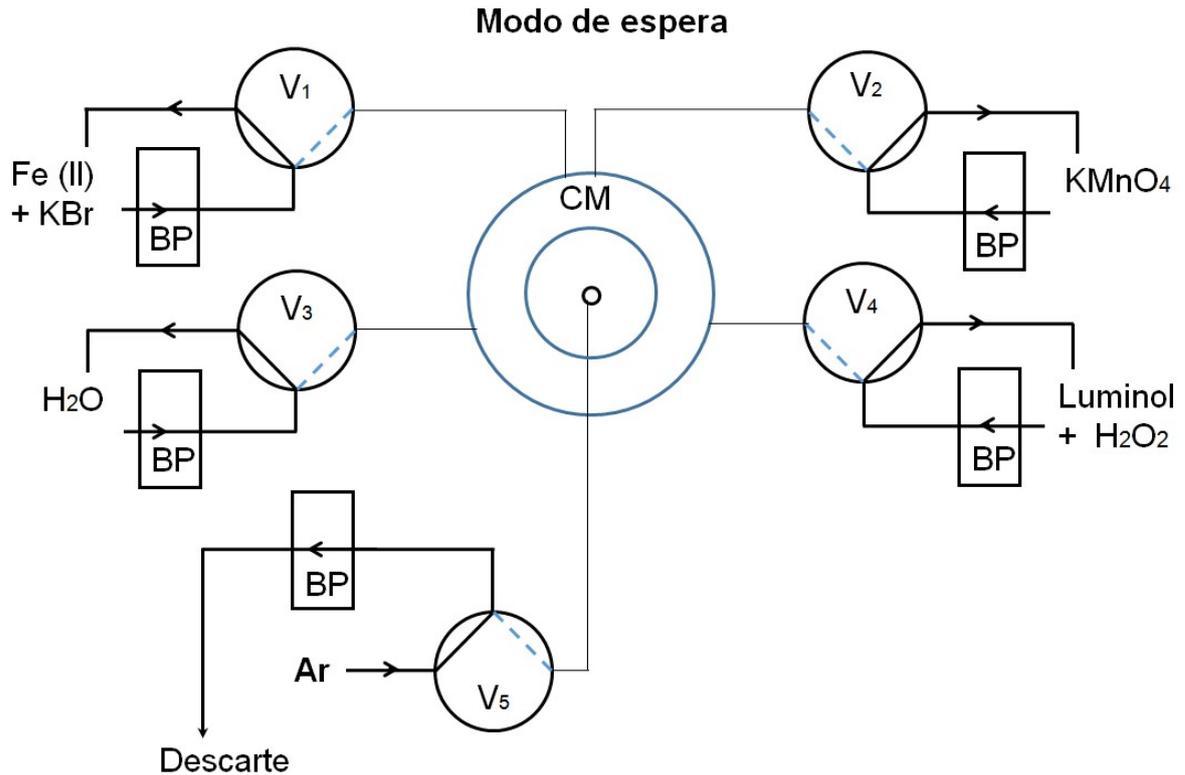


Figura 2.7 – Diagrama do sistema fluxo-batelada para titulação QL-BID em modo de espera. (—) Linhas de fluxo vazia ou estacionada e (—) preenchida em fluxo; (- - -) Linha de fluxo alternativa; (BP) Bomba peristáltica; (V_n) n-ésima válvula solenóide; (CM) Câmara de mistura.

2) Etapa de análise

- 2.i. Aciona-se a válvula V₁ durante 3s de modo a introduzir na câmara de mistura o volume fixo de 300 μ L da amostra diluída de sulfato ferroso através do canal C₁ conforme ilustrado na **Figura 2.8**;

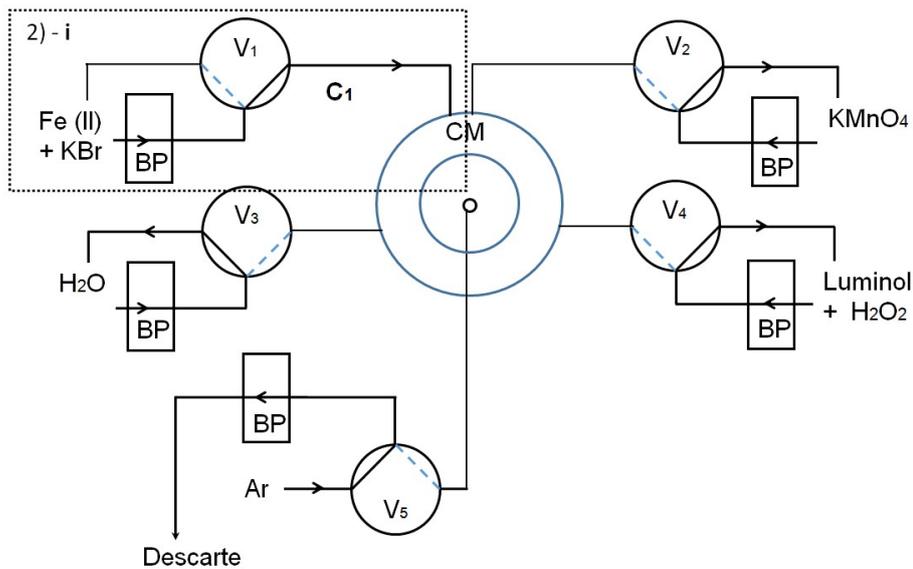


Figura 2.8 – Etapa de análise 2-i do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (C1) canal da amostra.

2.ii. Aciona-se a válvula V_2 a fim de introduzir na câmara o volume da solução de KMnO_4 correspondente ao tempo “ t_2 ” igual a 5s para essa medida em particular conforme ilustrado na **Figura 2.9**. Para as próximas medidas usa-se outros tempos, onde $t_2 = 0,0, 0,5, 1,0; \dots, 9,0; 9,5$ e 10 s para cada incrementado titulante programado na titulação;

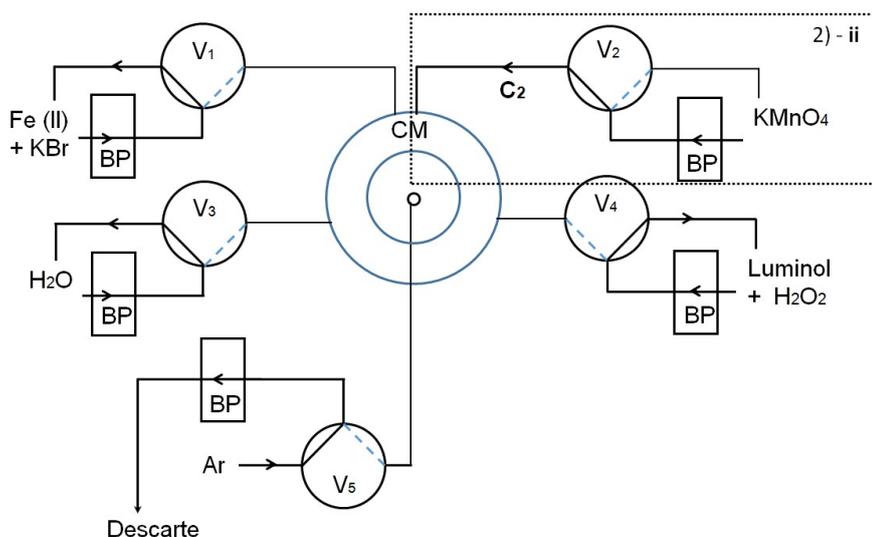


Figura 2.9 – Etapa de análise 2-ii do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (C2) canal do titulante.

2.iii. A válvula V_3 destina-se à adição de água à câmara de mistura de modo a estabelecer a mesma diluição da amostra durante a titulação. Para isso, essa válvula é acionada durante o tempo " t_3 " igual a 5s para essa medida em particular conforme ilustrado na **Figura 2.10**. Para as próximas medidas usa-se outros tempos, onde $t_3 = 10; 9,5; 9,0; \dots 1,0; 0,5; 0s$;

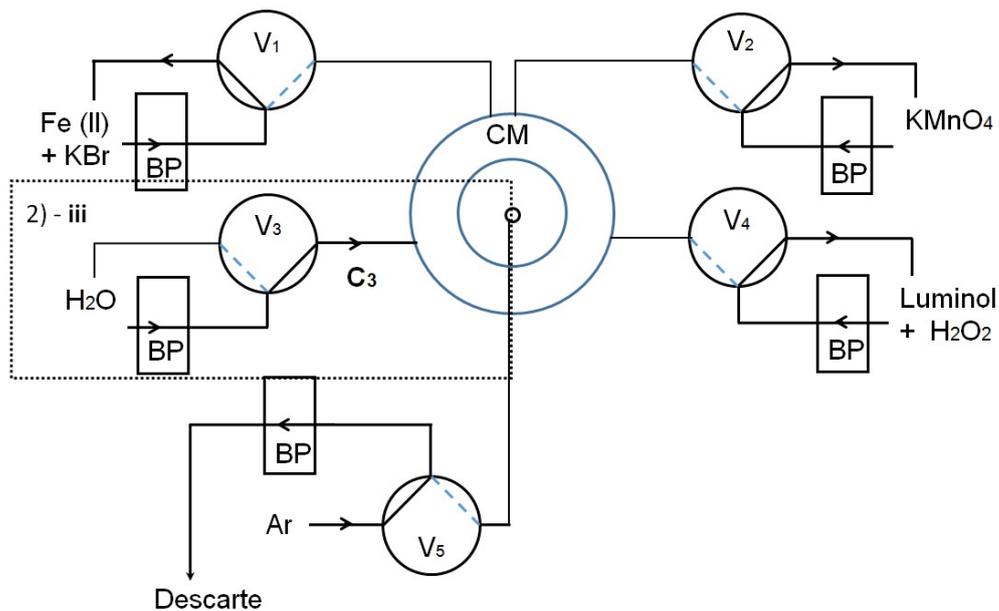


Figura 2.10 – Etapa de análise 2-iii do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (V_n) n -ésima válvula solenóide; (CM) Câmara de mistura; (C_3) canal da água.

2.iv. Aciona-se durante 0,3 s a válvula V_4 e a webcam simultaneamente conforme ilustrado nas **Figuras 2.11a e 2.11b** para, respectivamente, inserir na câmara a solução de luminol+ H_2O_2 em meio alcalino e capturar as imagens. O volume adicionado desse reagente é fixo, sendo neste caso igual a $30 \mu L$;

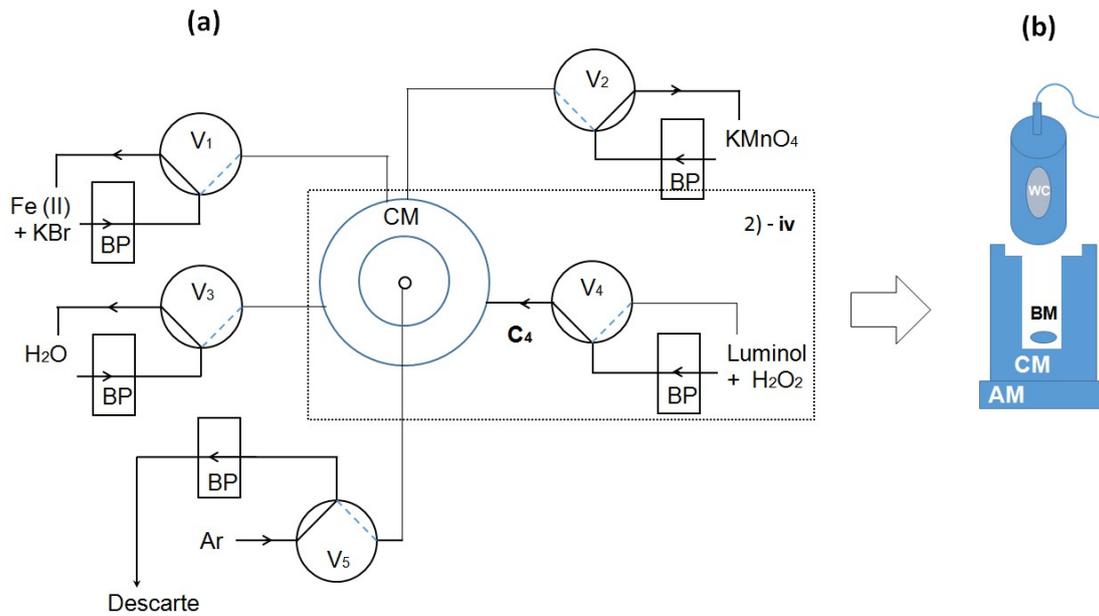


Figura 2.11 – Etapa de análise 2-iv do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (AM) agitador magnético; (WC) webcam; (BM) barra magnética; (C4) canal do luminol + peróxido.

2.v. Aciona-se a válvula V_5 durante 12s a fim de promover o esvaziamento da câmara de mistura para o descarte de seu conteúdo; conforme ilustrado na **Figura 2.12**.

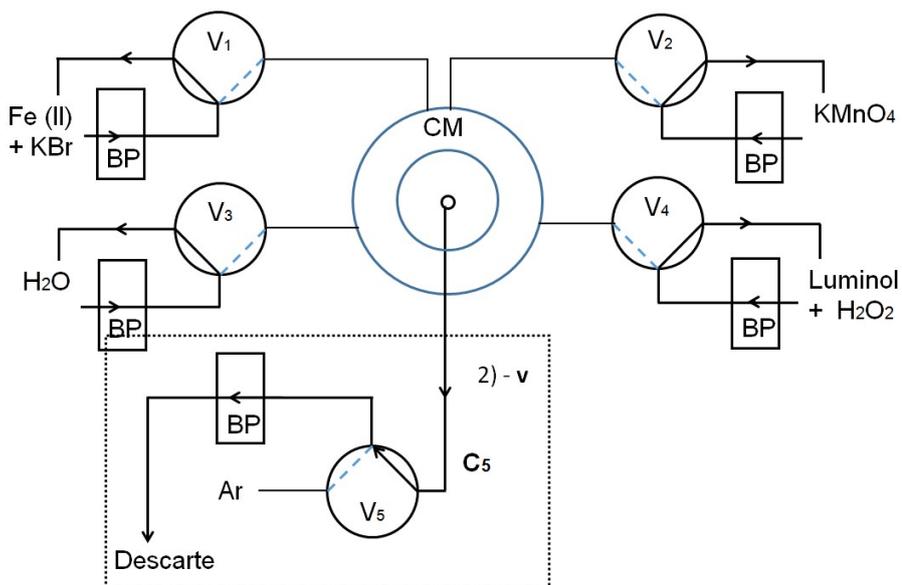


Figura 2.12 – Etapa de análise 2-v do procedimento de titulação QL: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida em fluxo; (BP) Bomba peristáltica; (Vn) n-ésima válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura; (C5) canal de retirada dos resíduos.

3) Etapa de limpeza do sistema entre cada medida

- 3.i. A válvula V_3 é novamente acionada, sendo que agora durante 15s para liberar na câmara o volume de água necessário para efetuar a limpeza; Repete-se esta operação duas vezes antes da próxima medida;

4) Novo ciclo de medida

- 4.i. A adição de um novo incremento do titulante é efetuada repetindo-se toda a etapa 2, exceto que nos passos ii e iii os tempos t_2 e t_3 são, respectivamente, aumentado e diminuído de modo que $t_2 + t_3 = 10$ s. Ou seja, os volumes para os tempos t_2 e t_3 variam de modo a contrabalançar o volume final a fim de manter o mesmo volume de aferição na câmara de mistura.

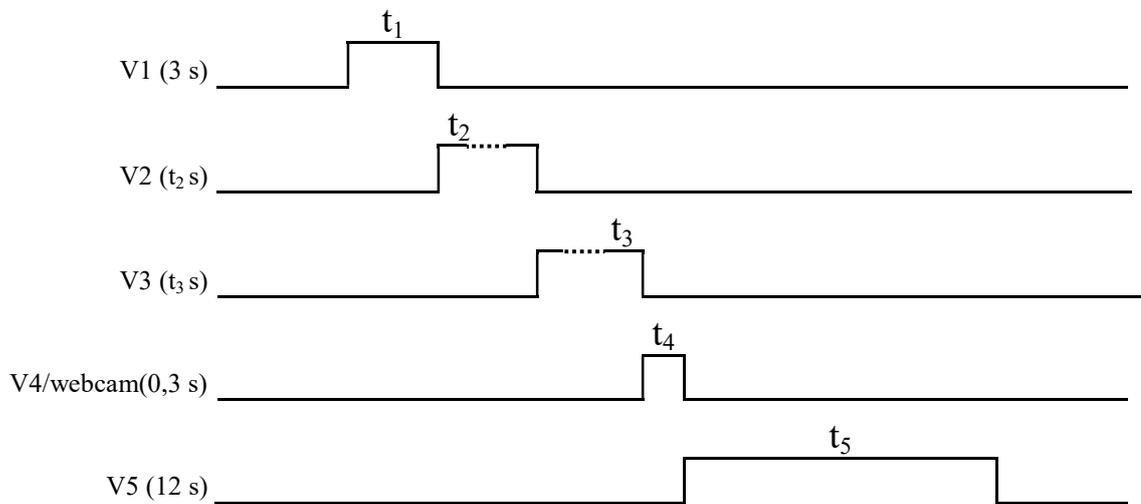


Figura 2.13 – Diagrama de tempos do analisador em fluxo para todas medidas.

Na **Figura 2.13** é mostrado um diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenoides para uma medida. A válvula V1 para amostra, tem um tempo de acionamento de 3 s, V2 um tempo de 5 s para solução do permanganato de potássio, V3 tempo de 5 s para água, V4 tempo de 0,3 s para a solução do luminol/ H_2O_2 e V5 tempo de 12 s para o descarte.

2.7 Validação da titulação quimiluminescente proposta

Os resultados da aplicação da titulação proposta foram validados por meio de testes estatísticos recomendados na literatura (NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010). Esses testes incluem o teste t emparelhado e o teste de recuperação (BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L., 1998) cuja implementação é descrita, respectivamente, nas **Seções 2.7.1 e 2.7.2**.

2.7.1 Teste t emparelhado

O teste t emparelhado pode ser aplicado com a finalidade de verificar se existe diferença sistemática, estatisticamente significativa, entre dois métodos a um dado nível de confiança (em geral, 95% de confiança). Para isso, é necessário considerar apenas o efeito da mudança da técnica analítica na determinação da concentração do(s) analito(s). Outras eventuais fontes de variação (por exemplo, a procedência das amostras) são isoladas por meio da análise das diferenças par-a-par, ou seja, aplicando ambos os métodos analíticos à análise das mesmas amostras analisadas. Esse procedimento – chamado de *blocagem* no jargão estatístico – permite neutralizar a influência de fatores que não interessam na comparação dos métodos (NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010).

Considere que sejam feitas “ n ” observações emparelhadas, (x_{1j} e x_{2j}) cujo $j = 1, 2, \dots, n$, resultando nos pares de valores (x_{11}, x_{21}), (x_{12}, x_{22}), ..., (x_{1n}, x_{2n}) das variáveis aleatórias (concentrações do analito estimadas por ambos os métodos) envolvidas. Admita ainda que x_{1j} e x_{2j} se distribuam normalmente com média e variância populacionais dadas, respectivamente, por μ_1 e σ_1^2 e μ_2 e σ_2^2 .

Definindo-se $d_j = x_{1j} - x_{2j}$ como a diferenças entre as observações em cada par, então “ d_j ” representa uma nova variável aleatória – também distribuída normalmente – com os parâmetros populacionais: média $\Delta = \mu_1 - \mu_2$ e variância σ_d^2 .

2.7.1.1 Teste t emparelhado baseado no conceito de intervalo de confiança

O conceito de intervalo de confiança pode ser usado para fundamentar o teste t emparelhado. Sendo assim, o intervalo de confiança para o parâmetro populacional Δ é dado pela **Equação 2.1**

$$\Delta = \left[\bar{d} - t_v \cdot \frac{s_d}{\sqrt{n}}, \bar{d} + t_v \cdot \frac{s_d}{\sqrt{n}} \right] \quad (2.1)$$

onde “ s_d ” é o desvio-padrão das diferenças “ d_j ” em relação à média amostral “ \bar{d} ”; “ t_v ” é o ponto da distribuição de Student, correspondente ao número de graus de liberdade “ $v = n - 1$ ” e ao nível de confiança adotado.

A interpretação do referido intervalo de confiança é realizada como segue:

- (i) Se o valor “zero” estiver contido no intervalo, então não existe diferença sistemática significativa, no nível de confiança estatística adotado, entre o método proposto (titulação QL-BID) e o de comparação (espectrofotométrico). Nesse caso, as médias amostrais (\bar{d}) das diferenças se distribuem normalmente com média e variância populacionais dadas, respectivamente, por $\Delta = 0$ e σ_d^2
- (ii) Se o valor “zero” não estiver no intervalo, isso significa que os resultados de ambos os métodos são estatisticamente diferentes e que existe uma diferença sistemática significativa ao nível de confiança adotado.

2.7.1.2 Teste t emparelhado baseado no teste de hipóteses

Pode-se recorrer ao teste de hipóteses formulado de modo que a hipótese nula seja dada por $\Delta = 0$, ou seja, admite-se não haver diferença estatisticamente significativa entre o método proposto e o de referência (NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010). A partir dessa hipótese, pode-se escrever:

$$\hat{t} = \frac{|\bar{d} - \Delta|}{s_d / \sqrt{n}} \quad (2.2)$$

onde \hat{t} é a estimativa do ponto de distribuição t e os demais termos da **Equação 2.2** têm significado similar ao dos termos apresentados na **Equação 2.1**.

Do ponto de vista estatístico, a estimativa \hat{t} representa o afastamento do valor amostral (\bar{d}) em relação ao populacional correspondente à hipótese nula ($\Delta = 0$), medido em unidades de erro-padrão (s_d / \sqrt{n}). Isso significa que quanto maior for o afastamento, tanto menor serão as chances da hipótese nula ser verdadeira.

Em face dos fundamentos acima, pode-se interpretar o resultado do teste de hipótese formulado da seguinte maneira:

- (i) Se o valor de $\hat{t} > t$ (extraído da distribuição t com “ v ” graus de liberdade e nível de confiança adotado), então a hipótese nula deve ser rejeitada. Isso significa que existe uma diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados de ambos os métodos.
- (ii) Do contrário $\hat{t} < t$, a hipótese nula deve ser aceita. Neste caso, conclui-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados ao nível de confiança adotado.

2.7.2 Teste de recuperação

O teste de recuperação é recomendado para avaliar a exatidão dos resultados da quantificação do(s) analito(s) quando não se dispõe de materiais de referência certificados (BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L., 1998).

O teste de recuperação é realizado confrontando-se o resultado da análise da amostra original com o da mesma amostra após a adição (fortificação) de uma quantidade conhecida do analito. Na ausência de erro sistemático, a diferença entre a concentração total do analito na amostra fortificada e a da amostra original deve, em tese, equivaler à concentração correspondente à quantidade adicionada do analito. Nesse caso, diz-se que a recuperação foi completa ou de 100 %.

Na prática a implementação envolve, pelo menos, um nível de adição do analito na fortificação da amostra de tal modo que o efeito de matriz (se houver) seja o mesmo a que o analito está sujeito na medida do sinal na amostra original. Assim, recomenda-se o seguinte procedimento:

- (i) *Medida do sinal e quantificação do analito na amostra original.* Toma-se uma alíquota da amostra original com volume V_a e o leva-se ao volume final V_f (seja no balão volumétrico ou na câmara do próprio sistema fluxo-batelada). O sinal da amostra original diluída (segundo fator de diluição, V_a / V_f) é medido e a concentração do analito (C_o) é determinada na amostra diluída (não fortificada) pelo método analítico proposto.
- (ii) *Medida do sinal e quantificação do analito após a fortificação da amostra.* Toma-se uma nova alíquota de mesmo volume da amostra original e

adiciona-se a este um volume V_{ad} da solução do analito de concentração conhecida (C_{ad}). O volume da mistura é levado ao mesmo volume final V_f e o sinal analítico total é medido. A concentração do analito na amostra diluída fortificada C_f é estimada pelo método em questão.

(iii) *Determinação da taxa de recuperação (% R)*. A percentagem de recuperação do analito na amostra diluída fortificada é dada pela **Equação 2.3**

$$\%R = \frac{C_f - C_o}{C_{ad}} \cdot 100 \quad (2.3)$$

2.7.3 Desvio padrão e desvio padrão conjunto

A precisão dos resultados da titulação QL-BID pode ser avaliada, recorrendo-se aos conceitos de desvio-padrão e desvio-padrão conjunto descritos a seguir.

Considere uma série de dados ou resultados analíticos com “j” repetições da quantidade ou grandeza observada, ou seja “ x_{ij} ” ($j = 1, 2, \dots, m$ repetições de x_i correspondentes a cada $i = 1, 2, \dots, n_i$). O desvio padrão “s” expressa uma medida da dispersão dos valores individuais “ x_{ij} ” em relação à média \bar{x}_i (NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010), ao passo que o desvio padrão conjunto “ s_{conj} ” representa a dispersão conjunta (ou agregada) ponderada pelas “j” repetições realizadas em x_i .

O desvio padrão correspondente a cada “i”, s_i , é estimado como

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{m_i - 1}} \quad (2.4)$$

onde m_i é o número de repetições ($j = 1, 2, \dots, m_i$) realizadas para cada x_i .

O desvio padrão conjunto, s_{conj} , é estimado a partir da raiz quadrada da variância conjunta, s_{conj}^2 , isto é,

$$s_{conj} = \sqrt{s_{conj}^2} \quad (2.5)$$

onde s_{conj}^2 é dada por

$$S_{\text{conj}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (m_i - 1) \cdot s_i^2}{\sum_{i=1}^n (m_i - 1)} \quad (2.6)$$

Se o número de repetições, $j = 1, 2, \dots, m_i$, realizadas para cada x_i for o mesmo “ m ” então $m_i - 1 = m - 1$. Portanto, a variância conjunta ponderada se reduz à média aritmética das variâncias individuais, isto é,

$$S_{\text{conj}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n s_i^2}{n} \quad (2.7)$$

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Estudo da vazão

Um estudo de vazão foi realizado para cada válvula solenoide (**Figura 3.1**) por meio da medida das massas correspondentes aos volumes liberados na câmara de mistura em função do tempo de acionamento das válvulas. Cada válvula foi avaliada individualmente por intermédio do bombeamento de água destilada para os tempos de acionamento 1, 3, 5, 7 e 10 s. Os volumes liberados eram direcionados para um recipiente colocado em uma balança analítica para a medição das massas correspondentes.

Por meio da equação da densidade ($d=m/V$), calculou-se com precisão o volume liberado na câmara correspondente a cada tempo de acionamento. Na **Figura 3.1** encontram-se as curvas de calibração, obtidas por regressão linear, resultantes das medidas dos volumes versus tempos de acionamento. As equações das retas foram utilizadas, posteriormente, para prever os tempos de abertura das válvulas necessários à implementação do procedimento analítico (**Seção 2.6**).

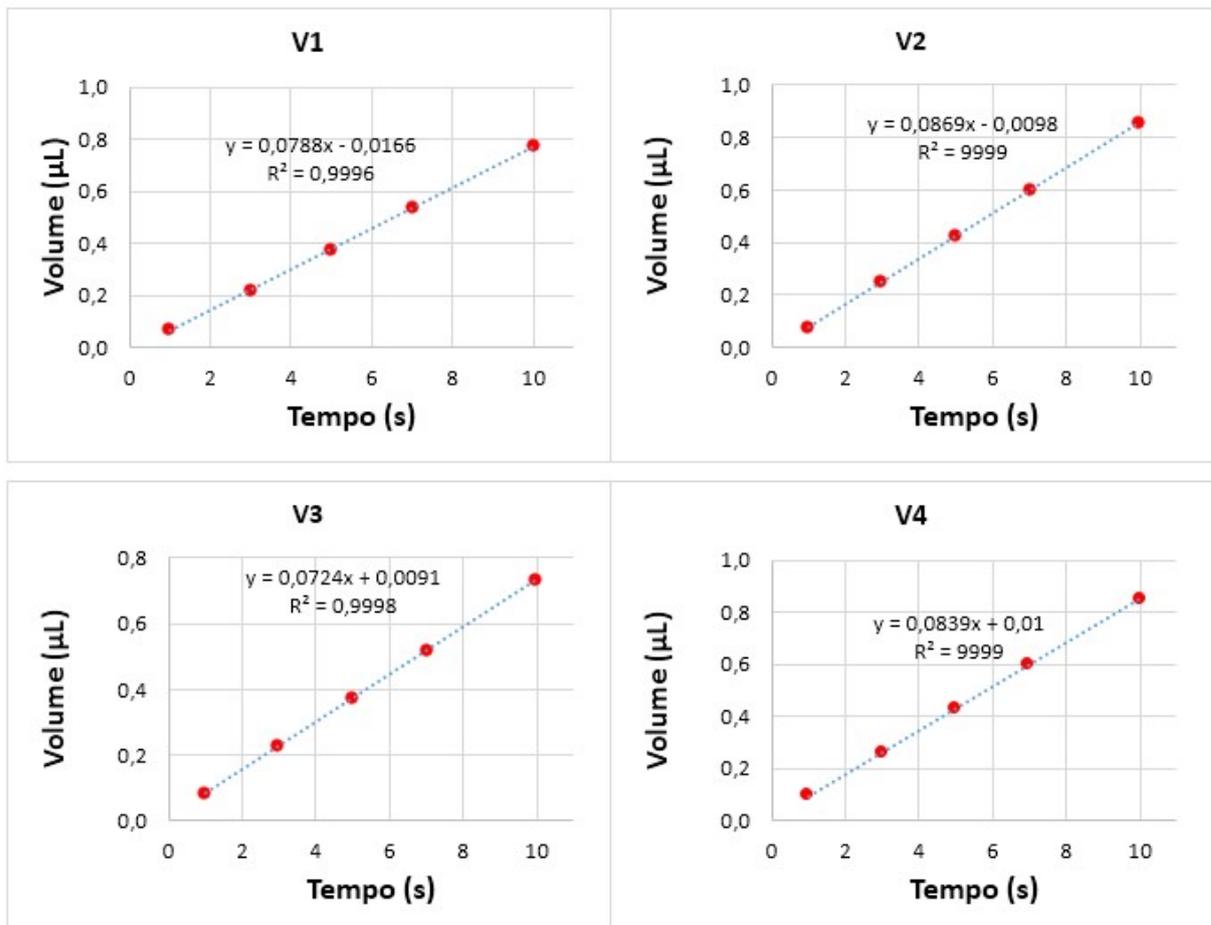


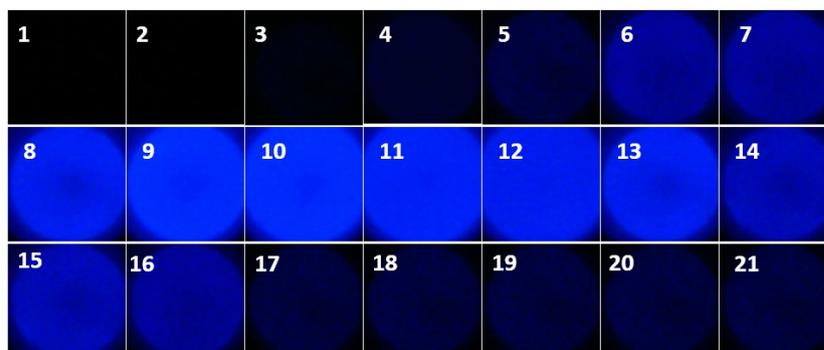
Figura 3.1 – Curvas do estudo da vazão para os canais de bombeamento de cada válvula solenoide.

3.2 Investigação do progresso do sinal quimiluminescente

Com o intuito de escolher o tempo mais apropriado para a tomada de medidas para a construção da curva de titulação, investigou-se o progresso do sinal QL nas condições estabelecidas para as análises. Para esse propósito, utilizou-se uma solução de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe^{2+} que foi submetida à reação quimiluminescente conforme descrito na **Seção 1.3**.

Na **Figura 3.2** são apresentadas, respectivamente nas partes (a) e (b), as imagens digitais e os pontos correspondentes usados no gráfico do sinal QL *versus* tempo. Como se pode observar na **Figura 3.2b**, o sinal alcança o máximo de intensidade (ápice do fenômeno QL) em torno de 200 ms. Esse tempo foi escolhido para a tomada das medidas, pois o sinal máximo é, a princípio, o mais indicado para construção da curva de titulação (sinal QL *versus* volume do titulante). A razão é que as medidas possuem uma maior relação sinal/ruído e sensibilidade, levando a uma maior variação do sinal e precisão na localização do ponto final da titulação.

(a)



(b)

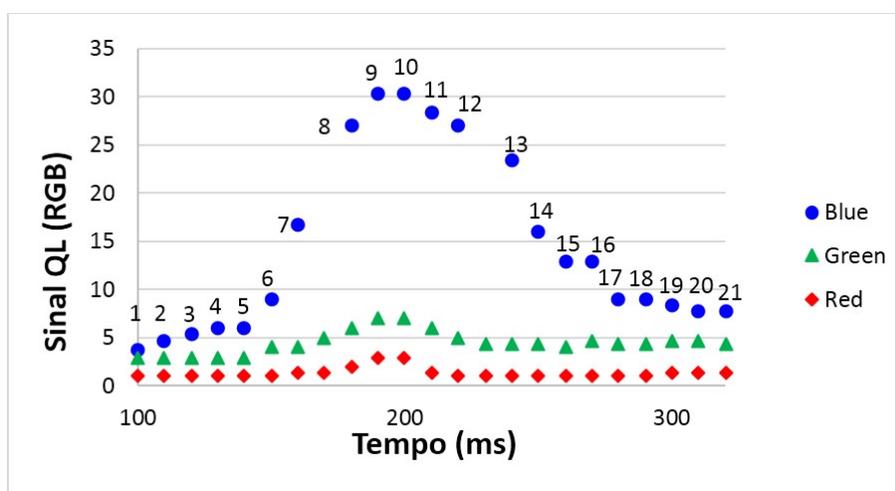


Figura 3.2 – Progresso do sinal QL em termos de (a) imagens digitais capturadas no sistema fluxo-batelada e (b) variação temporal do sinal nos canais R, G e B.

3.3 Perfil da curva de titulação quimiluminescente proposta

A titulação QL-BID em fluxo batelada, proposta neste trabalho, apresenta um perfil que é constituído de dois segmentos de reta: um antes e outro depois do ponto final associado à condição de equivalência química.

Primeiramente, seleciona-se a região mais homogênea da imagem que apresenta a maior intensidade **Figura 3.3a**, as coordenadas da região selecionada são guardadas para serem utilizadas em todas as outras imagens.

A **Figura 3.3a** mostra as áreas selecionadas no tratamento para todas as imagens em uma mesma coordenada ou posição. No tratamento das imagens escolheu-se a imagem que apresenta a maior intensidade, ou seja, a primeira da **Figura 3.3a** selecionada e destacada com círculo vermelho. Nela escolheu-se a área mais homogênea possível em destaque amarelo, variando-se a largura e o comprimento nas coordenadas X e Y mostradas no programa ilustrado na **Figura 2.2**. A partir daí, usou-se as mesmas coordenadas para o tratamento das imagens subsequentes utilizando o programa discutido na **Seção 2.2.1**.

Na determinação analítica, elegida neste trabalho, a reação envolvida na titulação é tal que o segmento antes do ponto final apresenta inclinação descendente, conforme mostrado na **Figura 3.3b**. Na **Figura 3.3a** são apresentadas as imagens, capturadas na titulação de Fe^{2+} em uma amostra de xarope, que originaram os valores do Sinal QL correspondentes aos pontos usados na curva. Todas as medidas foram feitas em triplicata para cada ponto na curva de titulação.

Com os pontos obtidos na titulação QL-BID, são obtidos no perfil da curva dois segmentos de reta (um antes e outro após o ponto final) como observado na **Figura 3.3b**. Faz-se a extrapolação desses segmentos para encontrar um ponto de interseção, cuja abscissa fornece o volume do ponto final da titulação. A cada segmento extrapolado, encontra-se associada uma reta cuja equação resultante da regressão pelos métodos dos mínimos quadrados ($y' = -0,045x + 22,12$ para o segmento da esquerda e $y'' = -0,003x + 8,806$ para o da direita) pode ser usada para encontrar a interseção com maior precisão. Substituindo-se ou igualando-se as equações em uma equação global, obtém-se o valor de “x = volume do ponto final (μL)”, conforme demonstrado abaixo:

O sistema de equações do primeiro grau envolvido é:

$$\begin{cases} y' = a'x + b' \\ y'' = a''x + b'' \end{cases} \quad (3.1)$$

Com o sistema de **Equações 3.1**, encontra-se o valor indicado na **Figura 3.3** de $x = 317 \mu\text{L}$, correspondente ao volume do titulante associado ao ponto final. Com o volume, estima-se a concentração de Fe^{2+} na amostra titulada por intermédio da estequiometria da reação. Para esse propósito, usa-se a equação do ponto de equivalência $n_{(\text{analito})} = n_{(\text{titulante})}$ para encontrar o valor de $c_{(\text{analito})}$, concentração do analito, mostrada na **Equação 3.2**:

$$\begin{aligned} n_{(\text{analito})} &= n_{(\text{titulante})} \\ c_{(\text{analito})} \cdot v_{(\text{analito})} &= c_{(\text{titulante})} \cdot v_{(\text{titulante})} \\ c_{(\text{analito})} &= \frac{c_{(\text{titulante})} \cdot v_{(\text{titulante})}}{v_{(\text{analito})}} \end{aligned} \quad (3.2)$$

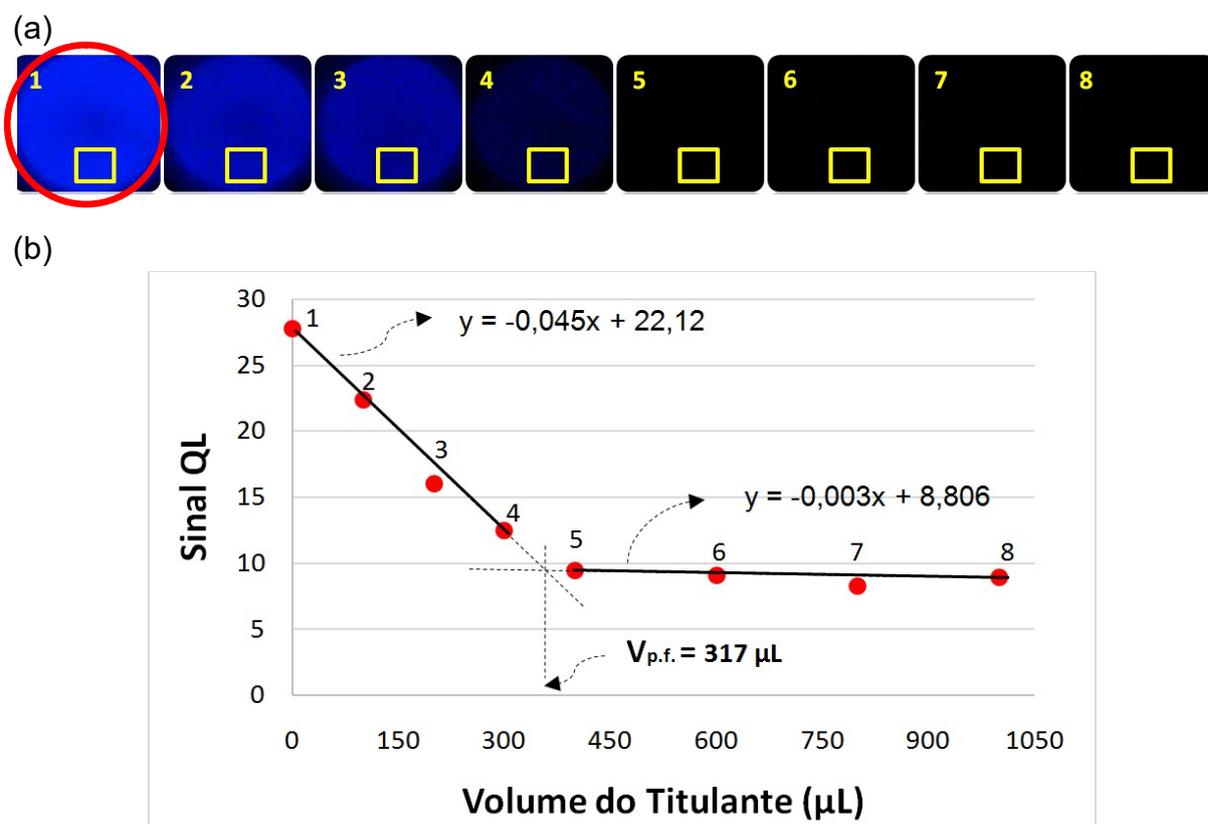


Figura 3.3 – (a) Imagens digitais adquiridas durante uma titulação QL-BID e (b) Perfil da curva de titulação obtida a partir de medidas no ápice do sinal QL (Figura 3.2).

Foram geradas trinta curvas de titulações semelhantes à curva mostrada na **Figura 3.3** e usadas para estimar a concentração de Fe^{2+} nas dez amostras de xarope analisadas. Para isso aplicou-se o mesmo processo matemático de substituição descrito, empregando-se **Equações 3.1** e **3.2**. Os resultados encontram-se nas **Tabela 3.1** e **3.2** para visualização e avaliação.

3.4 Titulação QL-BID aplicada à determinação de Fe²⁺ em sulfato ferroso

Na **Tabela 3.1**, são apresentados os valores das concentrações de Fe²⁺ estimados nas amostras de xarope a partir do volume do ponto final extraído das curvas de titulação QL-BID. Para fins de comparação, são mostrados também os resultados das análises das mesmas amostras pelo método de referência. Em ambos os casos, os valores representam a média das concentrações de Fe²⁺ estimadas a partir dos resultados de três determinações analíticas repetidas (n=3). Estimou-se também o desvio padrão individual que é apresentado em torno da média do resultado da análise de cada amostra, ou seja, na forma $\bar{x} (\pm s)$.

Aplicou-se o teste-*t* emparelhado, descrito na **Seção 2.7.1**, para verificar se havia concordância entre os resultados obtidos por ambos os métodos. De acordo com o teste de hipóteses descrito na **Seção 2.7.1.1**, o valor de *t* igual a 0,929 (em módulo) foi obtido a partir das diferenças par-a-par entre os valores de concentração para o número de graus de liberdade ($\nu=9$, n=10 amostras). Comparando-se esse valor com o do ponto $t_9=2,262$ (extraído da distribuição estatística teórica “*t*”), conclui-se que a hipótese nula deve ser aceita. Isto significa dizer que não existe diferença sistemática, estatisticamente significativa, entre os resultados de ambos os métodos.

Essa inferência pode ser corroborada pelo resultado do teste *t* baseado no conceito de intervalo de confiança, descrito na **Seção 2.7.1.2**. O intervalo para o valor populacional da média das diferenças par-a-par, obtido ao nível 95% de confiança, é $\Delta = [-0,243, +0,035]$. Dado que esse intervalo inclui o valor “zero”, conclui-se que os resultados da titulação proposta são, estatisticamente, similares aos obtidos pelo método de referência corroborando a inferência anterior.

Em relação à precisão, o desvio-padrão conjunto (**Seção 2.7.3**) foi usado para a comparação global entre os resultados das análises das dez amostras por ambos os métodos. Pode-se constatar que o método de referência apresentou uma eficiência ligeiramente melhor que a da titulação QL-BID proposta neste trabalho. Não obstante, pode-se considerar a precisão da titulação satisfatória tendo em vista que o Fe²⁺ foi determinado nas amostras diluídas (em $\mu\text{g L}^{-1}$) e os resultados expressos em mg L^{-1} considerando o fator de diluição. Além disso, pode-se atribuir essa perda de precisão dos resultados das titulações às flutuações das medidas no

decorrer das análises, decorrentes do desgaste de alguns materiais (por exemplo, tubos de bombeamento) do sistema fluxo-batelada.

Tabela 3.1 – Resultados das análises, em triplicata, de dez amostras de xarope sulfato ferroso usando o método proposto (Titulação QL-BID) e o de referência.

Amostra	Titulação QL-BID	Método de referência
	Fe ²⁺ , mg L ⁻¹	Fe ²⁺ , mg L ⁻¹
1	4,9 (± 0,2)	4,5 (± 0,0)
2	5,0 (± 0,3)	4,9 (± 0,1)
3	5,0 (± 0,4)	5,1 (± 0,1)
4	5,3 (± 0,1)	5,3 (± 0,0)
5	5,0 (± 0,3)	5,0 (± 0,0)
6	4,8 (± 0,3)	4,5 (± 0,0)
7	4,7 (± 0,1)	4,7 (± 0,1)
8	5,0 (± 0,0)	4,9 (± 0,1)
9	5,5 (± 0,5)	5,3 (± 0,0)
10	5,4 (± 0,1)	5,2 (± 0,0)
S_{conj}	0,3	0,1

Com o intuito de avaliar o desempenho da titulação QL-BID em termos de exatidão dos resultados das análises, recorreu-se ao teste de recuperação descrito na **Seção 2.7.2**. Os resultados encontram-se na **Tabela 3.2**, onde são apresentados os valores das concentrações das dez amostras não fortificadas e fortificadas com 150 µg L⁻¹ em Fe²⁺, assim como as taxas de recuperação correspondentes. Pode-se observar que os valores das taxas de recuperação são próximos a 100%, variando na faixa entre 93 e 108% para amostras individuais. A taxa média foi estimada como sendo igual a 101% de recuperação para as amostras fortificadas, indicando que os resultados das titulações QL-BID não apresentam evidência de erro sistemático. Essa avaliação é importante para detectar eventuais erros sistemáticos nos resultados das análises provenientes de fontes diversas (por exemplo, no analisador em fluxo-batelada e/ou no sistema químico), embora nessa aplicação a matriz envolvida não apresente interferência que contribua para esse tipo de erro.

A titulação QL-BID apresentou a frequência analítica de 18 titulações por hora e o consumo por titulação de 0,2 mL de luminol e 2,4 mL de amostra. Na avaliação da performance da titulação proposta, é possível constatar a viabilidade prática e a confiabilidade das medidas realizadas na determinação do analito Fe^{+2} em amostras de xarope sulfato ferroso.

Tabela 3.2 – Resultados do teste de recuperação para dez amostras (não fortificadas e fortificadas), cujos valores são expressos em termos da concentração (n=3).

Titulação QL-BID proposta			
Amostra	Fe^{2+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) [*]	Fe^{2+} ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^{**}	Taxa de recuperação (%)
1	294	455	107
2	297	441	96
3	297	442	97
4	317	461	96
5	302	464	108
6	290	446	104
7	279	422	95
8	300	461	107
9	328	468	93
10	324	479	103
			Média = 101

Amostra: (*) não fortificada e (**) fortificada com $150 \mu\text{g L}^{-1}$ em Fe^{2+}

Capítulo 4

Conclusão

4.1 Conclusão

Neste trabalho, realizou-se um estudo visando o desenvolvimento de uma titulação quimiluminescente baseada em imagem digital (titulação QL-BID), cujo potencial analítico foi avaliado na determinação de Fe^{2+} em xarope de sulfato ferroso. Para isso, montou-se um sistema de análise em fluxo-batelada usando uma *webcam* acoplada à câmara de mistura para aquisição das imagens digitais.

A norma do vetor no espaço tridimensional RGB foi utilizada para definir a resposta analítica empregada na construção das curvas de titulação QL-BID. Essa base matemática foi, inicialmente, desenvolvida e usada como resposta na construção de curvas analíticas baseadas em medidas de emissão atômica (LYRA, W.S. et al., 2011). No presente trabalho, essa abordagem foi diretamente adaptada em virtude do fenômeno quimiluminescente também envolver emissão de radiação cuja intensidade é proporcional à concentração do analito.

Na avaliação do potencial do método proposto, comparou-se os resultados das titulações QL-BID com os obtidos pelo método espectrofotométrico de referência nas análises de 10 (dez) amostras de sulfato ferroso adquiridas no comércio local. A concordância entre os resultados foi verificada, estatisticamente, adotando-se o teste *t* emparelhado e o teste de recuperação. A aplicação do teste *t* revelou que não existem diferenças sistemáticas, estatisticamente significativas, entre ambos os resultados ao nível de 95% de confiança. O teste de recuperação resultou na recuperação média de 101%, cujos valores individuais ficaram muito próximos dos 100% indicando a ausência de erro sistemático.

Apesar dos resultados da avaliação do potencial da titulação QL-BID serem satisfatórios na aplicação adotada, o método proposto apresenta algumas limitações que podem ser superadas para torná-lo mais eficiente para análise quantitativa. De fato, o sistema QL-BID apresentou a frequência analítica de 18 titulações por hora e o consumo por titulação de 0,2 mL de luminol e 2,4 mL de amostra. Assim seu desempenho poderá ser melhorado em termos do aumento da velocidade analítica e diminuição do consumo do reagente e amostra.

Para melhorar o desempenho da titulação QL-BID pode-se recorrer, por exemplo, a um algoritmo de otimização unidimensional tal como o método Fibonacci (HONORATO, R.S. et al. 1999). Além disso, pode-se buscar outros caminhos para seu aprimoramento ou otimização em trabalhos futuros a exemplo dos mencionados na **Seção 4.2**.

4.2 Propostas de trabalhos em continuação

Como propostas de trabalhos futuros na linha de titulação quimiluminescente, destacam-se as possibilidades:

- aprimoramento da titulação proposta implementando um processo de filme digital, tal como reportado na literatura por LIMA, R.A.C. e colaboradores (LIMA, R. A. C. et al., 2016).
- realização de estudos detalhados sobre os reagentes intensificadores de sinal a fim de promover um aumento da sensibilidade.
- aplicar a metodologia à determinação de outros íons metálicos como analitos, os quais podem atuar como "catalisador" no sistema.
- ampliar o leque de aplicações da titulação QL-BID para determinações envolvendo outros reagentes quimiluminescente, a exemplo da luciferina.
- Exploração do potencial de detecção bidimensional (espacial) por imagem ou filme digital para o desenvolvimento de titulação QL simultânea.

Referências

ALBERTIN, R.; et al., **Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos demonstração para a sala de aula**, Química Nova. 21: 772,1998.

ANDRADE, R. A. N., **Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação Quimiluminescente de Vitamina B12 em Medicamentos**, João Pessoa, UFPB, 2011. Dissertação de Mestrado.

ANDRADE, S. I. E. **Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas**. João Pessoa, Departamento de Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 2012. 89p.

AZEVEDO, E.; CONCI, A., **Teoria da computação gráfica**, Rio de Janeiro: Campus, 2003.

BAEYENS, W.R.G. et al., **Chemiluminescence-based detection: principles and analytical applications in flowing streams and in immunoassays**, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 17: 941–953, 1998.

BAUSE, Daniel E. e PATTERSON, Howard H., **Enhancement of Luminol Chemiluminescence with Halide Ions**, Anal. Chem. 51: 2288-2289, 1979.

BERNS, R.S., **Principles of colour technology**, 3^a Ed., New York: Wiley, 2000.

BOWIE, Andrew R. et al., **Analytical Applications of Liquid Phase Chemiluminescence Reactions — A Review**, J Biolumin Chemilumin, 11:61-90, 1996.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L., **Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method**, Mikrochim. Acta128:93-106, 1998.

CHANG, Cheng A. e PATTERSON, Howard H., **Halide Ion Enhancement of Chromium(III), Iron(II), and Cobalt(II) Catalysis of Luminol Chemiluminescence**, Anal. Chem. 52: 653-656, 1980.

CHOUHAN, R.S. et al., **Detection of methyl parathion using immuno-chemiluminescence based image analysis using charge coupled device**, Biosensors and Bioelectronics, 21: 1264–1271, 2006.

DIAZ, Aurora N. et al., **Sensitive chemiluminescent immunoassay of**

- triclopyr by digital image analysis**, *Talanta*, 97: 42–47, 2012.
- DINIZ, Paulo H. G. D. et al., **Flow-Batch Analysis: fundamentals and applications**, *Trends in Analytical Chemistry*, 35: 39-49, 2012.
- DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. **Chemiluminescence as diagnostic tool**. A review. *Talanta*, 51: 415–439, 2000.
- DONGGU, H. et al., **Attomolar detection of cytokines using a chemiluminescence immunoassay based on an antibody-arrayed CMOS image sensor**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221: 1248–1255, (2015).
- FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V., **A Quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise**, *Química Nova*, 25: 1003–1011, 2002.
- GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G., **Chemiluminescence in Analytical Chemistry**, New York: Marcel Dekker, 2001.
- GARCÍA-CAMPAÑA, A.M. e BAEYENS,W.R.G., **Principles and recent analytical applications of chemiluminescence**, *Analisis*, 28: 686-698 , 2000.
- GELADI, P.; GRAHN, H., **Multivariate image analysis**. 2ª Ed. New York: Wiley, 1996.
- GONZALEZ, R.C.; WOODS, R.E., **Processamento de imagens digitais**, São Paulo, Edgard Blucher LTDA, 2000.
- HONORATO, R.S. et al., **A flow-batch titrator exploiting a onedimensional optimisation algorithm for end point search**. *Analytica Chimica Acta*, 396:91, 1999.
- KAI, Masaaki et al., **A chemiluminescence derivatization method for detecting nucleic acids and DNA probes using a trimethoxyphenylglyoxal reagent that recognizes guanine**, *Anal. Chim. Acta*, 381: 155-163, 1999.
- KANG, J.M.S. Lee e DAVID G. Gorenstein., **Chemiluminescence-based electrophoretic mobility shift assay of heparin–protein interactions**, *Analytical Biochemistry*, 349: 156–158, 2006.
- KHAN, P. et al, 2014, **Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses**, *Appl Biochem Biotechnol*,

173: 333–355, 2014.

LARA, F. J. et al., **Applications of capillary electrophoresis with chemiluminescence detection in clinical, environmental and food analysis. A review**, *Analytica Chimica Acta*, 913: 22-40, 2016.

LIMA, R. A. C. et al., **Digital movie-based on automatic titrations**, *Talanta*, 147: 226–232, 2016.

LUO, Lirong et al., **Chemiluminescent imaging detection of staphylococcal enterotoxin C1 in milk and water samples**, *Food Chemistry*, 97: 355–360, 2006.

LUO, Lirong; ZHANG, Zhujun e HUO, Lingyan., **Development of a gold nanoparticles based chemiluminescence imaging assay and its application**, *Analytica Chimica Acta*, 584: 106–111, 2007.

LUO, Lirong; ZHANG, Zhujun e MA, Lifeng, **Determination of recombinant human tumor necrosis factor- α in serum by chemiluminescence imaging**, *Anal. Chim. Acta*, 539: 277-282, 2005.

LYRA, W.S. et al., **Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (*webcam*) flame emission spectrometric method**, *Anal. Methods*, 3: 1975–1980, 2011.

MARCH, C. et al., **Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera**, *Journal of Immunological Methods*, 303 92-104, 2005.

MICHL, J., **The role of biradicaloid geometries In organic photochemistry**, *Photochemistry und Photohiology*, 25: 141—154, 1977.

MIRASOLI, Mara et al., **Development of a chemiluminescence-based quantitative lateral flow immunoassay for on-field detection of 2,4,6-trinitrotoluene**, *Analytica Chimica Acta*, 721: 167– 172, 2012.

MONEMI, N. et al., **CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein**, *Anal. Chim. Acta*, 387: 21-27, 1999.

MOREIRA, P. N. T., **Planejamento e Otimização de um Método Quimiluminescente para Determinação de Vitamina B12 Usando um Sistema Fluxo-Batelada**, João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de doutorado.

MORITA, T.; Assumpção, R.M.V. **Manual de Soluções Reagentes e Solventes. Padronização Preparação Purificação**, 2^a. Edição, Editora Edgard Blucher Ltda, 2007.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E., **Como fazer experimentos**, 4^a Ed. Campinas: Editora Unicamp, 2010.

RICH, Edwin S. et al., **The Spatial Distribution of Light Emission From Liquid Phase Bio- And Chemiluminescence: Variations With Container Types, Turbidity And Container Frosting**, Photochemistry and Photobiology, 33: 727-736, 1981.

ROBARDS, K.; WORSFLOD, P.J., **Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence**, Analytica Chimica Acta, 266: 147-173, 1992.

RODA, Aldo. et al., **Bio-and chemiluminescence imaging in analytical chemistry**, Anal. Chim. Acta, 541: 25-36, 2005.

RODA, Aldo. et al., **Integrating Biochemiluminescence Detection on Smartphones: Mobile Chemistry Platform for Point-of-Need Analysis**, Anal. Chem. 86: 7299–7304, 2014.

RUZICKA, J. e HANSEN, E.H., **Flow injection analysis**, 2^a Ed. New York, [etc.]: John Wiley & Sons, 1988.

SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F. e COSTA, M.F.D., **Quimiluminescência e Bioluminescência**, Quim. Nova, 16: 200-209, 1993.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R; WEST, D.M., **Fundamentos de Química Analítica**, 9^a Ed. Porto Alegre: Bookman, 2014.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., **Princípios de análise Instrumental**, 6^a Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

WANG, Li e ZHANG, Zhujun, **Molecular imprinted polymer-based chemiluminescence imaging sensor for the detection of trans-resveratrol**,

Anal. Chim. Acta, 592: 115-120, 2007.

XU, Hao. et al., **Study on the chemiluminescence resonance energy transfer between luminol and fluorescent dyes using a linear CCD spectrometer**, Journal of Luminescence, 130: 1872–1879, 2010.

ZANGHERI, M. et al., **A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection**, Biosensors and Bioelectronics, 64: 63-68, 2015.

ZENG, Z. et al., **Portable Electrowetting Digital Microfluidics Analysis Platform for Chemiluminescence Sensing**, IEEE Sensors Journal, 16: 4531 - 4536, 2016.