



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

Dissertação de Mestrado

Um Micro *Flow-Batch* para Determinação Fotométrica
e Turbidimétrica de Taninos em Amostras de Chás

Marcelo Batista de Lima

João Pessoa – PB - Brasil

Setembro/2010



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

Dissertação de Mestrado

Um Micro *Flow-Batch* para Determinação Fotométrica e Turbidimétrica de Taninos em Amostras de Chás

Marcelo Batista de Lima*

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

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

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

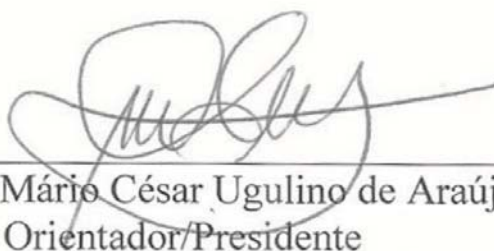
João Pessoa – PB - Brasil

Setembro/2010

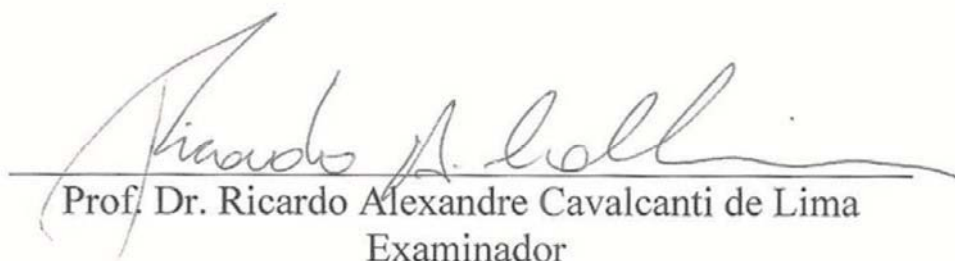
Um Micro *Flow-Batch* para Determinação Fotométrica e Turbidimétrica de Taninos em Amostras de Chás

Dissertação de mestrado submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química

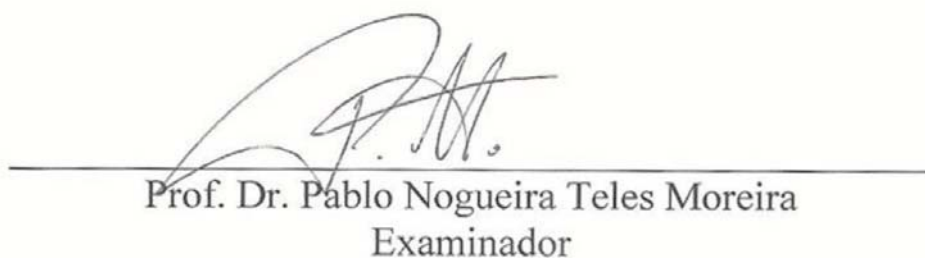
Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
Examinador



Prof. Dr. Pablo Nogueira Teles Moreira
Examinador

“É melhor tentar e falhar, que se preocupar em ver a vida passar.
É melhor tentar ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar a em dias tristes em casa me esconder.
É melhor ser feliz embora louco, do que em conformidade viver”

Martin Luther King

Dedico este trabalho a todos que diretamente contribuíram
significativamente para o seu desenvolvimento.

Agradecimentos

- A minha mãe, Maria Batista de Lima e a minha avó de coração, Maria Dinalva Ferreira de Andrade, pela constante presença e incentivo;
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo pelo gentil acolhimento no LAQA, a oportunidade de orientação e aos seus ensinamentos prestados.
- Aos amigos professores do IFPB, Carlos Alberto de Oliveira e Umberto Gomes da Silva Júnior por serem os primeiros a despertar em mim o gosto pela ciência química.
- Aos companheiros de pesquisa Stéfani lury, Sílvio do Monte e Yebá Ngoamãñ pela amizade e auxílio significativo prestado no decorrer desses dois longos anos.
- A Wellington da Silva Lyra pelo conhecimento, disponibilidade e paciência dedicada sempre que solicitado a esse trabalho.
- Aos amigos Hebertty Vieira, Sófacles Figueredo, Paulo Diniz, Fernanda Vera Cruz e Adamastor Rodrigues pela presença constante nessa caminhada.
- A todos os demais membros do LAQA pela amizade, companheirismo e bom humor sempre presente.
- A Deus, fonte de energia potencial máxima do universo.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 - Caracterização da Problemática	2
1.2 - Objetivos	3
1.2.1 - Geral	3
1.2.2 - Específicos	3
1.3 - Microfabricação de Sistemas de Análises Químicas	4
1.3.1 - Técnicas Clássicas	7
1.3.2 - Técnicas Alternativas	8
1.3.2.1 - Microfabricação em uretana-acrilato	10
1.4 - Sistemas Automáticos de Análise	13
1.4.1 - Analisador Flow-Batch	15
1.5 - Espectroscopia	17
1.5.1 - Fotometria	19
1.5.2 - Turbidimetria	21
1.6 - Chá	23
1.7 - Taninos	26
1.7.1 - Análise de taninos	31
1.7.2 - Considerações sobre os Métodos de Análise Empregados	33
Capítulo 2 - Experimental	37
2.1 - Reagentes, Amostras e Soluções	38
2.1.1 - Análise de Corantes	38
2.1.2 - Análise de Taninos	39

2.2 – Equipamentos	40
2.2.1 - Microsistema de análise	40
2.3 - Miniaturização do Flow-Batch	42
2.3.1 – Programa de gerenciamento do sistema	49
2.4 - Avaliação do Sistema Proposto	52
2.5 - Procedimentos para Avaliação da Performance Analítica	58
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	63
3.1 - Determinação dos Corantes Alimentícios	64
3.2 - Determinação de Taninos em Chás	71
3.2.1 - Método Fotométrico do Tartarato Ferroso	71
3.2.2 - Método Turbidimétrico do Cobre em Tampão Acetato	78
3.2.3 - Comparação dos resultados obtidos no μ FBA	84
Capítulo 4 - Conclusão	85
4.1 - Conclusão	86
4.2 - Perspectivas	87
Capítulo 5 - Referências	89

Lista de Figuras

Figura 1.1	Representação da miniaturização como convergência dos objetivos principais das ciências analíticas.	5
Figura 1.2	Esquema geral das etapas básicas para miniaturização analítica.	8
Figura 1.3	Esquema geral simplificado para microfabricação em uretana-acrilato. (a) montagem do molde, (b) molde, (c) deposição da resina, (d) fixação da resina, (e) polimerização, (f) sistema polimerizado, (g) selagem e (h) microsistema selado.	12
Figura 1.4	Diagrama esquemático de um sistema de análise em fluxo simples. (a) exemplos de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) exemplos de sistemas de injeção, (c) exemplo de sistemas de mistura e (d) exemplo de detectores.	14
Figura 1.5	Esquema simplificado com os componentes principais de um sistema de análise em fluxo-batelada. (a) câmara de mistura, (b) válvulas solenóides, (c) agitador magnético, (d) bomba peristáltica, (e) acionador de válvulas, (g) computador para administração, (f) detector, espectrofotômetro, por exemplo.	17
Figura 1.6	Representação esquemática de um feixe de radiação P_0 sendo atenuado após interagir com a amostra resultando na radiação emergente P .	18
Figura 1.7	Representação típica dos espectros de emissão de LEDs comerciais.	20
Figura 1.8	Esquema representando a interação da radiação incidente com a amostra particulada.	22
Figura 1.9	Estruturas moleculares. (a) catequina e (b) tanino condensado (proantocianidina) formado por monômeros de catequinas.	28
Figura 1.10	Estrutura química do ácido tânico, um galotanino. Observe que os radicais de ácido gálico nas quantidades monoméricas l, m, n podem ser de 0 a 3.	29

Figura 1.11	Estrutura química do Oenothein A, um elagitanino.	30
Figura 1.12	Esquema representando a reação do íon cobre (II) com dois monômeros de catequinas, observe que a reação ocorre entre o íon e os grupos ortodihidroxifenil em pH 5,5 com liberação de quatro íons H ⁺	35
Figura 2.1	Representação esquemática da confecção do μ FBA. (a) montagem dos moldes, (b) moldes das camadas, (c) polimerização da resina nas camadas, (d) canais gravados, (e) selagem do sistema e (f) sistema μ FBA confeccionado.	43
Figura 2.2	Sistema μ FBA prototipado em uretana-acrilato. (a) comparação das dimensões do sistema com uma moeda, (b) detalhe da selagem.	44
Figura 2.3	Imagem do sistema μ FBA desenvolvido para análise dos corantes. (a) dispositivo microfabricado, (b) LED branco, (c) agitador, (d) fibra óptica do <i>ocean optics</i> e (e) suporte de acrílico.	45
Figura 2.4	Imagem do sistema desenvolvido para análise dos taninos em chá. (a) dispositivo μ FBA, (b) LED verde, (c) agitador (d) fototransistor e (e) bateria de 12V para alimentação.	46
Figura 2.5	Mini-válvulas solenóides acopladas na parte posterior da caixa contendo o sistema μ FBA.	47
Figura 2.6	Imagem do sistema automático micro flow-batch montado com os componentes utilizados para a análise dos corantes. (a) caixa contendo o μ FBA e outros componentes, (b) <i>ocean optics</i> , (c) interface USB, (d) acionador de válvulas, (e) bomba peristáltica e (f) frascos das soluções.	48
Figura 2.7	Imagem dos componentes do analisador automático montado, utilizado para análise dos taninos. (a) caixa contendo o microssistema e outros componentes, (b) interface USB, (c) acionador de válvulas, (d) bomba peristáltica e (e) frascos das soluções.	48
Figura 2.8	Interface de controle automático do μ FBA para análise de taninos em chás.	50

Figura 2.9	Interface de controle automático do μ FBA para análise dos corantes e interface do <i>Ocean Optics</i> utilizada para tomada do espectro.	51
Figura 2.10	Oscilação do sinal na análise dos corantes pela presença do fio de nylon como agitador, (a) no caminho óptico, (b) fora do caminho óptico e (c) fora do sistema.	52
Figura 2.11	Diagrama esquemático do μ FBA para análise dos corantes (a) e o diagrama de tempo do processo de análise (b).	54
Figura 2.12	Diagrama esquemático do μ FBA para a análise dos taninos pelo método fotométrico (a) e o diagrama de tempo do processo de análise (b).	55
Figura 2.13	Diagrama esquemático do μ FBA para a análise dos taninos pelo método turbidimétrico (a) e o diagrama de tempo do processo de análise (b).	57
Figura 2.14	Curvas de calibração e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b).	60
Figura 3.1	Curvas de calibração analítica mFBA (linha azul pontilhada) e HP (linha preta cheia).	67
Figura 3.2	Gráfico dos resíduos dos modelos de calibração HP e μ FBA, respectivamente, para os três corantes analisados.	68
Figura 3.3	Curvas de calibração comparativas entre Micronal (linha preta pontilhada) e μ FBA (linha azul cheia), HP (linha preta cheia) e μ FBA (linha azul cheia), respectivamente, para o método fotométrico do tartarato ferroso.	74
Figura 3.4	Gráfico dos resíduos dos modelos de calibração HP, Micronal e μ FBA, respectivamente para o método fotométrico do tartarato ferroso.	75
Figura 3.5	Curvas de calibração comparativas entre Micronal (linha preta pontilhada) e μ FBA (linha azul pontilhada), HP (linha preta cheia) e μ FBA respectivamente para o método turbidimétrico.	80
Figura 3.6	Gráfico dos resíduos dos modelos de calibração para o ácido tânico, método do cobre em tampão acetato.	81

Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Importância dos taninos em processos vegetais.	27
Tabela 1.2	Principais métodos empregados para determinação de taninos.	33
Tabela 2.1	ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.	61
Tabela 3.1	Comparação entre LOD e LOQ (em mg L ⁻¹) para a determinação dos corantes entre o instrumento proposto (μ FBA) e referência (HP), a 95% de confiança estatística.	65
Tabela 3.2	Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos pelos métodos mFBA e HP.	65
Tabela 3.3	Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas para ANOVA.	69
Tabela 3.4	Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração dos corantes.	70
Tabela 3.5	Resultados da determinação das amostras sintéticas dos corantes.	71
Tabela 3.6	Comparação dos resultados de LOD e LOQ, em mg L ⁻¹ a 95% de confiança, para determinação do teor de tanino pelo método fotométrico.	72
Tabela 3.7	Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos.	73
Tabela 3.8	Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), método fotométrico do tartarato ferroso.	76
Tabela 3.9	Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração, método tartarato ferroso.	77
Tabela 3.10	Valores médios de concentração (n=3) das amostras de chá pelo método fotométrico do tartarato ferroso.	77
Tabela 3.11	Comparação dos resultados de LOD e LOQ, em mg L ⁻¹ , a 95% de confiança, para determinar o teor de tanino pelo método turbidimétrico do cobre em tampão acetato.	78

Tabela 3.12	Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos pelo método turbidimétrico do cobre em tampão acetato.	79
Tabela 3.13	Soma quadrática e médias quadráticas calculadas para ANOVA da análise dos padrões de tanino em tampão acetato.	82
Tabela 3.14	ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração pelo método turbidimétrico.	83
Tabela 3.15	Valores médios de concentração preditas (n=3) das amostras de chá pelo método do cobre em tampão acetato.	83
Tabela 3.16	Resultados obtidos para a análise dos chás pelos métodos fotométrico (referência) e turbidimétrico proposto.	84

Lista de Siglas e Abreviaturas

μ-TAS	<i>Miniaturized total chemical analysis system</i> – sistema miniaturizado de análise química total
TAS	<i>Total chemical analysis system</i> – sistema de análise química total
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Poli(trifluoro)etileno
PVC	Policloreto de vinila
PE	Poliestireno
LIGA	<i>Lithography, galvo and abformung</i> – litografia, eletroformação e moldagem
UA	Uretana-acrilato
dpi	<i>Dots per inch</i> – pontos por polegada
FIA	<i>Flow injection analyser</i> – análise por injeção em fluxo
FBA	<i>Flow-batch analyser</i> – análise em fluxo-batelada
UV-Vis	Ultravioleta-visível
LED	<i>Light emitting diode</i> – diodo emissor de luz
REM	Radiação eletromagnética
Da	Dalton – unidade de massa atômica
μFBA	<i>Micro flow-batch analyser</i> – microsistema de análise em fluxo-batelada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>

LOD	<i>Limit of detection</i> – limite de detecção
LOQ	<i>Limite of quantitation</i> – limite de quantificação
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – análise de variância

Resumo

Título: **Um Micro *Flow-Batch* para Determinação Fotométrica e Turbidimétrica de Taninos em Amostras de Chás**

Neste trabalho de pesquisa foi proposto o uso da técnica de microfabricação em polímero comercial uretana-acrilato para a miniaturização de um sistema automático de análises químicas em fluxo-batelada, o *flow-batch*. O microssistema desenvolvido foi avaliado e otimizado pela análise de amostras sintéticas de corantes. Posteriormente, o microssistema, foi empregado para a determinação de taninos, grupo de polifenóis de expressiva relevância industrial, em amostras de chá verde e preto, por dois métodos ópticos distintos, fotométrico e turbidimétrico. A técnica de microfabricação em uretana-acrilato se caracteriza pelos baixos custos de implementação e manutenção, satisfatórias propriedades físico-químicas do polímero e a rápida prototipagem de sistemas microfluídicos. Tais características aliadas às vantagens inerentes da miniaturização de dispositivos analíticos, como a elevada frequência de análise e a baixa geração de resíduos, conferem a esse sistema de análise uma ótima fonte de pesquisa acadêmica. Para análise dos taninos em amostras de chá, o sistema apresentou resultados precisos e exatos, além de uma alta velocidade analítica para ambos os métodos ópticos, sendo capaz de executar até 300 análises por hora, no método fotométrico e 200 análises por hora pelo método turbidimétrico. Cada análise efetuada gerou resíduos cujos volumes foram inferiores a 70 μL . Os dados de validação estatística dos modelos obtidos se mostraram bastante satisfatórios e promissores para novas aplicações ópticas.

Palavras-chave: microssistema analítico, micro *flow-batch*, uretana-acrilato, tanino.

Abstract

Title: **A Micro Flow-Batch for Photometric and Turbidimetric Determination of Tannins in Tea Samples**

This study proposed a miniaturized flow-batch system for chemical analysis. The technique used microfabricated urethane-acrylate, a commercial polymer. The microsystem was evaluated and optimized by analysis of synthetic dye samples. Afterwards, it was employed for the determination of tannins in tea samples. The tannins are a group of polyphenols of significant relevance in the food industry and pharmaceuticals. The samples used were green and black tea, obtained from the local market. The determinations were performed by turbidimetric methods using copper (II) in an acetate medium, with photometric methods and ferrous tartrate as a reference. Miniaturization in urethane-acrylate implies low cost and low maintenance, rapid prototyping and includes the satisfactory physicochemical properties of polymer. These characteristics combined with the general advantages of miniaturization in analytical devices, such as high frequency analysis and low waste generation, make the system a great source in academic research. For analysis of tannins in tea samples, the system had precise and accurate results, and high speeds. This flow-batch microsystem was able to perform up to 300 tests per hour, for the photometric method of reference and up to 200 tests per hour for the turbidimetric method. Each analysis performed generated waste volumes lower than 70 μL . Data validation of statistical models obtained have proved very satisfactory and promising for new optical applications.

Keywords: analytical microsystem, micro flow-batch, urethane-acrylate, tannin.



Capítulo 1 - Introdução

1.1 - Caracterização da Problemática

O acentuado desenvolvimento da microeletrônica, a partir da segunda metade do século XX, fundamental para os avanços das tecnologias contemporâneas, favoreceu de forma determinante as pesquisas na área de microanalítica. A miniaturização de sistemas analíticos torna-se justificável pela significativa diminuição do volume de reagentes e amostras empregadas para análises gerais e de rotina, bem como uma maior velocidade ou frequência analítica e portabilidade do instrumento. Tal justificativa pode ser enfatizada especialmente quando estes procedimentos apresentam baixa disponibilidade de amostras e/ou elevado valor dos reagentes [1-7].

O desafio para se fabricar um sistema de microanálise está em reunir todos os componentes e operações necessárias para uma ou várias análises químicas em um único dispositivo [2,3,5]. Estes dispositivos apresentam dimensões reduzidas da ordem de poucos milímetros, e são conhecidos como μ -TAS (microssistemas de análise total) [3] ou *Lab on a chip* (laboratório em um chip) [8]. Entretanto, tal proposta requer um elevado custo de implementação e manutenção, por serem oriundas de sofisticados procedimentos da microeletrônica. Desta forma, a sua utilização se restringe a grandes laboratórios industriais e centros de pesquisa de alta tecnologia, tornando-se inviável para instituições de menor porte [2,9,10].

Alternativamente, existem soluções tecnológicas mais simples, geralmente com a utilização de polímeros, proporcionando assim uma significativa redução dos custos e resultados analíticos satisfatórios [2,9,10]. A técnica utilizada neste trabalho contribui para a formação dos sistemas de microanálise, parcela fundamental e crítica nas pesquisas dessa área, através da polimerização de uma resina comercial, uretana-acrilato, por fotolitografia no ultravioleta [11,12,13]. A presente pesquisa realiza alterações nas metodologias já descritas na literatura [9,11,12] para construção, avaliação e aplicação de um analisador micro *flow-batch*

robusto, capaz de realizar análises com velocidade, precisão e exatidão, competitivas com outros sistemas, apresentando resultados satisfatórios do ponto de vista prático e analiticamente significativos.

1.2 - Objetivos

1.2.1 - Geral

- Desenvolvimento de um analisador fluxo-batelada miniaturizado, micro *flow-batch*, utilizando a resina uretana-acrilato, através da técnica de fotolitografia no ultravioleta, para determinação de taninos em amostras de chá.

1.2.2 - Específicos

- Otimização do processo de microfabricação em uretana-acrilato para o sistema requerido;
- Desenvolvimento das configurações, *layouts* do sistema, de forma mais adequada para as aplicações ópticas do microssistema em fluxo-batelada proposto;
- Desenvolvimento do programa para controle das operações do sistema e aquisição dos dados ópticos obtidos nas análises;
- Avaliação do sistema proposto pela análise espectrofotométrica de amostras de corantes alimentícios sintéticos;
- Aplicação do sistema avaliado para determinação de taninos hidrolisáveis em amostras de chá verde e preto por dois métodos ópticos: fotométrico e turbidimétrico;
- Avaliação do desempenho analítico do microssistema proposto em relação aos resultados obtidos por instrumentos comerciais de referência.

1.3 - Microfabricação de Sistemas de Análises Químicas

A microfabricação em química analítica busca o desenvolvimento de sistemas automáticos para análises gerais com dimensões expressivamente reduzidas, isto é, miniaturizadas, devendo apresentar robustez e simplicidade operacional. Esses sistemas, por definição, devem ser capazes de executar um elevado número de análises em um curto intervalo de tempo, empregando para isso quantidades mínimas de reagentes e amostras, proporcionando assim uma diminuição significativa de custos e resíduos nas análises [1-10].

Com o advento das microtecnologias, fundamentalmente a microeletrônica, a miniaturização de dispositivos elétricos, mecânicos, acústicos e fluídicos, por exemplo, tornaram realizáveis os procedimentos e metodologias necessárias para a miniaturização de sistemas de análises químicas [1-14]. Em 1990, Manz e colaboradores [15] idealizaram um dispositivo capaz de realizar todas as operações analíticas necessárias para a determinação de um analito qualquer. Tal trabalho estabeleceu os conceitos de sistema de análise química total (TAS, da versão original inglesa [15] *total chemical analysis system*) e, especialmente, os conceitos de sistema miniaturizado de análise química total (μ -TAS, da versão original inglesa [15] *miniaturized total chemical analysis system*).

O conceito de Lab-on-a-Chip [8] (laboratório em um chip) também se consolidou sendo empregado em várias publicações relevantes do gênero [16-22]. Tais produções apresentaram uma série de técnicas, aplicações e conceitos teóricos que corroboraram para firmar a microfabricação como tendência da automação e instrumentação em química analítica e áreas correlatas. Sendo importante ressaltar que a razão inicial para a miniaturização foi melhorar o desempenho analítico do dispositivo, frente a esta necessidade, as demais vantagens foram reconhecidas e agregadas [2,3,15]. A Figura 1.1 apresenta de forma

simplificada e generalista a miniaturização como convergência dos objetivos fundamentais que caracterizam as ciências analíticas.

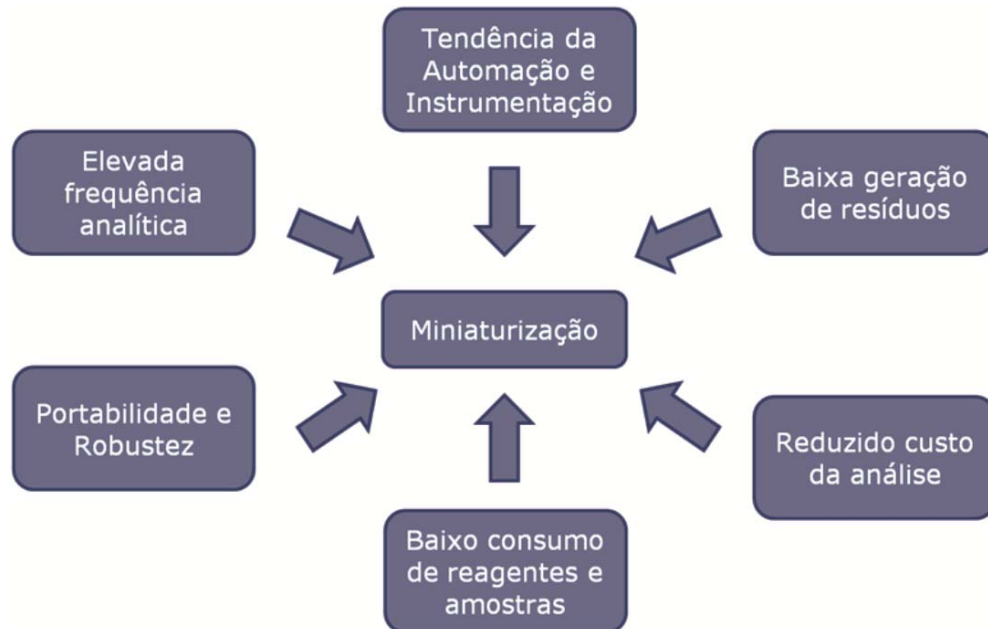


Figura 1.1 - Representação da miniaturização como convergência dos objetivos principais das ciências analíticas.

Desse modo, um microsistema idealmente necessitaria apresentar todos os seus mecanismos e componentes miniaturizados, como micro-válvulas e micro-bombas para controle e deslocamento dos fluidos, respectivamente, além de micro-reatores (bobinas e/ou câmaras de mistura) e micro-detectores, como exemplo [17]. Tais características requisitadas, coerentemente, demandam elevados investimentos, tornando inviáveis as pesquisas nesta área em instituições acadêmicas com menores recursos. Como forma de diminuir as dificuldades e baratear os custos desses trabalhos vários avanços alternativos foram estabelecidos, principalmente na etapa considerada fundamental [2,3,9,10] de prototipagem do sistema fluídico, isto é, confecção do dispositivo detentor dos microcanais onde ocorrerão todos os processos analíticos necessários para a aplicação requerida [16].

Seguindo as tendências da microeletrônica os primeiros dispositivos analíticos foram desenvolvidos tendo o vidro, aço, quartzo e silício como substrato [16,17,23]. As técnicas para tais protótipos embora permitam a construção de dispositivos extremamente otimizados, excelente resolução dos canais e complexidade dos *layouts* microfluídicos, necessitam de equipamentos e ambiente de trabalho especial, como as salas limpas, por exemplo [2,3]. A literatura científica oferece vários artigos de revisão adequados para uma leitura mais aprofundada e elucidativa sobre tais técnicas convencionais, consideradas clássicas [3,10,16,19].

De modo alternativo, com a utilização de técnicas de prototipagem dos microcanais relativamente mais simples, os estudos na área da microfabricação analítica ganharam um campo de pesquisa acadêmica mais vasta, competitiva e inovadora [10]. Basicamente as técnicas alternativas de microfabricação consistem na utilização de polímeros elastômeros como o PDMS (polidimetilsiloxano), PMMA (polimetilmetacrilato), PTFE (politrifluoroetileno), PVC (policloreto de vinila) e PE (poliestireno) os quais são mais baratos do que os materiais convencionais (vidro, silício e quartzo) e exigem um ambiente de pesquisa menos sofisticado [2,3,14]. Os trabalhos com tais polímeros, devido as suas propriedades singulares em relação aos substratos convencionais, permitem pesquisas cada vez mais inovadoras nesta área das ciências analíticas [23].

Embora a promessa de renovação analítica por meio dos estudos em microfabricação seja bastante persuasiva o seu uso ainda não é amplamente utilizado pela indústria, se restringindo em grande parte aos centros de pesquisa acadêmica [23]. A maioria das aplicações dos microssistemas encontra-se em sensores químicos e biossensores, análises de fármacos e de componentes de fluidos biológicos. Entretanto, várias outras aplicações promissoras estão em pleno desenvolvimento, como a síntese de proteínas e outras biomoléculas, diagnóstico de diversas patologias, cultura de microorganismos em ambientes

controláveis e novos sensores para controle ambiental, são alguns exemplos destacáveis [2-5,23].

1.3.1 - Técnicas Clássicas

Praticamente todos os processos de microfabricação, convencional e grande parcela dos processos alternativos, utilizam a fotolitografia como procedimento padrão para confecção dos microcanais no substrato desejado [17,19]. A fotolitografia empregada para esta finalidade consiste fundamentalmente na gravação de estruturas micrométricas, entre 10 a 100 μm , em um substrato plano com auxílio de raios-X ou radiação ultravioleta, por exemplo [2,10,16,17].

No geral, independentemente do substrato e da técnica litográfica requerida para transferência dos canais, o procedimento de gravação no substrato apresenta as mesmas características básicas [9,10]. Uma máscara ou *layout* é microfabricada [2,16,17,19] para produzir e replicar os microssistemas em um substrato conveniente mediante a interação de uma fonte de radiação ou solução corrosiva, conforme ilustrada na [Figura 1.2](#). Para permitir a movimentação dos fluidos o sistema recém confeccionado deve ser selado com uma camada do mesmo substrato ou outro material adequado à aplicação [3,17].

O silício foi o primeiro substrato a ser empregado devido aos seus reconhecidos méritos na indústria da microeletrônica [19]. Entretanto, por apresentar propriedades químicas, físicas e elétricas limitadas para aplicações analíticas, além de possuir alto valor comercial, este vem sendo menos utilizado na indústria e nas pesquisas [10,19]. O vidro e o quartzo são hoje os materiais mais utilizados depois do silício para a microfabricação de dispositivos microfluídicos através das estratégias convencionais [2,16].

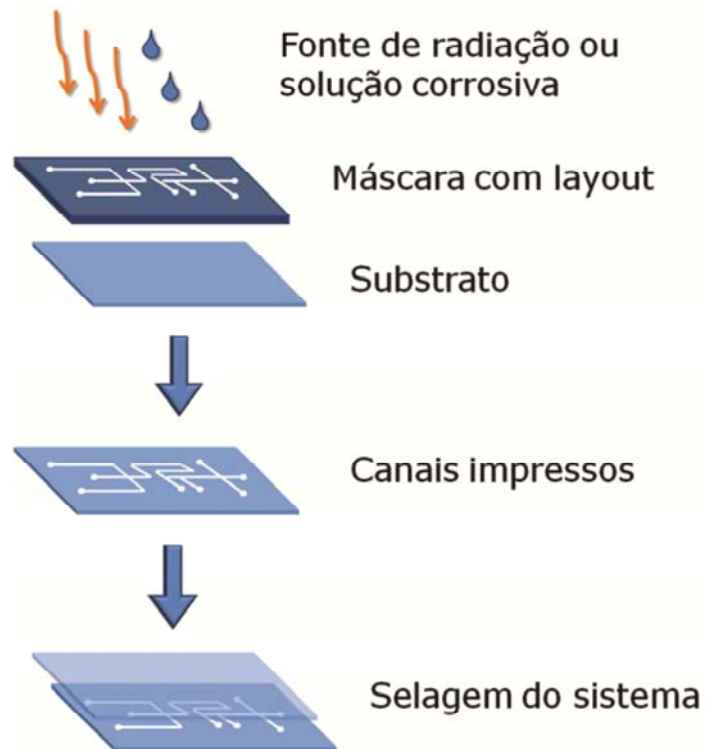


Figura 1.2 - Esquema geral das etapas básicas para miniaturização analítica.

Existem diversas técnicas para a microfabricação de dispositivos analíticos já descritos na literatura [16,17,19,21]. No geral tais técnicas, relativamente complexas, compreendem prototipagem por corrosão por via seca e corrosão por via úmida [19]. A corrosão por via seca consiste na gravação dos canais a partir da interação do substrato com um plasma, usualmente tetrafluorometano [2]. A corrosão por via úmida consiste na formação dos canais mediante a orientação da corrosão do substrato por soluções ácidas ou básicas [10].

1.3.2 - Técnicas Alternativas

Em detrimento dos elevados custos para implementação e manutenção das tecnologias para a miniaturização analítica convencional, ainda predominante no cenário mundial, surgem novas estratégias de prototipagens em polímeros [23]. Tais metodologias permitem a confecção

de moldes rápidos e com melhor relação custo-benefício para a indústria e instituições de pesquisa acadêmica, a fim de realizarem investigações científicas básicas [9,10].

Uma das técnicas bem empregadas é a ablação a laser [24], a qual permite a gravação dos canais em substrato polimérico por meio da radiação pulsada de um laser, que decompõem o polímero em pontos determinados gerando os canais [2,10,24]. Entretanto, mesmo sendo considerada alternativa, esta técnica não é aconselhada para produção de microssistemas em pequena escala devido ao seu maior custo e complexidade, além de produzir canais com menor resolução em relação a outros processos de prototipagem alternativa [10,17].

As técnicas de moldagem em polímeros para microfabricação em química analítica basicamente podem ser agrupadas em moldagem por pressão a quente, empregando-se um substrato rígido, moldagem por injeção, utilizando-se um substrato fluídico ou por fotolitografia por corrosão seca ou úmida [2,19]. Outro processo de microfabricação que envolve confecção de molde ou *layout* por litografia e eletroformação é conhecido como LIGA (*Lithography, Galvo and Abformung*) [16,17,19]. Após a confecção dos moldes, por qualquer que seja a técnica, a sua replicação pode ser realizada por estampagem a frio ou a quente, ou por litografia macia, por exemplo [2,10,16].

Recentemente [9], uma nova técnica proposta por pesquisadores brasileiros para miniaturização analítica vem se desenvolvendo. Atrativamente viável devido a sua prototipagem simples, rápida e robusta, se baseia no emprego do *tonner* de impressoras laser para confecção dos *layouts* (moldes) dos canais [2,10]. Em 2001, Tan, Rodgers e colaboradores [25] sugeriram a confecção de moldes para prototipagem simples e rápida em PDMS utilizando fotocopiadoras. Dois anos depois, Lago e outros pesquisadores [26] propuseram a fabricação de dispositivos microfluídicos através da impressão direta de *tonner* em transparência de retroprojetor, sendo os padrões de imagens, *layout* dos canais, projetados em programas como o *AutoCad* ou *Corel Draw*.

Outras pesquisas utilizando prototipagem de canais microfluídicos com impressoras jato de tinta em lâminas de vidro foram propostas recentemente e também se apresentam analiticamente promissoras [27,28]. Já o desenvolvimento do trabalho de Lago apresenta-se, sobretudo na miniaturização de sistemas de análise em fluxo, destacando-se os avanços atuais com a utilização do polímero uretana-acrilato como substrato [9,11-13].

1.3.2.1 - Microfabricação em uretana-acrilato

A técnica de microfabricação analítica em uretana-acrilato foi descrita primeiramente por Fernandes e Ferreira em 2006 [11]. Esta técnica consiste em gravar mini-canais em um substrato de poliuretana-acrilato comercial através da fotolitografia no ultravioleta, conforme apresentado no esquema da Figura 1.3. Tal procedimento permitia a criação de mini-canais de até 0,25mm de diâmetro em um polímero elastômero com boa resolução dos canais e ótima resistência física e química, admitindo, desta forma, uma prototipagem rápida, eficiente e bem simplificada [9,10,12].

A resina comercial uretana-acrilato (UA) amplamente utilizada na confecção de carimbos é composta por uma mistura complexa de oligômeros uretano e acrilato, é sensível a radiação ultravioleta podendo ser polimerizada ou curada por esta [11]. A estrutura microscópica do polímero formado ainda é avaliada, acredita-se que a mistura homogenia da resina fluídica passa a apresentar aglomerações de poliácrlato dispersas sobre um mar de cadeias de poliuretano fixadas por ligações cruzadas, o que se apresenta coerente com as propriedades e características deste material [9]. A cobertura de *tonner* impede a cura nas áreas estabelecidas pelo *layout*, permitindo desse modo a formação dos canais [12,13].

O processo de miniaturização em uretana-acrilato inicia-se a partir da concepção, projeto do *layout* dos canais microfluídicos os quais se

desejam criar. Tal projeto gráfico pode ser melhor executado utilizando-se programas como o *Corel Draw* ou *AutoCad*, por exemplo [9,10]. A impressão dos mesmos deve ser realizada em transparência para retroprojeter adequada (filme de poliéster) em uma impressora a laser, de preferência de melhor resolução disponível, esta resolução é dada em dpi (*dots per inch*, do inglês, pontos por polegada) [11].

O esquema da Figura 1.3 melhor representa o processo de microfabricação. Após a etapa inicial de produção e impressão dos minicanais, conhecido como produção da máscara ou *layout*. A Figura 1.3(a) e 1.3(b) representam a montagem do molde ou "piscina" onde a resina será depositada, o diâmetro do sistema será indicado pela espessura da moldura de borracha empregada, a base do molde é feita com uma placa fina de acrílico, a qual não responde a radiação ultravioleta utilizada para polimerizar a resina [12].

Em seguida, a resina é cuidadosamente depositada sobre o molde, preenchendo todo o volume e evitando a formação de bolhas de ar (Figura 1.3(c)). Uma segunda placa de acrílico é fixada sobre a piscina contendo a resina a fim de garantir a uniformidade da mesma (Figura 1.3(d)). Na sequência o molde é levado para uma expositora fotolitográfica ultravioleta, geralmente a mesma fotoexpositora comercial utilizada para a confecção de carimbos, onde o minissistema é polimerizado (Figura 1.3(e)). O tempo para polimerização da peça é relativo à intensidade da radiação, a área e a espessura do molde, quanto menor a piscina mais rápida e eficiente será a polimerização [9].

O estudo do período de exposição da resina a radiação ultravioleta torna-se necessário para se conhecer os melhores tempos, podendo otimizar desta forma o processo. O sistema já polimerizado deve ser removido cuidadosamente do molde, para evitar o rompimento dos seus canais (Figura 1.3(f)). Utiliza-se um banho de ultra-som com solução detergente para remover as partes não polimerizadas que formam os canais. A camada selante nesta técnica geralmente é constituída utilizando o mesmo substrato, neste caso o processo apresentado na

Figura 1.3(a) até 1.3(f) é o mesmo, apenas não apresentando o *layout* dos canais, entretanto nada impede que outros materiais sejam utilizados [10].

A etapa de selagem, Figura 1.3(g), é considerada a mais crítica do processo [9,10]. Para reduzir os riscos de não se obter uma selagem adequadamente resistente, deve-se empiricamente observar os melhores tempos para polimerização. É necessário saber que tanto a polimerização da camada do fotolito quanto da camada selante devem ser parciais, permitindo um contato mais viscoso entre ambas as camadas. Um sistema satisfatório deve estar bem selado, ser transparente, sem bolhas de ar entre ou nos canais e pouco pegajoso (Figura 1.3(h)).

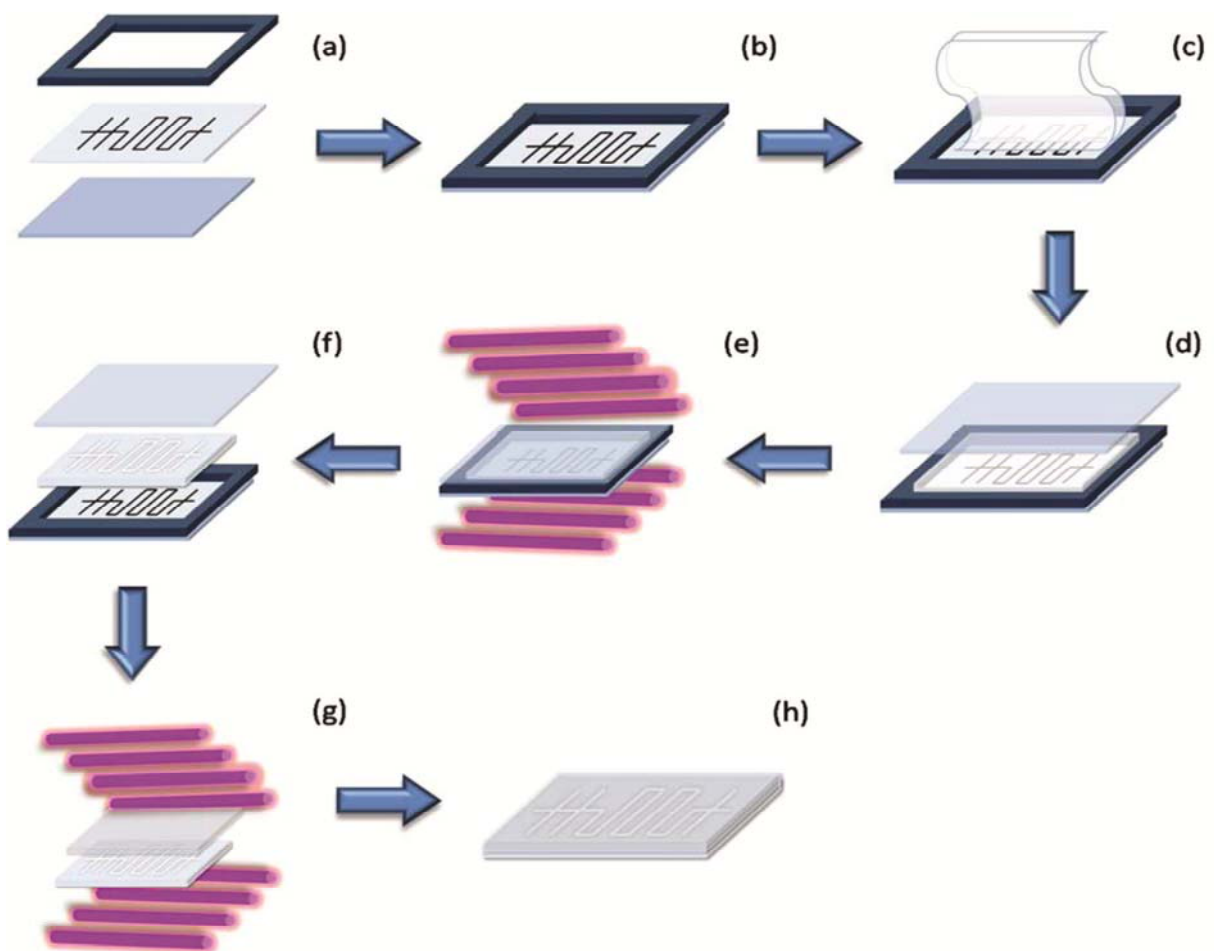


Figura 1.3 - Esquema geral simplificado para microfabricação em uretana-acrilato. (a) montagem do molde, (b) molde, (c) deposição da resina, (d) fixação da resina, (e) polimerização, (f) sistema polimerizado, (g) selagem e (h) microsistema selado.

1.4 - Sistemas Automáticos de Análise

Os sistemas automáticos permitem a otimização do desempenho dos processos analíticos, admitindo um aumento significativo na frequência, precisão e exatidão das análises. Tais sistemas permitem ainda a manipulação de substâncias instáveis, tóxicas, explosivas ou até mesmo radioativas, além de possibilitarem um monitoramento contínuo de um processo qualquer e redução dos custos para grandes volumes de análise, gerando ótimos resultados reprodutíveis e controle dos equipamentos com a mínima intervenção de operadores [29,30].

Os sistemas de análise automáticos foram empregados inicialmente nos laboratórios clínicos, onde a elevada demanda diária por diagnósticos rápidos, de qualidade e para várias espécies químicas incentivou a sua implantação e consolidação mundial. Hoje grande parte das análises químicas e bioquímicas de rotina e demanda em laboratórios industriais, governamentais, ambientais, farmacêuticos, forenses e acadêmicos são realizados em sistemas parcialmente ou totalmente automáticos [29].

Esses sistemas automáticos podem ser organizados em dois grandes grupos, segundo a forma de aquisição, tratamento e condução da amostra e reagentes durante o processo analítico, podendo se combinar eventualmente. Tal divisão compreende os analisadores automáticos discretos, os quais abrangem os analisadores em batelada e/ou robotizados, e os analisadores automáticos em fluxo [29]. A literatura científica apresenta excelentes textos dissertativos, em forma de artigos, livros e handbooks, sobre este assunto [31-33] que podem proporcionar ao leitor uma reflexão mais relevante, abrangente e elucidativa.

Os sistemas automáticos de análise por injeção em fluxo, mais conhecidos como FIA (do inglês *Flow Injection Analyser*) foram propostos por Ruzicka e Hansen em 1975 [34] e foram adaptados dos anteriores analisadores em fluxo segmentado por bolhas de ar [35], utilizados para atender a demanda dos laboratórios clínicos. O FIA caracteriza-se pela injeção controlada da amostra fluídica, bem como os reagentes, em um

fluxo carregador contínuo com vazão regulada, a mistura ou separação dos fluidos se dá por meio de uma bobina de reação. Um sistema de análise em fluxo simples e seus componentes básicos são esquematicamente ilustrados na Figura 1.4.

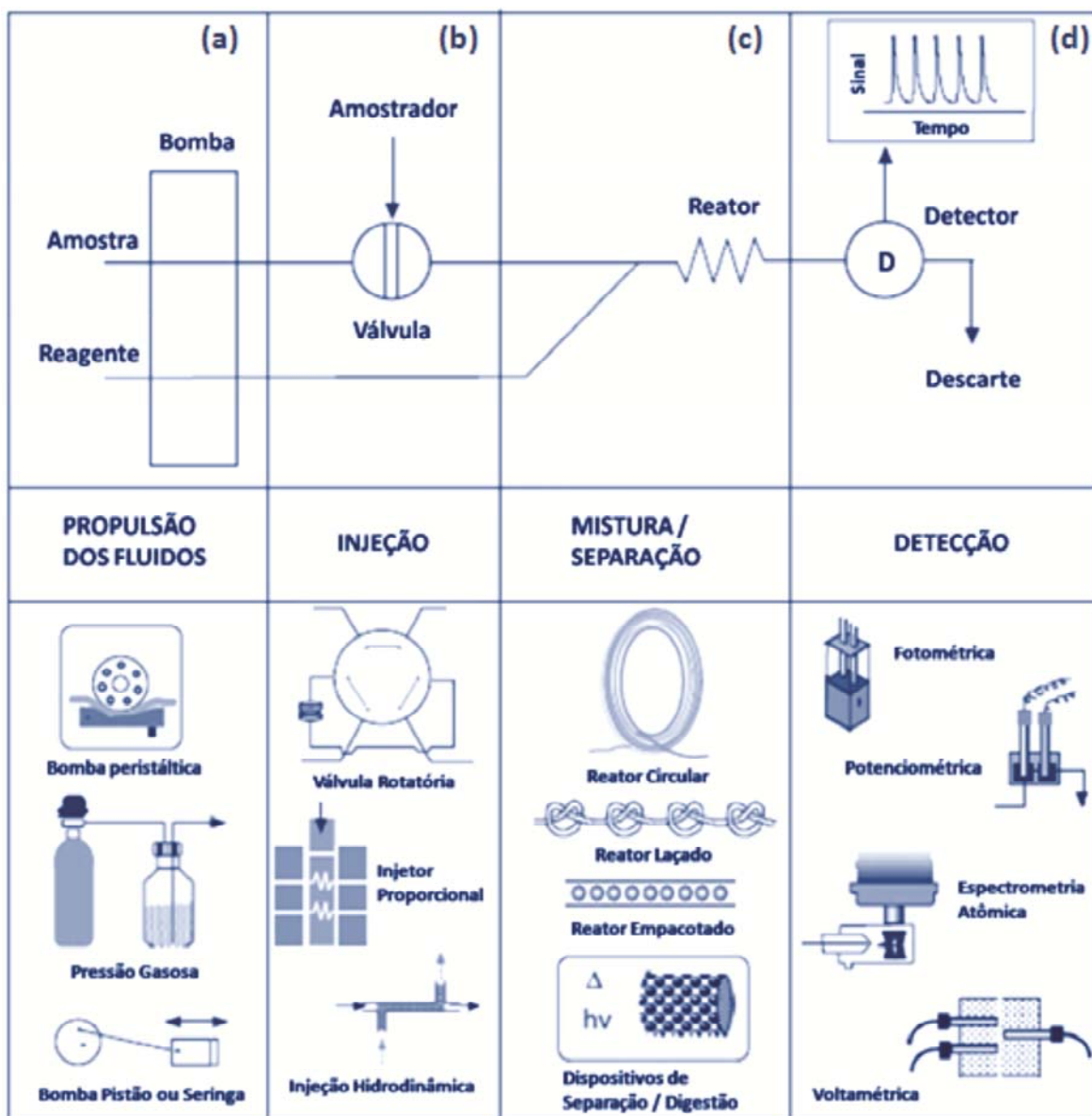


Figura 1.4 - Diagrama esquemático de um sistema de análise em fluxo simples. (a) exemplos de sistemas para propulsão dos fluidos, (b) exemplos de sistemas de injeção, (c) exemplo de sistemas de mistura e (d) exemplo de detectores.

Independente da configuração ou aplicação um sistema de análise em fluxo é composto por elementos comuns. A propulsão dos fluidos geralmente é realizada por uma bomba peristáltica, embora vários outros

mecanismos sejam utilizados com esta finalidade, como as bombas pistão (Figura 1.4(a)). O controle adequado das alíquotas de reagentes e amostras adicionadas ao sistema é normalmente, feito por válvulas solenóides, rotatórias, ou por injetor proporcional (Figura 1.4(b)).

Comumente, as análises em FIA necessitam da ocorrência de misturas, digestões ou separações tais etapas são promovidas por uma bobina de reação essas podem ser modificadas de acordo com a reação requerida (Figura 1.4(c)). A detecção do(s) analito(s) em um sistema em fluxo pode ser realizada das mais diversas formas desejadas conforme seja necessário (Figura 1.4(d)).

Várias modificações no modelo inicial, descrito por Ruzicka, de análise automática em fluxo, foram realizadas no decorrer dos anos [36,37]. Outros métodos de análise em fluxo foram propostos e estabelecidos na literatura [38-43] permitindo a consolidação desta forma de automação nas ciências e tecnologias analíticas. Praticamente todos os sistemas miniaturizados compreendem métodos, formas ou modelos de sistemas automáticos de análise em fluxo. Sendo a miniaturização a tendência dos novos métodos automáticos de análises químicas [44], por portarem as características já destacadas no texto.

1.4.1 - Analisador *Flow-Batch*

Os analisadores *flow-batch* (fluxo-batelada) descritos na literatura por Honorato e colaboradores em 1999 [42], caracterizam-se como um híbrido dos sistemas automáticos em batelada e em fluxo, portando desta forma, grande parte das vantagens analíticas de ambos. A Figura 1.5 a seguir apresenta de forma esquemática um sistema de análise *flow-batch* (FBA) com todos os seus componentes estruturais.

A principal característica do *flow-batch* é a presença da câmara de mistura (Figura 1.5(a)), pequena peça cilíndrica, geralmente de teflon ou acrílico com volume interno variável, de aproximadamente 0,50 a 2,00 mL. Nessa câmara de mistura ou câmara reacional ocorrem a maior

parte dos procedimentos analíticos, como adição, homogeneização, reações e acondicionamento dos fluidos, preparo de soluções de calibração e detecção do analito.

Nesse sistema de análise a câmara de mistura recebe os volumes adequados de reagentes e amostra a partir do tempo de abertura das válvulas solenóides (Figura 1.5(b)) e a sua mistura torna-se garantida pela utilização de um agitador magnético (Figura 1.5(c)). A propulsão dos fluidos é normalmente realizada através de uma bomba peristáltica (Figura 1.5(d)). O acionamento das válvulas é obtido por meio de um módulo de controle (Figura 1.5(e)). O sistema de detecção (Figura 1.5(f)) pode ou não ser acoplado à câmara de mistura, conforme a necessidade ou configuração do sistema requerido. Nos sistemas *flow-batch* todo o procedimento de controle é realizado com auxílio de um microcomputador (Figura 1.5(g)) que garante a reprodutibilidade e velocidade nas aplicações.

Recentemente, Almeida e colaboradores [45,46] descreveram um sistema *flow-batch* utilizando uma bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos. Esta relevante contribuição permite a remoção da bomba peristáltica e todos os inconvenientes agregados a sua utilização, como exemplo a perda de sensibilidade e reprodutibilidade mediante a pulsação da mesma, custo, robustez, flexibilidade e relativa portabilidade [46].

Atualmente foi desenvolvido um micro-analisador *flow-batch* em uretana-acrilato por fotolitografia no ultravioleta [9]. Tal pesquisa tem a finalidade de contribuir para aperfeiçoar as figuras de mérito dos analisadores *flow-batch* convencionais, aliando a esse sistema as notáveis características, já relatadas, dos sistemas miniaturizados. Portanto, permitindo desta forma o aprimorando do seu funcionamento e expandido a sua aplicabilidade analítica.

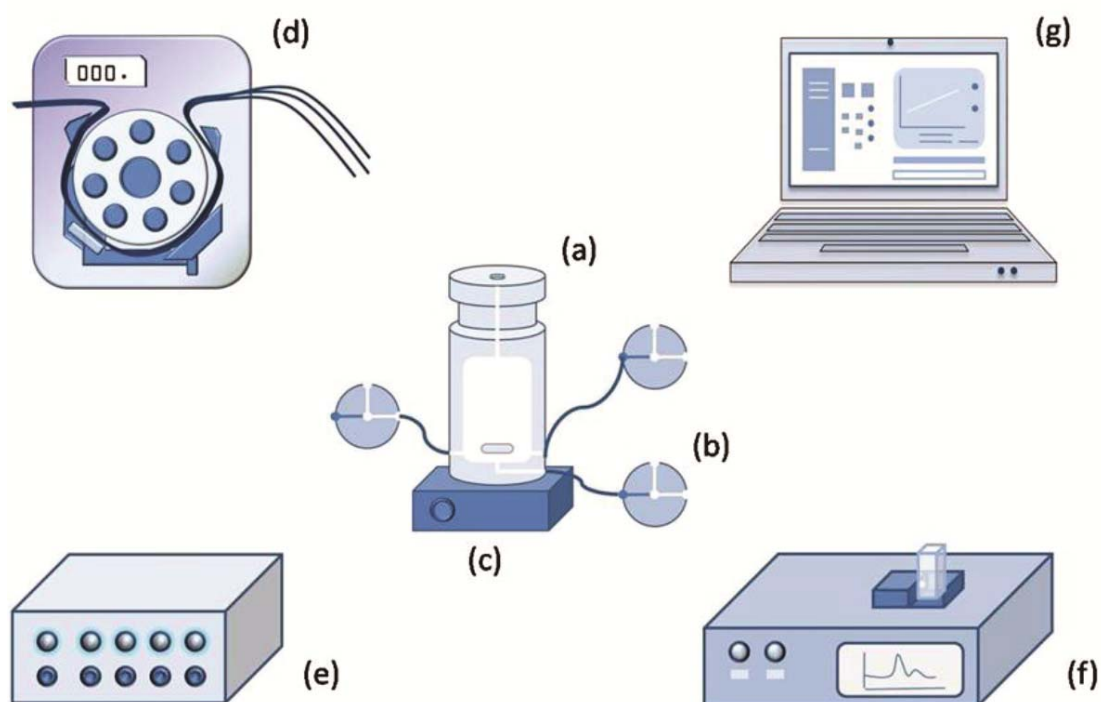


Figura 1.5 - Esquema simplificado com os componentes principais de um sistema de análise em fluxo-batelada. (a) câmara de mistura, (b) válvulas solenóides, (c) agitador magnético, (d) bomba peristáltica, (e) acionador de válvulas, (g) computador para administração, (f) detector, espectrofotômetro, por exemplo.

1.5 - Espectroscopia

A espectroscopia é uma abrangente área das ciências naturais e tecnológicas que se propõem a estudar os fenômenos relacionados à interação da radiação eletromagnética com a matéria [29]. Especificamente, a espectrofotometria de absorção molecular fundamenta-se na absorção da radiação eletromagnética por espécies moleculares. Em química analítica constitui uma poderosa ferramenta para determinação e quantificação de espécies orgânicas e inorgânicas [47].

Na espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis) utiliza-se a faixa de radiação eletromagnética de comprimentos de onda (λ) de aproximadamente 190 a 780 nm. Os espectrofotômetros e

os fotômetros são instrumentos ópticos utilizados em grande escala em todo o mundo para medidas quantitativas nessa região espectral [48].

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

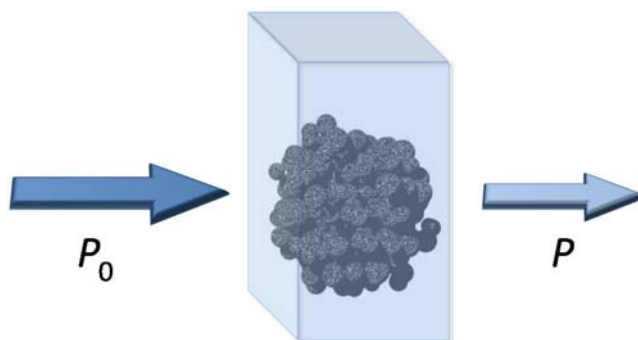


Figura 1.6 - Representação esquemática de um feixe de radiação P_0 sendo atenuado após interagir com a amostra resultando na radiação emergente P .

Normalmente, a concentração de uma espécie em estudo, ou seja, o analito, que absorve radiação está relacionado linearmente com a absorbância A , como demonstra a lei de Beer, Equação 1.1. Onde ε representa a absortividade molar que corresponde a um parâmetro característico da espécie absorvente em um determinado meio a um determinado comprimento de onda.

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

Embora a detecção espectrofotométrica seja bem consolidada pela literatura científica e indústrias por todo o mundo, sobretudo para detecções por análise em fluxo, o crescente desenvolvimento de novos fotômetros oferecem a possibilidade de métodos de detecção mais simples, econômicos e analiticamente satisfatórios. Tal forma de detecção permite a construção de instrumentos mais compactos e versáteis sendo mais adequados para análises em sistemas em fluxo e miniaturização analítica [48].

1.5.1 - Fotometria

O termo fotometria está associado diretamente a medidas realizadas em instrumentos para análises quantitativas no ultravioleta-visível e infravermelho próximo, denominados fotômetros. Tais medidas de absorção molecular abrangem uma faixa espectral entre 190 a 1000 nm aproximadamente. Medidas realizadas por fotômetros envolvem geralmente uma estreita faixa de comprimento de onda específica [48].

Um fotômetro é constituído normalmente por de uma fonte estável de energia radiante, um seletor de comprimento de onda, um recipiente de amostra, um detector de radiação e um processador de sinal. A análise fotométrica é um dos métodos mais comuns utilizados para a quantificação das espécies presentes em solução aquosas em laboratórios de análises clínicas, indústrias e centros de pesquisa acadêmica [29,49].

O uso de diodos emissores de luz (LEDs) como fontes de radiação seletiva, pode constituir uma alternativa simples que substitui notavelmente o uso de lâmpadas de tungstênio, filtros e lentes ópticas. LEDs produzem um estreito espectro contínuo em uma faixa de comprimento de onda, normalmente com cerca de 20 a 100nm, conforme representado na [Figura 1.7](#), além de apresentarem baixo consumo de energia, baixo custo de aquisição, estabilidade e elevada vida útil [49].

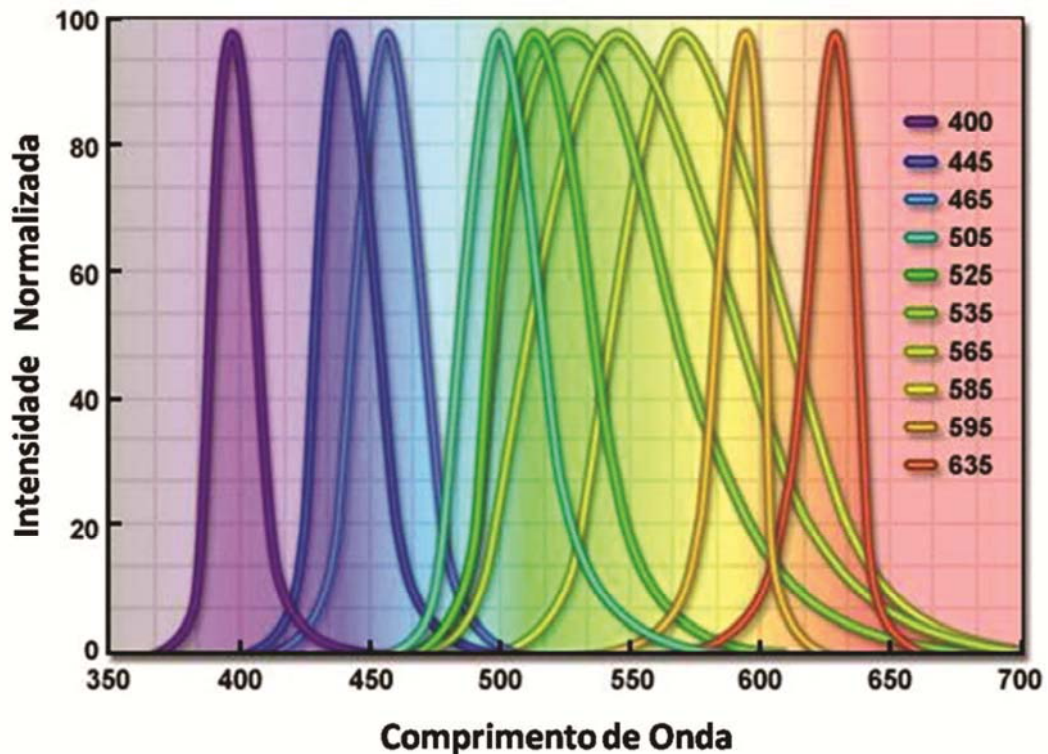


Figura 1.7 - Representação típica dos espectros de emissão de LEDs comerciais.

A estabilidade dos LEDs não requer o uso de circuitos eletrônicos sofisticados para o seu controle, podendo estes serem operados em modo pulsado ou contínuo. Os LEDs são utilizados como fonte de radiação semi-monocromática ou unido a filtros de interferência para se obter uma faixa de radiação mais estreita [29,50].

Essas características permitem aos LEDs serem combinados com detectores de luz de forma simples e econômica na confecção de instrumentos fotométricos ou espectrofotométricos. Numerosos sistemas de sensoriamento óptico a base de LED vêm sendo relatados na literatura desde a década de 1970, o que corrobora para a sua consolidação [49,50].

O desenvolvimento destes detectores baseado em LED tem sido de fundamental importância para permitir diferentes configurações em análise por injeção em fluxo (FIA). Numerosas variedades de sistemas FIA foram propostas para aplicação em processos de separação, pré-concentração e detecção fotométrica foram criados e aplicados para a

determinação de uma grande variedade de compostos em matrizes de amostras diferentes [48].

1.5.2 - Turbidimetria

A Turbidimetria é uma técnica analítica óptica que consiste na medida da redução da radiação incidente causada pela dispersão, sendo equivalente a uma determinação de absorção, ou seja, mede a quantidade de luz que passa por uma amostra turva. Quando uma radiação eletromagnética (REM) atravessa um meio transparente, onde partículas sólidas estão dispersas, parte desta radiação é difundida em todas as direções, dando uma aparência turva à mistura. A diminuição da radiação incidente, como resultado do espalhamento pelo meio particulado, compreende a base do método turbidimétrico [47,51,52].

A radiação espalhada deve ser quantificada por medidas nefelométricas geralmente em um ângulo reto a radiação incidente. A escolha entre nefelometria e turbidimetria depende da fração da radiação espalhada, quando há muitas partículas em suspensão os resultados turbidimétricos apresentam-se mais confiáveis. Já o método nefelométrico é preferível em baixas concentrações de precipitado sob um fundo negro [51].

A Figura 1.8 esquematiza esses processos, onde P_0 representa a potência de radiação incidente que interage com a amostra. P representa a potência de radiação transmitida, as medidas turbidimétricas são realizadas a esse ângulo (180°). P_{esp} representa a potência da radiação espalhada, as medidas nefelométricas são realizadas geralmente a 90° . Ambas as técnicas relacionam estas medidas com a concentração da espécie química em suspensão.

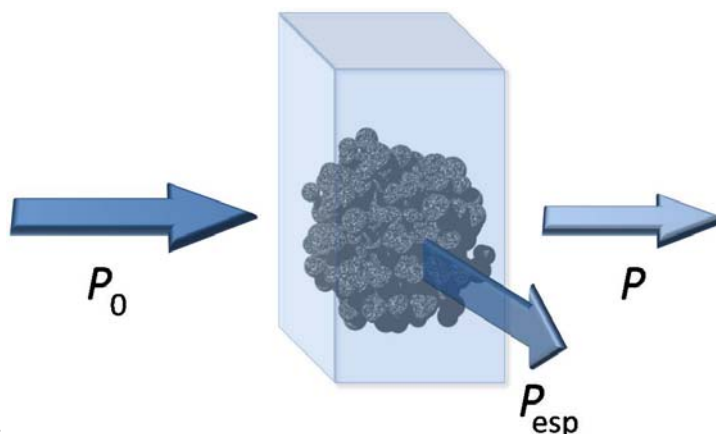


Figura 1.8 - Esquema representando a interação da radiação incidente com a amostra particulada.

Em turbidimetria a precisão do método pode ser limitada devido à presença de vários fatores que influenciam a formação reprodutível da suspensão. O controle das concentrações entre reagentes e analito, do solvente apropriado, do pH do meio, da temperatura, do nível de agitação, dos interferentes da matriz, dentre outros fatores, torna-se fundamental para garantir a maior diferença do índice de refração entre o particulado e o meio o que caracteriza uma análise satisfatória [47].

Na turbidimetria, a medida da atenuação da potência do feixe incidente segue uma relação linear com a concentração das partículas responsáveis pelo espalhamento, em uma equação análoga à Lei de Beer, como apresentado na [Equação 1.2](#).

$$T = \log \frac{P_0}{P} = KbC \quad (1.2)$$

Onde, T é a turbidância, P_0 é a potência do feixe incidente e P é a potência do feixe transmitido. C é a concentração de partículas em suspensão, b é o caminho ótico e K é um coeficiente de proporcionalidade, denominada de turbidez, que depende do tamanho das partículas e do comprimento de onda da radiação incidente.

A princípio, qualquer fotômetro de filtro simples ou espectrofotômetro permite realizar medidas turbidimétricas. As medidas nefelométricas podem ser realizadas em fluorômetros ou espectrofluorômetros. Turbidímetros têm sido desenvolvidos usando fonte de luz policromáticas, como lâmpada de tungstênio, por exemplo. Entretanto, para se obter melhores resultados é recomendado usar radiações monocromáticas, de maneira que quanto menor o λ da radiação maior é a intensidade do espalhamento. Assim, para se obter uma melhor sensibilidade em uma medida turbidimétrica, estas podem ser realizadas preferencialmente com uma fonte de radiação azul, LED azul ou filtro azul [47].

A Turbidimetria é amplamente utilizada na análise de águas, para a determinação da turbidez, e para o controle de vários processos de tratamento [52]. A literatura científica descreve vários processos onde a determinação turbidimétrica é utilizada com êxito em análise e íons inorgânicos, compostos orgânicos e biológicos [51].

Turbidimetria tem sido amplamente utilizado como método de detecção na análise por injeção em fluxo. Além de tornar esses processos automáticos sua utilização agregada a esses sistemas em fluxo permite a melhoria do desempenho analítico desses detectores, melhorando a reprodutibilidade e precisão, em comparação aos procedimentos convencionais em batelada [51].

1.6 - Chá

O chá verde (*Camellia sinensis*) é a segunda bebida mais consumida no mundo, depois da água, e vem levantando grande interesse de pesquisadores de todo o mundo por suas propriedades físico-químicas e biológicas [53,54]. O chá tem uma longa história como um remédio popular, mas os benefícios de suas propriedades para a saúde tem se elucidado nas últimas décadas [55,56].

O chá verde é obtido a partir da infusão de brotos e folhas desidratadas da planta *Camellia sinensis*, um arbusto nativo oriundo da Ásia. Surgiu a mais de quatro milênios, havendo relatos de seu consumo já com fins medicinais por volta de 2737 A.C [54]. É amplamente consumido no Japão, China e outras nações asiáticas, e está se tornando cada vez mais popular nos países ocidentais, como Brasil e Estados Unidos, por exemplo [57].

Folhas de chá frescas podem conter cerca de aproximadamente 36% de compostos polifenólicos, 25% de carboidratos, 15% de proteínas, 6,5% de lignina, 5% de cinzas, 4% de aminoácidos, 2% de lipídeos, 1,5% de ácidos orgânicos, 0,5% de clorofila, bem como carotenóides e substâncias voláteis representem menos de 0,1% [58,59].

O chá preto também é feito a partir da *Camellia sinensis*, mas ao contrário do chá verde, este é obtido por folhas que foram inteiramente fermentadas, ou seja, passaram por um processo oxidativo. Devido a tal processo de fermentação, uma parte dos compostos ativos, flavonóis e catequinas, são degradados nesse tipo de chá, mas permanecem ativos no chá verde [54]. As atividades biológicas do chá preto ainda não são bem documentadas pela literatura científica [59].

Os componentes ativos do chá verde são em sua grande maioria polifenóis (catequinas, monômeros que constituem boa parte dos taninos condensados) e flavonóis que possuem elevada atividade antioxidante. Taninos são grandes moléculas de polifenóis, e constituem a massa bruta dos compostos ativos do chá verde, que juntamente com as catequinas compreendem cerca de 90% dos compostos polifenólicos presentes nesta bebida [60].

Várias formas de catequinas estão presentes nestas plantas. Entre elas, o epigalocatequina-3-galato (EGCG) é o flavonóide mais abundante e largamente estudado. Cerca de 30% a 40% da massa real do extrato do chá verde é composta por polifenóis, dos quais aproximadamente 15% são de EGCG. Muitas pesquisas apontam serem estes componentes os principais inibidores de doenças, auxiliando na prevenção de várias formas

de câncer (pulmão, mama, ovário e próstata), arteriosclerose, hipertensão, dentre outras [54,61,62].

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio, radicais livres, compreende o estresse oxidativo e tem sido associado com eventos intracelulares, levando a danos nas proteínas, lipídios e DNA, e está correlacionado com o aumento da incidência de doenças como o câncer, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, e até mesmo o envelhecimento precoce [57,60]. Diversas pesquisas com o efeito antioxidante do chá verde têm demonstrado que a sua ingestão diária é significativamente responsável pelo aumento do nível antioxidante do plasma e redução quantitativa dos radicais livres [56].

Estudos observacionais indicam que o consumo habitual de chá verde pode fornecer efeitos protetores no sistema cardiovascular e cérebro-vascular com uma redução significativa na incidência de hipertensão e derrame cerebral. Sua ingestão também reduz a oxidação do colesterol total e colesterol LDL (*Low Density Lipoproteins*, lipoproteínas de baixa densidade) [54,56,60].

Existem também evidências científicas que o chá verde possui efeito imediato para melhoria da função endotelial e aumento do fluxo sanguíneo. Estes efeitos bioquímicos e fisiológicos combinados podem ser fatores importantes na prevenção e tratamento progressivo da aterosclerose. Outra importante propriedade dos componentes antioxidantes do chá é a possibilidade de aumentar o gasto de energia celular, metabolismo, podendo ser útil na redução de peso em pacientes obesos [56,60].

No Brasil, a análise da qualidade do chá é regida pelo regulamento técnico da ANVISA [63] para identificação e qualidade de chás. Tal regulamento adota os métodos recomendados por órgãos internacionais, como os da AOAC [64] e órgãos nacionais especializados, como o Instituto Adolfo Lutz [65]. Essas análises de qualidade incluem a determinação de umidade, cinzas totais e solúveis em ácido clorídrico, teores de cafeína, lipídios, proteínas, carboidratos e taninos.

1.7 - Taninos

Estima-se que os taninos sejam o quarto produto bioquímico mais produzido pelos tecidos vegetais logo após a celulose, hemicelulose e lignina [66]. Folhas e cascas de plantas podem conter até cerca de 40% de taninos [67]. Por serem estruturas complexas de sintetizar, envolvendo grande quantidade de energia metabólica, a sua ocorrência abundante sugere que estes desempenhem um papel importante na função e evolução dos vegetais [68].

Tradicionalmente, os benefícios do tanino como agente repelente de herbívoros, foi proposta como principal justificativa para o gasto dispendioso de energia com a sua síntese [69]. Entretanto, existem tantos trabalhos relacionado a elevada concentração de taninos a defesa contra herbívoros, quanto trabalhos que sugerem que tais índices apresentam pouca relevância a predação pelos mesmos [70].

Os taninos possuem uma ampla atuação em processos do ecossistema vegetal, como mostrado na [Tabela 1.1](#), além de defesa contra herbívoros, atua na ciclagem de nutrientes, decomposição orgânica, fixação do nitrogênio, atividade antimicrobiana, complexação de metais, como exemplo. Os taninos também podem afetar nocivamente o ecossistema, inibindo e inativando enzimas e microorganismos, complexando com proteínas e metais importantes aos organismos [71].

Vários trabalhos sobre a atividade biológica dos taninos evidenciam sua importante ação contra determinados microorganismos [72], contra agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática [73], além de agir como antiinflamatório e cicatrizante [74] e até como inibidores da transcriptase reversa em vírus do HIV [75]. Muitas espécies ricas em taninos são utilizadas inclusive na medicina popular para diferentes finalidades e poucos estudos têm sido realizados para avaliar tais potencialidades [74].

Tabela 1.1 - Importância dos taninos em processos vegetais.

Processo	Referências Seleccionadas
Defesa contra herbívoros (insetos, mamíferos predadores em geral)	Butler, L. G. & Schultz, J. C. <i>In Chemistry and Significance of Condensed Tannins</i> . Plenum Press, 1989.
Defesa contra patógenos (vírus, bactérias e fungos)	Field, J. A.; Lettinga, G. <i>In Plant Polyphenols Synthesis, Properties, Significance</i> . Plenum Press, 1992.
Ciclagem de nutrientes	
Decomposição	Kalbertji, K. L. et al. <i>Plant Soil</i> 208, 1999.
Mineralização do nitrogênio	Bradley, R. L. et al. <i>Soil Biol. Biochem.</i> 32, 2000. & Fierer, N. et al. <i>Soil Biol. Biochem.</i> 33, 2001.
Inibição da nitrificação	Baldwin, I. T. <i>Soil Biol. Biochem.</i> 15, 1983.
Inibição da fixação do nitrogênio	Schimel, J. P. <i>Biogeochemistry</i> 42, 1998.
Inibição da atividade microbiana	Scalbert, A. <i>Phytochemistry</i> 30, 1991.
Inibição da atividade de enzimas	Field, J. A.; Lettinga, G. <i>In Plant Polyphenols Synthesis, Properties, Significance</i> . Plenum Press, 1992. & Scalbert, A. <i>Phytochemistry</i> 30, 1991.
Melhoria na retenção de nutrientes	Sivapalan, K. <i>Soil Biol. Biochem.</i> 13, 1981.
Pedogênese (formação do solo)	Davies, R. I. <i>Soil Sci.</i> 111, 1971.
Sucessão	Schimel, J. P. et al. <i>Biogeochemistry</i> 42, 1998. Schimel, J. P. et al. <i>Can. J. Bot.</i> 74, 1996.
Desenvolvimento florestal	Bradley, R. L. <i>Plant Soil</i> 223, 2000.
Complexação de metais	Slabbert, N. <i>In Plant Polyphenols Synthesis, Properties, Significance</i> . Plenum Press, 1992.
Antioxidante	Feucht, W. <i>In Principles and Practices in Plant Ecology</i> . CRC Press, 1999.
Proteção contra a radiação ultravioleta	Close, D. C.; McArthur, C. <i>Oikos</i> , 99, 2002.
Regulação do crescimento da planta	Feucht, W. <i>In Principles and Practices in Plant Ecology</i> . CRC Press, 1999.
Cicatrizante	Walkinshaw, C. H. <i>In Plant Polyphenols 2</i> . Plenum Publishers, 1999.
Controle de infecção por fungos micorrízicos	Mallik, A. U. <i>In Recent Advances in Allelopathy. v 1</i> . Universidad de Cadiz, 1999.
Apoio estrutural / Tolerância ao frio / Resistência a seca	Chalker-Scott, L.; Kraemer, R. L. <i>In Chemistry and Significance of Condensed Tannins</i> . Plenum Press, 1989.

Tabela adaptada da referência ^[71]

Os taninos são definidos como compostos polifenólicos, solúveis em água, que podem variar em massa molecular de 500 a 3000Da e que têm a capacidade espontânea de precipitar proteínas [71]. Fazem parte do grupo dos compostos metabólicos secundários das plantas ou metabolismo especial, apresentando grande interesse econômico, para as indústrias farmacêuticas e alimentícias, além da sua significativa importância ambiental [74].

Taninos encontrados em vegetais superiores são normalmente divididos em duas grandes classes denominadas taninos condensados e hidrolisáveis, existindo ainda os taninos complexos [76,77]. Os taninos condensados, também denominados de proantocianidinas, são flavonóides poliméricos, constituídos geralmente por monômeros flavan-3-ol (catequina) ou flavan-3,4-diol (leucoantocianinas), resultantes do metabolismo do fenilpropanol e apresentam uma vasta diversidade estrutural devido a substituições de unidades flavânicas em diversas posições [71]. A Figura 1.9 representa a estrutura de um tanino condensado comum, formado por unidades monoméricas de catequinas.

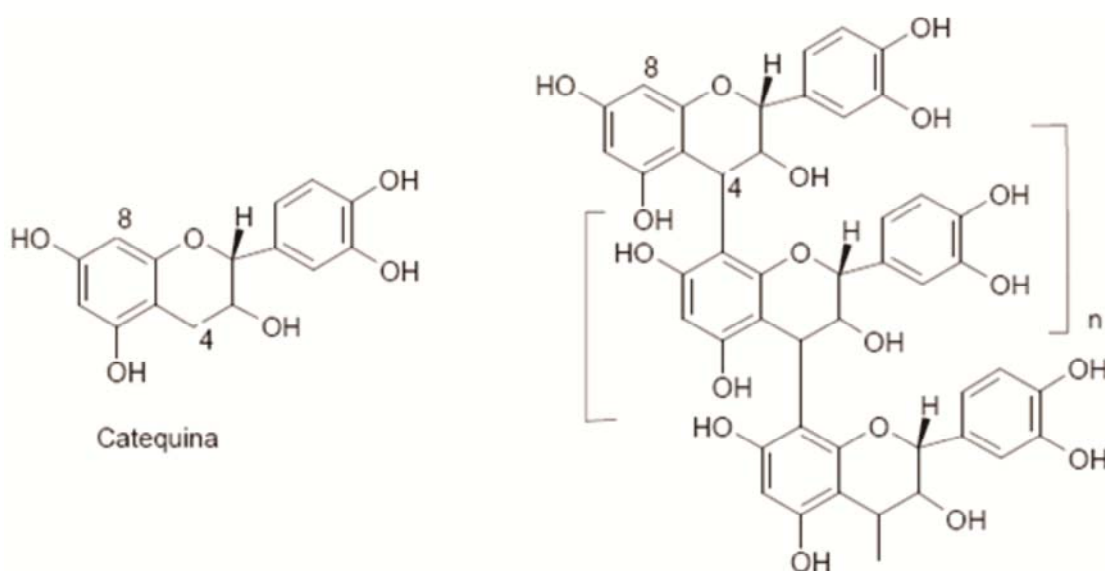
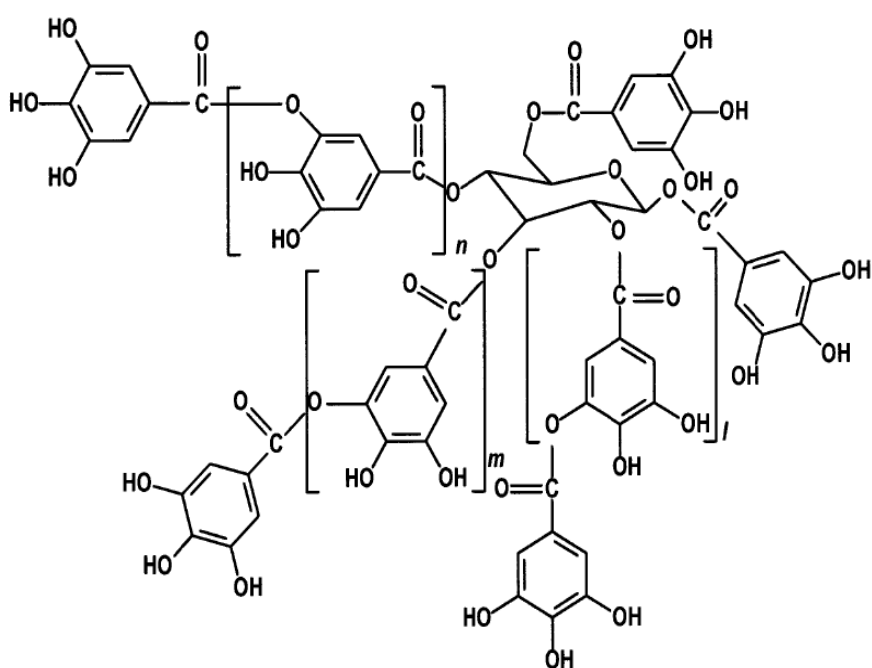


Figura 1.9 - Estruturas moleculares. (a) catequina e (b) tanino condensado (proantocianidina) formado por monômeros de catequinas.

Os taninos hidrolisáveis consistem em compostos de ésteres de ácidos gálicos (galotaninos) ou elágicos (elagitaninos), ligados a uma molécula de carboidrato, um dos mais comuns galotaninos é o ácido tânico [78]. É importante ressaltar que mesmo dentro do grupo dos taninos condensados e hidrolisáveis, existem uma vasta gama de variações estruturais [71]. Taninos compostos de ambas as classes também são conhecidos [79]. Assim, há uma enorme diversidade de taninos, e quanto maior o polímero maior a probabilidade de variação [80]. A Figura 1.10 representa a estrutura molecular do ácido tânico e a Figura 1.11 representa a estrutura química de um elagitanino, o *Oenothain A*.

Os taninos complexos são formados a partir de unidades de catequinas ligadas por meio de uma unidade glicosídica a unidades de galotaninos e/ou elagitaninos. Estes taninos complexos podem ser parcialmente hidrolisáveis [76,77].



3)

Figura 1.10 - Estrutura química do ácido tânico, um galotanino. Observe que os radicais de ácido gálico nas quantidades monoméricas l,m,n podem ser de 0 a 3.

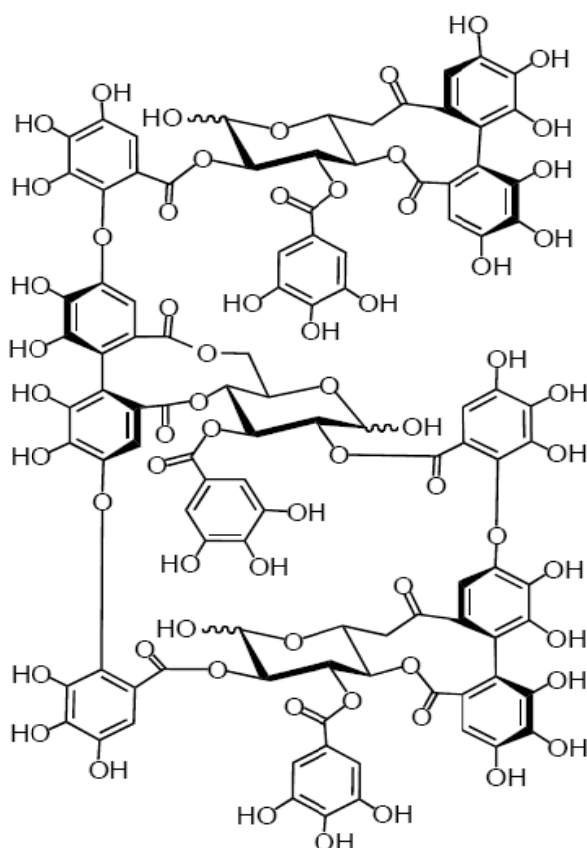


Figura 1.11 - Estrutura química do *Oenothin A*, um elagitanino.

Nutricionalmente, os taninos são considerados indesejáveis devido a sua característica natural de precipitar proteínas, inibir enzimas digestivas e afetar a utilização de vitaminas e minerais, podendo ainda em elevadas concentrações contribuir no desenvolvimento de determinadas espécies de câncer [81]. Entretanto, outras pesquisas indicam que o consumo de chás ricos em tanino diariamente inibe a formação de câncer gástrico, além de diminuir o risco de outras patologias graves como esclerose múltipla, arteriosclerose e o envelhecimento precoce [74].

Chung e colaboradores [82] sugerem que os taninos possam atuar de duas formas distintas, apresentar duplo efeito, por um lado, beneficiam a saúde devido a seu efeito quimiopreventivo contra carcinogênese, radicais livres intercelulares e atividades antimicrobianas, por outro lado, apresentam-se envolvidos, possivelmente, em efeitos antinutricionais e desenvolvimento de cânceres.

1.7.1 - Análise de taninos

Os taninos têm sido determinados e quantificados por diversas técnicas e metodologias analíticas no decorrer do anos [74]. Um dos métodos mais utilizados para determinação desses compostos é o que envolve precipitação de proteínas [83]. Vários ensaios fotométricos são usados para analisar grupos específicos de taninos, geralmente grupos hidrolisáveis. Embora os métodos espectrofotométricos não sejam gerais, vários autores afirmam não haver método ideal e enfatizam ser os métodos espectrofotométricos os mais usados e satisfatórios [84].

A determinação de taninos é comum na indústria e laboratórios de pesquisas da área de alimentos. A literatura científica apresenta um amplo número de publicações relacionadas a análise desse importante polifenol. Técnicas de determinação espectrofotométrica [85], espectrofluorimétrica [86], quimioluminescente [87], titrimétrica [88], termométrica [89], gravimétrica [90], cromatográfica [91], nefelométrica [92] e turbidimétrica [93], além de eletroforese capilar [94], foram empregadas.

Dentre as técnicas fotométricas mais empregadas, existe o reconhecido método de Folin-Denis, o qual utiliza como reagente uma mistura dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), conhecido como reativo de Folin. Na aplicação deste referido método ocorre uma reação de óxido-redução onde o reativo de Folin é reduzido pelos polifenóis formando uma suspensão coloidal de azul de molibdênio (Mo_5O_{14}) resultando no aparecimento da cor azul. Entretanto, não faz distinção entre compostos fenólicos e outros materiais redutores ou antioxidantes, como por exemplo, o ácido ascórbico, formando precipitados que interferem no resultado da análise [95].

O método Folin-Denis foi alterado para o Folin-Ciocalteu, com a adição de sulfato de lítio na mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico. O sulfato de lítio permitiu maior sensibilidade para os polifenóis, impedindo a precipitação dos complexos formados e melhor estabilidade do sinal analítico obtido, com uma banda mais definida por

volta de 760nm [95,96]. Hoje, este é considerado o método oficial para análise de tanino em amostras provenientes de tecidos vegetais pela farmacopeia europeia [97] e adotado em muitos países como Estados Unidos e Brasil [64].

Entretanto, como o método de Folin-Ciocalteu é baseado em uma reação redox, qualquer redutor presente na amostra pode interferir, apresentando assim pouca seletividade. Para determinar e quantificar taninos condensados os métodos mais empregados são o butanol-HCl e o vanilina [98]. A Tabela 1.2 apresenta os principais métodos de análise quantitativa utilizados para determinar taninos hidrolisáveis, condensados e totais.

Outras publicações na literatura descrevem sistemas de análise por injeção em fluxo como um ensaio ao processo de automação da análise de tanino [99,100]. Porém, o método oficial, com o Folin-Ciocalteu como reagente em meio básico pode agregar erros sistemáticos ao sistema FIA, devido a baixa seletividade apresentada [93,99]. Em 2003, Ferreira e colaboradores [101] desenvolveram um sistema FIA no qual se explorava a reação de precipitação entre hemoglobina e tanino. No ano de 2005, Piccin e colaboradores [93] baseados no trabalho de Yebra (102) descreveram um sistema de análise em fluxo para determinação turbidimétrica de taninos em amostras de chá a partir da complexação do tanino com íons cobre em tampão acetato.

Também visando a determinação de taninos em chá, Chen e colaboradores [86] usaram o método oficial japonês, método do tartarato ferroso [103]. Utilizando este como método padrão para suas medidas de fluorescência, por não ser afetado pelo ácido ascórbico, entre outros interferentes redutores. Segundo os autores o método japonês, que consiste na formação de um complexo vermelho que absorve na região do visível, por volta de 566 nm e que possui uma sensibilidade maior do que o método de Folin-Ciocalteu, é mais indicado para este tipo de analito permitindo análises com resultados mais confiáveis e precisos. Outros trabalhos mais recentes da literatura evidenciam o uso do método

do tartratarato ferroso como alternativa satisfatória para análise de referência [104-107].

Tabela 1.2 - Principais métodos empregados para determinação de taninos.

Método	Técnica	Vantagens	Desvantagens
Follin-Ciocalteau	Fotométrica	Fenóis totais	Sem seletividade
Azul da Prússia	Fotométrica	Fenóis totais	Reação com agentes redutores
Ácido-butanol	Fotométrica	Taninos condensados	Variação de cor, uso de padrão interno
Vanilina	Fotométrica	Meta-fenóis	Variação de cor, uso de padrão interno
KIO ₃	Fotométrica	Galotaninos e elagitaninos	Afetado por matrizes complexas
Rodanina	Fotométrica	Galotaninos	Afetado por outros ésteres
NaNO ₂	Fotométrica	Elagitaninos	
Enzimático	Inibição enzimática	Avaliação biológica	Susceptibilidade enzimática
Precipitação de proteínas	Gravimétrica	Avaliação biológica	Proteínas específicas
HPLC	HPLC	Para monômeros	Taninos condensados irreversíveis
Inibição de crescimento microbiano	Toxicológico	Avaliação biológica	Interferentes da matriz
Tiólise	HPLC	Elucidação de estruturas	Soluções puras
Precipitação por Itérbio	Gravimétrico	Sem solução padrão	Controle do Itérbio

Tabela adaptada da referência [74]

1.7.2 - Considerações sobre os métodos de análise empregados

Os taninos têm a capacidade natural de se complexar com íons metálicos. Esta característica ocorre devido a certos grupos funcionais que atuam como ligantes mono ou bidentados. Tais grupos constituem boa parte dos monômeros dos taninos condensados e hidrolisáveis. Os principais grupos de coordenação responsáveis pela precipitação do

complexo metal-ligante são os grupos orto-dihidroxifenil e carboxila, o que tornam os taninos excelentes moléculas quelantes. Alguns dos principais íons metálicos ligantes são o cobre (II), zinco (II), ferro (III), alumínio (III), germânio (VI), dentre outros [108-110].

Muitos taninos condensados e hidrolisáveis podem formar complexos com um único íon metálico por unidade monomérica, como acontece no caso do cobre (II), por exemplo. A precipitação dos complexos metal-tanino e sua respectiva estabilidade em solução se devem fundamentalmente ao pH do meio. No caso do complexo cobre-tanino, estudos evidenciam uma faixa estreita de pH para a sua precipitação e estabilização entre 4,5 e 5,5. Foi verificado empiricamente uma precipitação satisfatória com o pH em torno de 5,5, o qual foi obtido pelo uso adequado de tampão acetato [108].

Conforme descritos na literatura [108-109], outros fatores de igual importância para a precipitação dos taninos são a formação de complexos adutos, a redução da polaridade da molécula resultante e a formação de compostos com elevada massa molecular. Para formação destes compostos de alta massa molecular, cada molécula de tanino deve realizar ligações com dois ou mais íons metálicos, formando, desta forma, quelatos com grupos orto-dihidroxifenil de duas ou mais moléculas de taninos diferentes, por exemplo.

As propriedades físico-químicas que regem a insolubilidade de tais complexos ainda não são bem compreendidas [109]. Apesar disso, alguns trabalhos científicos recentes têm utilizado essa propriedade principalmente através de aplicações em química analítica e ciências biológicas [107]. A Figura 1.12 mostra o processo reacional que ocorre quando um íon metálico, no caso o cobre (II), reage com dois monômeros de taninos condensados (catequinas).

Desta forma, para se efetuar a análise dos taninos totais pelo método turbidimétrico basta adicionar uma solução concentrada de cobre(II) a fim de obter a completa precipitação do complexo. A proporção entre as soluções da amostra contendo o analito e de cobre(II)

deve ser de 1:1 v/v. Além disso, o pH do meio deve ser mantido por volta de 5,5. Neste caso, recomenda-se a utilização do tampão acetato de amônio, na proporção de 2:1 v/v ou conforme requerido pelo experimento [93,102,109].

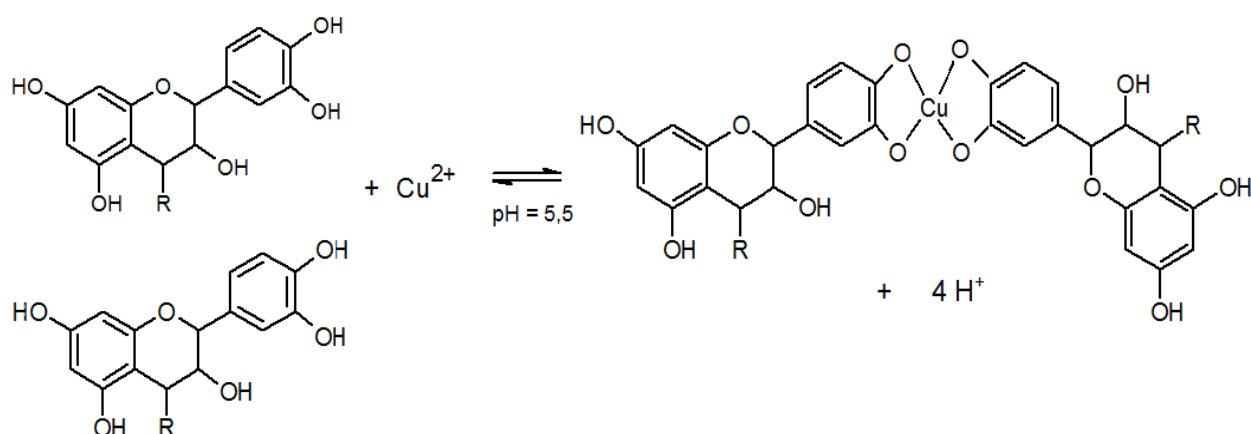


Figura 1.12 – Esquema representando a reação do íon cobre (II) com dois monômeros de catequinas, observe que a reação ocorre entre o íon e os grupos orto-dihidroxifenil em pH 5,5 com liberação de quatro íons H^+

Neste contexto, o método do tartarato ferroso (método japonês de referência) têm sido empregado em trabalhos recentes para determinação de taninos totais [104-107]. Todavia, nenhum trabalho conclusivo que descreva as propriedades físico-químicas e a estequiometria da reação de complexação entre o tartarato ferroso e os taninos foi encontrado na literatura.

Considerando-se que a estequiometria da reação é semelhante à reação do tanino com íons ferro(II) [108], o restante da estrutura do reagente (íon tartarato) é bastante solúvel e, portanto, pode ser o responsável pela não precipitação do complexo produzido. Além disso, a reação se torna mais seletiva, uma vez que não se evidenciam interferências significativas por espécies redutoras.

Para análise de taninos totais pelo método do tartarato ferroso, basta adicionar uma solução concentrada de tartarato ferroso a fim de se obter a completa formação do complexo colorido tanino-tartarato ferroso.

O meio reacional deve ser mantido tamponado por volta de pH 6,80 recomenda-se o uso do tampão fosfato 0,1M. A proporção entre a solução da amostra contendo o analito e do tartarato ferroso deve ser de 1:1 v/v ou conforme seja observado a complexação total experimentalmente.



Capítulo 2 - Experimental

2.1 - Reagentes, Amostras e Soluções

2.1.1 - Análise de Corantes

Os padrões dos corantes orgânicos artificiais tartrazina (E 102), amarelo crepúsculo (E 110) e vermelho-40 (E 129) utilizados, foram produzidos pela Indústria Sigma-Aldrich. As soluções-estoque dos corantes com 1000 mg L^{-1} foram preparadas dissolvendo-se quantidades suficientes de cada corante em solução tampão pH 7,00. As soluções-padrão de trabalho e das amostras sintéticas dos corantes, usadas nas etapas de avaliação de performance do instrumento construído e de medidas analíticas, foram preparadas por adequadas diluições das respectivas soluções-estoque.

Uma solução tampão fosfato com pH 7,00 foi utilizada na preparação de todas as soluções-padrão dos corantes e das amostras. Esta solução é obtida pela mistura na proporção de 50,0 mL da solução $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Reagen) com 29,63 mL de $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ (Vetec). A água utilizada em todas as soluções desse trabalho foi sempre recém-deionizada. A balança analítica utilizada foi da Scientech, modelo SA 120. Com a finalidade de medir o pH da solução tampão foi utilizado um pHmetro da Metrohm, modelo 713.

Para fins de comparação, o μFBA proposto teve seu desempenho avaliado em relação a um espectrofotômetro HP com arranjo de fotodiodos, modelo 8453. As medidas espectrométricas foram realizadas nos comprimentos de onda referentes à máxima absorção dos corantes: 500 nm (vermelho-40), 480 nm (amarelo crepúsculo) e 425 nm (tartrazina).

2.1.2 - Análise de Taninos

Os padrões de ácidos tânicos, utilizados como soluções padrão de referência para as análises, foram preparados a partir da diluição apropriada da solução estoque. Tal solução estoque foi produzida com 0,1000g de ácido tânico, adquiridos da Labsynth, diluídos para 100,0 mL em água recém deionizada. As amostras foram obtidas dissolvendo-se 2,0000g de chá verde ou preto (três de cada tipo, sendo de marcas e lotes distintos) em 50,0mL de água deionizada aquecida a 90°C, tais misturas foram adequadamente filtradas, utilizando-se papel de filtro quantitativo faixa branca, sendo diluído para balões volumétricos de 100,0 mL.

Para a análise fotométrica pelo método do tartarato ferroso, método japonês de referência [86,103,111], foram preparadas soluções de tartarato ferroso e tampão fosfato com pH 7,00. A solução de tartarato ferroso foi obtida pela mistura na proporção de 1,0000g de sulfato ferroso heptahidratado (Vetec) com 2,0000g de tartarato de sódio e potássio (Vetec) e 0,1000g de bissulfito de sódio (Reagen) dissolvidos em água deionizada e aferido para balão volumétrico de 100,0 mL [111].

A solução tampão de fosfato de sódio com pH 7,00, necessária para a análise, foi preparada pela mistura na proporção de 50,0 mL da solução de 0,10 mol L⁻¹ de fosfato de sódio heptahidratado (Reagen) com 29,63 mL de 0,10 mol L⁻¹ hidróxido de sódio anidro (Vetec). A balança analítica empregada para todas as pesagens foi a Scientech, modelo SA 120. Com a finalidade de medir o pH da solução tampão foi utilizado um pHmetro da Metrohm, modelo 713.

Para a análise turbidimétrica pelo método do cobre em tampão acetato [93] foram utilizadas uma solução de cobre (II) a 0,1 mol L⁻¹ e outra solução de acetato de amônio 1,5 mol L⁻¹ (Vetec), para controle do pH do meio reacional, garantindo assim a formação do precipitado desejado, em pH 5,00. A solução de cobre foi preparada dissolvendo-se 0,6355g de cobre metálico (Merck) em uma solução 50% (v/v) de ácido

nítrico P.A. (Reagen), esta foi diluída em água deionizada e aferida para balão de 100,0 mL.

Para fins de comparação, o μ FBA proposto para análise de taninos teve seu desempenho avaliado em relação a um espectrofotômetro HP com arranjo de fotodiodos, modelo 8453 e um fotômetro da Micronal, modelo B34211. As medidas espectrofométricas foram realizadas no comprimento de onda referente à máxima absorção. Para o método do tartarato ferroso, cujo complexo formado com o tânino absorve na região do vermelho a 566 nm, um LED verde foi utilizado no μ FBA. Para o método do cobre em tampão acetato, o precipitado foi avaliado na região de 400nm, o LED utilizado no μ FBA foi o azul.

2.2 - Equipamentos

2.2.1 - Microssistema de análise

Para se confeccionar um minissistema pelo método de impressão direta ^[2] utilizando *tonner* de impressora laser em um substrato de uretana-acrilato ^[11] se fez necessário a utilização de alguns aparatos fundamentais aqui relatados. O substrato polimérico, resina uretana-acrilato, M50 LBS, foi adquirido comercialmente a partir da Indústria de Carimbos Medeiros Ltda. A foto-expositora empregada para a fotolitografia no ultravioleta, também foi adquirida pela Carimbos Medeiros, modelo fotolight MD2 A4. As lâmpadas negras utilizadas foram as da marca SCT, modelo T8 BLB de 15 Watts.

Para desenvolvimento do *layout* dos canais do minissistema foi utilizado o programa CorelDRAW X3. A impressão dos *layouts* requeridos foram realizadas em filmes de poliéster, transparência para impressora a laser. Tais impressões foram feitas empregando uma impressora HP LaserJet P2014. Após a polimerização do sistema, através da

fotoexpositora, a remoção da resina não-polimerizada, a qual forma os canais, foi realizada utilizando um banho de ultra-som, Unique USC 800A.

Os métodos ou as técnicas de miniaturização analítica embora sejam fundamentais para essa área de pesquisa, não configuram, por si, um microssistema de análise química [2]. Para automatizar o sistema trabalhado utilizou-se de forma adequada os equipamentos disponíveis. Uma boma peristáltica, Ismatec IPC, foi empregada para a propulsão dos fluídos. O controle dos fluídos foi realizado com mini-válvulas solenóides da Lee Company, LHDA. A agitação no minissistema foi promovida com a inclusão de uma haste de nylon com uma das extremidades achatadas, de 0,4 mm de diâmetro, acoplado a um motor de drive de DVD.

Tanto as mini-válvulas como o agitador alternativo são acionados por meio de um controlador de válvulas. O interfaciamento deste componente com o microcomputador é realizado por meio de uma interface USB da National Instruments modelo NI USB 6009.

O software LabVIEW 5.1 foi utilizado para desenvolver e executar um programa adequado as necessidades de controle do minissistema automático desenvolvido. Tal programa permite ao usuário administrar o acionamento das válvulas e a agitação apropriada dos fluídos por tempo, além de adquirir e salvar o sinal analítico instrumental obtido na análise.

Para realização das análises químicas um LED branco, verde e azul foram utilizados como fonte de radiação para as análises ópticas, conforme a necessidade do método usado. Um fototransistor e um espectrofotômetro ocean optics, red tide USB 650, foram utilizados como detectores, também conforme necessário.

2.3 - Miniaturização do *Flow-Batch*

O esquema simplificado da Figura 2.1 melhor representa o processo experimental realizado na confecção do dispositivo miniaturizado de fluxo-batelada (μ FBA) proposto. No molde para deposição da resina foram utilizados duas transparências com o *layout* do sistema proposto impresso (Figura 2.1(a) e (b)). Os tempos de polimerização utilizados foram otimizados para a lâmpada negra utilizada (SCT), sendo de 150 segundos o melhor tempo para polimerização da parte superior de ambas as peças e 350 segundos para a parte inferior das mesmas (Figura 2.1(c) e (d)). O tempo de selagem utilizado foi o padrão ^[12] de 900 segundos para ambos os lados, o que garante uma selagem irreversível e satisfatória (Figura 2.1(e)).

Os componentes para comunicação com o ambiente externo, tubos de teflon e de vidro foram fixados no sistema já selado mediante uma segunda etapa de exposição a radiação ultravioleta-visível. Para isso deve-se adicionar um pouco da resina na superfície de contato de tais componentes com auxílio de um pequeno pincel. Essa intervenção permite a adesão irreversível dos tubos de teflon e de vidro no sistema recém microfabricado. Nesse procedimento final o tempo de selagem adequado é o mesmo utilizado na primeira selagem de 900 segundos para os dois lados (Figura 2.1(f)).

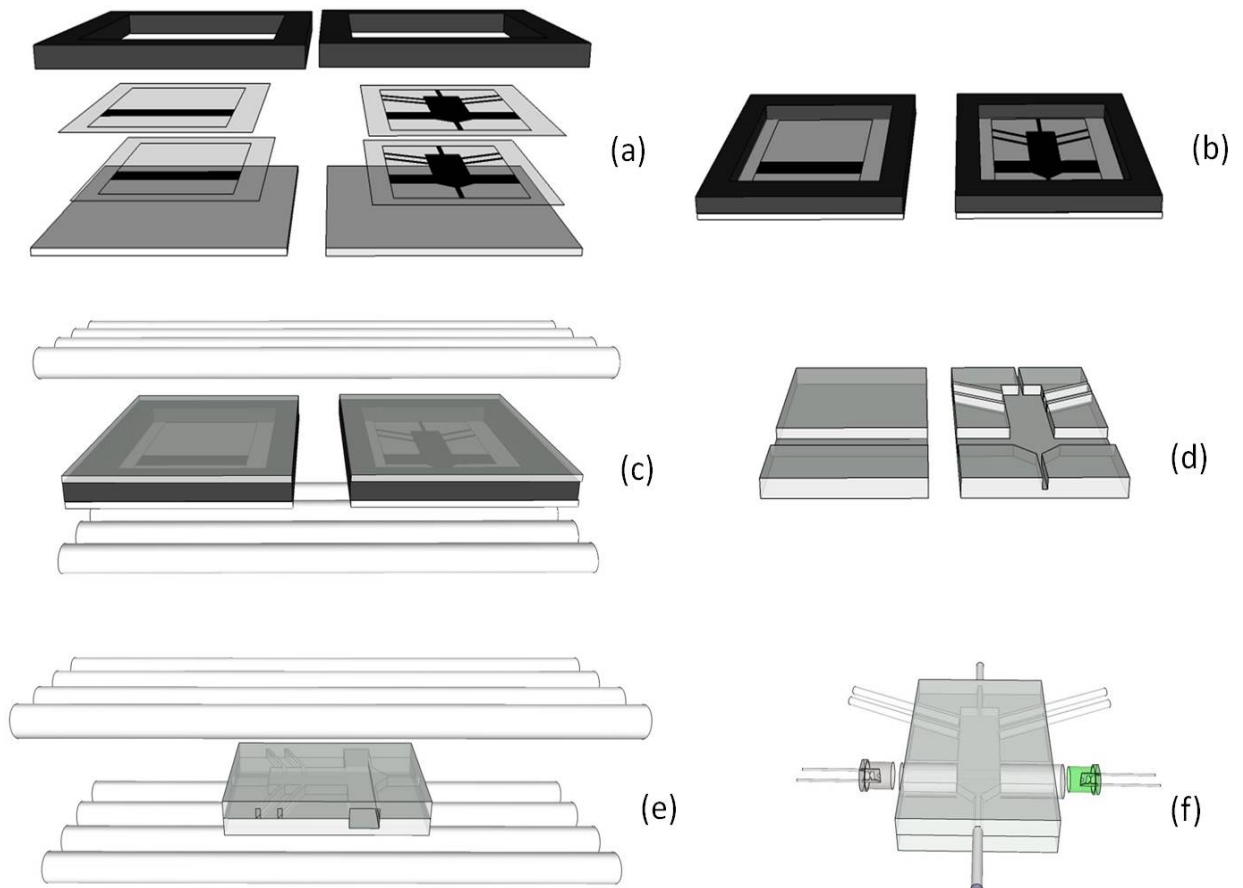


Figura 2.1 - Representação esquemática da confecção do μ FBA. (a) montagem dos moldes, (b) moldes das camadas, (c) polimerização da resina nas camadas, (d) canais gravados, (e) selagem do sistema e (f) sistema μ FBA confeccionado.

A inovação do acoplamento de pequenos tubos cilíndricos de vidro fechados em uma das extremidades permite uma significativa versatilidade para o acoplamento de diferentes fontes de energia radiante e detectores ópticos. A primeira versão dos micro *Flow-batch* apresentavam o sistema de detecção fixo, LED e fototransistor diretamente polimerizados na peça, o que não viabilizava tal possibilidade de diferentes acoplamentos. A [Figura 2.2](#) representa o sistema μ FBA desenvolvido e as suas dimensões comparadas com uma moeda, observe no detalhe os mini-tubos de 2,0 mm de diâmetro interno acoplado na câmara de mistura ou reacional, bem como os tubos de teflon de 0,50 mm de diâmetro interno.

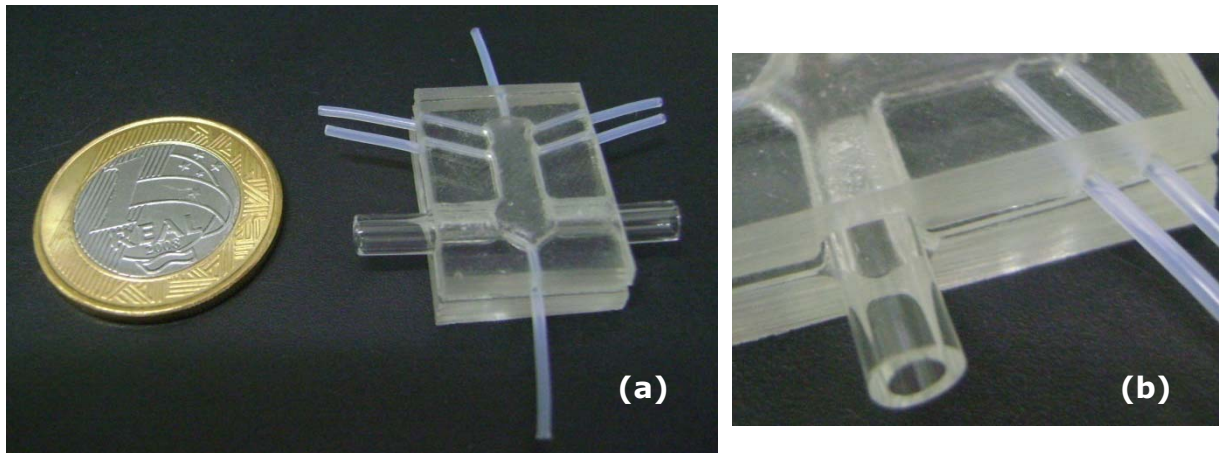


Figura 2.2 - Sistema μ FBA prototipado em uretana-acrilato. (a) comparação das dimensões do sistema com uma moeda, (b) detalhe da selagem.

O microsistema *flow-batch* confeccionado apresenta as seguintes dimensões: 14,0 mm de câmara reacional, com uma largura 5,0 mm, sendo este o comprimento do seu caminho óptico. O volume interno máximo da câmara corresponde a aproximadamente 200 μ L, sendo necessários apenas cerca de 50 μ L para completar o volume do caminho óptico e efetuar uma determinada análise.

Com os parâmetros de prototipagem já otimizados, vários sistemas com dimensões menores e *layouts* diferenciados podem ser facilmente reproduzidos. Entretanto, para a finalidade das análises requeridas tais dimensões empregadas foram consideradas satisfatórias. Todavia, é válido ressaltar que muitas formas de sistema foram avaliadas para permitir condições mais reprodutíveis e robustas, sendo o sistema utilizado um dos mais simples e adequado a um expressivo trabalho analítico dentro das condições possíveis de trabalho apresentadas.

Para permitir a sua utilização em análises automáticas o dispositivo microfabricado foi fixado adequadamente, juntamente com alguns componentes fundamentais em uma pequena caixa de montagem universal escura de tampa em U (10,0 x 8,0 x 4,0 cm) conforme apresentado na imagem da [Figura 2.3](#). O sistema automático de análise foi adaptado conforme o tipo de detector empregado.

No sistema espectrofotométrico, ilustrado na Figura 2.3, foi introduzida uma base suporte de acrílico para assegurar um posicionamento fixo a fibra óptica do *ocean optics*. Nesse sistema a alimentação do LED branco, utilizado como fonte de radiação, foi garantida por uma fonte auxiliar de 5V presente no próprio dispositivo comercial *ocean optics*.



Figura 2.3 – Imagem do sistema μ FBA desenvolvido para análise dos corantes. (a) dispositivo microfabricado, (b) LED branco, (c) agitador, (d) fibra óptica do *ocean optics* e (e) suporte de acrílico.

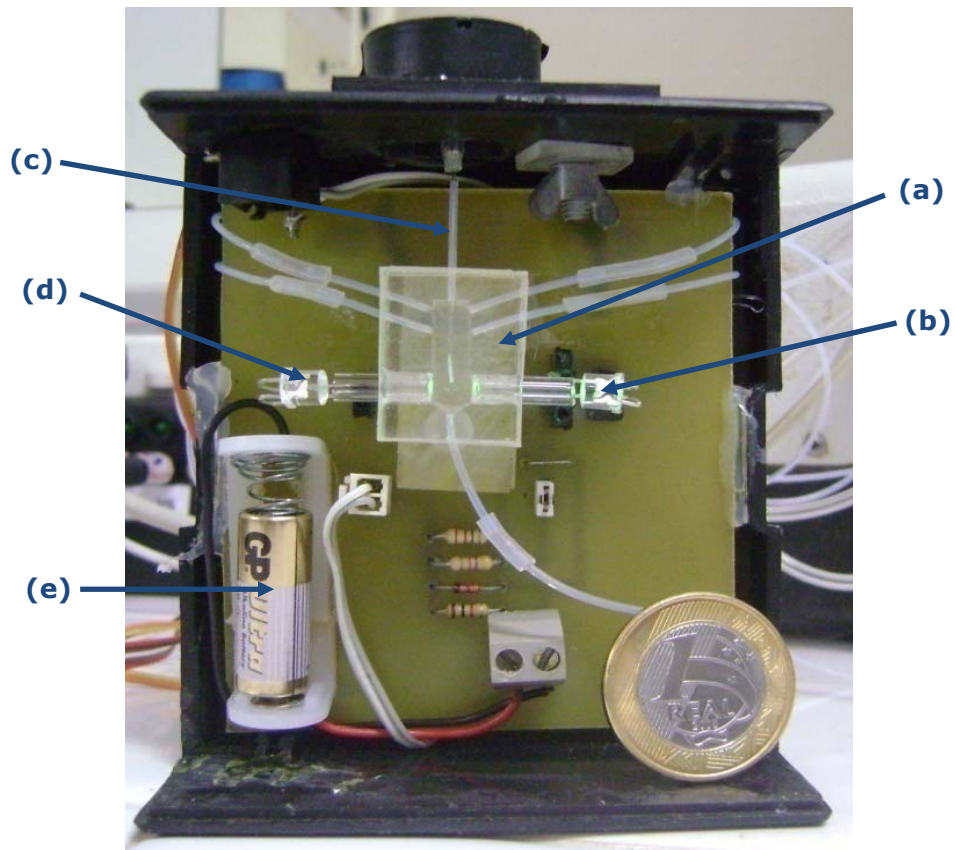


Figura 2.4 – Imagem do sistema desenvolvido para análise dos taninos em chá. (a) dispositivo μ FBA, (b) LED verde, (c) agitador (d) fototransistor e (e) bateria de 12V para alimentação.

O sistema para análise fotométrica conforme apresentado na [Figura 2.4](#) apresenta uma fonte de alimentação, bateria de 12V para o LED utilizado e um fototransistor acoplados, alinhados adequadamente. Ambos os sistemas montados apresentam circuitos elétricos bastante simples, basicamente, apenas para controle da corrente do LED e fototransistor.

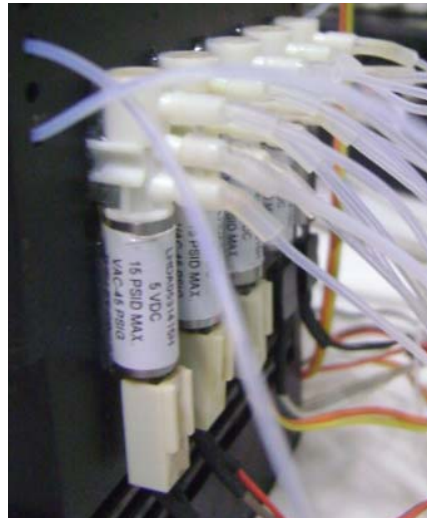


Figura 2.5 - Mini-válvulas solenóides acopladas na parte posterior da caixa contendo o sistema μ FBA.

As mini-válvulas foram acopladas na parte traseira da caixa de montagem universal contendo o microsistema, conforme apresentado na imagem da [Figura 2.5](#). O motor do drive de DVD empregado para agitação do sistema encontra-se acima dessa mesma caixa, este componente juntamente com as mini-válvulas é acionado por meio do acionador ou controlador de válvulas. O interfaciamento deste controlador com o microcomputador é garantido pela interface USB da *National Instruments*, conforme apresentado nas imagens da [Figura 2.6](#) e da [Figura 2.7](#).

A imagem apresentada na [Figura 2.6](#) representa o sistema automático desenvolvido para a avaliação do desempenho do sistema micro *flow-batch* pela determinação da concentração dos corantes vermelho 40, amarelo crepúsculo e tartrazina em amostras sintéticas desses mesmos corantes. A imagem apresentada na [Figura 2.7](#) representa o sistema desenvolvido para a determinação de taninos em amostras de chá verde e preto. Torna-se importante ressaltar que todas as medidas foram realizadas com o sistema fechado, isentando o detector de interferência da radiação expúria do ambiente.

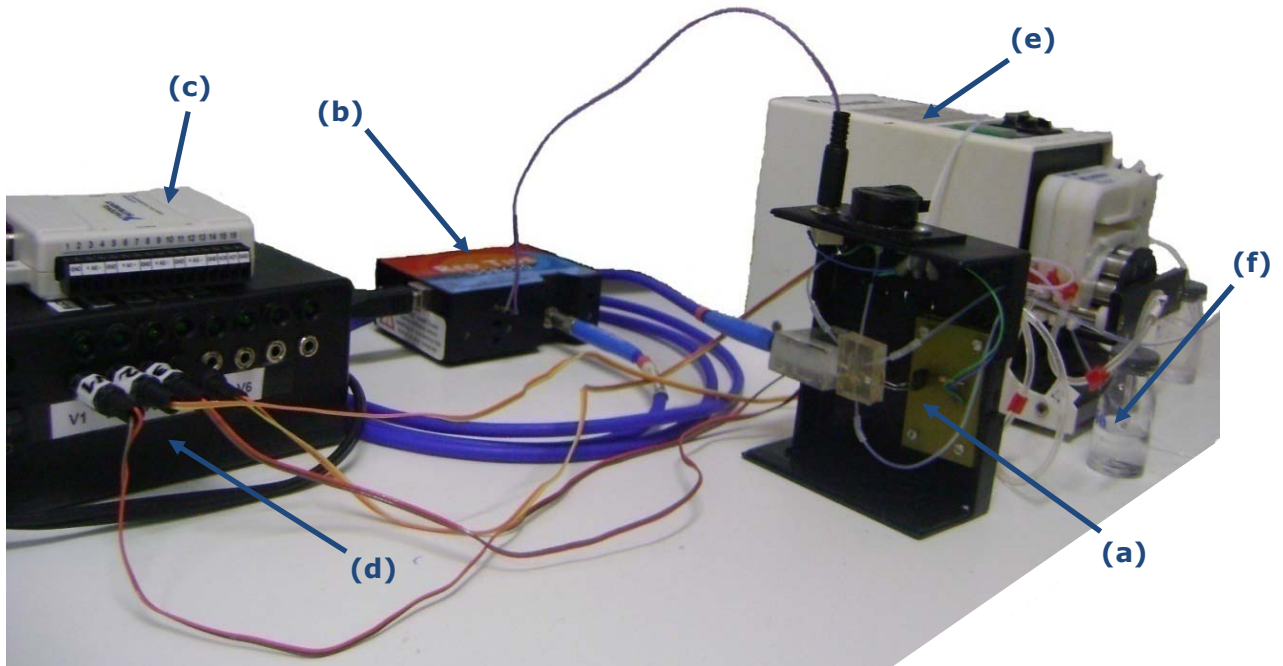


Figura 2.6 - Imagem do sistema automático micro *flow-batch* montado com os componentes utilizados para a análise dos corantes. (a) caixa contendo o μ FBA e outros componentes, (b) *ocean optics*, (c) interface USB, (d) acionador de válvulas, (e) bomba peristáltica e (f) frascos das soluções.

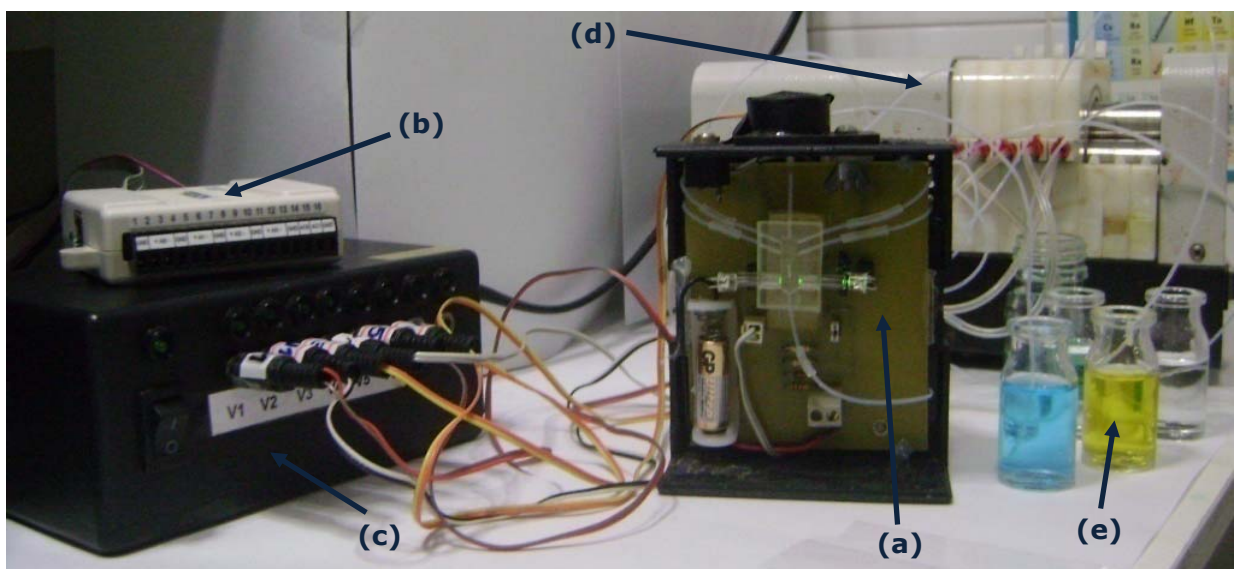


Figura 2.7 - Imagem dos componentes do analisador automático montado, utilizado para análise dos taninos. (a) caixa contendo o microsistema e outros componentes, (b) interface USB, (c) acionador de válvulas, (d) bomba peristáltica e (e) frascos das soluções.

O estudo preliminar de calibração das mini-válvulas solenóides empregadas no sistema, permitiu otimizar os tempos de acionamento das mesmas, garantindo uma melhor precisão em um menor tempo de abertura. Empiricamente, foi observada a possibilidade de se adicionar aproximadamente 17 μ L de solução a cada 0,50 segundos, a rotação contínua da bomba peristáltica de 10rpm, com ótima reprodutibilidade dos resultados obtidos.

2.3.1 - Programa de gerenciamento do sistema

O programa desenvolvido para o controle e gerenciamento automático por tempo das mini-válvulas, da agitação e da leitura do sinal analítico está representada pela [Figura 2.8](#), a qual apresenta a sua interface gráfica para administração do usuário, desenvolvida em ambiente de programação LabView. O gerenciamento desse programa de controle é bastante simplificado, apresentando-se de forma autodidática e encontra-se dividida conforme os procedimentos a ele atribuídos para adição e registro do sinal (análise), limpeza da câmara e descarte do produto.

O acionamento das válvulas e agitação da câmara de mistura é administrado de acordo com a necessidade da análise e é dependente do tempo, que deve ser inserido em milisegundos pelo usuário. O sistema permite o controle da leitura do branco, limpeza e descartes efetivos, garantindo adições precisas, além de simultâneas, possibilitando uma ótima frequência analítica e reprodutibilidade das análises. O seu funcionamento mais detalhado, com os tempos de adição, leitura e agitação, serão discutidos conforme pertinente aos resultados de cada analito estudado.



Figura 2.8 - Interface de controle automático do μ FBA para análise de taninos em chás.

A Figura 2.9 representa uma interface mais simples, também desenvolvida em ambiente LabView, para a análise dos corantes, observe que a forma de utilização, contendo as etapas de análise, limpeza e descarte são as mesmas descritas a cima, para a Figura 2.8. Torna-se importante destacar a interface de controle do *Ocean Optics* a qual apresenta o espectro obtido para o analito requerido, o espectro do led branco é mostrado no detalhe.

Ambas as interfaces de controle para usuário do μ FBA, foram desenvolvidas exclusivamente para este trabalho de pesquisa, análise de corantes e de taninos, podendo ser utilizadas para a realização de outras análises de interesse conforme a necessidade.

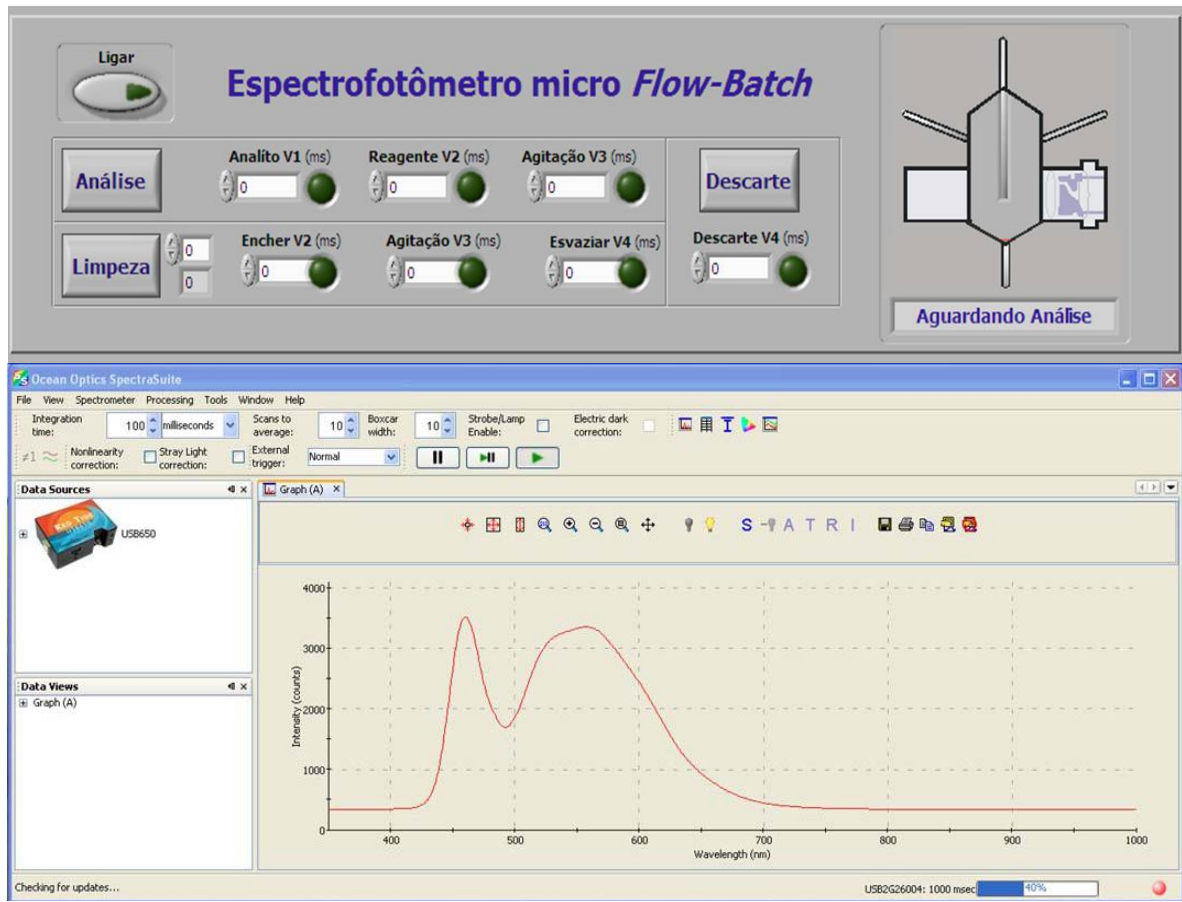


Figura 2.9 - Interface de controle automático do μ FBA para análise dos corantes e interface do *Ocean Optics* utilizada para tomada do espectro.

2.4 - Avaliação do Sistema Proposto

Inicialmente, foram realizados diversos testes com componentes, *layouts* e dimensões diferentes, buscando sempre o desenvolvimento de um minissistema *flow-batch* simples e robusto. Tais modificações foram ocorrendo de forma gradativa no decorrer da pesquisa, conforme o amadurecimento das idéias, necessidade analítica e disponibilidade de materiais adequados. Uma das mais significativas contribuições dos testes iniciais foi a confirmação experimental da interferência significativa do fio de nylon, utilizado como agitador, posicionado entre o caminho óptico.

A Figura 2.10 apresenta esse problema na medida do sinal analítico, nas mesmas condições, observe no detalhe a diferença da oscilação do sinal quando o fio de nylon se encontra dentro do caminho óptico (a), acima dele (b) e fora do sistema (c). Tal interferência foi estatisticamente validada pela falta de ajuste apresentada pelo modelo de calibração das medidas realizadas para os três corantes.

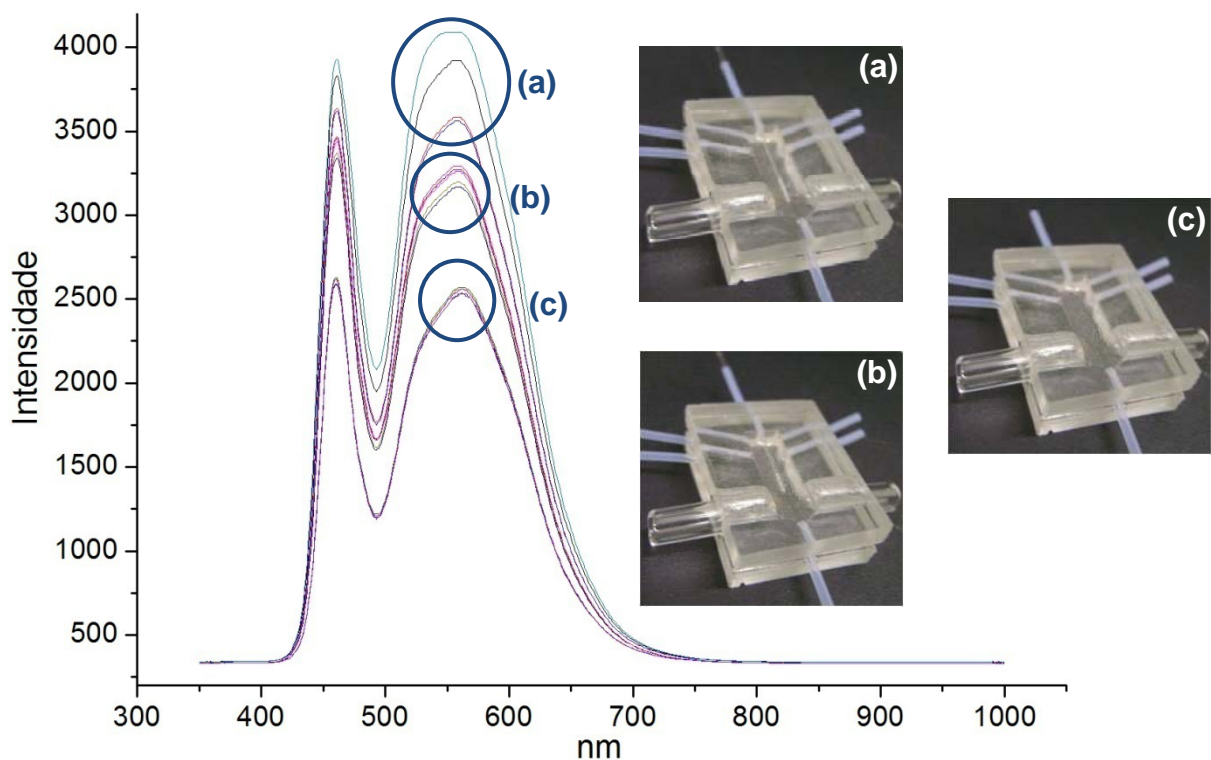


Figura 2.10 - Oscilação do sinal na análise dos corantes pela presença do fio de nylon como agitador, (a) no caminho óptico, (b) fora do caminho óptico e (c) fora do sistema.

A utilização do fio de nylon como agitador acima do caminho óptico permitiu resultados estatisticamente satisfatórios, sem perda significativa de precisão utilizando-se valores médios de triplicatas. Desta forma, tornou-se possível gerar modelos de calibração bem ajustados. Esse ajuste na agitação foi conservado para todas as análises ópticas realizadas nesse trabalho.

As soluções padrão utilizadas para a construção das curvas de calibração analítica foram realizadas na própria câmara de mistura do μ FBA. Para cada corante uma única solução padrão estoque de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi usada. Essas soluções foram diluídas proporcionalmente pela adição controlada de uma solução tampão fosfato, conforme o necessário. Tais adições são administradas pelo controle do tempo de abertura das mini-válvulas solenóides. A limpeza do sistema entre as análises também é realizada com a solução tampão.

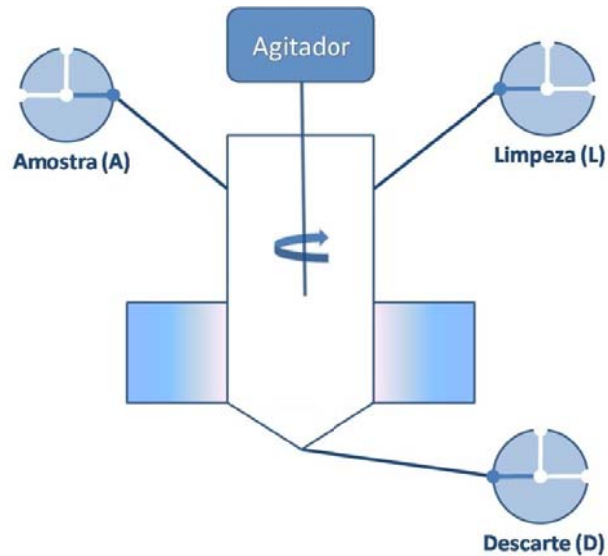
A [Figura 2.11](#) apresenta um diagrama esquemático simplificado do sistema μ FBA desenvolvido para a análise dos corantes vermelho 40, amarelo crepúsculo e tartrazina, bem como um diagrama de tempo de acionamento das válvulas para os processos de adição dos corantes (amostras), solução tampão (limpeza) e descarte, tal como realizado experimentalmente.

O instrumento otimizado proposto, com um volume de aproximadamente $50 \mu\text{L}$ em seu caminho óptico, permitiu a realização de todo o processo necessário para a determinação do analito, com a tomada do sinal, limpeza e descarte, em apenas 15 segundos. Desta forma, torna-se possível realizar até 240 análises de corantes por hora, sendo o volume de analito necessário para se realizar a medida preenchido em apenas 1,5 segundos, com a rotação da bomba peristáltica a 10 rpm, e gerando aproximadamente $51,0 \mu\text{L}$ de resíduos por cada detecção efetuada.

Pelo diagrama de tempo, esquematizado na [Figura 3.2](#), podemos analisar que são utilizados 5,0 segundos para salvar a leitura espectral realizada pelo *Ocean Optics* devido a sua tomada ser manual. A adição do tampão, posterior ao descarte de 2,0 segundos, permite a limpeza do

sistema, conjuntamente com 2,0 segundos de agitação. Tal tempo de agitação permitiu a substituição de três limpezas consecutivas (adições de tampão) por apresentar empiricamente resultado similar.

(a)



(b)

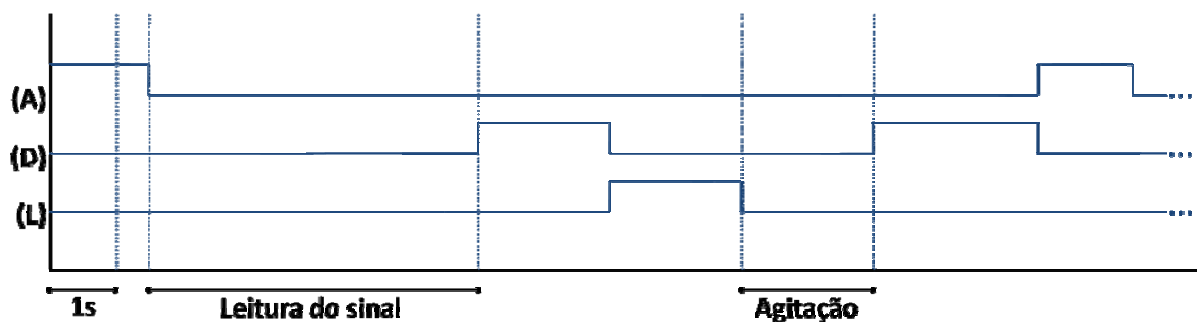
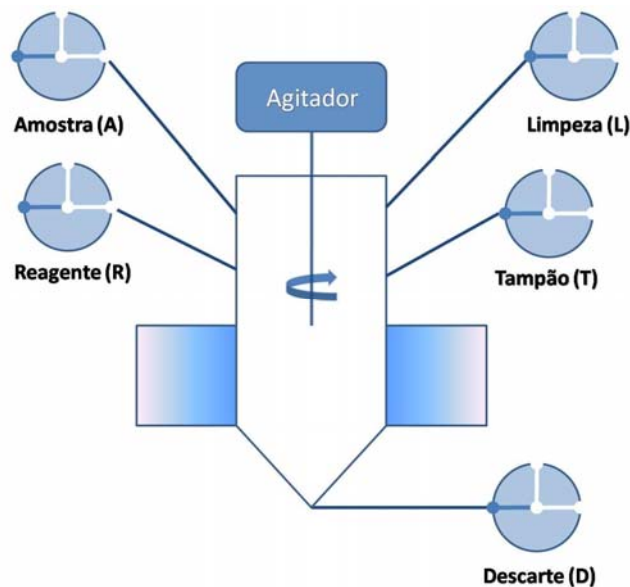


Figura 2.11 -Diagrama esquemático do μ FBA para análise dos corantes (a) e o diagrama de tempo do processo de análise (b).

O sistema micro *flow-batch* desenvolvido para análise dos taninos em amostras de chá verde e preto, muito se assemelhou ao dispositivo desenvolvido para a análise dos corantes, estudo de caso pertinente a uma avaliação geral do microsistema confeccionado. Tais diferenças foram mais acentuadas pelo próprio método óptico de determinação empregado, que passou a ser fotométrico e turbidimétrico conforme o procedimento experimental adotado.

A Figura 2.12 apresenta um diagrama esquemático simplificado do sistema μ FBA desenvolvido e um diagrama de tempo de acionamento das válvulas para adição da amostra, reagente, tampão, descarte e limpeza, tal como realizado experimentalmente. O instrumento proposto permite a realização de todo o processo necessário para a determinação do analito em apenas 12 segundos, podendo realizar cerca de 300 análises consecutivas por hora, com a geração de aproximadamente 68,0 μ L de resíduos por cada detecção efetuada.

(a)



(b)

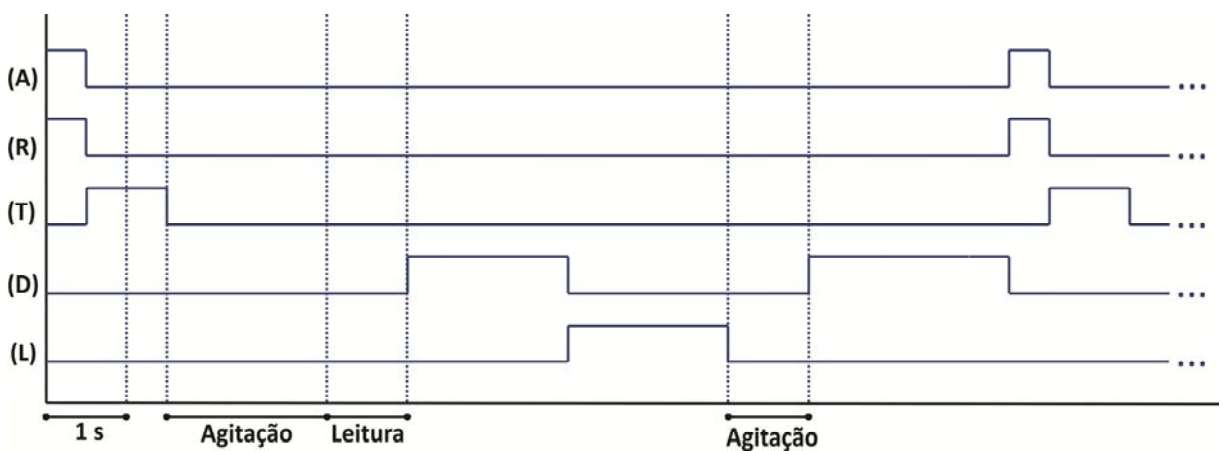


Figura 2.12 - Diagrama esquemático do μ FBA para a análise dos taninos pelo método fotométrico (a) e o diagrama de tempo do processo de análise (b).

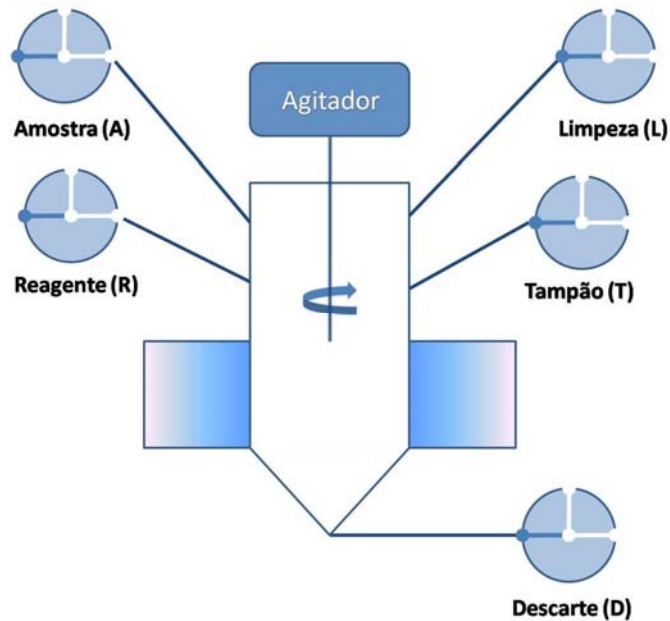
Pelo diagrama de tempo, esquematizado na Figura 2.12, podemos observar que o tempo de adição para amostra de chá e do reagente tartarato ferroso, aproximadamente $17\mu\text{L}$ de cada solução, ocorre simultaneamente em 0,5 segundos, devido a corrente gerada pelo circuito desenvolvido para o acionador de válvulas ser suficiente para comportar a alimentação de até duas válvulas (10V, no total). O tampão fosfato, pH 6,8, é adicionado com o dobro do volume do reagente, por ter sido constatado empiricamente ser esta uma relação satisfatória para uma completa complexação.

A agitação de 2,0 segundos mostrou-se suficiente para uma mistura homogênea do sistema. A adição de água deionizada, posterior ao descarte de 2,0 segundos, permite a limpeza do sistema, conjuntamente com 1,0 segundo de agitação. Tal tempo de agitação permite a substituição de três limpezas consecutivas com água deionizada por apresentar empiricamente resultado similar.

O método turbidimétrico de cobre em tampão acetato ^[93] para determinação da concentração de taninos nos chás também foi realizado e posteriormente comparado com as concentrações obtidas pelo método de referência empregado, o de tartarato ferroso. Os resultados obtidos pelo micro *flow-batch* desenvolvido foram comparados com os resultados de um espectrofotômetro HP e um fotômetro Micronal.

A Figura 2.13 apresenta um diagrama esquemático simplificado do sistema μFBA desenvolvido e um diagrama de tempo de acionamento das válvulas para adição da amostra, reagente, tampão, descarte e limpeza, com ácido nítrico a 10%, tal como realizado experimentalmente. O instrumento proposto permite a realização de todo o processo necessário para a determinação do analito em apenas 18 segundos, podendo realizar até 200 análises consecutivas por hora, com a geração de aproximadamente $68,0\mu\text{L}$ de resíduos por cada detecção efetuada.

(a)



(b)

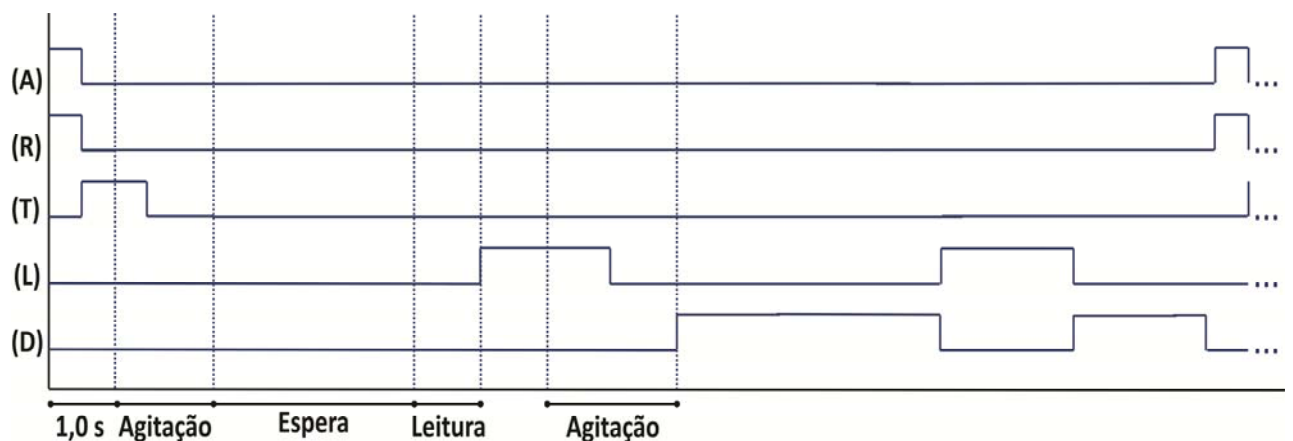


Figura 2.13 - Diagrama esquemático do μ FBA para a análise dos taninos pelo método turbidimétrico (a) e o diagrama de tempo do processo de análise (b).

Pelo diagrama de tempo, esquematizado na Figura 2.13, podemos observar que o tempo de adição para amostra de chá e do reagente, solução de cobre II, aproximadamente $17\mu\text{L}$ de cada solução, ocorre simultaneamente em 0,5 segundos, devido a corrente gerada pelo circuito desenvolvido para o acionador de válvulas ser suficiente para comportar a alimentação das duas válvulas.

O tampão acetato de amônio 1,5M é adicionado com o dobro do volume do reagente, por ter sido constatado empiricamente ser esta uma

relação satisfatória para a completa complexação do tanino com o cobre II, permitindo assim a formação do precipitado. Os 1,5 segundo de agitação do sistema mostraram-se suficientes para uma mistura mais homogênea. O tempo de espera de 3,0 segundos, empiricamente otimizado, antes da medida do sinal, permitiu uma melhor homogenização do precipitado formado.

A adição da solução de ácido nítrico a 10% antes do descarte, permitiu a limpeza do sistema, conjuntamente com 2,0 segundo de agitação. Tal tempo de agitação permite a substituição de duas limpezas consecutivas com a solução de ácido nítrico. No entanto, para garantir uma melhor limpeza, remoção de algum resquício de precipitado, foi acrescentado mais 2,0 segundos de limpeza.

2.5 - Procedimentos para Avaliação da Performance Analítica

Os procedimentos estatísticos para a estimativa das figuras de mérito e validação dos modelos de calibração empregados neste trabalho são sucintamente descritos a seguir.

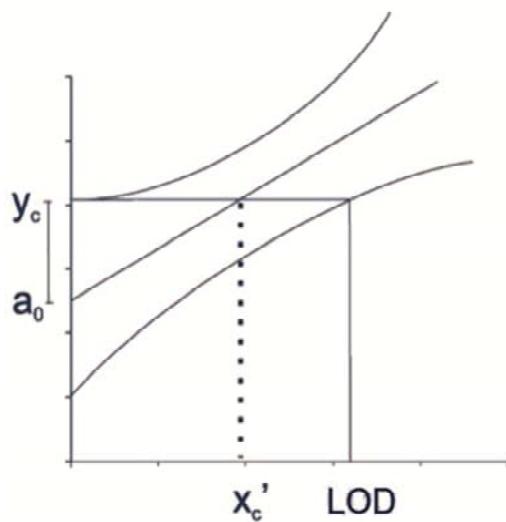
A sensibilidade de um método analítico é definida pelos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ). O limite de detecção corresponde a menor concentração de espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada, enquanto o limite de quantificação corresponde a concentração mais baixa que pode ser quantificada dentro dos limites de reprodutibilidade das medidas pelo método empregado.

Existem três formas de se estimar LOD e LOQ e as suas escolhas geralmente devem levar em consideração a técnica analítica utilizada, bem como o grau de confiabilidade estatística necessária. São eles, o método visual, da relação sinal-ruído e pelos parâmetros da curva analítica ^[112].

O método da relação sinal ruído, que utiliza de 20 a 30 medidas do sinal do branco, é amplamente utilizado devido a sua rapidez e simplicidade dos cálculos estatísticos. O método da estimativa do limite de detecção e quantificação baseado em parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística e robustez, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. Neste caso, o LOD e o LOQ são calculados a partir do intervalo de confiança pode ser medida a 95% de confiança estatística. Tais estimativas foram realizadas através de uma planilha eletrônica para validação de métodos analíticos univariados proposta na literatura ^[113] e disponível na internet ^[114].

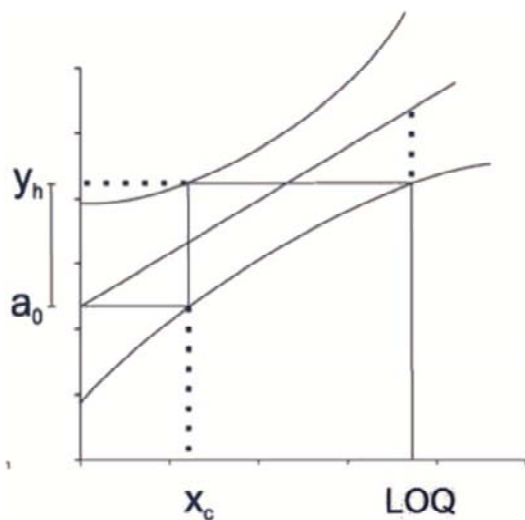
A Figura 2.14 ilustra os parâmetros e equações utilizadas para a realização dos cálculos estatísticos para tal previsão de LOD e LOQ. A estimativa do sinal analítico a partir da equação da regressão apresenta um erro padrão, o produto desse erro pelo valor da distribuição t de Student adequado, permite calcular o intervalo de confiança da curva de calibração (Figura 2.14(a)), que apresenta a forma de duas linhas hiperbólicas ao redor da curva. O intercepto do limite superior do intervalo de confiança é denominado y_c crítico (y_c) e a sua projeção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança estatística evidenciado, sendo o limite de detecção do método (LOD). As equações apresentadas (Figura 2.14(a)) descrevem os cálculos de y_c crítico e do limite de detecção.

Pelo método dos parâmetros da curva de calibração, o limite de quantificação (LOQ) também é determinado da mesma forma de LOD. Como observado através da Figura 2.14(b) x_c é o valor da concentração, x , no ponto onde o valor de a_0 intercepta a reta de regressão e y_h é o valor da projeção de x_c no limite superior. Os cálculos estatísticos de y_h , x_c e LOQ podem ser efetuados pela utilização das equações apresentadas na Figura 2.14(b).



$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$LOD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$



$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$x_c = \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$LOQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Figura 2.14 - Curvas de calibração e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b).

O modelo de calibração pode ser usado para estimar a concentração do analito de maneira satisfatória apenas se for capaz de descrever o comportamento dos valores experimentais. Portanto, o modelo predito não pode apresentar evidências de falta de ajuste e deve refletir uma significativa regressão estatística. Desta forma, a validação do modelo de calibração geralmente é realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA) [115]. A Tabela 2.1 apresenta as equações para ANOVA de dados experimentais adaptados para modelos lineares pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

Tabela 2.1 - ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.

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

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

A validação de modelos lineares pela aplicação do método dos mínimos quadrados consiste na análise dos resíduos, falta de ajuste e significância da regressão. Na análise de resíduos deixados pelo modelo, verifica-se o comportamento dos erros de previsão em relação aos dados experimentais. No gráficos dos resíduos é possível identificar o tipo de erro associado aos dados. Dessa forma, se os resíduos apresentam algum perfil ou estrutura teremos a presença de um erro experimental associado aos dados obtidos. Entretanto, se os resíduos se distribuírem aleatoriamente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios.

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

No teste de significância da regressão os resíduos do modelo com relação à média dos valores de **y**, média quadrática da regressão (MQ_{reg})

são comparados com os resíduos deixados pelo modelo com relação aos dados experimentais, MQ_{ep} . Desta forma, quando a razão $(MQ_{reg})/(MQ_{ep})$ é maior do que o valor do ponto da distribuição F referente aos graus de liberdade de MQ_{reg} e MQ_{ep} para um certo nível de confiança, o modelo estará melhor ajustado.



Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 - Determinação dos Corantes Alimentícios

Para validação estatística do micro sistema proposto em relação a um espectrofotômetro comercial, foi realizada, primeiramente, uma investigação da faixa dinâmica, envolvendo os valores de limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), para a determinação de cada um dos corantes estudados. Para tanto, usou-se o equipamento proposto desenvolvido, micro *flow-batch* e um instrumento comercial de referência, espectrofotômetro HP.

Um teste de análise de variância (ANOVA) foi realizado para validar os modelos lineares baseados no método dos mínimos quadrados (MMQ). Em seguida, as curvas de calibração analítica foram construídas e os testes *F* para falta de ajuste e de significância estatística da regressão foram aplicados aos modelos lineares com base nos resultados de variância, bem como os intervalos de confiança em relação aos parâmetros do modelo foram encontrados.

Os resultados da investigação da faixa dinâmica para a determinação dos corantes vermelho-40, amarelo crepúsculo e tartrazina são apresentados na [Tabela 3.1](#). Para isso, foram preparadas soluções desses corantes, em triplicatas autênticas, com concentrações na faixa de 2,0 a 10,0 mg L⁻¹.

Pode-se averiguar observando os valores apresentados na Tabela 3.1 que o instrumento proposto apresenta uma faixa linear semelhante e valores de LOD e LOQ maiores do que os obtidos com o equipamento de referência. Tal fato pode ser avaliado segundo a forma de detecção e o caminho óptico dos instrumentos, onde o micro *flow-batch* apresenta como detector um fototransistor, enquanto que o espectrofotômetro HP possui um detector de arranjo de fotodiodos o que pode conferir melhor sensibilidade na análise realizada, além disso, o caminho óptico do equipamento proposto é a metade do comercial.

Tabela 3.1 - Comparação entre LOD e LOQ (em mg L⁻¹) para a determinação dos corantes entre o instrumento proposto (μFBA) e referência (HP), a 95% de confiança estatística.

Analito	HP		μFBA	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Vermelho 40	0,26	0,39	0,38	1,15
Amarelo Crepúsculo	0,22	0,32	0,37	1,12
Tartrazina	0,19	0,28	0,33	1,06

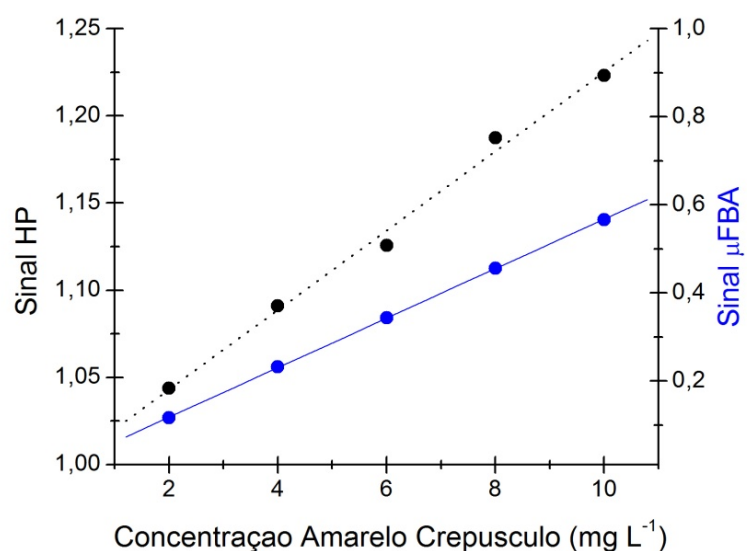
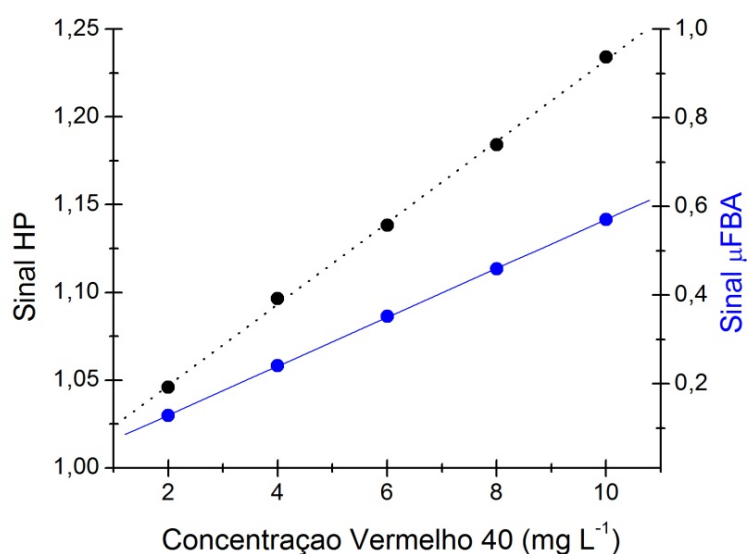
A Tabela 3.2 apresenta os parâmetros dos modelos, obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, que descrevem as curvas analíticas mostradas na Figura 3.1. Na Tabela 3.2, também são apresentados os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais dos parâmetros dos modelos, os quais foram obtidos considerando o nível de 95% de confiança. Como os intervalos de confiança não contêm o valor zero, os parâmetros estimados para todos os modelos de calibração são considerados estatisticamente significativos.

Tabela 3.2 - Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos pelos métodos mFBA e HP.

Analito	Modelo: $\hat{y} = \alpha + \beta x$			
	$\alpha \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\alpha)$		$\beta \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\beta)$	
	HP	μFBA	HP	μFBA
Vermelho 40	0,512 ± 0,018	0,356 ± 0,098	0,072 ± 0,055	0,049 ± 0,019
Amarelo Crepúsculo	0,337 ± 0,009	0,318 ± 0,018	0,056 ± 0,006	0,052 ± 0,015
Tartrazina	0,990 ± 0,004	0,399 ± 0,984	0,149 ± 0,047	0,061 ± 0,019

As curvas de calibração analítica foram construídas com base nos níveis de concentração distribuídos segundo os valores 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹. A Figura 3.1 mostra que as curvas analíticas, obtidas por ambos os instrumentos, exibem um comportamento linear entre a

resposta analítica e a concentração dos analitos em suas soluções de calibração. Essa inferência, baseada inicialmente em uma inspeção visual, é confirmada mediante a análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e, principalmente, pela aplicação da Análise de Variância, apresentada na sequência.



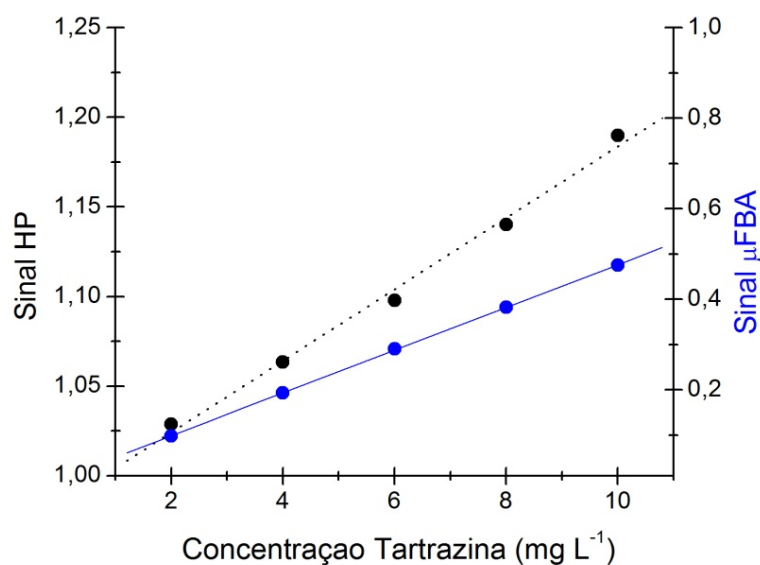


Figura 3.1 - Curvas de calibração analítica mFBA (linha azul pontilhada) e HP (linha preta cheia).

O gráfico dos resíduos deixados pelos modelos de calibração é apresentado na [Figura 3.2](#). Como se pode observar, os resíduos se distribuem de maneira aleatória, variância aleatória constante, isto é, não exibem nenhuma estrutura sistemática, que evidencie uma eventual falta de ajuste. Não obstante, a análise dos gráficos dos resíduos constitui um critério subjetivo e, por isso, esse procedimento pode não ser suficiente para concluir que os modelos não apresentam falta de ajuste. Para isso, recorreu-se à ANOVA e aplicou-se o teste F para verificar se existe falta de ajuste e avaliar a significância estatística da regressão.

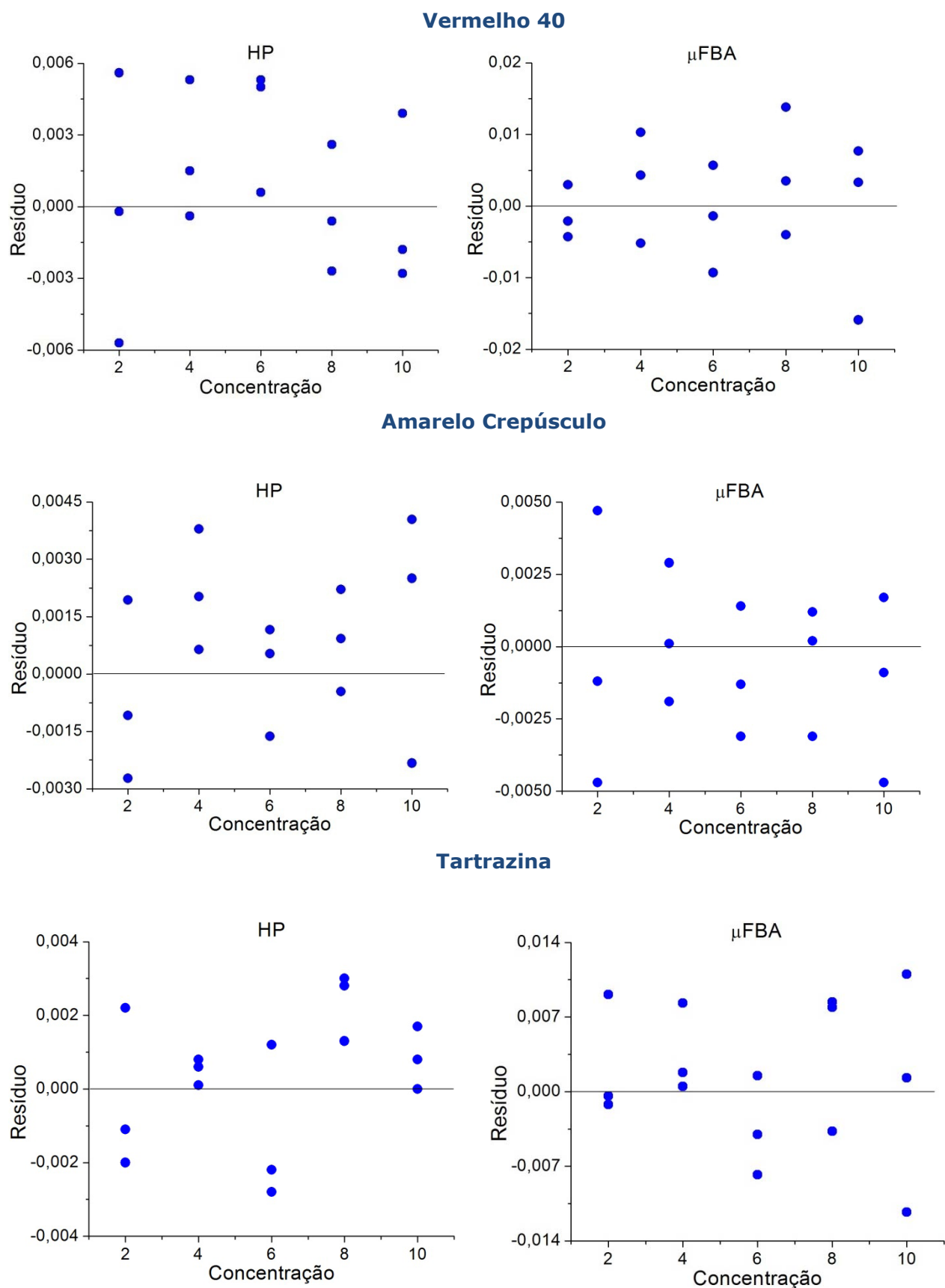


Figura 3.2 - Gráfico dos resíduos dos modelos de calibração HP e μ FBA, respectivamente, para os três corantes analisados.

Os resultados da Análise de Variância, ANOVA, utilizada para a validação dos modelos de calibração baseados nas medições realizadas no μ FBA e HP, são apresentados na Tabela 3.3 e Tabela 3.4. Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas de acordo com as equações na Tabela 2.1 e os valores obtidos são mostrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas para ANOVA.

Analito	Fonte	SQ		MQ	
		HP	μ FBA	HP	μ FBA
Vermelho 40	Reg. (1)	$3,63 \times 10^{-1}$	$6,46 \times 10^{-2}$	$3,63 \times 10^{-1}$	$6,46 \times 10^{-2}$
	Res. (13)	$1,96 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,51 \times 10^{-5}$	$8,26 \times 10^{-5}$
	F.Aj. (3)	$7,34 \times 10^{-5}$	$6,07 \times 10^{-5}$	$2,44 \times 10^{-5}$	$2,02 \times 10^{-5}$
	E. P. (10)	$1,23 \times 10^{-4}$	$1,01 \times 10^{-3}$	$1,23 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-4}$
Amarelo Crepúsculo	Reg. (1)	$3,76 \times 10^{-1}$	$3,66 \times 10^{-1}$	$3,76 \times 10^{-1}$	$3,66 \times 10^{-1}$
	Res. (13)	$1,13 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$	$8,75 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-5}$
	F.Aj. (3)	$7,48 \times 10^{-5}$	$1,85 \times 10^{-5}$	$2,49 \times 10^{-6}$	$6,17 \times 10^{-6}$
	E. P. (10)	$3,89 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-4}$	$3,89 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-5}$
Tartrazina	Reg. (1)	$2,65 \times 10^{-1}$	$4,38 \times 10^{-2}$	$2,65 \times 10^{-1}$	$4,38 \times 10^{-2}$
	Res. (13)	$8,27 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-3}$	$6,36 \times 10^{-6}$	$1,14 \times 10^{-4}$
	F.Aj. (3)	$7,83 \times 10^{-5}$	$9,84 \times 10^{-4}$	$2,61 \times 10^{-5}$	$3,28 \times 10^{-5}$
	E. P. (10)	$4,39 \times 10^{-6}$	$4,96 \times 10^{-4}$	$4,39 \times 10^{-5}$	$4,96 \times 10^{-5}$

Sendo: Reg.: Regressão, Res.: Resíduos, F. Aj.: Falta de ajuste, E. P.: Erro puro. Os valores entre parênteses indicam o número de graus de liberdade.

Após o cálculo das médias quadráticas, estes valores foram utilizados nos testes de falta de ajuste e significância de regressão, cujos resultados encontram-se na Tabela 3.4. Para todos os casos, os valores de MQ_{faj}/MQ_{ep} são menores que o ponto da distribuição F , ao nível de 95% confiança, considerando os mesmos graus de liberdade. Dessa forma, não há evidência de falta de ajuste para um modelo linear. Além disso, a Tabela 3.4 revela que as regressões lineares são altamente significativas. De fato, os valores de MQ_{reg}/MQ_r são muito maiores que o ponto da

distribuição F , considerando-se os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança.

Tabela 3.4 - Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração dos corantes.

Analito		Vermelho 40	Amarelo Crepúsculo	Tartrazina
MQ_{faj}/MQ_{ep}	HP	1,986	0,064	0,593
	μ FBA	0,199	0,501	0,671
MQ_{reg}/MQ_r	HP	$2,403 \times 10^4$	$4,301 \times 10^4$	$4,168 \times 10^4$
	μ FBA	$7,820 \times 10^2$	$3,362 \times 10^4$	$3,854 \times 10^3$
gl	Falta de Ajuste	3 e 10 respectivamente		
	Signif.da Regres.	1 e 13 respectivamente		
$F_{v1/v2}$ a 95%	Falta de Ajuste	3,71		
	Signif.da Regres.	4,67		

Uma vez validados os modelos de calibração, as curvas analíticas do μ FBA e HP foram usadas para a determinação dos corantes alimentícios vermelho 40, amarelo crepúsculo e tartrazina em amostras sintéticas. A Tabela 3.5 mostra tais resultados com os valores médios de três repetições.

A aplicação do teste t -emparelhado mostrou que não existe diferença significativa entre os resultados da Tabela 3.4 ao nível de 95% de confiança estatística. Além disso, observa-se uma satisfatória precisão dos resultados para o micro *Flow-batch*, como observado pelos valores dos intervalos de confiança e de desvio padrão relativo, DPR [116].

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

Tabela 3.5 - Resultados da determinação das amostras sintéticas dos corantes.

Amostras	Valor Esperado (mg L ⁻¹)	Valor Predito (mg L ⁻¹)	
		HP	μFBA
Vermelho 40			
Am1	5,20	5,257 ± 0,011	5,196 ± 0,001
Am2	6,80	6,919 ± 0,001	6,910 ± 0,012
Am3	9,20	9,388 ± 0,019	9,292 ± 0,030
Am4	3,80	3,844 ± 0,025	3,954 ± 0,017
Am5	2,60	2,576 ± 0,006	2,565 ± 0,005
Desvio padrão relativo		0,009	0,013
Amarelo Crepúsculo			
Am1	5,20	5,257 ± 0,006	5,196 ± 0,019
Am2	6,80	6,919 ± 0,019	6,910 ± 0,001
Am3	9,20	9,388 ± 0,010	9,292 ± 0,028
Am4	3,80	3,844 ± 0,020	3,954 ± 0,034
Am5	2,60	2,576 ± 0,015	2,565 ± 0,021
Desvio padrão relativo		0,014	0,021
Tartrazina			
Am1	5,80	5,971 ± 0,025	5,678 ± 0,010
Am2	7,20	7,216 ± 0,013	6,931 ± 0,036
Am3	9,80	10,054 ± 0,034	10,342 ± 0,106
Am4	2,80	2,942 ± 0,001	2,910 ± 0,022
Am5	4,60	4,774 ± 0,018	4,679 ± 0,014
Desvio padrão relativo		0,018	0,038

3.2 - Determinação de Taninos em Chás

3.2.1 - Método Fotométrico do Tartarato Ferroso

Inicialmente, foram realizadas as análises pelo método adotado como referência ^[103], sendo este o método fotométrico japonês do tartarato ferroso. Os resultados obtidos pelo micro sistema desenvolvido foram comparados com os resultados de um instrumento comercial de referência, um espectrofotômetro HP e um fotômetro Micronal, também comercial e de referência.

Desta forma, foi realizada primeiramente, uma investigação da faixa dinâmica do analito, envolvendo os valores de LOD e LOQ. Um teste de análise de variância também foi realizado para validar os modelos lineares. Na sequência, as curvas analíticas foram contruídas e os testes F para falta de ajuste e de significância estatística foram aplicados.

Os resultados da investigação da faixa dinâmica para a determinação do teor de tanino nas amostras de chá verde e preto são apresentados na Tabela 3.6. Para tanto, foram preparadas soluções do padrão de ácido tânico, em triplicatas autênticas, com concentrações na faixa de 20,0 a 100,0 mg L⁻¹. Observe que os valores de LOD e LOQ são um pouco menores para o espectrofotômetro HP em relação ao µFBA, que por sua vez apresenta menores valores do que os do fotômetro Micronal. Tais diferenças devem-se sobretudo ao tipo de detector e ao caminho óptico empregados. O µFBA apresenta melhor valores do que um fotômetro comercial, o que é bem satisfatório, entretanto, não consegue superar os valores de LOD e LOQ de um espectrofotômetro, visto que este apresenta um detector de arranjo de fotodiodos, que lhe confere melhor sensibilidade. Desta forma, estes resultados mostram-se coerentes as limitações do instrumento proposto.

Tabela 3.6 - Comparação dos resultados de LOD e LOQ, em mg L⁻¹ a 95% de confiança, para determinação do teor de tanino pelo método fotométrico.

	HP	Micronal	µFBA
LOD	3,02	6,36	4,74
LOQ	4,48	9,46	6,98

A Tabela 3.7 apresenta os parâmetros dos modelos, obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, que descrevem as curvas analíticas mostradas na Figura 3.3. Na Tabela 3.7, também são apresentados os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais dos parâmetros dos modelos, os quais foram obtidos

considerando o nível de 95% de confiança. Como os intervalos de confiança não contêm o valor zero, os parâmetros estimados para todos os modelos de calibração são estatisticamente significativos.

Tabela 3.7 - Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos.

Instrumento	Modelo $\hat{y} = \alpha + \beta x$	
	$\alpha \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\alpha)$	$\beta \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\beta)$
HP	0,014 ± 0,013	0,150 ± 0,004
Micronal	0,010 ± 0,014	0,102 ± 0,003
μFBA	0,010 ± 0,004	0,122 ± 0,001

As curvas de calibração analítica foram construídas com base nos níveis de concentração distribuídos segundo os valores 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 mg L⁻¹. A Figura 3.3 mostra que as curvas analíticas, obtidas por ambos os instrumentos, exibem um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração dos analitos em suas soluções de calibração. Essa inferência, baseada inicialmente em uma inspeção visual, é confirmada mediante a análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e, principalmente, pela aplicação da Análise de Variância, apresentada na sequência.

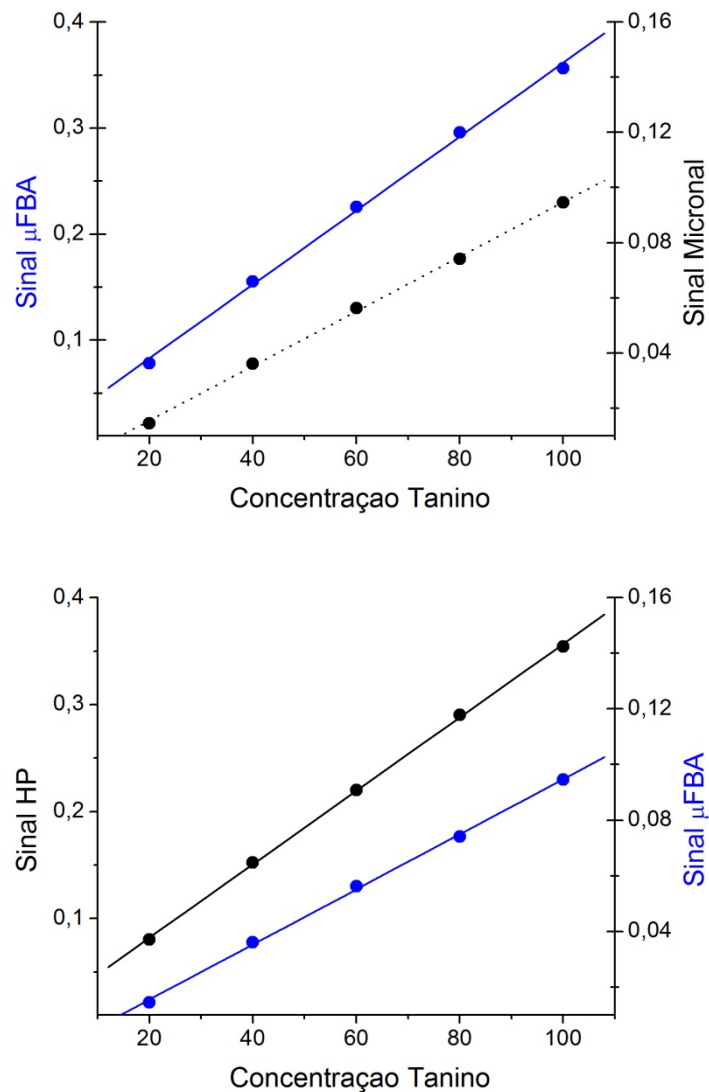


Figura 3.3 - Curvas de calibração comparativas entre Micronal (linha preta pontilhada) e μ FBA (linha azul cheia), HP (linha preta cheia) e μ FBA (linha azul cheia) , respectivamente, para o método fotométrico do tartarato ferroso.

Os resíduos deixados pelos modelos de calibração são exibidos na Figura 3.4. Observa-se nesta figura uma variância aleatória constante ao longo da faixa de concentrações investigada, indicando a inexistência de estruturas sistemáticas, que evidencie falta de ajuste.

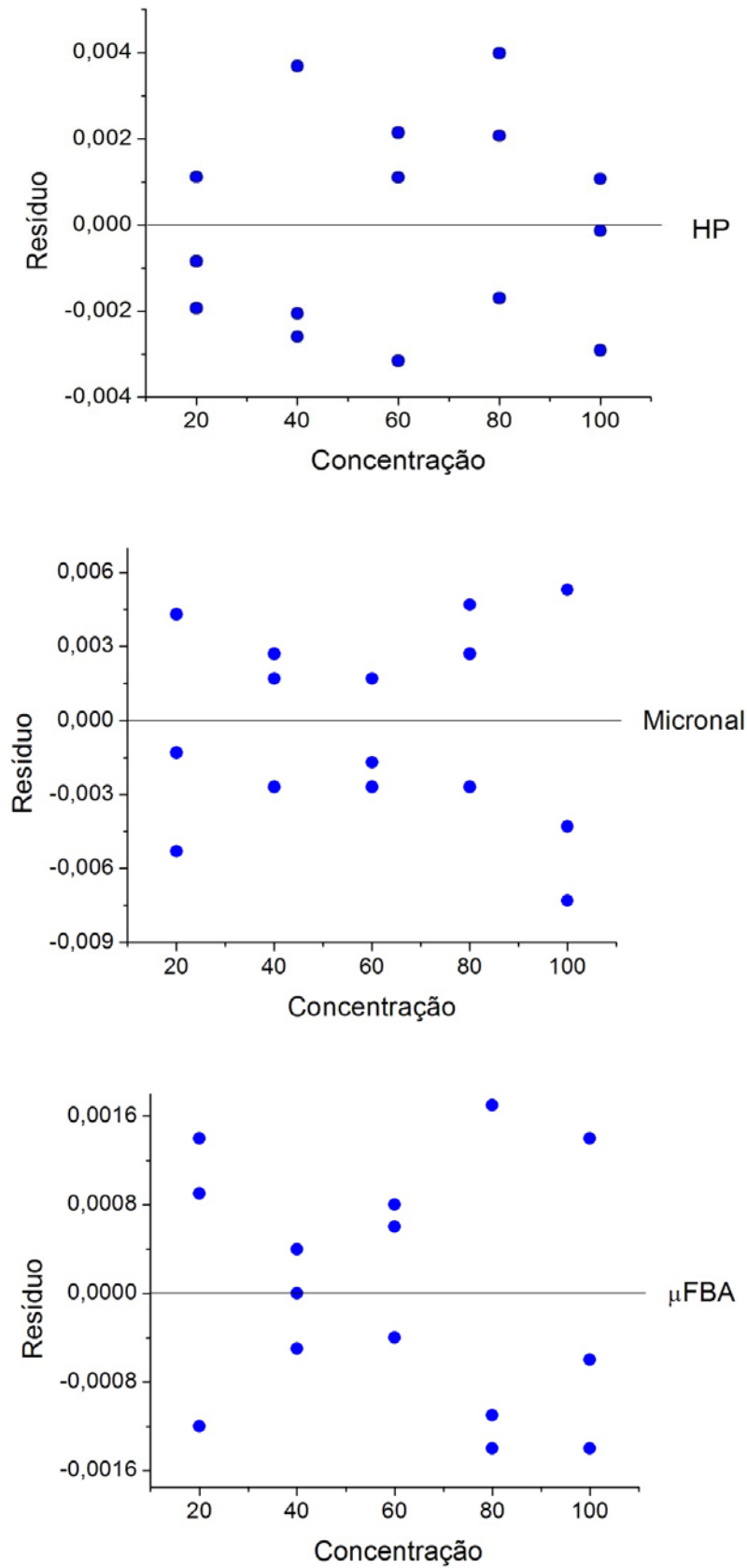


Figura 3.4 - Gráfico dos resíduos dos modelos de calibração HP, Micronal e μ FBA, respectivamente para o método fotométrico do tartarato ferroso.

Os resultados da ANOVA, utilizada para a validação dos modelos de calibração baseados nas medições realizadas no HP, Micronal e μ FBA, são apresentados na Tabela 3.8 e Tabela 3.9. Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas de acordo com as equações na Tabela 2.1 e os valores obtidos são mostrados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), método fotométrico do tartarato ferroso.

Fonte	SQ			MQ		
	HP	Micronal	μ FBA	HP	Micronal	μ FBA
Reg. (1)	$1,38 \times 10^{-1}$	$1,47 \times 10^{-1}$	$1,20 \times 10^{-2}$	$1,38 \times 10^{-1}$	$1,47 \times 10^{-1}$	$1,20 \times 10^{-2}$
Res. (13)	$1,26 \times 10^{-4}$	$2,73 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-5}$	$9,72 \times 10^{-6}$	$2,10 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-6}$
F.Aj. (3)	$1,22 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^{-5}$	$1,67 \times 10^{-5}$	$4,05 \times 10^{-5}$	$9,02 \times 10^{-6}$	$5,56 \times 10^{-6}$
E. P. (10)	$4,69 \times 10^{-4}$	$2,66 \times 10^{-4}$	$6,61 \times 10^{-5}$	$4,69 \times 10^{-5}$	$2,67 \times 10^{-5}$	$6,61 \times 10^{-6}$

Após o cálculo das médias quadráticas, estes valores foram utilizados nos testes de falta de ajuste e significância de regressão, cujos resultados encontram-se na Tabela 3.9. Para todos os casos, os valores de MQ_{faj}/MQ_{ep} são menores que o ponto da distribuição F , ao nível de 95% confiança, considerando os mesmos graus de liberdade. Dessa forma, não há evidência de falta de ajuste para um modelo linear. Além disso, essa tabela revela que as regressões lineares são altamente significativas. Desse modo, os valores de MQ_{reg}/MQ_r são muito maiores que o ponto da distribuição F , considerando-se os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança estatística.

Tabela 3.9 - Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração, método tartarato ferroso.

		HP	Micronal	μFBA
MQfaj/MQep		0,864	0,338	0,841
MQreg/MQr		$1,428 \times 10^4$	$6,99 \times 10^3$	$8,99 \times 10^3$
gl	Falta de Ajuste	3 e 10 respectivamente		
	Signif. da Regressão	1 e 13 respectivamente		
Fv1/v2	Falta de Ajuste	3,71		
a 95%	Signif. da Regressão	4,67		

Uma vez validados os modelos de calibração, as curvas analíticas do Micronal, HP e μFBA foram usadas para a determinação da concentração de taninos em amostras de chá verde e preto. A Tabela 3.10 mostra tais resultados com os valores médios de três repetições. A aplicação do teste *t*-emparelhado mostrou que não existe diferença significativa entre os resultados da Tabela 3.4 ao nível de 95% de confiança estatística. Além disso, observa-se uma satisfatória precisão dos resultados para o micro *Flow-batch*, como observado pelos valores dos intervalos de confiança e de desvio padrão relativo, DPR.

Tabela 3.10 - Valores médios de concentração (n=3) das amostras de chá pelo método fotométrico do tartarato ferroso.

Amostras	Valor Predito (mg L ⁻¹)		
	HP	Micronal	μFBA
A1	0,070 ± 0,010	0,069 ± 0,021	0,069 ± 0,035
A2	0,080 ± 0,015	0,080 ± 0,003	0,080 ± 0,025
A3	0,107 ± 0,026	0,107 ± 0,008	0,106 ± 0,030
A4	0,079 ± 0,031	0,078 ± 0,010	0,079 ± 0,010
A5	0,092 ± 0,016	0,091 ± 0,012	0,092 ± 0,005
A6	0,075 ± 0,001	0,075 ± 0,010	0,075 ± 0,027
DPR	0,016	0,011	0,022

3.2.2 - Método Turbidimétrico do Cobre em Tampão Acetato

Para validação estatística das análises, inicialmente, foi realizada uma investigação da faixa dinâmica do analito, envolvendo os valores do limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Um teste de análise de variância (ANOVA) foi empregado para validar os modelos lineares. Na sequência, as curvas analíticas foram contruídas e os testes *F* para falta de ajuste e de significância estatística foram aplicados.

Os resultados da investigação da faixa dinâmica para a determinação do teor de tanino nas amostras de chá verde e preto são apresentados na [Tabela 3.11](#). Para tanto, foram preparadas soluções do padrão de ácido tânico, em triplicatas autênticas, com concentrações na faixa de 20,0 a 100,0 mg L⁻¹.

Tabela 3.11 - Comparação dos resultados de LOD e LOQ, em mg L⁻¹, a 95% de confiança, para determinar o teor de tanino pelo método turbidimétrico do cobre em tampão acetato.

	HP	Micronal	μFBA
LOD	4,43	6,83	6,90
LOQ	6,53	9,79	10,06

Observe que os valores de LOD e LOQ são menores para o espectrofotômetro HP em relação ao μFBA, que por sua vez também são valores um pouco maiores do que os do fotômetro Micronal. Tais diferenças devem-se sobretudo a forma de detecção e ao caminho óptico utilizado. O μFBA apresenta a metade do caminho óptico dos dois outros instrumentos, e a própria técnica turbidimétrica é característica por conferir baixa precisão devido a formação do precipitado, podendo interferir sensibilidade dos instrumentos. Desta forma, estes resultados mostram-se coerentes as limitações do instrumento desenvolvido.

A Tabela 3.12 apresenta os parâmetros dos modelos, obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, que descrevem as curvas analíticas mostradas na Figura 3.5. Na Tabela 3.12, também são apresentados os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais dos parâmetros dos modelos, os quais foram obtidos considerando o nível de 95% de confiança. Como os intervalos de confiança não contêm o valor zero, os parâmetros estimados para todos os modelos de calibração são estatisticamente significativos.

Tabela 3.12 - Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos pelo método turbidimétrico do cobre em tampão acetato.

Instrumento	Modelo $\hat{y} = \alpha + \beta x$	
	$\alpha \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\alpha)$	$\beta \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\beta)$
HP	0,079 ± 0,017	0,926 ± 0,001
Micronal	0,066 ± 0,002	0,761 ± 0,001
µFBA	0,028 ± 0,003	0,331 ± 0,000

As curvas de calibração analítica foram construídas com base nos níveis de concentração distribuídos segundo os valores 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹. A Figura 3.5 mostra que as curvas analíticas, obtidas por ambos os instrumentos, exibem um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração dos analitos em suas soluções de calibração. Essa inferência, baseada inicialmente em uma inspeção visual, é confirmada mediante a análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e pela aplicação da Análise de Variância, apresentada na sequência.

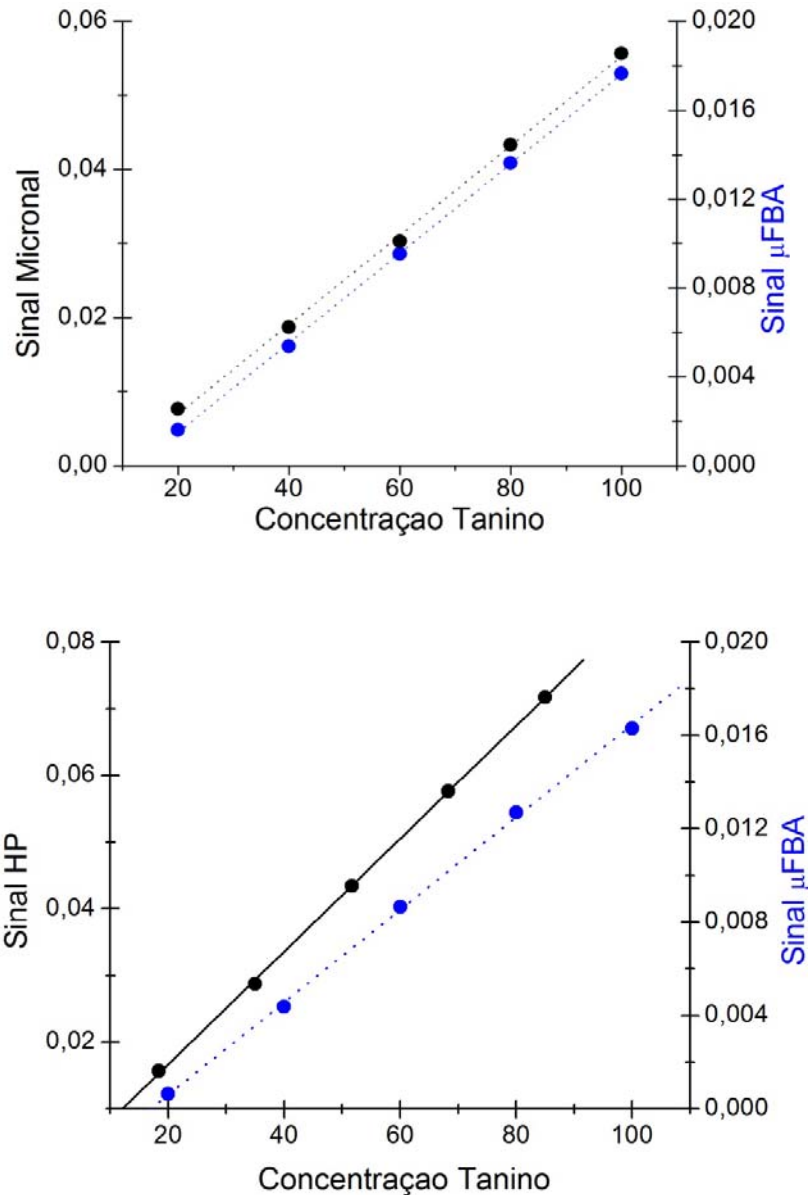


Figura 3.5 - Curvas de calibração comparativas entre Micronal (linha preta pontilhada) e μ FBA (linha azul pontilhada), HP (linha preta cheia) e μ FBA respectivamente para o método turbidimétrico.

O gráfico dos resíduos deixados pelos modelos de calibração são exibidos na [Figura 3.6](#). Observa-se nesta figura uma variância constante e aleatória ao longo da faixa de concentrações investigada, para os três equipamentos utilizados. Desta forma, os resíduos não apresentam estrutura sistemática que evidencie a falta de ajuste. Entretanto, a análise dos gráficos dos resíduos constitui um critério subjetivo. Devido a isso, utilizou-se análise de variância e aplicou-se o teste *F* para se concluir a existência ou não de falta de ajuste.

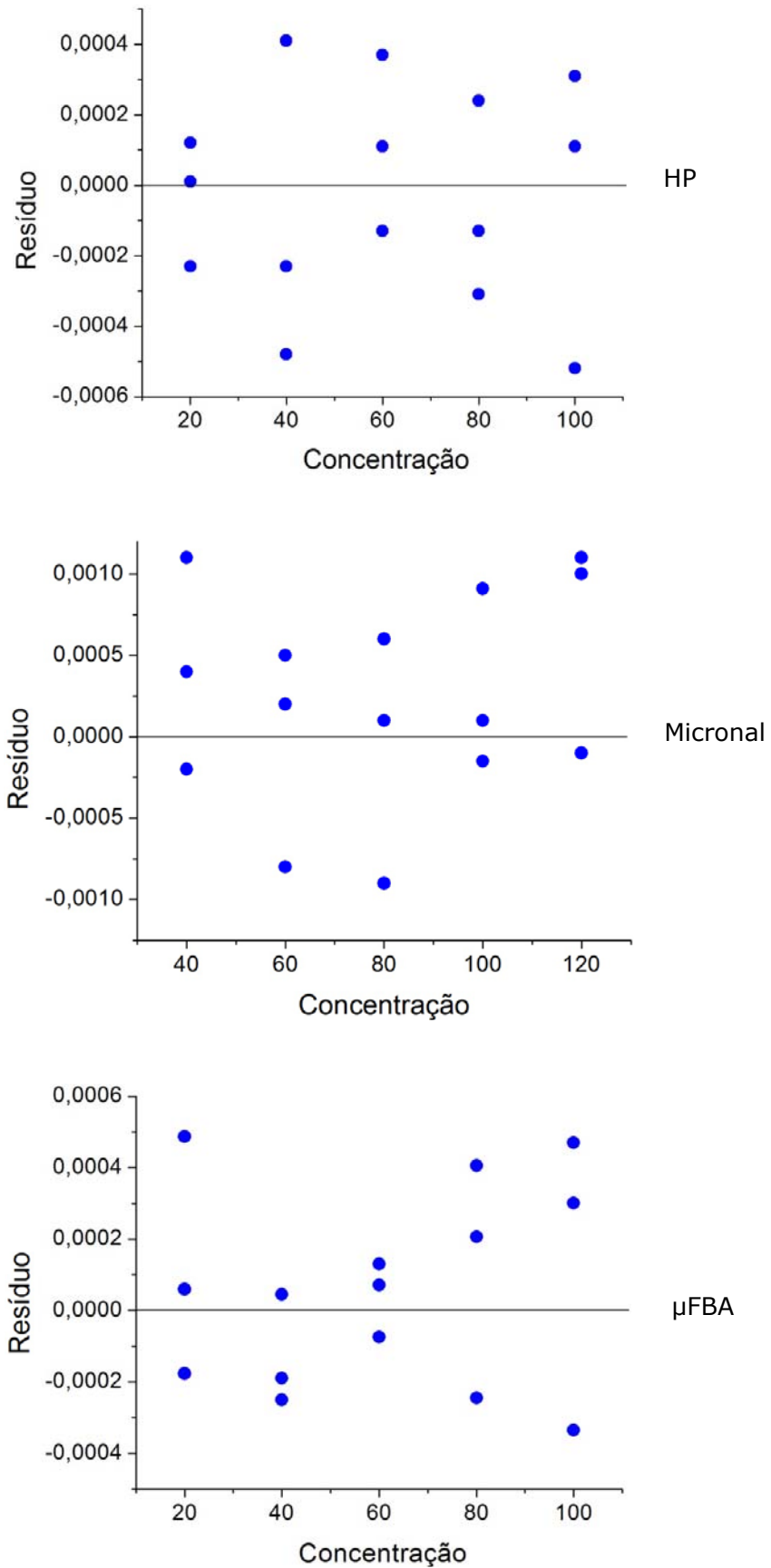


Figura 3.6 - Gráfico dos resíduos dos modelos de calibração para o ácido tânico, método do cobre em tampão acetato.

Os resultados da ANOVA, utilizada para a validação dos modelos de calibração baseados nas medições realizadas no HP, Micronal e μ FBA, são apresentados na Tabela 3.13 e Tabela 3.14. Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas de acordo com as equações na Tabela 2.1 e os valores obtidos são mostrados na Tabela 3.13.

Tabela 3.13 - Soma quadrática e médias quadráticas calculadas para ANOVA da análise dos padrões de tanino em tampão acetato.

Fonte	SQ			MQ		
	HP	Micronal	μ FBA	HP	Micronal	μ FBA
Reg. (1)	$5,88 \times 10^{-3}$	$4,32 \times 10^{-3}$	$4,80 \times 10^{-4}$	$5,88 \times 10^{-3}$	$4,32 \times 10^{-3}$	$4,80 \times 10^{-4}$
Res. (13)	$6,93 \times 10^{-6}$	$8,55 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-6}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$6,57 \times 10^{-7}$	$8,38 \times 10^{-8}$
F.Aj. (3)	$6,58 \times 10^{-6}$	$5,22 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-7}$	$2,19 \times 10^{-6}$	$1,74 \times 10^{-6}$	$7,04 \times 10^{-8}$
E. P. (10)	$3,50 \times 10^{-5}$	$3,33 \times 10^{-5}$	$8,79 \times 10^{-7}$	$3,50 \times 10^{-6}$	$3,33 \times 10^{-6}$	$8,79 \times 10^{-8}$

Após o cálculo das somas quadráticas e médias quadráticas, estes valores foram utilizados nos testes de falta de ajuste e significância de regressão, cujos resultados encontram-se na Tabela 3.14. Para todos os casos, os valores de MQ_{faj}/MQ_{ep} são menores que o ponto da distribuição F , ao nível de 95% confiança, considerando os mesmos graus de liberdade. Dessa forma, não há evidência de falta de ajuste para um modelo linear. Além disso, a Tabela 3.14 revela que as regressões lineares são altamente significativas. Desse modo, os valores de MQ_{reg}/MQ_r são muito maiores que o ponto da distribuição F , considerando-se os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança.

Tabela 3.14 - ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração pelo método turbidimétrico.

		HP	Micronal	μFBA
MQ_{faj}/MQ_{ep}		0,626	0,522	0,801
MQ_{reg}/MQ_r		$1,103 \times 10^4$	$6,569 \times 10^3$	$5,724 \times 10^3$
gl	Falta de Ajuste	3 e 10 respectivamente		
	Signif. da Regressão	1 e 13 respectivamente		
F_{v1/v2} a 95%	Falta de Ajuste	3,71		
	Signif. da Regressão	4,67		

Uma vez validados os modelos de calibração, as curvas analíticas do Micronal, HP e μFBA foram usadas para a determinação da concentração de taninos em amostras de chá verde e preto. A Tabela 3.15 mostra tais resultados com os valores médios em triplicatas.

Tabela 3.15 - Valores médios de concentração preditas (n=3) das amostras de chá pelo método do cobre em tampão acetato.

Amostras	Valor Predito (mg L ⁻¹)		
	HP	Micronal	μFBA
A1	0,068 ± 0,010	0,071 ± 0,020	0,069 ± 0,050
A2	0,081 ± 0,016	0,080 ± 0,009	0,082 ± 0,035
A3	0,108 ± 0,023	0,106 ± 0,017	0,103 ± 0,023
A4	0,078 ± 0,030	0,079 ± 0,012	0,077 ± 0,041
A5	0,094 ± 0,042	0,092 ± 0,025	0,091 ± 0,052
A6	0,076 ± 0,050	0,081 ± 0,034	0,074 ± 0,056
DPR	0,028	0,020	0,043

A aplicação do teste *t*-emparelhado mostrou que não existe diferença significativa entre os resultados da Tabela 3.15 ao nível de 95% de confiança estatística. Além disso, observa-se uma satisfatória precisão dos resultados para o micro *flow-batch*, como observado pelos valores dos intervalos de confiança e de desvio padrão relativo.

3.2.3 - Comparação dos resultados obtidos no μ FBA

Os resultados obtidos para ambos os métodos no micro *flow-batch* estão comparados na Tabela 3.16. O teste *t*-emparelhado mostrou que não existe diferença significativa entre os resultados do método fotométrico (referência) e o método turbidimétrico proposto ao nível de 95% de confiança estatística. Além disso, pode-se observar uma precisão e exatidão satisfatórias como mostrado pelos valores dos intervalos de confiança e desvio padrão relativo.

Tabela 3.16 - Resultados obtidos para a análise dos chás pelos métodos fotométrico (referência) e turbidimétrico proposto.

Amostras	μ FBA – Ref.	μ FBA – Turb.
A1	0,069 ± 0,035	0,069 ± 0,050
A2	0,080 ± 0,025	0,082 ± 0,035
A3	0,106 ± 0,030	0,103 ± 0,023
A4	0,079 ± 0,010	0,077 ± 0,041
A5	0,092 ± 0,005	0,091 ± 0,052
A6	0,075 ± 0,027	0,074 ± 0,056
DPR	0,022	0,043



Capítulo 4 - Conclusão

4.1 - Conclusão

O presente trabalho permitiu contribuir para a consolidação da técnica de microfabricação alternativa em resina comercial uretana-acrilato por fotolitografia no ultravioleta. Desta forma foi possível demonstrar a sua plena viabilidade na confecção de sistemas analíticos microfluídicos robustos, de prototipagem rápida, de simples instrumentação, acessível a qualquer instituição de pesquisa e de características físicas, químicas e mecânicas adequadas a inúmeras aplicações analíticas.

Os microssistemas automáticos *flow-batch* desenvolvidos nesta pesquisa apresentaram desempenho analítico satisfatório para as determinações ópticas empregadas. Além disso, eles apresentaram uma boa performance com uma elevada frequência, baixíssimo consumo de reagentes e amostras e, conseqüentemente, baixa geração de resíduos. Por possuírem tais características, esses sistemas podem ser utilizados de forma favorável à realização de outras aplicações fotométricas, espectrofotométricas e/ou turbidimétricas.

A análise espectrofotométrica dos corantes alimentícios sintéticos auxiliou satisfatoriamente na avaliação do sistema automático miniaturizado desenvolvido inicialmente, permitindo a realização de até 240 análises por hora, com um consumo de apenas 51 μ L de amostra por análise. Os dados estatísticos obtidos para análise dos corantes corroboraram para a validação das figuras de mérito do instrumento proposto. Os resultados da sua performance analítica apontam para a viabilidade prática e confiabilidade das medidas realizadas pelo micro *flow-batch*.

A determinação realizada para os taninos, um importante polifenol de interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica, foram feitas por dois métodos distintos, o método fotométrico do tartarato ferroso e o método turbidimétrico do cobre em tampão acetato. Para ambos os

métodos, altas frequências analíticas foram alcançadas, bem como os gastos das soluções utilizadas foram reduzidos. No método fotométrico foram realizadas até 300 análises por hora, enquanto no método turbidimétrico foi possível executar até 200 análises no mesmo período de tempo.

Os resultados obtidos em todas as análises experimentais se mostraram estatisticamente satisfatórios, sendo todos devidamente ajustados e validados conforme requerido para um trabalho de pesquisa analítica convencional. Tanto as análises de variância para falta de ajuste do modelo quanto os testes *t*-emparelhado, a 95% de confiança estatística, não confirmaram desvios significativos, creditando os bons resultados obtidos pelas análises do micro *flow-batch* em relação as medidas obtidas pelos instrumentos de referência.

Portanto, este trabalho contribuiu de forma significativa para o desenvolvimento de um novo instrumento miniaturizado em fluxo-batelada adaptado para técnicas ópticas de fácil controle e manutenção empregadas na determinação de taninos em chás. Assim, novas pesquisas nessa área são viáveis, podendo ser utilizadas, sobretudo, em análises cujas amostras tenham baixa disponibilidade e requeram elevada demanda analítica, bem como a adaptação de novas metodologias de análise.

4.2 - Perspectivas

Testes utilizando materiais rígidos e transparentes como vidro, quartzo e acrílico no lugar da camada selante do micro *flow-batch* já foram realizados no decorrer deste trabalho. Estes testes se mostraram promissores para outros tipos de análise óptica, que requerem camadas transparentes para um monitoramento mais adequado do analito, a exemplo de detecções com imagens digitais, quimiluminescência e espectrofluorimetria.

Análises de amostras com baixa disponibilidade, como fluidos biológicos, requerem sistemas com maior sensibilidade. Desta forma a adaptação do micro *flow-batch* para técnicas eletroanalíticas (potenciometria, condutometria, voltametria e amperometria) já estão sendo discutidas.

A adaptação do microssistema desenvolvido para métodos espectro-eletroquímicos é outra perspectiva inovadora e viável, bem como o desenvolvimento de novos materiais, como microeletrodos modificados, por meio de métodos de filmes automontados, *layer by layer*, por exemplo, também têm sido discutida.

O emprego desta técnica de miniaturização analítica na fabricação de sensores dopados com reagentes orgânicos para análise e monitoramento de sistemas ambientais também se apresenta uma nova vertente para pesquisas acadêmicas aplicadas a situações reais.



Capítulo 5 - Referências

1. EHRFELD, W. Electrochemistry and microsystems. *Electrochim.Acta.* 48, 2003.
2. COLTRO, W. K. T. et al. Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. *Quím. Nova.* 30, 2007, Vol. 8.
3. REYES, D. R. et al. Micro total analysis systems.1.Introduction,theory and technology. *Anal.Chem.* 74, 2002.
4. AUROUX, P. A. et al. Micro total analysis systems.2.Analytical standard operations and applications. *Anal.Chem.* 74, 2002.
5. WEST, J. et al. Micro total analysis systems.Latest achievements. *Anal.Chem.* 80, 2008.
6. CHEN, X. Micro total analysis systems in biopharmaceutical process development. *Bioanalysis.* 1, 2009, Vol. 7.
7. WORKMAN, J. Process analytical chemistry. *Anal.Chem.* 81, 2009.
8. LAB-ON-A-CHIP. *The revolution in portable instrumentation.* 3. New York : Frost & Sullivan, 1999.
9. FILHO, S. S. M. *Microfabricação de um analisador em fluxo-batelada (micro flow-batch) à base de polímero fotocurável uretano-acrilato.* João Pessoa, Programa de pós-graduação em química, UFPB. Dissertação de mestrado, 2010.
10. FONSECA, A. *Construção e avaliação de microsistemas para análise em fluxo.* Campinas, Programa de pós-graduação em química, Unicamp. Tese de doutorado, 2008.
11. FERNANDES, J.C.B. Manufacturing of miniature fluidic modules for lab on a chip using UA photoresin from flexographic platemaking process. *J. Braz. Chem. Soc.* 4, 2006, Vol. 17.
12. FONSECA, A. Construction and evaluation of a flow injection micro-analyser based on urethane acrylate resin. *Anal.Chim.Acta.* 603, 2007.
13. FONSECA, A. microfluidic device integrated fluorimetric detection for flow injection analysis. *Anal.Bioanal.Chem.* 396, 2010.
14. BECKER, H.; LOCASCIO, L.E. Polymer microfluidic devices. *Talanta.* 56, 2002.

- 15.** MANZ, A. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sens.Actuators*. 1, 1990.
- 16.** MADOU, M.J. *Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization*. 2. s.l. : CRC Press, 2002.
- 17.** NGUYEN, N. T.; WERELEY, S. *Fundamentals and applications of microfluidics*. 3. s.l. : Artech House, 2002.
- 18.** OOSTERBROEK, R. E.; BERG, A. V. D. *Lab-on-a-chip miniaturized systems for (bio)chemical analysis and synthesis* . s.l. : Elsevier, 2003.
- 19.** FRANSSILA, S. *Introduction to microfabrication*. s.l. : Wiley, 2004.
- 20.** BRUUS, H. *Theoretical microfluidics*. New York : Oxford, 2008.
- 21.** CHAKRABORTY, S. *Microfluidics and Microfabrication*. s.l. : Springer, 2009.
- 22.** KAKAC, S. et al. *Microfluidics based microsystems: fundamentals and applications*. s.l. : Springer, 2010.
- 23.** WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 442, 2006.
- 24.** ROBERTS, M. A., et al. UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. *Anal. Chem*. 69, 1997.
- 25.** TAN, A., et al. Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying. *Lab Chip*. 1, 2001.
- 26.** LAGO, C. L., et al. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. *Anal. Chem*. 75, 2003.
- 27.** WATANABE, M. Refreshable microfluidic channels constructed using an inkjet printer. *Sensors Actuat. B*. 122, 2007.
- 28.** WATANABE, M. Microfluidic devices easily created using an office inkjet printer. *Microfluid Nanofluid*. 8, 2010.
- 29.** HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. *Princípios de análise instrumental*. 6. Porto Alegre : Bookman, 2009.
- 30.** VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, M. S. *Automatización y miniaturización en química analítica*. Córdoba : Springer, 2000.

- 31.** VALCÁRCEL, M.; CASTRO, M. D. L. *Automatic methods of analysis*. Amsterdam : Elsevier, 1988.
- 32.** CORCK, D. G.; SUGAWARA, T. *Laboratory automation in the chemical industries*. New York : Marcel Dekker, 2002.
- 33.** CALATAYUD, J. M. *Flow injection analysis of pharmaceuticals: Automation in the laboratory*. s.l. : Taylor & Francis, 1996.
- 34.** RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*. 1975, Vol. 78.
- 35.** SKEGGS, L. T. An automatic method for colorimetric analysis. *American Journal of Clinical Pathology*. 1957, Vol. 28.
- 36.** BERGAMIN, H.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F. Merging zones in flow injection analysis. Part 1: Double proportional injector and reagent consumption. *Analytica Chimica Acta*. 1978, Vol. 101.
- 37.** ZAGATTO, E.A.G., et al. An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. *Analytica Chimica Acta*. 1980, Vol. 120.
- 38.** REIS, B. F., et al. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digests. *Analytica Chimica Acta*. 1994, Vol. 293.
- 39.** STADEN, J. F.; PLESSIS, H. Sequential injection acid–base titration—A useful application for process analytical science. *Analytical Communications*. 1997, Vol. 34.
- 40.** PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia, and phosphorous. *Analytical Chemistry*. 1985, Vol. 57.
- 41.** RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*. 1990, Vol. 237.
- 42.** HONORATO, R. S, et al. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Analytica Chimica Acta*. 1999, Vol. 396.

- 43.** TROJANOWICZ, M. *Advances in Flow Analysis*. Weinheim : Wiley-VCH, 2008.
- 44.** HANSEN, E. H. Flow injection analysis: Its origins and progress. In: KOLEV, S. D.; MCKELVIE, I. D. *Comprehensive analytical chemistry advancer in flow injection analysis and relater techniques.*: Elsevier, 2008.
- 45.** ALMEIDA, L. F., et al. A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. *Talanta*. 73, 2007.
- 46.** ALMEIDA, L. F. Um analisador fluxo-batelada com bomba pistão aplicado à preparação de soluções de calibração e microemulsões: determinação de metais em água mineral e gasolina por GF AAS. *Tese de Doutorado*. Programa de pós-graduação em química, 2007, UFPE.
- 47.** PATNAIK, P. *Dean's analytical chemistry handbook*. 2. New York : McGraw-Hill, 2004.
- 48.** Frenzel, W.; McKelvie, I. D. Photometry. In: S. D. Kolev e I. D. Mckelvie. *Comprehensive analytical chemistry advancer in flow injection analysis and relater techniques*. Elsevier, 2008.
- 49.** UGUCIONE, C.; CARDOSO, A. A. Flow cell within an LED: a proposal for an optical absorption detector. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 2007.
- 50.** DASGUPTA, P. K., et al. Light emitting diode-based detectors absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell. *Anal. Chim. Acta*. 500, 2003.
- 51.** MORAIS, I. P. A.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S. Turbidimetric and nephelometric flow analysis: concepts and applications. *Spectroscopy Letters*. 39, 2006.
- 52.** OMAR, A. F. B.; MATJAFRI, M. Z. B. Turbidimeter design and analysis: a review on optical fiber sensors for the measurement of water turbidity. *Sensors*. 9, 2009.
- 53.** XI, X. Determination of tea polysaccharides in camellia sinensis by a modified phenol-sulfuric acid method. *Arch. Biol. Sci.* 62, 2010, Vol. 2.
- 54.** HARA, Y. *Green Tea. Health Benefits and Applications*. New York : Marcel Dekker, 2001.
- 55.** ANDERSON, R.A.; POLANSKY, M.M. Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2002.

- 56.** MCKINLEY, H.; JAMIESON, M. *McKinlHandbook of green tea and health research*. New York : Nova Science Publishers, 2009.
- 57.** ZHEN, Y. *Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential*. New York : Taylor & Francis, 2002.
- 58.** HAROLD, N.; GRAHAM, P. D. Green tea compositon, consupcion and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21, 1992.
- 59.** LUCZAJ, W.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine.* 40, 2005.
- 60.** CLEMENT, Y. Can green tea do that. A literature review of the clinical evidence. *Preventive Medicine.* 49, 2009.
- 61.** COLALTO, C. Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacological Research.* 62, 2010.
- 62.** DAAYF, F.; LATTANZIO, V. *Recent advances in polyphenol research*. s.l. : Wiley-Blackwell, 2008.
- 63.** ANVISA - *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Legislação: Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/519_98.htm>. Acessado em: 27 de agosto de 2010.
- 64.** AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* 40. 1984.
- 65.** ZENEBON, O.; PASCUET, N.S. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo : Anvisa, 2008.
- 66.** HERNES, P. J.; HEDGES, J. I. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. *Anal. Chem.* 72, 2000.
- 67.** MATTHEWS, S., et al. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. *Phytochemistry.* 45, 1997.
- 68.** ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *Am. Nat.* 121, 1983.
- 69.** CATES, R. G.; RHOADES, D. F. Patterns in the production of antiherbivore chemical defenses in plant communities. *Biochem. Syst. Ecol.* 5, 1977.

- 70.** CLOSE, D. C.; MCARTHUR, C. Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *Oikos*. 99, 2002.
- 71.** KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A.; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil*. 256, 2003.
- 72.** SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30, 1991.
- 73.** CHUNG, K.; WEI, C. e Johnson, M. G. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 1998.
- 74.** MONTEIRO, J. M., et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova*. 5, 2005, Vol. 28.
- 75.** KILKUSKIE, R. E. et al. Evaluation of tea polyphenols as anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2, 1992.
- 76.** KHANBABAEI, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18, 2001.
- 77.** VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. *Phenolic compound biochemistry*. s.l. : Springer, 2006.
- 78.** BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alim. Nutr.* 1, 2004, Vol. 15.
- 79.** OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Correlation of oxidative transformations of hydrolyzable tannins and plant evolution. *Phytochemistry*. 55, 2000.
- 80.** BEHRENS, A. et al. MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. *Phytochemistry*. 62, 2003.
- 81.** CHUNG, K. et al. Tannins and human health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*. 38, 1998.
- 82.** CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Technol.* 9, 1998.
- 83.** HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. J. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Chem. Ecol.* 15, 1989.

- 84.** MONDAL, K. C. et al. Colorimetric assay method for determination of tannin acyl hydrolase. *Anal. Biochem.* 2001.
- 85.** SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 1999.
- 86.** CHEN, R. L. C., et al. Determination of tannin in green tea infusion by flow-injection analysis based on quenching the fluorescence of 3-aminophthalate. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2005.
- 87.** CUI, H., et al. Flow injection analysis of tannic acid with inhibited chemiluminescent detection. *Anal. Chim. Acta.* 362, 1998.
- 88.** ITTAH, Y. Titration of tannin via alkaline-phosphatase activity. *Anal. Biochem.* 192, 1991.
- 89.** CELESTE, M., et al. Thermometric titration of polyhydric phenols application to the determination of tannin content in wines. *Analyst.* 118, 1993.
- 90.** MAKKAR, H.P.S.; DAWRA, R.K.; SINGH, B. Protein precipitation assay for quantification of tannins: Determination of protein in tannin-protein complex. *Anal. Biochem.* 166, 1977.
- 91.** SHARMA, O.P.; BHAT, T.K.; SINGH, B. Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *J. Chromatogr. A.* 822, 1998.
- 92.** CARVALHO, E.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of proteintannin interactions. *Anal. Chim. Acta.* 513, 2004.
- 93.** PICCIN, E.; VIEIRA, H. J.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow-injection turbidimetric determination of tannins in tea samples using copper(II)/acetate as precipitant reagent. *Analytical Letters.* 38, 2005, Vol. 3.
- 94.** ARCE, L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flowinjection system. *J. Chromatogr. A.* 827, 1998.
- 95.** HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance.* New York : Basic Life Sciences, 1992.

- 96.** FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. Tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 1927.
- 97.** EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 5. Main, 2005.
- 98.** AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. *Quim. Nova.* 26, 2003.
- 99.** CELESTE, M., et al. Enhanced automatic flow-injection determination of total polyphenol index in wines using Folin–Ciocalteu reagent. *Anal. Chim. Acta.* 269, 1992.
- 100.** DRESSLER, V.L.; MACHADO, E.L.; MARTINS, A.F. Spectrophotometric determination of tannin in tanning effluent with a flow-injection system. *Analyst.* 120, 1995.
- 101.** FERREIRA, E.C., Souza, G.B. e Nogueira, A.R.A. FIA-FAAS method for tannin determination based on a precipitation reaction with hemoglobin. *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 2003.
- 102.** YEBRA, M.C.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M. Indirect flow-injection determination of tannins in wines and tea by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 308, 1995.
- 103.** IWASA, K.; TORII, H. A colorimetric determination of tea tannin with ferrous tartrate. *Tea Res. J.* 26, 1962.
- 104.** YU, F. et al. Antioxidant activities of crude tea polyphenols, polysaccharides and proteins of selenium-enriched tea and regular green tea. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 2007.
- 105.** HUNG, Y. et al. Determining the levels of tannin in tea by amperometry of ferricyanide pre-reaction with a sample in a flow-injection system. *Sensors and Actuators B.* 130, 2008.
- 106.** NAKAYAMA, M. et al. A simple and rapid turbidimetric method for determining catechins in beverages. *International Journal of Food Science and Technology.* 2010.
- 107.** CHENG, T. et al. Determination of tannic acid after precipitation with bovine serum albumin by visible light scattering in a flow injection system. *Microchim Acta.* 169, 2010.

- 108.** SLABBERT, N. Complexation of condensed tannins with metal ions. In: Hemingway, R. W.; LAKS, P. E. *Plant Polyphenols*. New York : Plenum Press, 1991.
- 109.** MCDONALD, M.; MILA, I; SCALBERT, A. Precipitation of metal ions by plant polyphenols: Optimal conditions and origin of precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1996.
- 110.** BALLA, J.; KISS, T.; JAMESON, R. F. Copper(II) catalyzed oxidation of catechol by molecular oxygen in aqueous solution. *Inorg. Chem.* 31, 1992.
- 111.** CHENG, T. et al. Determination of tannic acid after precipitation with bovine serum albumin by visible light scattering in a flow injection system. *Microchim. Acta.* 169, 2010, Vol. 1.
- 112.** *Guidance for industry. Q2B Text on validation of analytical procedures: methodology.* s.l. : International Conference on Harmonisation, 1996.
- 113.** RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim. Nova.* 2008, Vol. 30, 1.
- 114.** FERREIRA, M. M. C. Planilha Eletrônica para Validação de Métodos Analíticos Univariados. Disponível em: <<http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/validar.xls>>. Acessado em: 2 de agosto de 2010.
- 115.** PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Quim. Nova.* 1996, Vol. 19, 3.
- 116.** SKOOG, D.A. et al. *Fundamentos de Química Analítica.* 8. s.l. : Thomson, 2007.