

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

JEFERSON ALVES AMORIM

**MICRODISPOSITIVO COMPACTO CONSTRUÍDO COM CERÂMICAS
VERDES PARA A DETERMINAÇÃO DE FERRO EM MATRIZES
ALIMENTÍCIAS E FARMACÊUTICAS EMPREGANDO IMAGEM DIGITAL E
ANÁLISE EM FLUXO**

VIÇOSA - MG

2020

JEFERSON ALVES AMORIM

**MICRODISPOSITIVO COMPACTO CONSTRUÍDO COM CERÂMICAS
VERDES PARA A DETERMINAÇÃO DE FERRO EM MATRIZES
ALIMENTÍCIAS E FARMACÊUTICAS EMPREGANDO IMAGEM DIGITAL E
ANÁLISE EM FLUXO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: William Toito Suarez

VIÇOSA – MG

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A524m
2020 Amorim, Jeferson Alves, 1992-
Microdispositivo compacto construído com cerâmicas
verdes para a determinação de ferro em matrizes alimentícias e
farmacêuticas empregando imagem digital e análise em fluxo /
Jeferson Alves Amorim. – Viçosa, MG, 2020.
80 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Willian Toito Suarez.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.70-80.

I. Análise por injeção em fluxo. 2. Imagens digitais.
3. Cerâmica co-sinterizada a baixa temperatura. 4. Ferro.
5. Cereais. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica.
II. Título.

CDD 22. ed. 543


JEFERSON ALVES AMORIM

**MICRODISPOSITIVO COMPACTO CONSTRUÍDO COM CERÂMICAS
VERDES PARA A DETERMINAÇÃO DE FERRO EM MATRIZES
ALIMENTÍCIAS E FARMACÊUTICAS EMPREGANDO IMAGEM DIGITAL E
ANÁLISE EM FLUXO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Jeferson Alves Amorim
Autor



Willian Toito Suarez
Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Willian Toito Suarez, pela oportunidade de orientação, aprendizado e amizade.

Aos Profs. Drs. Carlos Roberto Bellato e Alexandre Fontes Pereira pelas sugestões, críticas e todo enriquecimento do trabalho durante a defesa.

Aos meus pais, Ângela e José Geraldo, por todo amor, confiança e incentivo.

À Andreza, por ser essa pessoa tão incrível e sempre estar ao meu lado.

À Thaisy, por ser a melhor irmã que eu poderia ter, me dando carinho e suporte durante todos os anos de graduação e pós-graduação.

Ao meu sobrinho Raul, que trouxe alegria aos nossos corações.

Agradeço, profundamente, as amizades feitas no decorrer desses 7 anos de Viçosa, permitindo-me desfrutar de momentos inesquecíveis, os quais guardarei nas lembranças mais prazerosas desta vida. Em especial, agradeço ao Mathews e Gleyner, que foram amizades construídas desde os primeiros dias de UFV e perdurarão por toda vida; as “reuniões” do papa-capim que foram os maiores momentos de risadas e descontração.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

AMORIM, Jeferson Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Microdispositivo compacto construído com cerâmicas verdes para a determinação de ferro em matrizes alimentícias e farmacêuticas empregando imagem digital e análise em fluxo.** Orientador: Willian Toito Suarez.

Neste trabalho foi desenvolvido, otimizado e validado uma metodologia analítica para a determinação do teor de ferro em matrizes alimentícias e farmacêuticas. O método foi baseado na captura de imagens utilizando a câmera de um *smartphone* e um microdispositivo construído com LTCC acoplado a um sistema de análise por injeção em fluxo. O princípio do método se fundamenta na medida da tonalidade da cor obtida após a reação de complexação entre os íons Fe (II) e a 1,10-fenantrolina em pH 4,50. O complexo vermelho gerado foi monitorado por meio de um *smartphone*, empregando o aplicativo Color Grab o qual transforma a imagem obtida no padrão de cores do sistema RGB, cujos componentes variam proporcionalmente com a concentração do analito. Por meio do planejamento experimental Box-Behnken, o método foi otimizado com intuito de obter as melhores condições reacionais. Foi obtida uma curva analítica linear no intervalo de concentração de $5,00 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ do íon metálico, com coeficiente de correlação $r^2 = 0,9964$ e limites de detecção e quantificação iguais a $5,38 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,79 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. Para os estudos de veracidade foram testados três níveis de concentração distintas: $4,00 \times 10^{-5}$, $3,50 \times 10^{-4}$ e $9,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, e as porcentagens de recuperação variaram de 82,80 a 108,96%. Os resultados obtidos foram comparados a um nível de significância de 95% empregando o método desenvolvido e o método de referência para a análise das matrizes alimentícias e farmacêuticas e, mostraram que não ocorreu diferenças significativas entre ambos os métodos. A análise das amostras evidenciou que os valores encontrados estão próximos aos valores rotulados pelos fabricantes, com erros que variaram de 3,70 a 6,30% e uma frequência analítica de 72 análises por hora.

Palavras-chave: Análise por injeção em fluxo. Imagens digitais. Cerâmica co-sinterizada a baixa temperatura. Ferro. Cereais.

ABSTRACT

AMORIM, Jeferson Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Compact microdevice built with green ceramic for the determination of iron in food and pharmaceutical matrices using digital imaging and flow-injection analysis.** Advisor: Willian Toito Suarez.

In this work, an analytical methodology was developed, optimized and validated in order to determine the iron content in food and pharmaceutical matrices. The method was based on capturing images using a smartphone camera in a microdevice built with LTCC coupled to a flow-injection analysis system. The principle of the method is based on the measurement of the color tone obtained after the complexation reaction between Fe (II) ions and 1.10-phenanthroline at pH 4.50. The generated red complex was monitored using a smartphone with the Color Grab application capable of transforming the image obtained into the color pattern of the RGB system, as well as components that vary proportionally according to the concentration of the analyte. Through Box-Behnken experimental planning, the method was optimized in order to obtain the best reaction conditions. A linear analytical curve was obtained in the concentration range from 5.00×10^{-5} to 1.00×10^{-3} mol L⁻¹ of the metal ion, with correlation coefficient $r^2 = 0.9964$ and limits of detection and quantification equal to 5.38×10^{-6} mol L⁻¹ and 1.79×10^{-5} mol L⁻¹, respectively. For the veracity studies, three different concentration levels were performed and the percentages of recovery ranged from 82.80 to 108.96%. The results obtained were compared at a 95% significance level using the developed method and the reference method for the analysis of food and pharmaceutical matrices, and showed that there were no significant differences between both methods. The analysis of the samples showed that the values found are close to the values labeled by the manufacturers, with errors ranging from 3.70 to 6.30% and an analytical frequency of 72 analyzes per hour.

Keywords: Flow injection analysis. digital images. low temperature co-sintered. Iron. cereals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de um sistema FIA simples de linha única. Onde: T é a solução transportadora; 1 é a unidade de propulsão; 2 é a unidade de comutação; 3 é a unidade de reação; 4 é a unidade de detecção; D é o descarte.....	16
Figura 2: Etapas de fabricação de um microdispositivo construído com LTCC..	21
Figura 3: Layout do microdispositivo construído com LTCC, (a) janela de entrada óptica, (b) entradas de reagentes, (c) saída de reagentes.....	22
Figura 4: Estrutura interna do microdispositivo construído com LTCC.....	22
Figura 5: Espectro eletromagnético destacando a região do visível.....	25
Figura 6: Disco cromático que define as cores primárias e complementares.....	26
Figura 7: Cubo de cores do modelo RGB.....	27
Figura 8: Camada da cerâmica DuPont 951AX com plástico Mylar.....	41
Figura 9: Rampa de temperatura para a sinterização das cerâmicas DuPont 951AX.....	43
Figura 10: Camadas de cerâmicas constituintes do microdispositivo construído com LTCC.....	44
Figura 11: Camada 1 do microdispositivo construído com LTCC.....	45
Figura 12: Esquema de conexão de entrada e saída de fluidos do microdispositivo construído com LTCC.....	46
Figura 13: Microdispositivo construído com LTCC com conectores e lamínulas fixados.....	46
Figura 14: Sistema FIA-LTCC com análise por imagem para a determinação de Fe (II).....	47
Figura 15: Parte interior do sistema de aquisição de imagens.....	48
Figura 16: Parte inferior do sistema de aquisição de imagens.....	48
Figura 17: Parte superior do sistema de aquisição de imagens.....	49

Figura 18: Ilustração das etapas para iniciar a aquisição dos sinais empregando o aplicativo Color Grab.....	49
Figura 19: Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de ferro por imagem em amostras alimentícias e farmacêuticas. As representações são: BP, bomba peristáltica; R, reagente 1,10-fenantrolina ($5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $1,3 \text{ mL min}^{-1}$); W, descarte; C, solução transportadora (ácido ascórbico; $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $1,3 \text{ mL min}^{-1}$); LS, limpeza do sistema (água deionizada; $0,65 \text{ mL min}^{-1}$); I, alça de amostragem; L, injetor comutador; A, solução de amostra ou solução padrão; D, equipamento de aquisição de imagens.....	50
Figura 20: Influência do pH na resposta analítica.....	54
Figura 21: Distribuição de resíduos do modelo em relação ao número de experimentos.....	56
Figura 22: Relação entre os valores preditos gerados pelo modelo e os valores observados obtidos experimentalmente.....	57
Figura 23: Gráfico de Pareto, obtido para o planejamento Box-Behnken.....	58
Figura 24: Gráfico da superfície de resposta que representa a interação significativa entre a concentração de 1,10-fenantrolina e o tamanho da alça de amostragem.....	59
Figura 25: Gráfico da superfície de resposta que representa a interação significativa entre a vazão de fenantrolina e a vazão de ácido ascórbico.....	60
Figura 26: Curva analítica para determinação de Fe (II) empregando o sistema FIA-LTCC.....	62
Figura 27: Estudo da precisão do método desenvolvido para a concentração de Fe (II) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Recomendações nutricionais diárias de ferro.....	28
Tabela 2: Quantidade de ferro de alguns alimentos.....	29
Tabela 3: Concentração teórica de ferro após a abertura das amostras.....	39
Tabela 4: Propriedades físicas e elétricas da cerâmica Dupont 951AX ₂	40
Tabela 5: Fatores com seus níveis para a otimização da reação Fe (II) com a 1,10-fenantrolina utilizando o planejamento Box-Behnken.....	52
Tabela 6: Variáveis analisadas por meio da análise de variância (ANOVA).....	55
Tabela 7: Condições reacionais ótimas dos fatores utilizados.....	61
Tabela 8: Efeito de possíveis interferentes na determinação de Fe (II).....	64
Tabela 9: Porcentagens de recuperação de Fe (II) obtidas para os três níveis de concentração estudados.....	67
Tabela 10: Determinação de Fe (II) empregando o método proposto e um método de referência ($n=3$).....	68
Tabela 11: Comparação de algumas figuras de mérito obtidas no método proposto e as descritas na literatura.....	69

LISTA DE SIGLAS

ASS - *Atomic Absorption Spectroscopy* (Espectroscopia de absorção atômica).

FIA - *Flow injection analysis* (Análise por injeção em fluxo).

μ TAS - *Micro-total analysis systems* (Microssistemas de análises totais).

LTCC - *Low Temperature co-fired Ceramics* (Cerâmica co-sinterizada à baixa temperatura).

CAD - Computer Aided Design (desenho assistido por computador).

CNC – Computer Numerical Control (controle numérico computadorizado).

CCD - *Charge Coupled Device* (dispositivos de carga acoplada).

CMOS - *Complementary Metal Oxide Semiconductor* (sensores complementares de metal-óxido semicondutor).

RGB – *Red, Green and Blue* (Vermelho, Verde e Azul).

IDR - Ingestão diária recomendada.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

ICP – MS - Espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente.

HR-CS-GFAAS - Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de fonte contínua de alta resolução.

HR-CS-FAAS - Espectrometria de absorção atômica com chama de fonte contínua de alta resolução.

LEDs - *Light Emitting Diodes* (Diodos de Emissão de Luz).

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

LD - Limite de Detecção.

LQ - Limite de Quantificação.

RSD - Desvio Padrão Relativo.

ANOVA - Análise de Variância.

SUMÁRIO

1. Justificativa.....	13
2. Referencial Teórico.....	14
2.1. Análise por Injeção em Fluxo.....	14
2.2. Miniaturização de Sistemas Analíticos.....	17
2.3. Tecnologia LTCC.....	19
2.4. Métodos Analíticos Baseados em Imagens Digitais.....	23
2.4.1. Teoria das Cores.....	24
2.4.2. Modelo de Cor RGB em Imagens Digitais.....	26
2.5. Importância do ferro.....	27
2.5.1. Medicamentos antianêmicos.....	30
2.5.2. Fortificação de Alimentos com Ferro.....	30
2.5.3. Procedimentos para a Determinação de Ferro em Alimentos.....	31
2.6. Métodos de Análise por Injeção em Fluxo com Determinação por Imagens Digitais.....	32
2.7. Validação da metodologia e aplicação em amostras reais.....	33
2.7.1. Linearidade.....	34
2.7.2. Limite de detecção e quantificação.....	34
2.7.3. Repetibilidade.....	35
2.7.4. Seletividade.....	35
2.7.5. Recuperação.....	35
3. Objetivos.....	36
3.1. Objetivos Gerais.....	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. Parte experimental.....	36
4.1. Instrumentação.....	36
4.1.1. Bomba Peristáltica.....	36
4.1.2. Tubos e conexões.....	36
4.1.3. Injetor comutador.....	37
4.1.4. Aquisição de dados.....	37
4.1.5. Balança analítica.....	37
4.1.6. pHmetro.....	37
4.1.7. Espectrofotômetro.....	37
4.1.8. Micropipetas.....	37
4.2. Preparo de soluções e amostras.....	37

4.3. Reação colorimétrica.....	39
4.4. Desenvolvimento do microdispositivo analítico construído com cerâmicas verdes (LTCC).....	40
4.4.1. Desenho inicial do microdispositivo analítico.....	42
4.4.2. Processo de corte.....	42
4.4.3. Laminação.....	42
4.4.4. Sinterização.....	43
4.4.5. Desenho das camadas para construção do microdispositivo construído com LTCC.....	44
4.5. Equipamento de análise por imagem.....	46
4.5.1. Aquisição dos sinais RGB empregando o aplicativo Color Grab.....	49
4.5.2. Preparação do sistema para as análises.....	50
4.6. Estudo do pH.....	51
4.7. Planejamento experimental.....	51
5. Resultados e discussões.....	53
5.1. Efeito do pH.....	53
5.2. Planejamento experimental.....	54
5.3. Figuras de mérito na validação do método otimizado.....	61
5.4. Avaliação da linearidade.....	61
5.5. Avaliação da precisão dos sinais analíticos e frequência de amostragem.....	62
5.6. Avaliação da seletividade do método.....	64
5.7. Teste de recuperação.....	66
5.8. Análise das amostras reais de sucrilhos e formulações farmacêuticas.....	67
6. Conclusão.....	69
7. Referências bibliográficas.....	70

1. Justificativa

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a anemia pode ser caracterizada como a condição em que a quantidade de hemoglobina presente no sangue está abaixo do normal. A condição anêmica está atrelada a carência de um ou mais nutrientes essenciais para o bom funcionamento dos processos biológicos do organismo, podendo ser causada pela deficiência de diversos nutrientes como o zinco, vitamina B12, proteínas, dentre eles, o ferro. A anemia ferropriva, causada pela deficiência de ferro, é comum em relação as demais, estimando-se que 50% de sua ocorrência seja provocada pela carência de ferro e manifestada em três estágios: no primeiro, ocorre a diminuição das reservas de ferro, no segundo, o declínio no teor de ferro sérico e no terceiro, instala-se a anemia ferropriva, trazendo consequências como limitações de trocas de oxigênio e gás carbônico entre o sangue e as outras células do corpo^{1,2}.

A condição anêmica mundial remete a aproximadamente 1,620 milhões de indivíduos, sendo que a anemia causada pela deficiência por ferro é de 2,5 maior. De acordo com o Ministério da Saúde brasileiro, estima-se que 20,9% das crianças menores de dois anos apresentam anemia por carência de ferro. A sua alta frequência pode gerar muitos custos econômicos e de saúde consideráveis, uma vez que diminui a capacidade de trabalho físico, desempenho cognitivo o que dificulta crianças em idade escolar, além de baixa resistência a infecções. A suplementação de alimentos fortificados com ferro ou formulações farmacêuticas à base de sulfato ferroso para o tratamento da anemia podem contribuir para o controle da deficiência desse mineral. Quando a dieta não fornece a quantidade necessária de ferro, a fortificação de alimentos tem sido considerada uma das melhores formas de prevenção, tendo como vantagem principal, não requerer a participação ativa do sujeito no consumo desses alimentos e a não necessidade de mudanças nos hábitos alimentares^{1,3,4, 5}.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo metodologias analíticas para a quantificação de diversos analitos por meio do emprego de métodos baseados na análise de imagens digitais, metodologias estas que fazem o uso de equipamentos de baixo custo para o seu desenvolvimento^{41,42}. Visto que a deficiência de ferro pode caracterizar graves problemas a saúde humana, o desenvolvimento de metodologias para a quantificação desse analito em diferentes matrizes torna-se imprescindível.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo, desenvolver uma metodologia para a determinação de ferro em matrizes alimentícias e farmacêuticas empregando smartphones para a captura e análise de imagens das reações colorimétricas em um microdispositivo construído com cerâmicas verdes acoplados a um sistema de fluxo⁶.

Desta forma, a metodologia descrita neste trabalho apresenta vantagens em relação a outras metodologias já consolidadas, tais como: a baixa geração de resíduos químicos, alta frequência analítica, facilidade no monitoramento da reação e principalmente seu baixo custo de desenvolvimento pelo fato de utilizar equipamentos simples e relativamente baratos.

Portanto, o trabalho desenvolvido evidenciou a viabilidade do uso de microdispositivos compactos produzidos a partir de cerâmicas verdes com detecção por imagem e análise por injeção em fluxo para a determinação de ferro em amostras de cereal matinal e em formulações farmacêuticas. A partir de pesquisas na literatura, não foram encontrados métodos que envolvessem um sistema FIA acoplado a um dispositivo LTCC com detecção por imagem com o auxílio de um smartphone.

2.Referencial Teórico

2.1. Análise por injeção em fluxo

Os sistemas FIA podem ser definidos como processos de automatização de procedimentos analíticos, envolvendo uma introdução discreta de uma amostra em um fluxo de transporte não segmentado que flui continuamente em direção a um detector para a quantificação, ao longo desse percurso podem ocorrer etapas de concentração de analitos, limpezas de amostras e reações químicas^{7,8}. Esses tipos de sistemas são caracterizados por serem versáteis e simples, além de minimizarem o consumo de reagentes e amostras e eliminarem algumas possibilidades de contaminação de soluções. Ademais, o baixo custo os tornam atraentes para serem implantados em laboratórios de análises químicas⁹.

As origens para o avanço da análise de injeção em fluxo já estavam presentes no final de 1959, uma vez que o conceito de injetar a amostra no fluxo com uma agulha hipodérmica estava bem definido. O desenvolvimento de uma técnica automatizada para a análise de amostras discretas com uso de fluxos

contínuos e segmentados realizada por Skeggs em 1957, foi o passo chave para a história inicial da análise de injeção de fluxo. Por meio desse sistema, Skeggs estabeleceu a base para a automação futura de fluxos a partir do desenvolvimento de medição automática de amostras, medição de reagentes, temporização da reação, limpeza do sistema, segmentação da amostra e leitura da amostra¹⁰.

O desenvolvimento de sistemas FIA ocorreu em 1975, com o trabalho pioneiro dos pesquisadores Ruzicka e Hansen que propuseram um sistema mecanizado sem a presença de bolhas de ar no percurso analítico, levando a um sistema mais simples que possibilitou a expansão das potencialidades das análises em fluxo. Segundo os conceitos de Skeggs, era essencial a presença de bolhas de ar no percurso analítico dos sistemas mecanizados existentes até então, a fim de limitar a dispersão das amostras e ter uma boa mistura entre reagentes e amostras^{11,12}.

No processo de análise por um sistema FIA, alíquotas de amostra (eventualmente de reagentes) são inseridas em um fluido transportador, o qual as conduz em direção ao detector. No decorrer do processo, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma zona de amostra caracterizada pela existência de gradientes de concentração. O grau de dispersão é um dos principais aspectos relacionados ao desempenho de um sistema em fluxo, uma vez que ele determina os graus de diluição e de mistura, bem como a frequência com que as amostras podem ser introduzidas sem que os sinais sejam afetados pela amostra precedente¹³.

Caso necessário, as reações químicas podem ocorrer durante o transporte da zona de amostra em direção ao sistema de detecção. Devido a existência dos gradientes de concentração e em função da medida ser feita com a zona de amostra em movimento em relação ao sistema de detecção, obtém-se um sinal analítico cuja intensidade pode ser relacionada à concentração inicial da espécie de interesse¹³.

Os sistemas FIA são constituídos por uma unidade propulsora de fluídos, de inserção da amostra, de reação/mistura e de detecção, como indicado na Figura 1. As unidades apresentadas podem ser controladas tanto manualmente por uma pessoa quanto por uma unidade de controle, como por exemplo, um software de computador.

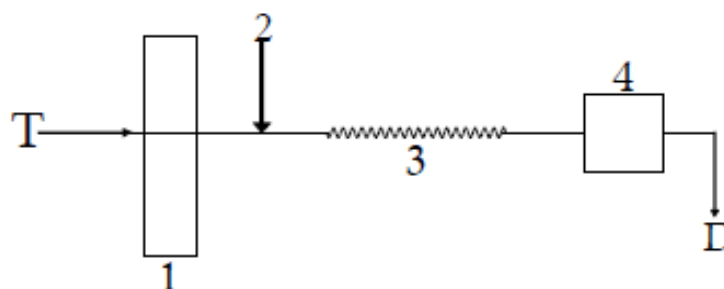


Figura 1: Representação esquemática de um sistema FIA simples de linha única. Onde: **T** é a solução transportadora; **1** é a unidade de propulsão; **2** é a unidade de comutação; **3** é a unidade de reação; **4** é a unidade de detecção; **D** é o descarte.

A unidade propulsora movimenta de forma constante e uniforme os reagentes, amostras e fluídos transportadores em direção à zona de detecção. A bomba peristáltica é a unidade propulsora mais utilizada, permitindo operações em vazões que variam de $0,1 \mu\text{L min}^{-1}$ a $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Outras formas de emprego de dispositivos propulsores também são descritas na literatura, como por exemplo: bombas de pistão, propulsão por ação da pressão de gases inertes, gravitação, etc¹³.

Ao se utilizar a bomba peristáltica como unidade de propulsão, é importante salientar a escolha dos tubos de bombeamento e seus diferentes materiais, levando em consideração o tipo de solvente e concentração das soluções. Tubos de Tygon são adequados para soluções aquosas ácidas ou alcalinas diluídas. Em bombas com velocidade de rotação constante, os diâmetros internos dos tubos vão determinar a magnitude da vazão¹³.

O injetor é um dispositivo importante para um sistema em fluxo, pois tem como função a introdução uma quantidade discreta e reproduzível de volume de uma amostra no percurso analítico. Diversos dispositivos podem ser utilizados na seleção e inserção de alíquotas, com destaque para o injetor comutador composto por três peças de acrílico, uma peça central móvel e duas laterais fixas. Além de apresentar movimentos para frente e para trás, o injetor coleta e insere a amostra no percurso analítico¹⁴.

Nos sistemas FIA, o percurso analítico é o local onde ocorrem as misturas e/ou reações necessárias para detecção. No que diz respeito ao dimensionamento do percurso analítico, deve-se levar em conta as vazões do

fluido transportador e dos reagentes diretamente ligados a frequência de amostragem. Com o aumento do percurso analítico, uma diminuição do sinal analítico seria observada devido ao processo de dispersão da zona de amostra, porém, se a cinética da reação for lenta, ocorreria um aumento do sinal analítico com o aumento do percurso analítico. Nos sistemas FIA, o processo de dispersão da amostra é dependente das características físico-químicas das soluções (ex: viscosidade), bem como das dimensões dos componentes do sistema (ex: volume da alça de amostragem, material, diâmetro e comprimento dos tubos que constituem o percurso analítico). Normalmente, são efetuadas medidas com esses parâmetros mantidos constantes para obtenção de resultados com alta repetibilidade^{13,15}.

Por fim, não menos importante, a unidade de detecção deve possuir alta repetibilidade e reprodutibilidade dos sinais. De acordo com o analito de interesse a ser quantificado, tem sido empregado praticamente todas as técnicas usuais em química analítica, a saber: absorção e emissão atômica, espectrofotometria UV-Vis, potenciometria, quimiluminescência, turbidimetria, amperometria, etc¹⁶.

2.2. Miniaturização de sistemas analíticos

A miniaturização de processos analíticos na comunidade científica nas últimas três décadas tornou-se uma importante área de pesquisa e desenvolvimento, abrindo novos caminhos para a química analítica moderna, biologia, medicina, dentre outras¹⁷. Métodos instrumentais considerados clássicos usados em análises químicas consomem tempo e uma quantidade significativa de reagentes, gerando uma grande quantidade de resíduos. Com o advento dos microssistemas de análises totais (μ TAS), foi possível integrar várias etapas analíticas, como introdução e pré-tratamento das amostras, execução de reações químicas, separação analítica e detecção em um único dispositivo, possibilitando realizar várias análises químicas ao fazer uso de volumes de amostras nas escalas micro e nanolitros¹⁸⁻²⁰.

O primeiro dispositivo analítico miniaturizado foi proposto por Terri^{21,22} no ano de 1975, em sua tese de doutorado, foi proposto um sistema em miniatura de cromatografia gasosa, utilizando a tecnologia de circuitos integrados. O sistema em miniatura foi construído com silício, gerando um sistema de GC

menor, mais leve e portátil. Entretanto, esse trabalho não teve muito impacto, pois o conceito de miniaturização ainda não estava consolidado em grupos de pesquisa espalhados pelo mundo, principalmente devido à falta de experiência tecnológica da época.

O renascimento dos μ TAS ocorreu no início da década de noventa, quando Manz *et al*^{23,24} apresentaram um microssistema para cromatografia em fase líquida. Esse cromatógrafo foi fabricado em um substrato de silício com dimensões de 5x5 cm contendo uma coluna tubular aberta, um detector condutométrico e conexões externas para uma bomba de cromatografia líquida e válvulas para aplicação de pressão. Para a época, isso significou um grande desenvolvimento no emprego de novas tecnologias para construção de dispositivos miniaturizados.

A partir daí, o rápido desenvolvimento dos microssistemas analíticos permitiu inúmeras vantagens como a redução do volume de reagentes e amostras, o que conseqüentemente diminuiu a geração de resíduos químicos, o baixo custo de fabricação devido a possibilidade de produção em larga escala, as análises em tempo reduzido e a portabilidade, a qual facilita as análises *in situ*^{18,25}.

Os μ TAS possuem ampla disponibilidade de tecnologia para serem fabricados, capacitando a modificação da sua superfície e acoplamento de diferentes modos de detecção. Diversas técnicas e materiais são utilizados na miniaturização desses sistemas analíticos, como por exemplo o silício e o vidro muito empregados inicialmente para essa finalidade, devido, em especial, ao seu baixo custo²⁶.

Os μ TAS se destacaram como instrumentos analíticos importantes no controle da qualidade de alimentos, permitindo análises rápidas, seguras, associadas a baixa geração de resíduos e de baixo custo. Como consequência da introdução dessas tecnologias, surgiram muitos dispositivos microanalíticos e novas aplicações foram descobertas por essas abordagens.

Nesse sentido, Ávila *et al*⁷ propuseram o uso de um chip microfluídico com detecção amperométrica para a triagem de amostras na confirmação de possíveis fraudes em amostras de alimentos relacionados a baunilha, obtendo respostas em apenas 5 minutos e oferecendo uma alternativa valiosa aos métodos cromatográficos, não apenas devido aos curtos tempos de análise, mas

também ao consumo muito baixo de reagentes e à eliminação do uso de solventes orgânicos.

He *et al*⁸ desenvolveram um sistema de análise por injeção em microfluxo (μ -FIA) para determinação de nitrito em alimentos com detecção por quimiluminescência. O método proposto obteve boa reprodutibilidade, com uma faixa linear de 8 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, limite de detecção de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$), desvio padrão relativo de 4,1% para 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de nitrito ($n = 9$). Esse sistema foi aplicado com sucesso na determinação de nitrito em alimentos, com baixa geração de resíduos.

Cardoso *et al*⁹ desenvolveram um dispositivo microfluídico baseado em papel (μ -PADs) com detecção colorimétrica para a determinação de nitrito em amostras clínicas, alimentares e ambientais. O dispositivo possuía 8 zonas de detecção circular e uma zona central. Após a adição de amostras padrão ou reais, as imagens resultantes eram capturadas com um scanner, convertidas em uma escala de cores e analisadas no canal magenta. Os níveis de concentração de nitrito foram determinados com sucesso em amostras de saliva, água, presunto, linguiça e água de rio. Os resultados obtidos foram comparados por espectrofotometria e não houve diferença significativa entre elas a um nível de confiança de 95%.

Kamruzzaman *et al*¹⁰ desenvolveram um chip microfluídico com detecção por quimiluminescência na determinação de L-fenilalanina (L-PA). O chip foi fabricado por litografia suave usando polidimetilsiloxano (PMDS), cotando com quatro microcanais de entrada para introdução de amostras e reagentes. O limite de detecção encontrado foi de $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, com um desvio padrão relativo de 1,8%. O método apresentado oferece uma técnica analítica simples, rápida e fácil de manusear em termos de sensibilidade, faixa dinâmica e baixo limite de detecção para a determinação de L-PA em refrigerantes dietéticos e amostras de injeção farmacêutica.

2.3. Tecnologia LTCC

Desenvolvida originalmente por Hughes e DuPont com a finalidade de produzir circuitos eletrônicos militares, a tecnologia LTCC é uma técnica que consiste na sobreposição de camadas em um alinhamento preciso antes do processo de sinterização. Com o desenvolvimento da indústria de dispositivos eletrônicos, essa tecnologia tem atraído a atenção, possuindo diversas

vantagens que permitem a integração e miniaturização de subsistemas eletrônicos completos. Trata-se de uma tecnologia utilizada na construção de circuitos integrados híbridos, que incluem resistores, capacitores, indutores e componentes ativos em um mesmo substrato, aliadas ao baixo custo de fabricação. A partir do ano 2000, diversos trabalhos foram desenvolvidos com a finalidade de uso do LTCC como suporte microfluídico^{31.32}.

Esta tecnologia é denominada *Low Temperature* – “baixa temperatura” pois o processo de sinterização ocorre a temperaturas abaixo de 1000 °C. O termo *Co-Fired* faz referência a sinterização compatível dos substratos cerâmicos juntamente com pastas condutoras e dielétricas³³.

O LTCC, também chamado de cerâmicas verdes, é composto em sua maioria por alumina (Al_2O_3), vidro e compostos orgânicos como solventes, plastificantes e aglutinantes. Devido a abordagem multicamadas, o processo de fabricação passa por algumas etapas como: 1- design do dispositivo usando um software; 2- processo de mecanização, como por exemplo, perfuração, laser, gravação a jato de vapor ou usinagem; 3- estágio de serigrafia, onde ocorre a integração de condutores e componentes eletrônicos no dispositivo para o sistema de detecção; 4- alinhamento e laminação por termocompressão; 5- Por fim, ocorre o processo de sinterização envolvendo duas etapas, a primeira delas consiste na volatilização dos componentes orgânicos (350°C) e a segunda, interpenetração das partículas de alumina entre as camadas cerâmicas a 850°C, temperatura de transição vítrea da maioria dos vidros e, posteriormente ocorre o resfriamento³⁴.

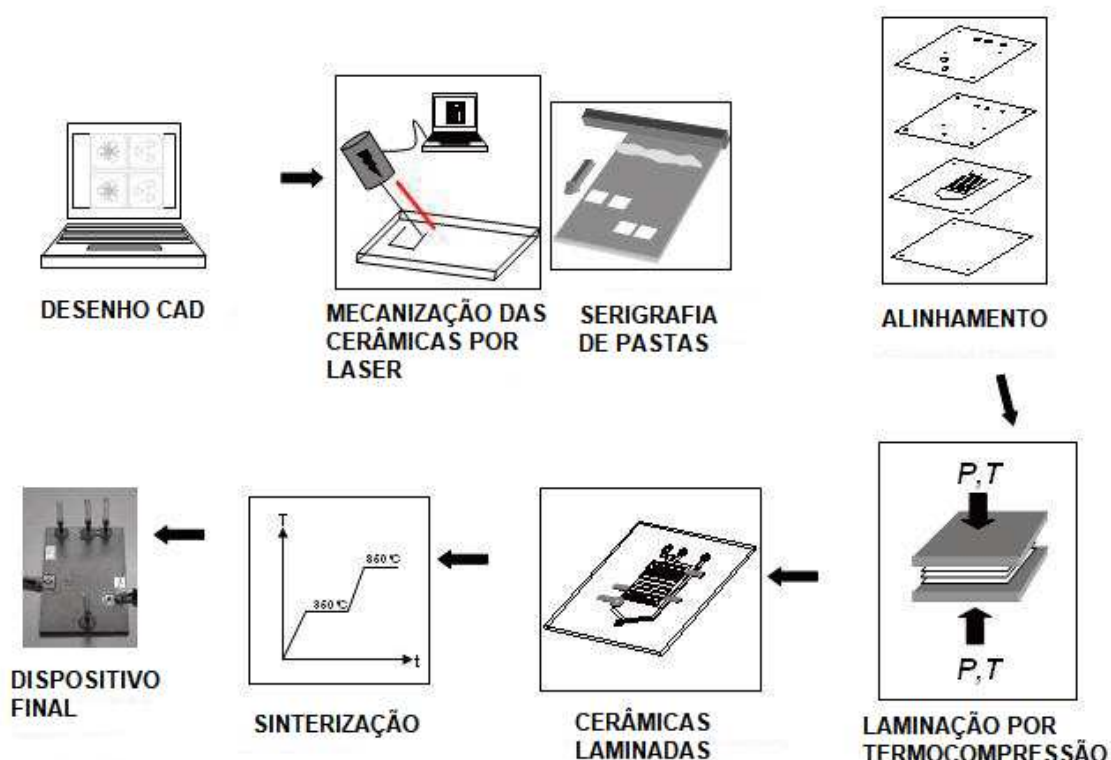


Figura 2: Etapas de fabricação de um microdispositivo construído com LTCC.

Todo esse protocolo apresentado na Figura 2 foi utilizado por López *et al*⁶⁵ para a construção de um microdispositivo usando a tecnologia LTCC. O microdispositivo foi projetado camada por camada por meio de um software CAD, para que todas essas camadas fossem empilhadas formando a estrutura interna com os canais de fluxo, entradas e saídas de reagentes, etc. Posteriormente, foi feita a usinagem das camadas, utilizando um moinho CNC. As camadas foram empilhadas, alinhadas e termolaminadas, usando uma prensa monoaxial a 750 PSI com placas quentes a 100 °C. Foram utilizadas 18 camadas Dupont 951PX com uma espessura de 254 μm antes do processo de sinterização. As entradas e saídas de reagentes foram feitas de tubos de aço inoxidável com comprimento de 8 mm e diâmetro de 2 mm, colados com resina epóxi. A sinterização das camadas foi feita em um forno mufla utilizando uma rampa de temperatura recomendada.

A Figura 3 mostra o design do microdispositivo construído com LTCC (60 mm \times 48 mm \times 4 mm). Os canais de fluxo interno têm uma seção transversal de 0,75 mm \times 0,75 mm. Esses canais abrem para uma célula de medição cilíndrica com um diâmetro de 5 mm e uma altura de 3,25 mm com janelas de

vidro em ambos os lados. O caminho óptico foi construído com vidro borossilicato colado também com resina epóxi. Os condutores para a parte eletrônica foram impressos com pasta condutora de cerâmica 6142d Dupont. Os componentes eletrônicos foram soldados de forma manual utilizando solda de chumbo e estanho. A Figura 4 apresenta a estrutura interna do microdispositivo construído com LTCC³⁵.



Figura 3: Layout do dispositivo construído com LTCC, (a) janela de entrada óptica, (b) entradas de reagentes, (c) saída de reagentes.

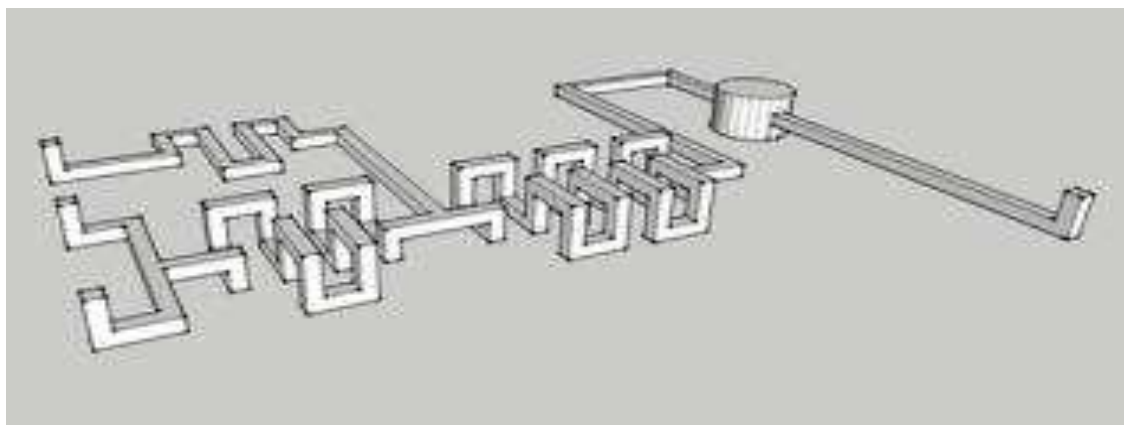


Figura 4: Estrutura interna do dispositivo construído com LTCC.

No âmbito da Química analítica, para fins de miniaturização, a tecnologia LTCC tem apresentado vantagens interessantes, como a integração de materiais de diferentes naturezas ao corpo cerâmico por meio da metodologia de sobreposição multicamadas, facilitando a prototipagem de dispositivos com estruturas tridimensionais complexas a um custo acessível, já que não necessita de sala limpa para a construção dos microdispositivos.

Além disso, é possível uma integração de múltiplos caminhos analíticos em um mesmo microdispositivo, componentes elétricos, fluídicos e mecânicos devido as características das camadas cerâmicas. Devido a sua versatilidade, pode ser incorporado à tecnologia LTCC o sistema de detecção no processo analítico, como por exemplo, sensores potenciométricos, amperométricos e espectrofotométricos³⁶⁻³⁸.

2.4. Métodos analíticos baseados em imagens digitais

A demanda cada vez mais crescente de métodos analíticos simples, precisos, de baixo custo e principalmente capazes de gerar uma quantidade pequena de resíduos químicos é um dos desafios nas áreas de pesquisas. Os métodos baseados em imagens digitais têm sido frequentemente usados como uma alternativa para a determinação quantitativa em Química Analítica, a fim de proporcionar resultados satisfatórios, que sejam acessíveis e funcionais.

Diante disso, é notório que os métodos baseados em imagens digitais são capazes de coletar dados quantitativos do analito de interesse de forma instantânea. O desenvolvimento desses dispositivos de captura de imagens cresceu nos últimos anos, alguns deles são: câmeras fotográficas, scanners, telefones celulares com câmera embutida e webcams, utilizados para monitorar, por exemplo, uma reação colorimétrica, em que se desenvolve um gradiente de cor diretamente proporcional a concentração do analito de interesse^{39,40}.

A obtenção de dados ocorre por meio das câmeras digitais com os sensores CCD (dispositivos de carga acoplada) ou CMOS (sensores complementares de metal-óxido semicondutor), que por sua vez convertem a intensidade da luz incidente em valores digitais armazenáveis, denominados bits. Dessa forma, a geração do sinal analítico está relacionada com a radiação eletromagnética refletida que chega ao detector da câmera, posteriormente decomposto em modelos de cores, principalmente o RGB^{39,41}.

Diversos trabalhos são descritos na literatura empregando imagens digitais como ferramenta analítica. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo vários trabalhos nessa área. Franco *et al*⁴² desenvolveram um procedimento analítico simples, de baixo custo e preciso para a determinação de metanol em cachaça empregando análise de imagens digitais. As imagens foram obtidas por meio de um *smartphone* com um sistema portátil construído empregando

materiais de baixo custo e iluminação própria. A partir da otimização, foram construídas curvas analíticas com boa linearidade e coeficiente de correlação r^2 igual a 0,998.

Em outro trabalho, Franco *et al*⁴¹ desenvolveram por meio do mesmo equipamento supracitado uma metodologia para a determinação de furfural em cachaça empregando um smartphone como ferramenta analítica. O método desenvolvido apresentou uma recuperação de 85,8 a 106% e baixa geração de resíduos (600 μ L/cavidade).

Em outro trabalho proveniente do mesmo grupo de pesquisa, Santos *et al*⁴³ propuseram um método para a determinação de ácido ascórbico em frutas exóticas da Amazônia brasileira empregando um *smartphone* para a captura das imagens. Após otimizar o sistema, obtiveram um limite de detecção de $8,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e recuperações que variaram de 87,1 a 116%. Diversos frutos foram analisados, como manga, laranja, maracujá, caju, bacuri, cupuaçu, muruci e mombin amarelo. O método é econômico, ambientalmente seguro e portátil.

Fernandez *et al*⁴⁴ desenvolveram um método para determinar potássio usando um *scanner* de mesa trabalhando no modo de reflexão para obter informações quantitativas. O método foi aplicado a diversas bebidas e amostras de água.

2.4.1. Teoria das cores

A cor de uma imagem ou objeto pode ser estabelecida como a percepção humana da combinação de comprimentos de onda do espectro eletromagnético na região da luz visível que reflete sobre uma superfície⁴⁶. Portanto, a luz é uma forma de radiação eletromagnética que consiste em campos elétricos e magnéticos oscilantes, isto é, variam com o tempo. A luz visível, ondas de rádio, micro-ondas e os raios-x são exemplos de tipos de radiação eletromagnética. O olho humano detecta a radiação eletromagnética numa faixa do espectro eletromagnético que varia entre 700 nm (luz vermelha) e 400 nm (luz violeta), sendo que neste intervalo a radiação é chamada de luz visível⁴⁷, conforme destacado na Figura 5.

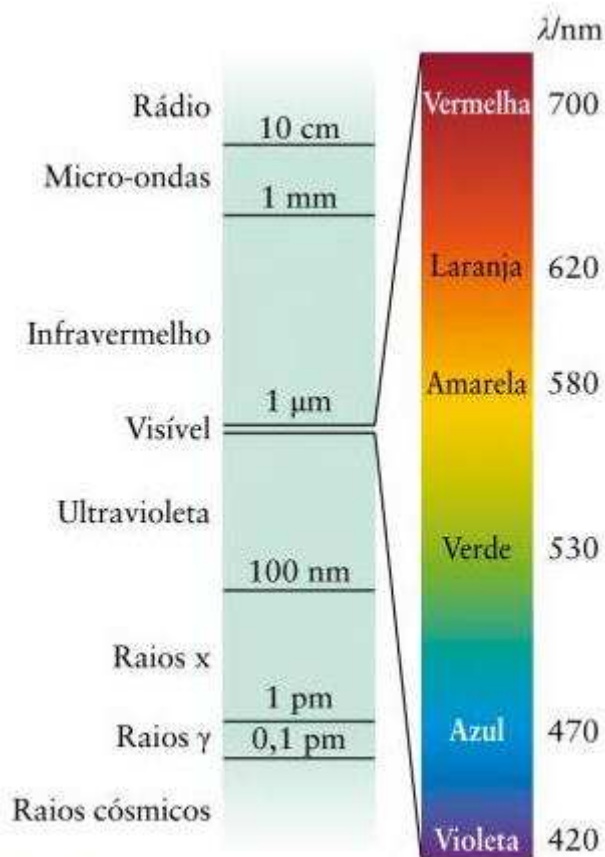


Figura 5: Espectro eletromagnético destacando a região do visível (Fonte Atkins).

Em 1853, em respostas ao fracasso de Hermann Von Helmholtz (1821-1894) em encontrar mais de um par de cores complementares, o matemático polonês Hermann Gunter Grassmann (1809-1877) publicou uma teoria da mistura de cores que incluía um conceito fundamental: a complementaridade das cores, ou seja, cada ponto em um círculo de cores tem, dentro deste, uma cor complementar⁴⁸. Portanto, uma cor primária é sempre complementada por uma cor secundária, ou cor complementar.

Uma substância colorida absorve seletivamente comprimentos de onda da região visível do espectro eletromagnético e a coloração resultante, ou seja, a cor complementar, composta pelos comprimentos de onda que são refletidos pela substância, comprimentos de ondas restantes⁴⁸. Portanto, se uma determinada solução exibir uma coloração vermelha, o canal que terá maior absorção é o verde, sua cor complementar. A cor verde é absorvida pela solução e a vermelha é refletida até um detector digital ou até os olhos. A Figura 6 expressa o disco cromático.



Figura 6: Disco cromático que define as cores primárias e complementares.

2.4.2. Modelo de cor RGB em imagens digitais

A maioria dos métodos de análises de imagens emprega o padrão de cores RGB, fazendo uso das cores primárias vermelho(R), verde(G) e azul(B) e gerando cerca de 16 milhões de combinações de cores possíveis a partir dessas três cores primárias. Este modelo é reconhecido como o sistema de cor mais amplo e aceito^{39,49}. O modelo em questão é capaz de reproduzir as características de detecção de cores do olho humano, o qual detém sensores sintonizados nas regiões das cores primárias vermelho, verde e azul e, é considerado aditivo pelo fato da combinação linear das três cores primária gerarem uma cor composta⁵⁰.

O sinal analítico gerado a partir de uma imagem é obtido como valores de RGB que variam de 0 a 255, portanto, existem 256 níveis. Nesse sentido, o preto puro representa a escala 0, enquanto a escala 255 é representada pela cor branca pura^{49,50}. Assim, as cores são compostas como dados aditivos da combinação linear das três cores do modelo RGB.

Geometricamente, o modelo RGB pode ser caracterizado por um espaço tridimensional cúbico de cores, no qual os eixos representam as três cores primárias (Figura 7)⁴⁵.

aproximadamente 1 mg ao dia por meio de sangramentos, células da superfície intestinal, pele e urina, podendo ser compensada com a absorção de ferro pelo corpo. Em mulheres, ocorre perda adicional de 0,5 mg ao dia devido a menstruação e perdas de 2 mg ao dia durante a gravidez, nesse caso a compensação é mais difícil por ser uma perda consideravelmente maior⁵⁴.

Considerando que a perda diária de ferro por um homem adulto seja de 1 mg e que a média de absorção de ferro presente em uma dieta seja de 10%, uma porção diária de 10 mg de ferro seria o suficiente para suprir a demanda necessária de um homem adulto⁵⁵. As recomendações diárias exigidas para a ingestão de ferro variam, conforme a idade e o estado nutricional. Para a mulher, oscilam na idade fértil, gravidez e lactação. As recomendações diárias nutricionais de ferro de acordo com Krause e Mahan estão na Tabela 1⁵⁶.

Tabela 1: Recomendações nutricionais diárias de ferro.

Categoria	Idade	Recomendações diárias
Crianças	1 a 3 anos	7 mg
	4 a 8 anos	10 mg
	9 a 13 anos	8 mg
Homens	14 a 18 anos	11 mg
	>19 anos	8 mg
Mulheres	14 a 18 anos	15 mg
	>19 anos	18 mg
Gravidez		27 mg
Lactante		10 mg

Fonte: KRAUSE E MAHAN, 2013.

Diversos alimentos são fontes ricas em ferro na sua composição nutricional, contribuindo para os valores de ingestão diárias recomendadas. A Tabela 2 traz alguns exemplos de fontes nutricionais de ferro.

Tabela 2: Quantidade de ferro de alguns alimentos.

Alimento	Miligramas por Porção
Cereais enriquecidos prontos para o consumo (vários) (28,35 g)	1,8-21,1
Carne de órgãos (fígado, miúdos), cozidos (85,05g)	5,2-9,9
Cereais instantâneos enriquecidos, cozidos (vários), 1 pacote	4,9-8,1
Carne bovina, acém, paleta, sem gordura, cozida (85,05 g)	3,1
Carne bovina, coxão mole, carne magra, 0 de gordura, todas as qualidades, cozida (85,05 g)	2,8
Sardinhas, em lata com óleo, drenadas (85,05 g)	2,5
Grãos de soja, maduros, cozidos, ½ xícara	4,4
Espinafre, fresco, cozido, ½ xícara	3,2
Grão-de-bico cozido, ½ xícara	2,4
Carne bovina moída, 15% de gordura, cozidas (85,05 g)	2,2
Suco de ameixa, ¼ de copo	2,3

Fonte: KRAUSE E MAHAN, 2013.

A deficiência de ferro está atrelada a sua ingestão de forma inapropriada ou a perda crônica de sangue, gerando um estado no qual há redução da quantidade total no fornecimento de ferro, incapacitando a sua utilização ou causando falhas em atender as demandas fisiológicas pelo organismo⁵⁷. A sua biodisponibilidade é baixa em populações que fazem uso de dietas à base de plantas e com pouca carne, uma vez que os produtos de carnes são ótimas fontes de ferro.

Por outro lado, a sobrecarga de ferro é tida como o acúmulo excessivo de ferro no organismo e tem sido associado a condições patológicas severas, podendo ocorrer devido ao alto conteúdo de ferro por meio de suplementação

dietética, ingestão excessiva medicamentosa, transfusões sanguíneas frequentes, administração parenteral ou mutações genéticas nos genes responsáveis pela absorção e regulação da absorção de ferro^{57,58}.

Os sintomas da toxicidade de ferro incluem letargia, náuseas, vômitos, dores abdominais, fezes negras, danos no fígado e defeitos de coagulação dias após a ingestão. Efeitos tardios incluem falência renal e cirrose hepática⁵⁸.

2.5.1. Medicamentos antianêmicos

Os medicamentos podem ser definidos como agentes de diagnósticos, tratamento, prevenção ou cura de doenças. São compostos por substâncias ativas e excipientes⁵⁹.

A substância ativa de origem grega “pharmakon”, com significado de remédio ou veneno, é o responsável pelas ações terapêuticas e reações adversas no organismo⁶⁰.

Os excipientes não possuem ação terapêutica, são apenas compostos utilizados na garantia de estabilidade e características físico-químicas de produtos farmacêuticos. Eles aumentam o tempo adequado para o consumo, preservando os medicamentos da ação de microrganismos⁶⁰.

As formulações farmacêuticas contendo Fe (II) com objetivo terapêutico proporcionam ao organismo a correção da anemia ferropriva em concentrações ideais, devido ao fato do íon Fe (II) ser mais facilmente assimilável, restabelecendo os seus índices corretos no organismo. As formulações a base de sulfato ferroso é a forma mais absorvível de Fe (II) quando combinado ao ácido ascórbico, o qual possui ação redutora, melhora a sua absorção e conseqüentemente aumenta a taxa de hemoglobina em pacientes anêmicos⁶¹.

2.5.2. Fortificação de alimentos com ferro

A legislação brasileira considera que, de acordo com parâmetros legais, enriquecimento, adição ou fortificação consiste no processo de adição de um ou mais nutrientes ao alimento com o objetivo de fortalecer seu valor nutricional e atuar na prevenção ou correção de deficiências nutricionais presentes na população de uma forma geral ou grupos. Trata-se de uma técnica de baixo custo que vem sendo utilizada por diversos países, desenvolvidos ou subdesenvolvidos, na prevenção das carências nutricionais. Ademais, a adição

desses fortificantes deve ocorrer em alimentos que participem efetivamente da rotina alimentar da população alvo⁶².

O enriquecimento ou fortificação é permitido desde que a cada 100 mL ou 100g do alimento pronto para consumo seja fornecido um mínimo de 15% de IDR (ingestão diária recomendada) de referência, no caso de líquidos, e de 30% de IDR, para sólidos⁵⁹.

Em junho de 2004, por meio da Resolução RDC nº 344 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o Ministério da Saúde tornou obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e milho, estabelecendo que a cada 100g do produto deve-se fornecer no mínimo 4,2 mg de ferro, 30% da IDR de adulto e 150 mcg de ácido fólico, correspondendo a 37% da IDR de adulto⁶³.

Várias experiências têm demonstrado que o consumo em larga escala de alimentos enriquecidos ou fortificados tem sido a forma mais eficiente no combate a deficiência nutricional a um custo compensatório⁶⁴.

Diversos países da América do Sul e Central, como: Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Chile, Honduras, Panamá, Porto Rico, México, Nicarágua, entre outros⁶¹ adotaram a fortificação de alimentos como obrigatória.

2.5.3. Procedimentos para a determinação de ferro em alimentos e fármacos

Diversos procedimentos para a determinação de ferro em alimentos são descritos na literatura. Dentre eles, destacam-se espectrometria de absorção na chama, forno de grafite e ICP-MS. Por exemplo, Zverina *et al*⁶⁵ avaliaram o teor de cádmio e ferro em flocos de diferentes tipos de cereais provenientes de países da União Europeia, Ucrânia, Índia e China utilizando a técnica HR-CS-GFAAS. A técnica HR-CS-FAAS foi utilizada por Brandão *et al*⁶⁶ para a determinação de ferro em amostras de leite em pó fortificado baseado na amostragem de churume. Na Finlândia, Ekholm *et al*⁶⁷ avaliaram o teor de ferro e diversos outros metais em produtos à base de cereais, frutas e legumes por ICP-MS. Ainda que essas técnicas estejam bem estabelecidas, elas são limitadas em muitos laboratórios, pois requerem infraestrutura e equipamentos caros, salas limpas, pessoal qualificado para a operação desses equipamentos, dentre outros.

A metodologia normalmente utilizada na espectrofotometria da região UV-VIS se baseia na aplicação do método colorimétrico por meio da reação de

formação de complexo entre Fe (II) com a 1,10-fenantrolina, utilizando o cloridrato de hidroxilamina como agente redutor, reduzindo o Fe (III) a Fe (II), formando um complexo de coloração avermelhada. Borges *et al*⁶⁸ empregaram essa metodologia para a determinação quantitativa de Fe (II) em farinha de trigo enriquecidas.

Outra metodologia descrita para determinação colorimétrica de ferro é por meio da reação de complexação entre a 2,2'-bipiridina e o Fe (II), como proposto por Teixeira *et al*⁶⁹. Os autores determinaram ferro em etanol empregando o comprimento de onda de absorção máxima de 523nm.

Sadighi *et al*⁷⁰ desenvolveram um método baseado na reação do Fe (II) com a 1,10-fenantrolina e posterior determinação por espectrofotometria na região visível sendo utilizado para avaliar farinhas e pães fortificados com este mineral. Em outro trabalho, Rosado *et al*⁷¹ utilizaram um espectrômetro de absorção atômica com chama para determinação do teor de ferro e zinco em tortillas. Em um estudo desenvolvido por Queiroz *et al*⁷² com diversas linhagens de milhos, também foi empregado um espectrofotômetro de absorção atômica para a quantificação de ferro e zinco.

2.6. Métodos de análise por injeção em fluxo com detecção por imagens digitais

O emprego de sistemas de análise por injeção em fluxo com detecção por métodos baseados em imagens digitais apresenta um grande potencial de desenvolvimento, especialmente na área da química analítica⁷³. A capacidade do monitoramento da reação em tempo real e avaliação de parâmetros, como a intensidade da cor, favorecem o desenvolvimento de um sistema com alta aplicabilidade.

Por meio da seleção de uma determinada área homogênea da imagem da reação é possível obter e expressar um valor matemático pelo modelo RGB, utilizado para construir uma curva analítica ao assumir uma relação linear com a concentração do analito, possibilitando posteriormente a quantificação do analito nas amostras^{74,75}.

Andrade *et al*⁷³ desenvolveram um estudo com imagens digitais para detecção em um sistema de análise em fluxo-batelada a fim de determinar Al (III) e Cr (VI) em água. Foi usando uma webcam com sensor CCD para a aquisição

das imagens digitais, as quais foram analisadas por meio de um programa denominado *ImageJ*, capaz de realizar varredura dos pixels para extrair os componentes RGB de cada pixel. Com a esta metodologia, foi conseguido uma precisão para o Al (III) de 1,5% na faixa linear de trabalho de 10 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o Cr (VI) precisão de 1,7% na faixa de 10 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos foram considerados estatisticamente bons, a um nível de 95% de confiança comparado ao método de referência utilizado.

Moura *et al*⁷⁶ descreveram o uso de uma webcam para a detecção por luminescência e quimiluminescência em um microssistema de análise de fluxo contínuo para determinar acetaminofeno em comprimidos e avaliação da dureza em águas minerais. O dispositivo foi desenvolvido em laboratório, disposto em uma caixa para evitar a influência de luz externa e a câmera foi fixada no topo da caixa alinhada as células de fluxo, no qual pixels de imagens em tempo real foram pré-selecionados para a detecção em RGB. Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa a um nível de confiança de 95%, sugerindo uma precisão adequada para o método descrito.

Almeida Jr *et al*⁷⁷ propuseram um analisador de lote em fluxo associado a detecção por imagens digitais baseado no sistema de cores RGB para a quantificação de sulfitos em amostras de vinagre por meio da reação pararosanilina (PRA) -formaldeído-sulfito. O analisador produzido era composto por uma câmara de mistura com uma janela de vidro lateral e um LED na parte superior da câmara para o monitoramento da reação em condições de não-equilíbrio. Utilizando um teste *t* pareado a um nível de 95% de confiança, tanto o método proposto, como o método de referência foram comparados estatisticamente e apresentaram resultados satisfatórios, confirmando o potencial do método proposto como ferramenta de baixo custo, confiável e baixos níveis de geração de resíduos.

2.7. Validação da metodologia e aplicação em amostras reais

No que diz respeito a confiabilidade de comparabilidade do método e qualidade das medições a serem realizadas, algumas exigências devem ser seguidas. Um método analítico deve fornecer informações claras e seguras a respeito da amostra em análise, passando por um processo de validação, garantindo por meio de estudos experimentais que o método atenda as exigências e assegurando confiabilidade nos resultados^{78,79}.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) ditam os procedimentos necessários para a validação de um método, por meio da disponibilização de documentos. Dentre esses documentos, encontram-se os principais parâmetros a serem avaliados no processo de validação, ou figuras de mérito, as quais serão descritas a seguir^{79,80}.

2.7.1. Linearidade

O termo Linearidade compreende a resposta de um método de acordo com a sua capacidade de demonstrar que os resultados experimentais obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito da amostra dentro do intervalo de confiança denominado faixa linear⁷⁹.

A verificação deste parâmetro ocorre por meio da curva analítica, onde estima-se a sua qualidade através do coeficiente de correlação r^2 , indicando uma boa relação entre os conjuntos de pontos experimentais e a baixa incerteza dos coeficientes de regressão quando seu valor se aproxima de 1,0⁷⁸.

2.7.2. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito na amostra e, pode ser detectado por um determinado procedimento experimental⁸⁰.

O limite de quantificação (LQ), por sua vez, representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis em condições experimentais estabelecidas⁷⁹.

Ambos limites podem ser calculados por: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica, o mais confiável estatisticamente⁷⁸.

O método baseado em parâmetros da curva analítica determina LD e LQ por meio das seguintes equações:

$$LD = \frac{(3 \times SD)}{S} \quad \text{equação (1)}$$

$$LQ = \frac{(10 \times SD)}{S} \quad \text{equação (2)}$$

Onde, SD é a estimativa do desvio padrão da resposta e S é o coeficiente angular da curva analítica⁷⁸.

2.7.3. Repetibilidade

A repetibilidade representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas dentro de um curto período de tempo. Sua efetuação ocorre nas mesmas condições de medição, com mesmo analista e instrumentação, sete ou mais repetições e, pode ser expressa a partir do desvio padrão relativo (RSD)^{78,80}.

2.7.4. Seletividade

A seletividade de um método analítico corresponde a sua capacidade de medir exatamente o analito de interesse na presença de outras espécies capazes de interferir na análise. A seletividade garante que o pico de resposta seja unicamente do analito de interesse, uma vez outros fatores como linearidade, exatidão e precisão^{79,80} podem ser comprometidos.

No que diz respeito a avaliação da seletividade, podem ser feitos alguns experimentos com padrões ou materiais de referência, amostras com presença e ausência do analito e avaliação da capacidade de identificação do analito na presença de possíveis interferentes⁸⁰.

2.7.5. Recuperação

Os ensaios de recuperação podem ser determinados por meio da fortificação das amostras com quantidades conhecidas. A fortificação pode ocorrer em três diferentes concentrações: baixa, intermediária e alta, de acordo com a faixa em que a curva analítica do método se encontra linear⁸⁰.

A recuperação pode ser calculada por meio da seguinte equação:

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{equação (3)}$$

onde:

C₁ = concentração obtida na amostra adicionada,

C₂ = concentração obtida na amostra não adicionada,

C₃ = concentração adicionada.

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Desenvolver uma metodologia analítica utilizando sistemas de análise por injeção em fluxo acoplado a um microsistema analítico construído com LTCC e detecção por imagens digitais para a determinação de Fe (II) em matrizes alimentares e farmacêuticas.

3.2. Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros operacionais do sistema FIA-LTCC para obter a máxima sensibilidade e precisão.
- Otimizar a reação colorimétrica Fe (II) – 1,10-Fenantrolina por meio da técnica de planejamento experimental Box-Behnken.
- Validar a metodologia analítica desenvolvida para verificar a sua precisão, seletividade, limite de detecção e exatidão por meio da comparação entre o método proposto e um método de referência.
- Aplicar o sistema desenvolvido em amostras reais fortificadas para verificar se os teores de ferro estão de acordo com os valores informados nos rótulos das embalagens comerciais.

4. Parte Experimental

4.1. Instrumentação

4.1.1. Bomba Peristáltica

Para o transporte das soluções e reagente, utilizou-se uma bomba peristáltica Gilson, modelo Minipuls 3.

4.1.2. Tubos e conexões

Foram utilizados tubos de Tygon com diferentes diâmetros internos. Além de tubos de polietileno de diâmetro interno de 0,8 mm para a construção de alças de amostragem, conexões a linhas de condução de reagentes e amostras.

4.1.3. Injetor comutador

Soluções de reagentes e amostras (ou solução padrão) foram introduzidas no sistema em fluxo por meio de um injetor comutador manual construído em acrílico¹⁴.

4.1.4. Aquisição de dados

Para o controle da aquisição de dados analíticos, empregou-se um celular Motorola, modelo G5S Plus, equipado com duas câmeras de 13 megapixels cada, capaz de oferecer uma resolução de 4160x3120 pixels.

4.1.5. Balança analítica

As medidas de massa foram feitas com uma balança analítica Shimadzu, modelo AUX320.

4.1.6. pHmetro

Todas as medidas de pH foram realizadas utilizando-se um pHmetro de bancada (Mettler Toledo) e um eletrodo de referência interno de Ag/AgCl, contendo uma solução de KCl 3,0 mol L⁻¹.

4.1.7. Espectrofotômetro

As medidas espectrofotométricas para o método de comparação foram feitas com um espectrofotômetro FEMTO, modelo 600 S.

4.1.8. Micropipetas

Foram utilizadas micropipetas Olen, de 20 a 200 µL e 100 a 1000 µL para o preparo de soluções padrão, amostras e reagentes.

4.2. Preparo de soluções e amostras

As soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida de um sistema Millipore Milli-Q (EUA). Sulfato Ferroso Amoniacal (Grupo Química), Ácido L(+) Ascórbico (Isofar), 1,10-Fenantrolina(Orto) (Dinâmica), Acetato de Sódio (Êxodo Científica), Ácido Acético Glacial (Impex), Ácido Nítrico (Êxodo Científica), Ácido Perclórico (Vetec), foram reagentes de grau analítico usados.

A solução estoque de Fe (II) $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada no mesmo dia de sua utilização, dissolvendo-se 0,049 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em um balão volumétrico de 25 mL, e o volume completado com água deionizada. As soluções padrão para o preparo da curva de calibração foram feitas por diluições apropriadas da solução estoque em balões de 10 mL, adicionou-se a cada balão 1 mL de ácido ascórbico $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 1 mL de tampão acetato 2 mol L^{-1} , completou-se o volume com água deionizada.

Preparou-se a solução tampão acetato $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,50) pela dissolução de 13,6 g acetato de sódio trihidratado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) em água deionizada em um balão de 50 mL, adicionou-se 5,71 mL de ácido acético $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, e posteriormente o pH foi ajustado a 4,50 com a adição de pequenas alíquotas de soluções diluídas de NaOH e/ou HCl.

A solução estoque de ácido ascórbico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,8800 g desse reagente em um balão volumétrico de 500 mL completando o volume com água deionizada.

Para o preparo da solução de 1,10-fenantrolina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, dissolveu-se 0,4955 g desse reagente em um béquer contendo 100 mL de água deionizada sob agitação a uma temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e com adição de 10 gotas de HCl_{conc} até a dissolução completa do reagente. Posteriormente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e seu volume completado com água deionizada.

Quatro amostras foram adquiridas em supermercados e farmácias da cidade de Viçosa-MG para a realização deste trabalho, a saber:

- 1- Sucrilhos SC_1 : contém 5,6 mg de ferro a cada 30 g de porção.
- 2- Sucrilhos SC_2 : contém 5,9 mg de ferro a cada 30 g de porção.
- 3- Medicamento MD_1 : contém 25 mg de ferro a cada 1 mL.
- 4- Medicamento MD_2 : contém 25mg de ferro a cada 1 mL.

As amostras de 1g de Sucrilhos foram pesadas em béqueres e, em seguida, maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo. Posteriormente, adicionou-se a cada béquer 15 mL de uma solução nitroperclórica (3:1 v/v) e os mesmos foram colocados em chapas de aquecimento na capela de exaustão a temperatura de $190 \text{ }^\circ\text{C}$, condição mantida para o recebimento da solução nitroperclórica até que se tornasse límpida, sem coloração amarela. Com isso, ajustou-se o pH para 4,50 ($\pm 0,10$) utilizando NaOH $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida as

amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água deionizada.

Para o preparo das amostras de medicamentos, pipetou-se 1 mL de cada amostra, as quais foram posteriormente diluídas em balões de 50 mL e seu volume completado com água deionizada.

A Tabela 5 apresenta a concentração teórica de ferro presente nas amostras, as quais foram calculadas a partir do valor de ferro rotulado pelos fabricantes e da quantidade em massa de amostras utilizadas no preparo.

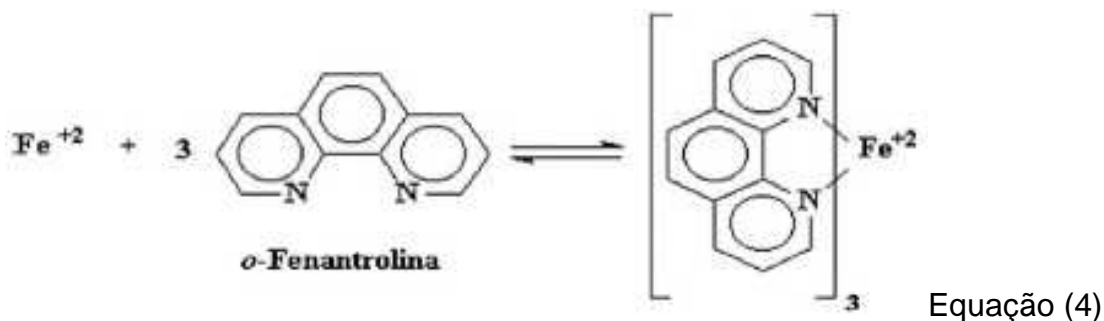
Tabela 3: Concentração teórica de ferro após a abertura das amostras.

Amostra	Concentração de ferro (mol L ⁻¹)
Sucrilhos SC ₁	1,337 x 10 ⁻⁴
Sucrilhos SC ₂	1,408 x 10 ⁻⁴
Medicamento MD ₁	8,953 x 10 ⁻³
Medicamento MD ₂	8,953 x 10 ⁻³

4.3. Reação colorimétrica

A metodologia utilizada foi a mais amplamente empregada, consistiu na aplicação do método colorimétrico baseado na reação de complexação do Fe (II) com a 1,10-fenantrolina, gerando um complexo de intensa coloração vermelho-alaranjado monitorado no comprimento de onda de máxima absorvância de 510 nm^{83,84}.

A Equação 4 apresenta o esquema da reação de formação do complexo Fe (II)-1,10-fenantrolina.



Equação 4: Esquema da reação de formação do complexo entre Fe (II)-1,10-fenantrolina.

Conforme mostrado na Equação 4, três moléculas de 1,10-fenantrolina complexam um íon ferroso na coloração vermelho-alaranjado. Desta forma, são necessários três ligantes para cada um centro metálico.

4.4. Desenvolvimento do microdispositivo analítico construído com cerâmicas verdes (LTCC)^{33,34, 36-38, 81,82}

A tecnologia LTCC, também chamada *Green Tapes* ou cerâmicas verdes, por serem manipuladas em estado “verde” antes de serem submetidas ao processo de sinterização, possuem diversas características significativas no que diz respeito ao desenvolvimento e fabricação de estruturas 3D por meio de várias camadas cerâmicas. Apesar da denominação “verde”, as cerâmicas são de cor azul devido aos sais de cobalto que a incorporam. Na etapa “verde”, elas são flexíveis a ponto de serem cortadas com tesouras ou mesmo com a própria mão. A construção dessas estruturas no formato tridimensional ocorre por meio do empilhamento das distintas camadas cerâmicas, podendo dar origem a dispositivos com estruturas complexas quando sobrepostas em ordem correta.

Algumas das características desse material são descritas na Tabela 3:

Tabela 4: Propriedades físicas e elétricas da cerâmica Dupont 951AX.

Densidade	3,1 g/cm ³
Condutividade térmica	3,3 W/mK
Rugosidade superficial	<0,34µm
Resistência de isolamento (100VDC)	>10 ¹² Ω
Espessura	254 µm
Encolhimento durante a etapa de sinterização do eixo XY	12,7 ± 0,3%
Encolhimento durante a etapa de sinterização do eixo Z	15 ± 0,5%

No que diz respeito a composição desse material em seu estado “verde”, 45% corresponde a Al_2O_3 (alumina), 40% de vidro e 15% de compostos orgânicos, tais como: solvente, aglutinante e plastificante.

Existem três tipos de compostos orgânicos presentes nas cerâmicas:

- 1- Dissolventes: Proporcionam viscosidade adequada ao material e ajudam na dispersão de partículas sólidas por meio da dissolução de aditivos orgânicos. Ex: etanol, xileno.
- 2- Plastificantes: Permitem a fácil manipulação das cerâmicas antes da sinterização por conferirem flexibilidade ao material. Ex: Santicizer 160, UCON.
- 3- Aglutinantes: Mantém as partículas cerâmicas unidas. Ex: Butvar 98.86.

A Figura 8 demonstra a camada de uma cerâmica DuPont 951AX em seu estado não sinterizado e com um plástico (Mylar) que lhe confere rigidez após a sinterização.

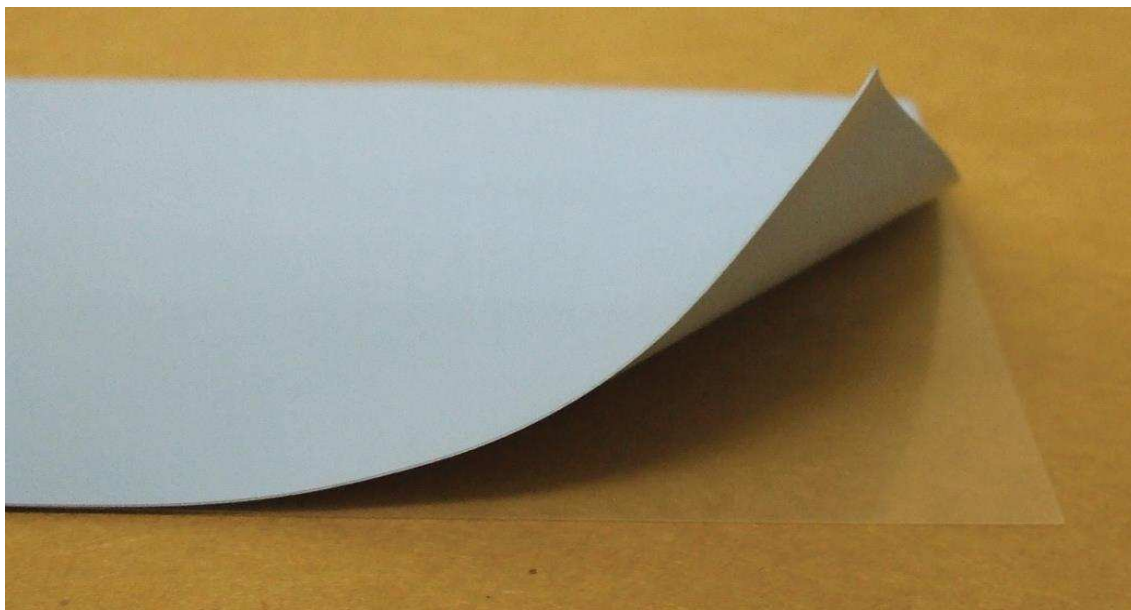


Figura 8: Camada da cerâmica DuPont 951AX com plástico Mylar.

As etapas necessárias para a construção do microdispositivo construído com LTCC foram:

1. Desenho inicial do microsistema analítico.
2. Processo de corte.

3. Alinhamento e laminação.
4. Sinterização.

4.4.1. Desenho inicial do microdispositivo analítico

Diversas camadas foram projetadas utilizando o software AUTOCAD baseadas na geometria escolhida para os canais por onde passarão os reagentes. Durante o processo de desenho, dois fatores devem ser levados em conta: 1- Encolhimento sofrido pela cerâmica no processo de sinterização em consequência da perda de compostos orgânicos. 2- A utilização de metodologia de fabricação por sobreposição de camadas ou capas. Cada camada possui sua geometria particular e corresponde a um corte do dispositivo. Quando sobrepostas, formam uma estrutura tridimensional com canais fluídicos bem definidos, a fim de se obter o microdispositivo analítico inicialmente projetado.

4.4.2. Processo de corte e serigrafia

Para a construção do dispositivo, foram utilizadas cerâmicas verdes Dupont 951AX devido a ampla maleabilidade desse material. Utilizou-se ainda um equipamento a laser (Protolaser), que consiste em um laser de infravermelho capaz de produzir radiação com parâmetros de corte otimizados pelo fabricante para o corte das cerâmicas.

Uma vez cortadas, as cerâmicas foram alinhadas e laminadas. No caso do microdispositivo construído com LTCC desenvolvido para este trabalho, não houve a integração de circuitos elétrico, portanto, não foi necessário realizar o procedimento de serigrafia.

4.4.3. Alinhamento e Laminação

Posteriormente, foi feita a sobreposição para alinhamento das camadas cerâmicas objetivando a configuração sob medida dos canais fluídicos projetados inicialmente.

Na etapa de laminação, o método utilizado foi a termocompressão. Foi aplicada uma pressão nas cerâmicas sobrepostas e alinhadas, a temperatura foi mantida constante, as cerâmicas se aglutinaram dando origem as estruturas. Esse processo foi realizado a uma temperatura de 100° C por 60 segundos, produzindo um microdispositivo LTCC alinhado e sólido ao término desta etapa.

Períodos de tempos mais longos, podem acarretar deformações no microdispositivo. Para a laminação, utilizando-se uma prensa hidráulica com dois blocos de aquecimento de 250mm x 150mm, equipada com um controlador de temperatura que permite o sistema aplicar uma pressão de até 420kg/cm².

Após a etapa de laminação, por meio de uma fresadora, o excesso de material cerâmico foi eliminado permitindo o corte das cerâmicas, melhorando assim, o aspecto visual do microdispositivo devido à boa precisão de corte da fresadora.

4.4.4. Sinterização

Na sinterização, foi utilizado um forno com atmosfera de ar CARBOLITE CBCWF11/23P16, com capacidade de 1100°C. A sinterização é o procedimento com a finalidade de conferir rigidez ao microdispositivo LTCC e, para isso, é necessário atingir altas temperaturas. Para a cerâmica DuPont, o fabricante recomenda 2 rampas de temperatura de 30 min de duração cada uma. A primeira rampa, correspondente a volatilização dos componentes orgânicos em sua totalidade, pode variar de 200 a 400 °C. A segunda rampa, corresponde a temperatura de transição vítrea e origina a interpenetração da alumina entre as camadas, de 600 a 850 °C. A rampa de temperatura correspondente ao processo de sinterização da DuPont 951 AX é representada na Figura 9.

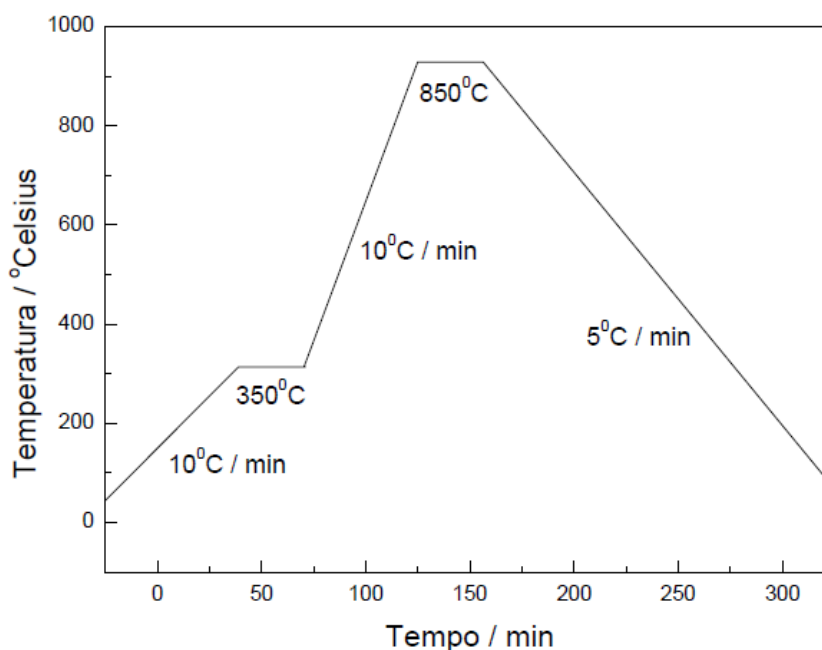


Figura 9: Rampa de temperatura para a sinterização das cerâmicas DuPont 951AX.

4.4.5. Desenho das camadas para construção do microdispositivo construído com LTCC

A Figura 10 representa todas as camadas cerâmicas empregadas na construção do microdispositivo analítico utilizado na determinação de Ferro (II) usando a 1,10-fenantrolina como reagente cromogênico.

Na construção do microdispositivo, as camadas 3-5 abrigam os canais microfluídicos por onde ocorrerão as reações. Tratam-se de três camadas iguais que quando sobrepostas formam microcanais com medidas de 1 mm de diâmetro, 0,85 mm de largura e 0,17 mm de profundidade, e outras quatro camadas que complementam o microdispositivo. A quantidade de camadas que constituem um microdispositivo pode variar de 6 a 12, não sendo aconselhado mais de 12, devido a possível danificação das estruturas internas na etapa de laminação.

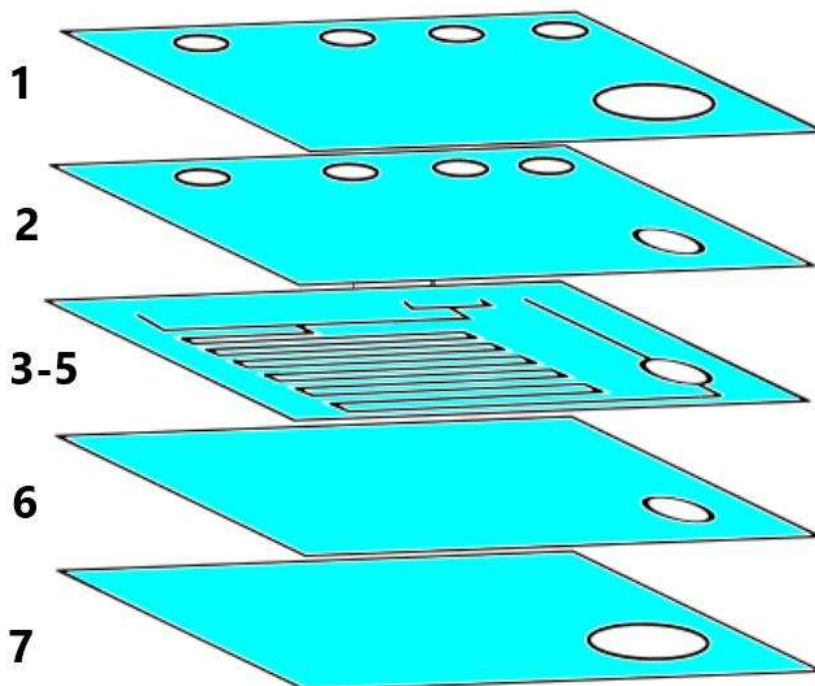


Figura 10: Camadas de cerâmicas constituintes do microdispositivo construído com LTCC.

A Figura 11 apresenta a camada 1 do microdispositivo onde são fixados os conectores de latão (fixados com resina epóxi) que delimitam as entradas das

cavidades (A, B e C) e a saída (D) dos reagentes possuindo 3 mm de diâmetro. A cavidade (E) comporta a colocação de uma lamínula de vidro esférica de 1,0 cm de diâmetro, que também é colocada na camada 7 do microdispositivo, formando assim um caminho óptico de 0,6 mm.

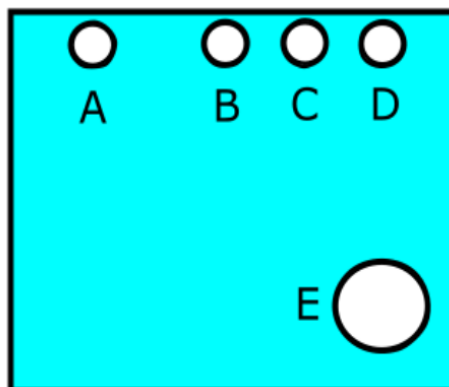


Figura 11: Camada 1 do microdispositivo construído com LTCC.

As cavidades (A, B, C e D) da camada 2 (Figura 11) possuem diâmetros de 1 mm, ou seja, são menores em comparação as mesmas cavidades presentes na camada 1, devido ao ajuste para entrada de reagentes nos canais microfluídicos da camada 3-5.

Os canais microfluídicos, por onde passam reagentes e amostras, presentes nas camadas 3-5, foram desenhados no formato de serpentina, uma vez que este formato possibilita uma mistura mais eficiente entre reagentes e amostras. A cavidade em formato côncavo presente nas camadas 2, 3-5 e 6 foi desenhado para eliminar bolhas que eventualmente poderiam ser produzidas no interior do microdispositivo e também para reduzir o volume morto que poderia se formar.

As camadas 6 e 7 representadas na Figura 10, não possuem cavidades para entrada de reagentes, elas possuem apenas cavidades referentes a forma côncava (camada 6) e a cavidade esférica (camada 7), com a finalidade de complementar a formação do microdispositivo.

A Figura 12 esquematiza a conexão de entrada e saída de fluídos do microdispositivo analítico, na qual F representa o tubo de polietileno, G é um tubo de silicone que permite a melhor fixação do tubo de polietileno e H é o conector

de latão, local onde foi utilizada cola tipo superbonder e resina epóxi para a fixação do mesmo sobre a cerâmica.

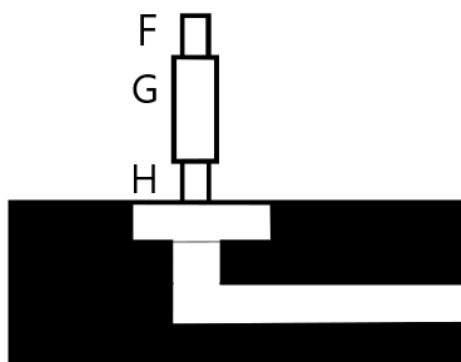


Figura 12: Esquema de conexão de entrada e saída de fluidos do microdispositivo construído com LTCC.

A Figura 13 apresenta o microdispositivo construído com LTCC pronto para uso, após o processo de sinterização e com seus conectores e lamínulas de vidro fixados (com resina epóxi e cola tipo superbonder).

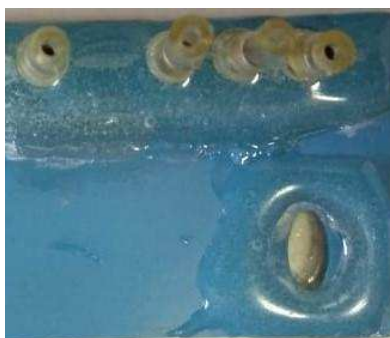


Figura 13: Microdispositivo construído com LTCC com conectores e lamínulas fixados.

4.5. Sistema para aquisição de imagens

Na construção do sistema para a aquisição das imagens, utilizou-se uma caixa com tampa lateral removível e dimensões de aproximadamente 21 cm x 15 cm x 9 cm. A cor interna da caixa é preta, uma vez que esta cor homogeneiza em sua totalidade a radiação eletromagnética na região do visível, resultando em menos reflexos na parte interior e conseqüentemente, melhorando a qualidade das imagens obtidas. O interior do equipamento é totalmente isolado evitando interferências da luminosidade externa.

No sistema de iluminação foram empregadas quatro lâmpadas de LEDs, de luz branca BLUEX 20-100 mA com resistores variáveis ao controle de

intensidade. Essas lâmpadas foram fixadas na parte superior interna e um sistema elétrico foi acoplado a uma fonte externa de energia conectado aos LEDs a fim de evitar picos de intensidade da luz. É importante destacar que uma fonte elétrica uma bateria não foi utilizada para evitar descarregamento de carga.

A distância entre cada um dos LEDs foi a mesma, com o intuito de tornar a iluminação dentro do microdispositivo a mais homogênea possível.

Para o monitoramento em tempo real da reação no microdispositivo utilizando-se o smartphone, foi feita uma abertura circular na parte superior da caixa, de forma que o encaixe do *smartphone* fosse adequado e estático, uma vez que o mínimo descolamento do mesmo pode influenciar no valor do RGB medido.

As Figuras 14, 15, 16 e 17 demonstram o equipamento completo, a parte interior com todos os conectores e as partes inferior e superior do sistema construído para a aquisição das imagens.

A Figura 14 apresenta o sistema FIA-LTCC em seu formato completo e pronto para uso, com os tubos de Tygon fixados na bomba peristáltica, os tubos de polietileno em seus respectivos reagentes sendo ligados diretamente ao microdispositivo construído com LTCC, o qual se encontra na parte interior do sistema de aquisição das imagens.

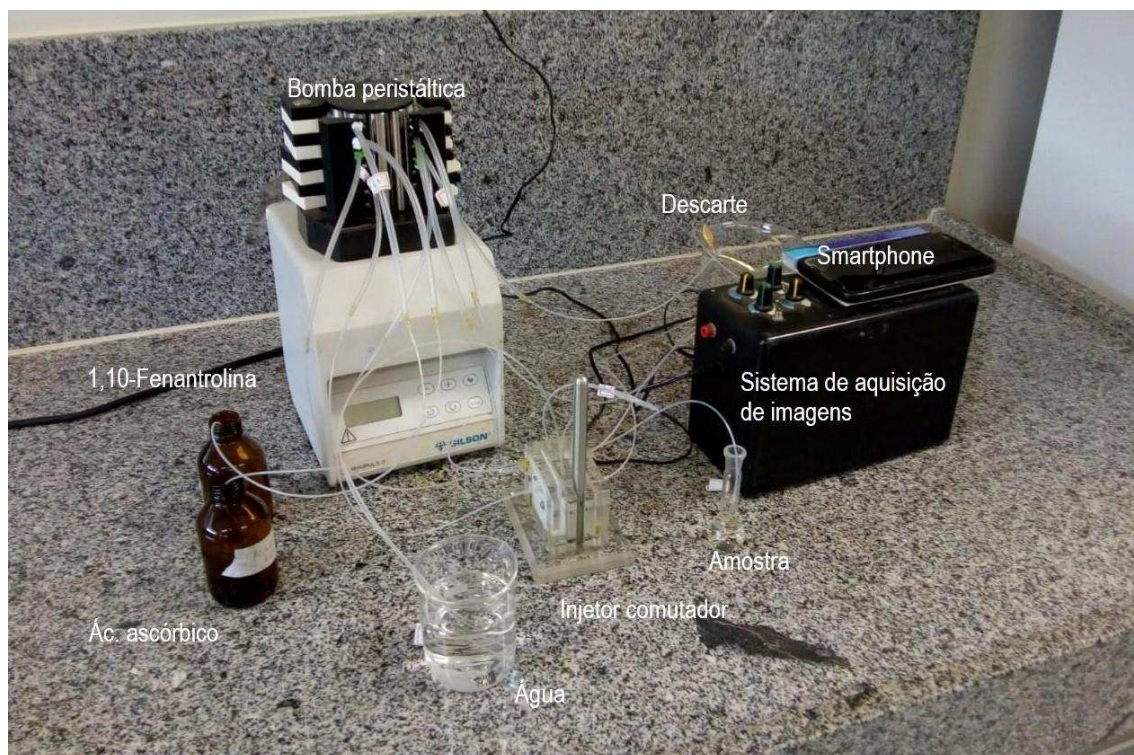


Figura 14: Sistema FIA-LTCC com análise por imagem para a determinação de Fe (II).

A Figura 15 ilustra a parte interior do sistema construído para a aquisição das imagens, onde se encontram as 4 luzes de LEDs, juntamente com a bateria interna (utilizada apenas como suporte) e o suporte para a fixação do LTCC.

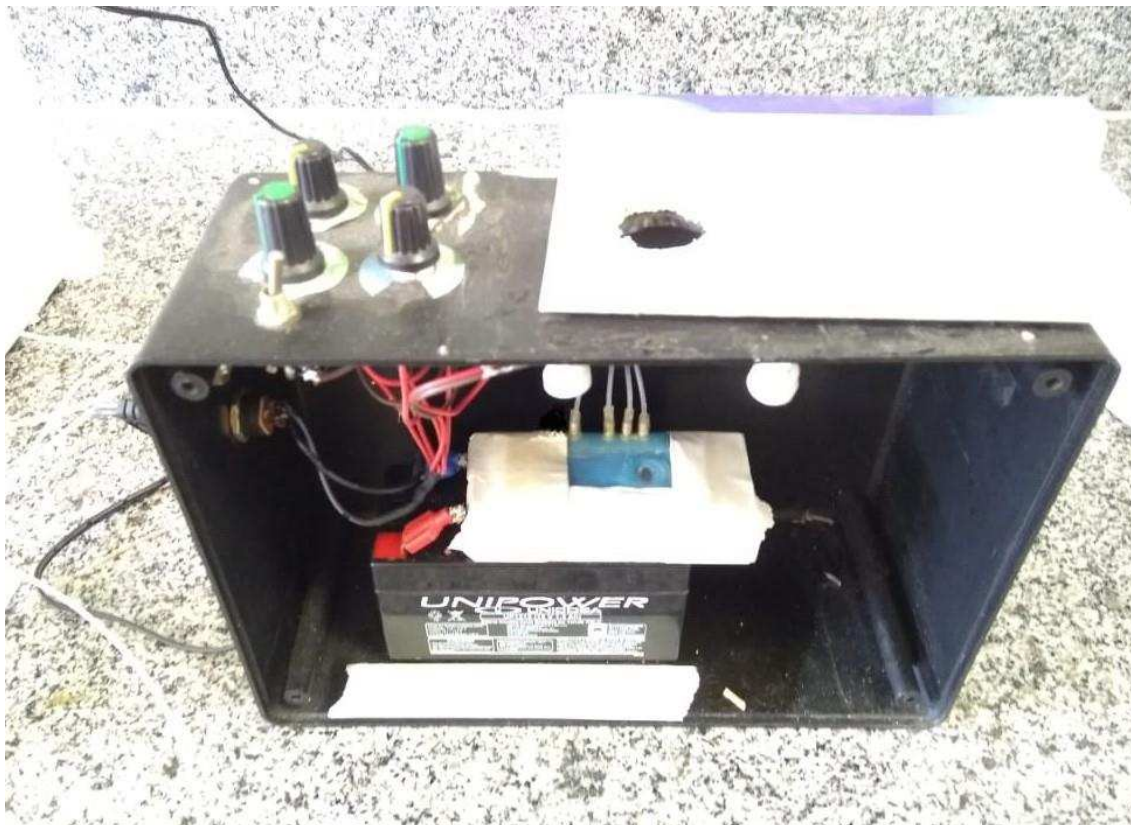


Figura 15: Parte interior do sistema de aquisição de imagens.

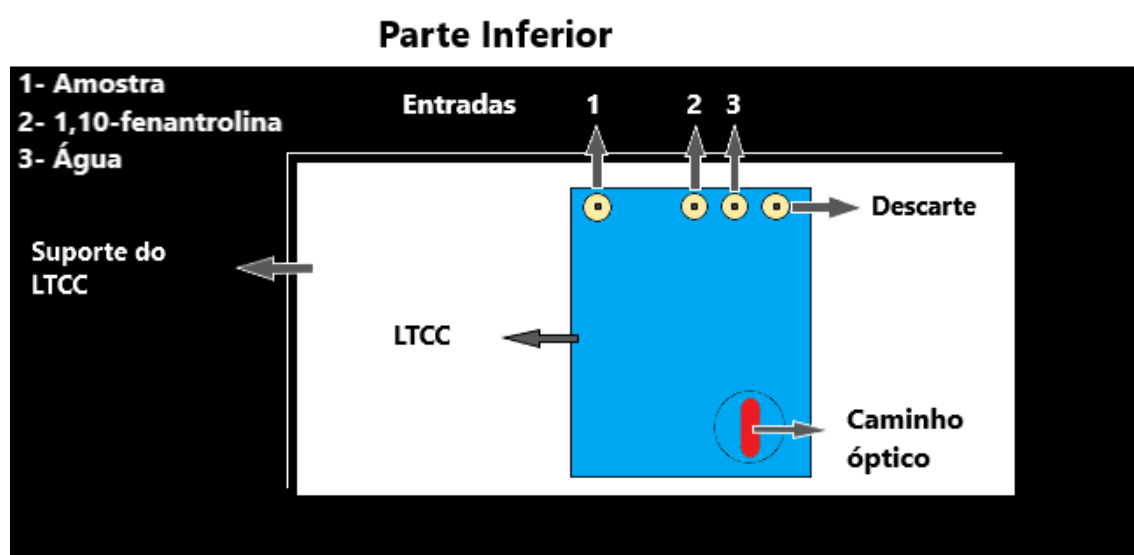


Figura 16: Parte inferior do sistema de aquisição de imagens.

Parte Superior

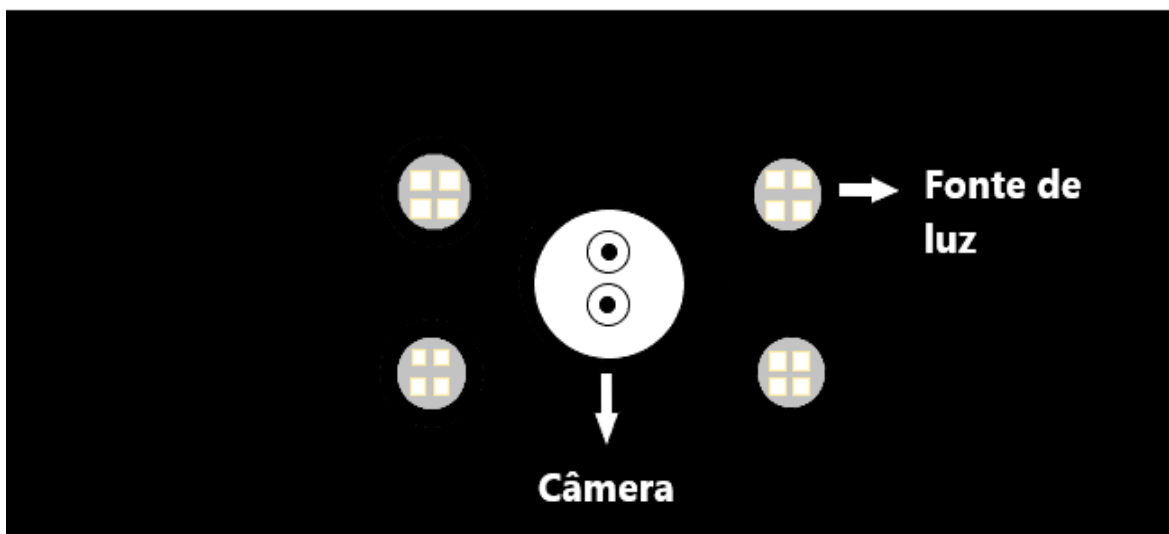


Figura 17: Parte superior do sistema de aquisição das imagens.

4.5.1. Aquisição dos sinais RGB empregando o aplicativo Color Grab

A Figura 18 ilustra as etapas para a utilização do aplicativo e a posterior coleta dos sinais RGB. Primeiramente, o usuário deve se dirigir a opção “Settings”, clicar em “Câmera Right Cell”, selecionar o sistema de cores “RGB” e voltar a tela principal.

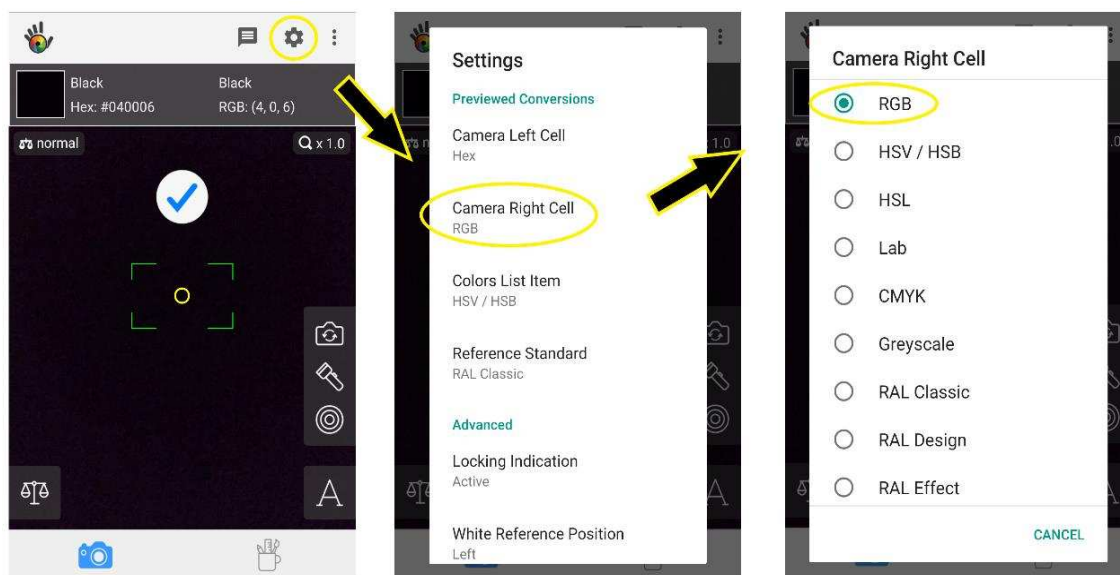


Figura 18: Ilustração das etapas para iniciar a aquisição dos sinais empregando o aplicativo Color Grab.

Após realizar esse procedimento, o aplicativo estará pronto para a coleta dos sinais RGB nas amostras. Inicialmente, constrói-se uma curva de calibração com padrões para a posterior análise das amostras reais; então, os sinais são

medidos em tempo real, posicionando-se a câmera do celular no ponto central do caminho óptico.

Para o procedimento de obtenção da curva de calibração, inicia-se a coleta dos sinais RGB em ordem crescente de concentração de Fe (II). Desde antes da injeção do padrão no sistema FIA até a posterior reação dentro do microdispositivo LTCC, o aplicativo Color Grab mede o valor de referência ou branco da amostra em RGB. Após a injeção do padrão de Fe (II) no sistema, é medida a variação do RGB em relação ao valor de referência, ou seja, o valor do RGB da coloração mais intensa formada pelo complexo.

A partir da construção da curva de calibração, consegue-se analisar as amostras e quantificar os teores de Fe (II) em tempo real.

4.5.2. Preparação do sistema para as análises

A Figura 19 exemplifica o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo na posição de injeção para a determinação de ferro por imagem digital. Esse sistema é baseado na reação de complexação entre 1,10-fenantrolina e o Fe (II), a qual ocorre no interior do microdispositivo.

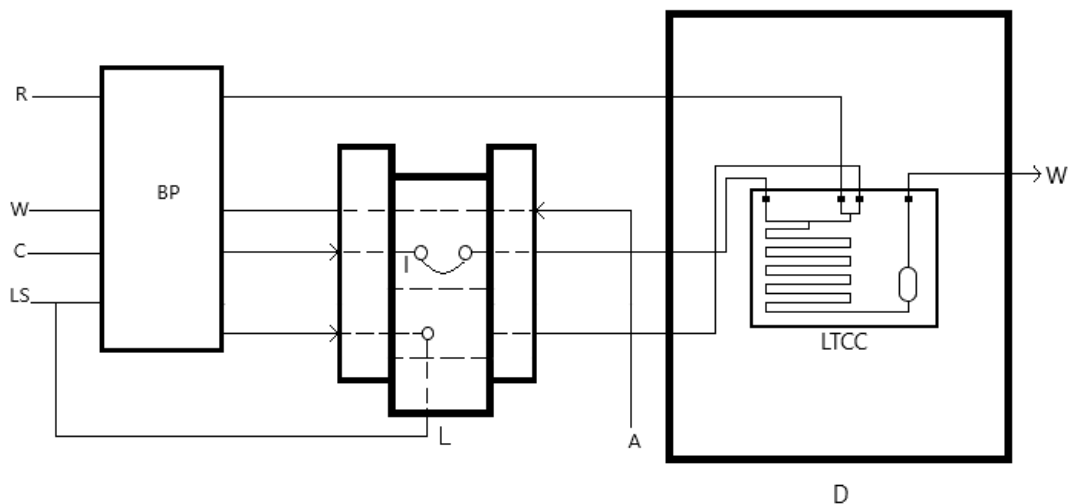


Figura 19: Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de ferro por imagem em amostras fortificadas. As representações são: BP, bomba peristáltica; R, reagente 1,10-fenantrolina ($5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $1,3 \text{ mL min}^{-1}$); W, descarte; C, solução transportadora (ácido ascórbico; $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; $1,3 \text{ mL min}^{-1}$); LS, limpeza do sistema (água deionizada; $0,65 \text{ mL min}^{-1}$); I, alça de amostragem; L, injetor comutador; A, solução de amostra ou solução padrão; D, equipamento de aquisição de imagens; LTCC, microdispositivo construído com cerâmicas verdes.

Inicialmente, as alíquotas das soluções padrão ou amostras foram injetadas na solução transportadora (ácido ascórbico) com o auxílio do injetor comutador. As amostras de alimentos, formulações farmacêuticas ou padrões de sulfato de ferro amoniacal, entram no microdispositivo pela entrada 1 (Figura 16) confluindo em seguida com a solução de 1,10-fenantrolina na entrada 2 (Figura 16), gerando o complexo no percurso analítico no formato de serpentina. O sinal analítico foi monitorado no caminho óptico do microdispositivo por meio de um smartphone usando o aplicativo Color Grab, medindo-se o valor do RGB do branco da amostra e do ponto máximo da reação, onde a coloração característica do complexo formado foi mais intensa possível.

4.6. Estudo do pH

Os valores de pH dos padrões estudados foram 2,00; 3,00; 4,00; 4,50; 5,00; 6,00 e 7,00. Para tal, preparou-se uma série de padrões de Fe (II) na concentração de 2×10^{-4} mol L⁻¹ em balões de 25 mL, e para cada um dos padrões, foi adicionado 1 mL ácido ascórbico como agente redutor para reduzir o Fe (III) a Fe (II) e 1 mL de tampão ácido acético/acetato. Posteriormente, foi utilizado HCl ou NaOH 0,1 mol L⁻¹ para alcançar o pH desejável. Em seguida, após homogeneização, os padrões foram injetados ao sistema individualmente por meio do injetor comutador. O ácido ascórbico foi utilizado como solução transportadora a fim de garantir que todo ferro fosse mantido no estado de oxidação +2.

4.7. Planejamento experimental

Para a quantificação de ferro em matrizes alimentares fortificadas e farmacêuticas empregando um sistema FIA acoplado ao microdispositivo analítico construído com LTCC, utilizou-se 1,10-fenantrolina como reagente para a formação do complexo com o ferro. Empregou-se um planejamento experimental para otimizar algumas variáveis necessárias para conseguir um sistema eficiente na quantificação de Fe (II).

O emprego de planejamentos experimentais é bastante apropriado para definir as condições reacionais consideradas ótimas, assim como o local de melhor resposta analítica, permitindo a exploração de 2 a 5 níveis de algumas

variáveis envolvidas no processo de análise com um número reduzido de experimentos.

Portanto, para estudar as melhores condições reacionais da reação proposta foi utilizado o planejamento experimental Box-Behnken em 3 níveis (-1, 0, +1). As seguintes variáveis foram estudadas:

- 1- Concentração da fenantrolina
- 2- Comprimento da alça de amostragem
- 3- Vazão da fenantrolina
- 4- Vazão do ácido carregador

O planejamento experimental foi realizado utilizando um sistema de análise em fluxo acoplado ao microdispositivo analítico construído com LTCC. Todos os fatores com seus respectivos níveis estão descritos na Tabela 4.

Tabela 5: Fatores com seus níveis para a otimização da reação Fe (II) com a 1,10-fenantrolina utilizando o planejamento Box-Behnken.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
[1,10-fenantrolina] (mol L ⁻¹)	5,0 x 10 ⁻³	7,0 x 10 ⁻³	9,0 x 10 ⁻³
Comprimento da Alça de amostragem (cm)	10	30	50
Vazão da 1,10- fenantrolina (mL/min)	0,30	0,65	1,3
Vazão do carregador (mL/min)	0,30	0,65	1,3

5. Resultados e discussões

5.1. Efeito do pH

Antes de realização do planejamento experimental, investigou-se o efeito do pH do padrão de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado na resposta analítica, variando-se o pH de 2,00 a 7,00. Dentre os canais monitorados do modelo de cores RGB, o canal B apresentou melhor resposta analítica. Ademais, a partir da relação logarítmica $-\log(I/I_0)$, onde I se refere aos valores obtidos no canal B da reação colorimétrica e I_0 é o valor do branco^{86,87}, foi calculado o valor de B em absorbância.

Experimentalmente, como pode ser observado na Figura 20, a resposta analítica em valores de absorbância, foi aumentando à medida que o pH aumentava, tendo seu pico de absorção máxima em pH 4,50 ($\pm 0,10$). O sistema FIA-LTCC depende da eficiência do agente redutor. Portanto, foi adicionado 1 mL de ácido ascórbico em excesso no padrão para garantir que todo ferro fosse mantido no estado de oxidação +2.

O estudo do efeito do pH na resposta analítica foi feito de forma isolada, uma vez que a reação entre ferro e 1,10-fenantrolina foi largamente estudada. Diversos artigos científicos encontrados na literatura relatam o pH ideal da reação em questão, por este motivo, não foi necessária a inclusão deste estudo no planejamento experimental realizado. Por outro lado, um fator determinante para a inclusão desse estudo, foi a necessidade de realizar um planejamento para cada pH, ao todo foram realizados 27 experimentos distintos.

O pH influi na reação de forma significativa, uma vez que em valores de pH muito ácidos, a espécie desprotonada da 1,10-fenantrolina pode não estar disponível em uma concentração ideal, diminuindo a concentração do complexo com Fe (II). Em valores de pH mais altos, pode ocorrer a formação de hidróxidos de ferro, conferindo uma coloração amarelada e interferindo na resposta analítica⁸⁵. Desta forma, para a reação no sistema FIA-LTCC com detecção por imagem, foi fixado um pH ideal de 4,50 utilizando-se o tampão acetato.

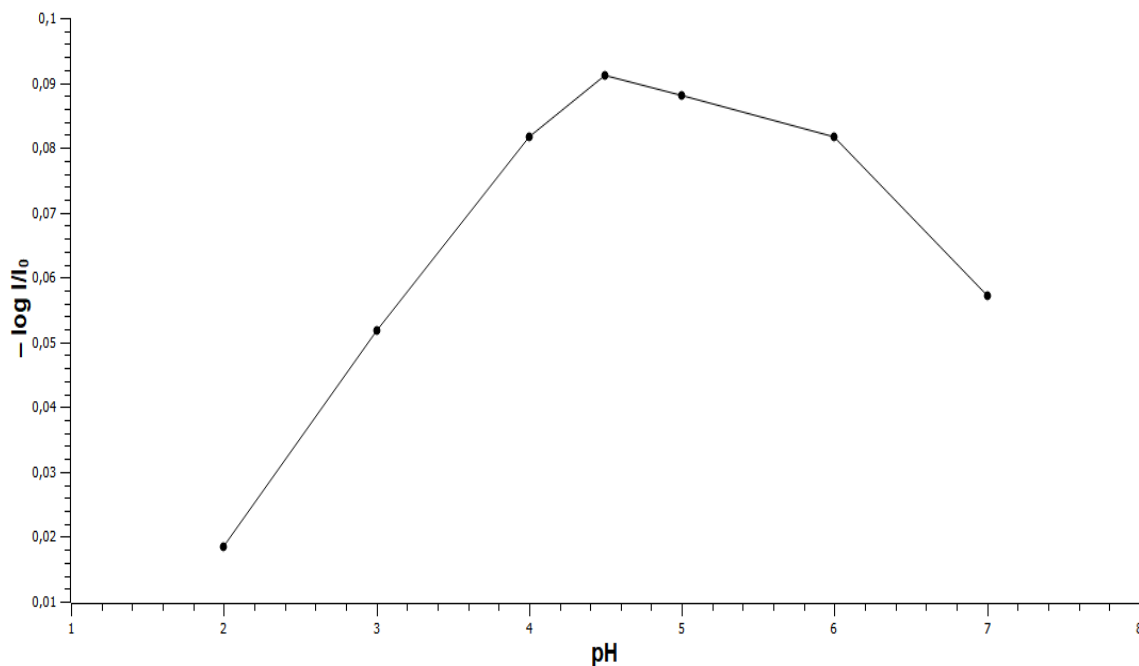


Figura 20: Influência do pH na resposta analítica.

5.2. Planejamento experimental

No processo de otimização foram realizados estudos objetivando as melhores condições experimentais para o método proposto, foram eles: concentração de fenantrolina, tamanho da alça de amostragem, vazão da fenantrolina e vazão de ácido ascórbico. O planejamento Box-Behnken foi empregado com o intuito de obter o modelo que mais se ajustasse a este processo, bem como as interações entre variáveis independentes e de resposta para a obtenção do melhor rendimento.

A equação de previsão para a otimização da reação no sistema FIA é apresentada a seguir, onde Y é o valor da absorbância obtida por meios dos sinais do canal B (Blue) monitorado, A é a concentração de fenantrolina, B é o tamanho da alça de amostragem, C é a vazão da fenantrolina e D é a vazão do ácido ascórbico. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3).

$$Y = 0,038198 + 0,002512 A - 0,009216 A^2 + 0,014777 B + 0,000932 B^2 + 0,000251 C - 0,002735 C^2 - 0,000250 D - 0,002622 D^2 - 0,001837 AB - 0,007991 AC - 0,000042 AD + 0,005507 BC - 0,001946 BD + 0,008926 CD$$

A significância dos efeitos relacionados as variáveis estudadas foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA). Para cada uma das respostas, utilizou-se o p-valor e F-Valor para verificar os efeitos. O p-valor, também denominado nível descritivo ou probabilidade de significância, indica

uma variável significativa a valores menores que 0,05 com um nível de confiança de 95%. Para F-valor, uma medida maior é mais positiva, pois indica que os quadrados médios do modelo são maiores que o quadrados médios residuais; consequentemente, o valor de p para a ANOVA mais significativo.

Portanto, de acordo com a tabela abaixo, observa-se que o fator quadrático para a concentração de fenantrolina, o fator linear para o tamanho da alça de amostragem, as interações lineares entre concentração de fenantrolina, a vazão de fenantrolina, bem como vazão de fenantrolina e a vazão de ácido ascórbico, apresentaram valores significativos, destacados em vermelho na Tabela 6.

Tabela 6: Variáveis avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA).

Fatores	SQ	GL	QM	F-valor	p-valor
A	0,000110	1	0,000110	1,53835	0,238568
A ²	0,002038	1	0,002038	28,54002	0,000176
B	0,003801	1	0,003801	53,21800	0,000010
B ²	0,000021	1	0,000021	0,29203	0,598811
C	0,000001	1	0,000001	0,01564	0,902534
C ²	0,000174	1	0,000174	2,44049	0,144213
D	0,000001	1	0,000001	0,01551	0,902936
D ²	0,000160	1	0,000160	2,24353	0,160010
AB	0,000035	1	0,000035	0,48470	0,499566
AC	0,000675	1	0,000675	9,44552	0,009656
AD	0,000000	1	0,000000	0,00026	0,987332
BC	0,000320	1	0,000320	4,48659	0,055717
BD	0,000040	1	0,000040	0,56040	0,468518
CD	0,000867	1	0,000867	12,14068	0,004510
ERRO	0,000857	12	0,000071		

TOTAL	0,009475	26
SQ		

A Tabela 6 apresentou um coeficiente de correlação com valor $r^2 = 0,90955$, um valor aceitável para um planejamento experimental, além de um indicativo de boa correlação dos valores obtidos.

É possível notar por meio da tabela ANOVA que as vazões para fenantrolina e ácido ascórbico não foram significativas para os fatores lineares e nem mesmo para os fatores quadráticos, indicando que as vazões utilizadas não influenciam na resposta analítica.

A distribuição de resíduos do modelo em relação ao número de experimentos está presente na Figura 21. Como podemos observar, a distribuição dos resíduos é aleatória, ou seja, o resíduo não apresenta estrutura. No que diz respeito a distribuição dos resíduos, a aleatoriedade dos pontos é um requisito imprescindível para a confirmação da adequação do modelo matemático aos dados experimentais observados.

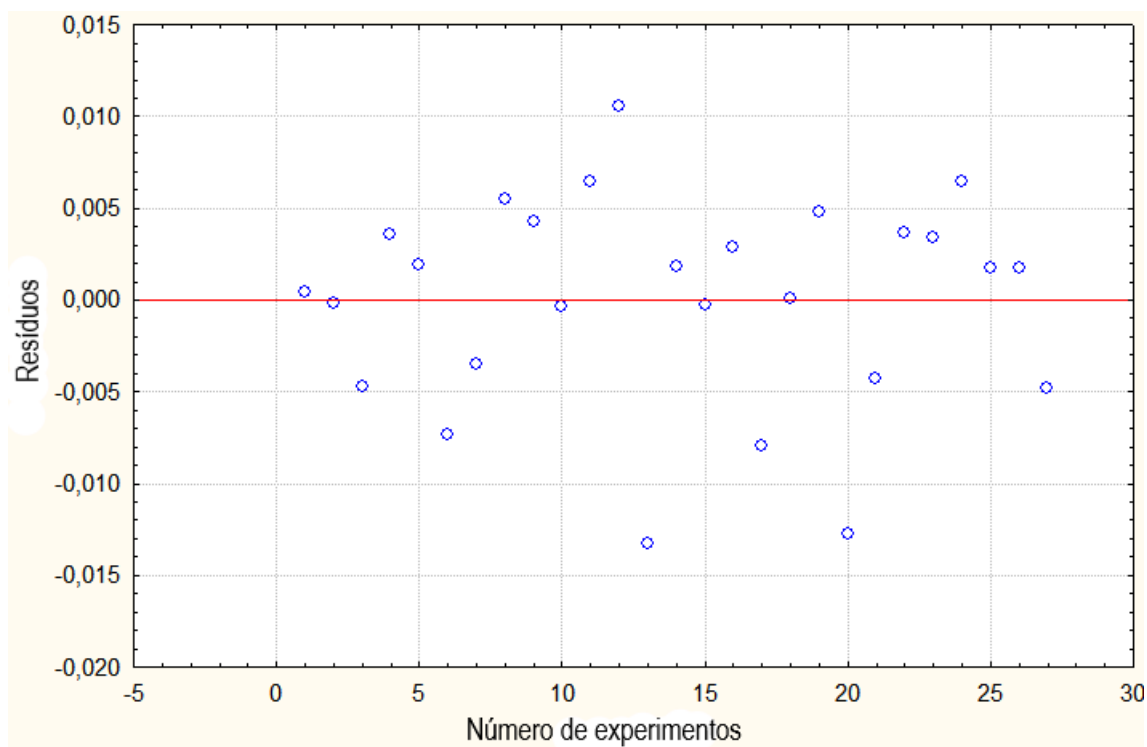


Figura 21: Distribuição de resíduos do modelo em relação ao número de experimentos

Na Figura 22, observa-se a relação entre os valores preditos gerados pelo modelo e os valores obtidos experimentalmente. É possível notar que os pontos

caem em torno da reta criada pelo modelo, o que indica uma boa relação entre estes valores.

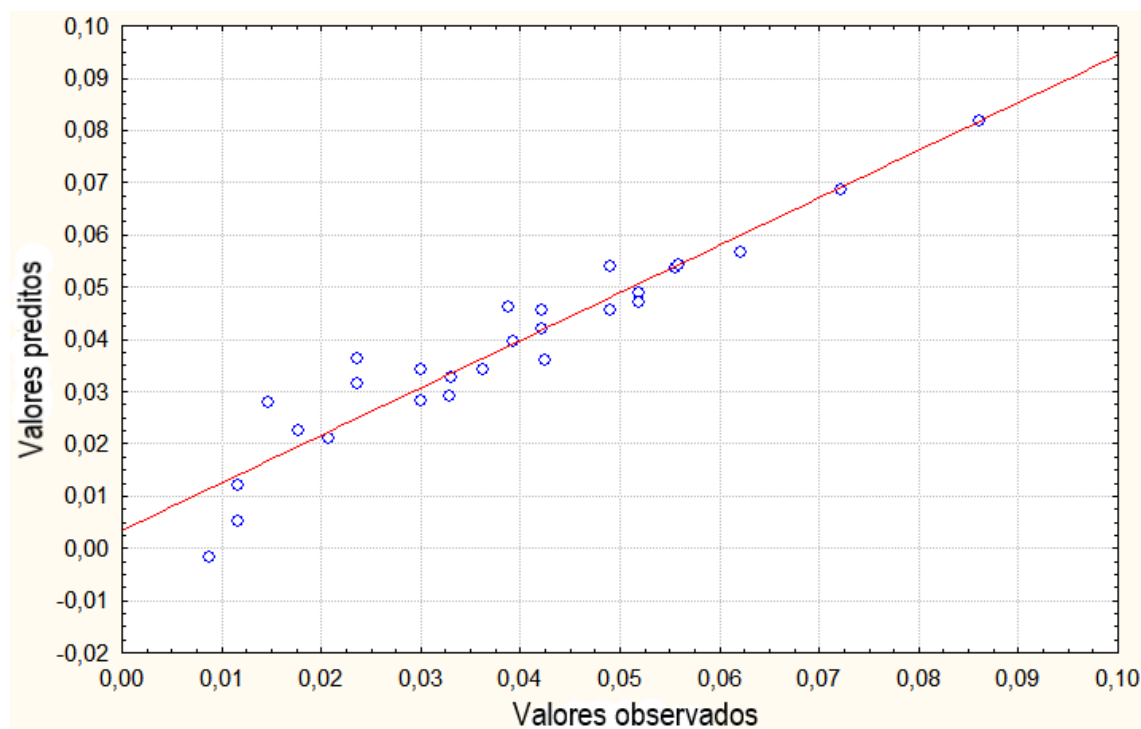


Figura 22: Relação entre os valores preditos gerados pelo modelo e os valores observados obtidos experimentalmente.

Outra forma de representar graficamente os resultados obtidos pela ANOVA é a partir do gráfico de pareto, expresso na Figura 23. Os valores da direita $p=0,05$ (linha tracejada em vermelho) indicam quais fatores foram significativos a um nível de confiança de 95%.

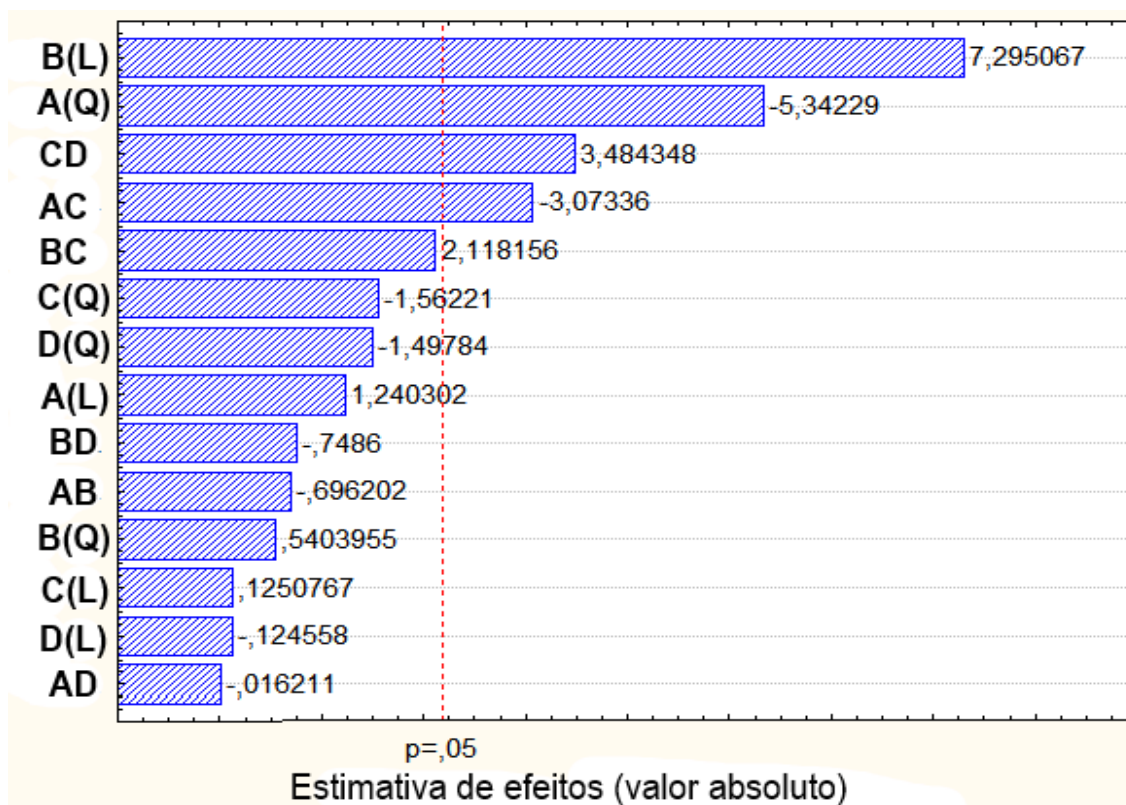


Figura 23: Gráfico de Pareto, obtido para o planejamento Box-Behnken.

Vale destacar que o complexo ferro-1,10-fenantrolina forma uma cor característica vermelhado-alaranjado. Diante disso, dentre os canais monitorados, o canal B (Azul) foi o que obteve maior sensibilidade a resposta analítica. Assim, à medida que a reação colorimétrica formava uma cor mais intensa, observou-se valores menores para o canal B, uma vez que o valor de 0 relaciona-se a absorção máxima do canal correspondente. Portanto, quanto mais intenso for a cor proveniente da reação, menor será o valor do sinal obtido pelo monitoramento do canal B.

Desta forma, por meio dos gráficos de superfície de resposta apresentados abaixo, pode-se analisar quais os pontos ótimos de resposta analítica para a formação do complexo.

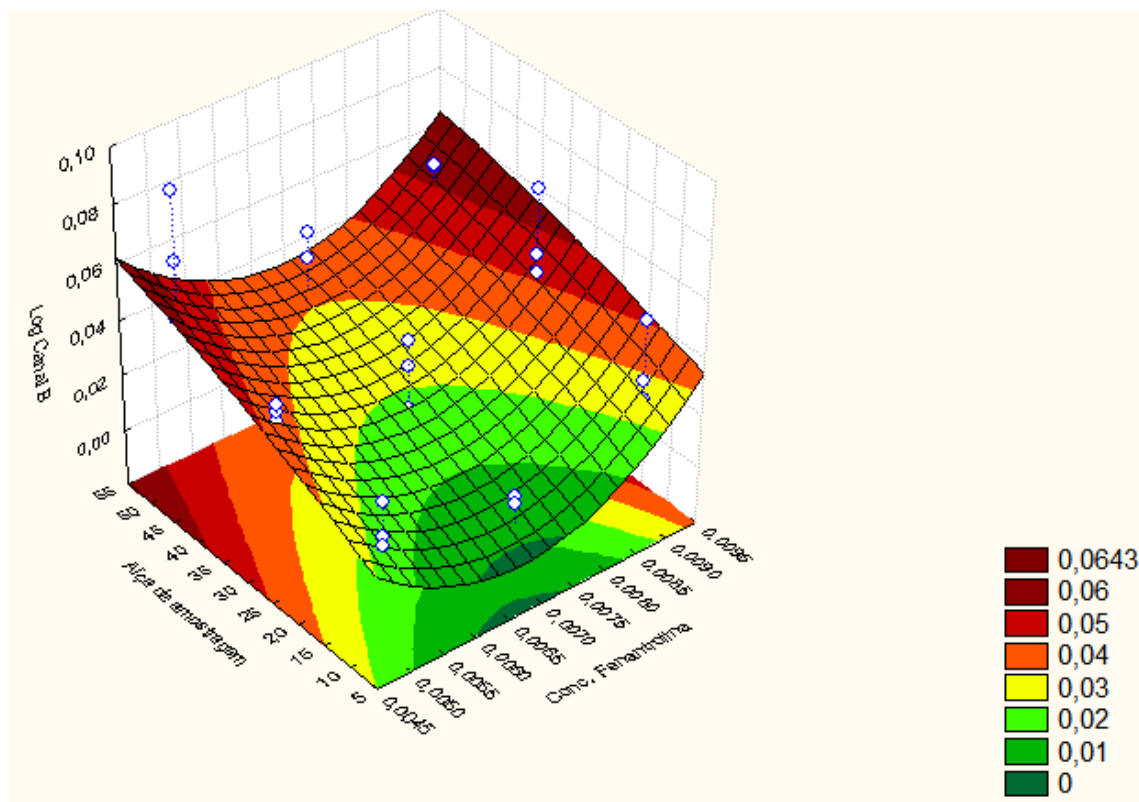


Figura 24: Gráfico da superfície de resposta que representa a interação significativa entre a concentração de fenantrolina e o tamanho da alça de amostragem.

Com base na Figura 24, é possível notar que o gráfico de superfície de resposta obtido através do planejamento experimental, representa a interação significativa entre a concentração de fenantrolina e o tamanho da alça de amostragem. Observa-se ainda que o tamanho da alça de amostragem afeta diretamente a magnitude da resposta analítica obtida pelo equipamento, indicando que a alça de 50 cm, que contém um volume de 250 μL , gera uma resposta satisfatória em relação aos outros tamanhos, devido a maior quantidade de padrão disponível.

Para a fenantrolina, as concentrações de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ proporcionaram boa interação com a alça de 50 cm, facilitando a obtenção de melhores respostas analíticas. Considerando que cada íon ferroso necessita de 3 moléculas de fenantrolina para a formação do complexo avermelhado, a concentração de $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do reagente cromogênio supriria a demanda reacional de Fe (II) para uma resposta satisfatória, uma vez que no processo de otimização, a concentração máxima de interesse da curva de trabalho para íons é Fe (II) foi de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Assim, haveria reagente suficiente para a

determinação do analito nas amostras e em padrões para a construção da curva analítica.

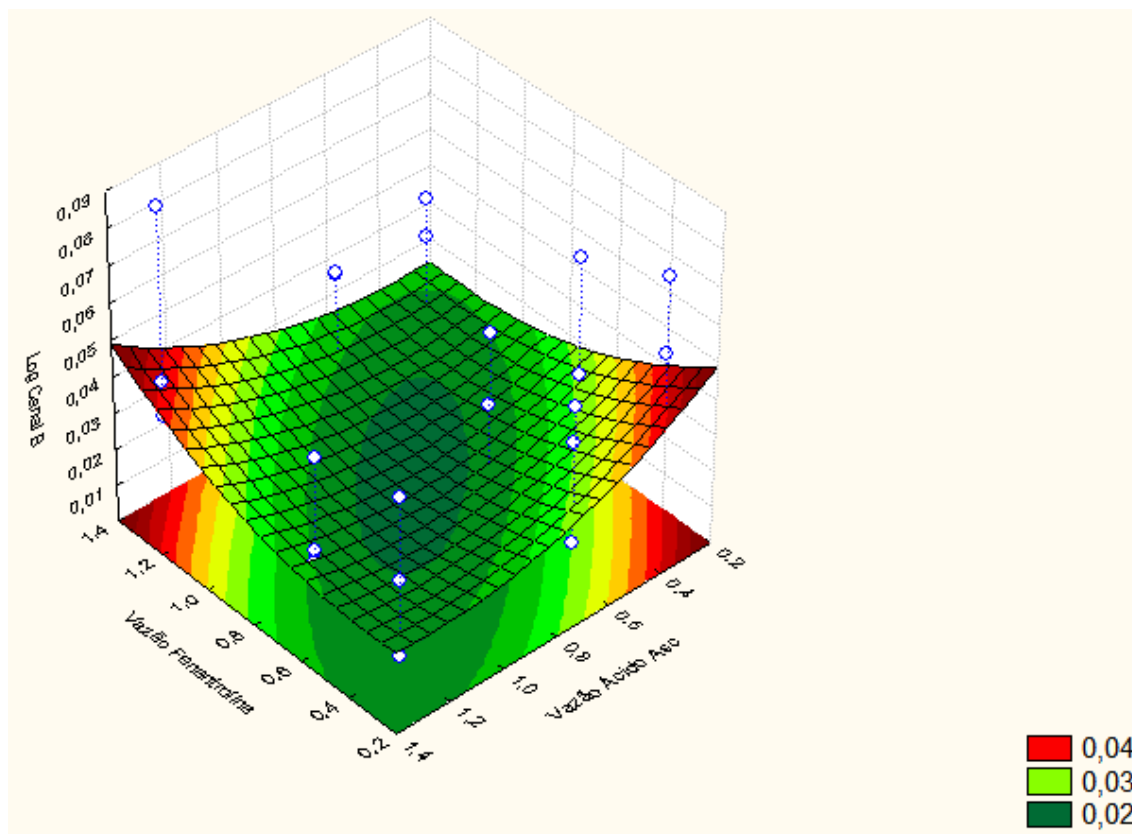


Figura 25: Gráfico da superfície de resposta que representa a interação significativa entre a vazão de fenantrolina e a vazão de ácido ascórbico.

Como pode ser observado na Figura 25, há uma interação significativa entre a vazão da 1,10-fenantrolina e a vazão de ácido ascórbico, utilizado como solução transportadora. Assim, maiores e menores vazões, $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ e $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ respectivamente, tanto para 1,10-fenantrolina como para ácido ascórbico, proporcionaram uma maior resposta analítica. Vale destacar que o aumento da vazão tem como consequência um aumento de volume no microdispositivo. A fim de se obter uma maior frequência analítica, a vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ tanto para a 1,10-fenantrolina quanto para o ácido ascórbico seria o ideal, visto que quanto maior a frequência analítica mais rápida será a obtenção do sinal analítico.

Deste modo, com os resultados obtidos por meio do planejamento experimental Box-Behnker, foi possível determinar as condições ótimas para a formação do complexo ferro-1,10-fenantrolina no método desenvolvido. As

condições reacionais ótimas para os fatores utilizados são indicadas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições reacionais ótimas dos fatores utilizados.

Fator	Condições reacionais ótimas
Concentração de 1,10-fenantrolina	$5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Tamanho da alça de amostragem	50 cm
Vazão de 1,10-fenantrolina	$1,3 \text{ mL min}^{-1}$
Vazão de ácido ascórbico	$1,3 \text{ mL min}^{-1}$

5.3. Figuras de mérito na validação do método otimizado

A fim de avaliar a metodologia analítica desenvolvida para a determinação quantitativa de Fe (II), as figuras de mérito especificadas na literatura foram estudadas com base na seletividade, efeitos de matriz, faixa linear da reação em questão e a capacidade do método para detecção e quantificação do analito estudado.

5.4. Avaliação da linearidade

Utilizando o aplicativo *Color Grab* de *smartphone* para a aquisição e decomposição das imagens em um modelo de cores RGB, foi possível obter os dados correspondentes aos diversos níveis de cores em relação aos pontos de construção da curva analítica. Estes dados foram coletados e posteriormente construiu-se a curva analítica por meio do *software* SciDAVis, ou seja, um programa de computador de código aberto e uma multiplataforma para plotagem interativa de gráficos e análises de dados científicos. A cor resultante após a reação colorimétrica pode ser uma mistura de cores, o que conseqüentemente levaria ao emprego de qualquer canal para as análises. Desta forma, foram monitorados os três canais R, G e B, a fim de concluir qual deles apresentaria a melhor resposta analítica. Portanto, diante das replicatas testadas, o canal B foi o que apresentou melhor resposta.

Para o sistema FIA, no qual foi acoplado o microdispositivo analítico, foram preparadas oito soluções padrão distintas com concentrações de 5×10^{-5} ; 7×10^{-5} ; 9×10^{-5} ; 2×10^{-4} ; 4×10^{-4} ; 6×10^{-4} ; 8×10^{-4} ; $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$,

respectivamente, com faixa de 5×10^{-5} a 1×10^{-3} mol L⁻¹ correspondente ao intervalo de concentração no qual a curva analítica foi linear. As soluções padrão foram injetadas no sistema FIA-LTCC por meio do injetor comutador, e após a coleta dos dados em modelo RGB utilizando o *smartphone* contendo o aplicativo *Color Grab*, construiu-se a curva analítica e a linearização dos valores do canal B, valores já transformados em absorvância pela relação logarítmica $-\log(I/I_0)$.

A equação de regressão linear obtida é expressa por: $y = 643,77x - 0,0208$, onde “y” é a absorvância e “x” a concentração de Fe (II) em mol L⁻¹. A Figura 26 representa a curva analítica obtida empregando o sistema FIA-LTCC.

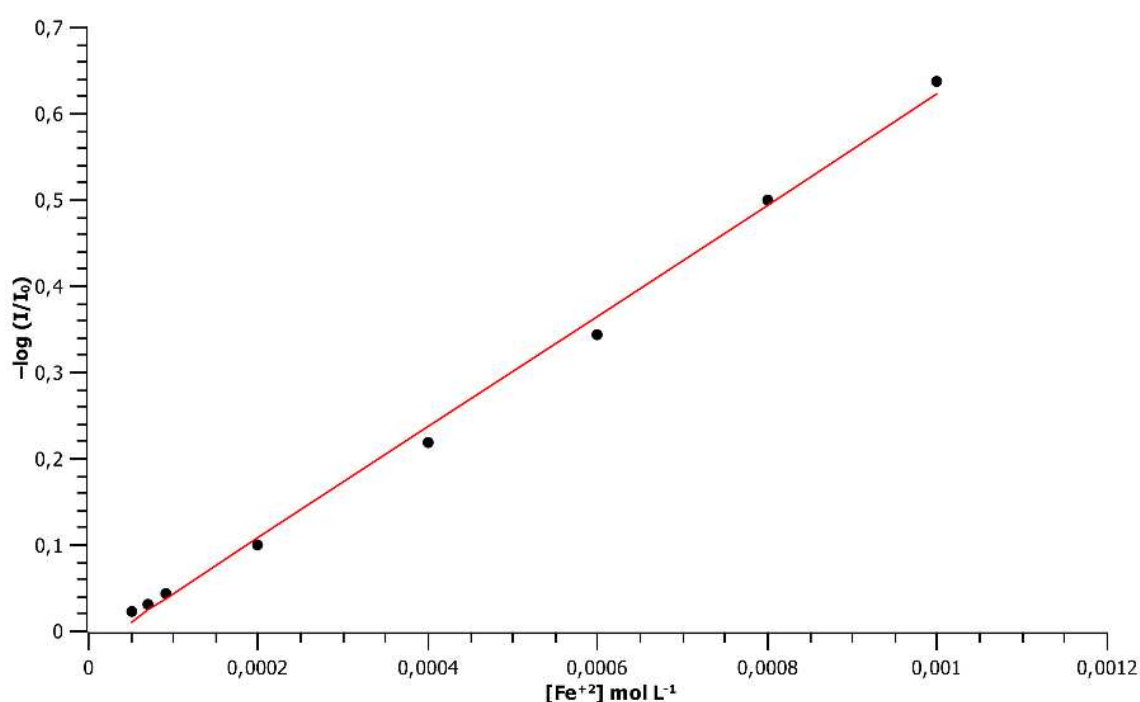


Figura 26: Curva analítica para determinação de Fe (II) empregando o sistema FIA-LTCC.

A curva expressa uma boa linearidade com coeficiente de correlação r^2 igual a 0,9964, de acordo com as normas da ANVISA⁷⁹, as quais determinam um coeficiente superior a 0,990. Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados por meio das equações 1 e 2, obtendo-se as concentrações de $5,38 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,79 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente.

5.5. Avaliação da precisão dos sinais analíticos e frequência de amostragem

Foi estudada a precisão do método desenvolvido por meio do emprego de concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Fe (II) e análise do sinal do canal B (Figura 27).

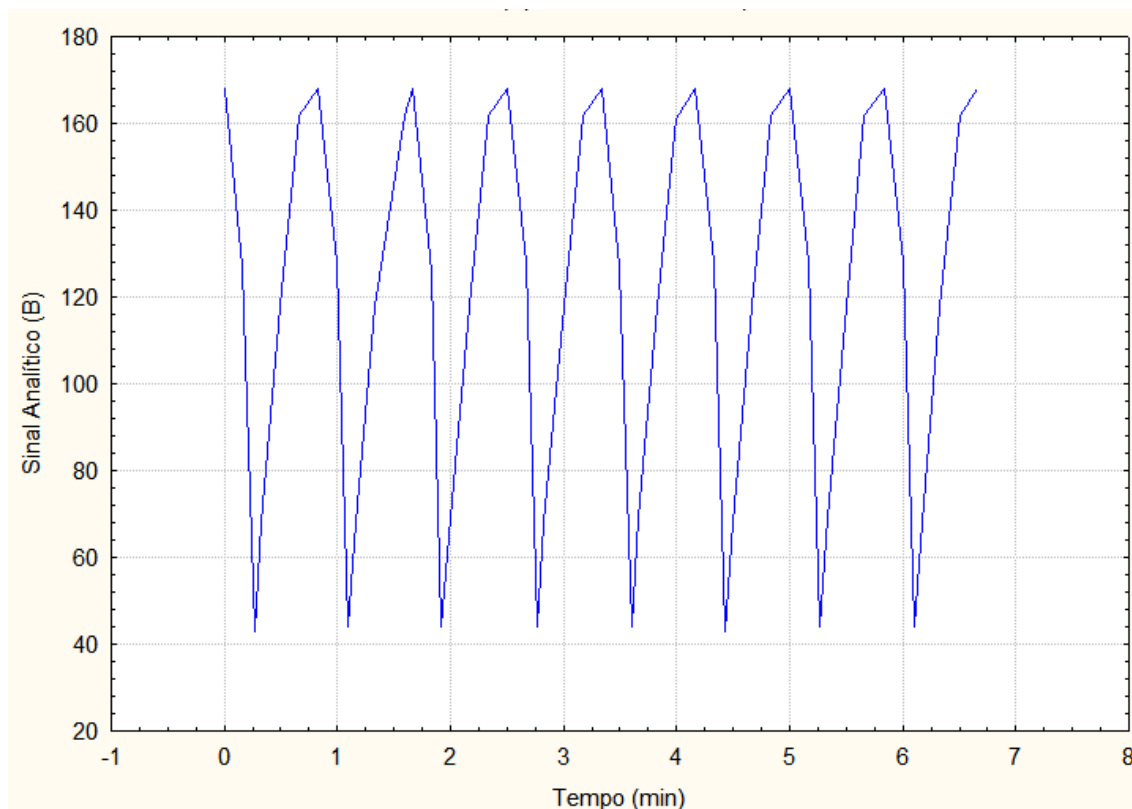


Figura 27: Estudo da precisão do método desenvolvido para a concentração de Fe (II) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Após o acionamento do sistema em fluxo, o sinal foi monitorado durante 7 minutos para testar a estabilidade das medidas, visto que são necessários 16 segundos para atingir a coloração mais intensa na concentração e 50 segundos para uma análise completa. Como pode ser observado na Figura 27, os picos mínimos correspondem a coloração vermelha alaranjada mais intensa e os picos máximos, correspondem ao branco ou linha de base. Obteve-se um coeficiente de variação inferior a 2% para a concentração aplicada. De acordo com Brito et al⁸⁸, são aceitos coeficientes de variação de 5,6% a 16% para níveis de concentração que variam na ordem de 10^{-3} a 10^{-6} . Desta forma, os valores obtidos indicam boa estabilidade das medições.

A frequência de amostragem na quantificação de Fe (II) para o sistema FIA-LTCC foi de 72 determinações por hora.

5.6. Avaliação da seletividade do método

A seletividade do método proposto para a determinação de Fe (II) foi testada estudando-se os efeitos da presença de possíveis interferentes comumente encontrados nas amostras de cereal matinal e formulações farmacêuticas. Os possíveis interferentes foram estudados nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100 analito/interferente. Para este estudo, foi empregada uma solução padrão de Fe (II) com concentração de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 8: Efeito de possíveis interferentes na determinação de Fe (II) ($n=3$).

Interferente	Proporção Fe (II)/ Interferente	Erro relativo (%)
Frutose	1:1	3,98
	1:10	6,03
	1:100	0,10
Glicose	1:1	3,97
	1:10	5,39
	1:100	4,54
Na (I)	1:1	-2,65
	1:10	-8,52
	1:100	-68,57
Zn (II)	1:1	-2,30
	1:10	-65,18
	1:100	-110,54
Cu (II)	1:1	-20,94
	1:10	-25,91
	1:100	-64,91
Cr (III)	1:1	-6,86
	1:10	-42,74

	1:100	-66,84
Glicerol	1:1	-2,14
	1:10	-3,02
	1:100	-4,76
Ácido Cítrico	1:1	-9,34
	1:10	-29,99
	1:100	-35,62
Sacarina	1:1	-4,24
	1:10	-5,12
	1:100	-8,60

Com base nos resultados apresentados na Tabela 8, podemos constatar que os cátions Na (I) na proporção de 1:100, Zn (II) nas proporções 1:10 e 1:100, Cr (III) nas proporções 1:10 e 1:100 e Cu (II) em todas as proporções apresentaram interferência. A possível interferência do Na (I) na proporção de 1:100 se deve ao fato de que com o aumento da força iônica do meio, ocorre um efeito de blindagem, diminuindo assim a atração entre o cátion Fe (II) e a espécie desprotonada da 1,10-fenantrolina e consequentemente, interferindo no sinal analítico. Porém, o teor de Na (I) presente nas amostras de cereal matinal encontra-se muito abaixo da proporção capaz de gerar interferência empregando a reação proposta. O cátion Zn (II) possui uma concentração significativamente inferior à de Fe (II) nas amostras de cereal matinal, e de acordo com os fabricantes, não há Cr (III) e tampouco Cu (II) na composição desses cereais.

Segundo Cambuim⁸⁹, no que diz respeito as amostras de cereais matinais e os possíveis interferentes estudados, cádmio, mercúrio e zinco podem formar complexos incolores solúveis com a 1,10-fenantrolina. Portanto, podem interferir na formação do complexo diminuindo a intensidade da coloração produzida. Porém, apenas o zinco está presente em uma concentração baixa, não gerando interferência no sinal analítico. O cromo presente em concentrações 10 vezes superior à de ferro e o cobre em concentrações acima de 5 mg L⁻¹ também

interferiram no sinal analítico, enquanto os cátions não estavam presentes na composição nutricional dessas amostras. Glicose e frutose, os açúcares presentes, não apresentaram interferências significativas em nenhuma das proporções analisadas.

Glicerol, ácido cítrico e sacarina são excipientes presentes nas formulações farmacêuticas. De acordo com a análise de possíveis interferentes, apenas o ácido cítrico nas proporções 1:10 e 1:100 causou interferência no sinal analítico. Esta interferência ocorreu devido a formação de complexos entre o citrato e o Fe (II), porém como o teor de ácido cítrico nas formulações é baixo, estas puderam ser analisadas sem interferência significativa.

Estudos realizados por Tesfaldet⁹⁰ empregando análise por injeção sequencial (SIA) na determinação de Fe (II) em multivitamínicos mostraram que o zinco, um dos metais em quantidades apreciáveis neste tipo de formulação farmacêutica, apresentou interferência significativa em proporções acima de 1:7 Fe (II).

Portanto, os possíveis interferentes testados para a determinação de Fe (II) empregando 1,10-fenantrolina foram significativos apenas em proporções muito superiores em relação a quantidade de Fe (II) presente nas amostras, tanto alimentares quanto farmacêuticas. Por fim, cabe ressaltar que a maioria dos interferentes estão presentes em quantidades inferiores aos investigados neste estudo.

5.7. Teste de recuperação

O teste de recuperação foi realizado com o intuito de avaliar possíveis efeitos de matrizes prejudiciais as análises. Três diferentes concentrações de Fe (II), $4,00 \times 10^{-5}$, $3,50 \times 10^{-4}$ e $9,50 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, foram adicionadas a quatro amostras comerciais, duas de sucrilhos (cereal matinal) e duas de formulações farmacêuticas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelas amostras não adicionadas ao padrão. O percentual de recuperação foi calculado por meio da Equação 3.

A Tabela 9 demonstra os resultados obtidos para o estudo da recuperação. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3). As amostras SC₁ e SC₂ são de cereais matinais e as amostras MD₁ e MD₂ são de formulações farmacêuticas.

Tabela 9: Porcentagens de recuperação de Fe (II) obtidas para os três níveis de concentração estudados.

Amostra	Adicionado (mol L ⁻¹)	Encontrado (mol L ⁻¹)	Recuperação (%)
SC ₁	4,00 x 10 ⁻⁵	3,35 x 10 ⁻⁵	83,78
	3,50 x 10 ⁻⁴	3,03 x 10 ⁻⁴	86,68
	9,50 x 10 ⁻⁴	9,72 x 10 ⁻⁴	102,36
SC ₂	4,00 x 10 ⁻⁵	3,68 x 10 ⁻⁵	92,04
	3,50 x 10 ⁻⁴	3,05 x 10 ⁻⁴	87,25
	9,50 x 10 ⁻⁴	8,19 x 10 ⁻⁴	86,25
MD ₁	4,00 x 10 ⁻⁵	3,47 x 10 ⁻⁵	86,63
	3,50 x 10 ⁻⁴	2,93 x 10 ⁻⁴	83,78
	9,50 x 10 ⁻⁴	10,24 x 10 ⁻⁴	107,78
MD ₂	4,00 x 10 ⁻⁵	3,31 x 10 ⁻⁵	82,80
	3,50 x 10 ⁻⁴	3,26 x 10 ⁻⁴	93,15
	9,50 x 10 ⁻⁴	10,35 x 10 ⁻⁴	108,96

Como pode ser observado na Tabela 9, os resultados obtidos no teste de recuperação para as quatro amostras variaram de 82,80 a 108,96 %. Os valores obtidos foram comparados aos descritos por Brito *et al*⁸⁸. O autor recomenda que o intervalo de recuperação esteja entre 80% e 110% para níveis de concentração que variam de 10⁻³ a 10⁻⁵, sugerindo dessa forma, a ausência significativa de efeitos de matriz nas amostras analisadas.

5.8. Análise das amostras reais de sucrilhos e formulações farmacêuticas

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de Fe (II) em amostras comerciais de cereal matinal e em formulações farmacêuticas adquiridas respectivamente, em supermercados e farmácias da cidade de Viçosa-MG. Os resultados obtidos pelo método proposto e o método de referência são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Determinação de Fe (II) empregando o método proposto e um método de referência ($n=3$).

Amostra	Valor rotulado	Método proposto	Método de referência ⁹⁶	Erro Relativo (%)
SC ₁	5,6mg/porção 30g	5,500mg	5,870mg	6,30
SC ₂	5,9mg/porção 30g	6,376mg	6,047mg	5,44
MD ₁	25mg/mL	27,425mg	28,480mg	3,70
MD ₂	25mg/mL	26,78mg	28,144mg	4,85

E (%): Erro relativo entre o método proposto e o método de referência.

Considerando os valores rotulados para as quantidades de ferro presente nas amostras, os resultados obtidos na quantificação do analito para o método proposto e método de referência, são próximos, ambos com erros variando de 3,70% a 6,30%. Todavia, é evidente a dificuldade no processo de preparação das amostras alimentares por via úmida, as quais compreendem várias etapas até a sua análise. Portanto, com base nos resultados obtidos, nota-se boa confiabilidade do método FIA-LTCC com detecção por imagem.

Com o propósito de comparar os resultados alcançados através do método proposto e pelo AAS, foi empregado o teste t pareado com 95% de confiabilidade. O teste citado indicou que o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi menor em relação ao $t_{\text{crítico}}$, ($0,0587 < 12,706$) e ($7,82 < 12,706$) para as amostras de cereal matinal e medicamentos, apresentando p-valores de 0,962 (cereal matinal) e 0,0809 (medicamentos). Esse fato implica na inexistência de distinções estatísticas significativas na determinação de Fe (II) em amostras de sucrilhos e medicamentos.

A Tabela 12 demonstra que as características analíticas do procedimento empregando o microdispositivo analítico construído com LTCC e detecção por imagem, podem ser favoravelmente comparados aos procedimentos de

determinação de ferro descritos na literatura, apresentando maior frequência de amostragem^{91, 92, 93}, e limite de detecção^{93, 94, 95} igual ou melhor em relação a alguns artigos de determinação do mesmo analito de interesse.

Tabela 11: Comparação de algumas figuras de mérito obtidas no método proposto e as descritas na literatura.

Referência	Frequência de amostragem (h ⁻¹)	Limite de detecção (mg L ⁻¹)
91	24 amostras	0,18
92	25 amostras	0,3
93	64 amostras	0,08
94	100 amostras	0,5
95	100 amostras	0,97
Método Proposto	72 amostras	0,3

6. Conclusão

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do uso de microdispositivos compactos produzidos a partir de cerâmicas verdes com detecção por imagem e análise por injeção em fluxo para a determinação de ferro em amostras de cereal matinal e em formulações farmacêuticas

A partir do procedimento proposto, os parâmetros de validação avaliados apresentaram resultados satisfatórios ao serem comparados com o método de referência, apresentando erros relativos na faixa de 3,7% a 6,3%, além de serem mais rápidos, uma vez que são possíveis, em média, 72 análises por hora, sem profissional experiente. Apresentam ainda baixo consumo de reagentes, volume de 250 µL de amostra por determinação, gerando poucos resíduos, praticidade e facilidade no monitoramento da reação. Dessa forma, essas vantagens tornam este método simples e de fácil execução para demandas laboratoriais.

O sistema de captura de imagens é de fácil construção e emprega componentes de baixo custo, como por exemplo, os LED's que são peças de pequeno porte utilizados como fonte de luz monocromática. Ademais, o sistema

desenvolvido é versátil, podendo ser empregado como fonte de detecção em diversas outras reações.

No que diz respeito a criação de novas tecnologias de imagens digitais, tanto em termos de *hardware* como *software*, o avanço exponencial possibilitou o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais modernos como *webcams*, *scanners* e *smartphones* equipados com câmeras fotográficas embutidas com resoluções cada vez melhor. Tratam-se de ferramentas imprescindíveis no desenvolvimento de métodos analíticos de baixo custo e fácil construção. Diante disso, o método de análise por imagens permite o uso desses equipamentos gerando uma grande gama de aplicabilidade e potencial para o desenvolvimento de métodos futuros em conjunto com outras técnicas estabelecidas.

O método foi aplicado na análise de amostras comerciais de cereais matinais e formulações farmacêuticas. Todas as amostras analisadas apresentaram teores de ferro próximos aos valores rotulados pelos fabricantes, não sendo encontrado nenhum interferente em potencial para as análises.

Por fim, o sistema desenvolvido pode ser facilmente aplicado para a determinação de outros analitos utilizando detecção por imagem e análise em fluxo.

7. Referências bibliográficas

- 1- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais**. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.
- 2- RODRIGUES, V. C.; MENDES, B. D.; GOZZI, A.; SANDRINI, F.; SANTANA, R. G.; MATIOLI, G. Deficiência de ferro, prevalência de anemia e fatores associados em crianças de creches públicas do oeste do Paraná, Brasil. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 407-420, 2011.
- 3- ANDRE, H. P.; SPERANDIO, N.; SIQUEIRA, R. L.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S. E. Indicadores de insegurança alimentar e nutricional associados à anemia ferropriva em crianças brasileiras: uma revisão sistemática. **Ciência e saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 1159-1167, 2018.

- 4- ZIMMERMANN, M. B., HURRELL, R.F. Nutritional iron deficiency. **Lancet**, v. 11, p. 511–520, 2007.
- 5- SOGLIA, SILVIO LUIZ DE OLIVEIRA. **Enriquecimento de leite tipo C com ferro aminoácido quelato: biodisponibilidade de características físico-químicas e sensoriais**. 1996. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- 6- KOTÁS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 263-283, 2000.
- 7- Reis, B. F.; Giné, M. F.; Kronka, E. M. A análise por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, v. 12, p. 82, 1989.
- 8- ROCHA, F. R. P.; ZAGATTO, E. A. G. Flow analysis the 60 years of Talanta. **Talanta**, v. 206, 2020.
- 9- REIS, B. F. Análise Química por Injeção em Fluxo: Vintes Anos de Desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, p. 51-58, 1996.
- 10- STEWART, K.K. Flow-injection analysis - a review of its early history. **Talanta**, v. 28, p. 789-797, 1981.
- 11- SKEGGS, T. J.; An Automatic Method for Colorimetric Analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, p. 311, 1957.
- 12- RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. Flow injection analysis 1. New concept of fast continuous-flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975.
- 13-REIS, B. F.; GINÉ, M. F. & KRONKA, E. A. M. "A análise por injeção em fluxo contínuo". **Química Nova**, v. 12, p. 82-91, 1989.
- 14-KRUG, F. J.; BERGAMIN, F. H. & ZAGATTO, E. A.G., "Commutation in flow injection analysis ". **Analytica Chimica Acta**, v. 179, p. 103-118, 1986.
- 15-RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. *Flow injection analysis. Chemical Analysis*. **New York**, v. 62, 1988.
- 16-CARRILHO, E.; MIRANDA, C. E. S. M.; GERVASIO, A. P. & GINÉ, M. F. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 412, 2002.

- 17-KRICKA, L. J. Miniaturization of analytical systems. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 2008-2014, 1998.
- 18- COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli et al. Microsistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, p. 1986-2000, 2007.
- 19- MANZ, A.; GRABER, N. & WIDMER, H. M. "Miniaturized total chemical analysis system: a novel concept for chemical sensing". **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 244 - 248, 1990
- 20- MALECHA, K.; REMISZEWSKA, E.; PIJANOWSKA, D. G. Surface modification of low and high temperature co-fired ceramics for enzymatic microreactor fabrication. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 190, p. 873, 2014.
- 21-TERRI, S. C. A Gas Chromatography System Fabricated on a Silicon Wafer Using Integrated Circuit Technology. Stanford, Department of Electrical Engineering. **Tese de doutorado**, Stanford University, 1975.
- 22-TERRI, S. C.; JERMAN, J. H. & ANGEL, J. B. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. **IEEE Trans. Electron. Devices**, v. 26, 1880-1886, 1979.
- 23-MANZ, A.; GRABER, N. & WIDMER, H. M. "Miniaturized total chemical analysis system: a novel concept for chemical sensing". **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 244-248, 1990
- 24-MANZ, A.; MIYAHARA, Y.; MIURA, J.; WATANABE, Y.; MIYAGI, H. & SATO, K. "Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology". **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 249-255, 1990.
- 25- DITTRICH, P. S.; TACHIKAWA, K. & MANZ, A. Micro total analysis. Latest advancements and trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3887-3908, 2006.
- 26- REYES, D.R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.A. & MANZ, A. "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory and technology". **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2623-2636, 2002.
- 27-ÁVILA, M.; GONZALEZ, M.C.; ZOUGAGH, M.; ESCARPA, A.; RIOS, A. Fast single run of vanilla fingerprint markers on microfluidic-

- electrochemistry chip for confirmation of common frauds. **Electrophoresis**, v. 30, p. 3413-3418, 2009.
- 28-HE, D.; ZHANG, Z.; HUANG, Y.; HU, Y. Chemiluminescence microflow injection analysis system on a chip for the determination of nitrite in food. **Food Chemistry**, v. 101, p. 667-672, 2007.
- 29-CARDOSO, T. M.; GARCIA, P. T.; COLTRO, W. K. Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms. **Analytical Methods**, v. 7, 7311–7317, 2015.
- 30-KAMRUZZAMAN, M.; ALAM, A. M.; KIM, K. M.; LEE, S. H.; KIM, Y. H.; KIM, G. M.; DANG, T. D. Microfluidic chip based chemiluminescence detection of L-phenylalanine in pharmaceutical and soft drinks. **Food Chemistry**, v. 135, p. 57-62, 2012.
- 31- JURKÓW, D.; MAEDER, T.; DABROWSKI, A.; ZARNIK, M. S.; BELAVIC, D.; BARTSCH, D. & MULLER, J. Overview on low temperature co-fired ceramic sensors. **Sensors Actuators A**, v. 233, p. 125-146, 2015.
- 32- WANG, F.; ZHANG, W.; CHEN, X.; MAO, H. Synthesis and characterization of low CTE value $\text{La}_2\text{O}_3\text{-B}_2\text{O}_3\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ glass/cordierite composites for LTCC application. **Ceramics International**, v. 45, p. 7203-7209, 2019.
- 33-COUCERO, P. N. T. Microfabricação de um dispositivo de Free Flow Electrophoresis com Tecnologia Low Temperature Co-Fired Ceramics. Lisboa, Departamento de Química. **Dissertação de mestrado**. Universidade Técnica de Lisboa, 2008.
- 34- IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; MARTÍNEZ-CISNEROS, C. S.; VÁLDES, F. & ALONSO, J. Green-tape ceramics. New technological approach for integrating electronics and fluidics in microsystems. **Trends Analytical Chemistry**, v. 27, p. 24-33, 2008.
- 35-LÓPEZ, O.N.B.; FUENTES, H.C.; PEREZGASGA, F.V.; CASILLAS, H.A.M.; CHAMARRO, J.A. Detection and analysis of cobalt in continuous flow using an analytical microsystem based on LTCC technology. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 227, p. 11-16, 2016.
- 36- LLOPIS, XAVIER.; IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; ALEGRET, S. & ALONSO, J. Pesticide determination by enzymatic inhibition and amperometric

- detection in a low temperature cofired ceramics microsystem. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 3662-3666, 2007.
- 37- IBÁÑEZ–GARCÍA, N.; MERCARDER, M. B.; ROCHA, Z. M.; SEABRA, A. C.; GONGORA-RUBIO, M. R. & ALONSO, J. Continuous flow analytical microsystems based on low-temperature co-fired ceramic technology. integrated potentiometric detection based on solvent polymeric ion-selective electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 2985-2992, 2006.
- 38- IBÁÑEZ–GARCÍA, N.; GONÇALVES, R. D. M.; ROCHA, Z. M.; GONGORA-RUBIO, M. R.; SEABRA, A. C. & ALONSO, J. LTCC meso-analytical system for chloride ion determination in drinking waters. **Sensors and Actuators. B: Chemical**, v. 118, p. 67-72, 2006.
- 39- BENEDETTI, L. P. S.; DOS SANTOS, V. B.; SILVA, T. A.; BENEDETTI-FILHO, E.; MARTINS, V. L. & FITIBELLO-FILHO, O. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4138 – 4144, 2015.
- 40- YAM, L. K.; PAPADAKIS, E.S. A simple digital imaging method for measuring and analyzing colour of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 137-142, 2004.
- 41- FRANCO, M. DE O. K.; SUAREZ, W. T.; SANTOS, V. B. DOS. Digital Image Method Smartphone-Based for Furfural Determination in Sugarcane Spirits. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 508–515, 2017.
- 42-FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; MAIA, M. V.; SANTOS, V. B. Smartphone Application for Methanol Determination in Sugar Cane Spirits Employing Digital Image-Based Method. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 2102–2109, 2017.
- 43-SANTOS, V.B.; SILVA, E.K.N.; OLIVEIRA, L.M.A.; SUAREZ, W.T. Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits. **Food Chemistry**, v. 285, p. 340-346, 2019.
- 44-LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Evaluation of analytical reflection scanometry as an analytical tool. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2644, 2011.
- 45- DAMASCENO, D.; TOLEDO, T. G.; SILVA, C. P.; OLIVEIRA, S. B. & OLIVEIRA, A. E. ANÁLISE MULTIVARIADA DE IMAGENS NA QUÍMICA:

- UM EXPERIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DO pH DE ÁGUAS POTÁVEIS. **Química Nova**, v. 38, p. 836-841, 2015.
- 46- ATKINS, P.; JONES, L.; **Princípios de Química**; 3ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2006
- 47- MOLLON, J. D. The origins of modern color Science. **The Science of Color**, v. 2, p. 1-39, 2003.
- 48- GOMES, M. S.; TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 31, 1577-1581, 2008.
- 49- MOLINERO, A. L.; LINAN, D.; SIPIERA, D. & FALCON, R. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 380-385, 2010.
- 50- PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS, R. C.; GANNERMAN, D. Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 156-161, 2006.
- 51- COAD, J.; STEWART, R. & PEDLEY, K. Iron: Physiology of iron. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 461-467, 2016.
- 52- BEARD, J.L., DAWSON, H., PIÑERO, D.J. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 295-317, 1996.
- 53- PRATT, J. J.; KHAN, K. S. Non-anaemic iron deficiency - a disease looking for recognition of diagnosis: a systematic review. **European Journal of Haematology**, v. 96, p. 618- 28, 2016.
- 54- MACPHAIL, A. P. Iron deficiency and the developing world. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v. 51, p. 02-06, 2001.
- 55- PASSMORE, R.; NICOL, B. M.; RAO, M. N.; BEATON, G. H.; DEMAAYER, E. M.; Consumo recomendado de energia e nutrientes: Manual das necessidades nutricionais humanas. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 1986.
- 56- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. Krause Alimentos, nutrição e dietoterapia. **Elsiever**, 13^o ed, 2013.

- 57- ZHANG, H.; ZHABYEYEV, P.; WANG S.; OUDIT, G. Y. Role of iron metabolims in heart failure: from iron deficiency to iron overload. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**. V. 1865, 1925-1937, 2019.
- 58- HEIMBACH, J.; RIETH, S.; MOHAMEDSHAH, F.; SLESINSKI, R.; SAMUEL-FERNANDO, P.; SHEEHAN, T.; DICKMANNM R.; BORZELLECA, J. Safety assessment of iron EDTA [sodium iron (Fe³⁺) ethylenediaminetetraacetic acid]: Summary of toxicological, fortification and exposure data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 99-11, 2000.
- 59- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Jr. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. **Artmed**, 8º ed, p. 775, 2007.
- 60- BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 400-406, 2006.
- 61-MANCINI, M. A. D.; ZUANON NETTO, J.; VALLADAO, D. M. S.; Determinação do íon ferro em preparações farmacêuticas através da cromatografia planar e espectrofotometria. **Eclética Química**, v. 22, p. 133-145, 1997.
- 62- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. **Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília (DF); 1998.
- 63- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002. **Aprova o Regulamento Técnico para a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília (DF); 2002.
- 64- VELLOZO, E. P.; FISBERG, M. O impacto da fortificação de alimentos na prevenção da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 32, v. 134-139, 2010.

- 65- ZVERINA, O.; KUTA, J.; COUFALIK, P.; KOSECKOVA, P.; KOMAREK, J. Simultaneous determination of cadmium and iron in different kinds of cereal flakes using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 298, 2019.
- 66- BRANDÃO G. C.; GOMES D. P.; MATOS, G. D. Development of an analytical method based in the slurry sampling for iron determination in fortified milk powder by HR-CS FAAS. **Food Analytical Methods.**, v. 5, p. 579–584, 2012.
- 67- EKHOLM, P.; REINIVUO, H.; MATTILA, P.; PAKKALA, H.; KOPONEN, J.; HAPPONEN, A.; HELLSTROM, J.; OVASKAINEN, M. L. Changes in the mineral and trace element contents of cereals, fruits and vegetables in Finland. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 487-495, 2007.
- 68- BORGES, A. C. C.; SILVA, K. A.; MORAIS, C. C.; FERNADES, A. S. Determinação de ferro (II) em farinhas enriquecidas com trigo pelo método Uv-Vis. **Revista Mirante**, v. 9, 2016.
- 69- TEIXEIRA, L. S. G.; BRASILEIRO, J. F.; BORGES JF., M. M.; CORDEIRO, P. W. L.; ROCHA, S. A. N.; COSTA, A. C. S. Determinação espectrofotométrica simultânea de cobre e ferro em álcool etílico combustível com reagentes derivados da ferroína. **Química Nova**, v. 29, p. 741-745, 2006.
- 70-SADIGHI, J.; SHEIKHOLESLAM, R.; MOHAMMAD, K. *et al.* Flour fortification with iron: a mid-term evaluation. **Public Health**, v. 122, p. 313-321, 2008.
- 71-ROSADO, J. L.; CASSÍS, L.; SOLANO, L.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Nutrient addition to corn masa flour: effect on corn flour stability, nutrient loss, and acceptability of fortified corn tortillas. **Food and nutrition bulletin**, v. 26, p. 266-272, 2005.
- 72-QUEIROZ, V. A. V.; GUIMARÃES, P. E. O.; QUEIROZ, L. R. *et al.* Iron and zinc availability in maize lines. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 577-583, 2011.
- 73- ANDRADE, S. I. E.; LIMA, M. B.; BARRETO, I. S.; LYRA, W. S.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U.; SILVA, E. C. A digital image-based

- flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in water. **Microchemical Journal**, v. 109, p.106-111, 2013.
- 74- LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; BARRETO, I. S.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U. A digital image-based micro-flow-batch analyzer **Microchemical Journal**, v. 106, p. 238-243, 2013.
- 75- LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; SILVA NETA, M. S.; BARRETO, I. S.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U. A micro-flow-batch analyzer using webcam for spectrophotometric determination of Ortho-phosphate and aluminium(III) in tap water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 898-906, 2014.
- 76- MOURA, H. S. R. P.; MOL, A. R.; SAMPAIO, T. R.; FONSECA, A. Image-based luminescence detection for quantitative determinations in continuous flow analysis **Microsystems. Analytical Methods**, v. 10, p. 5571-5576, 2018.
- 77- ALMEIDA, P. L.; BONFIM, T. H. F.; CUNHA, F. A. S.; LIMA, K. M. G.; AQUINO, L. F.; ALMEIDA, L. F. A rapid, sensitive and green analytical method for the determination of sulfite in vinegars using pararosaniline reaction with image detection. **Analytical Methods**, v. 10, p. 448-458, 2018.
- 78- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- 79- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2016.
- 80- INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2011.
- 81-GONGORA-RUBIO, M. R.; ESPINOZA-VALLEJOS, P.; SOLA-LAGUNA, L.; SANTIAGO-AVILÉS, J. J. Overview of low temperature co-fired ceramics tape technology for meso-system technology (MsST). **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 89, p. 222-241, 2001.
- 82-IBÁÑEZ-GARCÍA, N.; PUYOL, M.; AZEVEDO, C. M.; MARTÍNEZ-CISNEROS, C. S.; VILLUENDAS, F.; GONGORA-RUBIO, M. R.; SEABRA, A. C.; ALONSO, J. Vortex configuration flow cell based on low

- temperature cofired ceramics as a compact chemiluminescence microsystem. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 5320-5324, 2008.
- 83- BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. A didactic chemometrics experiment for design of experiments (doe): evaluation of experimental conditions in the spectrophotometric determination of iron II with o-phenanthroline. a tutorial, part III. **Química Nova**, v. 37, p. 564-573, 2014.
- 84- CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard methods for examination of water and wastewater**. APHA: American Public Health Association, 1998.
- 85-TEIXEIRA, M. F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; RAMOS, L. A. Utilização de um eletrodo de grafite-epóxi recoberto com $[Zn(FEN)_3][tetratris(4-clorofenil) borato]_2$ sensível a zinco(II) em meio 1,10-fenantrolina como eletrodo indicador em titulações potenciométricas de precipitação. **Química Nova**, v. 28, p. 817-821, 2005.
- 86- BENEDETTI, L. P. D. S.; SANTOS, V. B. DOS; SILVA, T. A.; FILHO, E. B.; MARTINS, V. L.; FATIBELLO-FILHO, O. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4138–4144, 2015a.
- 87- BENEDETTI, L. P. DOS S.; SANTOS, V. B. DOS; SILVA, T. A.; FILHO, E. B.; MARTINS, V. L.; FATIBELLO-FILHO, O. A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages. **Analytical Methods**, v. 7, p. 7568–7573, 2015b.
- 88-BRITO, M. N.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticida: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 13, p. 129-146, 2003.
- 89-CAMBUIM, K. B. **Carvão de endocarpo de coco da baía ativado quimicamente com H_3PO_4 e fisicamente com vapor d'água: produção, caracterização e aplicações**. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Departamento de Química, UFPB, João Pessoa, 2009.
- 90-TESFALDET, Z. O.; VAN STADEN, J. F.; STEFAN, R. I. Sequential injection spectrophotometric determination of iron as Fe(II) in multi-vitamin

- preparations using 1,10-phenanthroline as complexing agent. **Talanta**, v. 64, p. 1189-1195, 2004.
- 91- VAN STADEN, J. F.; NAIDOO, E. B. Determination of total iron as Fe(II) in multivitamins, haematinics and natural waters using a sequential injection (SIA) system. **South African Journal of Chemistry**, v. 53, p. 191-205, 2000.
- 92- PAIROH, D.; CHAIENDOO, K.; NGEONTAE, W.; BURAKHAM, R. Sequential injection analysis of Fe (II) in supplement samples using silver nanoclusters as optical sensor. **Current Analytical Chemistry**, v. 12, p. 612-619, 2016.
- 93- MIRANDA, J. C.; KAMOGAWA, M. Y.; REIS, B. F. Development of a portable setup and a multicommuted flow analysis procedure for the photometric determination of Fe(III) and Fe(II) in fresh water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 811-818, 2015.
- 94-ARAÚJO, A. N.; GARCIA, J.; LIMA, J. L. F. C.; POCH, M.; LÚCIA, M. F. S. S. Colorimetric determination of iron in infant fortified formulas by sequential injection analysis **Frezenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 357, p. 1153–1156, 1997.
- 95- OLIVEIRA, P. C. C; MASINI, J. C. Sequential injection determination of iron (II) in antianemic pharmaceutical formulations with spectrophotometric detection. **Analytical Letters**, v. 34, p. 389-397, 2001.
- 96-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Água – Determinação de ferro – Método colorimétrico da ortofenantrolina: **NBR 13934**. Rio de Janeiro, 1997.