



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

**DILMO MARQUES DA SILVA LEOTERIO**

**MATERIAIS INORGÂNICOS ASSOCIADOS A SISTEMAS  
MULTICOMUTADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE  
ESPÉCIES QUÍMICAS EM ALIMENTOS**

**RECIFE  
2016**

**DILMO MARQUES DA SILVA LEOTERIO\***

**MATERIAIS INORGÂNICOS ASSOCIADOS A SISTEMAS  
MULTICOMUTADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE  
ESPÉCIES QUÍMICAS EM ALIMENTOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em química.

Orientador: Prof. Dr. André Galembek (dQF- UFPE)

Orientador: Prof. Dr. André Fernando Lavorante (DQ- UFRPE)

Co-orientadora: Profa. Dr. Mônica Freire Belian (DQ-UFRPE)

\* Bolsista CNPq

**RECIFE  
2016**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB 4-572

L588m Leoterio, Dilmo Marques da Silva.  
Materiais inorgânicos associados a sistemas multicomutados para a determinação de espécies químicas em alimentos / Dilmo Marques da Silva Leoterio . – 2016.  
131 f.: fig., tab.

Orientador: André Galembeck.  
Tese (Doutorado)– Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química. Recife, 2016.  
Inclui referências e anexo.

1. Química inorgânica. 2. Compostos de coordenação . 3. Sílica. 4. Potenciometria. 5. Espectrofotometria. I. Galembeck, André (Orientador). II. Título.

546 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2016-34

**DILMO MARQUES DA SILVA LEOTERIO**

**"MATERIAIS INORGÂNICOS ASSOCIADOS A SISTEMAS MULTICOMUTADOS  
PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES QUÍMICAS EM ALIMENTOS."**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 21/03/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. André Galembeck (Orientador)**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira**

Departamento de Química  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Silveira Paim**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Wagner Eduardo da Silva**

Departamento de Química  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Dr. Euzébio Skovroinski**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

**À minha família e amigos que  
ajudaram nessa nova etapa.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus – àquele que criou o mundo e todas as coisas que nele existem. Agradeço a Deus por ter me aproximado de pessoas maravilhosas, que agradeço muito como:

A professora Mônica Freire Belian, os professores André Galembeck e André Lavorante que me ajudaram e orientaram no desenvolvimento deste trabalho. Aos professores do departamento de química da UFRPE e da UFPE e por terem contribuído com minha formação. Ao departamento de Pós-Graduação em química, dQF UFPE.

Agradeço professora Maria da Conceição Montenegro, Célia Amorim e Alberto Araújo da FFUP, Portugal, pela disponibilidade e dedicação com que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o doutorado e a CAPES pela bolsa concedida no período do doutorado sanduíche realizado em Portugal.

## RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos, baseados no conceito de multicomutação, para análise de espécies químicas em alimentos. Para isto, foram sintetizados dois materiais: um composto de coordenação usado como fase sólida na determinação de açúcares redutores e uma rede de sílica utilizada como resina de pré-concentração de percloratos. O composto de coordenação cobre (II) - 4,4'-bipiridina foi usado no desenvolvimento do método para a determinação de açúcares redutores em água de coco e sucos empregando sistema em fluxo multicomutado com detecção espectrofotométrica. A metodologia de análise baseou-se na reação de oxi-redução em meio alcalino entre o reagente sólido e os açúcares redutores. A reação entre a fase sólida (de coloração azul) com (glicose + frutose) resulta em produto de cor amarelada, monitorada em 420 nm. A fase sólida foi fixada em 50 mg e temperatura de 90°C. Com volume de zona de amostragem de 160  $\mu\text{L}$ , que corresponde a 20 ciclos, obtendo resposta linear entre 1,0 e 20,0  $\text{g L}^{-1}$  de AR com RSD de 4,47% ( $n = 7$ ), limite de detecção de 0,2250  $\text{g L}^{-1}$ , limite de quantificação de 0,7496  $\text{g L}^{-1}$ , frequência analítica de 75 determinações por hora e geração de efluentes de 320  $\mu\text{L}$  por determinação. Os teores de açúcar redutor encontrados em sucos e água de coco variaram de 38,35 a 98,50  $\text{g L}^{-1}$  e 61,80 a 68,70  $\text{g L}^{-1}$  respectivamente. A rede de sílica, 2,5,8,11,14-pentaoxa-1-silaciclotetradecano, foi empregada num sistema multicomutado como coluna de pré-concentração de perclorato. O sistema foi acoplado a um detector potenciométrico para determinar percloratos em vegetais. Usou-se um eletrodo tubular com membrana constituída por 1% (m/m) de BNIP 4,4 Dapm LC1 solubilizado em 68% (m/m) de 2-nitrodifenil-éter, como solvente mediador e 31% (m/m) de poli (cloreto de vinila). Obteve-se limite de detecção de  $2,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , resposta linear no intervalo de  $1,0 \times 10^{-9}$  a  $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ , coeficiente de correlação linear de 0,9998 e a coluna apresentou uma capacidade de retenção de  $2,86 \times 10^{-3} \text{ mol}$  de perclorato.

O sistema foi aplicado às amostras de diferentes vegetais e foram encontradas concentrações de percloratos de 1,30 a 5,08  $\mu\text{g L}^{-1}$  o teste recuperação variou de 96,5 a 110,8 %.

Palavras-Chave: Açúcares Redutores. Fase Sólida. Análise em Fluxo. Multicomutação. Mini-bombas. Perclorato . Potenciometria. Pre-concentração.

## ABSTRACT

Two new multicommutation-based analytical methods were developed aiming to the quantification of chemical species in food. The first method is intended to the determination of reducing sugars in coconut water and fruit juices, while the second one is a potentiometric determination of perchlorates in horticultural products. The method developed for the determination of reducing sugars uses a multicommutated flow system with spectrophotometric detection employing a (copper (II) - 4,4' - bipyridyl) coordination compound as the solid-phase reagent. The reaction of the solid blue phase with glucose/fructose resulted in a yellowish solution, which was monitored at 420 nm; 50 mg of the solid phase was used and the temperature was set at 90°C. The volume of the sample zone was, 160  $\mu\text{L}$ , corresponding to 20 cycles, with a linear response of 1.0 e 20.0  $\text{g L}^{-1}$  to the RA and RSD of 4.47% ( $n = 7$ ), detection limit of 0.2250  $\text{g L}^{-1}$ , the limit of quantification was 0.7496  $\text{g L}^{-1}$ , analytical frequency of 75 determination per hour and effluent generation of 320  $\mu\text{L}$  per determination. The potentiometric method used to determine perchlorates used a tubular electrode formed by a polymeric membrane which showed the best features consisted of 1% (w/w) BNIP Dapm LC1 solubilized in 68% (w/w) of 2-nitrodiphenyl ether as a mediator solvent and 31% (w/w) poly(vinyl chloride) as the polymeric matrix. A limit of detection of  $2.8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  was obtained with a linear response in the range of  $1.0 \times 10^{-9}$  at  $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ , linear correlation coefficient of 0.9998 and the column retention capacity  $2.86 \times 10^{-3} \text{ mol perchlorate}$ . Was applied to samples of different vegetables found perchlorates 1.30 to 5.08  $\mu\text{g L}^{-1}$  and recovery between 96.5 and 110.8%.

Keywords: Reducing Sugars. Solid Phase. Flow Analysis. Multicommutation. Mini pumps. Perchlorate. Potentiometric. Pre-concentration.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação do funcionamento da mini-bomba solenóide. ON = acionamento da mini-bomba; OFF = desligamento da mini-bomba; C = compartimento interno de volume fixo para onde a solução é aspirada	24
<b>Figura 2</b>	Estrutura proposta por Werner do complexo $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$	28
<b>Figura 3</b>	Estrutura de alguns ligantes orgânicos usados na síntese de compostos de coordenação. Em destaque ( $\square$ ) o ligante utilizado na síntese do composto deste trabalho	30
<b>Figura 4</b>	Estrutura do complexo Cu(II)-Neocuproína	31
<b>Figura 5</b>	Representação do mecanismo da reação da glicose com íon cúprico	32
<b>Figura 6</b>	Métodos de determinação de açúcares redutores reportados na literatura	40
<b>Figura 7</b>	Diagrama do circuito empregado para o controle das válvulas de estrangulamento e mini-bombas solenóide, V e P, respectivamente. Controle através da porta USB do microcomputador, através da interface USB6009	41
<b>Figura 9</b>	Foto da coluna de reação construída e preenchida com o composto de coordenação sintetizado	44
<b>Figura 10</b>	Diagrama em fluxo utilizado neste trabalho, onde: A = amostra.; R = NaOH . ; C = solução carreadora, $\text{H}_2\text{O}$ . ; $\text{P}_1$ , $\text{P}_2$ , $\text{P}_3$ = Minibombas solenoide de 4, 4 e 10 $\mu\text{L}$ ; V = válvula solenoide de três vias; x = Confluência.; B.T. = banho termostatizado; F.S.= Fase sólida.; D= detector.; Espectrofotômetro; W = Descarte	45
<b>Figura 11</b>	Espectros na região do infravermelho do ligante livre (A:---) e do composto Cu-Bipy (B: ___).	49
<b>Figura 12</b>	Curva termogravimétrica do composto Cu-Bipy	50
<b>Figura 13</b>	Difratograma de raios-X do composto Cu-Bipy	51
<b>Figura 14</b>	Imagens de MEV do complexo Cu-Bipy com aumento de (a) 3.500x, (b) 10.000x, e (c) 20.000x	51
<b>Figura 15</b>	EDS do composto de coordenação de cobre (II) – 4,4'-bipiridina	52

<b>Figura 16</b>	Perfil de sinais analíticos para o estudo da concentração de NaOH menor que 0,050 mol L <sup>-1</sup> (a); igual a 0,050 mol L <sup>-1</sup> (b); e maior que 0,050 mol L <sup>-1</sup> (c)	53
<b>Figura 17</b>	Gráfico da Influência da temperatura na absorvância do produto obtido	54
<b>Figura 18</b>	Efeito da temperatura (a) e da razão volumétrica (b) entre AR/NaOH	55
<b>Figura 19</b>	Influência do número de ciclos de amostragem na magnitude do sinal Analítico.	56
<b>Figura 20</b>	Avaliação de linha de base e repetibilidade do sistema em fluxo multicomutado	57
<b>Figura 21</b>	Sinais transientes referentes às soluções de referência (1,00; 5,00, 10,0; 15,0; 20,0 g L <sup>-1</sup> ); A e B Sinais transientes referentes às amostra 10 g L <sup>-1</sup> e a curva analítica	58
<b>Figura 22</b>	Sistema reacional utilizado na obtenção da fase sólida	72
<b>Figura 23</b>	Imagem dos eletrodos usados neste trabalho (eletrodo tubular e convencional)	75
<b>Figura 24</b>	Estrutura química de bis-naftalimidopropil-4,4'-diaminodifenilmetano (BNIP (4,4) DADPM)	76
<b>Figura 25</b>	Fotografia do sistema usado na avaliação da membrana sensora	78
<b>Figura 26</b>	Fotografia do sistema multicomutado utilizado na determinação do perclorato.	80
<b>Figura 27</b>	Diagrama em fluxo utilizado neste trabalho, onde: P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> , P <sub>3</sub> = Mini-bombas solenoide de µL; V = válvula solenoide de três vias; x,y = confluências.; ISE = eletrodo de trabalho; E Ref. = eletrodo referência F.S.= fase sólida.; W = descarte.	81
<b>Figura 28</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>29</sup> Si de uma amostra de sílica gel	85
<b>Figura 29</b>	Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>29</sup> Si (sólido) da sílica funcionalizada	86
<b>Figura 30</b>	mostra o espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup> C da sílica sintetizada neste trabalho	87
<b>Figura 31</b>	Estrutura proposta para a sílica sintetizada, o 2,5,8,11,14 - pentoxa - 1 – silaciclodeceno-sódico	88

<b>Figura 32</b>	Espectro de infravermelho da sílica funcionalizada	89
<b>Figura 33</b>	Curva térmica da sílica funcionalizada, tendo em destaque os percentuais de perda de massa para cada evento térmico	91
<b>Figura 34</b>	Esquema simplificado para a primeira e segunda perda de massa da sílica funcionaliza	92
<b>Figura 35</b>	Micrografias do material ampliadas em (a) 120 vezes e (b) 10.000 vezes	93
<b>Figura 36</b>	Curvas de resposta potenciométrica para diferentes ânions, obtidas usando o sensor proposto	96
<b>Figura 37</b>	Influência do pH no eletrodo seletivo de perclorato para as concentrações $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	97
<b>Figura 38</b>	Curva de calibração, a) sem pré-concentração; b) com pré-concentração.	99
<b>Figura 39</b>	Resposta potenciométrica do eletrodo proposto, onde: a) variação do volume do eluente; e b) variação da concentração dos íons cloreto	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Métodos de determinação de açúcares redutores reportados na literatura	33
<b>Tabela 2</b>	Concentração e Volume das soluções de trabalho utilizadas	38
<b>Tabela 3</b>	Reagentes usados no desenvolvimento do método proposto	38
<b>Tabela 4</b>	Sequência de acionamento das mini-bombas e válvulas, para determinação de AR	46
<b>Tabela 5</b>	Características analíticas do sistema em fluxo multicomutado proposto	59
<b>Tabela 6</b>	Características analíticas de sistemas em fluxo para determinação de açúcares redutores comparados a este trabalho	59
<b>Tabela 7</b>	Resultados obtidos para os testes de adição e recuperação	60
<b>Tabela 8</b>	Resultados obtidos para a determinação dos açúcares redutores pelo método proposto e pelo método de Lane-eynon	61
<b>Tabela 9</b>	Reagentes usados no desenvolvimento deste trabalho	70
<b>Tabela 10</b>	Sequencia de acionamento das mini-bombas e válvulas	81
<b>Tabela 11</b>	Dados de análise elementar e fórmula mínima para a sílica funcionalizada	90
<b>Tabela 12</b>	Respostas potenciométricas do sensor obtidas para diferentes espécies aniônicas	94
<b>Tabela 13</b>	Características gerais de funcionamento do Sensor para ânions estudados neste trabalho e na referência (GIL et al.,2015)	95
<b>Tabela 14</b>	Coeficientes de seletividade potenciométrica para duas concentrações ( $2,5 \times 10^{-9}$ e $1,0 \times 10^{-8}$ mol L <sup>-1</sup> ) de perclorato e diferentes íons estudada	102
<b>Tabela 15</b>	Figuras de mérito do sistema em fluxo multicomutado proposto.	103
<b>Tabela 16</b>	Resultados obtidos para os testes de adição e recuperação em amostras de vegetai	104
<b>Tabela 17</b>	Resultados obtidos para a determinação de perclorato	105

	SUMÁRIO	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1	SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)	18
1.2	SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO MULTICOMUTADO	23
1.3	APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA	25
<b>2</b>	<b>DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AÇÚCARES REDUTORES EMPREGANDO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO (COBRE II- 4,4' – BIPYRIDINA) COMO REAGENTE SÓLIDO</b>	<b>27</b>
2.1	OBJETIVOS	27
2.1.1	Geral	27
2.1.2	Específicos	27
2.2	REVISÃO DA LITERATURA	28
2.2.1	Química de Coordenação: breve histórico e definições	28
2.2.2	Tipos de ligantes orgânicos	29
2.2.3	Algumas aplicações dos compostos de coordenação	30
2.2.4	Açúcares Redutores	31
2.2.5	Métodos de determinação de açúcares redutores	33
2.2.6	Determinação de açúcares redutores empregando sistema de análise em fluxo (FIA)	35
2.2.7	Reatores Fase Sólida	36
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.3.1	Soluções e Reagentes	37

2.3.2	Materiais e Equipamentos Utilizados	39
2.3.3	Síntese e caracterização do composto de coordenação de cobre (II) com 4,4'-bipiridina	43
2.3.4	Desenvolvimento do método proposto empregando sistema em fluxo multicomutado	44
.2.3.4.1	<b>Preparo do Reator Fase Sólida</b>	44
2.3.4.2	<b>Desenvolvimento do método para a determinação espectrofotométrica de açúcares redutores</b>	45
2.4	MÉTODO DE REFERÊNCIA	47
2.5	ANÁLISES DAS AMOSTRAS	47
2.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
2.6.1	Caracterização do Composto de Coordenação	48
2.6.2	Desenvolvimento do método para determinação espectrofotométrica de açúcares redutores	53
2.6.3	Análise das mostras	60
2.7	CONCLUSÃO	62
3	<b>DETERMINAÇÃO DE PERCLORATO EM PRODUTOS HORTÍCOLAS ATRAVÉS DE UM SISTEMA MULTICOMUTADO COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA E PRÉ-CONCENTRAÇÃO</b>	63
3.1	OBJETIVOS	63
3.1.1	Geral	63
3.1.2	Específicos	63
3.2	REVISÃO DA LITERATURA	63
3.2.1	Potenciometria	63

3.2.2	Ionóforos	65
3.2.3	Eletrodo Íon-Seletivo (ISE)	66
3.2.4	Adsorção	68
3.2.5	Sílica	68
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	70
3.3.1	Soluções	71
3.3.2	Solução estoque	71
3.3.3	Soluções de trabalho	71
3.3.4	Síntese e caracterização da sílica funcionalizada (fase sólida)	72
3.3.5	Construção do eletrodo convencional e tubular	73
<b>3.3.5.1</b>	<b>Preparação do corpo do eletrodo</b>	<b>73</b>
<b>3.3.5.2</b>	<b>Preparação do suporte condutor convencional e tubular</b>	<b>74</b>
<b>3.3.5.3</b>	<b>Preparação das membranas sensoras</b>	<b>75</b>
<b>3.3.5.4</b>	<b>Aplicação da membrana sensora (método convencional)</b>	<b>76</b>
<b>3.3.5.5</b>	<b>Avaliação do eletrodo convencional</b>	<b>77</b>
<b>3.3.5.6</b>	<b>Teste de influência do pH</b>	<b>78</b>
3.3.6	Desenvolvimento do método proposto empregando sistema em fluxo	79
<b>3.3.6.1</b>	<b>Preparo da Fase Sólida e do eletrodo tubular</b>	<b>79</b>
<b>3.3.6.2</b>	<b>Sistema em fluxo multicomutado para a determinação de perclorato</b>	<b>80</b>
<b>3.3.6.3</b>	<b>Desenvolvimento do método para a determinação potenciométrica do íon perclorato</b>	<b>83</b>

3.4	ANÁLISES DAS AMOSTRAS	84
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.5.1	Caracterização da Sílica Funcionalizada	84
3.5.2	Avaliação do eletrodo convencional	93
3.5.3	Sistema em fluxo multicomutado para a determinação potenciométrica de perclorato	97
3.5.4	Análises das amostras	103
3.6	CONCLUSÃO	105
	<b>REFERÊNCIAS</b>	107
	<b>ANEXO</b>	126

## 1 INTRODUÇÃO

Os monossacarídeos, glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem o grupo carbonílico e cetônico livres, esses grupos são suscetíveis a sofrerem oxidação em meio básico na presença de agentes oxidantes fracos. Os açúcares redutores são analisados de forma rotineira em laboratórios das indústrias de alimentos e bebidas (VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H., 1973), e por isso, existem vários métodos não seletivos para estimar o teor de açúcares redutores. No entanto, para a obtenção de resultados confiáveis é necessário a eliminação de interferentes (BORGES, M.T.M.R.; PARAZZI, C.; PIEDADE, S.M.D.S., 1987)

Neste capítulo da tese, objetivou-se o desenvolvimento de um procedimento analítico em fluxo multicomutado empregando um composto de coordenação cobre II – (4,4'-bipiridina) como reagente em fase sólida para a determinação espectrofotométrica de açúcares redutores em amostras de água de coco e de sucos. Neste caso, realizou-se a síntese e a caracterização do composto cobre II – (4,4'-bipiridina) e, posteriormente, desenvolveu-se procedimento em fluxo utilizando válvula solenoide de três vias associada à mini-bombas solenóide. Neste sentido, pretendeu-se a construção de um módulo de análise compacto e robusto minimizando o consumo de reagentes e geração de efluentes.

O perclorato é um ânion monovalente, de estrutura tetraédrica contendo o cloro como espécie central (TRUMPOLT et al., 2005). O íon perclorato tem sua ocorrência natural ou pode ser produzido quimicamente. É usado em propelentes sólidos para foguete, combustível, munições, explosivos comerciais, usos industriais e agrícolas (fertilizantes), assistência médica e farmacêutica (tratamento de distúrbios tireoidal). O perclorato é um contaminante liberado no meio ambiente a partir de fontes naturais e antrópicos sob a forma de diferentes sais, especialmente em cursos de água e de solos. O uso de fertilizantes naturais à base de perclorato podem contaminar a água de irrigação e solos levando altas concentrações aos vegetais cultivados. A desinfecção da água com substâncias cloradas potencialmente formadoras de perclorato pode ser outra fonte potencial de contaminação.

O perclorato é um contaminante ambiental emergente que tem uma capacidade única para interferir na absorção de iodo normal da glândula tireóide humana (CAPEN, 1997), e, portanto, tem o potencial de afetar adversamente o crescimento normal e desenvolvimento de crianças.

Na última década, principalmente nos Estados Unidos, tem sido estudado o comportamento do perclorato no meio ambiente. Evidências recentes sugerem fortemente que o perclorato ocorre naturalmente em níveis baixos e está presente na dieta humana (URBANSKY, 2002). A sua presença foi detectada em fontes de água superficial e subterrânea (ZHANG et al., 2007), em diferentes matrizes ambientais, tais como as águas de superfície (LAMB et al., 2006), leites (KIRK et al., 2005), peixes (THEODORAKIS et al., 2006) e solos (MACMILLAN et al., 2007). Estudos recentes têm mostrado que o perclorato se acumula em várias espécies de plantas (SANCHEZ et al., 2005a,b; SEYFFERTH AND PARKER, 2006, 2007, 2008; SANCHEZ et al., 2006; PARKER, 2009), em amostras de água, solo utilizados em atividades agrícolas e em vegetais, tendo como destaque o alface (CALDERON et al., 2014). A exposição da população a este contaminante e as consequências resultantes tornou-se um problema de saúde pública (BLOUNTA, et AL., 2007; MURRAVA., et al, 2008), tendo recebido atenção especial por parte da Agência de Proteção do Ambiente (EPA), em 1998. Em janeiro de 2009, a EPA lançou um comunicado estabelecendo a permissão de um total de 15 microgramas por litro ( $\mu\text{g/L}$ ) em água de beber. O nível estabelecido na recomendação do Conselho Nacional de Pesquisa (NRC), propondo o acompanhamento obrigatório de perclorato na água potável (HENLEY, 2011).

Na Europa, a autoridade para a segurança alimentar (EFSA) recebeu os resultados analíticos para 4731 amostras apresentadas pelos seis Estados-Membros, principalmente para frutas e produtos hortícolas no seu Painel dos Contaminantes da Cadeia Alimentar, e publicou um artigo emitindo preocupações para a saúde pública relacionado com a presença desse contaminante em alimentos. Foi dado parecer sobre os riscos para a saúde pública relacionado com a presença de perclorato em alimentos, em particular frutas e legumes (EFSA, 2014). Diante destes fatos, existe uma necessidade de desenvolver novos sistemas analíticos que podem ser utilizados para detectar este contaminante em matrizes alimentares em concentrações muito baixas. Os métodos atualmente reconhecidos para a determinação de perclorato são EPA 314.0 e 314.1, ambos baseados em

cromatografia iônica (HAUTMAN et al., 1999) ou em linha com coluna de concentração e eliminação cromatografia iônica com detecção de condutividade suprimida (WAGNER et al., 2005). Foi também desenvolvida a técnica de IC-MS, para tratar esse tipo de contaminante (MARTINELANGO et al., 2005), conhecida como o método EPA 332.0 ( HEDRICK; BEHYMER, 2005). Embora este método seja capaz de determinar concentrações inferiores a 4 ppt, não foi amplamente utilizado devido ao custo elevado e a disponibilidade limitada de instrumentação. Além disso, estes métodos de pré-tratamento necessitam de amostras de cartuchos de limpeza para remover os componentes interferentes de matriz (KOESTER; BELLAR; HALDEN, 2004), e a adição padrão deve ser empregada para compensar a supressão da matriz. Outras estratégias têm sido recentemente relatadas na literatura (LAMB et al., 2006; KUMAR et al., 2012; Shu-Ling; CHIH-YU; MING-REN, 2012; ISAAC et al., 2011; ROMANO, 2006), pois estes métodos não impedem pré-tratamentos de amostras, particularmente se forem turvas, como é o caso de amostras de alimentos. A potenciometria empregando eletrodos íon-seletivo é uma técnica simples permitindo de uma forma seletiva e rápida a determinação da atividade de um íon numa faixa de concentração, mesmo se as amostras são turvas. Além disso, quando acoplado a sistemas de fluxo contínuo, que são associados de forma simples e econômica, e em sistemas de pré-concentração o seu desempenho é melhorado. Neste trabalho foi desenvolvido um sistema em fluxo para detecção e quantificação potenciométrica de perclorato em vegetais, através do uso de um eletrodo íon seletivo e uma coluna de pré-concentração contendo sílica organofuncionalizada.

### 1.1 SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

Em 1975, Ruzicka e Hansen propuseram um sistema de análise por injeção em fluxo, do inglês *Flow injection analysis* (FIA), este sistema permitia a determinação analítica fora do equilíbrio químico. Este sistema foi chamado de análise em fluxo contínuo não segmentado, pois consistia na inserção de analitos em um fluxo transportador não havendo necessidade de inserção de bolhas para evitar a dispersão da zona de amostra. Uma característica importante do sistema FIA é a viabilidade em explorar a cinética das reações químicas, uma vez que o

processo de análise por injeção em fluxo tem como proposta a inserção de pequenas alíquotas de amostra (RŮŽICKA; HANSEN, 1975). Nos primeiros relatos da literatura, (RŮŽICKA; STEWART, 1975), (RŮŽICKA; HANSEN, 1975) a amostra era inserida no sistema com auxílio de uma seringa hipodérmica, a qual atravessava um septo de borracha, sendo assim, introduzida na solução carreadora. O sistema de análise em fluxo é uma ferramenta analítica utilizada nos estudos de: especiação química ambiental (BOZA, F.L, LUQUE, DE CASTRO M.D, VALCÁRCEL., 1985.; LUQUE DE CASTRO M.D., 1992.; MIRO M, FRENZEL W. 2004), reações catalíticas (FITSEV, I.M, BUDNIKOV, G.K., 1999), determinação eletroquímica (BRAININA, K.Z, MALAKHOVA, N.A, STOJKO NY., 2000), imunoenaios (ZHI, Z.L. 1999), determinação de amostras ambientais com a técnica cromatográfica (CERDA, V. ESTELA, J.M., 2005), e, em pré-tratamento de amostras por análise sequencial (ECONOMOU, A., 2005).

O desenvolvimento e evolução do FIA iniciou-se a partir da implementação do injetor proporcional e da válvula rotativa, que foram utilizados para a introdução das alíquotas de soluções de amostra e de reagente no percurso analítico (REIS; BERGAMIM, 1993). O uso da seringa hipodérmica e do septo de borracha tinha duas desvantagens principais: a primeira estava relacionada com seringa, pois dependendo do operador poderia existir variação no volume introduzido no fluxo no momento da injeção; e a segunda estava relacionada ao septo, pois tinha um tempo de vida útil curto, após três injeções deveria ser trocado a fim de eliminar possíveis contaminações do sistema. Segundo Reis e Bergamin (1997) o surgimento do injetor proporcional corrigiu o principal problema da técnica, otimizando a repetibilidade dos resultados, sendo, portanto, o mais versátil dentre os dispositivos para injeção de alíquota de reagentes e de amostra em sistemas FIA. (PASQUINI; DE OLIVEIRA, WALACE, 1985), (SOUZA et al , 1991).

Na válvula rotatória, para se variar o volume da solução de amostra era necessário trocar o rotor do injetor. Enquanto no injetor proporcional, o volume da solução de amostra era definido pela troca da alça de amostra, sendo este um procedimento bem mais fácil em relação ao primeiro. Do ponto vista conceitual, os dois injetores são iguais, porém o injetor proporcional é mais fácil de ser construído, podendo ser apresentar várias configurações (REIS; BERGAMIM, 1993).

Na evolução dos sistemas FIA, Pasquini e Oliveira (1985) desenvolveram o primeiro sistema empregando o processo de análise em fluxo monosegmentado (do Inglês, Monosegmented Flow Analysis - MSFA), o qual reunia as características favoráveis dos sistemas FIA e dos sistemas análise em fluxo contínuo segmentado. Neste sistema, uma alíquota da solução de amostra e de reagente era introduzida entre duas bolhas de ar. O MSFA podia e pode ser usado através do emprego de reações que requeiram um alto tempo de residência no sistema. As duas principais vantagens desses sistemas em relação ao sistema de Skeggs é a possibilidade de trabalhar com pequenos volumes de amostra e com alta frequência analítica. Em relação ao sistema FIA, o MSFA tem como principal vantagem a possibilidade de trabalhar com reações de cinética lenta.

No início da década de 90, os sistemas FIA já se encontravam popularizados e largamente empregados em química analítica (SANTOS; MASINI, 2010). Buscando então por uma ferramenta projetada para o monitoramento de processos, Ruzicka e Marshall (1990), a partir de pesquisas no Centro de Química Analítica de Processos da Universidade de Washington, publicaram o primeiro trabalho sobre a análise por injeção sequencial (SIA), que posteriormente, foi considerada a segunda geração dos métodos em fluxo (SANTOS; MASINI, 2010). Segundo Santos e Masini, (2010) a principal característica física do sistema é a utilização de uma válvula seletora rotatória multiportas cuja finalidade é permitir a comunicação entre cada uma das portas através da porta central. Esta porta, por sua vez, está conectada a uma bobina coletora, que tem por objetivo agrupar as zonas de amostra e de reagentes aspiradas através das diferentes portas, sem que essas zonas atinjam o sistema de propulsão. Diferentemente dos sistemas FIA uma seringa conectada a uma bomba de pistão, realiza tanto a aspiração como a propulsão de soluções no sistema. Ressalta-se a importância que existe na parada automática da bomba de pistão quando a válvula rotatória seletora se encontra em operação, evitando-se assim a pressurização do sistema (SANTOS; MASINI, 2010). Existem algumas desvantagens dos sistemas SIA em relação ao FIA, tais como conhecimento mínimo em linguagem de programação, custo de aquisição de um sistema SIA, menor flexibilidade para a escolha de volumes de amostra e de reagentes que vão circular no sistema, e, frequência analítica menor (SANTOS; MASINI, 2010).

Sistemas híbridos em fluxo foram propostos como sistemas automáticos de análise química em fluxo-batelada (ou simplesmente analisadores automáticos em Fluxo-Batelada) proposto por Honorato e colaboradores (1999) como uma nova estratégia para automação de análise titulométricas, onde denominaram como análise em fluxo-batelada (do inglês: Flow-Batch Analysis - FBA). O principal componente de sistema FBA é a utilização de uma câmara de mistura. Nos sistemas FBA, a solução de amostra e de reagente é bombeada ou aspirada para uma câmara de mistura onde se processa a reação química respeitando a cinética da reação. Posteriormente, a mistura é bombeada para o detector ou é realizada na própria câmara de detecção. Dessa forma, esses sistemas garantem o controle do equilíbrio químico e físico da reação com o mínimo de intervenção humana, mantendo elevada frequência analítica (DINIZ DIAS et al, 2012).

De uma maneira geral, ao se realizar procedimentos de análise química pelo método de batelada, a quantidade de reagentes usados é maior que a quantidade de reagente necessária empregando procedimentos em fluxo.

A necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos seletivos e autossustentáveis levou a busca da automação de sistemas de análise em fluxo no sentido de melhorar o gerenciamento de soluções. A redução de materiais nocivos a saúde humana e ao meio ambiente, hoje é um parâmetro primordial no desenvolvimento de métodos de análise química (ANASTAS, 1999). Os sistemas em fluxo apresentam essas características quanto a seletividade e autossustentação. Nestes sistemas, podem-se citar diversas vantagens, como: baixo consumo de reagentes, pouca ou nenhuma interferência do operador na manipulação dos reagentes e amostras, as reações químicas não necessariamente devem se completar para se realizar as medidas de análises (MELCHERT; REIS; ROCHA, 2012), alta frequência analítica, reprodutibilidade, e confiança nas medidas.

## 1.2 SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO MULTICOMUTADO

Sistemas de fluxo são ferramentas que permitem a análise de espécies química por via úmida através da manipulação de soluções (ROCHA et al., 2002), por isso é de fundamental importância a variabilidade dos sistemas em fluxo. Estes sistemas podem ser ligados a dispositivos como válvula rotatória, injetor comutador e bomba de pistão, melhorando assim, o desempenho do mesmo (TROJANOWICZ, 2008). Desta forma, esses dispositivos trabalham em dois estados de repouso de modo que os sistemas funcionem em apenas dois estágios, sendo assim, inviável em sistemas complexos (REIS et al., 1994).

Na década de 90, foi publicado o primeiro artigo que aborda a análise em fluxo por multicomutação (REIS et al., 1994). No entanto conceitos de multicomutação já estavam presentes em trabalhos feitos anteriormente na década de 70 (REIS et al., 1979).

Em 1994, Reis e colaboradores propuseram o uso de válvulas solenóide como dispositivos de acionamento discretos para manejar as soluções nos sistemas de análises, permitindo assim, uma maior versatilidade do sistema. Os dispositivos são interligados a um microcomputador e o processo de multicomutação em fluxo torna-se automático (MORÁLES-RUBIO et al., 2009).

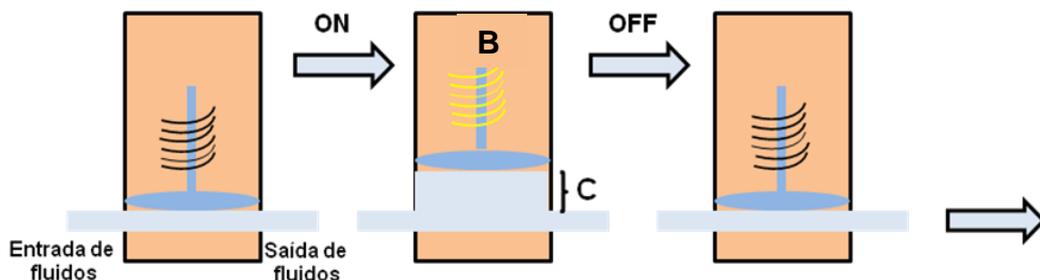
Multicomutação e amostragem binária têm como premissa a inserção sequencial, no caminho analítico, de solução de amostra e dos reagentes. Podemos entender a multicomutação baseada no sistema FIA em linha única e na comutação, entendendo como uma chave que abre e fecha, permitindo ou interrompendo a passagem de soluções no sistema. Para injetar uma determinada solução, de amostra ou de reagentes, no sistema em fluxo é preciso utilizar várias válvulas acionando-as alternadamente ou mais de uma simultânea gerando um ciclo de amostragem, podendo esse processo ser repetidos por diversas vezes quando for necessário (MARTELLI et al., 1995).

Neste sentido podemos destacar algumas potencialidades do sistema, como a versatilidade, a possibilidade de manipular pequenos volumes e a redução no consumo da solução de amostra e reagentes, como consequência disso, menor

geração de efluentes. O uso de mini-bombas solenóide em sistemas multicomutados possibilitou o desenvolvimento de novos métodos analíticos (LAPA et al., 2002.; RODENAS-TORRALBA. et al., 2006), com diversas vantagens, como: diminuição no consumo de reagentes e amostras; e geração de resíduos. As mini-bombas produzem volumes distintos devido a sua capacidade de bombeamento individual. Isto conduz a uma maior versatilidade que permite a utilização de abordagens diferentes para o gerenciamento de soluções. A versatilidade do sistema proposto foi demonstrada utilizando as estratégias para inserção de solução de amostra e de reagentes. Deste modo, o sistema foi caracterizado como fluxo pulsado, ressaltando a eficiência na introdução e na mistura das soluções de amostra e reagente (LIMA et al., 2004).

A Figura 1 mostra uma representação das mini-bombas solenóide em funcionamento num sistema hipotético.

**Figura 1** - Representação de mini-bombas solenoide em funcionamento. ON = acionamento da mini-bomba; OFF = desligamento da mini-bomba; C = compartimento interno de volume fixo para onde a solução é aspirada



Fonte: SOUZA, 2012, P,18.

Quando é aplicada uma diferença de potencial na mini-bomba uma bobina solenóide é acionada (B), permitindo a aspiração dos fluidos pela mesma. As mini-bombas solenóide como unidades de propulsão de fluidos têm-se caracterizado como sistemas de análises compactos, de fácil operação, versáteis na manipulação das soluções e, principalmente, proporcionando redução significativa no consumo de soluções de amostra e reagentes; e na produção de efluentes (LAPA et. al., 2002). Segundo Morales Rubio e colaboradores (2009); as mini-bombas solenóide,

oferecem uma alternativa interessante à miniaturização e implantação de sistemas em fluxo portáteis, pois operam com uma diferença de potencial de 12 V.

Alguns autores ressaltaram também, a importância do uso da multicomutação associado às mini-bombas solenoide e diodos emissores de luz (LEDs), com intuito de diminuir o custo de implementação de um sistema em fluxo, pois não haveria a necessidade do uso de espectrofotômetros. Em 2007, Lavorante e colaboradores, desenvolveram um sistema em fluxo multicomutado para a determinação sequencial de surfactantes aniônicos e catiônicos em amostras de águas. O módulo de análise baseou-se na utilização de sete válvulas de estrangulamento e duas mini-bombas solenoide, utilizando o conceito de amostragem binária. Também é demonstrado o uso desses sistemas multicomutados empregando minibomba solenoide na determinação de nitrato em água (MELCHERT, W.R.; INFANTE, C.M.C.; ROCHA, F.R.P., 2007.; LIMA et al., 2008).

### 1.3 APRESENTAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Esta tese será dividida em duas partes que apresentam como principal objetivo o desenvolvimento de sistemas de análise em fluxo multicomutado para a determinação de espécies químicas em alimentos.

A primeira parte trata da determinação espectrofotométrica de açúcares redutores empregando composto de coordenação (cobre II– 4,4' – bipyridina) como reagente sólido, para tanto foi desenvolvido um composto de coordenação, com características poliméricas, a partir de sulfato de cobre e 4,4'bipyridina. Este composto de coordenação foi aplicado como reagente em fase sólida para a determinação de açúcares redutores. As amostras reais utilizadas foram de sucos de frutas e de água de coco. A justificativa para o desenvolvimento deste sistema foi a redução do uso de reagentes, já que o íon cúprico reage especificamente com açúcar redutor, o uso do reagente sólido permite uma melhora no sinal analítico, o sistema proposto mostra-se simples e operacional apresenta alta reprodutibilidade sendo bastante versátil. A segunda parte, tratou-se da determinação de perclorato em produtos hortícolas, num sistema multicomutado com detecção potenciométrica e pré-concentração, foi aplicado um material de sílica desenvolvido pelo nosso grupo (BELIAN et al., 2012), para a pré-concentração de perclorato. O sistema desenvolvido baseou-se no conceito de multicomutação, cuja detecção foi

potenciométrica. O sensor utilizado foi cedido pelo Professor Paul Kong Thoo Lin, *Robert Gordon University Scotland United Kingdom*.

A coluna de pré-concentração foi necessária para otimização do sistema, pois através desse processo era possível aumentar a concentração de perclorato na coluna de pré-concentração, que posteriormente era eluído permitindo a detecção do analito em análise mesmo que este se encontre em pequenas quantidades em amostras reais.

## **2. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AÇÚCARES REDUTORES EMPREGANDO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO (COBRE II- 4,4' – BIPYRIDINA) COMO REAGENTE SÓLIDO**

### 2.1 OBJETIVOS

#### 2.1.1 Geral

Desenvolver uma metodologia eficiente com maior sensibilidade e menor geração de efluentes para a determinação de açúcar redutor em amostras de alimentos.

#### 2.1.2 Específicos

Sintetizar um composto de coordenação usando íon cobre II e o ligante orgânico 4,4' – bipyridina pelo método hidrotermal, usando forno programável;

Caracterizar o composto obtido através das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva e difração de raios – X;

Empregar o composto de coordenação como reagente sólido no desenvolvimento de um sistema em fluxo multicomutado;

Aplicar o sistema multicomutado na determinação espectrofotométrica de açúcar redutor.

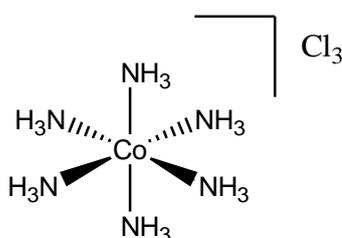
## 2.2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.2.1 Química de Coordenação: breve histórico e definições

Os compostos de coordenação podem ser definidos como produtos de uma reação entre um ácido e uma base de Lewis, sendo o ácido de Lewis (metal ou íon metálico) o receptor de par de elétrons e a base um doador de par de elétrons (ATKINS, SHRIVER, 2003). Estes compostos são estudados dentro da área da química inorgânica onde são exploradas suas estruturas, propriedades e aplicações. Em 1597, foi reportado o primeiro composto de coordenação, hoje denominado de cloreto de tetramincobre (II) com fórmula  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_2$ , pelo químico alemão Andréas Libavius. Em 1704, Heinrich Diesbach reportou a síntese do azul da Prússia, cuja fórmula inicialmente construída foi  $\text{KCN}.\text{Fe}(\text{CN})_2.\text{Fe}(\text{CN})_3$ , hoje conhecido como  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (FARIAS, R. F, 2009).

Em 1798, Tassaert citou a síntese do composto de coordenação de aminas e cobalto visando o estudo estrutural (BASOLO, R., JOHNSON, R. 1976). Werner e Jørgensen também contribuíram para a compreensão futura dos compostos de coordenação. Para Jørgensen, esses compostos se formavam por ligações químicas em cadeias (FARIAS, R. F; 2001., KAUFFMAN, G. B. 1959). E para Werner, os complexos eram formados por um átomo metálico central envolto por espécies que estariam ligadas ao mesmo (Figura 2) (Kauffman, G. B. 1968 e 1976).

**Figura 2** - Estrutura proposta por Werner do complexo  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ .



Fonte: Do Autor, 2016.

Werner em seus estudos concluiu que no composto  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ , os três cloretos são a valência primária do íon  $\text{Co}(\text{III})$ , e as seis moléculas de amônia são a valência secundária, ou seja, número de coordenação. Logo, com relação ao íon  $\text{Co}(\text{III})$ , os três cloretos apresentam ligação iônica e as seis  $\text{NH}_3$  formam ligações coordenadas.

O número de coordenação, dependendo da geometria, pode variar entre 1 e 12, com exceção do 11 que ainda não foi reportado na literatura. Os números de coordenação mais comuns em compostos de metais do bloco "d" são 4 e 6, e do bloco "f" são 8 e 9. Os metais de transição que apresentam  $\text{NC}=6$ , geralmente apresentam geometria octaédrica, e os  $\text{NC}=4$  podem ser quadrado plano ou tetraédrico. Compostos tetraédricos são formados geralmente quando o íon metálico é pequeno e apresentam alta carga nuclear, como no caso dos complexos de  $\text{Cu}(\text{II})$  (GREENWOOD, N. N., EARNSHAW, A.1997).

### 2.2.2 Tipos de ligantes orgânicos

Segundo Huheey, Keiter e Keiter, ligantes podem ser definidos como espécies que possuem existência independente. Ou seja, ânions e moléculas neutras que se comportem como bases de Lewis. As ligações químicas nos compostos de coordenação são do tipo metal-ligante, de natureza coordenativa.

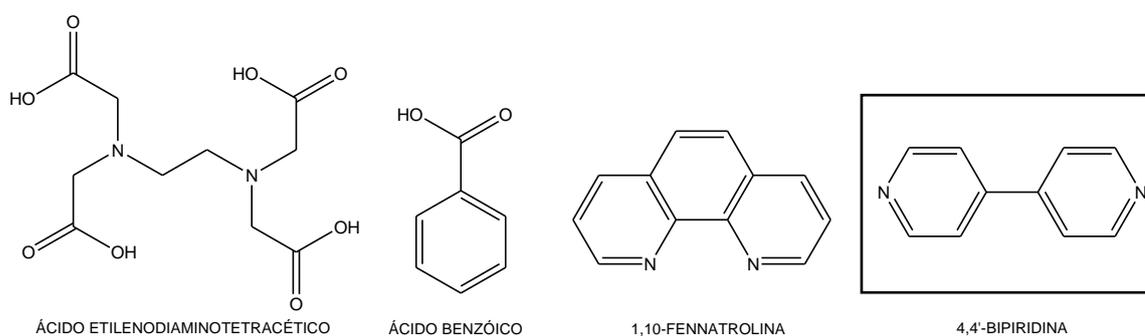
Os ligantes podem ser inorgânicos (basicamente ânions) e orgânicos, sendo esta última classe de grande importância devido às diversas possibilidades de atuar na coordenação, como também em contribuir na estrutura que o ligante traz para o complexo como um todo.

Os compostos orgânicos utilizados como ligantes, naturalmente contêm átomos de oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre e outros que se ligam devido à presença de par de elétrons não ligantes. Consequentemente, moléculas com grupos funcionais aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e aminas são espécies utilizadas na síntese de compostos de coordenação (ZHANG et al., 2008).

O ligante orgânico pode se coordenar ao íon metálico por um ou mais pontos (pares de elétrons). Quando um ligante apresenta apenas um ponto de coordenação, esses ligantes são chamados monodentados. Os ligantes do tipo

quelato apresentam dois ou mais sítios de coordenação. Espécies com vários sítios de coordenação são ditos também polidentados (ATKINS, SHRIVER, 2003). Na Figura 3 são apresentadas algumas estruturas de ligantes comumente utilizados na síntese de compostos de coordenação.

**Figura 3** - Estrutura de alguns ligantes orgânicos usados na síntese de compostos de coordenação. Em destaque (□) o ligante utilizado na síntese do composto deste trabalho.



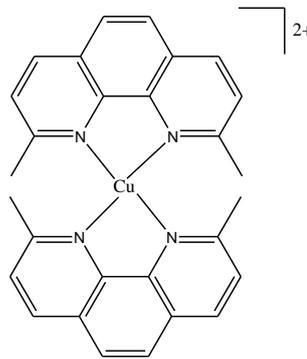
Fonte: Do autor, 2016.

### 2.2.3 Algumas aplicações dos compostos de coordenação

As aplicações dos compostos de coordenação são variadas, isto devido a sua diversidade estrutural e propriedades apresentadas por esta classe de compostos. Os compostos de coordenação podem ser aplicados como corantes inorgânicos (CAO et al., 2005), sensores químicos (SUN, S. S., LEES, A. J., 2002), sensores magnéticos (GARCIA, Y., KSENFONTOV, V., GUTLICH, P., 2002), materiais com propriedades ópto-eletrônicas (GRATZEL, M., KALYANASUNDARAM, K., 1998) e fármacos (OCHIAI, E-I., BAKHTIAR, R., 1999). Além disso, estes compostos também têm sua aplicação do campo da eletrocatalise em reação de oxi-redução, (CHENG et al., 2007) e da catálise assimétrica, em química orgânica (TROST, B. M., CRAWLEY, M. L., 2003). Uma característica bastante explorada desses compostos atualmente é a porosidade, pois estes compostos são capazes de agir como agente adsorvente (KRAP et al., 2010).

O composto de coordenação contendo o íon cobre coordenado a Neocuproína (Figura 4) foi aplicado na determinação de açúcares redutores em vinho por sistema de injeção em fluxo (FIA,). (ANGEL, M.; CASTRO, M. D. L.; VALCARCEL, M.; 1987.; PERIS-TORTAJADA, M., PUCHADES, R. E MAQUEIRA, A., 1992), e por sistema de injeção sequencial ( SIA ) (ALBERTO, et al.; 2000). Outro complexo utilizado com esta finalidade foi o  $K_3[Fe(CN)_6]$  através de uma reação em sistema em fluxo assistida por micro-ondas (Oliveira, A. F; Fatibello-Filho, O; Nobrega, J.A., 2001).

**Figura 4** - Estrutura do complexo Cu(II)-Neocuproína.



Fonte: Do autor, 2016.

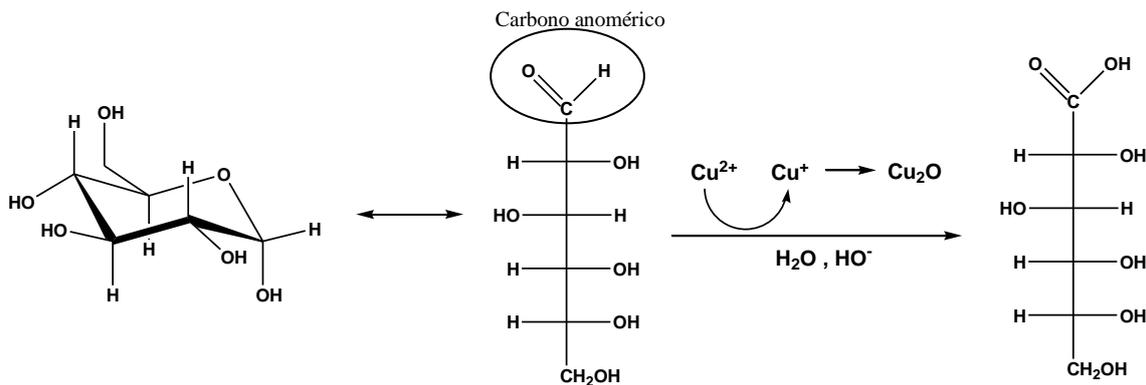
#### 2.2.4 Açúcares Redutores

Açúcares Redutores, do inglês *reducing sugar* (RS), são monossacarídeos simples, que consistem de unidades cetoses e aldoses (HODGE E OSMAN, 1976). RS são sólidos cristalinos, insolúveis em solventes orgânicos e solúveis em água (FRANCISCO, JR., 2008), que apresentam a propriedade de serem oxidados por íons cúpricos Cu(II) e férricos Fe(III) em soluções alcalinas (LEHNINGER et al., 2000). Nestas reações os grupos carbonila são oxidados a ácido carboxílico enquanto, os íons cúpricos Cu(II), por exemplo, são reduzidos a íons cuprosos Cu(I) (HODGE E OSMAN, 1976.; FRANCISCO, JR., 2008).

Para um açúcar se considerado redutor, o mesmo deve possuir um grupo anomérico não comprometido. A sacarose é um dissacarídeo formado por dois

monossacarídeos, portanto os grupos anoméricos estão comprometidos formando ligação glicosídica, fazendo com que a mesma não seja um açúcar redutor, diferente da glicose e frutose, que tem seus grupos carboxílicos livres (DEMIATE, et al, 2002). Na Figura 5 é representado o mecanismo de oxidação da glicose com o íon  $\text{Cu(II)}$ , onde através da conformação de Fisher ou conformação aberta da glicose, o carbono anomérico é representado livre para sofrer a reação de oxidação.

**Figura 5** - Representação do mecanismo da reação da glicose com íon cúprico.



A determinação de açúcares redutores é uma prática rotineira em análises de controle de qualidade em alimentos (ARAÚJO et al., 2000). Na indústria do vinho essa análise é feita com alta frequência (LOPES et al., 1995), sendo uma ferramenta versátil na verificação e acompanhamento do processo de fermentação (SARTINI et al., 1998) e controle de qualidade, atestando aos mesmos limites estabelecidos de quantidades açúcares redutores (AMERINE E OUG, 1980).

Na indústria sucro-alcooleira, a quantificação de açúcares redutores e totais são parâmetros de fundamental importância no acompanhamento da produtividade, na maturação e no pagamento da cana-de-açúcar (ZAGATTO et al., 2005). A determinação de açúcar redutor tem também sua importância no controle de qualidade de mel (CRANE, 1990.; MARCHINI, 2001).

## 2.2.5 Métodos de determinação de açúcares redutores

A maioria dos métodos utilizados para a determinação de açúcares redutores é baseado na reação de Fehling (STRYER et al., 2001). Alguns métodos mais seletivos vêm sendo reportado ao longo do tempo, como a análise empregando reações enzimáticas (FROST, 1984; KUNSSST et al.; 1984; MATISSEK et al, 1998) e baseada na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CANO E ALMEIDA – MURADIAN, 1998; COURTIN, et. al., 2000).

A Tabela 1 mostra alguns métodos utilizados na determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores totais.

**Tabela 1** - Métodos de determinação de açúcares redutores reportados na literatura.

<b>TÉCNICA</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
	Lane-Enyon	(Shneider, 1979).
Volumetria	Luff-Schorl	(Villela et al.,1973).
	EDTA	(Matissek et al., 1998).
Gravimetria	Musson-Walker	(Spencer, G.L., Meade, G.P., 1945)
Espectrofotometria	Antrona	(Brevil e Saddler, 1985)
	Somogyi-Nelson	(Nelson, 1960).

Fonte: Do autor, 2016.

No método Luff-Schoorl, os açúcares redutores são oxidados e os íons cúpricos são reduzidos a íons cuprosos, que em meio alcalino precipita como  $\text{Cu}_2\text{O}$ , enquanto que o excesso de  $\text{Cu(II)}$  é determinado por Iodometria (VILLELA et al.,1973).

No método complexométrico o resíduo de Cu(II) é titulado com solução padrão de EDTA, após os íons Cu(II) presentes na amostra são reduzidos a íons Cu(I) e precipita na forma Cu<sub>2</sub>O (MATISSEK et al., 1998).

O método de Musson-Walker baseia-se na quantificação do precipitado óxido de cobre I, sendo este composto formado pela reação entre os íons Cu(II) e os açúcares redutores.

O método de Lane-Eynon é um dos mais utilizados para determinação de açúcares redutores em diferentes amostras. Esse método se baseia também na redução de Cu(II) a Cu(I) em meio básico na presença de tartarato, formando óxido de cobre I (SHNEIDER, 1979).

No método com antrona (9,10-diidro-9-oxoantraceno), para a determinação dos RS, o ácido sulfúrico é usado para desidratar os carboidratos. Após a condensação, é formado um produto de cor azul que pode ser determinado por espectrofotometria a 620 nm (BREVIL E SADDLER, 1985).

No método de Samogyi-Nelson os açúcares redutores são convertidos em enedióis em meio básico, reduzindo o Cu(II) a Cu(I) formando Cu<sub>2</sub>O. O heteropoliácido arsenomolibídico é reduzido pelo Cu<sub>2</sub>O reduzindo um composto de coloração azul que pode ser determinado por espectrofotometria sendo monitorado a 640 nm (NELSON, 1960).

Os açúcares redutores também têm sido determinados por espectroscopia no infravermelho, contudo, essa análise apresenta alguma dificuldade devido à presença de várias bandas na região de impressões digitais, o que deixa o espectro bastante complexo. Além disso, a presença de bandas de OH largas proveniente da absorção de água pelas amostras encobre sinais característicos importantes (ACHÁ et al., 1988, BAKER, 1985, CADET et al., 1997).

## 2.2.6 Determinação de açúcares redutores empregando sistema de análise em fluxo (FIA)

A determinação de açúcares redutores empregando a análise em fluxo tem sido reportada na literatura (REIS et al., 1994), pois as etapas de análise não necessitam de interferência do operador, o que é considerado um fator de diminuição de riscos de contaminação; apresenta baixo custo e alta produtividade (PERIS – TORTAJADA et al., 1992). O FIA tem sido proposto fazendo o uso de várias técnicas de detecção, como: quimiluminescência (KOERNER et al., 1986), gravimetria (SARTINI et al., 1998), fluorimetria (DANIELSON et al., 1999), amperometria (PARELLADA et al., 1986), entre outras.

Açúcares redutores, neste contexto, têm sido determinados empregando uma reação com ácido pícrico, que é monitorada de acordo com a diminuição da concentração de picrato em solução (LOPES et al., 1995). Este método emprega potenciometria com o uso de eletrodo íon-seletivo (MAQUIERA et al., 1987). Também foi proposto por análise em fluxo, outro método que trata da redução em meio básico e sob aquecimento, do íon complexo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  (OLIVEIRA et al., 2001; ALVES et al., 2005), neste caso a reação é monitorado através da técnica de análise espectrofotométrica. A determinação de açúcares redutores por gravimetria em análise de injeção em fluxo foi reportada por Sartini et. al., em 1998. Esse método se baseiou na reação do reagente de Fehling com o açúcar redutor. Outro método visando à determinação de açúcares redutores foi proposto baseado na síntese do composto de coordenação de cobre I com o 2,9-dimetil- 1,10- fenantrolina ou neocuproína, neste caso a detecção é através da espectroscopia de absorção, onde a formação do  $\text{Cu}_2\text{O}$  é monitorado (ARAUJO et al., 2000). Esta técnica de detecção é sem dúvida a mais explorada nos sistemas de análise em fluxo que visam a determinação de açúcar redutor (ARAUJO et al., 2000; FATIBELLO-FILHO, 1999; MATTOS et al, 1988; ZAGATTO et al., 1988; TRENT et al., 1986; REIS et al., 2003, NETO, 2006).

### 2.2.7 Reatores Fase Sólida

Os reatores em fase sólida, do inglês *Solid Phase Reactor* (SPR), são reatores contendo reagentes sólidos. Os reatores em fase sólida podem ser do tipo que haja apenas para pré-concentração, para reação, com intuito de formar uma espécie detectável, para pré-tratamento de reagentes e amostras. O desenvolvimento de métodos de análise que utilizam os sistemas em fluxo apresenta grande versatilidade e permitem a incorporação de novos componentes de acordo com o analito em estudo. Pode-se adicionar ao sistema, por exemplo, um reator fase sólida em uma certa posição do sistema com a finalidade de detectar um analito através da reação que ocorre entre a interface sólido-solução ou por pré-concentração (MARTINEZ-CALATAYUD, J. & MATEO, J. V. G., 1993).

O uso de SPR acoplado a sistema FIA vem sendo muito utilizado, pois permite o confinamento de reagentes sólidos através da sua baixa solubilidade ou por retenção dos reagentes em um suporte específico. Tem-se usado soluções como reagente em sistemas por injeção em fluxo, no entanto, o emprego de reagentes sólidos é justificado pelas inúmeras vantagens, como: diminuição da dispersão da amostra, aumento da sensibilidade do sistema, conversão do analito ou reagente num determinado ponto do SPR, aumento do sinal analítico, menor volume da amostra injetada, simplicidade do sistema, economia de reagentes, consumo de reagente sólido apenas pela espécie de interesse, menor geração de rejeitos e menor impacto ao meio ambiente (MARTINEZ- CALATAYUD, J. M., 1996; ZAMORA et. al., 1992).

Um reator em fase sólida pode ser posicionado no sistema FIA dependendo da sua função no processo analítico (ZAMORA et. al., 1992), podendo ser utilizado com as seguintes finalidades: **(i)** Pré-tratamento de reagentes - O SPR remove impurezas liberando ou gerando reagentes instáveis; **(ii)** Pré-concentração e conversão de amostras – o reator é posicionado na alça de amostragem; **(iii)** Pré-tratamento de amostras - SPR é colocado antes do sistema de injeção; **(iv)** como Optossensor - O reagente é imobilizado no sistema de detecção, o qual tem como objetivo verificar a seletividade e sensibilidade; e **(v)** Conversão da amostra - O SPR é posicionado entre o injetor e o detector.

Os reagentes sólidos devem apresentar algumas características para serem utilizados em fase sólida, como, tamanhos de partículas adequados para que a pressão do sistema não seja alta, permitindo assim, a passagem da solução pelo reator; rápida reação com o analito; e inerte à solução carregadora (MARTINEZ-CALATAYUD, J. M., 1996). Vários materiais são usados com reagentes sólidos em SPR, tais como, sais, óxidos, resinas, enzimas e membranas microporosas. A resina de troca iônica, por exemplo, é bastante utilizada como reagente sólido na preparação de SPR (COLLINS, C. H. 1987). Neste contexto algumas resinas aniônicas tem se mostrado um bom eliminador de interferentes presentes em amostras (VASCONCELOS, M. T. S. D.; GOMES, C. A. R. & MACHADO, A. A. S. C. 1994).

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1 Soluções e Reagentes

As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água deionizada, ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) obtida através de um sistema deionizador básico - Q380M fabricado pela QUIMIS e os reagentes foram adquiridos com alto grau analítico.

A solução estoque de açúcares redutores foi preparada através de 1,5 g de frutose e 1,0 g de glicose em 25,0 mL de água destilada.

Para o preparo de uma solução de hidróxido de sódio a  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , foram pesados 2 g de NaOH e dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque de açúcares redutores. Foram preparadas 5,0 soluções de concentrações de 1 a  $20 \text{ g L}^{-1}$ , a partir da diluição da solução estoque conforme os dados apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Concentração e Volume das soluções de trabalho utilizadas.

Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Volume da solução estoque (mL)
1,00	0,25
5,00	1,25
10,0	2,50
15,0	3,75
20,0	5,00

Fonte: Do autor, 2016.

Na Tabela 3 são apresentados os reagentes e solventes utilizados neste trabalho, com suas respectivas descrições.

**Tabela 3** - Reagentes usados no desenvolvimento do método proposto.

Reagente	Fórmula	Massa molar g mol <sup>-1</sup>	Grau de Pureza (%)	Fabricante
4,4'-bipiridina	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	156,18	98,0	Aldrich
Nitrato de Cobre II Tri-hidratado	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	241,60	99,0	Dinâmica
Frutose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16	99,0	Dinâmica
Glicose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16	99,0	Vetec
Hidróxido de sódio	NaOH	40,0	98,0	Dinâmica
Sulfato de Cobre II Penta-hidratado	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249,69	98,0	Dinâmica
Tartarato de sódio e Potássio	KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O	282,22	99,0	Vetec
Azul de metileno	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> SCl	319,85	82,0	Dinâmica

Fonte: Do autor, 2016.

### 2.3.2 Materiais e Equipamentos Utilizados

Para a determinação dos açúcares redutores, o módulo de análise foi construído empregando-se três mini-bombas solenoide (Ref.P/N 090SPSP12-8 12VDC), sendo duas com capacidade de 4  $\mu$ L por pulso, e uma com capacidade de 10  $\mu$ L, todas fabricadas pela BIO-CHEM (Valve Inc, Boonton, USA). Foi utilizada também uma válvula solenoide de 3 vias (Ref. Nresearch 161P011). Para a confecção das linhas de fluxo e da bobina de reação de 100 cm utilizou-se tubos de polietileno de 0,8 mm d.i., e confluências construídas em acrílico.

Para o sistema de detecção utilizou-se um espectrofotômetro multicanal com arranjo linear de fotodetectores do tipo CCD modelo USB 4000 (Ocean Optics, Inc) com cela de fluxo de quartzo AGILENT de 10 mm de caminho óptico e 80  $\mu$ L de volume. Também foi utilizado um espectrofotômetro da *Oceans Optics* multicanal com arranjo linear de fotodetectores do tipo CCD modelo USB4000 UV-Vis (Figura 6), conectado a uma entrada USB de um microcomputador. Foram utilizados também, cabos de fibra óptica para a condução da radiação emitida por uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, modelo LS-1). Como fonte de radiação foi utilizado um espectrofotômetro USB4000 com arranjo linear de fotodetectores tipo CCD. Esse equipamento possui uma lâmpada de tungstênio-halogênio, que é alimentada por uma fonte de 12 V. Também foram utilizados cabos de fibra óptica com 0,2 mm de diâmetro para transporte da radiação até a cela de detecção e para a interface contendo o monocromador e o arranjo de fotodetectores. A cela de fluxo foi colocada em um suporte conectada a lentes convergentes para a focalização do feixe de radiação, o qual permitiu o alinhamento dos cabos de fibra óptica na entrada e na saída da cela. O sistema de detecção é formado por um monocromador que permite a dispersão da radiação incidente sobre o arranjo linear de 1024 fotodetectores do tipo CCD e uma interface analógica/digital que permite a aquisição de dados num intervalo de comprimento de onda entre 280 e 840 nm.

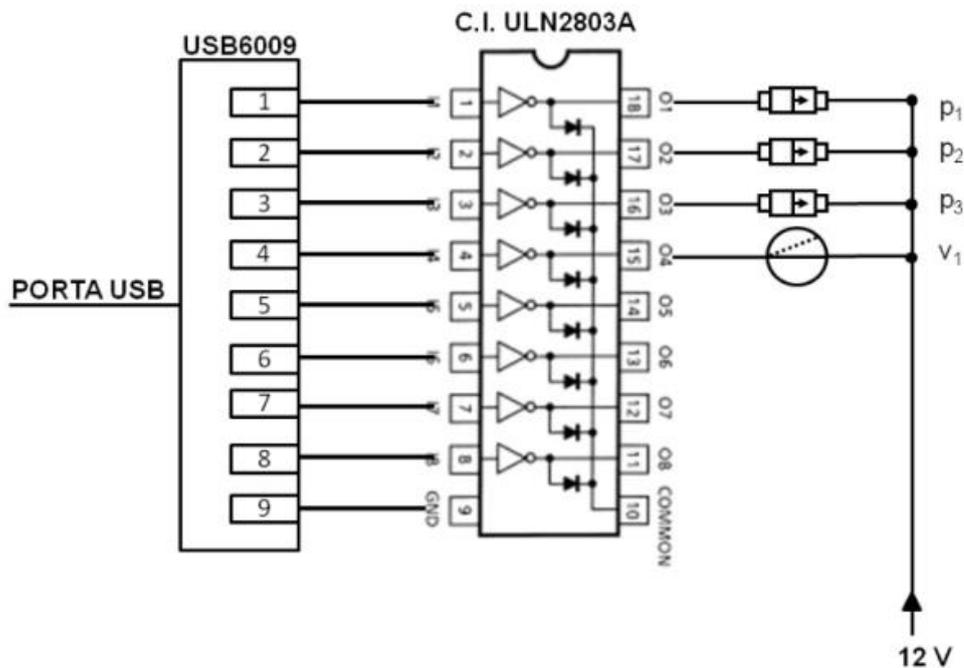
**Figura 6** - Espectrofotômetro multicanal com arranjo linear de fotodetectores, modelo USB4000 UV-Vis utilizado neste trabalho.



Fonte: (OCEAN OPTICS - USB4000 FIBER OPTIC SPECTROMETER, 2012).

Foi usado um microcomputador, para a manipulação dos dispositivos, através de uma interface eletrônica construída no laboratório com um circuito integrado ULN2803A. Este circuito foi conectado a uma interface USB6009, (*National instruments*). A interface USB6009 foi ligada a porta USB do microcomputador (Figura 7). As mini-bombas foram acionadas usando uma interface de potência de 12 V, intensidade de corrente de aproximadamente 2 A, e a uma frequência de 5 Hz, que corresponde aos intervalos de tempo de acionamento (ligado / desligado) de 0,1s/ 0,1 s (LAVORANTE, 2006).

**Figura 7** - Diagrama do circuito empregado para o controle das válvulas de estrangulamento e mini-bombas solenóide, V e P, respectivamente. Controle através da porta USB do microcomputador, através da interface USB6009.



Fonte: SOUZA, 2012, P.36.

Para o controle do módulo de análise e aquisição de dados foi desenvolvido um programa em linguagem Lab View 8.6. Este foi estruturado para realizar também o controle das variáveis do sistema proposto. A porta USB do microcomputador foi empregada para conectar o espectrofotômetro multicanal. Os sinais transientes e absorbância versus tempo, em comprimento de onda específico, foram adquiridos fornecendo parâmetros de entrada, como número de pontos que serão gerados em função do tempo fornecido pelo analista (tempo de integração), e comprimento de onda específico para monitorar a reação.

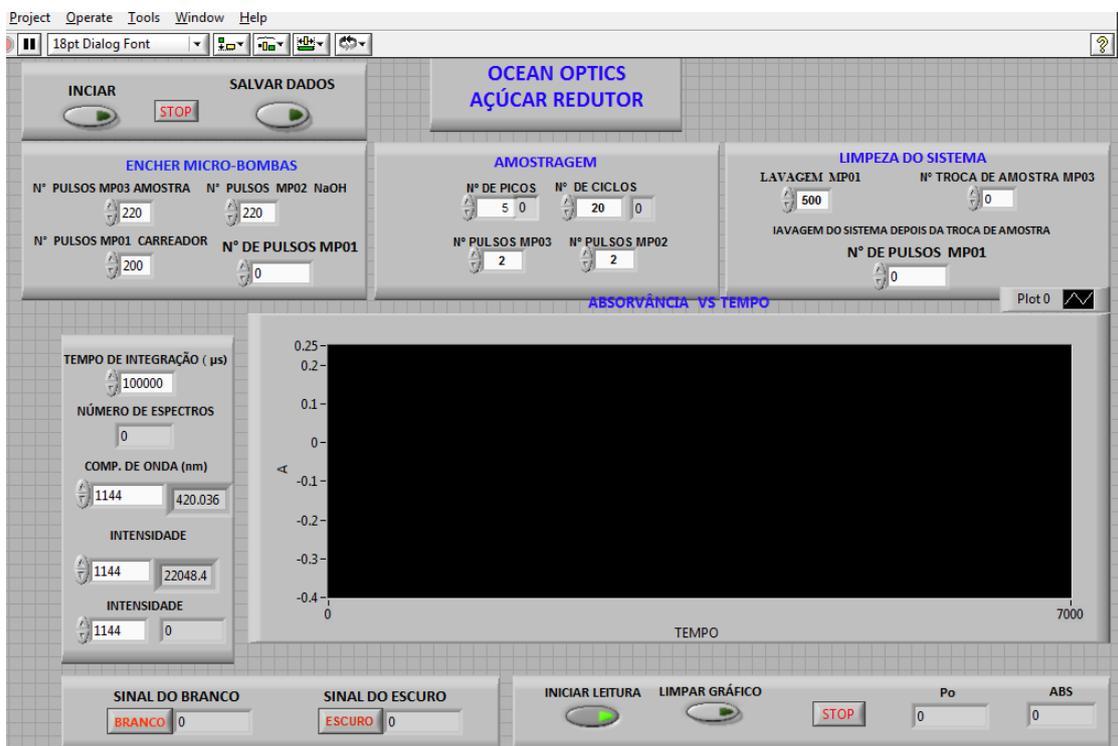
Para a aquisição dos dados de absorbância (A) em função do tempo, isto é, intensidades geradas pelos 1024 fotodetectores, foram realizadas leituras na ausência de radiação proveniente da lâmpada de tungstênio-halogênio (medidas no escuro) e das respectivas soluções de referência. Aplicando-se a Equação 1, onde,  $I_0$  = intensidade no escuro,  $I_1$  = intensidade com a solução carreadora e  $I_2$  =

intensidade com a solução da amostra, pode-se calcular a absorbância relativa da solução da amostra.

$$A = -\log \left( \frac{I_2 - I_0}{I_1 - I_0} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Um formulário de interação (Figura 8) foi desenvolvido para manipulação do sistema, permitindo ao analista a interação com o sistema, selecionando as variáveis de entrada e de dados de interesse, tais como tempo de integração, número de replicatas, número de ciclos de amostragem, tempo de acionamento das mini-bombas solenóide, válvulas de 3 vias e comprimento de onda selecionado. Foram criados botões para salvar, parar as minibombas e válvulas de três vias, parar a leitura, medir o branco e escuro e iniciar a leitura. O formulário continha na parte central o espaço reservado onde os sinais transientes são visualizados em comprimento de onda fixo. Foi possível programar o formulário para que sejam gerados sinais transientes em quantos comprimentos de onda forem necessários.

**Figura 8-** Formulários para a interação com o usuário.



Fonte: Do autor, 2016.

### 2.3.3 Síntese e caracterização do composto de coordenação de cobre (II) com 4,4'-bipiridina

Em balança analítica pesou-se 0,155 g ( $6,4 \times 10^{-4}$  mols) de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e 0,100 g ( $6,4 \times 10^{-4}$  mols) de 4,4' bipiridina. Os compostos foram adicionados em um reator de teflon, seguindo da adição de 7,0 mL de água destilada. O sistema foi então selado com uma capa metálica e levado ao forno programável, submetido a uma temperatura de 120°C durante 24h com taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C min<sup>-1</sup>. O sólido obtido foi lavado com água destilada e acetona, e posteriormente, seco a temperatura ambiente. Este mesmo procedimento foi repetido para os tempos de 48 e 72 horas, a fim de verificar o melhor tempo reacional com maiores rendimentos.

Os espectros de infravermelho do ligante e do complexo foram obtidos à temperatura ambiente varrendo uma janela de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> usando um Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier BRUKER, modelo IFS66 usando pastilha de KBr, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

A curva termogravimétrica para avaliação da estabilidade térmica e decomposição do composto foi realizado num THERMOGRAVIMETRIC ANALYZER da SHIMADZU, modelo TGA-50/50H com fluxo de 50 mL/min de N<sub>2</sub> com taxa de aquecimento de 5°C/min até 700°C, pertencente ao Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

As imagens de superfície do produto sintetizado para a verificação da qualidade e distribuição dos elementos no mesmo foram feitas através de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) associado a espectroscopia de energia dispersiva (EDS). A amostra foi primeiramente metalizada com uma camada de 10-20 nm de ouro, e as imagens foram obtidas em um microscópio FEI Quanta 200 FEG com voltagem de 20.00 KV e distância de trabalho de 10 mm, no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE.

A avaliação da cristalinidade do produto foi verificada pela técnica de difração de raios-X pelo método do pó. O difratograma foi obtido utilizando um difratômetro Bruker D8 Advance, com fonte de cobre, também no CETENE.

2.3.4 Desenvolvimento do método proposto empregando sistema em fluxo multicomutado

#### 2.3.4.1 Preparo do Reator Fase Sólida

Para a construção do reator (Figura 8) empregou-se uma placa de acrílico, onde a mesma foi cortada em forma de um retângulo, cujas dimensões internas foram de 4 mm x 40 mm. Nesta coluna foram adicionados 200 mg de areia previamente tratada, em seguida, adicionou-se uma mistura proporcional de 50 mg do composto de coordenação e 500 mg de areia. A areia tem a função de diminuição da pressão no interior da coluna, pois promove uma maior distribuição do complexo ao longo da coluna, sendo a mistura de areia com o composto uma forma também de evitar a compactação do material dentro na coluna de reação.

**Figura 9** - Foto da coluna de reação construída e preenchida com o composto de coordenação sintetizado.



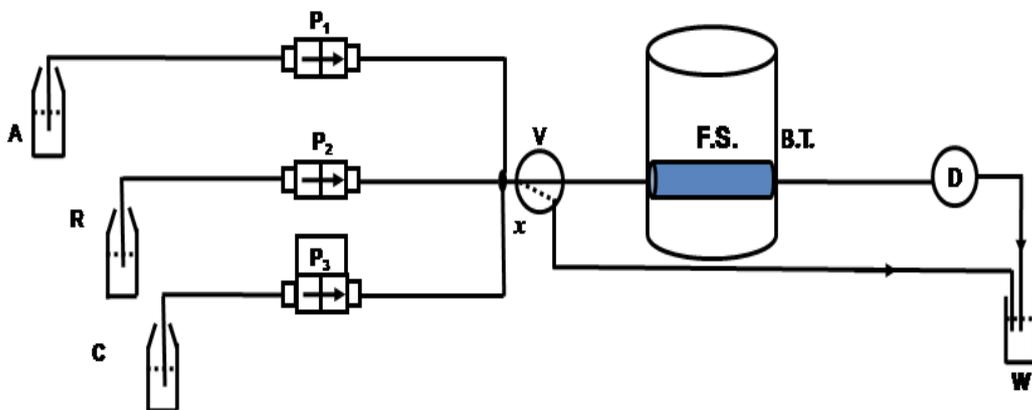
Fonte: Do autor, 2016.

### 2.3.4.2 Desenvolvimento do método para a determinação espectrofotométrica de açúcares redutores

Para a determinação espectrofotométrica dos açúcares redutores utilizou-se um sistema de análise em fluxo baseado na reação de oxidação- redução entre o Cu (II) e os açúcares redutores, já que o Cu(II) sofre redução sob aquecimento em meio básico quando em contato com os açúcares redutores (Araújo et. al., 2000) à Cu(I).

Na Figura 10 é apresentado o diagrama em fluxo para a determinação espectrofotométrica dos açúcares redutores, baseado no conceito de multicomutação.

**Figura 10** - Diagrama em fluxo utilizado neste trabalho, onde: A = amostra.; R = NaOH . ; C = solução carreadora, H<sub>2</sub>O. ; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> = Minibombas solenoide de 4, 4 e 10  $\mu$ L; V = válvula solenoide de três vias; x = Confluência.; B.T. = banho termostatizado; F.S.= Fase sólida.; D= detector.; Espectrofotômetro; W = Descarte.



Fonte: LEOTERIO et al., 2015

A sequência de acionamento das mini-bombas e válvulas é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** - Sequência de acionamento das mini-bombas e válvulas, para determinação de AR.

ETAPA	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	V	Pulsos	Ciclos
	1/0	0	0	1	100	
Enchimento das mini-bombas	0	1/0	0	1	100	
	0	0	1/0	1	100	
Inserção de Amostra	1/0	0	0	0	2	20
Inserção de NaOH	0	1/0	0	0	2	
Transporte, detecção e limpeza	0	0	1/0	0	300	

1/0 e 1: mini-bomba ou válvula acionada.; 0: mini-bomba ou válvula desativada.

Fonte: LEOTERIO et al., 2015.

Inicialmente, as mini-bombas e a válvula são acionadas para que todo o percurso analítico seja preenchido.

Para a determinação de açúcares redutores, as mini-bombas P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub> sequencialmente (2 pulsos cada), com 20 ciclos de amostragem para a formação da zona de amostragem. Posteriormente, a mini-bomba P<sub>3</sub> é acionada para o transporte da zona de amostragem até o detector. Durante o transporte da zona de amostragem a mesma atravessa reator onde está adicionado o composto de coordenação (reagente sólido) acondicionado em banho termostaticado. Neste

ponto ocorre a reação de oxirredução entre o açúcar redutor e o Cu(II) presente no composto de coordenação, onde Cu(II) é reduzido a Cu(I) formando uma solução de cor amarela, monitorado em 420 nm.

Os parâmetros físico-químicos do sistema proposto podem influenciar na reação de oxirredução. Inicialmente, foi estudado o parâmetro químico de concentração de hidróxido de sódio que tem grande importância para o sistema, uma vez que o reagente sólido sofre uma maior degradação quando a essa concentração é aumentada e vice-versa.

Posteriormente, foram estudados os parâmetros físicos: razão volumétrica entre as soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e de solução de referência, número de 2 a 100 pulsos das mini-bombas e número de ciclos de amostragem variando-se entre 5 e 35 ciclos com intervalo de 5 ciclos.

## 2.4 MÉTODO DE REFERÊNCIA

Para uma melhor análise do método desenvolvido, foi realizada uma comparação dos resultados do método proposto com o método de referência de Lane-eynon descrito na “*Association of Official Analytical Chemists*” (SHNEIDER, 1979). No método de Lane-Eynon os sais cúpricos, em solução de tartarato de sódio e potássio (solução de Fehling), são reduzidos a quente por aldoses ou cetoses formando sais cuprosos de coloração avermelhada. O tartarato reage com os íons Cu(II), formando um complexo solúvel, impedindo assim, a formação de hidróxido cúprico que é insolúvel, o que resultaria na existência de cobre livre na solução alcalina. Na reação observa-se um precipitado vermelho tijolo formado por óxido cuproso (LITWACK, 1960).

## 2.5 ANÁLISES DAS AMOSTRAS

Após a otimização do sistema proposto realizaram-se análises de amostras de sucos e água de coco de diferentes marcas sendo 8 tipos de sucos e 2 tipos de

água de coco. As amostras foram adquiridas em mercados locais da Região Metropolitana do Recife. Também foram realizados testes de adição e recuperação para avaliar o efeito de matriz.

O composto de coordenação sintetizado apresentou-se em forma de pó de coloração azul e não apresentou afinidade por água. Antes da análise das amostras realizou-se um procedimento de diluição das mesmas a fim de deixá-las numa concentração dentro da faixa de trabalho estudada. As amostras foram filtradas usando um filtro 0,42  $\mu\text{m}$  (Whatman) para eliminar partículas dispersas a fim de evitar falhas na leitura do sinal analítico.

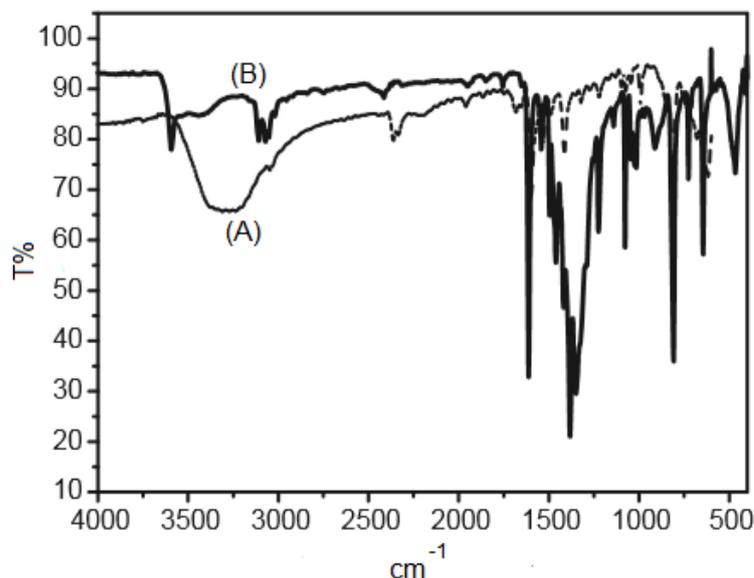
## 2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.6.1 Caracterização do Composto de Coordenação

O composto de coordenação de Cu(II), Cu-Bip, apresentou aspecto cristalino e coloração azul intenso. O teste de solubilidade do complexo Cu-Bip mostrou pouca solubilidade em água e etanol. O complexo não apresentou características higroscópicas, permitindo assim, uma boa manipulação do mesmo para a caracterização e aplicação.

A espectroscopia na região do infravermelho é um método fundamental para a caracterização dos grupos funcionais. O estudo desta técnica permitiu observar o deslocamento de bandas de absorção referente a grupos funcionais do ligante, sugerindo se houve ou não à formação do complexo (ligação coordenativa). A ligação entre o ligante e metal ocasiona geralmente, uma diminuição na constante de força da ligação e nos graus de liberdade da molécula, logo, o sistema passa a vibrar em menores frequências. A Figura 11 mostra o espectro de infravermelho do ligante 4,4'-bipiridina e do composto de coordenação obtido sobrepostos.

**Figura 11** - Espectros na região do infravermelho do ligante livre (A:---) e do composto Cu-Bipy (B: \_\_\_).



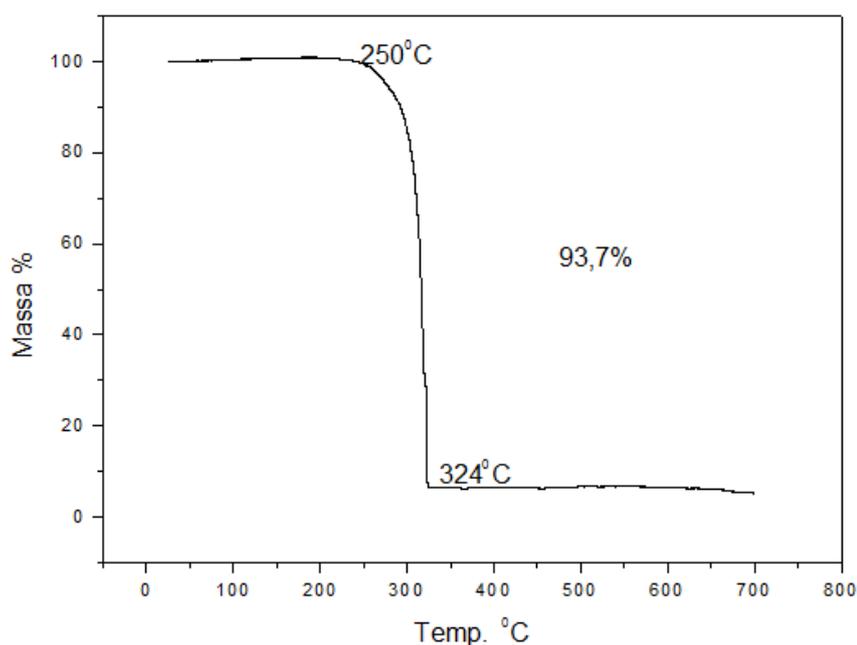
Fonte: LEOTERIO et al., 2015.

Analisando o espectro na região do infravermelho do complexo é possível observar uma banda em torno  $1390\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento C=N, que se encontra deslocada para menor frequência, uma vez que no ligante livre (4,4'-bipiridina) esta banda aparece em torno de  $1414\text{ cm}^{-1}$  (Figura 11A). Este comportamento sugere que o ligante está coordenado ao íon metálico, através do grupo C=N. Os espectros mostram bandas correspondente a deformação axial C-H, em  $3122\text{ cm}^{-1}$  mostra ainda sinais das deformações C-C em  $1570\text{ cm}^{-1}$  para o ligante livre e  $1483\text{ cm}^{-1}$  para o Cu-Bipy. Entre  $3223$  e  $3687\text{ cm}^{-1}$  para o ligante livre é mostrado a banda referente ao grupo OH devido a hidratação, essa banda não é observada no espectro do Cu-Bipy o que é confirmado pela análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica analisou a dinâmica de decomposição e a estabilidade térmica do complexo Cu-Bipy. De forma geral, o produto apresentou apenas um evento térmico bem definido, mostrando a degradação e carbonização do ligante. A temperatura *on-set* é de  $250^{\circ}\text{C}$  com término em  $324^{\circ}\text{C}$ , referente a uma perda de massa de aproximadamente 93,7%. Este comportamento é observado em complexos de cobre (II) que são inflamáveis quando aquecidos em taxas superiores

a  $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Este fato ainda sugere que o Bipy está coordenado ao cobre. Observa-se ainda a ausência de água no composto, o que corrobora com os dados da espectroscopia de infravermelho, ou seja, ausência de banda de absorção relacionado às deformações da ligação do grupo hidroxila presente em moléculas de água. A Figura 12 mostra a curva termogravimétrica do composto Cu-Bipy.

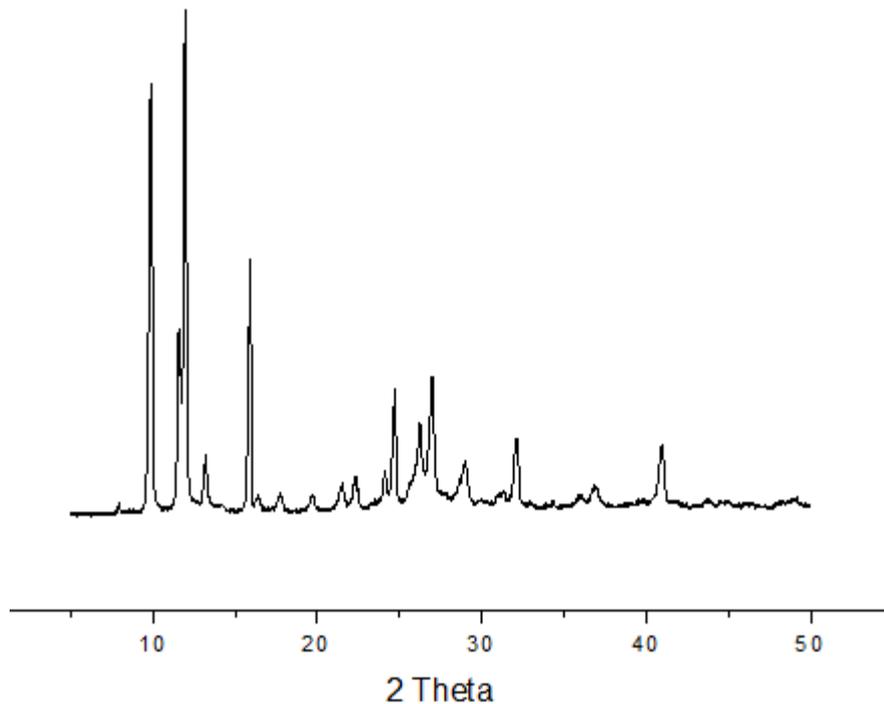
**Figura 12** - Curva termogravimétrica do composto Cu-Bipy.



Fonte: Do autor, 2016.

A avaliação da cristalinidade do composto de coordenação foi feita usando a técnica de difratometria de raios-X, através do método do pó. Se os arranjos dos átomos, planos ou espaçamento paralelos entre planos são irregulares o padrão de difração é característicos de material amorfo com picos largos, porém a presença de picos estreitos indica cristalinidade no material analisado. A Figura 13 mostra o difratograma de raios-X do complexo Cu-Bipy.

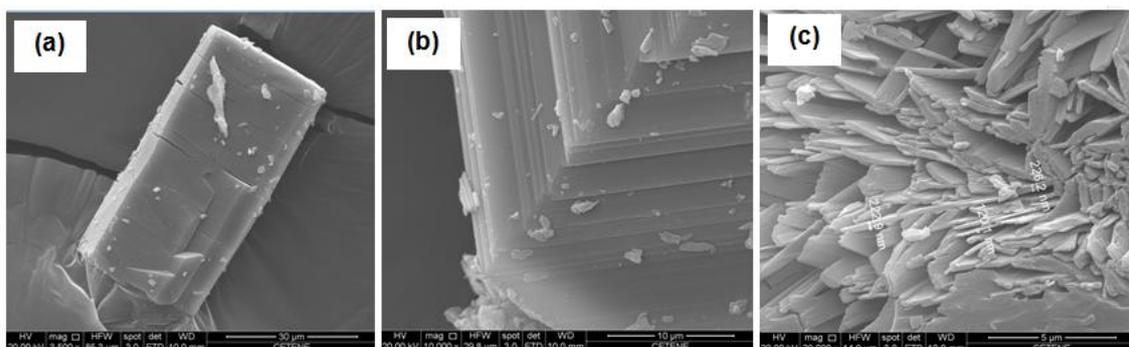
**Figura 13** - Difratoograma de raios-X do composto Cu-Bipy.



Fonte: Do autor, 2016.

Analisando o difratograma do complexo de cobre é possível observar um padrão de difração típico de sistemas policristalinos, ou seja, presença de diversos planos cristalográficos. A morfologia e superfície foram analisadas através da microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 14 são apresentadas imagens de microscopia eletrônica de varredura do complexo Cu-Bipy.

**Figura 14** - Imagens de MEV do complexo Cu-Bipy com aumento de (a) 3.500x, (b) 10.000x, e (c) 20.000x.

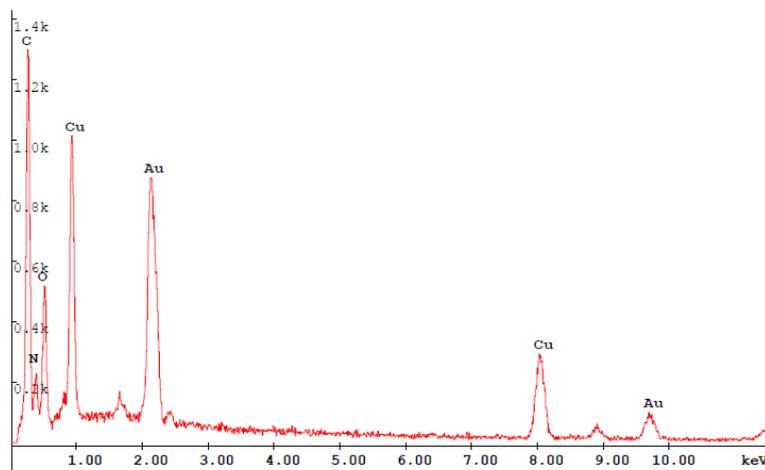


Fonte:LEOTERIO et al.,2015.

A partir da imagem de micrografia é possível observar que se trata de um composto com organização morfológica e homogeneidade. Na Figura 14.a observa-se uma estrutura provavelmente cristalina formando uma placa, com o aumento desta imagem de 3500x para 10000x evidencia uma forma organizada desses cristais (Figura 14.b). Na Figura 14.c, com aumento de 20000x, observa-se um aglomerado dessas estruturas com espessuras de placas da ordem de 200 nm.

A Figura 15 apresenta o EDS do composto Cu-Bipy. Analisando os dados obtidos é possível observar a presença de carbono, nitrogênio, oxigênio e cobre, corroborando com os dados de caracterização.

**Figura 15** - EDS do composto de coordenação de cobre (II) – 4,4'-bipiridina.

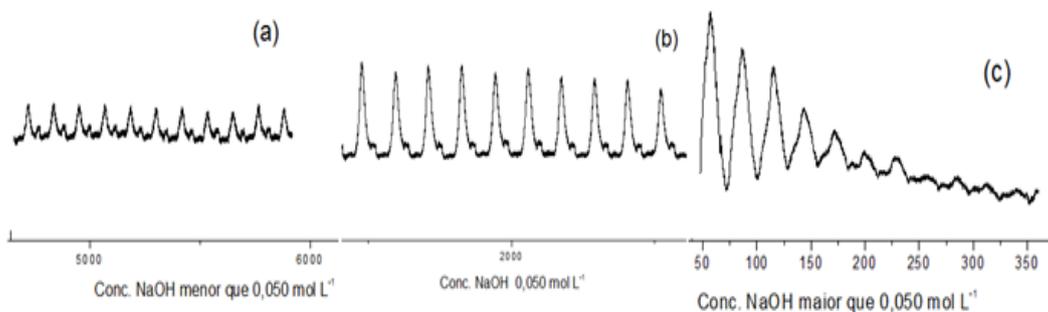


Fonte: LEOTERIO et al., 2015.

## 2.6.2 Desenvolvimento do método para determinação espectrofotométrica de açúcares redutores

Inicialmente, realizou-se o estudo da concentração de hidróxido de sódio variando-se a concentração entre 0,025 e 0,100 mol L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos para o estudo da concentração de NaOH são apresentados na Figura 16.

**Figura 16** - Perfil de sinais analíticos para o estudo da concentração de NaOH menor que 0,050 mol L<sup>-1</sup> (a); igual a 0,050 mol L<sup>-1</sup> (b); e maior que 0,050 mol L<sup>-1</sup> (c).

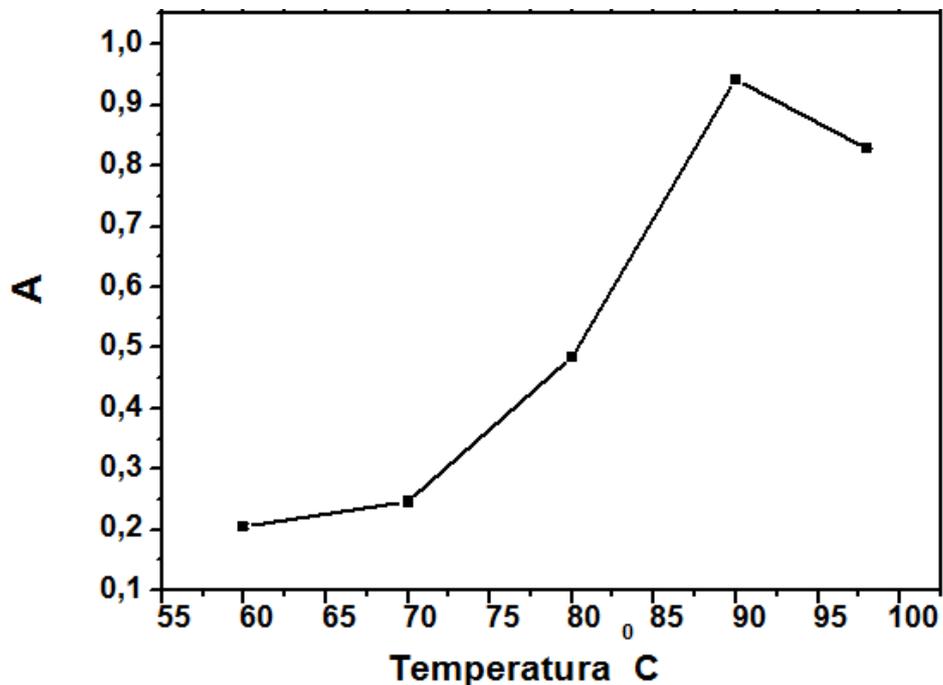


Fonte: Do autor, 2016.

Através da análise do perfil dos sinais analíticos (Figura 16), com uma solução de açúcar redutor de 10 g L<sup>-1</sup>, observa-se que em concentrações abaixo de 0,050 mol L<sup>-1</sup>, os sinais apresentam baixa magnitude (Figura 16a) quando comparados aos sinais referente à concentração 0,050 mol L<sup>-1</sup> (Figura 16b). Em concentrações acima de 0,050 mol L<sup>-1</sup> os sinais analíticos diminuem drasticamente, uma vez que a fase sólida presente na coluna de reação se degrada rapidamente (Figura 16c). Neste caso foi selecionada a concentração 0,050 mol L<sup>-1</sup>, o qual permitiu um melhor resultado na intensidade e repetitividade dos sinais analíticos, além de não causar a degradação na fase sólida.

Estabelecida a concentração de hidróxido de sódio, foi realizado o estudo da influência da temperatura na reação da fase sólida com a solução de açúcar redutor, na de concentração 10 g L<sup>-1</sup> (Figura 17).

**Figura 17** - Gráfico da Influência da temperatura na absorvância do produto obtido.



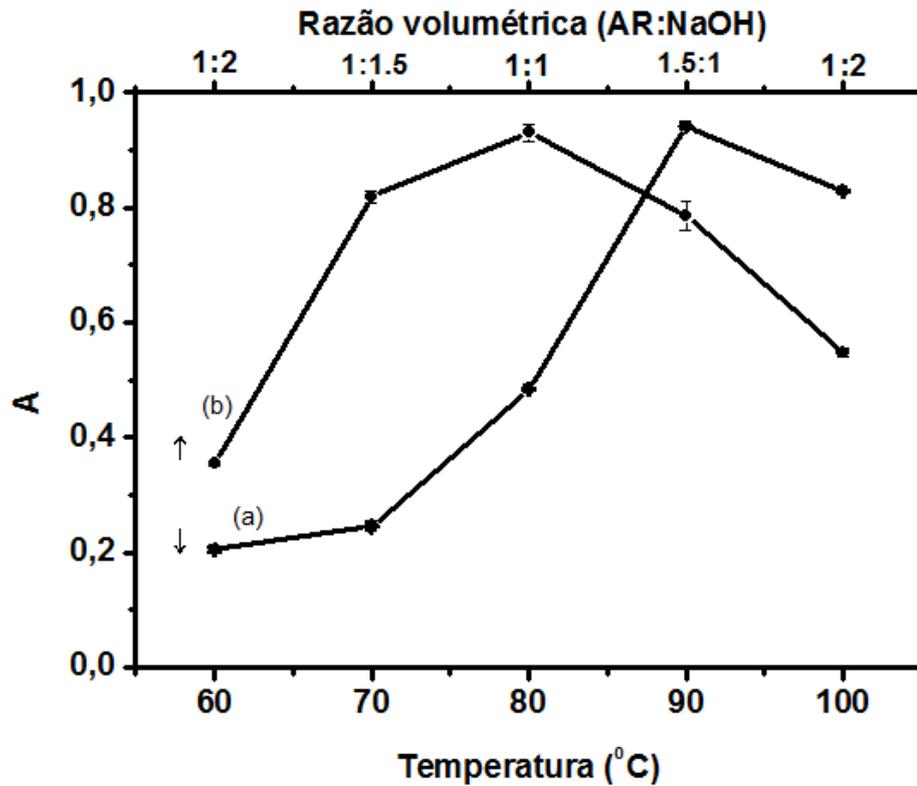
Fonte: Do autor, 2016.

Através do gráfico apresentado na Figura 17, é possível observar que o aumento gradativo da temperatura de 60 para 90 °C ocasiona um aumento na resposta analítica (absorvância). Em temperaturas superiores a 98 °C o sinal analítico é diminuído. Dessa forma, foi selecionada a temperatura de 90 °C para o desenvolvimento do método em fluxo proposto para a determinação de açúcares redutores.

Em seguida realizou-se o estudo da razão volumétrica entre RS e hidróxido de sódio. Para tanto, utilizou-se a temperatura de 90 °C, uma solução de hidróxido de sódio de 0,050 mol L<sup>-1</sup>, uma solução de RS 10 g L<sup>-1</sup> e, estabeleceu-se um total de dois pulsos para injeção das soluções de amostra e NaOH.

Neste caso a razão volumétrica afetou a sensibilidade do procedimento. Na Figura 18 é apresentada a resposta analítica variando-se às proporções volumétricas RS/NaOH.

**Figura 18-** Efeito da temperatura (a) e da razão volumétrica (b) entre AR/NaOH.

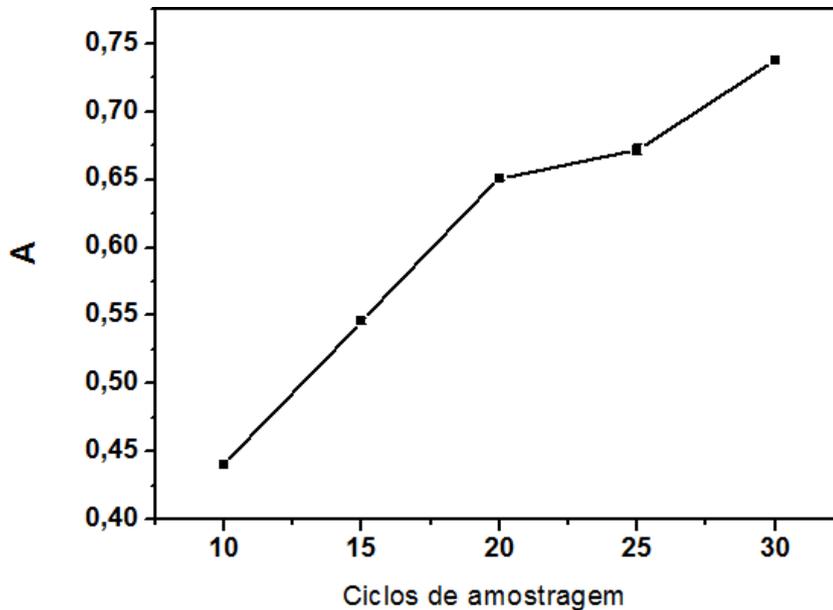


Fonte: LEOTERIO et al., 2015.

Observou-se que na proporção açúcar redutor/hidróxido de sódio de 0,5:1, o valor de absorbância foi baixo, e a medida que aumenta essa proporção (máximo 1/1) é aumentada a absorbância. Desta forma, fica estabelecida a razão volumétrica de 1/1 para o sistema em fluxo proposto.

Após a realização do estudo de razão volumétrica, efetuou-se o experimento para a definição do número de ciclos. Neste estudo houve uma variação do número de ciclos de 10 a 30, cuja taxa foi de 5 ciclos. Para execução do estudo de número de ciclos utilizou-se uma concentração de açúcar redutor de 5 g L<sup>-1</sup> e tempo de acionamento da minibomba da amostra foi de 0,1s para dois pulsos. Na Figura 19 é apresentado o gráfico da influência do número de ciclos de amostragem na determinação de açúcares redutores para o sistema proposto.

**Figura 19** - Influência do número de ciclos de amostragem na magnitude do sinal Analítico.

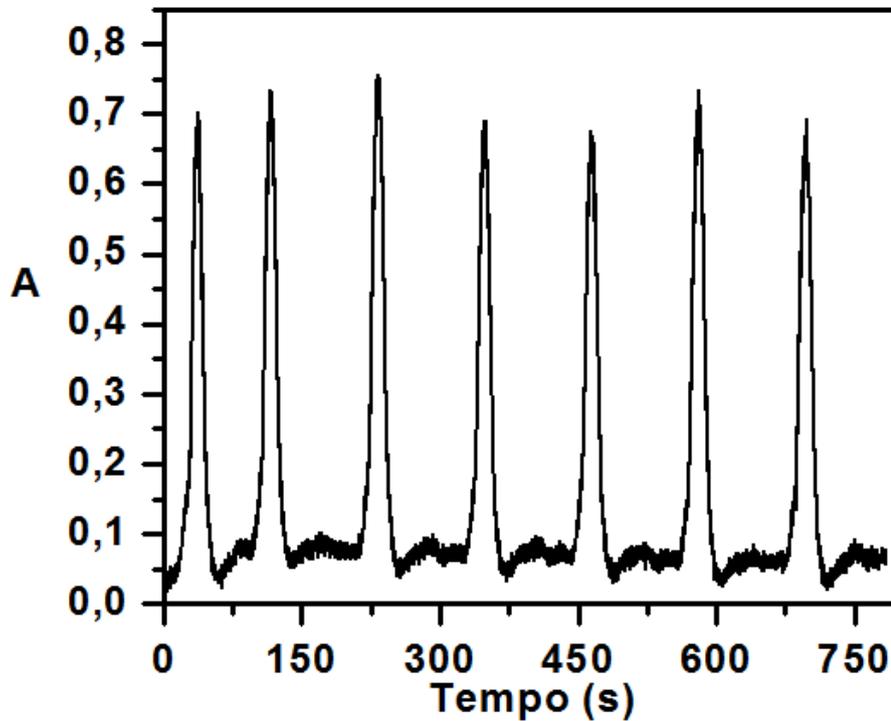


Fonte: Do autor, 2016.

De acordo com os resultados mostrados na curva, observa-se que o sinal analítico aumenta linearmente entre 10 e 20 ciclos; e aumenta não proporcionalmente a partir de 20 ciclos. O sinal analítico foi maior com 25 e 30 ciclos de amostragem, contudo fixou-se em 20 o número de ciclos de amostragem, o qual corresponde ao volume de 320  $\mu\text{L}$  de uma solução de açúcar redutor com concentração de 5  $\text{g L}^{-1}$ . Apesar da condição 25 e 30 ciclos ter magnitude de sinal maior que a condição de 20, a condição 30 ciclos não foi selecionada devido a uma maior geração de resíduos e efeito Schlieren (ROCHA ; NÓBREGA, 1996).

Após o estudo de número de ciclos foi verificada a estabilidade da linha de base e a repetibilidade do sinal analítico, utilizando a água destilada como agente carreador. Não foi observada instabilidade na linha base após uma repetição de sete sinais (Figura 20).

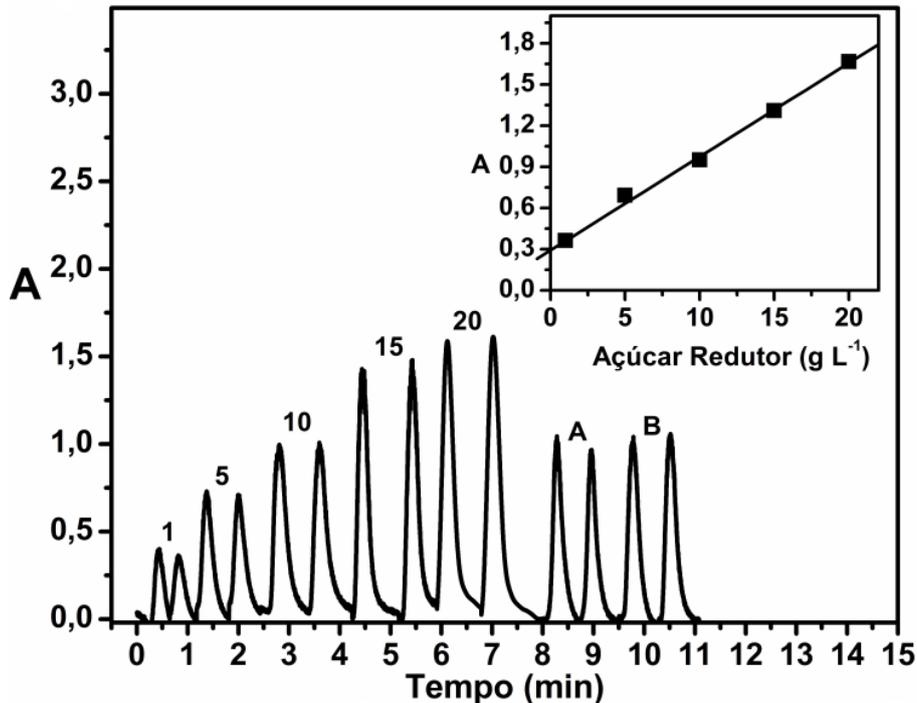
**Figura 20** - Avaliação de linha de base e repetibilidade do sistema em fluxo multicomutado.



Fonte: Do autor, 2016.

Com a repetição dos sinais analíticos foi estimado o desvio padrão relativo em 4,47%, demonstrando assim, a estabilidade da linha de base do sistema proposto. Os sinais transientes obtidos para as soluções de referência foram obtidos através da variação da concentração entre 1,00 a 20,0 g L<sup>-1</sup> e para as amostras (A e B) utilizou-se a concentração de 10 g L<sup>-1</sup> (Figura 21). A curva analítica correspondente à análise de amostras também é apresentada na Figura 21.

**Figura 21** - Sinais transientes referentes às soluções de referência (1,00; 5,00, 10,0; 15,0; 20,0 g L<sup>-1</sup>); A e B Sinais transientes referentes às amostra 10 g L<sup>-1</sup> e a curva analítica.



Fonte: LEOTERO et al., 2015.

Observa-se que a resposta analítica para as soluções de referências estudadas apresentaram repetibilidade para cada solução de referência e amostra. O sistema em fluxo proposto mostrou uma resposta linear entre 1,00 gL<sup>-1</sup> e 20,0 gL<sup>-1</sup>, de acordo com o método dos mínimos quadrados, obteve-se a equação linear  $Y = (0,29 \pm 0,04)C + (0,068 \pm 0,0023)$  e coeficiente de correlação linear  $r = 0,9978$ ,  $n = 5$ , onde  $Y$  é o sinal analítico e  $C$  é a concentração de açúcar redutor. De acordo com os resultados pode-se afirmar que o sistema multicomutado proposto é viável para análise de amostras de açúcares redutores. Na Tabela 5 são apresentadas as figuras de méritos do sistema proposto.

**Tabela 5** - Características analíticas do sistema em fluxo multicomutado proposto.

<b>Figuras de mérito</b>	
Linearidade (g L <sup>-1</sup> )	1,00-20,0
Limite de detecção (g L <sup>-1</sup> )	0.225
RSD (%)	4,47
Consumo de NaOH ( mg)	0,32
Massa de reagente sólido (mg)	50
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9978
Geração de efluente (mL)	0,32
Frequência analítica (h <sup>-1</sup> )	75

Fonte: Do autor, 2016.

As características do sistema em fluxo multicomutado proposto são de fundamental importância para um novo método analítico, tendo como destaque a frequência analítica de 75 por hora, o baixo consumo de solução de amostra e reagentes; e a geração de pouco efluente, pois na metodologia oficial temos um consumo de amostra e reagente elevado em comparação com o procedimento proposto. Na Tabela 6 são apresentadas as características analíticas de sistemas em fluxo para determinação de açúcares redutores comparados a este trabalho.

**Tabela 6** - Características analíticas de sistemas em fluxo para determinação de açúcares redutores comparados a este trabalho.

	(Oliveira et. al., 2001)	(Maquieira et. al., 1987)	(Araújo et. al., 2000)	(Sartini et. al., 1998)	(Lopes et. al., 1995)	Este trabalho
<b>Limite de detecção (g L<sup>-1</sup>)</b>	0,0016	—	1,2 ou 11,2	—	—	0,225
<b>Frequência analítica (h<sup>-1</sup>)</b>	54	50	18 ou 14	15	50	75
<b>Faixa linear (g L<sup>-1</sup>)</b>	7.2-72 x10 <sup>-3</sup>	0,05 – 1,0	2 - 25 ou 20 - 140	—	25-200	1-20
<b>R.S.D. (%)</b>	1,9 (n=12)	1,61 (n=3)	2,1 ou 1,7 (n=10)	< 0.9	< 4	4,47 (n=7)

Fonte: LEOTERIO et al., 2015.

### 2.6.3 Análise das amostras

Concluída a otimização dos parâmetros físico-químicos do sistema em fluxo multicomutado proposto foram analisadas 10 amostras, sendo oito amostras de sucos de diversas marcas e sabores; e duas amostras de água de coco de marcas diferentes. O sistema também foi aplicado em cinco amostras de suco para o teste de adição e recuperação. Antes da análise das amostras realizou-se um procedimento de diluição das mesmas a fim de deixá-las numa concentração dentro da faixa de trabalho estudada. Os resultados para os testes de adição e recuperação estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7-** Resultados obtidos para os testes de adição e recuperação.

Amostras	Adicionado (g L <sup>-1</sup> )	Encontrado (g L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
1	10,0	9,86 ± 0,02	98,6
2	10,0	10,95 ± 0,01	109,5
3	10,0	9,46 ± 0,01	94,6
4	10,0	10,93 ± 0,03	109,3
5	10,0	9,60 ± 0,01	96,0

Fonte:LEOTERIO et al., 2015.

Os resultados apresentados demonstram a exatidão do método analítico proposto conforme descrito por Taverniers, Loose, e Bockstaele, em 2004. As recuperações nas amostras variaram de 94,6 e 109,5 %, demonstrando que não há influência de interferentes da matriz analisada, corroborando a eficiência do método na determinação dos açúcares redutores.

Os resultados obtidos na determinação dos açúcares redutores para 10 amostras usando o método proposto são mostrados na Tabela 8. Esses valores apresentaram-se de forma concordante quando comparado ao método oficial de Lane-Eynon com nível de confiança foi de 95 %.

**Tabela 8** - Resultados obtidos para a determinação dos açúcares redutores pelo método proposto e pelo método de Lane-Eynon.

AMOSTRAS	MÉTODO PROPOSTO g L <sup>-1</sup>	MÉTODO DE LANE-EYNON g L <sup>-1</sup>
1	38,35 ± 0,01	31,20 ± 0,07
2	41,30 ± 0,03	43,90 ± 0,1
3	57,75 ± 0,01	62,00 ± 0,1
4	54,40 ± 0,05	61,85 ± 0,1
5	45,50 ± 0,01	48,85 ± 0,3
6	69,40 ± 0,04	76,65 ± 0,1
7	98,50 ± 0,01	104,5 ± 0,2
8	58,90 ± 0,07	61,65 ± 0,2
9	68,70 ± 0,02	67,65 ± 0,2
10	61,80 ± 0,05	67,00 ± 0,1

Fonte:LEOTERIO et al., 2015.

## 2.7 CONCLUSÃO

O composto de coordenação Cu-Bipy foi sintetizado por reação hidrotermal, apresentou coloração azul e foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura, acoplado a espectroscopia de energia dispersiva; e difração de raios-x. Os dados obtidos por essas caracterizações sugerem que o íon Cu(II) se condensou efetivamente ao ligante bipyridina

O procedimento desenvolvido baseado no conceito da multicomutação utilizando mini-bombas solenoide para a propulsão das soluções e empregando reatores fase sólida apresentou-se de forma operacional simples e de alta robustez. Essas propriedades somadas à alta produtividade analítica, baixo consumo de amostra e pequena geração de efluentes, tornou o procedimento proposto uma alternativa para análise rotineira na determinação de açúcares redutores em alimentos e bebidas. Este método foi aplicado na determinação de açúcares redutores em amostras de água de coco e sucos, e apresentou um RSD de 4,7 para sete repetições. Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados ao método referência de Lane-Eynon, e aplicado o teste t foi observada uma concordância para 95%, o que confirmam a potencialidade do método proposto. O sistema em fluxo multicomutado empregando reatores em fase sólida nas condições de otimização apresentou uma frequência analítica de 75 por hora e limite de detecção de 0,225 g L<sup>-1</sup>. O desempenho analítico apresentado no procedimento proposto em relação à precisão, exatidão e frequência de amostragem; pode ser comparável a procedimentos citados na literatura, contudo, apresenta uma estrutura de fácil implementação e operação. Outra característica importante do sistema é a baixo custo de implementação e manutenção, o que viabiliza sua aplicação em laboratório de análises de rotina.

### **3 DETERMINAÇÃO DE PERCLORATO EM PRODUTOS HORTÍCOLAS ATRAVÉS DE UM SISTEMA MULTICOMUTADO COM DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA E PRÉ-CONCENTRAÇÃO**

#### **3.1 OBJETIVOS**

##### **3.1.1 Geral**

Desenvolver uma metodologia eficiente para a determinação potenciométrica de perclorato em vegetais usando siloxano, 2,5,8,11,14-pentaoxa-1-silaciclotetradecano em coluna de pré-concentração

##### **3.1.2 Específicos**

Sintetizar um siloxano funcionalizado à base de sílica partindo dos precursores tetraetilortossilicato e tetraetilenoglicol que seja capaz de pre-concentrar o íon perclorato;

Caracterizar o siloxano obtido através das técnicas de ressonância magnética nuclear, análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura;

Empregar o siloxano como resina de pré-concentração num sistema em fluxo multicomutado;

Preparar e avaliar uma membrana sensora seletiva a perclorato;

Aplicar o sistema multicomutado na determinação potenciométrica de perclorato.

## 3.2 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.2.1 Potenciometria

Em 1888, Walther Hermann Nernst estabeleceu a base da potenciometria (ROSS, 1967), descrevendo a origem do potencial do eletrodo entre um metal e uma solução contendo íons desse metal, e o potencial redox entre um metal inerte e uma solução contendo um sistema redox (BAKKER; BHAKTHAVATSALAM; GEMENE, 2008).

A potenciometria é uma técnica eletroquímica bastante conhecida e usada com frequência em análise de amostras alimentares, ambientais, farmacêuticas, entre outras. No campo eletroanalítico se destaca em parte, os eletrodos íons seletivos (ISEs) em análises dessas amostras (MALON et al., 2006).

Esta técnica permite a determinação direta e seletiva da espécie química em estudo de uma forma simples, sem necessidade de reações para a formação de compostos secundários com reagentes, muitas vezes, tóxicos. Associadas a estas características de desempenho, destaca-se ainda a alta rapidez na resposta, geralmente em períodos inferiores a 30 segundos, assim como, a simplicidade do equipamento e da operação. A detecção potenciométrica permite a determinação do analito independentemente da coloração ou turvação das amostras, dispensando técnicas de filtração prévia das amostras (MALON et al., 2006), diferentemente do que acontece em metodologias espectrofotométricas. A potenciometria pode ser acoplada a procedimentos de pré-concentração do analito, permitindo melhorar os limites de detecção dos ISEs.

Atualmente, medições de concentrações em níveis nanomolares são comuns e a detecção de íons em pequenos volumes de amostra na ordem de 1 $\mu$ L mostraram que quantidades baixas podem ser medidas potenciometricamente sem etapas de pré-concentração (LINDNER; PENDLEY, 2013).

A construção dos eletrodos é muito simples e são portáteis, podendo ser usados numa vasta gama de íons. Os eletrodos íon-seletivo permitem a detecção do analito de forma não-destrutiva da amostra em diferentes concentrações, sendo possível a sua miniaturização, sem perda significativa da sensibilidade. Esta técnica é de baixo custo e permite a produção em grandes quantidades destes sensores, os quais podem ser aplicados na monitorização de espécies químicas de interesse (SILVA et al., 2000). O aperfeiçoamento destes sensores contribuem para análises de rotina. Todas as vantagens deste método associado ao baixo custo dos detectores e do equipamento, faz a determinação potenciométrica uma técnica de controle analítico importante, quando comparado a metodologias convencionais, sendo mais trabalhosa e lenta. Para a construção de eletrodos íon-seletivo é necessário uma espécie química, ionóforo, que tem a finalidade de sensor de reconhecimento químico à espécie de interesse.

### 3.2.2 Ionóforos

Sensores potenciométricos baseados em membranas lipofílicas, projetados para detectar um único analito de interesse, estão entre as tecnologias de sensores mais bem estabelecidas e estudadas. Uma característica comum destes sensores é que o reconhecimento do analito ocorre quimicamente por bioreceptores, e por vários outros receptores supramoleculares sintéticos, imobilizados nos substratos poliméricos (SKOOG, 2014). O reconhecimento químico de ânion tem seu estudo iniciado nos anos 60, em torno do mesmo tempo que a química de coordenação de cátions à éteres de coroa e criptandos foi publicada por Pedersen e Lehn (FERNANDES et al., 2001). Entretanto, a química de coordenação de ânions tem recebido pouca atenção, sendo apenas nos últimos 20 anos estudada e aplicada a problemas inerentes à ligação de ânions (MALON et al., 2006). Os ânions desempenham papéis importantes na área da medicina e catálise, e também é associado à eutrofização dos rios (ROSS, 1967) e relacionado com material carcinogênico (BAKKER; BHAKTHAVATSALAM; GEMENE., 2008), uma vez que pode interromper a produção de hormônios necessários para se ter um boa saúde (LINDNER; PENDLEY., 2013). Contudo, a concepção de receptores de íons é

particularmente difícil devido ao maior raio de íons relativamente aos cátions, por interações de ligação eletrostática mais complexas, a maior sensibilidade a variações de pH (SILVA et al., 2000) diferentes dos cátions, apenas um número comparativamente pequeno dos eletrodos seletivos de ânions são conhecidos e suas seletividades são frequentemente pior do que para os cátions (ROSS, 1967; FIEDLER; RUZICKA.,1973). Assim sendo, sensores potenciométricos para ânions bastante lipofílicos tais como  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{IO}_4^-$  e  $\text{NO}_3^-$  são geralmente baseados em membranas poliméricas contendo trocadores de ânions, como sais de amônio lipofílicos (TORRES et al., 2001). Nos últimos anos, foi dada uma especial atenção à concepção e síntese de análogos / homólogos / derivados de poliaminas naturais. Suas estruturas químicas também tem sido atraente para ser explorado no processo de reconhecimento de tecnologias de sensores de aterramento seletivas.

### 3.2.3 Eletrodo Íon-Seletivo (ISE)

A potenciometria baseia-se na medição do potencial de uma célula eletroquímica constituída por um eletrodo de referência e um eletrodo indicador, imersos na mesma amostra, na ausência de corrente elétrica.

Nos últimos anos foram publicados vários trabalhos reportando aplicações de ISE, muitos dos quais foram comercializados para análises de rotina em laboratórios ( SÁNCHEZ-PEDREÑO et al., 2000; SHAMSIPUR et al., 2008; GHOLAMIAN et al., 2011; NEZAMZADEH-EJHIEH; BADRI, 2011; GUPTA et al., 2014). Com a evolução notada nesta área foi permitida a melhora da seletividade, podendo também, diminuir os limites de detecção dos ISE para grandezas na ordem de micro e nanomolar (PÉRES-OLMOS et al., 2001).

Em 1989, Nernst propôs esta técnica, para medir a acidez de uma solução aquosa, com o eletrodo íon seletivo a hidrogênio, (BAKKER; BHAKTHAVATSALAM; GEMENE, 2008). No entanto, devido à sua complexidade não apresentava finalidade prática. Em 1906, Cremer desenvolveu o eletrodo de vidro para a determinação da acidez, destacando a detecção potenciométrica.

Existem vários tipos de eletrodos de referência comercializados, sendo o mais utilizado, o eletrodo de prata/cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ). A potenciometria é aplicada

quando o operador conhece com exatidão o potencial e que este seja constante e completamente independente da solução em análise. Já o eletrodo indicador é constituído por uma membrana sensora seletiva que tem a capacidade de reconhecer a espécie química de interesse sendo possível determinar a concentração de um determinado íon em solução, através da medida da variação do potencial da célula eletroquímica.

Os eletrodos indicadores podem ser classificados segundo vários critérios, sendo importante destacar os eletrodos íon-seletivos. O principal objetivo do ISE é identificar e interagir seletivamente com a espécie de interesse, em que uma alteração da sua atividade (ou concentração) em solução produz uma alteração no potencial químico do sistema e conseqüentemente no potencial elétrico da membrana, o qual pode ser medido relativamente ao eletrodo de referência (MALON et al., 2006). A relação entre a atividade do analito iônico e a variação do potencial registrado é traduzida pela equação de Nernst-Nikolsky (Equação 1).

$$E = E_0 + \frac{RT}{Z_A F} \log a_A \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$E$  = Potencial da célula eletroquímica;

$E_0$  = Potencial normal do eletrodo seletivo, do eletrodo de referência e da junção líquida;

$R$  = Constante dos gases ideais;

$T$  = Temperatura absoluta;

$F$  = Constante de Faraday;

$Z_A$  = Carga do íon primário;

$a_A$  = Atividade do íon primário.

Esta relação é considerada como resposta Nernstiana quando um eletrodo interage com o íon em solução de acordo com um equilíbrio termodinâmico dentro de um determinado intervalo de atividade (ou concentração, caso a força iônica se

encontre ajustada). Graficamente, é possível visualizar quando a diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência em função do logaritmo ( $\log a_A$ ) da atividade iônica (ou concentração) de uma espécie química é linear, apresentando um declive correspondente a **Equação 2**.

$$\frac{2,303RT}{Z_A F} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$Z_A$  = carga do íon;

$F$  = constante de Faraday.

### 3.2.4 Adsorção

A adsorção pode ser entendida como quantidade de uma espécie química acumulada numa superfície sólida da fase estacionária. Este processo poder ser químico, denominado de quimissorção; e físico, onde é denominado de fisissorção. A quimissorção ocorre quando há formação de ligações químicas entre as espécies adsorbato e adsorvente alterando as propriedades químicas, assim sendo, considera-se como uma nova espécie química. Na fisissorção, não ocorre mudança nas ligações químicas, ocorrendo adsorção por interações do tipo Van der Waals e/ou ligações de hidrogênio (ARAKAKI, 2000; OLIVEIRA, 2008). A adsorção da espécie de interesse ocorre através de sua imobilização na superfície do adsorvente, esse processo é à base da extração em fase sólida aplicada na separação e pré-concentração de espécies químicas (TUMANG et al., 2009).

### 3.2.5 Sílica

O silício é um dos elementos mais abundante da crosta terrestre, e juntamente com o oxigênio, forma o óxido de composto binário que pode ser encontrado na forma cristalina ou amorfa. O termo sílica refere-se aos compostos de óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) em suas diversas formas, e esses compostos são responsáveis por cerca de 60% em peso de toda crosta terrestre. Assim sendo, a sílica é o principal constituinte

das rochas e areias. A sílica possui uma estrutura semelhante à do diamante em sua forma elementar (LLLER, 1979).

Em 1771, Scheele sintetizou o  $\text{SiF}_4$ , e, em 1823 Berzelius sintetizou o  $\text{SiCl}_4$ , esses foram os primeiros haletos de silício obtidos pela dissolução de óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) em ácidos inorgânicos como HCl e HF, respectivamente. O primeiro organossilano, o tetraetilssilano ( $\text{SiEt}_4$ ) foi sintetizado em 1863 por C. Friedel e J.M. Crafts (DEGEN, 1976).

Podemos encontrar o silício em diversos materiais e suas aplicações permeiam diversas áreas de conhecimento. Os materiais de sílica podem ser utilizados como dispositivos eletrônicos, vidros, argilas, cerâmicas, e tantas outras aplicações de grande importância tecnológica e biomédica (YI, 2006). O silício pertence ao mesmo grupo do carbono, mas apresenta comportamento químico deferente. Esta diferenciação deve-se principalmente aos numerosos compostos do tipo silicopenta ou hexacoordenados (DENMARK; STAVENGER, 2000 ). Esses compostos existem devido à participação dos orbitais 3d vazios localizados no átomo de silício.

A superfície da sílica é formada por grupos silanóis ( $\text{Si-OH}$ ) e siloxanos ( $\text{Si-O-Si}$ ), sendo os silanóis responsáveis pela reatividade da sílica (NASSAR et al., 2002). Essa reatividade confere a esses compostos uma grande diversidade estrutural, além da capacidade de formação de materiais híbridos orgânico-inorgânico. Esta diversidade confere aos materiais de sílica diversas aplicações como, por exemplo, na separação e pré-concentração através da construção de sensores e extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phases extration*). Neste trabalho foi usada uma sílica funcionalizada como fase sólida, para pré-concentrar o íon perclorato, que será determinado potenciometricamente, através de membrana sensora, contendo um ionóforo como reconhecedor químico.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na Tabela 9 são apresentados os reagentes e solventes que foram utilizados neste trabalho, com suas respectivas procedências. Os solventes e reagentes não passaram por nenhum processo de purificação prévio.

**Tabela 9** - Reagentes usados no desenvolvimento deste trabalho.

Reagente	Fórmula	Massa molar (g/mol)	Grau de Pureza (%)	Fabricante
Tetraetilortosilicato	$\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$	208,33	98,0	Aldrich
Tetraetilenoglicol	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$	194,23	99,0	Aldrich
Acetona	$\text{CH}_3\text{COCH}_3$	58,08	99,0	Dinâmica
Dioxano	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	88,11	99,0	Vetec
Etanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	46,07	99,0	Vetec
2-nitrofeniléter	$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_3$	215,20	99,0	Fluka
Cloreto de poli(vinil)	$(\text{CH}_2\text{CHCl})_n$			Fluka
Tetrahidrofurano	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	72,11	99,0	Fluka
Cloreto de sódio	$\text{NaCl}$	58,44	99,0	Fluka
Acetato de sódio	$\text{CH}_3\text{COONa}$	82,03	99,0	Fluka
Borato de sódio	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	381,37	99,0	Fluka
Aminobenzoato de potássio	$\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2\text{K}$	175,23	99,0	Fluka
Nitato de sódio	$\text{NaNO}_3$	84,99	99,0	Fluka
Sulfato de sódio	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	142,04	99,0	Fluka
Fosfato de sódio	$\text{Na}_3\text{PO}_4$	163,94	96,0	Fluka
Brometo de potássio	$\text{KBr}$	119,00	99,0	Fluka
Citrato de sódio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	294,10	99,0	Aldrich
Clorato de sódio	$\text{NaClO}_3$	106,44	99,0	Aldrich

Iodeto de potássio	KI	166,00	98,0	Aldrich
Perclorato de sódio	NaClO <sub>4</sub>	122,44	99,0	Aldrich
Periodato de sódio	NaIO <sub>4</sub>	213,89	99,0	Aldrich
Fluoreto de potássio	KF	58,10	99,0	Fluka
Salicilato de sódio	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub>	160,00	99,0	Fluka
Tiocianato de sódio	NaSCN	81,07	98,0	Fluka

---

Fonte: Do autor, 2016

### 3.3.1 Soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada preparada num sistema Milli - Q (condutividade < 0,1  $\mu\text{Scm}^{-1}$ ) e reagentes de grau analítico.

### 3.3.2 Solução estoque

Foram preparadas soluções em balões volumétricos de 250 mL na concentração de 0,10 mol L<sup>-1</sup> dos íons, a serem avaliados usando os sais cloreto de sódio, acetato de sódio, borato de sódio, aminobenzoato de potássio, brometo de potássio, fluoreto de potássio, fosfato de sódio, nitrato de sódio, sulfato de sódio, fosfato de sódio, citrato de sódio, clorato de sódio, iodeto de potássio, perclorato de sódio, periodato de sódio, salicilato de sódio e tiocianato de sódio.

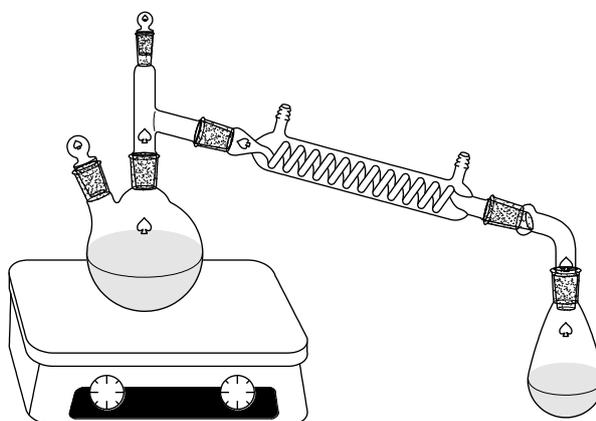
### 3.3.3 Soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque. Foram preparadas soluções em concentrações, cujo intervalo foi de uma década, a partir da diluição da solução estoque. As concentrações das soluções de perclorato variaram de  $1,0 \times 10^{-12}$  a  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>.

### 3.3.4 Síntese e caracterização da sílica funcionalizada (fase sólida)

Em um balão de 100 mL, acoplado a um sistema de destilação (Figura 22), foram adicionados 20 mL de 1,4-dioxano, 2,0 mL de tetraetilenoglicol (TEG), e 3,6 mL tetraetilortosilicato (TEOS). A reação foi mantida em agitação e após 10 min foi adicionado o etóxido de sódio (previamente preparado utilizando 140 mg de sódio metálico e 500  $\mu$ L de etanol). O sistema foi deixado em agitação e refluxo numa temperatura de 120°C pelo período de 4 h.

**Figura 22** - Sistema reacional utilizado na obtenção da fase sólida.



Terminada a reação o solvente foi evaporado e o produto foi lavado com etanol e acetona, e seco sob vácuo. Posteriormente, o material foi caracterizado, por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura. Este material foi preparado e caracterizado no decorrer do mestrado, no entanto todos os procedimentos de síntese e caracterização foram rigorosamente reproduzidos a fim de avaliá-lo como resina de pré-concentração.

A análise elementar de carbono e hidrogênio foi realizada utilizando hélio como gás de arraste, em um equipamento modelo EA 1110 da Carlo Erba (CE Instruments), da Central Analítica no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco.

Os espectros de FTIR dos produtos foram obtidos utilizando-se pastilha de KBr, cuja região espectral foi varrida entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de infravermelho foram obtidos a temperatura ambiente por um espectrofotômetro com transformada de Fourier Bruker, modelo IFS66. As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

As medidas de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (em clorofórmio deuterado,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{29}\text{Si}$  (sólido) foram realizadas em um equipamento VARIAN Unity Plus 300 MHz, da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento da SHIMADZU, modelo TGA-50/50H utilizando um fluxo de 50 mL/min de  $\text{N}_2$  com taxa de aquecimento de 10°C/min até 900°C. Para tanto, a amostra foi pesada e colocada num recipiente de platina onde acontecia o processo de decomposição.

As imagens foram obtidas em um microscópio de filamento de tungstênio da SHIMADZU SS550, com voltagem de 12 KV, sonda 3.0 e distância de trabalho de 16 nm. Cada amostra foi previamente metalizada com uma camada de 10-20 nm de ouro.

### 3.3.5 Construção do eletrodo convencional e tubular

#### 3.3.5.1 Preparação do corpo do eletrodo

Para a confecção do eletrodo proposto, inicialmente, foi preparado um tubo de perspex constituído por polimetilmetacrilato (PMMA), com 7 mm de diâmetro interno e 10 mm de diâmetro externo, com tamanho cerca de 120 mm de comprimento. Para eliminar as superfícies irregulares obtidas, as extremidades dos tubos foram polidas.

### 3.3.5.2 Preparação do suporte condutor convencional e tubular

O eletrodo convencional usado neste trabalho, foi constituído por uma membrana polimérica que continha a espécie responsável pelo reconhecimento químico, depositada diretamente sobre um suporte condutor. Este ionóforo foi cedido pelo grupo de pesquisas de sensores e biosensores da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal liderado pela professora Maria da Conceição Branco S. M. Montenegro.

O suporte condutor, composto por uma resina epoxídica (Araldite® M), um endurecedor HY 5162 e grafite em pó nas proporções adequadas, para servir de apoio à membrana sensora e permitir também a condução do sinal elétrico gerado quando a membrana entrar em contato com o analito.

Para preparo usou-se inicialmente uma mistura de Araldite® M e endurecedor HY 5162, na proporção de 1/0,4 (m/m), obtendo uma mistura homogênea. Foi adicionado uma parte desta mistura ao grafite em pó de modo a obter uma pasta homogênea e de boa consistência. Para permitir a obtenção de unidades funcionais com características adequadas, a relação percentual entre a Araldite, o endurecedor HY 5162 e a grafite, foi de de 32%, 13% e 55% (m/p), respectivamente.

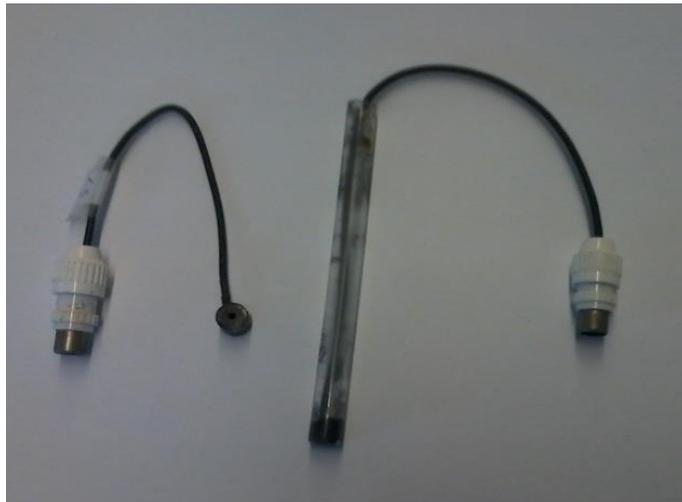
Posteriormente, a pasta preparada foi imediatamente aplicada na extremidade do tubo de perspex, de forma a ocupar uma camada com aproximadamente 5 mm de espessura. Devendo ter o máximo de cuidado para fixar corretamente a pasta às paredes do tubo de acrílico, para evitar qualquer infiltração de líquidos durante a utilização dos eletrodos. Em seguida, foi introduzido pela extremidade oposta um cabo condutor de cobre para permitir o contato direto com o suporte condutor. Para que o fio de cobre fosse fixado ao suporte condutor, o conjunto obtido foi mantido em repouso à temperatura ambiente, durante 48 horas, para que ocorresse a polimerização da resina epoxídica e endurecimento do próprio suporte.

Depois da secagem, o cabo foi fixado na outra extremidade do tubo de perspex com filme plástico. Além disso, de modo a remover o excesso de suporte condutor aplicado e a permitir uma ligeira concavidade para posterior deposição da membrana sensora, promoveu-se o excesso por atrito do suporte de grafite com lixa Rhynewood P420, permitindo também obter uma superfície lisa e eliminar a fração

oxidada. Por fim, para eliminar a presença de eventuais resíduos existentes na superfície condutora, que posteriormente pudesse interferir na geração do sinal elétrico, esta foi limpa eficazmente com papel absorvente embebido em tetrahidrofurano (THF).

Para confeccionar o eletrodo tubular foi cortado tubo de perspex em tamanhos de 10 mm, e depois foi preenchido com a pasta e, em seguida, fixou o fio de cobre após o endurecimento da pasta. Foi feita uma abertura de 0,8 mm d.i. os lados, e os mesmos foram lixados com lixa Rhynowood P420. Para o eletrodo convencional foi feito o mesmo procedimento. Na Figura 23 é apresentada uma fotografia dos eletrodos confeccionados neste trabalho.

**Figura 23** - Imagem dos eletrodos usados neste trabalho (eletrodo tubular e convencional).



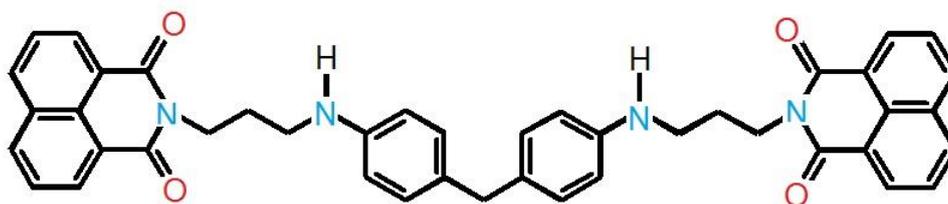
Fonte: Do autor, 2016.

### 3.3.5.3 Preparação das membranas sensoras

A membrana sensora testada ao longo deste trabalho foi preparada usando o bis-naftalimidopropil-4,4'-diaminodifenilmetano (BNIP (4,4) DADPM (LC1)) cedida pelo professor Paul Kong Thoo Lin, *Robert Gordon University Scotland United Kingdom*, (Figura 24) como candidato a ionóforo para preparação de membranas potenciométricas. Vários eletrodos de contato sólido foram incorporados a uma membrana de PVC plastificada com BNIP (4,4) DaDPM em diferentes solventes

mediadores na presença ou na ausência de aditivos (catiônicos ou aniônicos) com alguns íons inorgânicos e orgânicos usuais. Os coeficientes de seletividade indicam claramente que o sensor é seletivo para  $\text{ClO}_4^-$  diante de um número de outras espécies orgânicas e inorgânicas avaliadas.

**Figura 24** - Estrutura química de bis-naftalimidopropil-4,4'-diaminodifenilmetano (BNIP (4,4) DADPM) (GIL et al., 2015).



Fonte: GIL et al., 2015.

Foi dissolvida 180 mg de PVC em 6,0 mL de tetrahidrofurano à temperatura ambiente. Em seguida, 5,8 mg do ionóforo foi solubilizados em 400mg do solvente mediador. Usou-se uma vareta para garantir a homogeneidade da solução. Depois de dissolvido, o PVC foi misturado com os restantes constituintes, obtendo-se assim a membrana sensora.

#### 3.3.5.4 Aplicação da membrana sensora (método convencional)

Depois de preparada a membrana sensora foi depositada, gotejando a solução sobre a superfície do suporte condutor previamente limpo com THF. O solvente foi evaporado à temperatura ambiente entre cada aplicação. O gotejamento da solução sensora foi efetuado o número de vezes necessário para que no final fosse formado uma película com cerca de 2 mm de espessura. A deposição da solução sensora apresentava alguma precaução em determinados aspetos, tais como, não danificar a camada anteriormente aplicada e promover uma distribuição homogênea da membrana ao longo de toda a superfície.

Após obtenção da espessura desejada, os eletrodos foram deixados por cerca de 24 horas em repouso para que todo o THF fosse evaporado. Neste ponto o eletrodo foi coberto com o uso de um béquer, a fim de proteger a superfície dos

eletrodos, para que não fossem incorporadas partículas presentes no ar, que posteriormente pudessem interferir nas características do eletrodo, alterando seu funcionamento.

Antes da utilização dos eletrodos preparados, foi necessária a hidratação da membrana sensora por contato com água Milli-Q, sob agitação intensa e constante, por um tempo mínimo de 30 min.

### **3.3.5.5 Avaliação do eletrodo convencional**

A membrana sensora foi usada na avaliação de diversos íons. Para isso usou-se um béquer de 200 mL com 25 mL de água deionizada, com os eletrodos de trabalho e de referência imersos. O conjunto béquer-eletrodos foi colocado em uma placa de agitação magnética, e com o auxílio de uma pipeta automática (Gilson modelos P100, P1000 e P5000) foram adicionados volumes que variaram de 20 a 2500  $\mu\text{L}$  de sulfato de sódio com concentrações foram  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$   $\text{mol L}^{-1}$ , em intervalos suficientes para a estabilização do sinal analítico. O sinal foi registrado por um voltímetro digital da marca Crison micro pH (sensibilidade de  $\pm 0,1\text{mV}$ ) que mede a diferença de potencial entre os eletrodos indicadores e de referência. Este voltímetro foi acoplado a um comutador de eletrodos da marca Orion, modelo 605. Um eletrodo de Ag/AgCl de dupla junção, Orion 90-02-00, foi utilizado como eletrodo de referência, contendo solução padrão de nitrato de potássio, como solução externa, e cloreto de prata, como solução interna. O aparato utilizado é apresentado na Figura 25.

**Figura 25** - Fotografia do sistema usado na avaliação da membrana sensora.



Fonte: Do autor, 2016.

### 3.3.5.6 Teste de influência do pH

Depois de selecionado o íon perclorato, usou-se as concentrações  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, com variação de pH entre 2 e 12. Fez-se então uma avaliação para verificar a influência do pH na resposta potenciométrica dos eletrodos construídos. Foi utilizado um potenciômetro, contendo um eletrodo de vidro, da marca Phillips GAH 110. A determinação na resposta potenciométrica foi efetuada através da realização de diagramas de Reilley, que consistiam em provocar variações crescentes e decrescentes de pH em soluções da espécie química em estudo a diferentes concentrações. Para isso, foram preparadas duas soluções do íon perclorato num volume de 250 mL, em que as concentrações diferiam entre si uma década (uma solução de concentração  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e outra de  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>). Posteriormente, num bequer de vidro foram colocados, aproximadamente, 200 mL da solução  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, na qual se introduziram três unidades dos eletrodos indicadores construídos, o eletrodo de referência e o eletrodo de pH.

Os ensaios foram realizados no sentido crescente de pH, procedeu-se o ajuste prévio do pH da solução, em que os eletrodos estavam mergulhados, a um valor próximo de 2, através da adição de uma solução concentrada de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Depois foram adicionados pequenos volumes de uma solução concentrada de hidróxido de sódio (NaOH), com o objetivo de promover ligeiras alterações do pH

para valores superiores, até atingir um valor próximo de 12. As variações de pH era na ordem das 0,2 unidades, registrando para cada alteração, o valor do potencial e do pH obtidos.

Após lavagem dos eletrodos com água deionizada sob agitação constante e secagem com papel absorvente, repetiu-se o mesmo procedimento para a solução mais concentrada.

Após obtenção de todos os valores, foi traçado o gráfico do potencial da célula eletroquímica em função da variação de pH, sendo definido como patamar operacional dos eletrodos em estudo, o intervalo dos valores de pH em que as variações do potencial registadas eram inferiores a  $\pm 5$  mV.

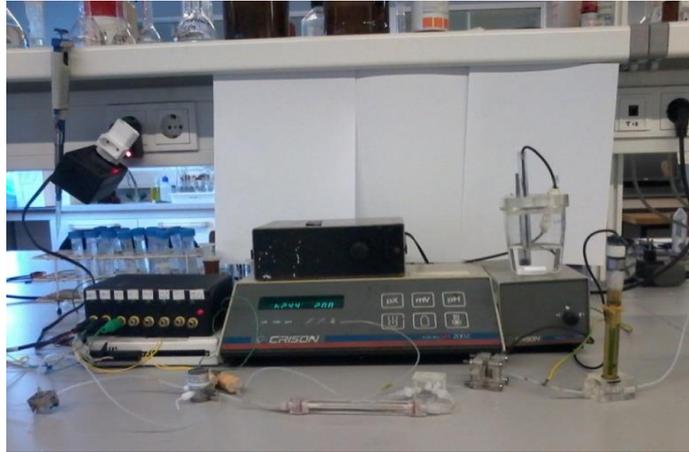
### 3.3.6 desenvolvimento do método proposto empregando sistema em fluxo

#### **3.3.6.1 Preparo da Fase Sólida e do eletrodo tubular**

A avaliação da fase sólida sintetizada foi realizada fazendo uso de duas massas diferentes de composto, 45 e 70 mg. Essas quantidades de massas, foram adicionadas a colunas acrílicas com 0,3 mm de diâmetro interno e 1 ou 2 cm de comprimento, entre duas rolhas de lã de algodão. A inserção da coluna foi feita entre a válvula solenoide e a confluência. O sensor de perclorato com uma configuração tubular, foi preparado por enchimento de um tubo acrílico (10 mm de comprimento e 8 mm de diâmetro) com a pasta polimérica. A ligação elétrica foi assegurada através de um cabo elétrico blindado inserido através de um furo na parede da superfície lateral do tubo. Em seguida, o furo central foi perfurado ao longo da resina condutora, pela qual a mistura do sensor em THF foi descartada. Para permitir a evaporação de THF, os sensores recém-preparados foram deixados à temperatura ambiente durante 24 h. Os sensores foram embebidos em água deionizada durante uma semana antes da primeira utilização para promover a hidratação membrana. O sensor de perclorato com a configuração tubular foi adaptado ao sistema de fluxo multicommutado, e empregado ao sistema de detecção potenciométrica (Figura 26),

e avaliado por meio de respostas para soluções padrões de perclorato com concentrações variando entre  $10^{-9}$  e  $10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>.

**Figura 26** - Fotografia do sistema multicomutado utilizado na determinação do perclorato.

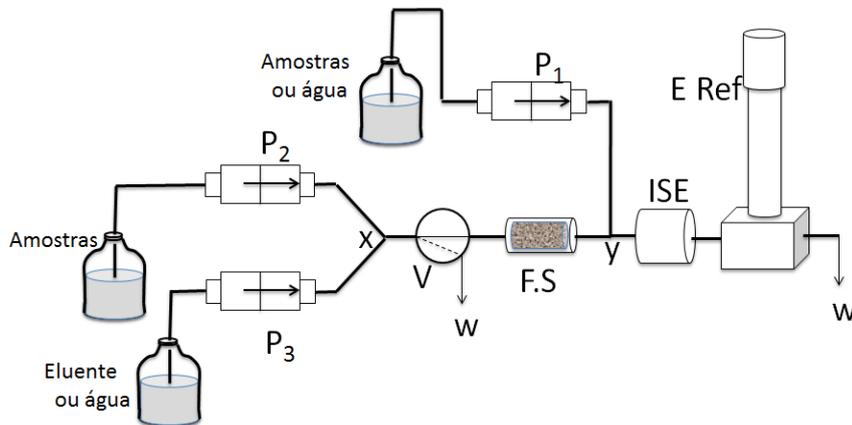


Fonte: Do autor, 2016.

### 3.3.6.2 Sistema em fluxo multicomutado para a determinação de perclorato

O diagrama em fluxo utilizado neste trabalho é apresentado na Figura 27. Para a determinação potenciométrica de perclorato o diagrama se baseou no conceito de multicomutação.

**Figura 27** - Diagrama em fluxo utilizado neste trabalho, onde:  $P_1, P_2, P_3$  = Mini-bombas solenoide de  $\mu\text{L}$ ;  $V$  = válvula solenoide de três vias;  $x, y$  = confluências.; ISE = eletrodo de trabalho; E Ref. = eletrodo referência F.S.= fase sólida.;  $W$  = descarte.



Fonte: Do autor, 2016.

A sequência de acionamento das mini-bombas e válvulas é apresentada na **Tabela 10**.

**Tabela 10** - Sequência de acionamento das mini-bombas e válvulas.

Etapas	$P_1$	$P_2$	$P_3$	$V$	Tempo (s)	Pulsos
	1/0	0	0	0	-	80
Enchimento das mini-bombas	0	1/0	0	1	16	80
	0	0	1/0	1	16	80
Amostragem e pré- concentração	0	1/0	0	0	-	80
	0	0	1/0	0	-	60
Eluição, leitura do sinal e lavagem	1/0	0	0	0	-	100
Troca de amostra	0	1/0	0	1	16	80

\*1 e 1/0 = Acionada; 0 Desativada

Fonte: Do autor, 2016.

Inicialmente as mini-bombas e a válvula são acionadas para que todo o percurso analítico seja preenchido. A mini-bomba  $P_1$  foi empregada para a inserção das soluções de reagentes e de amostras sem a solução passar pela coluna. As soluções de perclorato de concentração que variaram de  $10^{-9}$  a  $10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup> foram inseridas usando a mini-bomba  $P_2$  durante 80 segundos, permitindo assim a pré-concentração da amostra na coluna. Em seguida, uma solução de cloreto de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi usada como eluente durante 100 s, o perclorato eluído era então detectado. O eluente foi introduzido pela mini-bomba  $P_3$ . Toda vez que a solução de perclorato ou amostra era alterada a válvula solenóide era ativada durante 30 s, e a solução anterior dentro do percurso analítico se dirigia para o descarte, já que foram empregadas para o transporte da zona de amostragem, detecção e limpeza do sistema.

A taxa de bombeamento da mini-bomba  $P_1$  foi resolvida a  $4,0 \mu\text{L s}^{-1}$ , com a solução fluindo através do sensor de perclorato por um tempo de 100 s. Em seguida, o fluxo foi interrompido, e a leitura após a estabilização do potencial registado em  $\pm 0,2$  mV. O coeficiente de seletividade potenciométrico para os ânions mais comuns apresentados na matriz de amostra foram avaliadas por meio do método de interferência fixa (PÉREZ, et al., 2003) por adição de volumes de perclorato rigorosamente de solução para soluções contendo  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada íon, em seguida foi medido o potencial de interferência resultante.

Para a determinação do íon perclorato, o módulo de análise foi construído empregando-se três mini-bombas solenoide (Ref.P/N 090SPSP12-8 12VDC) de capacidade de  $4,0 \mu\text{L}$  fabricadas pela BIO-CHEM (Valve Inc, Boonton, USA) e uma válvula solenoide de 3 vias, (Ref. Nresearch 161P011). Para a confecção das linhas de fluxo foram utilizados tubos de polietileno de 0,8 mm d.i. Foram também usadas confluências e suporte para os eletrodos de referência tubular construídas em acrílico.

O sistema detector é composto por voltímetro digital da marca Crison micro pH (sensibilidade de  $\pm 0,1$  mV), que mede as diferenças de potenciais, um comutador de eletrodos da marca Orion, modelo 605, Um eletrodo de referência de Ag/AgCl de dupla junção, Orion 90-02-00 e o eletrodo de trabalho preparado. Equipamentos e acessórios complementares, tais como, balões volumétricos, béqueres e pipeta automática, foram utilizados para preparar as soluções. O controle desses dispositivos foi realizado pelo microcomputador, através de uma interface eletrônica

que foi confeccionada no laboratório usando o circuito integrado ULN2803A, o qual estava conectado a uma interface USB6009, (National instruments). A interface USB6009 foi ligada a porta USB do microcomputador conforme apresentado na Figura 6. Para o acionamento das mini-bombas utilizou-se uma interface de potência de 12 V e intensidade de corrente de aproximadamente 2 A. As mini-bombas foram acionadas mantendo uma frequência de 5 Hz, correspondendo aos intervalos de tempo de acionamento (ligado / desligado) de 0,1s/ 0,1 s.

A manipulação do sistema foi permitida devido aos formulários de interação que permite ao analista interagir selecionando as variáveis de entrada de interesse, tais como, número de replicatas, número de ciclos de amostragem, tempo de acionamento das mini-bombas solenóide, válvulas de 3 vias. Para tanto foram criados botões para salvar, parar a mini-bombas e válvulas de 3 vias, e iniciar leitura.

O programa para o controle do módulo de análise foi desenvolvido em linguagem Lab View 8.6, os quais foram estruturados para realizar o controle das variáveis do sistema propostos. Para a aquisição dos dados no procedimento de determinação do íon perclorato foi preciso fornecer dados de entrada como pulsos e tempo de acionamento dos dispositivos. Os dados registrados no voltímetro eram anotados e salvos no programa Microsoft Excel® para tratamento posterior.

### **3.3.6.3 Desenvolvimento do método para a determinação potenciométrica do íon perclorato**

Para a determinação potenciométrica do íon perclorato utilizou-se a metodologia de análise em fluxo baseada na inserção das amostras em contato com eletrodo indicador, onde o ionóforo está presente através da membrana sensora, permitindo a detecção do analito através da diferença de potencial. Antes desse processo, era necessário que a amostra passasse pela coluna, com o objetivo de pré-concentrar o analito, e após a eluição o sinal era registrado. Foram estudados os parâmetros de volume de amostras e tempo de acionamento das mini-bombas, para a introdução das soluções de padrões e amostras.

### 3.4 ANÁLISES DAS AMOSTRAS

Após a otimização do sistema, foram realizadas as análises de amostras de batata, alface, tomate, pimentão, cebola, feijão, cenoura, beterraba e abóbora para determinação do íon perclorato. As amostras foram adquiridas nos mercados locais da Região do Porto, em Portugal. Também, foram realizados testes de adição e recuperação em 5 diferentes tipos de amostras, onde às soluções de amostras foram adicionadas às soluções de referências.

As amostras foram trituradas em seguida foram pesadas cerca de 100 g de cada vegetal triturado sendo transferidos para um misturador com solução de sulfato de sódio ( $0,033 \text{ mol L}^{-1}$ ) na proporção de 1: 3 (w / w). Foram misturadas durante cinco minutos e em seguida centrifugadas a 2000 rpm durante 1 h . O sobrenadante foi filtrado através de filtros de membrana de seringa Corning® - nylon, tamanho de poro de  $0,45 \mu\text{m}$  e estocado para posterior uso ( CALDERON et al., 2014).

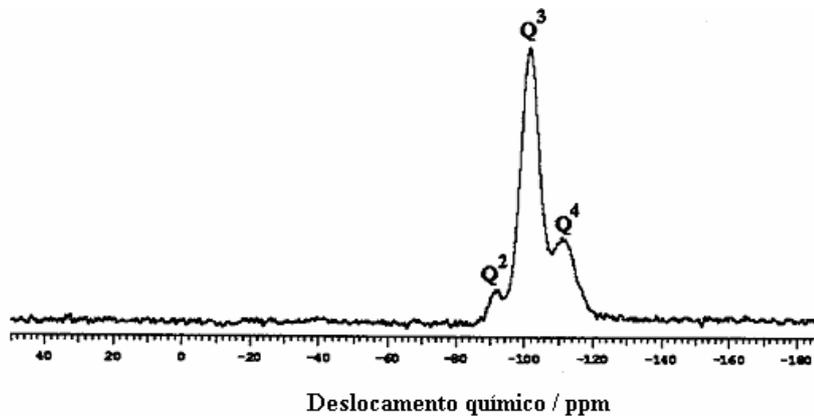
### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Caracterização da Sílica Funcionalizada

O material de sílica, 2,5,8,11,14 - pentaoxa - 1 - silaciclotetradecano , usado na coluna foi obtido na forma de um sólido de coloração branca, e apresentou estabilidade térmica e mecânica.

Na análise do RMN de  $^{29}\text{Si}$  da sílica gel (Figura 28) é verificada a presença de três sinais, atribuídos às espécies Q4, Q3 e Q2, que aparecem em valores aproximados de deslocamento químico de -110, -100 e -95 ppm, respectivamente (MOSCOFIAN; SILVA ; AIROLDI., 2008).

**Figura 28** - Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{29}\text{Si}$  de uma amostra de sílica gel (MOSCOFIAN; SILVA ; AIROLDI., 2008).



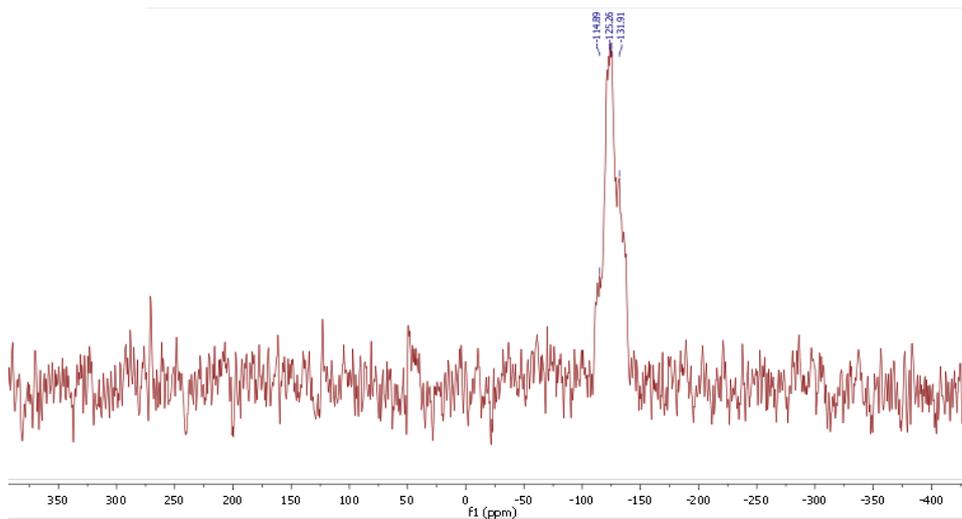
Fonte: MASCOFIAN et al., 2008.

Estes sinais tem relação com os grupos siloxanos (silício ligado a quatro átomos de oxigênio), aos grupos silanóis isolados  $[(\text{SiO})_3\text{SiOH}]$  e aos grupos silanóis geminais  $[\text{Si}(\text{OSi})_2(\text{OH})_2]$ , respectivamente. Na análise das amostras obtidas serão atribuídos sinais a silícios presentes quanto a sua vizinhança química assumindo que as unidades C-O-Si se comportam e apresentam mesmo deslocamento químico que as unidades siloxanos.

No caso da ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido, os espectros indicam o ambiente químico de cada carbono presente nas estruturas das matrizes. A análise desse ambiente químico permite identificar a maneira de como as cadeias orgânicas foram ligadas à rede inorgânica da matriz híbrida. Os sinais apresentados por cada espectro indicam que existe ligação covalente nas estruturas inorgânicas (SALES; PRADO; AIROLDI., 2005).

A **Figura 29** mostra o espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{29}\text{Si}$  da sílica funcionalizada, cujos picos foram identificados.

**Figura 29** - Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{29}\text{Si}$  (sólido) da sílica funcionalizada.

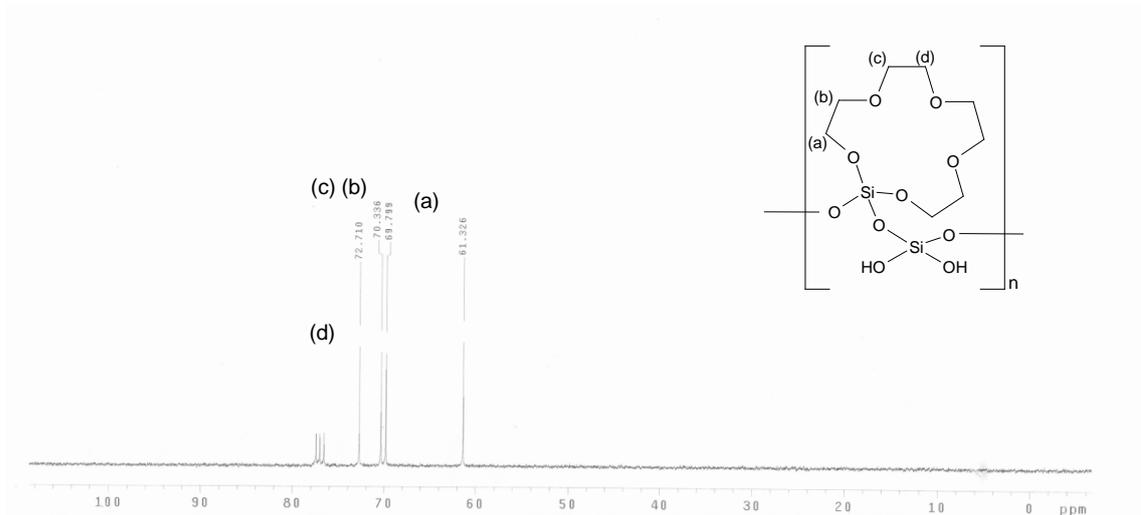


Fonte: Do autor, 2016.

O espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  mostra três sinais. O primeiro sinal aparece com valor de deslocamento químico igual a -114.98 ppm e está relacionado com o silício do tipo Q2. O espectro mostra ainda a presença de silício do tipo Q3, com valor de deslocamento químico igual a -125.26 ppm, e outro em torno de -131.90 ppm referente ao silício do tipo Q4.

A Figura 30 mostra o espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  da sílica sintetizada neste trabalho.

**Figura 30** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  (sólido) (75 MHz).



Fonte: BELIAN et al., 2012.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou os seguintes picos:

**Ca** →  $\delta$  61,326; 2C: referentes aos carbonos próximos ao silício, que apresentam maior blindagem sendo deslocado para a direita (minimizando o efeito do oxigênio próximo ao carbono em questão).

Os demais carbonos aparecem apresentam na região de éteres, entre 60-80 ppm:

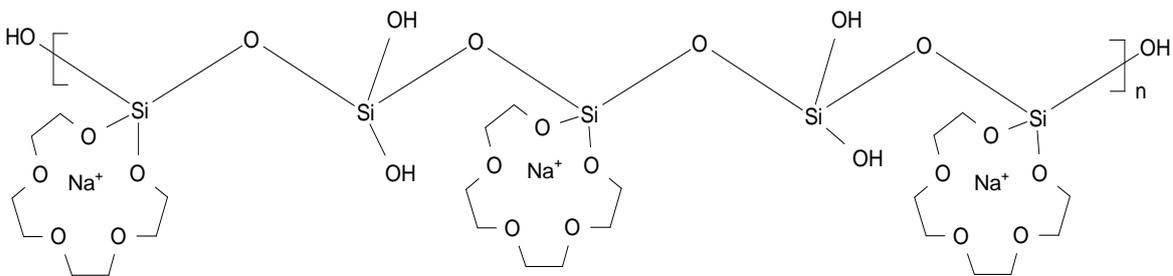
**Cb**:  $\delta$  69,799; 2C; **Cc**:  $\delta$  70,336; 2C; e **Cd**:  $\delta$  72,710; 2C.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostra um sinal com valor de deslocamento químico em torno de 59.18 ppm este sinal se refere aos carbonos próximo ao silício podendo estar ligado de modo a formar o grupo (C-O-Si) indicando a existência da ligação entre o carbono o oxigênio e o silício, o espectro mostra ainda outro sinal com valor de deslocamento químico em cerca de 68.16 ppm este deslocamento esta relacionado com o carbono que esta na região característica para grupo éter (C-O-

C), com evidências da existências de dois tipos de carbono é possível saber como ele se organizam na estrutura analisando a partir do material de partida.

A partir dos dados de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^{29}\text{Si}$ , foi possível atribuir uma estrutura inicial (Figura 31), que posteriormente apresentou coerência frente às demais caracterizações realizadas.

**Figura 31** - Estrutura proposta para a sílica sintetizada, o 2,5,8,11,14 - pentaoxa - 1 – silaciclodeceno-sódico.

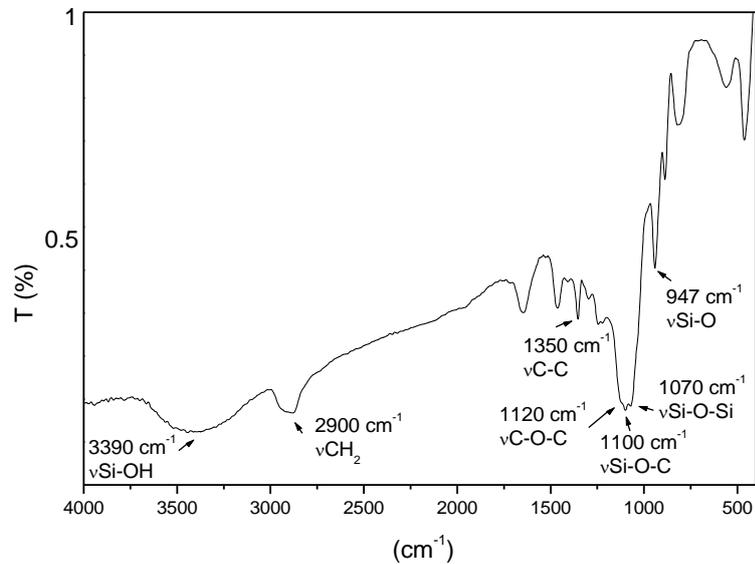


Fonte: BELIAN et al., 2012.

A espectroscopia na região do infravermelho é um método utilizado para caracterizar os grupos funcionais presentes nos compostos sintetizados. Essa técnica é rápida, econômica e não destrutiva, podendo ser aplicada universalmente em análises estruturais e como fonte para a elucidação das relações qualitativas entre espécies (RUSSEL; FRASER., 1994).

O espectro na região do infravermelho para o organosilano sintetizado Figura 32, apresenta bandas características dos grupos que constituem a superfície e o interior da rede inorgânica, e apresenta também bandas características de grupos orgânicos.

**Figura 32** - Espectro de infravermelho da sílica funcionalizada.



Fonte: Do autor, 2016.

Pelo espectro de infravermelho é possível observar uma banda intensa na região de  $1070\text{ cm}^{-1}$ , que é atribuída aos estiramentos dos grupos siloxanos (Si-O-Si) da rede inorgânica de sílica; uma banda também de alta intensidade na região de  $1100\text{ cm}^{-1}$  referente aos estiramentos dos grupos Si-O-C, e, uma banda em  $1120\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos grupos glicóis C-O-C. Observa-se ainda uma banda fraca na região de  $947\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação angular dos grupos Si-OH livres na superfície da rede inorgânica; na região de  $1350\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda referente ao grupo C-C; e, uma banda em  $2900\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao grupo  $\text{CH}_2$ . Também é possível verificar a presença de uma banda intensa em  $3390\text{ cm}^{-1}$  referente aos grupos OH de moléculas de água adsorvidas na superfície do material.

A fórmula mínima proposta para a estrutura está relacionada com os dados obtidos dos espectros de RMN e de infravermelho, no entanto foi necessário realizar uma análise elementar para estimar uma proporção entre silício e carbono na sílica produzida.

A Tabela 11 mostra os dados da análise elementar do composto. Os dados teóricos e experimentais confirmam a fórmula mínima proposta e apresentou um erro menor que 0,2%.

**Tabela 11** - Dados de análise elementar e fórmula mínima para a sílica funcionalizada.

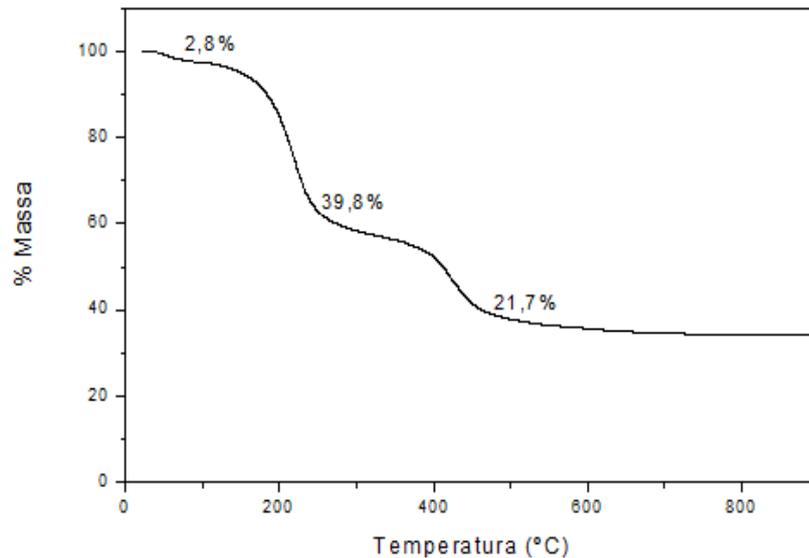
Fórmula mínima	%C		%H	
	Experimental	Teórico	Experimental	Teórico
$\text{Si}_5\text{C}_{30}\text{H}_{69}\text{O}_{28}\text{Na}_3$	33,17	33,15	6,36	6,35

Fonte: Do autor, 2016.

A análise termogravimétrica fornece dados que nos permitem obter conhecimento a respeito da estabilidade térmica dos materiais sintetizados, da temperatura de degradação dos grupos ligados às estruturas e, também, da quantidade de moléculas imobilizadas. Esses dados complementam as informações fornecidas pela análise elementar e pelos métodos espectroscópicos utilizados. Através da termogravimetria pode-se ainda estimar a quantidade de grupos silanóis presente na superfície da sílica gel (FARIAS; AIROLD, 1998). Esses dados são importantes no planejamento estequiométrico de uma reação específica na superfície da rede inorgânica, de maneira que essa informação é fundamental para a realização de reações de imobilização em superfície de polímero inorgânico. Nesta técnica, uma quantidade definida de cada amostra é submetida a um aumento gradual da temperatura em um forno, em atmosfera controlada, e a perda de massa produzida pelos processos decorrentes deste aumento de temperatura é detectada por uma termobalança. Este procedimento gera curvas, que representam a perda de massa de amostra em função da temperatura do forno. Para os compostos sintetizados, a dinâmica de decomposição, bem como, sua estabilidade térmica foi analisada através da técnica de termogravimetria. De maneira geral, todos os produtos apresentaram um padrão característico de decomposição com eventos sucessivos de perda de massa.

A análise termogravimétrica para o composto mostrou três eventos de perda de massa (Figura 33).

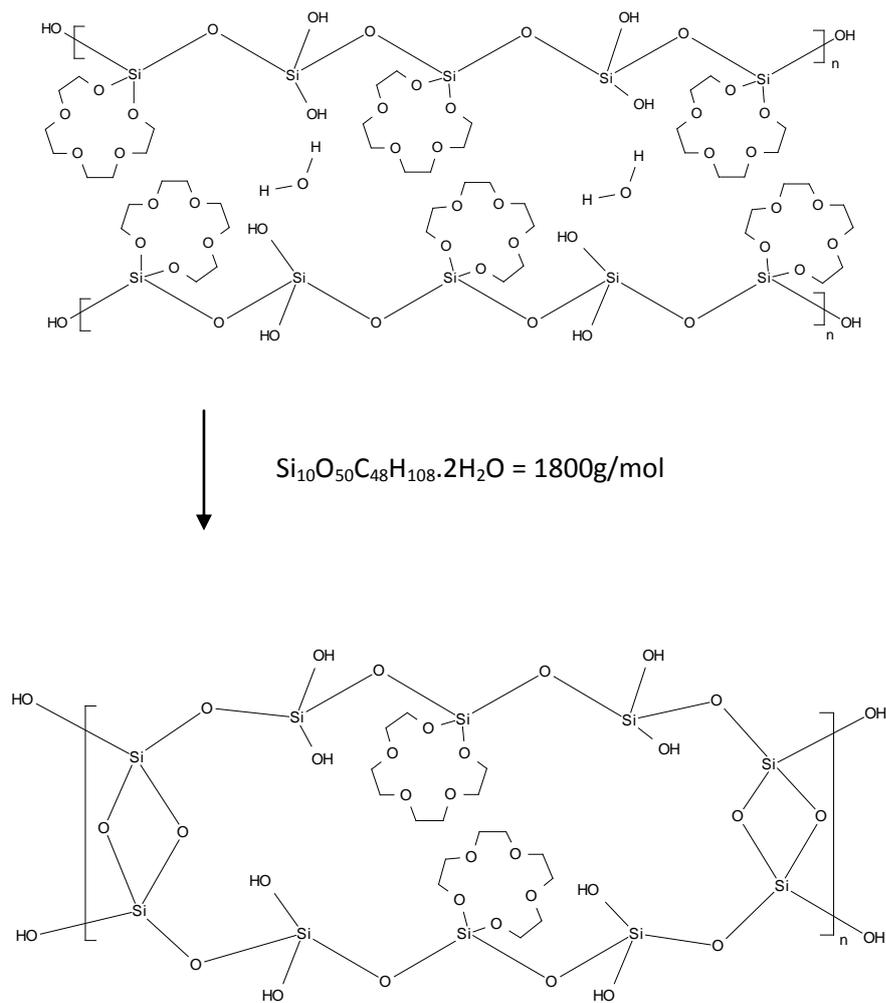
**Figura 33** - Curva térmica da sílica funcionalizada, tendo em destaque os percentuais de perda de massa para cada evento térmico.



Fonte: BELIAN et al., 2012.

Analisando os valores de perda de massa, sugere-se uma estrutura estendida para o composto. A primeira perda de 2,8% em torno de 100 °C atribuiu-se a perda de duas moléculas de água adsorvidas e, na segunda perda de massa, estima-se a saída das moléculas dos grupos glicóis dispostos nas extremidades da rede de sílica, conforme mostra a Figura 34, com uma perda de massa de 39,8%. A terceira etapa mostra uma perda de massa em 21,7 % referente aos glicóis mais internos (ZHURAVLEV, 2000).

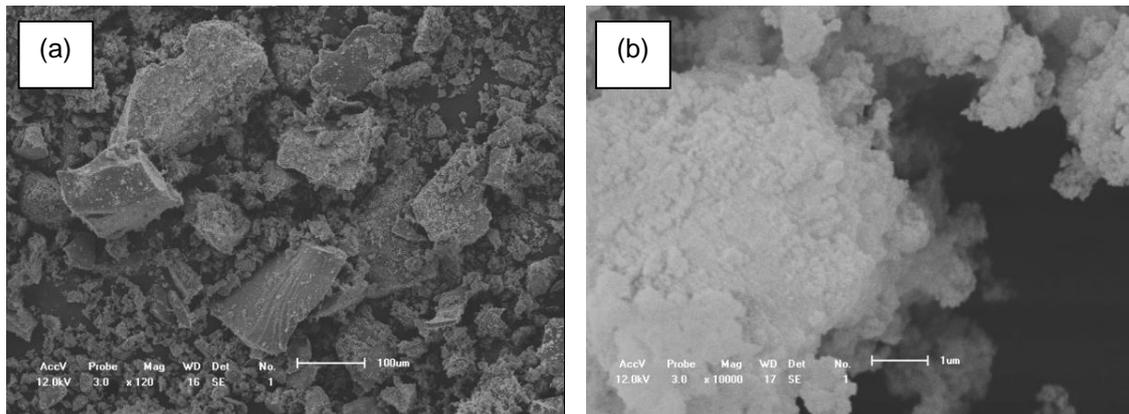
**Figura 34** - Esquema simplificado para a primeira e segunda perda de massa da sílica funcionaliza.



Fonte: BELIAN et al., 2012.

Através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 35) foi possível observar um material aglomerados de partículas e com alta homogeneidade.

**Figura 35** - Micrografias do material ampliadas em (a) 120 vezes e (b) 10.000 vezes



Fonte: BELIAN et al., 2012.

A sílica funcionalizada sintetizada foi usada como fase sólida para pré-concentrar o íon perclorato. Em seguida o perclorato foi determinado potenciometricamente usando um eletrodo íon seletivo à base de Bisnaftalimidopropil-4,4-diaminodifenilmetano como molécula sensora.

### 3.5.2 Avaliação do eletrodo convencional

No decorrer deste trabalho, foi utilizado um eletrodo desenvolvido por Gil e colaboradores (2015) contendo a bisnaftalimidopropil-4,4-diaminodifenilmetano, como espécie eletroativa a ser usada na construção de eletrodos seletivos a íons. Em testes iniciais, para verificar as características de seletividade aniônica foram avaliados diferentes espécies aniônicas tais como, acetato, aminobenzoato, borato, brometo, citrato, cloreto, clorato, fluoreto, fostato, hidrogenofosfato, iodeto, nitrato, perclorato, periodato, salicilato, sulfato tartarato e tiocianato na concentração de  $10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, na presença da membrana polimérica constituída por 1% do ionóforo, 31%

de PVC e 68% do solvente mediador (oNPPE). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12.

Na Tabela 12, é possível observar que o BNIP (4,4) Dapm (LC1) apresentava seletividade por resposta potenciométrica Nernstiana.

**Tabela 12** – Respostas potenciométricas do sensor obtidas para diferentes espécies aniônicas.

Ânions	Resposta potenciométrica	Ânions	Resposta potenciométrica
Acetato	Ausente	Hidrogenofosfato	Ausente
Aminobenzoato	Ausente	Iodeto	Nernstiana
Borato	Ausente	Nitrato	Ausente
Brometo	Ausente	Perclorato	Nernstiana
Citrato	Nernstiana	Periodato	Nernstiana
Cloreto	Ausente	Salicilato	Nernstiana
Clorato	Nernstiana	Sulfato	Ausente
Fluoreto	Ausente	Tartarato	Ausente
Fostato	Ausente	Tiocianato	Nernstiana

Fonte: GIL et al., 2015

Deste modo foi verificado resposta potenciométrica Nernstiana para sete espécies: o citrato, o clorato, o iodeto, o perclorato, o periodato, o salicilato e o tiocianato, o que mostra a capacidade do BNIP (4,4) DaPM (LC1) ser usado como reconhecedor de espécie química, sendo o BNIP (4,4) DaPM (LC1) um promissor ionóforo para o desenvolvimento de sensores potenciométricos. Em seguida, foram avaliadas as características gerais de funcionamento do sensor para os diferentes Ânions que apresentava uma resposta potenciométrica que segue a equação de Nernst, através da realização de curvas de calibração. Para tanto, foram preparadas soluções padrão em concentrações que permitissem, após o traçado da curva de calibração,

obter dados como o limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite prático de detecção (LPD) e o declive da zona de resposta linear.

**Tabela 13** - Características gerais de funcionamento do Sensor para ânions estudados neste trabalho e na referência (GIL et al.,2015)

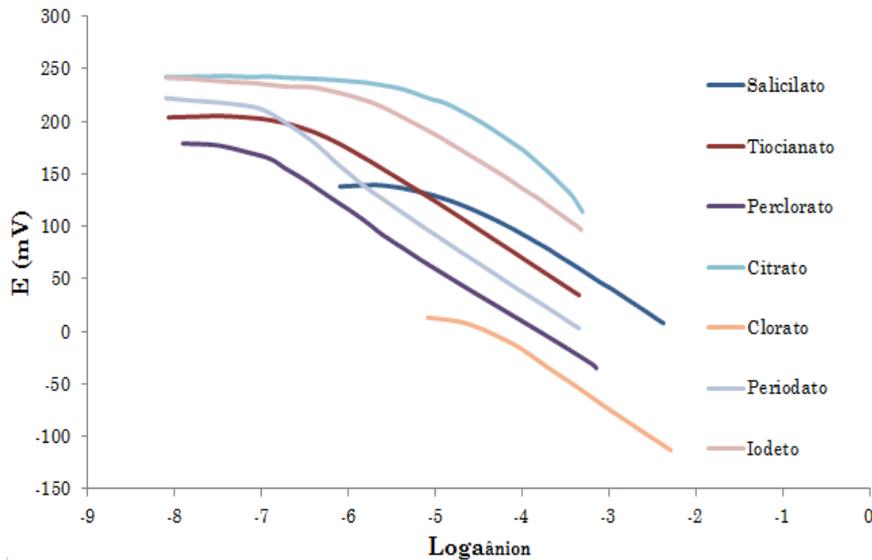
	Citrato	Clorato	Iodeto	Perclorato	Periodato	Salicilato	Tiocianato
<b>Ânion</b>							
<b>Características de desempenho</b>							
Declive (mV/dec)	-57,1	-55,7	-51,9	-54,1	-57,6	-49,1	-51,5
Reprodutibilidade							
Entre calibrações	4,6 <sub>n=2</sub>	---	2,0 <sub>n=3</sub>	0,7 <sub>n=3</sub>	1,57 <sub>n=4</sub>	---	2,5 <sub>n=2</sub>
Entre eletrodos	1,8 <sub>n=3</sub>	0,5 <sub>n=4</sub>	0,4 <sub>n=3</sub>	1,3 <sub>n=3</sub>	0,5 <sub>n=3</sub>	1,2 <sub>n=4</sub>	1,6 <sub>n=3</sub>
$R^2$	0,9841 <sub>n=6</sub>	0,9992 <sub>n=4</sub>	0,9978 <sub>n=9</sub>	0,9993 <sub>n=9</sub>	0,9988 <sub>n=12</sub>	0,9964 <sub>n=4</sub>	0,9987 <sub>n=6</sub>
LIRL (M)	$(8,96 \pm 0,00) \times 10^{-6}$	$(4,11 \pm 0,00) \times 10^{-5}$	$(3,26 \pm 0,75) \times 10^{-6}$	$(1,24 \pm 0,00) \times 10^{-7}$	$(9,08 \pm 1,82) \times 10^{-7}$	$(1,97 \pm 0,00) \times 10^{-5}$	$(4,11 \pm 0,00) \times 10^{-7}$
LPD (M)	$(6,47 \pm 0,43) \times 10^{-6}$	$(3,93 \pm 0,19) \times 10^{-5}$	$(1,55 \pm 0,17) \times 10^{-6}$	$(7,66 \pm 0,42) \times 10^{-8}$	$(6,41 \pm 1,76) \times 10^{-7}$	$(1,27 \pm 0,03) \times 10^{-5}$	$(2,77 \pm 0,34) \times 10^{-7}$
pH	---	---	---	[3,5;11]	---	---	---

Legenda: LIRL . Limite inferior de resposta linear; LPD . Limite prático de detecção.

Fonte: GIL et al., 2015.

Os resultados obtidos encontram-se discriminados na Tabela 13 que mostram as características gerais da calibração. Esses resultados mostram as características do funcionamento do eletrodo para diversos íons. Foram avaliados os íons presentes na tabela 13 segundo Gil e colaboradores (2015), com adicional dos resultados para o íon citrato e para os resultados de pH. A Figura 36 mostra as curvas de calibração para os ânions analisados.

**Figura 36** - Curvas de resposta potenciométrica para diferentes ânions, obtidas usando o sensor proposto (GIL et al., 2015).

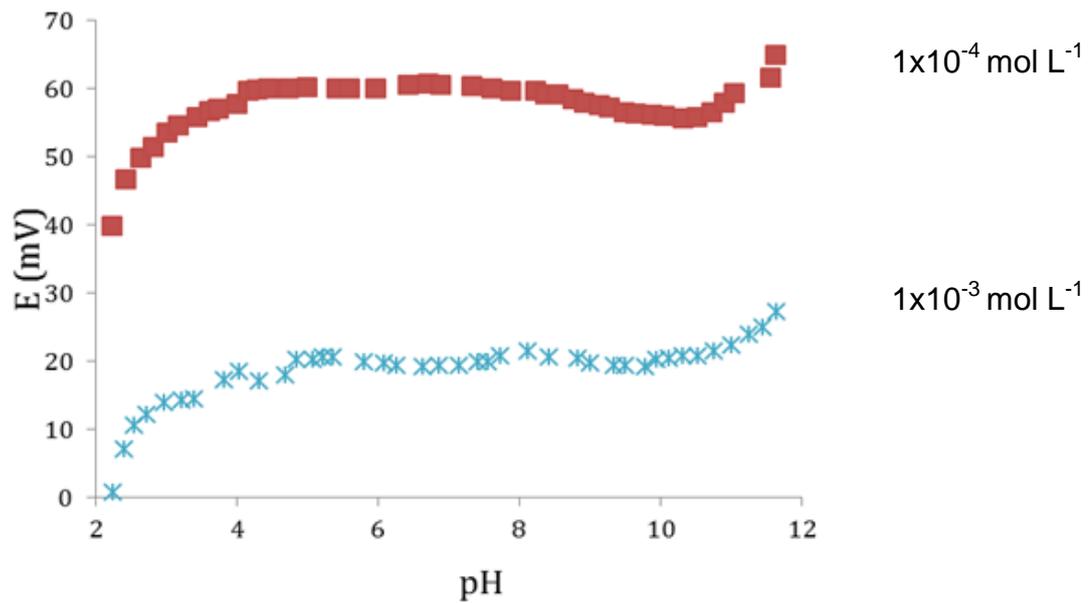


Fonte: Gil te al., 2015

Durante a realização dos vários ensaios experimentais verificou-se uma melhora das propriedades gerais de funcionamento dos eletrodos, que foi atribuída à hidratação progressiva da membrana sensora, o que facilitava a estabilização do sistema interno de referência. Embora, ao fim de várias calibrações, a lixiviação dos constituintes da membrana polimérica conduzia à perda ou diminuição das características de funcionamento dos eletrodos.

O resultado do teste da influência do pH é apresentado na figura 37. O funcionamento do eletrodo nos permitiu afirmar que a faixa de trabalho seria no intervalo de pH que varia de 3 a 10.

**Figura 37** - Influência do pH no eletrodo seletivo de perclorato para as concentrações  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .



Fonte: GIL et al., 2015

### 3 5.3. Sistema em fluxo multicomutado para a determinação potenciométrica de perclorato

Depois da avaliação do eletrodo convencional, realizou-se o estudo com o eletrodo tubular. Inicialmente, realizou-se um teste para a obtenção da curva analítica para o perclorato empregando a membrana sensora depositada no eletrodo tubular.

A solução de perclorato de concentração, numa faixa de  $1,0 \times 10^{-12}$  a  $1,0 \times 10^{-1}$   $\text{mol L}^{-1}$ , foi inserida no sistema pela mini-bomba  $P_1$  (sem pré-concentração) e, posteriormente, pela mini-bomba  $P_2$  passando pela coluna contendo a fase sólida (pré-concentração).

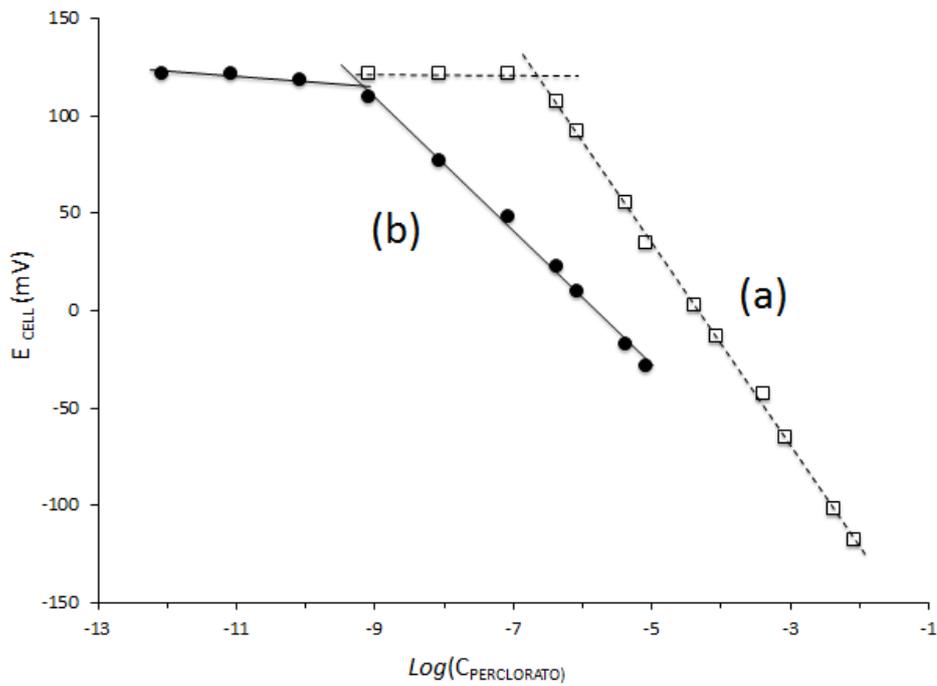
Foi previamente evidenciado que a poliamina bisnafitilimido propil-4,4'-diaminodifenilmetano fornece resultados potenciométricos para a determinação de

perclorato com limite inferior prático de detecção (LPD) de  $7,7 (\pm 0,4) \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e o limite inferior de intervalo linear (LIRL) de  $1,24 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Este desempenho é melhor do que outros eletrodos seletivos a perclorato descritos na literatura (FARRELL, 1997.; GHOLAMIAN, SHEIKH-MOHSENI, & SALAVATI-NIASARI, 2011.; GUPTA, SINGH, SINGH, & UPADHYAY, 2014.; QIN, ZHANG, GAN, & SUN, 2014.; BAGHERIFAM ET AL., 2014.; ONTIVEROS-VALENCIA, TANG, KRAJMALNIK-BROWN, & RITTMANN, 2014), e foi justificada pelo equilíbrio de associação / dissociação ( $\log \beta_{IL1} = 3,18 (\pm 0,04)$ ), estabelecido entre a poliamina e a massa de perclorato na membrana. A ausência de sítios iônicos às impurezas aniônicas na membrana assegura a baixa atividade do perclorato livre e a capacidade de dar resposta nernstiana a níveis baixos do analito. Para acoplar o sensor no sistema de fluxo com robustez física adequada foi adotada a configuração tubular.

A curva analítica obedeceu a equação  $E_{\text{cell}} = -222,1 (\pm 1,5) - 52,4 (\pm 0,6) \log_{[\text{perclorato}]}$ . Os tempos de resposta para obter uma resposta potenciométrica para as soluções de percloratos com concentrações abaixo  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  variou de 80 s até 15 min. De modo a limitar o volume da solução padrão no sistema e a fim de atingir a resposta, o tempo foi fixado em 80 s, e quando necessário a reprodutibilidade da resposta do sensor de perclorato com soluções de concentrações mais elevadas, como  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Numa segunda experiência, a resposta potenciométrica das soluções-padrão agora acionados pela mini-bomba  $P_2$ , com a solução de perclorato passando através da coluna com 70 mg de sílica. Durante o período de tempo de 80 s a mini-bomba inseriu as soluções padrão e nenhuma mudança no potencial de leitura foi observada para todas as soluções de perclorato com concentrações inferiores a  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, a diminuição do potencial mais alto para as soluções concentradas atingir rapidamente resposta nernstiana para concentrações mais elevadas que  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Este comportamento foi indicativo de que, durante a passagem da solução através da coluna, os íons percloratos foram retidos na coluna. O mesmo comportamento foi reproduzido quando a taxa de fluxo fornecida pela mini-bomba  $P_2$  foi aumentada até  $8 \mu\text{L s}^{-1}$ . A Figura 38 mostra as curvas de calibrações a partir do teste com o padrão de perclorato, com o fluxo passando na coluna e fora dela.

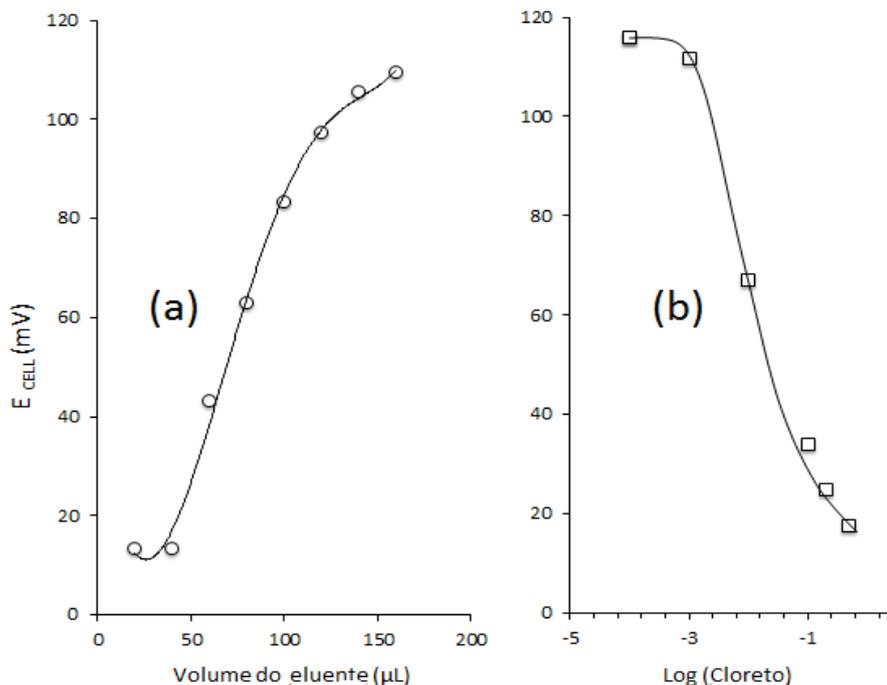
**Figura 38** - Curva de calibração, a) sem pré-concentração; b) com pré-concentração.



Fonte: Do autor, 2016.

Para eluir o perclorato da coluna usou-se íons cloretos. A resposta do sensor como função do volume e a concentração de cloreto no eluente (mini-bomba P<sub>3</sub>), após atravessar a resina e a pré-concentração, durante 60 s, e volume de 320  $\mu\text{L}$  de solução de perclorato  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  está representado na Figura 39.

**Figura 39** - Resposta potenciométrica do eletrodo proposto, onde: a) variação do volume do eluente; e b) variação da concentração dos íons cloreto.



Fonte: Do autor, 2016.

Pode-se observar que a resposta do potencial para o sensor aumenta com o aumento do volume de eluente que flui através da coluna (Figura 39a) e diminui com a concentração de cloreto no eluente (Figura 39b). Este comportamento indica que as melhores condições para a eluição ocorra é a utilização de um pequeno volume de solução de cloreto de sódio altamente concentrada. No entanto, o ensaio de eluentes com altas concentrações de cloreto faz com que o sistema apresente leituras de potenciais com respostas mais positivas.

Este comportamento foi, provavelmente, causado pelos menores volumes requeridos para o perclorato a partir da coluna. O ensaio de volume do eluente inferior a 40  $\mu\text{L}$  não foi possível por causa do curto tempo de passagem através do sensor (10 s), o que foi inferior ao tempo de resposta do sensor (cerca de 15 s). Uma segunda limitação explicando a variação que afeta principalmente a

determinação de concentrações baixas de perclorato é que a inclinação da curva de calibração diminuiu quase  $7,5 \text{ mV dec}^{-1}$ , quando a curva de calibração do sensor foi realizada após as experiências citadas antes com o eletrodo convencional. Este comportamento pode ser explicado pelo vazamento de perclorato livre a partir da membrana do sensor na solução de troca de fluxo e progressiva por íons cloreto.

Para avaliar a capacidade da coluna de sílica, uma solução de perclorato  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  foi bombeado através da coluna durante 80 segundos isso foi feito por períodos sucessivos até que a resposta do sensor correspondesse à mesma obtida na ausência da coluna, verificando a massa total de perclorato presente no volume correspondente calculado depois da diversas vezes bombeado. O mesmo procedimento foi repetido com as soluções de perclorato com concentrações de, respectivamente,  $1 \times 10^{-5}$  e  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e todo o estudo foi repetido para uma nova coluna carregada com 45 mg de sílica modificada. A massa média de perclorato de  $0,284 (\pm 0,010 \text{ n} = 6) \text{ mg g}^{-1}$  de sílica correspondente à capacidade de  $2,86 (\pm 0,10)$  foi encontrado  $\text{mEq g}^{-1}$ . Uma vez que  $1,00 \text{ g}$  da resina corresponde a sílica  $1,04 \times 10^{-3} \text{ mol}$ , e a sua capacidade calculada significa a capacidade de reter cerca de  $2,86 \times 10^{-3} \text{ mol}$  de perclorato, pode concluir-se que aproximadamente corresponde a proporção molar de 1: 3, a mesma proporção de grupos éter coroa no monômero de sílica modificada. Esta descoberta sugere que os ânions perclorato tem ligação com pares iônicos com as cargas positivas de átomos de sódio coordenados ao anel éter coroa. O valor da capacidade determinada experimentalmente excede as resinas comerciais disponíveis para o mesmo objetivo. Uma das características mais importantes para o eletrodo seletivo é sua resposta relativa para o íon primário sobre os outros íons presentes na solução, esta característica é expressa em termos de coeficiente de seletividade potenciométrica e esse teste teve como objetivo a avaliação da seletividade potenciométrica da membrana. O teste de interferentes foi realizado usando uma solução de perclorato de concentração  $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  e solução dos possíveis interferentes, como: clorato, tiocianato, periodato, citrato, salicilato e iodato, também de concentração  $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ . Os testes foram realizados, bombeando a solução de perclorato  $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ , medindo o potencial de perclorato, e em seguida adicionava-se a solução de interferentes na proporção interferente/ perclorato de 1/2 e 2/1. Observou-se que é preciso uma boa quantidade de interferentes para que haja alteração significativa na leitura do

potencial. A Tabela 14 mostra os coeficientes de seletividade potenciométrica para os interferentes estudados.

**Tabela 14** - Coeficientes de seletividade potenciométrica para duas concentrações ( $2,5 \times 10^{-9}$  e  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>) de perclorato e diferentes íons estudadas.

Íon interferente	$\log K^{\text{pot}}_{1:2}$ (ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> / interferente) Razão molar	$\log K^{\text{pot}}_{2:1}$ (ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> / interferente) Razão molar
Clorato	-1,23	-0,64
Tiocianato	-1,10	-0,38
Periodato	-1,00	-0,27
Citrato	-1,41	-1,07
Salicilato	+1,94	- 0,88
Iodeto	+2,12	-1,07
Borato	n i	n i
Acetato	n i	n i
Brometo	n i	n i
Fluoreto	n i	n i
Fosfato	n i	n i
Nitrito	n i	n i
Nitrato	n i	n i

ni: não interfere

Fonte: Do autor, 2016.

O sistema em fluxo proposto foi operado de acordo com a Tabela 10, mostrando uma resposta linear entre  $1,0 \times 10^{-9}$  e  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>. A curva analítica foi estimada em  $E_{\text{cell}} = -222,1 (\pm 1,5) - 52,4 (\pm 0,6) \log_{[\text{perclorato}]}$  e coeficiente de correlação linear  $r = 0,9989$ ,  $n = 9$  e com RSD de 3,4%. De acordo com os resultados podem-se afirmar que o sistema multicomutado proposto é viável para análises de amostras, cujo objetivo for à determinação de perclorato. Na Tabela 15 são apresentadas as figuras de méritos do sistema proposto neste trabalho. Através dos dados apresentados na Tabela 15, observa-se características de fundamental importância para um novo método analítico, tendo como destaque o limite de detecção, o baixo consumo de solução de amostra e reagentes; além de uma excelente adsorção da fase sólida somada a sua capacidade de reutilização, uma vez que é possível lavá-la e armazená-la para uso posterior.

**Tabela 15** - Figuras de mérito do sistema em fluxo multicomutado proposto.

<b>Figuras de Mérito</b>	
Linearidade (mol L <sup>-1</sup> )	$1,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-1}$
Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )	$2,8 \times 10^{-7}$
RSD (%)	3,4
Massa da fase sólido (mg)	45-70
Capacidade de retenção (mol)	$2,86 \times 10^{-3}$
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9989

Fonte: Do autor, 2016.

#### 3.5.4 Análises das amostras

Concluída a otimização dos parâmetros físico-químicos do sistema em fluxo multicomutado proposto, foram analisadas 9 (nove) amostras de vegetais para verificação da presença de perclorato. O sistema também foi aplicado em cinco amostras para o teste de adição e recuperação. Antes da análise das amostras

realizou-se um procedimento de filtragem das mesmas a fim de evitar dispersões de partículas sólidas.

Os resultados para os testes de adição e recuperação estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** - Resultados obtidos para os testes de adição e recuperação em amostras de vegetais.

<b>Amostras</b>	<b>Adicionado (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Encontrado (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação %</b>
Batata	2,05	$1,90 \pm 0,020$	92,3
Alface	2,19	$2,11 \pm 0,005$	96,5
Tomate	3,17	$3,24 \pm 0,010$	102,3
Pimentão	6,69	$7,42 \pm 0,032$	110,8
Fava	5,10	$5,28 \pm 0,015$	103,3

Fonte: Do autor, 2016.

Os resultados apresentados demonstram exatidão do método analítico proposto. As recuperações nas amostras variaram de 92,3 e 110,8 %, demonstrando que não há influência de interferentes da matriz analisada corroborando a eficiência do método, na determinação de perclorato nos produtos hortícolas. Os resultados obtidos na determinação dos percloratos para as amostras de vegetais usando o método proposto são mostrados na Tabela 17.

Os resultados mostram que a coluna é capaz de reter o analito e o método proposto pode ser utilizado na determinação de perclorato.

**Tabela 17** - Resultados obtidos para a determinação de perclorato

Amostras	Massa (g)	Resultados $\mu\text{g L}^{-1}$
Batata	100	2,32 $\pm$ 0,01
Alface	100	2,48 $\pm$ 0,01
Tomate	100	3,71 $\pm$ 0,02
Pimentão	100	5,08 $\pm$ 0,03
Fava	100	1,30 $\pm$ 0,01
Cebola	100	3,90 $\pm$ 0,01
Cenoura	100	ND*
Beterraba	100	ND*
Abóbora	100	ND*

\* ND = Não detectou.

Fonte: Do autor, 2016.

### 3. 6 CONCLUSÃO

O material de sílica sintetizado apresentou-se na forma de um pó amorfo de coloração branca, e foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura, por ressonância magnética nuclear de  $^{29}\text{Si}$ ,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e análise elementar. Os dados obtidos por essas caracterizações sugerem a estrutura proposta.

O procedimento desenvolvido baseado no conceito da multicomutação utilizando mini-bombas solenoides para a propulsão das soluções e empregando a sílica como resina de pré-concentração apresentou-se de forma operacional simples e de alta robustez. O procedimento proposto é uma boa alternativa aos métodos cromatográficos descritos para perclorato e pode ser aplicado para a determinação deste contaminante em alimentos, bebidas e outras matrizes. Neste trabalho, foram encontrados percloratos de 1,30 a 5,08  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de vegetais.

A técnica é simples, com baixo consumo de reagentes, utiliza reagentes que fornece pouco impacto ao meio ambiente, produzindo pequena geração de efluentes. Além disso, tanto o material de sílica e a metodologia utilizada apresenta

custo reduzido em comparação com as técnicas descritas para a análise deste composto, com a possibilidade de detectar níveis muito baixos de concentração. Este método foi aplicado na determinação de perclorato em amostras de vegetais apresentou um RSD de 3,4. O sistema em fluxo multicomutado empregando coluna de pré-concentração nas condições de otimização apresentou um limite de detecção de  $2,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e uma capacidade de retenção da coluna de  $2,86 \times 10^{-3} \text{ mol}$  de perclorato.

## REFERÊNCIAS

ACHÁ, V., NAVEAU, H. e MEURENS, M. Extractive sampling methods to improve the sensitivity of FT-IR spectroscopy in analysis of aqueous liquids. **Analisis**, 26, 157, 1988.

ALVES, E.R., FORTES, P.R., BORGES, E.P. e ZAGATTO, E.A.G., Spectrophotometric flow-injection of total reducing sugars exploiting their alkaline degradation, **Analytica chimica Acta**, 2005.

ALBERTO, N. A.; JOSÉ, L.F.C.L.; ANTÔNIO, O.S.S. R.; MARCELA, A. S.; Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. **Talanta**, 2000, 52, 59–66.

ARAKAKI, L. N. H. imobilização de etilenimina, etilenossulfeto, 2-aminoetanotiol em sílica gel-termodinâmica das interações dos centros básicos nitrogênio e enxofre com cátions em solução aquosa. [S.l.]: **Unicamp**, 2000.

AMERINE, M.A e OUGH, C.S., **Methods for analysis of Must and wines**, Wiley, New York, 1980.

ANDRÉ, F.O.; ORLANDO, F.F., JOAQUIM, A. N.; Focused-microwave-assisted reaction in flow injection spectrophotometry: a new liquid–vapor separation chamber for determination of reducing sugars in wine. **Talanta**, 2001, 55, 677–684.

ANGEL, M.; CASTRO, M. D. L.; VALCARCEL, M.; Determination of Reducing Sugars in Wine by Flow Analysis Injection. **ANALYST**, 1987, VOL. 112, 1569.

ANASTAS, P.T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Crit Rev Anal Chem (Boca Raton)** 1999; 29(3):167-175.

*Association of Official analytical chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC Internation.* 16 ed., P Cunniff. Arlington, Virginia, USA; 1995.

ARAÚJO, A.N., LIMA, J.L.F.C., RANGEL, A.O.S.S. e SEGUNDO, M.A., Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugar in wines, **Talanta**, 52, 59, 2000.

ATIKINS, P. W., SHRIVER, D. F. **Química Inorgânica**. Ed. Bookman, 2003, página 321-324 e 683-685.

AWAD, D. J., CONRAD, F., KOCH, A., SCHILDE, U., POPPL, A., STRAUCH, P. 1,10-Phenanthroline-dithiolate Mixed Ligand Transition Metal Complexes: Synthesis, Characterization and EPR Spectroscopy. **Inorganica Chimica Acta**, 2010, 363, 1488-1494;

BAGHERIFAM, S., KOMARNENI, S., LAKZIAN, A., FOTOVAT, A., KHORASANI, R., HUANG, W., ... WANG, Y. (2014). *Highly selective removal of nitrate and perchlorate by organoclay*. **Applied Clay Science**, 95, 126–132.

BAKKER, E., BHAKTHAVATSALAM, V., GEMENE, K.L., *Beyond potentiometry: Robust electrochemical ion sensor concepts in view of remote chemical sensing*; **Talanta**, 75, 629–635; 2008.

BASOLO, R., JOHNSON, R. **Química de los Compuestos de Coordinación: La Química de los Complejos Metálicos**. Ed. Reverté, S.A., 1976, páginas: 9-10; 37-38.

BELIAN, MÔNICA F., DILMO M. S. LEOTÉRIO, ANDRÉ GALEMBECK, GILBERTO F. DE SÁ., SEVERINO ALVES Jr. "One-Pot Synthesis of Novel Crown Ether Polysiloxanes: Promising Solid State Ionophores." **Journal of Non-Crystalline Solids** 358(11):1399–1403, 2012.

BERGAMIN, H.F., ZAGATTO, E.A.G., KRUG, F.J. AND REIS, B.F. Merging zones in flow injection analysis: Part 1. Double proportional injector and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, Vol.101, p.17–23, 1978.

BLOUNT, B. C., VALENTIN-BLASINI, L., OSTERLOHZ, J. D., MAULDINA, J. P., PIRKLE, J. L., *Temporal variability in urinary concentrations of perchlorate, nitrate, thiocyanate and iodide among children* **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, 17, 400–407; C. W. 2007.

BORGES, M.T.M.R., PRAZZI, C e PIEDADE, S.M.D.S., **Avaliação de métodos químicos de determinação de açúcares redutores em xaropes**, Anais do 4º Congresso Nacional da STAB. VIII Convenção da ACTALAC, Olinda, PE,1987.

BOZA FL, LUQUE DE CASTRO MD, VALCÁRCEL M. Flow-Injection Environmental-Analysis- a **Review.Analisis (Paris)** 1985;13(4):147-159.

BRAININA KZ, MALAKHOVA NA, STOJKO NY. Stripping voltammetry in environmental and food analysis. **Fresenius J Anal Chem (New York)**2000;368(4):307-325.

BREVIL, C. e SADDLER, J.N, Comparision of the 3,5- dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi Methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity, **Enzime and Microbiology**, 7, 327, 1985.

CADET, F. e OFFMANN, B., Extraction of characteristic bands of sugars by multidimensional analysis of their infrared spectra. **Spectroscopic Letters.**, 29, 523, 1997.

CALDERÓN, R., PALMA, P., PARKER, D., & ESCUDEY, M. *Capture and accumulation of perchlorate in lettuce. Effect of genotype, temperature, perchlorate concentration, and competition with anions.* **Chemosphere**, 111, 195–200. (2014).

CANO, C.B. e ALMEIDA-MURADIAN, L.B., **Análise de padrões de carboidratos normalmente encontrados no mel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE )**, Parte I. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998.

CAO, M., WU, X., HE, X., HU, C. Shape-controlled Synthesis of Prussian Blue Analogue Co<sub>3</sub>[Co(CN)<sub>6</sub>]<sub>2</sub> Nanocrystals. **Chemical Communications**, 2005, 2241-2243.

CAPEN, C. C. *Mechanistic data and risk assessment of selected toxic end points of the thyroid gland.* **Toxicol. Pathol.** ; 25:39-48, 1997.

CERDA V, ESTELA JM. Automatic pr-concentration and treatment for the analysis of environmental samples using non-chromatographic flow techniques. **Int J Environ An Ch (Oxon)**2005;85(4-5):231-253

CHENG, K-C., WONG, W-L., Ma, D-L., LAI, T-S., WONG, K-Y. Transition Metal Complexes as Eletrocatalysts – Development and Applications in Electro-oxidation Reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, 2007, 251, 2367-2385;

COLLINS, C. H. **Introdução a métodos cromatográficos.** Ed. Unicamp, 1987, P. 79-85.

COURTIN, C.M., VAN DEN BROECK, H., DELCOUR, J.A, Determination of reducing end sugar residues in oligo and polysaccharides by gas-liquid chromatography, **Journal of chromatography A**, 866,197, 2000

CRANE, E., **Bees and beekeeping: science, practice and world resources.** Oxford: Heinemann Newnes, 1990.

DANIELSON, N. D.; HEENAN, C.A.; HADDADIAN, F. e NUMAN, A.Q, determination of fructose, glucose, and sucrose using zirconyl chloride. **Microchemical Journal**, 63, 405, 1999.

DEGEN, E. D., in Topics in current Chemistry Vol.64, Inorganic Biochemistry, **Springer-Verlag**, New York, 1976.

DEMIATE, I. M.; WOSLACKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Analysis of total and reducing sugar in foods. A comparative study between colorimetric and titration techniques. **Publication, UEPG, exact and soil sciences, agrarian S. and engineering** 8(1): 65-78, 2002.

DENMARK, S. E., STAVENGER, R. A., *Acc. Chem. Ver.* 33,432, (2000).

DINIZ DIAS, P. H. G.; ALMEIDA, L. F. D.; HARDING, D. P.; ARAÚJO, M. C. U. DE. Flow-batch analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 35, p. 39-49, 2012.

ECONOMOU A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling a pre-treatment. **Trends Anal Chem** : (London)2005;24(5):416-425.

FARIAS R. F., AIROLD, C., *Thermogravimetry as a Reliable tool to Estimate the Density of Silanols on a Silica Gel Surface*, **J. Thermal Anal. Calorim.**, 53, 751-756, 1998.

FARIAS, R. F. *Werner, Jorgensen e o Papel da Intuição na Evolução do Conhecimento Científico*. **Química Nova na Escola**, 2001, 13, 29-33.

FARIAS, R. F. **Química de Coordenação: Fundamentos e Atualidades**. 2<sup>o</sup> Edição, Editora Átomo 2009, pg. 11-12.

FERNANDES, J., KUBOTA, L., & NETO, G. *electrodos íon-seletivos histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão de conceitos*; **Química Nova**, 24 (1), 120-130; (2001).

FIEDLER, U., RUZICKA, J. A., *valinomycin-based potassium electrode with nonporous polymer membrane and solid-state inner reference system*; **Analytica Chimica Acta**, 67 (1), 179-193, (1973).

FITSEV IM, BUDNIKOV GK. Flow-injection analysis using catalytic reactions in environmental monitoring(**review**). *Ind Lab+* (New York) 1999; 65(12):761-772.

FRANCISCO JR., W. E. *Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções*. **Química Nova na Escola** – Conceitos Científicos em Destaque, Araraquara, n 29. Ago 2008.

FROST, G.M., *Industrial enzyme applications industrial*, **Biotechnology wales**, 11, 1984.

GARCIA, Y., KSENFONTOV, V., GUTLICH, P. *Spin Transition Molecular Materials: New Sensors. Hyperfine Interactions*, 2002, 193/140, 543-551

GIL, R., AMORIM, C. G., CROMBIE, L., KONG THOO LIN, P., ARAÚJO, A., & DA CONCEIÇÃO MONTENEGRO, M. "Study of a Novel Bisnaphthalimidopropyl Polyamine as Electroactive Material for Perchlorate-Selective Potentiometric Sensors." *Electroanalysis*, 2015,27, 2809–2819, 2015.

GHOLAMIAN, F., SHEIKH-MOHSENI, M. A., & SALAVATI-NIASARI, M. *Highly selective determination of perchlorate by a novel potentiometric sensor based on a synthesized complex of copper. Materials Science and Engineering: C*, 31(8), 1688–1691. (2011).

GRATZEL, M., KALYANASUNDARAM, K. *Applications of Functionalized Transition Metal Complexes in Photonic and Optoelectronic Devices. Coordination Chemistry Reviews*, 1998, 77, 347-414;

Green chemistry: U.S. Environmental Protection AGENCY; 2008. [citado 24 julho 2008]. Disponível em: [http:// www.epa.gov/greenchemistry](http://www.epa.gov/greenchemistry).

GREENWOOD, N. N., EARNSHAW, A. *Chemistry of the Elements*. Ed. Butterworth-Heinemann, 1997, página 913-915.

GUPTA, V. K., SINGH, A. K., SINGH, P., & UPADHYAY, A. *Electrochemical determination of perchlorate ion by polymeric membrane and coated graphite electrodes based on zinc complexes of macrocyclic ligands. Sensors and Actuators B: Chemical*, 199, 201–209. (2014).

HAMSIPUR, M., MIZANI, F., ALIZADEH, K., MOUSAVI, M. F., LIPPOLIS, V., GARAU, A., & CALTAGIRONE, C. Flow injection potentiometry by a novel coated graphite electrode based on 5-(9-anthracenylmethyl)-5-aza-2,8-dithia[9],(2,9)-1,10-phenanthroline for the selective determination of uranyl ions. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 130(1), 300–309, 2008.

HAUTMAN, D. P., MUNCH, D.J., EATON, A. D., HAGHANI, A.W., *Method 314.0, Determination of Perchlorate in Drinking Water Using Ion Chromatography*, Revision 1.0, EPA Doc. No. 815-B-99-003, **Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH**, 1999.

HEDRICK, E., BEHYMER, T., *Method 332.0, Determination of Perchlorate in Drinking Water by Ion Chromatography with Suppressed Conductivity and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Revision 1.0*, EPA Doc. No. 600/R-05/049, **Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH**, 2005.

HENLEY, M. *Ultrapure Water*, 28 11-13, (2011)

HODGE, J. E.; OSMAN, E. M. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. **Principles of Food Science Chemistry**. Part I. V4. Madison: Dekker, Inc, 1976. Cap 3, p 41-138.

ISAAC K., KIPLAGAT, THI KIEU OANH DOAN, PAVEL KUBAN, *Trace determination of perchlorate using electromembrane extraction and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection* **Petr Bocek Electrophoresis** 32, 3008–3015; 2011.

KAUFFMAN, G. B. *Souphus Mads Jorgensen (1837-1914): A Chapter in Coordination Chemistry History*. **Journal of Chemical Education**, 1959, 56, 10, 521-527.

KAUFFMAN G.B. **Classics in Coordination Chemistry - Part 1**, Dover Publications Inc., N.Y., 1968.

KAUFFMAN, G. B. *An Ingenious Imprudence: Werner's Coordination Theory*. **Journal of Chemical Education**, 1976b, 53, 445.

KIRK, A. B., MARTINELANGO, P. K., TIAN, K., DUTTA, A., SMITH, E. E. DASGUPTA, P. K., (2005). *Perchlorate and iodide in dairy and breast milk*. **Environ. Sci. Technol.** 392011–2017.201710.1021/es048118t S0013-936X(04)08118-0 [Online 22 February 2005].

KOESTER, C. J., BELLAR, H. R., HALDEN, R. U., WINKLER, P., MINTEER, *Analysis in groundwater by electrospray( ionization mass spectrometry / mass spectrometry* M., WILLEY, J., **Environ. Sci. Technol.**, 34, p. 1862; 2000.

KRAP, C. P., BALMASEDA, J., CASTILLO, L. F., ZAMORA, B., REGUERA, E. *Hydrogen Storage in Prussian Blue Analogues: H<sub>2</sub> Interactions with the Metal Found at the Cavity Surface*. **Energy Fuels**, 2010, 24, 581-589.

KRUG FJ, BERGAMIN-FILHO H, ZAGATTO EAG, JORGENSEN SS. Rapid-determination of sulfate in natural-waters and plant digests by continuous-flow injection turbidimetry. **Analyst** (Cambridge) 1977;102(1216):503-508.

KOERNER, C.A. e NIEMAN, T.A., Chemiluminescence flow injection analysis determination of sucrose using enzymatic conversion and a microporous membrane flow cell, **Analytical Chemistry**, 58, 116, 1986.

KUMAR, R., KUMAR, S., SINGH, P., HUNDAL, G., HUNDAL, M.S., KUMAR, S., *fluorescent chemosensor for detection of perchlorate ions in water*. **Analyst**, 137, 4913; 2012.

KUNSST, A., DRAEGER, B. e ZIEGENHORN, J., **Methods in enzymatic analysis**, 3ª edição, Academic Press: New York, 163, 1984.

LAMB, J. D., SIMPSON, D., JENSEN, B. D., GARDNER, J. S., PETERSON, Q. P., *Determination of perchlorate in drinking water by ion chromatography using macrocycle-based concentration and separation methods*. **Journal of Chromatography A**, 1118, 100–105 ;2006.

LAPA RAS, LIMA JLFC, REIS BF, SANTOS JLM, ZAGATTO EAG. Multi-piping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Anal Chim Acta** (Amsterdam) 2002;466(1):125-132.

LAVORANTE, A. F. Piracicaba, 2006. **Desenvolvimento de instrumentação e procedimentos analíticos automáticos para a determinação espectrofotométrica de tensoativos em águas**. 2006. Páginas 1-174. Tese de Doutorado. Centro de Energia Nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.

LAVORANTE, A. F.; MORALES-RUBIO, A.; GUARDIA, M. DE LA; REIS, B. F. A multicommutated stop-flow system employing LEDs-based photometer for the sequential determination of anionic and cationic surfactants in water. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 600, p. 58-65, 2007.

Iller R.K. *The chemistry of sílica*, **John Wiley & Sons**, New York, 1979.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L e COX, M.M., **Princípios de Bioquímica**, 3ª edição, Editora Sarvier, São Paulo, 2000.

LIMA JLFC, SANTOS JLM, DIAS ACB, RIEIRO MFT, ZAGATTO EAG. Multi-pumping flow systems: na automation tool. **Talanta** (Amsterdam) 2004;64(5):1091-1098.

LI, Z., LI, M., ZHOU, Z-P., WU, T., LI, D., NG, S. W. *Metal-Directed Supramolecular Architectures From Mononuclear to 3D Frameworks Based on In Situ Tetrazole Ligand Synthesis*. **Crystal Growth and Design**, 2007, 7, 10, 1992-1998.

LINDNER, E., PENDLEY, B. D., *A tutorial on the application of ion-selective electrode potentiometry: An analytical method with unique qualities, unexplored opportunities and potential pitfalls*; **Analytica Chimica Acta**, 762, 1– 13, 2013.

LITWACK, G.; **Experimental Biochemistry** - A Laboratory Manual, John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1960

LOPES, T.I.M.S., RANGEL, A.O.S.S., LIMA, J.L.F.C e MONTENEGRO, M.C.B.S.M., Construction and use of a tubular picrate ion-selective electrode for reducing sugar determination in Port Wine by flow-injection analysis, **Analytica Chimica Acta**, 122,1995.

LUQUE DE CASTRO MD. The Role of Flow- Injection analysis in speciation studies. **Mikrochim Acta** (New York)1992;109(1-4):165-168

MALON, A., VIGASSY, T., BAKKER, E., PRETSCH, E., *Potentiometry at trace levels in confined samples: ion-selective electrodes with subfemtomole detection limits*; **J. Am. Chem. Soc.**, 128 (25), 8154-8155; 2006.

MAQUIEIRA, A., LUQUE DE CASTRO M.D e VALCARCEL, M., Determination of reducing sugars in wine by flow-injection analysis, **analyst**, 112, 1569, 1987.

MARTELLI PB, REIS BF, KRONKA EAM, BERGAMIN-FILHO H, KORN M, ZAGATTO EAG, LIMA JLFC, ARAUJO AN. Multicommutation in flow-analysis 2.binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys. **Anal Chim Acta** (Amsterdam) 1995;308(1-3):397-405.

MARTÍNEZ-CALATAYUD, J. & MATEO, J. V. G. "Online solid-phase reactors for unsegmented continuous-flow drug analysis". **Trends Anal. Chem.**, **12**(10): 428-436, 1993.

MARTÍNEZ- CALATAYUD, J. M. **Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals-Automation in the Laboratory**. 1ª ed. New York, Taylor & Francis, 1996.

MARCHINI, L.C. **Caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae ) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físicoquímicos e biológicos**. 2001. Tese (Livre Docência ) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001

MARTINELANGO, P. K., ANDERSON, J. L., DASGUPTA, P.K., ARMSTRONG, D.W., AL-HORR, R. S., SLINGSBY, R. W. Gas phase ion association provides increased selectivity and sensitivity for measuring perchlorate by mass spectrometry. **Anal. Chem.**, 77, p. 482, 2005.

MATISSEK, R., SCHENEPEL, F.M. e STEINER, G. **Analisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones**. Editora Acribia, S.A, ESPANHA, 1998.

MATTOS, I.L., ZAGATTO, E.A.G. E JACINTO, A.O., Spectrophotometric flow-injection determination of sucrose and total reducing sugar-cane juice and molasses, **Analytica Chimica Acta**, 214, 1988.

MEADE, G.P., CHEN, J.P., **Cane Sugar Handbook**. 11ª ed. New York: John Wiley e Sons, 947, 1977.

MELCHERT WR, INFANTE CMC, ROCHA FRP. Development and critical comparison of greener flow procedures for nitrite determination in natural waters. **Microchim J** (Amsterdam) 2007;85(2):209-213.

MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 714, p. 8-19, 2012.

MILLER, JAMES N.; MILLER, JANE C. **Statistics and Chemometrics for Analytical**. fifth ed. 2005. p. 1-263

MIRO M, FRENZEL W. What flow injection has to offer in the environmental analytical field. **Microchim Acta** (Viena) 2004;148(1-2):1-20.

MOSCOFIAN, A. S. O., SILVA, C. R., AIROLDI, C. *Stability of layered aluminum and magnesium organosilicates*. **Microporous Mesoporous Mater.**, 107, 113-120. 2008,

MORALES-RUBIO, Á. REIS, B. F.; GUARDIA, M. DE LA. Multi-commutation in spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 903- 913, 2009.

Multicommuation in flow analysis: Universidad de Valencia; [citado 2 setembro 2008].Disponível em: <http://www.uv.es/martinej/Flow-Analysis/Jvicent-MULTICOMMUTATION.htm>

MURRAY, C. W., EGAN, S. K., KIM, H., BERU, N., BOLGER, P. M., US Food and Drug Administration Total Diet Study: Dietary intake of perchlorate and iodine, **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology** 18, 571–580, 2008.

NASSAR, E. J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. INFLUÊNCIA DA CATÁLISE ÁCIDA E BÁSICA NA PREPARAÇÃO DA SÍLICA FUNCIONALIZADA PELO MÉTODO SOL-GEL. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 27-31, 2002.

NELSON, N., A Fotometric adaptacion of Somogyi method for the determination of glucose, **Journal of Biologic Chemistry**, 153, 375, 1960.

Nezamzadeh-Ejhieh, A., & Badri, A. Application of surfactant modified zeolite membrane electrode towards potentiometric determination of perchlorate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 660(1), 71–79, 2011.

OCHIAI, E-I., BAKHTIAR, R. *Pharmacological Applications of Inorganic Complexes*. **General Pharmacology**, 1999, 32, 525-540;

OLIVEIRA, A.F. e FATIBELLO-FILHO, O., FLOW injection spectrophotometric determination of reducing sugars using a focalized coiled reactor in a domestic microwave oven, **Talanta**, 50,899, 1999.

OLIVEIRA, A.F., FATIBELLO-FILHO, O. e NÓBREGA, J.A., Focused-microwave-assisted reaction in flow injection spectrophotometry: a new liquid-vapor separation chamber for determination of reducing sugars in wine, **Talanta**, 55, 677, 2001.

OLIVEIRA, V. V. **NOVOS ADSORVENTES DERIVADOS DE SÍLICA GEL MODIFICADA COM AMINAS E GLUTARALDAÍDO**. [S.I.]: Universidade federal da Paraíba, 2008.

PARELLADA, J., DOMÍNGUEZ, E. e FERNÁNDEZ, V.M., Amperometric flow injection determination of fructose in honey with, a carbon paste sensor based on fructose dehydrogenase, **Analytica chimica Acta**, 330, 71, 1996.

PASQUINI C, DE OLIVEIRA WA. Monosegmented system for continuous- flow analysis – spectrophotometric determination of chromium(vi), ammonia, and phosphorus. **Anal Chem** (Washington) 1985;57(13):2575-2579.

PÉREZ-OLMOS, R., RÍOS, A., FERNÁNDEZ, J.R., LAPA, R.A.S., LIMA, J.L.F.C., *Construction and evaluation of ion selective electrodes for nitrate with a summing operational amplifier: application to tobacco analysis*; **Talanta**, 53(4), 741-748, 2001.

PÉREZ, M. A., MARÍN, L.P., QUINTANA, J.C., PEDRAM, M.Y., *Influence of different plasticizers on the response of chemical sensors based on polymeric membranes for nitrate ion determination*, **Sensors and Actuators B**, 89 (2003) 262-268

PERIS-TORTAJADA, M., PUCHADES, R. e MAQUEIRA, A., Determination of Reducing Sugars by the Neocuproine Method Using Flow Injection Analysis. **Food Chemistry**, 1992, 43,65-69

PONS C, SANTOS JLM, LIMA JLFC, FORTALEZA R, CERDA V. Multi-pumping flow system for the determination of nitrate in water samples. **Microchim Acta** (wien) 2008; 161(1-2):73-79

PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M. & SUÁREZ-ILHA, M. E. V. “Metodologia analítica para determinação de sulfato em vinhoto”. **Quim. Nova**. 21(3): 249-252, 1998.

QIN, X., ZHANG, T., GAN, Z., & SUN, H. *Spatial distribution of perchlorate, iodide and thiocyanate in the aquatic environment of Tianjin, China: environmental source analysis*. **Chemosphere**, 111, 201–8. (2014).

RAN, J., LI, X., ZHAO, Q., QU, Z., LI, H., SHI, Y., CHEN, G. *Synthesis, Structures and Photocatalytic Properties of a Mononuclear Copper Complex with Pyridine-Carboxylate Ligands*. **Inorganic Chemistry Communications**, 2010, 13, 526-528.

REIS BF, BERGAMIN-FILHO H, ZAGATTO EAG, KRUG FJ. *Merging zones in flow injection analysis Part 3. Spectrophotometric determination of aluminium in plant and soil materials with sequential addition of pulsed reagents*. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 468, p. 309-319, 1979.

REIS, B.F., GINÉ, M.F., ZAGATTO, E.A.G, LIMA, J.LF.C. E LAPA, R.A. *Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests*, **Analytica Chimica Acta**, 293, 129, 1994.

REIS, B.F., TOMAZZINI, M.C. e TUMANG, C.A., *Automatic procedure exploiting multicommutation in flow analysis for simultaneous spectrophotometric determination of nonstructural carbohydrates and reducing sugar in forage materials*, **Analytical Sciences**, 19,1683, 2003.

REIS BF, BERGAMIN-FILHO H. *Evolução dos injetores empregados m sistemas de análise química por injeção em fluxo*. **Quim Nova** (São Paulo) 1993;16(6):570-573.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, JOAQUIM A. *Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo*. **Química Nova**, Vol. 19, n°. 6, p. 636-640, 1996.

ROCHA, F.R.P, MARTELLI, P.B, FRIZARIN, R.M, REIS, B.F. *Automatic multicommutation flow system for wide range spectrophotometric calcium determination*. **Anal Chim Acta** (Amsterdam) 1998;366(1-3):45-53.

ROCHA, F.R.P, NÓBREGA, J.A, FATIBELLO-FILHO O. *Green analytical chemistry exploiting flow analysis. An overview*. **Green Chen** (Cambridge) 2001;3(5):216-220.

ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. et al. *Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends*. **Analytica chimica acta**, Vol. 468, p. 119-131, 2002.

RODENAS-TORRALBA E. **Aplicaciones de la multiconmutación en química analítica [tese]**. Valencia: Departamento de química analítica, universidad de Valencia; 2006.

ROSS J.W. *Calcium-selective electrode with liquid ion exchanger* ; **Science**, 156, (3780), 1378-9, (1967).

RUSSEL J. D., A. R. Fraser *in Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*, ed. M. J. Wilson, **Chapman & Hall**, London, 1994.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow Injection Analyses 1. New Concept of Fast Continuous-Flow Analysis. **Anal Chim Acta** (Amsterdam)1975;78(1):145-157.

RUZICKA J, MARSHALL GD. Sequential Injection – a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assys. **Anal Chim Acta** (Amsterdam) 1990;237(2):329-343.

RŮŽIČKA, J; STEWART, J.W.B Flow injection analysis: Part II. Ultrafast determination of phosphorus in plant material by continuous flow spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 79, p. 79-91, 1975.

SANTOS, A. C. V.; MASINI, J.C. A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perceptiva brasileira. **Quimica Nova**. Vol. XY, No. 00, p. 1-8, 2010.

SARTINI, R. P., OLIVEIRA, C. C., ZAGATTO, E.A.G e BERGAMIN-FILHO, H., Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry. **Analytica Chimica Acta**, 366, 119, 1998.

SALES, J. A. A., PRADO, A. G. S., AIROLDI, C. Interaction of divalent copper with twodiaminealkyl hexagonal mesoporous silicas evaluated by adsorption and thermochemical data, **Surf. Sci.** 590, 51–6, (2005).

SANCHEZ, C.A., R.I. KRIEGER, N. KHANDAKER, R.C. MOORE, K.C. HOLTS, AND L.L. NEIDEL. Accumulation and perchlorate exposure potential of lettuce produced in the lower Colorado River region. **J. Agric. Food Chem.** 53:5479–5486. 2005.

SANCHEZ, C.A., R.I. KRIEGER, N.R. KHANDAKER, L. VALENTIN-BLASINI, AND B.C. BLOUNT.. Potential perchlorate exposure from Citrus sp. Irrigated with contaminated water. **Anal. Chim. Acta.** 567:33–38, 2006.

SÁNCHEZ-PEDREÑO, C., ORTUÑO, A., & HERNÁNDEZ, J. Perchlorate-selective polymeric membrane electrode based on a gold ( I ) complex : application to water and urine analysis. **Anal. Chim. Acta.** 415, 159–164, 2000.

SCHNEIDER, F., **Sugar analysis. Official and tentative methods recommended by the international commission for uniform methods of sugar analysis (ICUMSA )**, Peterborough, 41, 1979.

SEYFFERTH, A.L., AND D.R. PARKER. Determination of low levels of perchlorate in lettuce and spinach using ion chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (IC-ESI-MS). **J. Agric. Food Chem.** 54:2012–2017, 2006.

SEYFFERTH, A.L., AND D.R. PARKER. 2007. Effects of genotype and transpiration rate on the uptake and accumulation of perchlorate ( $\text{ClO}_4^-$ ) in lettuce. **Environ. Sci. Technol.** 41:3361–3367.

SEYFFERTH, A.L., AND D.R. PARKER. Uptake and fate of perchlorate in higher plants. **Adv. Agron.** 99:101–123. 2008.

SEMENIUC, R. F., REAMER, T., BLITZ, J. P., WHEELER, K. A., SMITH, M. D. *Functionalized O-Alkyldithiocarbonates: A New Class of Ligands Designed for Luminescent Heterometallic Materials.* **Inorganic chemistry**, 2010, 49, 2624-2629;

SHU-LING LIN, CHIH-YU LO, MING-REN FUH, *Quantitative determination of perchlorate in bottled water and tea with onlinesolid phase extraction high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* .**Journal of Chromatography A**, 1246, 40–47; 2012.

SILVA, A.I., ARAÚJO, H.C., SILVA, R.C., *TESTES DE DESEMPENHO DE ELETRODOS: ELETRODOS DE REFERÊNCIA*; **Química Nova**, 23 (4), 512-5179, 2000.

SOUZA, G. C. S. desenvolvimento de um sistema screening em fluxo multicomutado para a detecção sequencial de adulterantes em leite. Dissertação de mestrado, UFPE, 2012.

SOUZA, I.G.; BERGAMIN F, H.; KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V.; REIS, B.F.; GINÉ, M.F. On-line electrolytic dissolution of alloys in flow-injection analysis. Part 3. Multi-elemental analysis of stainless steels by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 245, p. 211-216, 1991

SPENCER, G.L.; MEADE, G.P. Special Reagentes. Cane Sugar **Handbook**, new York, Wiley, 1945;

STRYER, L., TYMOCZKO, J.L e BERG, J.M., **Bioquímica**, 3ª edição, ditora Guanabara Koogan, São Paulo, 2001.

SKEGGS LT. An automatic method for colorimetric analysis. **Am J Clin Pathol** (Chicago) 1957;28(3):311-322.

SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. JAMES; WEST, DONALD M. CENGAGE Learning Fundamentos de Química Analítica - **9ª Ed.** 2014 (Cód: 8090775)

SUN, S-S., LEES, A. J. *Transition Metal Based Supramolecular Systems: Synthesis, Photophysics, Photochemistry and Their Potential Applications as Luminescent Anion Chemosensors*. **Coordination Chemistry Reviews**, 2002, 230, 171-192;

TAVERNIERS; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 23, p. 535-552, 2004.

THEODORAKIS, C., RINCHARD, J., ANDERSON, T., LIU, F., PARK, J. W., COSTA, F., Waters, A. *Perchlorate in fish from a contaminated site in east-central Texas*. **Environmental Pollution**, 139(1), 59–69. (2006).

TRENT, J.D e CHRISTIANSEN, S., Determination of total nonstructural carbohydrates in forage tissue by p-hydroxybenzoic acid hydrazide flow injection analysis, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 34, 1033, 1986.

TORRES, K.Y.C., GARCIA, C.A.B., FERNANDES, J.C.B., NETO, G.O., KUBOTA, L.T., *Use of self-plasticizing EVA membrana for potentiometric anion detection*; **Talanta**, 53, 807-814, 2001.

TROJANOWICZ, MAREK. **Advances in Flow Analysis**. Edited by Marek Trojanowicz. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. p. 672. índice 1.

TROST, B. M., CRAWLEY, M. L. *Asymmetric Transition-Metal-Catalyzed Allylic Alkylations: Applications in Total Synthesis*. **Chemical Reviews**, 2003, 103, 8, 2921-2943;

TUMANG CD.DE LUCA GC, FERNANDES RN, REIS BF, KRUG FJ. Multicommutation inflow analysis exploiting a multizone trapping approach: spectrophotometric determination of boron in plants. **Anal Chim Acta** (Amsterdam) 1998;374(1):53-59.

TRUMPOLT, C. W., CRAIN, M., CULLISON, G., FLANAGAN S. J. P., SIEGEL, L., LATHROP, S., "Perchlorate: Sources, Uses, and Occurrences in the Environment" in **Wiley Periodicals, Inc. Remediation** DOI: 10.1002.rem, 2005.

URBANSKY, E. T., *Perchlorate as an Environmental Contaminant*. **Environ Sci & Pollut Res** 9 (3) 187 – 192, 2002.

**UNDER REVIEW. EFSA Journal 2014;12(10):3869, 106 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3869.**

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, *Interim Drinking Water Health Advisory for Perchlorate*, EPA 822-R-08-025, U.S.EPA, 2008, available at [http://www.epa.gov/safewater/contaminants/unregulated/pdfs/healthadvisory\\_perchlorate\\_interim.pdf](http://www.epa.gov/safewater/contaminants/unregulated/pdfs/healthadvisory_perchlorate_interim.pdf) ).

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998. *Drinking Water Contaminant Candidate List*. Washington, D.C., Doc N°EPA/600/F-98/002 .

VASCONCELOS, M. T. S. D.; GOMES, C. A. R. & MACHADO, A. A. S. C. "Ion chromatographic determination of fluoride in welding fumes with elimination of high contents of iron by solid-phase extraction". **J. Chromatogr. A**, 685(1): 53-60, 1994.

VILLELA, G.G., BACILA, M., TASTALDI, H, **Técnicas e experimentos de bioquímica**, Ed Guanabara, 552, São Paulo, 1973.

WAGNER, H. P., PEPICH, B.V., C. POHL, C., LATER,D., JOYCE, R ., SRINIVASAN, K., DEBORBA, B., THOMAS, D., WOODRUFF, A., MUNCH, D.J., *Method 314.1, Determination of Perchlorate in Drinking Water using Inline Column Concentration/Matrix Elimination Ion Chromatography with Suppressed Conductivity Detection*, Revision 1.0, EPA Doc. No. 815-R-05-009, **Environmental Protection Agency, Cincinatti, OH**, 2005.

YAGHI, O. M.; O'KEEFE, M.; OCKWIG N. W.; CHAE, H. K.; EDDAOUDI, M. , KIM J. *Reticular Synthesis and the Design of New Materials*. **Nature**, 2003, 423, 705-714;

YI, D. K. , Nanoparticle architectures templated by SiO<sub>2</sub>/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposites. **Chemical of Materials**. 18 (3), 614-619, 2006

ZHANG, Q., JIMENEZ, J. L., CANAGARATNA, M. R., ALLAN, J. D., COE, H., ULBRICH, I., ZHANG, Y. M. Ubiquity and dominance of oxygenated species in organic aerosols in anthropogenically-influenced Northern Hemisphere midlatitudes, 34. (2007).

ZHANG, Y-N., LIU, J-Q., WANG, T., WEN, G-L., YANG, G-P., WANG, Y-Y., SHI, Q-Z. *Design and Syntheses of Two Novel Mn(II) and Cu(II) Complexes with 2,2'-Biquinoline-4,4'-Dicarboxylate and N-Containing Bidentate Co-Ligand*. **Journal of Molecular Structure**, 2008, 878, 116-123.

ZAMORA, L. L., MATEO, J. V. G. & MARTÍNEZ- CALATAYUD, J. "Entrapment of reagents in polymeric materials. Indirect atomic absorption spectrometric determination of isoniazid by oxidation with manganese dioxide incorporated in polyser resin beads in a flow-injection system". **Anal. Chim. Acta**, 265: 81, 1992.

ZAGATTO, E.A.G., MATTOS, I.L. e JACINTHO, A.O., Determination of sucrose in sugar-cane juice and molasses by flow-injection spectrophotometry, **Analytica Chimica acta**, 204, 1988.

ZAGATTO, E. A., ALVES, E. R., BORGES, E.P E BARROS, V.A.F., Determinação de açúcares redutores totais empregando sistemas de análises por injeção em fluxo: aplicação a amostas de relevância sucro-alcooleira, **Revista Analytica**, 19, 2005.

ZHI ZL. Flow-injection immunoanalysis, a versatile and powerful tool for the automatic determination of environmental pollutants. **Lab Robotics Automat** (New York)1999;11(2):83-89.

ZHURAVLEV, L. T., *The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 173, 1–38, 2000.

## ANEXO

Food Control 57 (2015) 225–231



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Copper–4,4'-dipyridyl coordination compound as solid reagent for spectrophotometric determination of reducing sugar employing a multicommutation approach



Dilmo M.S. Leotério<sup>a,b</sup>, Paulo A.B. Silva<sup>a,c</sup>, Gustavo C.S. Souza<sup>a</sup>, Aline de A. Alves<sup>a,b</sup>,  
Mônica F. Belian<sup>d</sup>, André Galembeck<sup>a,b</sup>, André F. Lavorante<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Federal de Alagoas, Campus Caruaru, 57035 Maceió, Al, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 January 2015

Received in revised form

11 March 2015

Accepted 9 April 2015

Available online 25 April 2015

#### Keywords:

Multicommutation

Solid reagent

Reducing sugars

Coordination compound

Solid phase reactor

### ABSTRACT

In this work a multicommutated flow system employing copper–4,4'-dipyridyl coordination compound as the solid-phase reagent for the spectrophotometric determination of reducing sugar was developed. The coordination compound was synthesized through a reaction of the 4,4'-dipyridyl and copper (II) nitrate, under hydrothermal conditions. The complex was characterized by infrared spectroscopy (FTIR), power X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectrometer (EDS) and thermogravimetric analysis (TGA). Based on the characterization, a multicommutated spectrophotometric procedure for the determination of reducing sugar using copper (II) complex as solid reagent is proposed. The proposed method was based on the redox reaction between a monosaccharide, such as fructose and glucose (reducing sugar) and Cu(II). This reaction, mediated in an alkaline medium, produces a yellow compound that can be determined by absorption electronic spectroscopy ( $\lambda_{\text{Abs}} = 420 \text{ nm}$ ). Under optimum experimental conditions, a linear response ranging from 1.0 to 20.0  $\text{g L}^{-1}$  ( $R = 0.9978$  and  $n = 5$ ), a detection (3 $\sigma$  criterion) and quantification (10 $\sigma$  criterion) limit estimated at 0.23 and 0.75  $\text{g L}^{-1}$ , respectively, a standard deviation relative of 4.7% ( $n = 7$ ), for a reference solution of 10.0  $\text{g L}^{-1}$  reducing sugar, and a sampling rate of 75 determinations per hour were achieved. The proposed system was applied to the determination of reducing sugars in coconut water and juices. The analysis of ten samples and the application of the *t*-test to the results found, and those obtained using reference procedures (AOAC), provided no significant differences at a 95% confidence level. This system enabled the analysis of reducing sugar with ease and simplicity, providing a significant economy of the solid reagent (600  $\mu\text{g}$  per determination) and reducing effluent generation.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Reducing sugars are monosaccharide (aldoses and ketoses) that in a basic medium and in the presence of cupric and/or ferric ions are easily oxidized to their respective carboxylic acids (Hodge & Osman, 1976). The cupric ions are converted to cuprous ions in the redox process, where copper (I) carboxylate is generated as the

product (Lehninger, Nelson, & Cox, 1993). The determination of reducing sugars is economically interesting because of its importance as a classification and product quality parameter in food (Dutta, Mukhopadhyay, Dasgupta, & Chakrabarti, 2014; Mukhopadhyay, Dutta, Chattopadhyay, & Chakrabarti, 2013; Silveira, Aguiar, Silka-aho, & Ramos, 2014; Vats & Negi, 2013).

The development of new methodologies for the determination of reducing sugar in samples of wine, juice and sugarcane has received considerable attention. The monitoring of the generation of reducing sugars during the production processes of these drinks has brought an improvement in the market quality of these products (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkel, 1996). The Lane–Eynon

\* Corresponding author. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP: 52171-900, Brazil.

E-mail address: [alavorante@dq.ufpe.br](mailto:alavorante@dq.ufpe.br) (A.F. Lavorante).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.017>

0950-7135/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

method (Galtersburg, 1996, chap. 44), is based on a titration of the reducing sugar with copper(II) in alkaline solution (Fehling's solution), in the presence of methylene blue, and has commonly been used to determine reducing sugar. This conventional method, however, has some disadvantages: (i) inaccuracy in the reaction times, temperatures and reagent concentrations that must be carefully controlled; (ii) high reagent use; (iii) low analytical frequency, and (iv) susceptibility to interference from other molecules that reduce the copper (II) ion. In order to minimize the disadvantages previously presented, some studies have reported the use of such things as a flow analysis system (Araujo, Lima, Rangel, & Segundo, 2000; Fernández-Navales, López, Sánchez, Morales, & González-Caballero, 2009; Lopes, Range, Lima, & Montenegro, 1995; Maquieira, De Castro, & Valcarcel, 1987; Mattos, Zagatto, & Jacinto, 1988; Oliveira, Fatibello, & Nóbrega, 2001; Sartini, Oliveira, Zagatto, & Bergamin, 1998; Peris-Tortajada, Pachades, & Maquieira, 2000), gas-chromatography (Marsili, 1977), near-infrared spectrometry (Fernández-Navales et al., 2009) and the ion selective electrode (Papastathopoulos, Nikolelis, & Hadjiioannou, 1977) as alternatives to the conventional method (Lane–Eynon method).

The use of coordination compounds in the determination of aromatic compounds (Mistri, Zangrando, & Manna, 2013), glucose (Gao et al., 2009) and ions (Kulchat et al., 2012; Pina-Luis, Martínez-Quiroz, Ochoa-Terán, Santacruz-Ortega, & Mendez-Valenzuela, 2013), increases the sensitivity and, sometimes, the specificity of the methodology developed. In the literature, the copper (II) coordination compounds have been used to determine reducing sugar in wine samples (Araujo et al., 2000; Maquieira et al., 1987; Peris-Tortajada et al., 2000), demonstrating promising results with relationship to method sensitivity.

The consumption of reagents is a problem which has been a challenge in the development of new analytical methods. For this, the employment of solid-phase reactors coupled to flow analysis systems is a versatile alternative to determine analytes in pharmaceutical (Kojlo & Calatayud, 1995a, 1995b; Vicentini, Suarez, Cavalheiro, & Fatibello, 2012), environmental (Bonifácio, Figueiredo-Filho, Marcolino, & Fatibello, 2007) and food samples (Fatibello, Marcolino-Junior, & Pereira, 1999; Noroozifar & Khorasani-Motlagh, 2003).

The phase-solid reactor construction is generally used for the incorporation of oxidizing/reducing agents, insoluble salts or ion exchange resins, all within a small column (Lilley, Newton, Instrum, Phys, & De Castro, 1992). The immobilization process should be fast, simple and nonspecific. The main advantages of the use of solid-phase reactors coupled to flow systems are lower consumption of reagents, greater stability, long-life reproducible supplies, high sensitivity and throughput (Vicentini, et al., 2012).

This paper proposes a novel coordination compound based on copper (II) and 4,4'-dipyridyl, as the phase-solid reagent. This complex is characterized by Infrared spectroscopy (FTIR), power X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectrometer (EDS) and thermogravimetric analysis (TGA) and thereafter applied to determine reducing sugar in juice and coconut water samples employing a multicommutation flow procedure.

## 2. Experimental

### 2.1. Solutions and samples

All reagents used were of analytical-grade. The solutions were prepared with deionized water (resistivity < 18.2 MΩ cm<sup>-1</sup>).

A stock solution of 100 g L<sup>-1</sup> was prepared according to the literature (Lopes et al., 1995), using glucose (1.00 g) and fructose

(1.50 g) (Sigma–Aldrich, >99.5%) in 25.00 mL and conditioned at 4 °C. This solution was diluted to obtain of five solutions whose concentrations ranged from 1.00 to 20.0 g L<sup>-1</sup>.

A 1.0 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide stock solution was prepared by dissolving 40.0 g of NaOH (Vetec) in 1.0 L of water. Working solutions containing between 0.02 and 0.1 mol L<sup>-1</sup> of NaOH were prepared by appropriate dilution of the stock solution with water.

The juice (samples 1–8) and coconut water (samples 9 and 10) were acquired from local supermarkets and maintained at a temperature of 4 °C. For analysis, the samples were diluted as needed.

### 2.2. Apparatus

For the characterization of the copper–4,4'-dipyridyl coordination compound, we used a thermogravimetric analyzer (Shimadzu, model TGA 50/50H) under N<sub>2</sub> atmosphere and an FTIR spectrophotometer (Bruker, model B566) with spectral resolution of 8 cm<sup>-1</sup>, with 32 scans and range between 4000 and 400 cm<sup>-1</sup>. For FTIR analysis, the samples were prepared in a KBr tablet. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive spectrometry (EDS) were accomplished using a Quanta 200 FEG, FEI model. The power X-ray was obtained using a Bruker D8 Advance X-ray diffractometer with a copper source.

The flow system was composed of three solenoid micro-pumps (BIO-CHEM Valve<sup>®</sup>), two of them with 4 μL (P/N 030SP124 4TV-12VDC) and one with 10 μL (P/N 130SP1210 1TV-12 VDC) and a three-way solenoid valve (Ref. 161P01, NResearch Inc.). The flow lines were made of PTFE<sup>®</sup> tubing (0.8 mm id.) and an acrylic column (40 mm × 4 mm, id.) was prepared as a physical support, for placing the solid-phase reagent. A home-made electronic interface, based on an ULN 2803A integrated circuit (Lavorante, Morales-Rubio, de la Guardia, & Reis, 2005) was attached to that used to control the micro-pumps and solenoid valve. The data acquisition was carried out using an Intel Pentium laptop equipped with an electronic interface USB-6008/6009 (National Instruments<sup>®</sup>) and a program written in Lab View (LabView<sup>®</sup> 8.0) language. An Ocean Optics Spectrophotometer UV–VIS USB-4000 was used for detection, composed of a support cell of 1.0 cm, a quartz flow cell of the 1.0 cm optical path and optical fibers of 200 μm id.

### 2.3. Synthesis and characterized of copper (II) complex

The coordination compound was hydrothermally prepared from a mixture with a 1:1 molar ratio, consisting of 0.100 g of 4,4'-dipyridyl (Sigma–Aldrich, 98%) and 0.155 g of copper(II) nitrate tri-hydrated (Dinâmica, 99%) in 6.00 mL of deionized water. The mixture was sealed in a Teflon flask of the 24 mL coated with stainless steel, and maintained in an oven at 120 °C during 24 h. The product was washed with deionized water and ethanol for to purification of the coordination compound, and dried at room temperature. The coordination compound was characterized by FTIR, XRD, SEM, EDS and TGA.

### 2.4. Flow system and proposed procedure

The solid phase reactor was prepared in an acrylic minicolumn containing 50.0 mg of copper (II) complex and polyester screens on both sides of the column, in order to prevent leaching of the material.

A diagram of the flow system shown in Fig. 1 was designed to implement the procedure for the determination of reducing sugars using the multicommutated approach with tandem streams (Rocha et al., 2002). In this configuration all the micro-pumps and valve are switched OFF and no solution is flowing along the analytical path. The time interval used to maintain switched ON/OFF micro-pumps

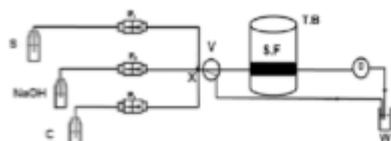


Fig. 1. Diagram of the multicommutated flow system, where: S – sample; C – carrier solution, H<sub>2</sub>O; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> – solenoid micro-pumps; V – three-way solenoid valve, solid line corresponds to valve in the ON-position, x – confluence; TB – Thermostatic bath, SP – solid phase; D – detector; W – Waste.

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub> was set at 0.1 s, giving a switching frequency of 5 Hz. Thus, the micro-pumps P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> delivered 4 μL and P<sub>3</sub> delivered 10 μL per stroke. In order to maximize procedure sensitivity, the chemical and physical parameters of the system were optimized, including reagent concentration, volumetric fraction, number of sampling cycles and temperature.

The multicommutated system was operated as described in Table 1. The P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> micro-pumps were used to insert the reference/sample and sodium hydroxide solutions, respectively, and the P<sub>3</sub> micro-pump transported the zone sampling to the detection and the cleaning system.

The operating sequence begins with the filling of the analytical path using the P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub> micro-pumps for the insertion of the reference/sample, reagent and carrier solutions, respectively (flow lines filling step). At this step, the solenoid valve (V<sub>1</sub>) remains switched ON to transport the excess sample, reagent and carrier solutions to waste.

In the sampling step, micro-pumps P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> were switched (ON/OFF) alternately for twenty cycles, thereby inserting a string comprising two slugs of sample and NaOH solutions in a tandem stream. Thus, 160 μL of each solution (reference or sample and NaOH solution) was inserted into the reactor containing the solid-phase reagent immersed in a thermostat with temperature set at 90 °C. Afterwards, the micro-pump P<sub>3</sub> was switched ON/OFF several times to establish a stream allowing carrier solution to displace the sample zone for to reactor containing the copper–4,4′-dipyridyl coordination compound, promoting a reaction between the reducing sugar and copper ion present in the coordination compound. This reduced the copper ion from Cu(II) for Cu(I), promoting the formation of a yellow copper (I) carboxylate, monitored at 420 nm. The signal generated by the spectrophotometer (Det) was read by the microcomputer through an electronic interface USB and stored as an *.lvm* file to allow further treatment.

After the detection step, the sample solution was changed and a new cycle began with the introduction of 100 pulses using the P<sub>1</sub> micro-pump, with the solenoid valve switched ON.

The experiments described below were implemented to determine the best operational conditions concerning sensitivity and precision using a 50.0 mg of copper–4,4′-dipyridyl coordination compound as the solid-phase reagent and a set of reducing sugar

Table 1  
Operating sequence of the proposed flow system.

Step	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	V	Pulse	Cycles
Flow lines filling	1/0	0	0	1	100	–
	0	1/0	0	1	100	–
Sampling	0	0	1/0	1	100	–
	1/0	0	0	0	2	20
Signal reading and washing	0	1/0	0	0	2	–
	0	0	1/0	0	100	–
Changing the sample solution	1	0	0	1	100	–
	0	0	1	1	100	–

standard solutions with concentrations ranging from 0 to 20 g L<sup>-1</sup>. At first, the flow consisted of 8 pulses of the reference/sample and NaOH solutions and 10 sampling cycles. The chemical and hydrodynamic variables of the system were optimized in the following order: NaOH concentration; volumetric ratio between sample and NaOH; temperature; number of pulses per sample and NaOH solutions; sampling cycles.

Determination of the reducing sugars was based on the redox reaction between a monosaccharide (fructose and glucose) and Cu(II) in an alkaline medium. For the reaction, a study was made ranging the concentrations of the NaOH between 0.02 and 1.00 mol L<sup>-1</sup>. Subsequently, the influence of temperature with ranges between 60 and 100 °C was studied.

The micro-pumps delivered 4 μL per stroke, which required some experimenting to find the ideal volumetric ratio and volume of the sample and NaOH solutions. The volumetric ratio of the reducing sugar (sample) and NaOH solutions was ascertained by varying the switching of the micro-pumps ON/OFF function. To do this, the micro-pumps P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> were switched ON/OFF sequentially, varying the volumetric ratio from 1:2 to 2:1 (v/v, Sample:NaOH), for 10 sampling cycles. Afterwards, a study of the volume of reducing sugar and NaOH solutions was ascertained by varying the switching of the micro-pumps. To do this, the micro-pumps P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> were switched on/off sequentially, varying the pulse numbers from 1 to 10, for each solution, maintaining a volumetric ratio of 1:1 (v/v). Following this evaluation of the number of the pulses, a study was made of the sampling cycles, varying between 5 and 30 cycles. We used 10.0 g L<sup>-1</sup> reducing sugar for all these studies.

Once the best operating conditions were established, ten samples were analyzed in order to prove the usefulness of the proposed system. A comparison of the procedure was performed using the AOAC official method (Gaithersburg, 1996, chap. 44).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of the copper–4,4′-dipyridyl complex

The copper (II) complex was presented form of a blue powder, characteristically crystalline and water insoluble. The insolubility or low hygroscopicity of the complex provides the viability of the application suggested in our work, also allowing its characterization and packing in the solid phase column. Fig. 2 shows the

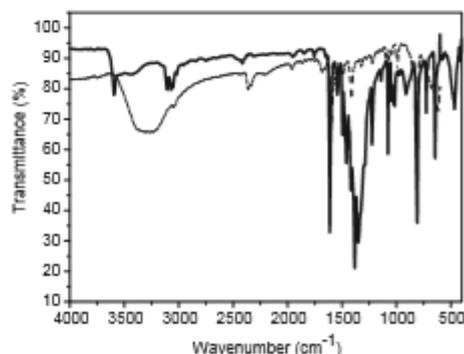


Fig. 2. FTIR spectra of the free ligand (dashed line) and coordinated to copper (II) ion (solid line).

infrared spectra of the free ligand (dashed line) coordinated to copper (II) ion (solid line).

Analysis of the infrared spectra of the complex reveals a band around  $1390\text{ cm}^{-1}$ , attributed to C–N stretching, which is shifted to lower frequency. In the free ligand (4,4'-dipyridyl) this band appears around  $1414\text{ cm}^{-1}$ . This behavior suggests that the ligand is coordinated to the metal ion through the C–N group. Thermogravimetric curves of the free ligand coordinated to copper(II) ion (not presented in this text), show a difference in the on-set temperatures. The dipyridyl ligand shows one mass loss at  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , referring to organic degradation of the molecule. The copper(II) complex, however, shows one mass loss dislocated at  $324\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  higher), suggesting that the ligand coordinates with Cu(II) ions. This thermal stabilization is observed by comparing the free ligand and its respective complex, where the metal ion, via coordinative binding, stabilizes the organic molecule. Absence of coordinated or adsorbed water molecules, in a complex case, confirms the results of the infrared spectrum and the macroscopic observations. The scanning electron microscopy (SEM) of the material is presented in Fig. 3.

Fig. 3a–c shows heterogeneous morphology and structural organization, corroborating with the crystalline aspect observed. The chemical composition of the compound coordination was determined by the energy dispersive spectrometer (EDS) (Fig. 3d). The EDS spectra were used to identify the existence of a particular element and the presence of carbon, oxygen and copper is observed, confirming the characterization data and confirming the formation of the material. The crystallinity of the copper complex was confirmed by X-ray diffractometry, where a standard type of polycrystalline solid was observed. However, was not

possible determine the chemical structure of the coordination compound.

### 3.2. Effect of NaOH concentration

The effect of NaOH concentration on the magnitude signal was studied using the conditions initially established (8 pulses of the reducing sugar and NaOH solutions each and 10 sampling cycles), a concentration of  $10.0\text{ g L}^{-1}$  of the reducing sugar solution maintained at constant and NaOH solutions with concentrations ranging from  $0.02$  to  $0.1\text{ mol L}^{-1}$ . In this study, we noted that in concentrations below  $0.05\text{ mol L}^{-1}$ , the analytical signals have low signal magnitude when compared to signals related to the concentration  $0.05\text{ mol L}^{-1}$ . At concentrations above  $0.05\text{ mol L}^{-1}$ , the magnitude of the analytical signal dramatically decreased with increased the concentration of NaOH. So, we can say that the solid-phase reagent present in the reaction column deteriorated rapidly with the higher concentrations of NaOH. Therefore, we selected the concentration  $0.05\text{ mol L}^{-1}$  which enabled a better result in intensity and repeatability of the analytical signal and did not cause degradation of the solid-phase reagent.

### 3.3. Effect of the temperature and volumetric ratio

Temperature influences the redox reaction between copper(II) complex and reducing sugar. The effect of the temperature on the magnitude of the signal varying between  $60$  and  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  was studied, maintaining the concentration at  $10.0\text{ g L}^{-1}$ , and yielding the results shown in Fig. 4. As we can see in Fig. 4, line (a), the monitored analytical signal increased as the temperature

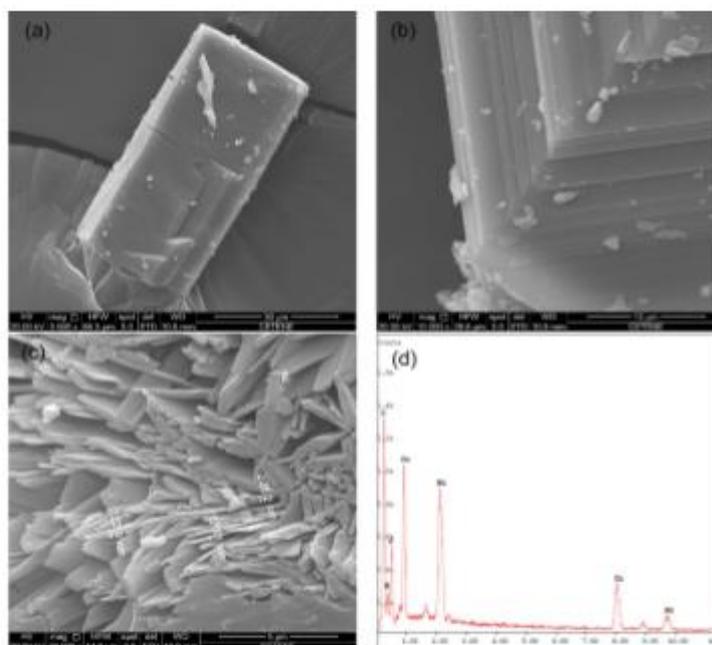


Fig. 3. Scanning electron microscope (SEM) of the coordination compound, with increased 3500 $\times$  (a) 10,000 $\times$  (b), 20,000 $\times$  (c) and energy dispersive spectrometry (EDS) (d).

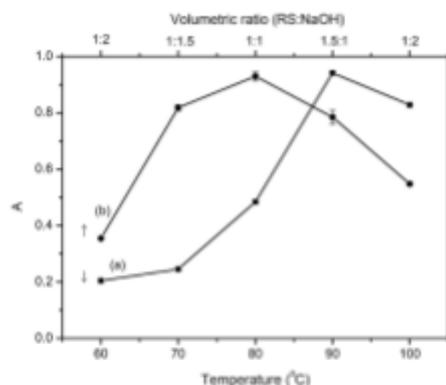


Fig. 4. Effects concerning of the temperature (a) and volumetric ratio between reducing sugar and NaOH (b).

increased, up to a temperature of 90 °C, then, there was a decrease at 100 °C. Given the obtained results, a temperature of 90 °C was established.

The volumetric ratio might affect the sensibility of the procedure. The study was realized using some fixed parameters, such as 90 °C, 10.0 g L<sup>-1</sup> of reducing sugar and 0.05 mol L<sup>-1</sup> of NaOH solutions and 10 sample cycles. Slugs of the reducing sugar and NaOH solutions of between 320 and 640 µL were inserted in the analytical path, corresponding to variations in volumetric ratio sample/NaOH between 1:2 and 2:1 (v/v), yielding the results shown in Fig. 4. As we can see in Fig. 4, line (b) with a volumetric ratio of 1:2 and 1:1.5 (v/v), there is a decrease in the magnitude of the analytical signal compared to the volumetric ratio of 1:1 (v/v). This is possibly due to the fact that in the process of diluting the sample solution (reducing sugar) excess NaOH solution was employed. In the volumetric ratios of 1.5:1 to 2:1 (v/v), we can note the decrease of the magnitude of the analytical signal, possibly due to the lack of efficiency of the NaOH to alkalize the reaction medium for the reaction of reducing sugars with the solid-phase reagent. Thus, the 1:1 (v/v) volumetric ratio was employed.

### 3.4. Effect of pulses number and sampling cycles

The effect of the sample volume on the analytical response was investigated at between 1 and 10 pulses using a 10.0 g L<sup>-1</sup> reducing sugar reference solution, a 50 mmol L<sup>-1</sup> NaOH solution, a stroke volume ratio of 1:1 (Sample:NaOH), 10 sampling cycles and

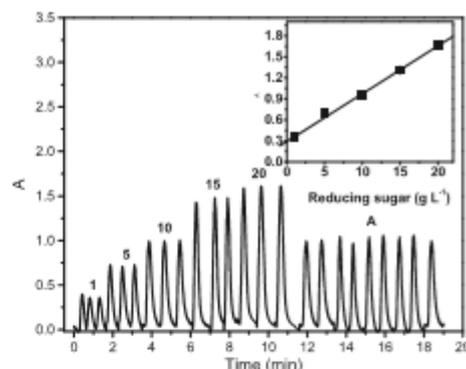


Fig. 5. Transient signals for reducing sugar reference solutions. Numbers indicate concentrations in g L<sup>-1</sup> and letters indicate the consecutive insertion of the 10 g L<sup>-1</sup> reducing sugar solution. The inset shows the corresponding analytical curve graph.

temperature of 90 °C. The analytical signal increased up to 2 pulses and, subsequently, remained constant. Thus, two pulses for each solution were achieved.

Considering that the volume of the sample zone might affect the analytical signal, additional experiments were carried out using the same conditions established in the study of the number of pulses. The volume sample zone was increased from 80 to 240 µL by varying the number of sampling cycles from 5 to 30. The analytical response increased linearly between 5 and 20 cycles. When the number of sampling cycles was higher than 25 and 30, the analytical signal also increased, however these conditions showed low repeatability and the Schlieren effect was quite pronounced (Rocha & Nóbrega, 1996). Given this, the inserted volumes of sample (reducing sugar) and NaOH solutions of 160 and 160 µL, respectively, were selected, which corresponds to 20 sampling cycles.

### 3.5. Figures of merit and recovery

The analytical signals for the determination of reducing sugar between 1.0 and 20.0 g L<sup>-1</sup> were evaluated, as shown in Fig. 5. Under optimized conditions, the system showed a stable baseline and a satisfactory repeatability of analytical signals with a relative standard deviation of 4.7% (n = 9) to consecutive insertion of the 10.0 g L<sup>-1</sup> reducing sugar solution (letter A, Fig. 5).

The proposed flow system presented a linear response between 1.0 and 20.0 g L<sup>-1</sup>, described by the equation  $A = (0.29 \pm 0.04)$

Table 2  
Analytical performance comparison between proposed and other methods described in literature.

Figures of merits	(Oliveira et al., 2001)	(Lopes et al., 1995)	(Sartini et al., 1998)	(Araujo et al., 2000)	(Maquieira, De Castro, & Valcarlos, 1987)	This work
Linear range (g L <sup>-1</sup> )	0.0072–0.072	25–200	0.20–1.00	2–25 or 20–140	0.05–1.0	1–20
Linear coefficient (R)	–	0.96	0.99	0.99	0.99	0.99
Limit of detection (g L <sup>-1</sup> )	0.0016	0.00054	–	1.2 or 11.2	–	0.225
Relative standard deviation (%)	1.9 (n = 12)	<4	<0.9	2.1 or 1.7 (n = 10)	1.61 (n = 3)	4.47 (n = 7)
Consumption of sample (mL) <sup>a</sup>	0.12	0.15	–	0.12	0.23	0.16
Consumption of reagent (g) <sup>a</sup>	2.0	0.20	0.04	0.9	0.04	0.0006
Waste generation (mL) <sup>a</sup>	–	6.0	–	10.6–11.7	–	1.320
Sampling throughput (h <sup>-1</sup> )	54	50	15	18 or 14	50	75

<sup>a</sup> Per determination.

**Table 3**  
Recovery tests for reducing sugar.

Samples	Added g L <sup>-1</sup>	Found	Recovered (%)
1	10.0	9.86 ± 0.02	98.6
2	10.0	10.95 ± 0.01	109.5
3	10.0	9.46 ± 0.01	94.6
4	10.0	10.93 ± 0.03	109.3
5	10.0	9.60 ± 0.01	96.0

**Table 4**  
Comparison of the reducing sugar determination results between proposed and official methods, values expressed in g L<sup>-1</sup>.

Samples	Proposed method	AOAC method
1	38.35 ± 0.01	31.20 ± 0.07
2	41.30 ± 0.03	43.9 ± 0.1
3	57.75 ± 0.01	62.0 ± 0.1
4	54.40 ± 0.05	61.9 ± 0.1
5	45.50 ± 0.01	48.9 ± 0.3
6	69.40 ± 0.04	76.6 ± 0.1
7	98.50 ± 0.01	104.5 ± 0.2
8	58.90 ± 0.07	61.6 ± 0.3
9	68.70 ± 0.02	67.6 ± 0.3
10	61.80 ± 0.05	67.0 ± 0.1

$C \pm (0.068 \pm 0.002)$ ,  $R = 0.9978$ , where  $A$  = absorbance and  $C$  = concentration in g L<sup>-1</sup> was achieved. The limit of detection and quantification of 0.23 and 0.75 g L<sup>-1</sup>, respectively, sampling throughput of the 75 determinations per hour and effluent generation of 1320 µL per determination were estimated. The solid-phase reactor showed an operating lifetime of 83 determinations for 50 mg of the coordination compound, after there has been a loss of reproducibility. The performance of the proposed procedure compared to the literature methods yielded the results summarized in Table 2.

The proposal analytical method is noteworthy due to its sampling rate of 75 determinations per hour, its low consumption of the reagent (600 µg of copper–4,4′-dipyridyl and 160 µL of NaOH per determination) and of the sample solution (160 µL per determination).

Data referring to analysis of the tests of addition and recovery from the five juice samples are presented in Table 3. The results obtained confirm the efficiency of the proposal procedure with low influence of the matrix, with test values of addition and recovery between 94.6 and 109.5%.

### 3.6. Comparison results

Once the optimal operational conditions had been established and to demonstrate the feasibility of the proposed system, a set of juice and coconut water samples was analyzed in order to test the usefulness of the proposed procedure and to compare with the official method, yielding the results shown in Table 4. For comparison of data obtained by proposed method with that obtained by the AOAC method (Gaithersburg, 1996, chap. 44), the paired t-test with results at a 95% confidence level was applied. The calculated value was  $t = 1.882$  while the theoretical value was  $t = 2.262$ , indicating that there was no statistically significant difference between the results.

## 4. Conclusion

The data obtained from the characterizations of coordination compound, synthesized under hydrothermal conditions, suggest that the copper (II) ion was coordinated to 4,4′-dipyridyl.

We consider the overall performance, including equipment, setup control software, and the proposed procedure to be simple, fast and easy to operate, with the additional advantage of being robust and consuming a stoichiometric amount of the reagent.

With the proposed multicommuted flow approach, the determination of reducing sugar employing copper–4,4′-dipyridyl packed in a reactor as the solid-phase reagent is viable.

## Acknowledgments

The authors are grateful to FACEPE (APQ-0663-L06/10), CNPq (proc. 310919/2009-6) and CAPES for financial support.

## References

- Araujo, A. N., Lima, J. L. F. C., Rangel, A. O. S. S., & Segundo, M. A. (2000). Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. *Talanta*, 52, 59–66.
- Bonfácio, V. C., Figueiredo-Filho, L. C., Marcolino, L. H., & Fatibello, O. (2007). An improved flow system for chloride determination in natural waters exploiting solid-phase reactor and long pathlength spectrophotometry. *Talanta*, 72, 663–667.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kulkarni, R. E. (1996). *Principles and practices of winemaking*. Chapman & Hall.
- Dutta, N., Mukhopadhyay, A., Dasgupta, A. K., & Chakrabarti, K. (2014). Improved production of reducing sugars from rice husk and rice straw using bacterial cellulase and xylanase activated with hydroxyapatite nanoparticles. *Bioresource Technology*, 153, 269–277.
- Fatibello, O., Marcolino-Junior, L. H., & Perrina, A. V. (1999). Solid-phase reactor with copper(II) phosphate for flow-injection spectrophotometric determination of aspartame in tabletop sweeteners. *Analytica Chimica Acta*, 384, 167–174.
- Fernández-Novales, J., López, M.-I., Sánchez, M.-T., Morales, J., & González-Caballero, V. (2009). Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. *Food Research International*, 42(2), 285–291.
- Gaithersburg, M. D. (1996). *Official methods of analysis of AOAC International* (16th ed.). AOAC International.
- Gao, F., Luo, F., Chen, X., Yao, W., Yin, J., Yao, Z., et al. (2009). A novel nonenzymatic fluorescent sensor for glucose based on silica nanoparticles doped with europium coordination compound. *Talanta*, 40, 202–206.
- Hodge, J. E., & Osman, E. M. (1976). Carbohydrates. In O. R. Fennema (Ed.), *Principles of food science chemistry* (pp. 41–138). Madison: Dekker (Chapter 3).
- Kojlo, A., & Calatayud, J. M. (1995a). Flow-spectrophotometric determination of N-substituted phenothiazine derivatives by oxidation with a solid-phase reactor of manganese dioxide incorporated in polyester resin beads. *Talanta*, 42, 900–913.
- Kojlo, A., & Calatayud, J. M. (1995b). Spectrofluorimetric flow injection determination of adrenaline with an iodine solid-phase reactor. *Talanta*, 2670.
- Kolchat, S., Chaicham, A., Ekgrak, S., Tumchareon, G., Tuntulani, T., & Tomapatanaget, B. (2012). Self-assembled coordination nanoparticles from nucleotides and lanthanide ions with doped-boreonic acid-fluorescein for detection of cyanide in the presence of Ca<sup>2+</sup> in water. *Talanta*, 80, 264–269.
- Lavorante, A. F., Morales-Rubio, A., de la Guardia, M., & Reis, B. F. (2005). Micro-pumping flow system for spectrophotometric determination of anionic surfactants in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1305–1309.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1995). *Principles of biochemistry* (2nd ed.). New York: Worth.
- Lilley, J. S., Newton, G. W. A., Instrum, N., Phys, M., & De Castro, M. D. I. (1992). Solid-phase reactors in flow injection analysis. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 11, 149–155.
- Lopes, Y. I. M. S., Rangel, O. S. S., Lima, J. L. F. C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (1995). Construction and use of a tubular picrate ion-selective electrode for reducing sugar determination in Port wine by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 308, 122–128.
- Maquieira, A., Castro, M. D. I. De, & Valcarlos, M. (1987). Determination of reducing sugars in wine by flow injection analysis. *Analyst*, 112, 1569–1572.
- Marsili, R. T. (1977). Gas-chromatographic procedure for determination of organic-acids and reducing sugars in fermenting cucumber juice. *Journal of Food Science*, 42, 52–56.
- Mattos, I. L., Zagatto, E. A. G., & Jacinto, A. O. (1988). Spectrophotometric flow-injection determination of sucrose and total reducing sugar in sugar-cane juice and molasses. *Analytica Chimica Acta*, 214, 247–257.
- Mistri, S., Zangrando, E., & Manna, S. C. (2013). Cu(II) complexes of pyridine-2,6-dicarboxylate and N-donor neutral ligands: synthesis, crystal structure, thermal behavior, DFT calculation and effect of aromatic compounds on their fluorescence. *Inorganica Chimica Acta*, 405, 331–338.
- Mukhopadhyay, A., Dutta, N., Chattopadhyay, D., & Chakrabarti, K. (2013). Degumming of rambutan fiber and the production of reducing sugars from waste peels using nanoparticle supplemented pectate lyase. *Bioresource Technology*, 137, 202–208.

- Morozoff, M., & Khorasani-Motlagh, M. (2003). Solid-phase iodine as an oxidant in flow injection analysis: determination of ascorbic acid in pharmaceuticals and foods by background correction. *Talanta*, *61*, 173–179.
- Oliveira, A. F., Fatibello, O., & Nóbrega, J. A. (2001). Focused-microwave-assisted reaction in flow injection spectrophotometry: a new liquid–vapor separation chamber for determination of reducing sugars in wine. *Talanta*, *55*, 677–684.
- Papastathopoulos, D. S., Nikolakis, D. P., & Hadjiioannou, T. P. (1977). Determination of reducing sugars in honey, marmalades and fruit juices using a copper ion-selective electrode. *Analyst*, *102*, 852.
- Peris-Tortajada, M., Puchades, R., & Magüeira, A. (2000). Determination of reducing sugars by the neocuproine method using flow injection analysis. *Food Chemistry*, *43*, 65–69.
- Pina-Izals, G., Martínez-Quirós, M., Ochoa-Terán, A., Santacruz-Ortega, H., & Mendez-Valenzuela, E. (2013). New dual emission fluorescent sensor for pH and Pb(II) based on bis(supthalimide) derivative. *Journal of Luminescence*, *134*, 729–738.
- Rocha, F. R. P., & Nóbrega, J. A. (1996). Eletro Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, *19*(6), 636–640.
- Rocha, F. R. P., Reis, B. F., Zagatto, E. A. G., Lima, J. I. F. C., Lapa, R. A. S., & Santos, J. I. M. (2002). Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, *468*, 119–131.
- Sartini, R. P., Oliveira, C. C., Zagatto, E. A. G., & Bergamini, H. (1998). Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry. *Analytica Chimica Acta*, *366*, 119–125.
- Silveira, M. H. L., Aguiar, R. S., Silka-aho, M., & Ramos, I. P. (2014). Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. *Bioresource Technology*, *151*, 392–396.
- Vats, S., & Negi, S. (2013). Use of artificial neural network (ANN) for the development of bioprocess using *Pinus roxburghii* fallen foliage for the release of polyphenols and reducing sugars. *Bioresource Technology*, *140*, 392–398.
- Vicentini, E. C., Suarez, W. T., Cavalheiro, E. T. G., & Fatibello, O. (2012). Flow-injection spectrophotometric determination of captopril in pharmaceutical formulations using a new solid-phase reactor containing AgSCN immobilized in a polyurethane resin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *48*, 325–333.