

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

NATHÁLIA ALMEIDA ALVES

**ESTRATÉGIA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM PAPEL PARA DETERMINAÇÃO
DE FERRO EM ETANOL COMBUSTÍVEL**

UBERLÂNDIA
2019

NATHÁLIA ALMEIDA ALVES

**ESTRATÉGIA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM PAPEL PARA DETERMINAÇÃO
DE FERRO EM ETANOL COMBUSTÍVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues
Batista

UBERLÂNDIA
2019

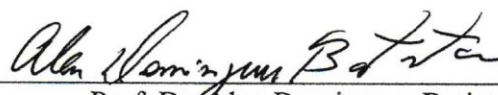
NATHÁLIA ALMEIDA ALVES

**ESTRATÉGIA DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM PAPEL PARA
DETERMINAÇÃO DE FERRO EM ETANOL COMBUSTÍVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Química
Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues
Batista

Banca Examinadora



Prof. Dr. Alex Domingues Batista
(Orientador)



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Examinador)



Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva
(Examinador)

Uberlândia, 05 de julho de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir viver experiências maravilhosas e me conceder saúde para superar os desafios. Sem Ele jamais teria chegado até aqui.

Aos meus pais, Suely e William, por tudo o que me proporcionaram até hoje e por todo apoio e amor incondicional. Todas as minhas conquistas são graças a vocês.

A minha irmã, Patrícia, por todas as conversas e incentivos durante todo o período da graduação.

A minha sobrinha, Giovanna, por sempre alegrar cada um dos meus dias desde a sua chegada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alex Batista Domingues, pela orientação, paciência e confiança durante todos esses anos de convivência.

Ao Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci, por toda a instrução e colaboração na execução deste trabalho.

A todos os membros e ex-membros do GrISA (Grupo de Instrumentação e Separação Analítica), Josiele, Bruno, Diandra, Caio e Weida pelas conversas, ensinamentos e momentos de descontração. Em especial a Ana Carolina pela parceria e amizade construída durante todos esses anos de graduação. Com toda certeza, vocês fizeram dos meus dias, dias mais felizes.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na conclusão desta etapa.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, pelo espaço físico concedido.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz e Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva por aceitarem o convite e pelas contribuições para este trabalho.

RESUMO

Dentre os contaminantes orgânicos e inorgânicos inseridos na composição do etanol combustível, os metais de transição, como o ferro, apresentam grande poder catalítico na peroxidação de hidrocarbonetos presentes na gasolina ou ainda na oxidação de componentes do motor, podendo comprometer a eficiência dos mesmos, ainda que em baixas concentrações. As técnicas oficialmente empregadas para o controle desses contaminantes requerem analistas especializados ou ainda a aplicação métodos de separação e pré-concentração como a extração em fase sólida (SPE). Dessa forma, a busca por métodos simples, portáteis, sensíveis e de baixo custo é importante para facilitar o monitoramento de contaminantes inorgânicos presentes em concentrações traço em combustíveis. O presente trabalho descreve um procedimento alternativo de pré-concentração em papel para determinação de Fe^{3+} em etanol combustível. A estratégia de pré-concentração foi baseada na adição sequencial de alíquotas de Fe^{3+} na zona hidrofílica de dispositivos analíticos microfluídicos à base de papel (μPADs), os quais eram constantemente aquecidos utilizando um sistema de aquecimento para evaporação dos componentes voláteis da amostra. A detecção e quantificação do analito foram baseadas na reação colorimétrica entre Fe^{3+} e SCN^- , obtendo-se um complexo vermelho característico. A captura das imagens foi feita por um *smartphone*, 10 minutos após o início da reação, e os dados foram analisados na escala RGB através do programa *ImageJ*, sendo relacionados a concentração de Fe^{3+} . Na etapa de pré-concentração foram otimizados o diâmetro do μPAD utilizado (20 mm), o número e os volumes das alíquotas de Fe^{3+} e SCN^- adicionadas (40 alíquotas de 25 μL e 1 alíquota de 25 μL , respectivamente) e a temperatura do sistema de aquecimento ($T = 90^\circ\text{C}$). Foi observada uma resposta linear no intervalo de 5 a 30 mg L^{-1} de Fe^{3+} , com um coeficiente de determinação de 0,9937, um coeficiente de variação de 1,89%, um limite de detecção visual de 5 mg L^{-1} e um fator de pré-concentração de 33,6. Com essas características, o procedimento apresentou vantagens como baixo consumo de reagentes e amostra, e consequentemente, redução dos resíduos gerados, além da portabilidade (o que facilita a aplicação em áreas remotas) e o custo reduzido.

Palavras-chaves: Pré-concentração, Etanol Combustível, μPADs .

ABSTRACT

Among the organic and inorganic contaminants inserted in the composition of fuel ethanol, transition metals, such as iron, have great catalytic power in the peroxidation of hydrocarbons present in gasoline or even in the oxidation of engine components, which may compromise its efficiency even at low concentrations. The officially employed in the control of these contaminants require specialized analysts or even the application of separation and preconcentration methods such as solid phase extraction (SPE). Thus, the search for simple, portable, sensitive and low-cost methods is important to facilitate the monitoring of inorganic contaminants present in trace concentrations in fuels. The present work describes an alternative in-paper preconcentration procedure for the determination of Fe^{3+} in fuel ethanol. The preconcentration strategy was based on the sequential addition of Fe^{3+} aliquots in the hydrophilic zone of paper-based microfluidic analytical devices (μ PADs), which were constantly heated using a heating system for evaporation of volatile sample components. The detection and quantification of the analyte were based on the colorimetric reaction between Fe^{3+} and SCN^- , obtaining a characteristic red complex. The images were captured by a smartphone, 10 minutes after the start of the reaction, and the data were analyzed in the RGB scale through the ImageJ program, being related the concentration of Fe^{3+} . In the preconcentration stage, the diameter of the μ PAD used (20 mm), the number and the volumes of the added Fe^{3+} and SCN^- aliquots (40 aliquots of 25 μL and 1 aliquot of 25 μL , respectively) were optimized and the temperature of the heating system ($T = 90^\circ \text{C}$). A linear response in the range of 5 to 30 mg L^{-1} of Fe^{3+} was observed, with a coefficient of determination of 0.9937, a coefficient of variation of 1.89%, a visual detection limit of 5 mg L^{-1} and a preconcentration factor of 33.6. With these characteristics, the procedure presented advantages such as low reagent and sample consumption, and consequently, reduction of generated waste, besides portability (which facilitates the application in remote areas) and the reduced cost.

Keywords: Preconcentration, Ethanol Fuel, μ PADs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquemas dos métodos de fabricação dos μ PADs. (Extraída de (DA SILVA, 2018), adaptado de (CATE <i>et al.</i> , 2015)).	18
Figura 2. Esquema de detecção da reação colorimétrica.	24
Figura 3. Sistema de aquecimento utilizado na etapa de pré-concentração.	25
Figura 4. Efeito da concentração de ácido na estabilidade do complexo.	29
Figura 5. Estudo da temperatura de aquecimento na distribuição da cor do complexo (μ PADs de 10 mm).	31
Figura 6. Estudo da temperatura de aquecimento na distribuição da cor do complexo (μ PADs de 20 mm).	32
Figura 7. Estudo da uniformidade da cor no anel formado.	34
Figura 8. Efeito da sequência de adição dos reagentes na etapa de pré-concentração.	35
Figura 9. Curva analítica para o sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ sem pré-concentração.	36
Figura 10. Curva analítica para o sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ com pré-concentração.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações do etanol anidro combustível (EAC) e do etanol hidratado combustível (EHC) e normas técnicas empregadas.	15
Tabela 2. Parâmetros de calibração obtidos para as calibrações com e sem pré-concentração.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μPADs Dispositivos Microfluídicos à Base de Papel

μTAS Microssistemas de Análises Totais

AAS Espectrometria de Absorção Atômica

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

CV Coeficiente de Variação

EAC Etanol Anidro Combustível

EHC Etanol Hidratado Combustível

LD Limite de Detecção

LIBS Espectroscopia de Emissão Óptica em Plasma Induzido por Laser

LLE Extração Líquido-Líquido

LLMF Microextração Líquido-Líquido

NBR Normas Brasileiras

ODR Densidade Óptica Relativa

SFE Extração por fluido supercrítico

SPE Extração em Fase Sólida

SPME Microextração em Fase Sólida

UV Ultravioleta

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
1.1- O Etanol Combustível	11
1.1.1- Controle de Qualidade do Etanol Combustível	12
1.2- Pré-concentração	16
1.3- Dispositivos Analíticos Microfluídicos à Base de Papel (μ PADs)	17
1.3.1- Métodos de Detecção em μ PADs	19
2- OBJETIVO	22
3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
3.1- Reagentes e soluções	23
3.2- Instrumentação.....	23
3.3- Fabricação dos μ PADs	26
3.4- Detecção colorimétrica	26
3.5- Etapa de pré-concentração	27
3.5.1- Otimização	27
3.5.2- Curva de calibração	27
3.6- Determinação de ferro por espectrometria de absorção atômica por chama	28
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1- Reação $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ em μ PADs	29
4.1.1. Estabilidade da cor do complexo $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$	29
4.2- Sistema de Pré-concentração	30
4.2.1- Influência da Temperatura de Aquecimento	31
4.2.2- Uniformidade da cor no anel formado	33
4.2.3- Sequência de adição dos reagentes na visualização da cor do complexo $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$	34
4.3- Característica Analíticas	35
4.3.1- Faixa Linear	35
4.3.2- Limite de Detecção (LD) e Fator de Pré-concentração	38
4.4- Aplicação em amostras reais	38
4.5- Perspectivas Futuras	38
5- CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1- INTRODUÇÃO

1.1- O Etanol Combustível

O etanol ou álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é produzido, essencialmente, mediante a processos fermentativos de açúcares já presentes na composição de produtos de origem vegetal como cana-de-açúcar e beterraba, ou através de compostos que resultam nesses monossacarídeos por uma etapa de hidrólise, que antecede a fermentação, como os amiláceos (milho e mandioca) e lignocelulósicos (madeira e bagaço de cana). Outras maneiras de obtenção do etanol envolvem processos de síntese a partir de hidrocarbonetos insaturados, como eteno e etino, e de gases de petróleo – processo economicamente viável em países onde se encontram grandes reservas deste combustível (LIMA *et al.*, 2001).

No Brasil, a principal fonte utilizada para a produção de etanol é a cana-de-açúcar, apresentando vantagens como maior rendimento de etanol/hectare de plantação e menor custo de produção, além da estar diretamente ligada à redução de emissão de gases de efeito estufa, como o dióxido de carbono – CO_2 , e contribuir para diversificação da matriz energética pela geração de outras matérias-primas que, também, se apresentam como uma alternativa na produção de energia (LEITE; CORTEZ, 2007).

Dentre suas diversas finalidades, como na produção de solventes, bebidas e produtos farmacêuticos, o etanol é empregado como combustível de veículos de duas maneiras: na forma hidratada (94,5 % v/v de etanol), chamado de etanol hidratado combustível (EHC), utilizado diretamente como biocombustível em motores a combustão interna; e, misturado à gasolina em proporções variadas definidas pela legislação, denominado etanol anidro combustível (EAC), com a finalidade de aumentar a octanagem da gasolina e reduzir a emissão de poluentes atmosféricos (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2015; CHIEPPE JÚNIOR, 2012).

O consumo do etanol como combustível no Brasil se deu pela primeira vez em 1925. Com o objetivo de reduzir a dependência nacional do petróleo importado, cerca de 80% do petróleo consumido, foi criado em 1975, o Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool), estimulando o aumento da produção de etanol anidro a ser adicionado à gasolina. Em 1978, ocorreu o surgimento de veículos com motores movidos exclusivamente a álcool, levando também a crescentes produções de etanol hidratado no país. Nos anos seguintes, as oscilações no mercado internacional de açúcar e petróleo comprometeram significativamente o mercado

interno do etanol. O cenário mudou somente nos anos 2000, especificamente a partir de 2003, com a chegada de veículos bicompostíveis – ou *flex fuel* (operados tanto a álcool quanto a gasolina, ou pela mistura dos dois), juntamente a um aumento nos preços do petróleo e aos incentivos na redução de consumo de combustíveis fósseis, estabelecidos pelo Protocolo de Kyoto (MICHELLON; SANTOS; JULIANO, 2008).

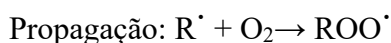
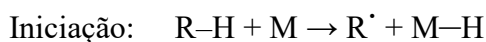
Atualmente, devido à expansão na produção e a alta demanda interna e externa (através das exportações), é necessário um rigoroso controle quanto à qualidade do etanol.

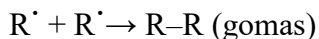
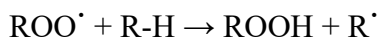
1.1.1- Controle de Qualidade do Etanol Combustível

Algumas espécies orgânicas, advindas dos processos fermentativos de açúcares, tais como ésteres, cetonas, aldeídos e ácidos orgânicos são frequentemente encontradas na composição do etanol combustível (PEREIRA; LIMA; DA SILVA, 2016). Íons metálicos como sódio, potássio, níquel, cobre e ferro são ditos como contaminantes inorgânicos, sendo alguns deles inseridos nessa matriz orgânica por meio das etapas envolvidas na produção do etanol ou ainda na fase de armazenamento (SANTOS *et al.*, 2012; TAKEUCHI *et al.*, 2007).

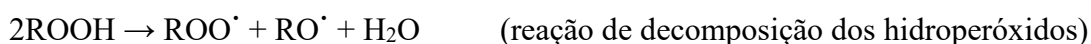
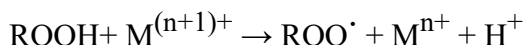
Apesar de serem encontrados em baixas concentrações, a presença de íons metálicos pode comprometer o bom desempenho dos motores, principalmente aqueles movidos à mistura etanol-gasolina, devido a formação de gomas (sólidos insolúveis) por processos de peroxidação dos hidrocarbonetos presentes na gasolina; ou ainda por processos oxidativos dos componentes do motor, levando a possíveis emissões de gases de escape, como monóxido de carbono CO (PEREIRA; PASA, 2005).

Os íons metálicos, em especial os metais de transição (como cobre, níquel, manganês, cobalto, ferro, dentre outros), podem levar a peroxidação dos hidrocarbonetos de duas formas. A primeira é catalisando a formação de radicais livres. As etapas envolvidas nesse processo são resumidamente descritas pela reação abaixo (HAZLETT, 1991):





A segunda maneira é pela decomposição de hidroperóxidos, formados no processo de propagação (WAYNICK, 2001):



Onde: RH - hidrocarboneto; M – metal; $\text{R}^\cdot$ – radical livre; $\text{ROO}^\cdot$ – radical peroxil;

$\text{RO}^\cdot$ – radical alcóxil; ROOH – hidroperóxido

Em geral, o mecanismo que leva a formação das gomas depende da natureza química do metal. Metais de caráter oxidante catalisam, preferencialmente, a decomposição dos hidroperóxidos, enquanto metais fortemente redutores levam a formação de radicais livres. Quando os metais tem o potencial de se converter facilmente entre dois estados de oxidação, atuando tanto como agente oxidante quanto como agente redutor, o processo catalítico leva a formação de elevadas quantidades de hidroperóxidos, aumentando as taxas de peroxidação dos hidrocarbonetos (WAYNICK, 2001).

Para garantir a qualidade dos produtos comercializados, a Agência Nacional de Petróleo (ANP) determina mediante ao regulamento técnico ANP N° 2/2015 presente na resolução ANP n°19 de 15 de abril de 2015, as especificações do etanol combustível anidro e hidratado, produzido ou não no Brasil, quanto as características físico-químicas, incluindo os métodos de verificação propostas por órgãos regulamentadores como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), responsável pelas Normas Brasileiras (NBR) (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2015).

Dentre os métodos oficiais descritos para o controle de qualidade do etanol combustível, se destacam a titulação colorimétrica para determinação da acidez total, titulação potenciométrica para determinação do pH, método volumétrico de Karl Fischer na determinação do teor de água, cromatografia gasosa para determinação dos teores de metanol e etanol, cromatografia de íons na determinação da concentração de cloreto e sulfato, e a fotometria de chama para determinação de sódio. A determinação da concentração de cobre e ferro é obtida pela aplicação da espectrometria de absorção atômica (AAS), conforme a norma técnica NBR 11331. O limite máximo permitido para o ferro em etanol combustível, tanto anidro quanto hidratado, é de 5 mg kg^{-1} (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2015).

A Tabela 1 mostra as especificações do etanol anidro combustível (EAC) e do etanol hidratado combustível (EHC) apresentadas na resolução ANP nº 19 de 15 de abril de 2015.

Tabela 1. Especificações do etanol anidro combustível (EAC) e do etanol hidratado combustível (EHC) e normas técnicas empregadas.

Característica	Unidade	Limite	
		EAC	EHC
Aspecto	-	Límpido e Isento de Impurezas	
Cor	-	4	5
Acidez total, máx. (em mg de ácido acético)	mg/L	30	
Condutividade elétrica, máx.	μS/m	300	
Massa específica a 20°C	kg/m ³	791,5 máx.	805,2 a 811,2
Teor alcóolico	% massa	99,3 mín.	92,5 a 94,6
Potencial hidrogeniônico (pH)	-	-	6,0 a 8,0
Teor de etanol, mín.	% volume	98	94,5
Teor de água, máx.	% massa	0,7	7,5
Resíduos por evaporação, máx.	mg/100 mL	5	
Teor de hidrocarbonetos, máx.	% volume	3	
Teor de cloreto, máx.	mg/kg	1	
Teor de sulfato, máx.	mg/kg	4	
Teor de ferro, máx.	mg/kg	5	
Teor de sódio, máx.	mg/kg	2	
Teor de cobre, máx.	mg/kg	0,07	-
Teor de enxofre, máx.	mg/kg	-	-
Teor de metanol, máx.	% volume	0,5	

Fonte: ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2015.

Devido a possibilidade de se apresentarem em concentrações muito baixas em matrizes complexas, a quantificação de íons metálicos é dificultada, o que demanda o uso de técnicas extremamente sensíveis, feitas por analistas especializados, ou ainda, a necessidade de etapas de pré-concentração.

1.2- Pré-concentração

A pré-concentração é uma etapa importante na sequência analítica e se faz necessária na análise de diversos analitos, principalmente quando o limite de detecção da técnica empregada é maior do que a concentração do analito em estudo. Esta etapa visa um aumento da concentração do analito de interesse, além de eliminar possíveis interferentes da amostra antes de sua detecção (ALFASSI; WAI, 1992). Diversas técnicas de separação são comumente empregadas na etapa de pré-concentração como, extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração líquido-líquido (LLE), extração por fluido supercrítico (SFE), microextração líquido-líquido (LLME), extração por volatilização e precipitação.

Uma técnica alternativa de pré-concentração foi desenvolvida por Helbert Weisz em 1954 e denominada de *ring oven*, devido a formação de um anel (uma mancha circular estreita) contendo o analito, sobre um substrato (geralmente um papel de filtro). Nesta técnica um cilindro metálico é colocado sobre o substrato e aquecido pelo uso de um fio metálico resistivo posicionado sob o cilindro. A amostra é adicionada por uma micropipeta na forma de gotas no centro do papel de filtro. As gotas de amostra inseridas são difundidas por capilaridade e volatilizadas pelas altas temperaturas do cilindro, restando somente os componentes não voláteis da amostra (analitos). Algumas gotas de solução ácida são adicionadas ao papel e, por arraste, levam esses componentes não voláteis para a borda interna do cilindro, formando um anel estreito. Para identificação qualitativa dos analitos presentes no anel, são utilizados reagentes seletivos para formação de produtos coloridos. Já para a quantificação, técnicas instrumentais como a espectroscopia de emissão óptica em plasma induzido por laser (LIBS) são utilizadas para identificação de íons metálicos em etanol combustível (CORTEZ; PASQUINI, 2012).

No presente trabalho, a quantificação de ferro em etanol combustível é feita baseada no anel gerado na etapa de pré-concentração da amostra por aquecimento, utilizando de

pequenos volumes de amostra e o papel como substrato para pré-concentração do analito. O uso de dispositivos analíticos microfluídicos à base de papel se mostram com um alto potencial para o desenvolvimento de novas técnicas de preparos de amostra e pré-concentração, principalmente por ser um método simples, rápido e de baixo custo.

1.3- Dispositivos Analíticos Microfluídicos à Base de Papel (μ PADs)

A ideia de miniaturização de sistemas de análises, em Química Analítica, surgiu com a criação dos μ TAS – microssistemas de análises totais, dispositivos capazes de realizar todas as etapas analíticas desenvolvidas em um laboratório (desde a introdução da amostra até a detecção) de maneira integrada (MANZ; GRABER; WIDMER, 1990). A miniaturização permitiu a portabilidade dos sistemas analíticos com a manipulação de pequenos volumes de amostras, reagentes e solventes químicos (na escala de micro e nanolitros) e, conseqüentemente, menor geração de resíduos, além da diminuição dos custos das análises, tudo isso associado a um aumento da frequência analítica (COLTRO *et al.*, 2007). Os dispositivos analíticos microfluídicos podem ser confeccionados a partir diversos materiais como vidro e sílica (materiais inorgânicos), polímeros, papel ou ainda pela associação dos mesmos. A escolha do substrato é feita baseada nas suas propriedades, no custo e facilidade de fabricação, e na aplicabilidade do dispositivo (KOVARIK *et al.*, 2012).

Dentre esses materiais, o uso do papel como substrato na produção de dispositivos microfluídicos é bastante vantajoso, principalmente por esse ser um material barato, acessível, versátil, de fácil transporte, manuseio e descarte, além de apresentar uma estrutura porosa que permite o transporte do fluido de amostra por capilaridade. Os μ PADs – dispositivos microfluídicos à base de papel são gerados através da construção de barreiras físicas por meio de diferentes materiais de caráter hidrofóbico, as quais restringem zonas hidrofílicas, sobre um papel cromatográfico ou papel filtro (MARTINEZ *et al.*, 2007).

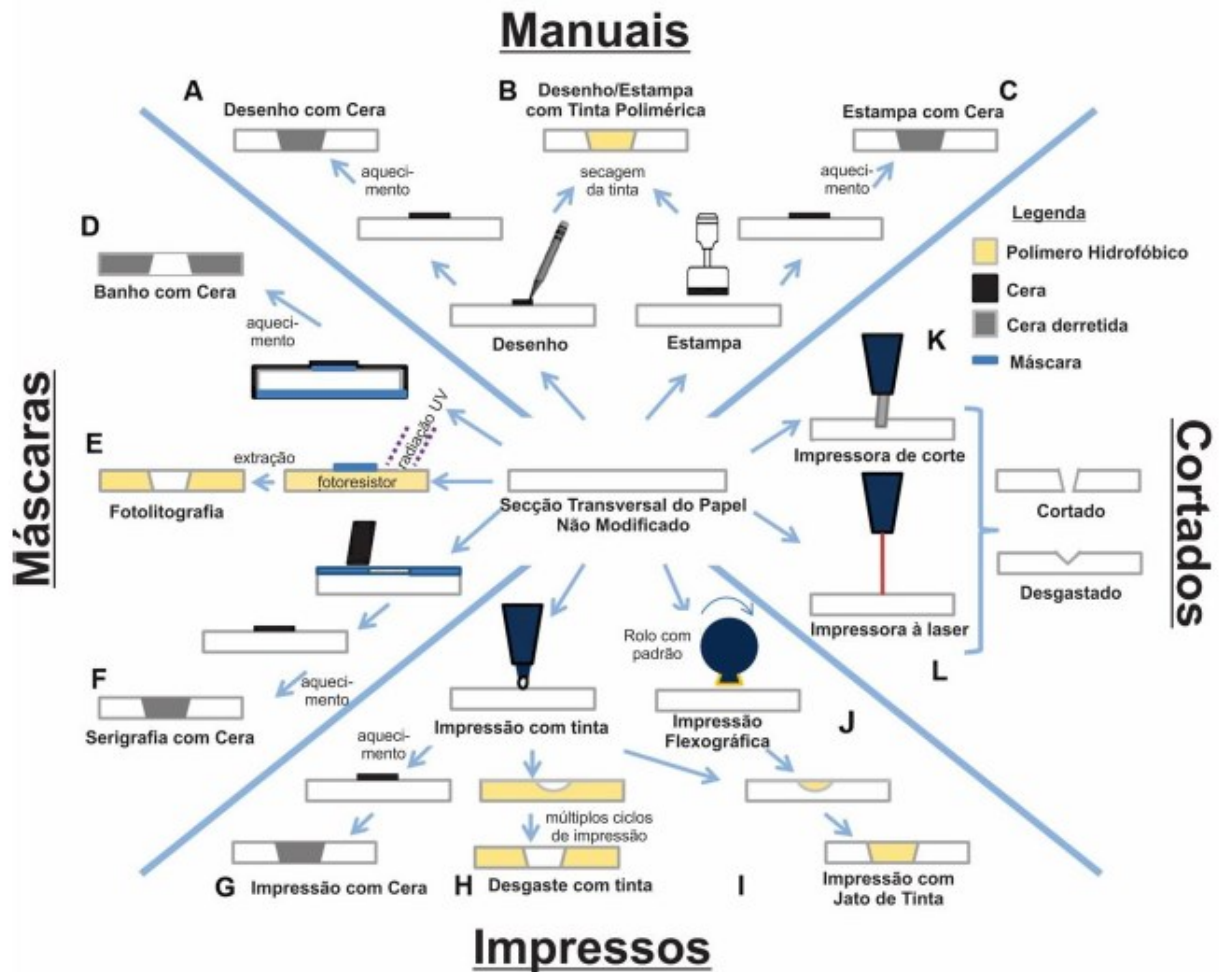
A primeira proposta para o uso de papel como plataforma microfluídica, mostra a fotolitografia como método de fabricação dos dispositivos analíticos (MARTINEZ *et al.*, 2007). A fotolitografia consiste basicamente na criação de padrões/formas no substrato, através da exposição do mesmo à luz ultravioleta (UV). Para isso, é necessário o uso de um material polimérico fotossensível (também denominado de fotorresiste) que permita a gravação desses canais. Apesar de apresentar uma alta resolução entre as áreas hidrofílicas e

hidrofóbicas (cerca de 200 μm de largura mínima), uma desvantagem da fotolitografia é que a mesma exige o uso de reagentes e equipamentos de alto custo, o que pode inviabilizar a aplicação do método (COLTRO *et al.*, 2007).

O método de impressão a cera é baseado na impressão de padrões de cera, desenhados com o auxílio de um *software* gráfico, sobre um papel cromatográfico por meio de impressoras à cera. Após a etapa de impressão, o papel é aquecido em uma placa/chapa de aquecimento ou estufa, permitindo a penetração e o espalhamento da cera nos poros do papel, de modo a formar barreiras hidrofóbicas que definem a zona hidrofílica. É dito como uma alternativa simples por apresentar um menor número de etapas, e possibilitar a produção de uma grande quantia de dispositivos em uma única impressão (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009).

Ao longo dos anos, foram propostas diversas metodologias para fabricação dos μPADs . Dentre elas, destacam-se a serigrafia (DUNGCHAI; CHAILAPAKUL; HENRY, 2011), o corte a laser (NIE *et al.*, 2013), a impressão flexográfica (OLKKONEN; LEHTINEN; ERHO, 2010) e impressão com jato de tinta (ABE; SUZUKI; CITTERIO, 2008). A Figura 1 representa algumas técnicas utilizadas para a confecção de μPADs .

Figura 1. Esquemas dos métodos de fabricação dos μPADs . (Extraída de (DA SILVA, 2018), adaptado de (CATE *et al.*, 2015)).



Dispositivos manuais fabricados usando: (A) desenho com cera, (B) desenho ou estampagem com tinta polimérica, ou (C) estampagem com cera. Máscaras foram utilizadas para proteger regiões para (D) banho com cera, (E) fotolitografia e (F) serigrafia com cera. Técnicas de fabricação com impressoras foram utilizadas para (G) impressão de cera, (H) desgaste por jato de tinta, (I) impressão por jato de tinta, ou (J) impressão flexográfica. Cortes para delimitar regiões ou criar canais foram realizados por (K) impressão por corte ou (L) impressão a laser.

1.3.1- Métodos de Detecção em μ PADs

A escolha do método de detecção é de extrema importância para que se mantenha a portabilidade oferecida pela aplicação dos μ PADs. Dentre os métodos utilizados tais como a detecção eletroquímica, quimioluminescência, eletroquimioluminescência e fluorescência, as detecções colorimétricas se destacam, principalmente pela simplicidade e possibilidade de análises sem o uso de instrumentos (LAND, 2018).

A detecção colorimétrica é realizada a partir de reações químicas que geram mudanças de coloração e comparação com padrões de cores conhecidos. A análise pode ser feita a olho nu, de forma qualitativa ou semiquantitativa. A detecção quantitativa dos analitos, através de reações colorimétricas, é feita com base na refletância – medida da luz refletida, capturada por dispositivos de imagens como câmeras, *smartphones* e *scanners*, e posteriormente analisada por *softwares* de imagem, que se apresentam como boa alternativa para o uso com μ PADs pela facilidade de operação. O sinal obtido é relacionado a concentração do analito em questão. As curvas de calibração com base na refletância não seguem uma função linear, devido a saturação da cor em concentrações elevadas (MARTINEZ; PHILLIPS; WHITESIDES, 2010).

As aplicações de métodos colorimétricos para determinação de ferro, são baseadas nas reações clássicas de Fe^{2+} e 1,10-fenantrolina, e Fe^{3+} e tiocianato. Na literatura, diversos trabalhos envolvem reações de Fe^{2+} e 1,10-fenantrolina em diferentes matrizes. Um exemplo, é o procedimento analítico descrito por Asano e colaborador, utilizando μ PADs construídos pelo uso de uma fotomáscara (para restrição das zonas hidrofílicas) obtida por impressão 3D. Esse método tem aplicação na determinação de ferro em amostras de água de rio e de torneira, através da reação de Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina (após redução do Fe^{2+} pela adição de cloreto de hidroxilamônio), detectada por captura de imagens. A relação linear da curva analítica foi entre 8,9-89 μM de Fe^{2+} , e os resultados analíticos das amostras (sem pré-tratamento) obtiveram boa concordância comparados com a aplicação da espectrometria de absorção atômica (ASANO; SHIRAISHI, 2015).

Garcia e colaboradores desenvolveram um procedimento, também envolvendo a reação de Fe^{2+} e 1,10-fenantrolina em μ PADs, para determinação colorimétrica dos níveis de Fe^{2+} em amostras de humor vítreo (substância gelatinosa encontrada no seguimento posterior do olho) a fim de estimar o intervalo pós-morte em cenas de crime. Devido ao processo de decomposição, o Fe^{2+} é capturado pela transferrina no globo ocular. Portanto, quanto maior o estágio de decomposição, menores são os níveis de Fe^{2+} presentes. Essa correlação foi feita com base na curva analítica, onde a resposta linear foi de 2-10 ppm de Fe^{2+} . O intervalo de pós-morte é melhor estimado em períodos superiores a 1 dia, obtendo grande concordância dos dados com o método de referência (GARCIA *et al.*, 2017).

A desvantagem do uso de reações envolvendo Fe^{2+} , é que elas necessitam de uma etapa de redução do Fe^{3+} a essa espécie por algum agente redutor. Os íons Fe^{2+} são facilmente

oxidados pelo ar em meios neutros ou alcalinos, necessitando estarem em meio levemente ácido.

A reação de Fe^{3+} com íons tiocianato produz uma coloração vermelha e deve ser realizada em meio ligeiramente ácido para que as reações de hidrólise do Fe^{3+} – formação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ acima de pH 2-3, sejam minimizadas. Essa reação não sofre interferência do Fe^{2+} , porém, ânions como fluoreto, fosfato, citrato e oxalato complexam com Fe^{3+} e o tiocianato sob as mesmas condições, complexa com Co, Mo, Bi e Ti resultando em compostos coloridos e pouco solúveis (BACCAN *et al.*, 1988; MARCZENKO; BALCERZAK, 2000).



Além desse, uma série de complexos, dependentes das concentrações de ferro e tiocianato presentes, podem ser formadas como $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$, $[\text{Fe}(\text{SCN})_2]^+$, $[\text{Fe}(\text{SCN})_4]^-$, $[\text{Fe}(\text{SCN})_5]^{2-}$ e $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-}$.

2- OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver um procedimento de pré-concentração simples, portátil e de baixo custo para determinação de ferro em etanol combustível, através da utilização de dispositivos microfluídicos à base de papel (μ PADs) como um microssistema de análise envolvendo a detecção colorimétrica do complexo $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$, com captura e análise de imagens.

3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1- Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes com grau de pureza analítica. Para o preparo das soluções aquosas, foi utilizada água deionizada de alta pureza obtida do sistema de purificação GEHAKA (São Paulo, Brasil) de resistividade 18,8 MΩ cm.

A solução estoque de Fe^{3+} (1,0 mol L⁻¹) foi preparada em um balão volumétrico de 25,0 mL, dissolvendo 6,7600 g de cloreto de ferro hexaidratado $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) em água deionizada, completando-se o volume do balão até o menisco.

A solução estoque de SCN^- (1,0 mol L⁻¹) foi preparada em um balão volumétrico de 25,0 mL, dissolvendo 2,4300 g de tiocianato de potássio KSCN (Dinâmica Química Contemporânea LTDA) em água deionizada, completando-se o volume do balão até o menisco.

Soluções de concentrações desejadas de Fe^{3+} e SCN^- , utilizadas nas etapas de otimização, foram preparadas por diluições apropriadas a partir das soluções estoque.

Para os estudos de estabilidade da reação $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$, soluções estoque de Fe^{3+} (1,0 mol L⁻¹) foram preparadas separadamente, conforme citado acima, com adição de 2 mL de ácido nítrico 0,5 e 1,0 mol L⁻¹ – preparadas através de diluições adequadas de um ácido nítrico 65% v/v (Merck).

Para os estudos feitos durante as etapas de pré-concentração, as soluções de Fe^{3+} foram preparadas em álcool etílico absoluto 99,8% v/v (Dinâmica Química Contemporânea LTDA), de modo a se aproximar das condições da matriz orgânica.

As amostras de etanol combustível foram adquiridas de diferentes postos de gasolina locais.

3.2- Instrumentação

Os reagentes empregados para o preparo das soluções de trabalho foram pesados utilizando uma balança analítica Shimadzu modelo AUY220 com precisão de $\pm 0,1$ mg.

A detecção da reação colorimétrica foi realizada utilizando um *smartphone* (Samsung Galaxy A3, câmera de 8 megapixels – 3264x2448, foco automático), acoplado a uma pequena caixa de fundo removível (para melhor posicionamento do μ PAD), obtida por impressão 3D, para o bloqueio da luz ambiente. (Figura 2). O flash do telefone forneceu uma constante fonte de iluminação para a captura de imagens. A distância entre o celular e o μ PAD foi otimizada em relação a distância focal da câmera do celular e foi fixada em 8,5 cm.

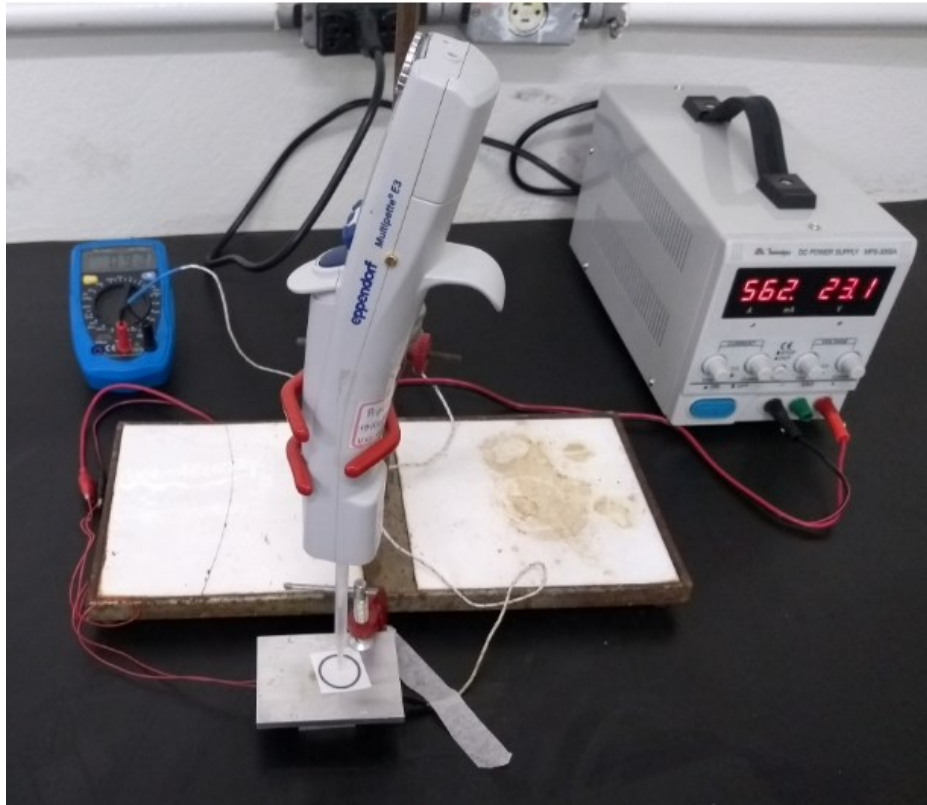
Figura 2. Esquema de detecção da reação colorimétrica.



Fonte: A autora.

A etapa de pré-concentração foi efetuada em um sistema de aquecimento, mediante a aplicação de voltagem, controlada por uma fonte de alimentação de tensão (Minipa DC MPS-3005A), a um filme de poliimida (aquecedor flexível com temperatura máxima de operação de 200°C) posicionado e preso entre duas placas metálicas. A temperatura de aquecimento foi monitorada a partir de um multímetro digital (Minipa ET-1400). A aplicação das alíquotas aos μ PADs foi feita a partir do uso de uma micropipeta eletrônica fixa a um suporte, a fim de garantir que as mesmas se espalhassem radialmente por capilaridade sempre na mesma posição.

Figura 3. Sistema de aquecimento utilizado na etapa de pré-concentração.



Fonte: A autora.

As imagens digitais foram analisadas através do programa *ImageJ* (*software* gratuito de processamento de imagens), pela seleção de geometria circular da zona de detecção. A conversão para escala RGB foi feita por meio do comando *Plugins>Analyze>RGB Measure*, obtendo separadamente, os sinais de intensidade R (vermelho), G (verde) e B (azul) que compõem a coloração detectada, na faixa de 0 a 255. Todos os dados RGB foram exportados e processados pelo programa Microsoft Excel.

Os valores de intensidade obtidos foram convertidos em densidades ópticas relativas (ODR), a fim de corrigir variações de brilho durante a aquisição de imagens por *smartphone* (PASSARETTI FILHO; DA SILVEIRA PETRUCI; CARDOSO, 2015).

$$\text{ODR} = -\log_{10} \frac{R}{R_0} \quad (2)$$

Onde, R é a leitura de intensidade de cor da reação no canal escolhido e R_0 corresponde a intensidade do branco.

As análises seguindo a norma técnica NBR11331, foram realizadas em um Espectrômetro de Absorção Atômica por Chama Varian® SpectrAA-220 (Victoria, Austrália), utilizando uma lâmpada de catodo oco de ferro (marca Varian®, Victoria, Austrália); chama de ar-acetileno e um microcomputador equipado com o *software* “*Spectra AA Worksheet AA Software Version 5.2*”, para visualização das absorbâncias.

3.3- Fabricação dos μ PADs

Os μ PADs utilizados no presente trabalho foram fabricados de acordo com o procedimento relatado por Carrilho e colaboradores (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009). Os padrões dos μ PADs foram desenhados usando o *software* de edição de imagens Adobe Illustrator. Foram impressos em papel cromatográfico (Whatman 41) usando uma impressora a cera (Xerox, ColorQube™ 8580DN). Em seguida, foram aquecidos em uma placa de aquecimento por aproximadamente 5 minutos, para espalhamento da cera pelos poros do papel.

3.4- Detecção colorimétrica

Os estudos de detecção colorimétrica da reação $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ no papel foram realizados em μ PADs de 10 mm de diâmetro.

A reação colorimétrica e sua estabilidade foram avaliadas. Para isso, foram adicionados 5 μL de solução aquosa de Fe^{3+} 6 mmol L^{-1} acidificada com HNO_3 0,5 mol L^{-1} , na zona central do μ PAD, deixando secar em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 5 μL da solução de SCN^- 0,1 mol L^{-1} . A detecção colorimétrica foi realizada pela captura de imagens via *smartphone* por um período de 1 hora, num intervalo de 5 minutos, entre uma captura e outra. O mesmo procedimento foi feito para a solução de Fe^{3+} 3 mmol L^{-1} acidificada com HNO_3 1,0 mol L^{-1} , e também com a solução de Fe^{3+} sem adição de ácido.

Foi construída uma curva de calibração em um intervalo de concentração de Fe^{3+} variando entre 3 e 24 mmol L^{-1} . Para isso, 5 μL de cada solução padrão de Fe^{3+} , preparadas nas concentrações de 3, 6, 9, 12 e 24 mmol L^{-1} , foram adicionados na zona de teste. Após 10 minutos, foram adicionados 5 μL da solução de SCN^- 0,1 mol L^{-1} . A aquisição de imagens foi feita 10 minutos após a adição do reagente.

3.5- Etapa de pré-concentração

3.5.1- Otimização

Foram avaliadas as temperaturas de aquecimento de 50, 60, 70, 80 e 90°C do filme de poliimida. Quinze alíquotas de 5 μL da solução de Fe^{3+} 3 mmol L^{-1} (preparada em meio etanólico) foram adicionadas sequencialmente na zona central dos μPADs de 10 mm de diâmetro, aguardando a evaporação do solvente entre uma adição e outra. Em seguida, foram adicionados 5 μL da solução de tiocianato 0,1 mol L^{-1} nas zonas de detecção, aguardando 10 minutos após a adição para a aquisição das imagens via *smartphone*.

O mesmo foi feito utilizando μPADs de 20 mm de diâmetro, adicionando cinco alíquotas de 15 μL da solução de Fe^{3+} , seguidas de 15 μL da solução de tiocianato.

A sequência de adição dos reagentes no papel para a formação da cor do complexo também foi avaliada.

3.5.2- Curva de calibração

Foi construída uma curva de calibração em um intervalo de concentração de Fe^{3+} variando entre 5 e 30 mg L^{-1} . Para isso, 25 μL da solução de tiocianato 0,1 mol L^{-1} foi adicionado a zona central dos μPADs , deixando secar por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, quarenta alíquotas de 25 μL de cada solução padrão de Fe^{3+} , preparadas nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg L^{-1} , foram adicionadas sequencialmente na zona de teste. Por fim, foi feita a aquisição das imagens.

3.6- Determinação de ferro por espectrometria de absorção atômica por chama

A aplicação do método de referência para determinação de ferro nas amostras de etanol combustível foi realizada em um espectrofotômetro de absorção atômica por chama. Foi preparada uma curva analítica de 0,1 a 5 mg L⁻¹ de ferro, obtendo um coeficiente de correlação corresponde à curva igual a R= 0,9973 e um limite de detecção (LD) igual a 0,24 mg L⁻¹. As amostras de etanol combustível foram analisadas em triplicata.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que a utilização da reação $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ para determinação de Fe^{3+} empregando μPADs ainda não foi reportada na literatura, foram estudadas algumas condições para essa reação no papel a fim de se garantir melhores resultados.

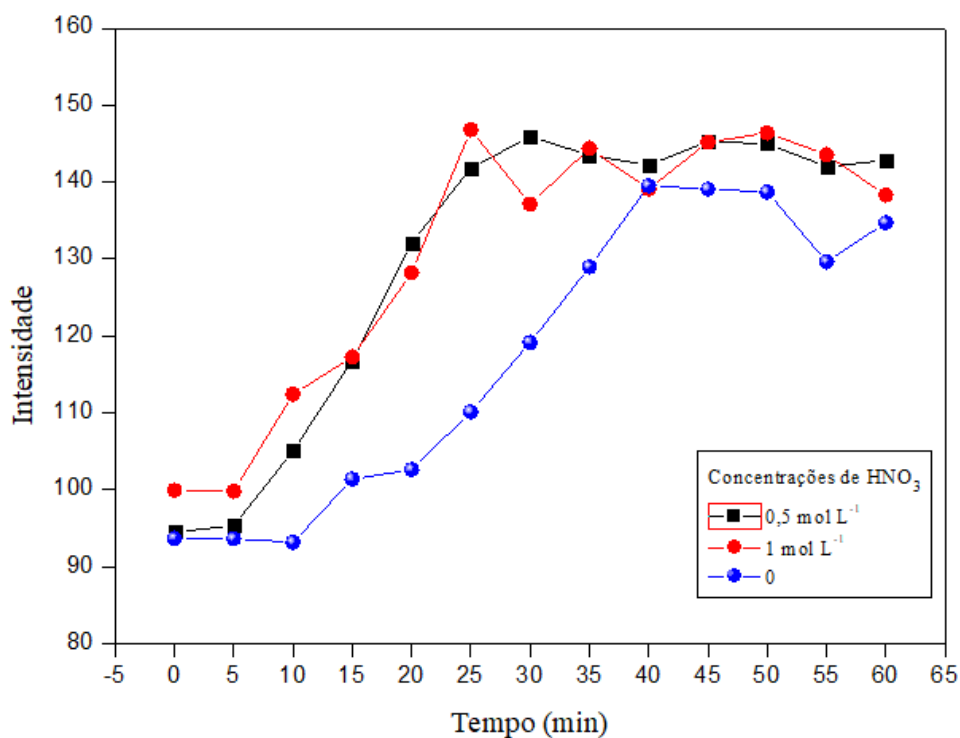
4.1- Reação $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ em μPADs

Inicialmente, foram realizados estudos quanto à reação colorimétrica $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ no papel. Como ensaio preliminar, foram analisadas diferentes concentrações de Fe^{3+} , variando de $0,1$ - $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, na reação com SCN^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Foi escolhida a concentração de Fe^{3+} 6 mmol L^{-1} uma vez que, essa foi a menor concentração a apresentar melhor resposta visual da reação sendo, portanto, utilizada no estudo seguinte. A concentração de SCN^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi fixada para que, em concentrações baixas de Fe^{3+} , houvesse um excesso de íons tiocianato no meio, visto que este aumenta a intensidade da cor do complexo formado.

4.1-1. Estabilidade da cor do complexo $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$

A cor do complexo $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ em solução aquosa é dita na literatura, como instável devido a redução do Fe^{3+} pelos íons SCN^- , podendo apresentar perda significativa de sinal nos primeiros 30 minutos da reação (MARCZENKO; BALCERZAK, 2000). A concentração de ácido no meio reacional desempenha um papel fundamental na formação do complexo, uma vez que o ácido tem a função de minimizar a redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2016). Visando um melhor conhecimento sobre a estabilidade do complexo formado no sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ no papel frente ao tempo de reação e acidez do meio, foram realizadas medidas de intensidade de cor em função do tempo, no intervalo de 1 hora, conforme a Figura 4. Para este estudo, soluções de Fe^{3+} 6 mmol L^{-1} acidificadas com HNO_3 $0,5$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas para reação com SCN^- $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O canal *Red* foi selecionado para detecção colorimétrica da reação, uma vez que produziu maior sensibilidade frente ao intervalo tempo monitorado.

Figura 4. Efeito da concentração de ácido na estabilidade do complexo.



*O instante de adição do SCN^- foi considerado como o tempo zero.

Fonte: A autora.

Os valores obtidos mostram que, no intervalo de tempo estudado, a intensidade da cor apresenta maior estabilidade quando empregada a solução de Fe^{3+} sem adição de ácido para a reação. O desvanecimento da cor (intensidades maiores) foi pronunciado com a adição e o aumento das concentrações de ácido nítrico, pois um excesso de ácido pode afetar tanto a taxa de formação do complexo como sua estabilidade de cor, devido a diminuição dos íons SCN^- no meio.

Foi possível concluir que a variação ocorrida entre as intensidades é pouco significativa. Portanto, para os estudos posteriores, foi fixado o uso da solução de Fe^{3+} sem adição de ácido, uma vez que forneceu melhor sinal analítico e estabilidade aceitável em um tempo de análise de até 10 minutos.

4.2- Sistema de Pré-concentração

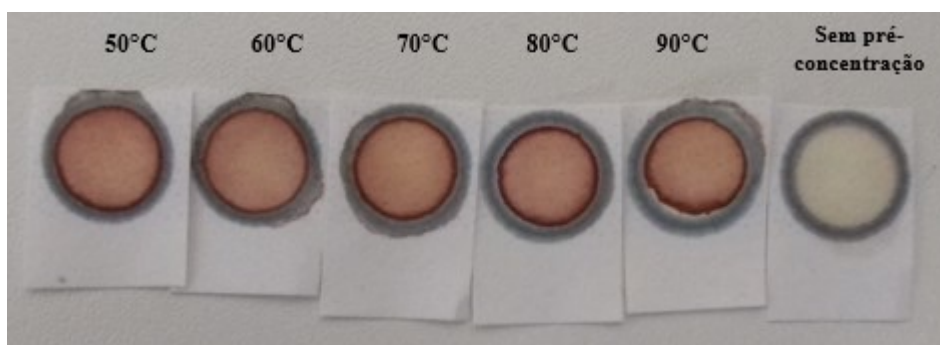
Diante da necessidade da utilização de pré-concentração para alcançar a faixa de concentração necessária para determinação de ferro em amostras de etanol combustível, foram realizados alguns estudos de otimização do sistema de pré-concentração de modo a identificar as melhores condições para a aplicação do procedimento.

4.2.1- Influência da Temperatura de Aquecimento

A ideia de pré-concentração foi baseada na adição de várias alíquotas de Fe^{3+} na zona hidrofílica do μPAD , a fim de se conseguir acumular o analito na superfície do papel. Para isso, era necessário a remoção do solvente da primeira alíquota antes da adição de uma nova alíquota, para evitar o espalhamento gradual das mesmas pelo papel. Visando a pré-concentração do analito, um sistema de aquecimento foi empregado para tornar a etapa de evaporação mais rápida e eficiente.

Foram estudadas as temperaturas de aquecimento de 50, 60, 70, 80 e 90 °C do filme de poliimida, utilizando uma solução de Fe^{3+} 3 mmol L⁻¹ preparada em meio etanólico, de modo a se assimilar as características do etanol combustível. As temperaturas eram mantidas constantes durante cada estudo, sendo controladas pela fonte de alimentação de tensão. Esse estudo foi feito paralelamente utilizando μPADs de 10 e 20 mm de diâmetro. As Figuras 5 e 6, mostra a distribuição da cor do complexo frente as diferentes temperaturas de aquecimento aplicadas na etapa de pré-concentração.

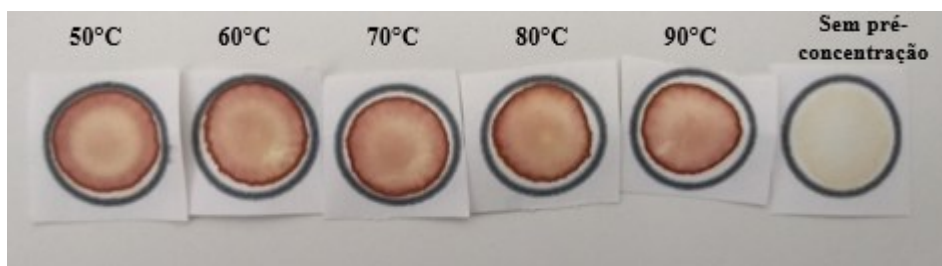
Figura 5. Estudo da temperatura de aquecimento na distribuição da cor do complexo (μPADs de 10 mm).



*Condições sem pré-concentração: 5 μL da solução de Fe^{3+} + 5 μL da solução de SCN^-

Fonte: A autora.

Figura 6. Estudo da temperatura de aquecimento na distribuição da cor do complexo (μPADs de 20 mm).



*Condições sem pré-concentração: 15 μL da solução de Fe^{3+} + 15 μL da solução de SCN^-

Fonte: A autora.

Sob as mesmas condições de temperatura e pela adição total de 75 μL da solução de ferro (10 mm: 15 alíquotas de 5 μL ; 20 mm 5 alíquotas de 15 μL), os μPADs de 10 mm se mostraram melhores na distribuição da cor por toda a zona hidrofílica em todas as temperaturas avaliadas. A menor uniformidade da cor utilizando os μPADs de 20 mm se deve ao fato de ocorrer a evaporação do solvente antes da gota atingir a barreira hidrofóbica por capilaridade. Porém, para a etapa de pré-concentração de amostras com baixos níveis de ferro, ao empregar os μPADs de 10 mm, seria necessário o uso de um grande número de alíquotas para o mesmo resultado, quando comparado ao de 20 mm, aumentando assim o tempo demandado para a pré-concentração. Sendo assim, os μPADs de 20 mm foram escolhidos para a realização da etapa de pré-concentração, uma vez que possui a capacidade de maiores volumes de alíquotas inseridas.

Baixas temperaturas mostraram a formação de uma coloração mais clara na região central dos μPADs (Figura 6). Isso ocorre devido ao arraste do complexo pelas alíquotas adicionadas posteriormente, uma vez que nessas temperaturas, a alíquota se distribui por capilaridade de maneira mais lenta. Essa região é menos pronunciada a partir de 80°C. A temperatura de 90°C foi escolhida como ideal para a etapa de pré-concentração pois, leva a um aumento da frequência de pré-concentração.

Pelas Figuras 5 e 6, foi observado que o ferro se concentrou na região da fronteira tanto da gota quanto do μ PAD, formando um anel. Com a formação do anel, o analito passou a se concentrar em uma área menor que a área ocupada pela alíquota dispensada sobre o papel, ou seja, o fator de pré-concentração do processo nessa região é maior. As medidas de intensidade foram, então, analisadas na região do anel, utilizando o *software ImageJ*, pela seleção de uma área específica do anel.

4.2.2- Uniformidade da cor no anel formado

Um aspecto importante na utilização desta técnica de pré-concentração é avaliar a reprodutibilidade da cor formada ao longo do anel, para evitar erros devido a escolha da área de aquisição de imagem. Para isso, foram realizadas 31 medidas por toda a extensão do anel formado, como mostra a Figura 7, a fim de se determinar a variabilidade dos dados obtidos pelas leituras de intensidade no canal R. O estudo foi feito após a pré-concentração da solução de 168 mg L^{-1} , a partir do cálculo do coeficiente de variação (CV) (SKOOG *et al.*, 2006) dado por

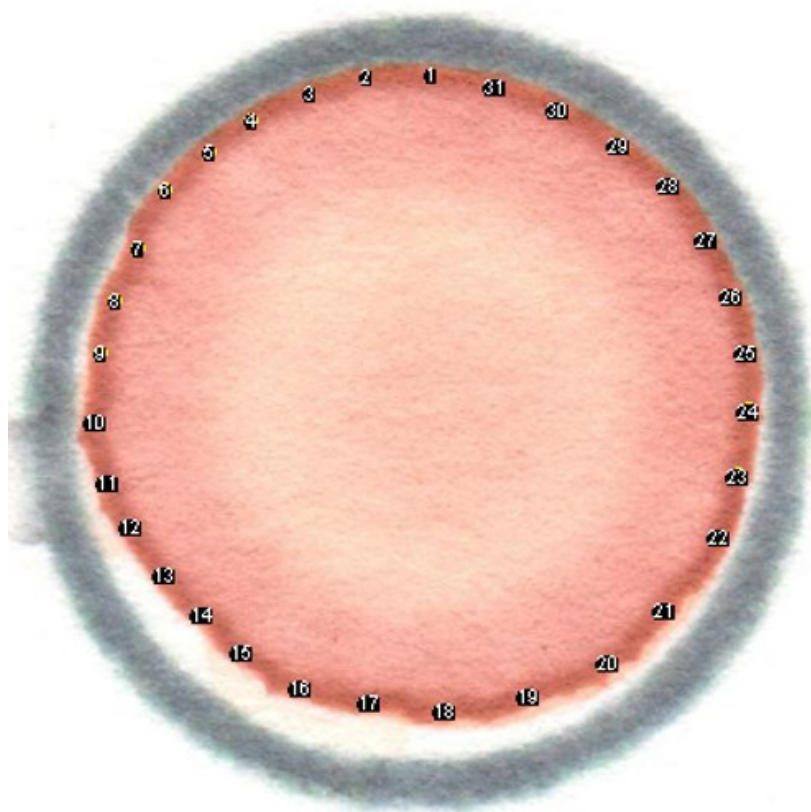
$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3)$$

Onde,

σ = desvio padrão

$\bar{x}$ = média das 31 medidas de intensidade

Figura 7. Estudo da uniformidade da cor no anel formado.



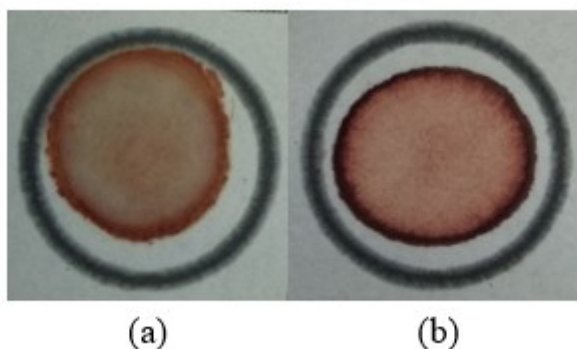
Fonte: A autora.

O coeficiente de variação obtido foi de 1,89%. Este valor é considerado aceitável, o que significa que a leitura de intensidade da cor pode ser determinada em qualquer área do anel.

4.2.3- Sequência de adição dos reagentes na visualização da cor do complexo Fe^{3+}/SCN^{-}

A influência da sequência de adição das alíquotas de Fe^{3+} e SCN^{-} também foi avaliada. Foram adicionadas alíquotas de 25 μL de SCN^{-} sobre o papel, antes e depois da pré-concentração de Fe^{3+} , como mostra a Figura 8.

Figura 8. Efeito da sequência de adição dos reagentes na etapa de pré-concentração.



Adição da alíquota de SCN^- (a) após a pré-concentração e (b) antes da pré-concentração.

Fonte: A autora.

Analisando a Figura 8.a, nota-se que o tempo de espera para a captura da imagem (10 minutos) foi insuficiente para que alíquota de SCN^- secasse, não permitindo um bom registro da reação. Na Figura 8.b, foi um ganho no sinal analítico gerado através da adição do SCN^- antes da etapa de pré-concentração, devido ao aumento visual da cor gerada. Assim, a fim de facilitar a determinação da quantidade de alíquotas necessárias para a visualização da cor do complexo, e conseqüentemente, da formação do anel na etapa de pré-concentração, a aplicação da alíquota de SCN^- foi realizada previamente.

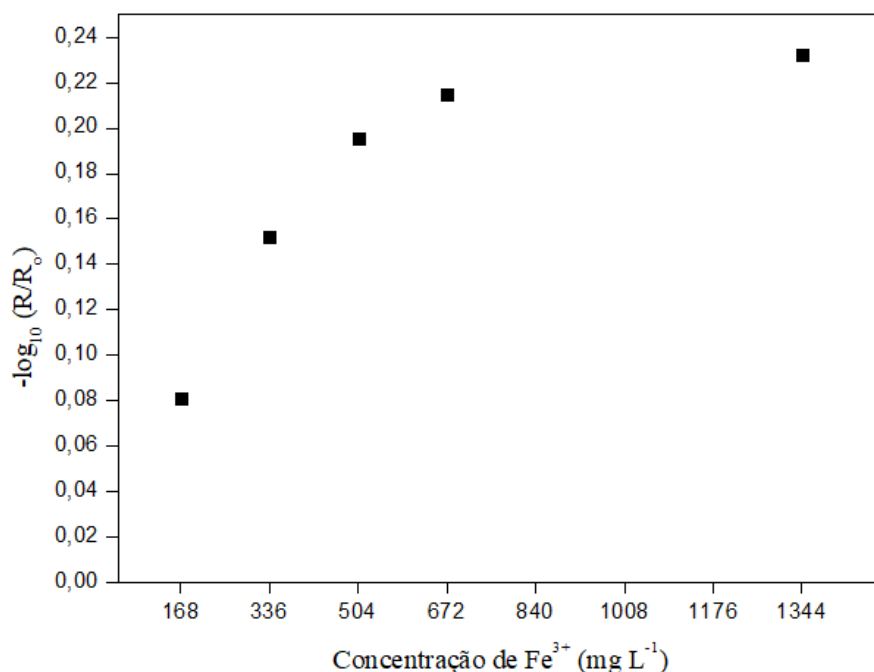
4.3- Característica Analíticas

4.3.1- Faixa Linear

Reunidas as condições experimentais para a reação colorimétrica no papel, procedeu-se ao tratamento quantitativo desta, através da construção das curvas de calibração com e sem pré-concentração.

A curva sem pré-concentração foi obtida a partir de leituras de intensidade de cor do complexo em função de 5 concentrações diferentes de Fe^{3+} . A relação entre as concentrações de Fe^{3+} , variando de 3 a 24 mmol L^{-1} (o equivalente a 168 e 1344 mg L^{-1} , com base na massa molar do ferro) e o logaritmo das intensidades de cor é mostrada na Figura 9.

Figura 9. Curva analítica para o sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ sem pré-concentração.

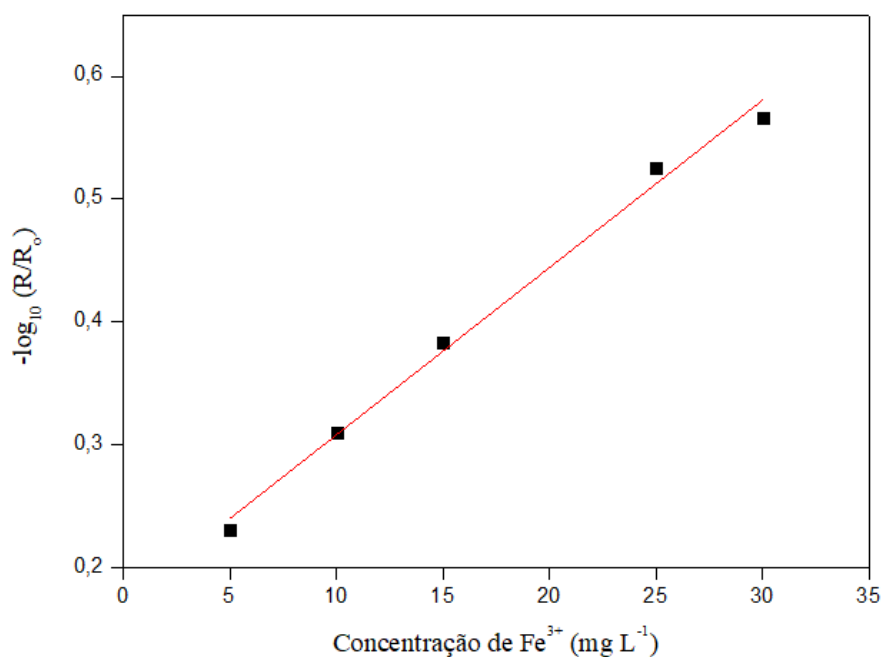


Fonte: A autora.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, para o intervalo avaliado não foi observada correlação satisfatória ($R = 0,8204$). Em concentrações abaixo de 168 mg L^{-1} não foi possível obter uma resposta linear visto que o sinal gerado já se aproximava do valor do branco. Em concentrações elevadas, acima de 670 mg L^{-1} , ocorreu a saturação da cor do complexo formado, ou seja, os valores de intensidade no canal vermelho são praticamente os mesmos, sem mudança significativa.

A curva com pré-concentração foi obtida, também, a partir de leituras de intensidade de cor do complexo em função de 5 concentrações diferentes de Fe^{3+} . A relação entre as concentrações de Fe^{3+} , variando de 5 a 30 mg L^{-1} , e as intensidades de cor é mostrada na Figura 10. Para a pré-concentração da solução de 5 mg L^{-1} , foram necessárias 40 alíquotas de $25 \mu\text{L}$ da solução de Fe^{3+} para uma boa visualização do anel formado. Sendo assim, as mesmas condições foram empregadas para as soluções de concentrações maiores.

Figura 10. Curva analítica para o sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$ com pré-concentração.



Fonte: A autora.

A relação entre o logaritmo da intensidade em função da concentração de Fe^{3+} foi linear no intervalo estudado. Testes utilizando concentrações abaixo de 5 mg L^{-1} de Fe^{3+} não mostraram distinção significativa em relação ao branco.

As equações de calibração e os coeficientes de determinação para o ajuste linear das curvas de calibração são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de calibração obtidos para as calibrações com e sem pré-concentração.

Curva	Faixa Linear	Equação de Calibração	R^2
Sem pré-concentração	168–504 mg L^{-1}	$y = 19,12x + 0,0282$	0,9814
Com pré-concentração	5–30 mg L^{-1}	$y = 0,0136x + 0,1716$	0,9937

Fonte: A autora.

4.3.2- Limite de Detecção (LD) e Fator de Pré-concentração

Os limites de detecção (LD), tanto nas condições sem pré-concentração quanto nas condições com pré-concentração, foram determinados visualmente em relação à concentração mínima de Fe^{3+} que poderia ser significativamente distinguida do branco. Sendo assim, foram estimados limites de detecção iguais a 168 mg L^{-1} (sem pré-concentração) e 5 mg L^{-1} (com pré-concentração). É importante ressaltar que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura calculam o limite de detecção por meio da equação que relaciona o desvio padrão do branco com o coeficiente angular da curva de calibração. Nesse trabalho, foi utilizado o limite de detecção visual, que é a menor concentração do analito que gera um sinal analítico visual. Acreditamos que neste tipo de abordagem, o limite de detecção visual faz mais sentido analiticamente do que o calculado.

O fator de pré-concentração foi então calculado mediante a razão das menores concentrações detectáveis pelas curvas sem e com pré-concentração, obtendo, portanto, um valor de 33,6. Esse ganho de sensibilidade permite obter limites de detecção que garante a aplicação do procedimento na determinação de ferro dentro do valor imposto pela legislação.

4.4- Aplicação em amostras reais

O procedimento proposto foi aplicado para a determinação de Fe^{3+} em três amostras de etanol combustível de postos de gasolina locais. A análise revelou que a concentração de Fe^{3+} nas amostras se apresentaram abaixo do limite de detecção tanto para o procedimento proposto quanto para o método oficial (AAS).

4.5- Perspectivas Futuras

Alguns fatores podem ser considerados futuramente a fim de obter as melhores condições para aplicação do procedimento proposto. Dentre eles estão os testes de adição e recuperação de ferro nas amostras de etanol combustível, teste dos possíveis interferentes na reação $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$, aumento do número de alíquotas de ferro/amostra inseridas e o estudo do teor de água presente no etanol.

Além disso, o procedimento de pré-concentração descrito pode ser avaliado para determinação de outros metais em etanol combustível.

5- CONCLUSÃO

É possível concluir que, o procedimento proposto se mostrou eficiente na pré-concentração de Fe^{3+} em papel. As condições estabelecidas para aplicação do mesmo foram: adição de 1 alíquota de 25 μL de SCN^- seguida por 40 alíquotas de 25 μL de Fe^{3+} /amostra (volume total = 1 mL), utilização de μPADs de 20 mm de diâmetro, temperatura do sistema de aquecimento $T = 90^\circ\text{C}$ (o que conferiu uma maior frequência de pré-concentração) e o tempo 10 minutos para captura de imagens sem perda significativa do sinal.

A concentração de SCN^- empregada foi fixada em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a fim de aumentar a intensidade da cor do complexo gerado. A curva analítica mostrou linearidade entre 5 e 30 mg L^{-1} e limite de detecção visual igual a 5 mg L^{-1} . As leituras dos sinais de intensidades e mostraram bastante uniformes em toda a extensão do anel formado através da pré-concentração, uma vez que o coeficiente de variação foi igual a 1,89%.

Quanto ao desempenho do sistema de pré-concentração, o fator de pré-concentração foi de 33,6, o qual demonstra o grande potencial do procedimento na determinação de ferro em amostras de etanol combustível dentro do valor imposto pela legislação. Esse método pode ser considerado também uma ótima alternativa como método de *screening* para avaliar se uma amostra de etanol está em conformidade com os valores permitidos pela legislação.

A realização das análises em μPADs se mostrou uma metodologia simples, empregando baixos consumos de amostra e reagentes, resultando na redução dos resíduos gerados, baixo custo de execução, além da portabilidade, possibilitando análises em campo.

REFERÊNCIAS

- ABE, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 18, p. 6928–6934, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, A. **Especificações do etano anidro combustível (EAC) e do etanol hidratado combustível (EHC)**. Disponível em: <<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2015/abril&item=ranp-19-2015>>. Acesso em: 9 jun. 2019.
- ALFASSI, Z. B.; WAI, C. M. **Preconcentration techniques for trace elements**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992.
- ASANO, H.; SHIRAISHI, Y. Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography. **Analytica Chimica Acta**, v. 883, p. 55–60, 2015.
- BACCAN, N. *et al.* **Introdução à Semimicroanálise Qualitativa**. 2^a ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1988.
- CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–7095, 2009.
- CATE, D. M. *et al.* Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 19–41, 2015.
- CHIEPPE JÚNIOR, J. B. **Tecnologia e Fabricação do Álcool**. Inhumas, GO: Universidade Federal de Santa Maria, , 2012..
- COLTRO, W. K. T. *et al.* Microsistemas de análises químicas: Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986–2000, 2007.
- CORTEZ, J.; PASQUINI, C. **Pré-concentração Baseada na Técnica de Ring Oven para Microanálise: Determinação Simultânea de Sódio, Ferro e Cobre em Etanol Hidratado Combustível por Espectroscopia de Emissão Óptica em Plasma Induzido por Laser (LIBS)**. 2012, 117 p. Programa de Pós-Graduação em Química. (Tese de Doutorado) – UNICAMP, Campinas-SP, 2012.

DA SILVA, J. R. **Desenvolvimento de sensores químicos de baixo custo visando o monitoramento da qualidade e da potabilidade de águas**. 2018, 137 p. Programa de Pós Graduação em Química. (Tese de Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. **Analyst**, v. 136, n. 1, p. 77–82, 2011.

GARCIA, P. T. *et al.* Paper-based microfluidic devices on the crime scene: A simple tool for rapid estimation of post-mortem interval using vitreous humour. **Analytica Chimica Acta**, v. 974, p. 69–74, 2017.

HAZLETT, R. N. **Thermal Oxidation Stability of Aviation Turbine Fuels**. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=e-h5UZefdZcC&pg=PA72&hl=pt-BR&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 20 jun. 2019.

KOVARIK, M. L. *et al.* Micro Total Analysis Systems for Cell Biology and Biochemical Assays. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 516–540, 2012.

LAND, K. J. **Paper-based Diagnostics: Current Status and Future Applications**. Pretoria, South Africa: Springer International, 2018.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. **O Etanol Combustível no Brasil**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/etanol3_000g7gq2cz702wx5ok0wtedt3xdrmfk.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2019.

LIMA, U. DE A. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos - Volume III**. 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, n. 1–6, p. 244–248, 1990.

MARCZENKO, Z.; BALCERZAK, M. **Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis**. 1ª ed. New York: Elsevier Science, 2000.

MARTINEZ, A. W. *et al.* Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. Diagnostics for the Developing World Microfluidic. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010.

MICHELLON, E.; SANTOS, A.; JULIANO, R. Breve Descrição do Proálcool e Perspectivas Futuras para o Etanol Produzido no Brasil. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, p. 1–16, 2008.

NIE, J. *et al.* One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices. **Analyst**, v. 138, n. 2, p. 671–676, 2013.

OLKKONEN, J.; LEHTINEN, K.; ERHO, T. Flexographically printed fluidic structures in paper. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 24, p. 10246–10250, 2010.

PASSARETTI FILHO, J.; DA SILVEIRA PETRUCI, J. F.; CARDOSO, A. A. Development of a simple method for determination of NO₂ in air using digital scanner images. **Talanta**, v. 140, n. 2, p. 73–80, 2015.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Paper-based analytical device for instrumental-free detection of thiocyanate in saliva as a biomarker of tobacco smoke exposure. **Talanta**, v. 147, p. 390–396, 2016.

PEREIRA, F. C.; LIMA, F. J. S.; DA SILVA, A. O. Uma breve revisão sobre alguns aspectos do álcool combustível veicular e a análise quantitativa de espécies químicas presentes nesta matriz energética. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1702–1720, 2016.

PEREIRA, R. C. C.; PASA, V. M. D. Effect of Alcohol and Copper Content on the Stability of Automotive Gasoline. **Energy and Fuels**, v. 19, p. 426–432, 2005.

SANTOS, A. L. *et al.* Electrochemical Determination of Inorganic Contaminants in Automotive Fuels. **Electroanalysis**, v. 24, n. 8, p. 1681–1691, 2012.

SKOOG *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8^a ed. São Paulo: Thomson, 2006.

TAKEUCHI, R. M. *et al.* Copper determination in ethanol fuel by differential pulse anodic stripping voltammetry at a solid paraffin-based carbon paste electrode modified with 2-aminothiazole organofunctionalized silica. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 771–777, 2007.

WAYNICK, J. A. The development and use of metal deactivators in the petroleum industry: A review. **Energy and Fuels**, v. 15, n. 6, p. 1325–1340, 2001.