

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Curso de Ciências dos Alimentos

**Desenvolvimento de procedimento analítico limpo para
determinação de formaldeído em amostras de leite bovino**

NAIARA SILVA COSTA

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
parte dos requisitos para obtenção do título de:
Bacharela em Ciências dos Alimentos

Piracicaba
2020

Naiara Silva Costa

**Desenvolvimento de procedimento analítico limpo para determinação de
formaldeído em amostras de leite bovino**

Orientadora:
Profa. Dra. **WANESSA MELCHERT MATTOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Bacharela em Ciências dos Alimentos

**Piracicaba
2020**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça de ter me conduzido até aqui.

Agradeço meus pais, irmãos e irmãs, sobrinhos e sobrinhas e toda minha família pelo amor, companheirismo de sempre, por estarem do meu lado e por serem a base da minha existência.

A meu namorado, Luan, por todo o apoio, amor, compreensão e respeito desde o início dessa jornada. Você é parte essencial dessa conquista!

Aos meus amigos de longa data, pelo compartilhamento da vida e suas vicissitudes. Vocês são minha segunda família.

Aos amigos e colegas que fiz em Piracicaba durante esses anos. Muito obrigada pelas horas de conversa, estudos, risadas e parcerias.

À Prof.^a Wanessa pela orientação, paciência e amizade ao longo desse período. Foi de extrema importância contar com uma pessoa tão humana e disposta a ensinar, a nos manter sempre no caminho do conhecimento.

Aos colegas de laboratório, sobretudo Rita de Cássia e Marcos Brasil pela ajuda com as rotinas laboratoriais.

Aos colegas do “Grupo de Estudos em Química Analítica Verde” (GEQAV) pelos conselhos, aprendizados e amizade.

À Universidade de São Paulo e Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela estrutura e formação.

À Casa do Estudante Universitário Prof. “José Benedito de Camargo”, por ter sido meu lar durante esse período e parte essencial da minha formação superior.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

“A felicidade só é real quando compartilhada”.

“Siga confiante na direção dos seus sonhos. Viva a vida que imaginar”.

- *Henry Thoreau*

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	8
2 OBJETIVO	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 Cadeia produtiva do leite e fraude.....	10
3.2 Formaldeído	13
3.3 Química verde	14
3.4 Análise em fluxo	15
3.4.1 Configurações e elementos dos sistemas FIA.....	17
3.4.2 Mecanização do sistema FIA	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Soluções e reagentes.....	20
4.2 Quantificação do formaldeído.....	20
4.3 Sistema de análises em fluxo.....	21
4.3.1 Programação da ferramenta Arduino	21
4.3.2 Limpeza da amostra em fluxo	22
4.3.3 Sistema de análises em fluxo proposto inicialmente.....	22
4.3.3 Sistema de multicomutação empregado nas análises de formaldeído.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Otimizações do sistema proposto	26
5.1.1 Estudo da concentração do reagente de Nash e influência do pH ...	26
5.2 Limpeza da matriz	30
5.3 Características analíticas	31
5.4 Avaliação de interferentes da reação de Hantzsch	33
5.5 Análise de amostras de leite bovino	33
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

Desenvolvimento de procedimento analítico limpo para determinação de formaldeído em amostras de leite bovino

O leite é um produto comumente fraudado, seja pelo desnate ou pela adição de substâncias proibidas pela Legislação, como: neutralizantes de acidez, água, conservantes, reconstituintes de densidade ou qualquer outro elemento estranho a sua natureza. A fraude coloca em evidência a importância do controle de qualidade de toda cadeia leiteira, visto que o consumidor pode estar sujeito a um alimento inseguro. Dentre os adulterantes empregados no leite, o formaldeído é utilizado como conservante para mascarar uma deterioração microbiológica. O formol é tóxico se ingerido ou inalado, causando sintomas desde fortes dores de cabeça e náuseas até coma e morte por falência respiratória. Atualmente, os métodos de detecção do formaldeído são morosos e empregam reagentes de alta toxicidade, expondo o analista e o ambiente a riscos na manipulação e descartes de resíduos, respectivamente, critérios que não satisfazem os preceitos da química verde. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de procedimento analítico limpo e sensível que visou o preparo de amostras *on-line* para quantificação de formaldeído em amostras de leite bovino. Para tanto, foi empregado sistema de multicomutação monossegmentado constituído por válvulas e microbomba solenoide com *clean-up* online da amostra e medida espectrofotométrica em 412 nm. Após otimização do sistema, resposta linear foi obtida até 20 mg L⁻¹, descrita pela equação: $A = 0,1028 + 0,0034 C$ mg L⁻¹ formaldeído, $r = 0,9788$. Limite de detecção, coeficiente de variação e frequência analítica foram estimados em 0,45 mg L⁻¹; 2,8% e 48 determinações h⁻¹, respectivamente. Em cada determinação foram consumidos 0,014 mL de acetilacetona e 0,037 mg de acetato de amônio e gerados 3 mL de resíduo. As principais espécies concomitantes presentes na amostra de leite não interferiram na determinação de formaldeído em concentrações maiores que as usualmente encontradas. Estudos de adição e recuperação de formaldeído foram realizados, obtendo-se valores entre 80 - 119% para leites integrais e desnatados UHT. A metodologia proposta apresentou vantagens na redução de volumes de reagentes, bem como redução da quantidade de resíduos gerados, menor tempo de análise e maior frequência analítica. A versatilidade dos sistemas de análise em fluxo permite ampla aplicação em rotinas laboratoriais e constitui ferramenta importante na detecção de fraudes em leite e, conseqüentemente, na segurança do produto ofertado aos consumidores.

Palavras-chave: Análise por injeção em fluxo; Química verde; Fraude em alimentos; Análise de Alimentos

ABSTRACT

Development of green analytical procedure for determination of formaldehyde in milk

Milk is a product that is commonly defrauded, either by skimming or by the addition of substances prohibited by legislation, such as: acidity neutralizers, water, preservatives, density restoratives or any other element foreign to its nature. The fraud highlights the importance of quality control of the entire dairy chain, since the consumer may be subject to an unsafe food. Among the adulterants used in milk, formaldehyde is used as a preservative to mask microbiological deterioration. Formaldehyde is toxic if ingested or inhaled, causing symptoms ranging from severe headaches and nausea to coma and death from respiratory failure. Currently, formaldehyde detection methods are time consuming and employ highly toxic reagents, exposing the analyst and the environment to risks in the handling and disposal of waste, respectively, criteria that do not satisfy the precepts of green chemistry. The present work aimed to develop a clean and sensitive analytical procedure aimed at preparing samples online for quantification of formaldehyde in bovine milk samples. For this purpose, a monosegmented multicomutation system consisting of valves and a solenoid micro pump with online sample clean-up and spectrophotometric measurement at 412 nm was employed. After system optimization, a linear response was obtained up to 20 mg L⁻¹, described by the equation: $A = 0.1028 + 0.0034 C$ mg L⁻¹ formaldehyde, $r = 0.9788$. Detection limit, coefficient of variation and analytical frequency were estimated at 0.45 mg L⁻¹; 2.8% and 48 h⁻¹ determinations, respectively. In each determination, 0.014 ml of acetylacetone and 0.037 mg of ammonium acetate were consumed and 3 ml of residue were generated. The main concomitant species present in the milk sample did not interfere in the determination of formaldehyde in concentrations higher than those usually found. Formaldehyde addition and recovery studies were carried out, obtaining values between 80 - 119% for whole and skimmed UHT milk. The proposed methodology showed advantages in reducing the volume of reagents, as well as reducing the amount of waste generated, less analysis time and higher analytical frequency. The versatility of flow analysis systems allows wide application in laboratory routines and constitutes an important tool in the detection of milk fraud and, consequently, in the safety of the product offered to consumers.

Keywords: Flow injection analysis; Green chemistry; Food fraud; Food Analysis

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Leite pode ser definido, segundo a Legislação brasileira, como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017). É um alimento complexo, representando um equilíbrio entre a solução aquosa, emulsão fina de glóbulos de gordura e suspensão coloidal de proteínas. Apresenta-se como um líquido de cor branca, ligeiramente amarelado, de odor suave e gosto adocicado (CIÊNCIA..., 2008).

Em termos de composição centesimal, a água é o principal constituinte do leite, representando 87,5% de sua constituição, enquanto o restante (12,5%), também conhecido como matéria seca, compreende as proteínas, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas. O leite é um alimento amplamente consumido em todo o mundo, tanto na forma *in natura* quanto na forma de seus derivados, e.g., queijos, iogurtes e manteiga (ROCHA, 2015).

Segundo Santos (2014), a qualidade do leite depende de um conjunto de medidas que abrangem desde o treinamento e capacitação da mão-de-obra nas propriedades rurais, boas práticas agropecuárias, boa assistência técnica, além de um sistema de pagamento diferenciado que incentiva uma perspectiva de avanço na qualidade do produto.

O controle de qualidade do leite é realizado por meio de análises físico-químicas (e.g. densidade, acidez, índice crioscópico), microbiológicas (e.g. contagem bacteriana total, contagem de células somáticas) e de fraudes e adulterações (e.g. de antibióticos, conservantes e cloretos).

O leite é um produto comumente fraudado, seja pelo desnate ou pela adição de substâncias proibidas pela legislação como neutralizantes de acidez, água, conservantes, reconstituintes de densidade ou qualquer outro elemento estranho a sua natureza (BRASIL, 2011). O objetivo da fraude quase sempre é obter maior rendimento do produto (adição de água, soro de queijo, urina). Além disso, visam também alterar as características e os componentes, com o intuito de receber bonificações em sistemas que realizam o pagamento do leite por qualidade (VIOTTO; CUNHA, 2006 *apud* MAREZE et al., 2015), criando assim, competição desleal e impacto negativo na economia.

Dentre os adulterantes empregados no leite, o formaldeído (CH₂O) é utilizado como conservante para mascarar uma deterioração microbiológica e práticas

higiênico-sanitárias inadequadas, em função de sua ação conservante. O formaldeído é um gás produzido a partir do metanol que, na forma líquida (misturado à água e álcool) é denominado de formalina ou formol e tem função estabilizante. É empregado na preservação de tecidos para análises histopatológicas, na agricultura como conservante para forragem, entre outras aplicações (INCA, 2018).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer - INCA (2018), o formaldeído é solúvel em água, sendo rapidamente absorvido no trato respiratório e gastrointestinal e, posteriormente, metabolizado. Embora o formol e os metabólitos sejam capazes de penetrar na pele humana, a absorção dérmica é mais leve, porém podem induzir a dermatites de contato. O formol é tóxico se ingerido ou inalado, causando sintomas como fortes dores de cabeça, edema pulmonar, dores abdominais, náuseas, vômito, colapsos circulatórios, danos degenerativos no fígado, coração e cérebro, perda de consciência, coma e morte por falência respiratória (INCA, 2018). Além disso, o formaldeído é reconhecido como agente cancerígeno em humanos, segundo a IARC – *International Agency for Research on Cancer*, da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2006).

O método usual de determinação de formaldeído é caracterizado por uma etapa de destilação prévia da amostra de leite, seguida de aquecido com ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico, gerando produto de condensação que após oxidado, transforma-se num composto de coloração violeta (BRASIL, 2006). O uso desses reagentes no procedimento analítico, bem como as etapas envolvidas no procedimento experimental, expõe o analista e o ambiente à riscos na manipulação e descartes de resíduos, respectivamente, critérios que não satisfazem os preceitos da química verde.

A Química Verde é uma abordagem para síntese, processamento e uso de produtos e processos químicos que reduzem riscos para os seres humanos e ao meio ambiente (ANASTAS, 1999). Foi proposto pela primeira vez em 1993, através do programa *Alternative Synthetic Pathways for Pollution Prevention* da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA), tendo como proposta inicial, o aprimoramento de produtos e processos químicos já existentes e a criação de alternativas “limpas” para prevenção da poluição do meio ambiente, bem como a garantia do desenvolvimento sustentável dos processos químicos (TUNDO, 2000).

Desse modo, uma alternativa aos métodos convencionais da química analítica é o emprego da análise por injeção em fluxo, que tem como conceito norteador, um

sistema de análises em fluxo que otimiza o tempo de análise e obtenção de resultados, bem como o uso de menores volumes de solventes e reagentes e, conseqüentemente geração de menos resíduos.

A análise por injeção em fluxo contínuo (FIA – Flow Injection Analysis) foi proposta por Ruzicka e Hansen em 1975 e consiste em um processo de mecanização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em um fluido carregador, sendo transportada em direção ao detector (REIS; GINÉ; KRONKA, 1989). Nesse transporte, reações químicas e etapas de separação, concentração ou eluição podem ocorrer, de modo a promover a detecção do analito de interesse. Os detectores acoplados podem ser espectrofotômetros UV – Vis ou de absorção atômica, potenciômetros, condutivímetros, entre outros.

Em virtude dos problemáticos efeitos do formaldeído na saúde humana, é necessário o monitoramento em amostras de leite bovino. Além disso, o desenvolvimento de procedimentos limpos, simples, com novas estratégias para o preparo de amostras, confiáveis, altamente sensíveis e seletivos, enriquecem as alternativas para a química analítica.

2 OBJETIVO

O presente projeto teve como objetivo o desenvolvimento de procedimento analítico limpo e sensível que visou o preparo de amostras on-line para quantificação de formaldeído em amostras de leite bovino. Para tanto, foi explorado o emprego de sistema monossegmentado com multicomutação e detecção espectrofotométrica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cadeia produtiva do leite e fraude

Segundo a legislação vigente, o leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017). É um alimento complexo, sendo que parte de seus componentes é produzida pelas células secretoras da glândula mamária dos mamíferos e outra porção advém da corrente sanguínea dos mesmos (GUERREIRO et al., 2018).

Apresenta-se como um líquido branco opaco, composto principalmente por água, proteínas, lactose, ácidos graxos saturados e insaturados, além de vitaminas

do complexo A e B e uma quantidade significativa de minerais como o cálcio, fosfato e citrato (GUERREIRO et al., 2018).

Nas últimas décadas, as proteínas do leite têm recebido atenção crescente por conta de sua propriedade funcional, mas especificamente, os peptídeos fisiologicamente ativos. Segundo Korhonen (2009) , os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas que têm um impacto positivo nas funções ou condições do corpo e podem, em última instância, influenciar a saúde, reduzindo o risco de doenças crônicas através de benefícios como atividade antioxidante e anti-hipertensiva, por exemplo. Atualmente, as proteínas do leite são consideradas a fonte mais importante de peptídeos bioativos, o que corrobora a importância nutricional desse alimento.

A produção de leite é um dos principais setores do agronegócio brasileiro; o Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo, com mais de 33 bilhões de litros de leite produzidos em 2018, correspondendo a 6% do volume global de produção (BÁNKUTI; CALDAS, 2018; MILKPOINT, 2019). Em termos de exportação, o Brasil também conta com volume relevante para o setor: mais de 11 milhões de litros em maio de 2020, segundo dados da MilkPoint (2020).

A cadeia produtiva do leite está inserida num contexto de intensas mudanças na agropecuária brasileira, desde os anos 1990, quando da estabilização da economia e o consequente aumento do poder de compra da população que incentivaram a demanda por produtos e serviços, especialmente por produtos de demanda reprimida. Além disso, as diretrizes de regulamentação do setor lácteo foram sendo desenhadas ao longo das últimas décadas de modo a capacitar produtores, promover uma cadeia produtiva sólida e atender a demanda nacional (BÁNKUTI; CALDAS, 2018).

A legislação vigente está fragmentada em três Instruções Normativas (INs), as IN 76, IN 77 e a IN 78, todas publicadas em 2018. Essa separação teve como objetivo promover melhor entendimento das orientações e facilitar a interpretação pelos produtores e profissionais da área. Em resumo, a IN 77/2018 trata da produção de leite até a recepção no laticínio e a IN 76/2018 da entrada no laticínio até a expedição. A IN 78/2018 abrange requisitos e procedimentos que visam o controle leiteiro e avaliação genética de animais com aptidão leiteira (FAGNANI, 2019; BRASIL, 2018).

Apesar de todo o controle e fiscalização por órgãos federais, além de recursos como o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade de Leite (PNQL), criado em 1998 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que objetiva

justamente promover a pecuária leiteira, há ações fraudulentas na cadeia produtiva do leite. As fraudes e adulterações, ocorrem com o intuito de obtenção de lucro ou na intenção de mascarar produto de procedência duvidosa. Segundo Castro (2019):

[...] tipicamente, o leite é adulterado para ganho financeiro ou devido às más condições de higiene de processamento, armazenamento, transporte e comercialização. Pode-se dividir as fraudes no leite em quatro grandes grupos: alteração intencional na composição do leite, falhas na pasteurização, mistura de leites de espécies diferentes e fraudes de rotulagem.

As práticas incluem por exemplo, adição de água para aumentar o volume do leite; adição de alcalinos para aumentar a conservação ou diminuir a acidez; adição de conservantes como formaldeído, ácido bórico, peróxido de hidrogênio para inibir o crescimento microbiano; adição de reconstituintes como a melanina para modificar o valor proteico e ainda adição de reconstituintes de densidade como sacarose e urina (CASTRO, 2019). Todas essas práticas são proibidas pela Legislação e promovem riscos à cadeia produtiva e expõem o consumidor à um alimento inseguro.

Relatos de fraudes e adulterações do leite datam desde do século XIX no Brasil escravocrata, quando se fazia adição de água ao produto, a fim de se obter lucros sobre a comercialização. Meireles (2015) afirma que durante esse período, certos negociantes mandavam os frascos de leite fechados com cadeado e que, através de uma segunda chave, seus fregueses os abriam no momento propício para o consumo. O autor sustenta ainda que “[...] seria necessário mais de um século para que o consumidor brasileiro viesse a ter acesso ao leite tratado termicamente, sem fraude e em embalagem inviolável individual”.

Mesmo em dias atuais, casos de fraudes permeiam a cadeia produtiva do leite. Foi o caso da Operação Leite Compensado que investigou um esquema de adulteração do leite no Rio Grande do Sul em 2013 (EMPRESA..., 2013). Nesse esquema, água era adicionada ao leite a fim de aumentar o volume e, para recompor a porcentagem protéica advinda da diluição dos componentes, ureia agrícola, que contém formaldeído não intencional, era acrescida ao produto. O leite cru era adulterado pela empresa transportadora, antes de chegar a indústria de beneficiamento, o que evidencia a necessidade de aprimoramento e rastreabilidade de todos os pontos da cadeia produtiva a fim de garantir a segurança do alimento.

As metodologias de determinação de adulterantes (ou mesmo dos componentes) do leite podem ser morosas, com utilização de reagentes e solventes

tóxicos, gerando resíduos também tóxicos, o que coloca em evidência a necessidade de viabilizar ferramentas e metodologias alternativas para auxiliar o controle de qualidade do leite, produto fundamental para a agropecuária brasileira, de uma forma mais ambientalmente amigável.

3.2 Formaldeído

O formaldeído (CH_2O) – sinônimos: formol, metanal, formalina, aldeído fórmico, formalida 40, oximetileno, formalite - é um gás a temperatura ambiente com forte odor característico e altamente inflamável (CETESB, 2012). Está presente no ambiente originado de incêndios e outras fontes naturais de combustão e antropogênicas como usinas de energia, fábricas e emissão veicular. Também é formado naturalmente na troposfera durante a oxidação de hidrocarbonetos, os quais reagem com radicais hidroxila e ozônio formando, além do formaldeído, outros aldeídos (CETESB, 2012).

É muito utilizado em resinas sintéticas, fenólicas, uréicas e melamínicas nas indústrias de madeira, papel e celulose; em abrasivos, plásticos, esmaltes sintéticos, tintas e vernizes, indústria têxtil e de fundição, entre outras aplicações. Devido ao seu excelente poder desinfetante, atuando sobre bactérias, fungos e vírus, é empregado também na sanitização de superfícies na cadeia avícola, por exemplo, onde é utilizado a solução aquosa de formaldeído a 37% (m/v) (RUI et al. 2011).

Por ser solúvel em água, o formaldeído é rapidamente absorvido no trato respiratório e gastrointestinal e metabolizado. É um produto tóxico se ingerido, inalado ou tiver contato com a pele (embora a absorção dérmica seja mais leve). Os sintomas frequentes incluem desde dor de cabeça, falta de ar, vertigem, dificuldade para respirar até perda de consciência e morte por falência respiratória, além disso a IARC classificou o formaldeído como carcinogênico, tumorigênico e teratogênico por produzir efeitos na reprodução humana. Especificamente em relação ao câncer, não há níveis seguros de exposição (IARC, 2006).

O método oficial de determinação de formol, especificado no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, do MAPA (2018) baseia-se no “aquecimento do formaldeído com ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico, originando um produto de condensação, que oxidado, posteriormente, transforma-se em composto p-quinoidal de coloração violeta”. Nesse caso, como a

análise é qualitativa, se houver a formação do composto de coloração violeta, o resultado é positivo para formaldeído.

3.3 Química verde

A Química verde é uma abordagem para a síntese, processamento e uso de produtos químicos que reduzem riscos para os seres humanos e ao meio ambiente (ANASTAS, 1999). Surgiu na década de 1990 como um conceito que define que os conhecimentos e habilidades da área química podem ser usados para evitar ameaças a saúde humana e ao meio ambiente em todos os tipos de processos químicos.

Nesse contexto, uma das áreas mais proeminentes ao desempenho massivo da Química Verde é o desenvolvimento de metodologia analítica, em que novos métodos, técnicas e abordagens que reduzam ou eliminam o uso e a geração de substâncias perigosas em todas as etapas da análise química.

O objetivo da Química Verde é explorar cada vez mais rotinas analíticas mais limpas possíveis, eficazes e eficientes, com redução de volume de reagentes empregados, evitar processos morosos, aumentar a frequência analítica, abordar questões de impactos ambientais e à saúde, permitir avanços tecnológicos de modo a critérios econômicos. É tornar as metodologias analíticas existentes mais dinâmicas e aplicáveis e, quando possível, com baixo custo.

Anastas (1999) afirma que é exatamente porque muitas dessas novas abordagens são economicamente benéficas que se tornam catalisadas pelo mercado, de modo a aliviar a indústria e sociedade de custos, historicamente dispendiosos. É fundamental esclarecer que a Química Verde surge no contexto de minimizar os efeitos e impactos gerados pela análise química, considerando que não existe metodologia com resíduo zero ou especificamente “benigna” ao meio ambiente. O contexto é diminuir consideravelmente a quantidade de resíduos e optar por reagentes e substâncias que não sejam extremamente tóxicos para o ser humano e que sejam ambientalmente amigáveis.

A química analítica verde surge nesse cenário como uma das áreas da Química Verde mais proeminentes de atuação, permitindo o avanço de atividades de proteção ambiental com o desenvolvimento de metodologias que sejam ambientalmente amigáveis, desde os anos 1960. (ANASTAS, 1999).

A Química Verde está estruturada em 12 princípios básicos que são: prevenção, economia de átomos, síntese de produtos menos perigosos, desenho de produtos seguros, solventes e auxiliares mais seguros, busca pela eficiência de energia, uso de fontes renováveis de matéria-prima, evitar formação de derivados, catálise, desenho para a degradação, análise em tempo real para prevenção da poluição e por fim, química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes. A proposta é que os tópicos sejam facilitadores do entendimento da Química Verde de modo a viabilizar sua implementação prática (LENARDAO et al., 2003).

Na literatura, estudos definem e discutem sobre a relevância da Química Verde na abordagem analítica, como o de Melchert, Reis e Rocha (2012) que traça um paralelo sobre a evolução da FIA e a Química Analítica Verde na substituição de solventes tóxicos, bem como a minimização de resíduos gerados.

3.4 Análise em fluxo

A análise por injeção em fluxo, proposta na metade dos anos 70, com grande contribuição brasileira (REIS; GINÉ; KRONKA, 1989), representou avanço significativo no campo da automatização em química analítica, sendo utilizada em diversas áreas do conhecimento (agronômica, clínica, industrial). Estes sistemas foram propostos com o objetivo de mecanizar procedimentos de análises químicas, reduzindo o envolvimento do operador, melhorando a precisão das medidas e aumentando o número de amostras que podem ser processadas por unidade de tempo (LEITE; FATIBELLO-FILHO; ROCHA, 2004).

Trata-se de uma abordagem baseada na inserção de alíquota da amostra, a qual sofre dispersão ao ser conduzida através do percurso analítico por solução transportadora, que pode ser o próprio reagente, até o detector (MIRANDA, 2002). Durante o transporte, pode receber reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, concentração etc.

Segundo Leite; Fatibello-Filho; Rocha (2004), nos sistemas FIA, as reações químicas geralmente não se completam, em virtude dos restritos tempos de residência (geralmente < 30 s). Entretanto, por conta da temporização altamente reprodutível, os resultados são, em geral, bastante precisos. A amostra é dispersa em virtude do contato com a solução transportadora, o que promove gradientes de concentração. A dispersão depende das características físico-químicas das soluções (viscosidade) e

de fatores hidrodinâmicos (vazões, volume de amostra, comprimento e diâmetro dos tubos que constituem o percurso analítico). Como a medida é realizada com a amostra em movimento em relação ao detector, sinal transiente é característico, cuja altura pode ser relacionada à concentração da espécie medida. Dessa forma, tanto padrões de reagentes analíticos quanto amostras comportam da mesma maneira no percurso analítico, o que possibilita a medida do sinal analítico, mesmo sem a reação ter se completado.

As principais vantagens do sistema FIA incluem a mecanização de quase todo procedimento analítico, permitindo mínima intervenção do analista e menores chances de erros associados, aumento da repetitividade das medidas, minimização do consumo de amostra, reagentes e padrões e, conseqüentemente, diminuição da quantidade de resíduos químicos gerados, aumento da frequência analítica, facilita a implementação e versatilidade de um método analítico e possibilita o controle do processo (industrial, biológico, etc.) *in situ* (BEZERRA et al., 2020; MOREIRA et al., 2014).

Reis, Giné e Kronka (1989) afirmam que o processo de análise química por injeção em fluxo contínuo é dividido em quatro partes, basicamente: a propulsão de fluidos - que pode ser a pressão ou à vazão constante; injeção da amostra; reação e detecção. O injetor é considerado o dispositivo mais fundamental do sistema FIA, pois é responsável pela introdução da amostra e reagentes no percurso analítico. Os injetores mais comuns são os de válvula rotatória e o injetor proporcional desenvolvido pela Universidade de São Paulo (REIS; GINÉ; KRONKA, 1989). Este último é versátil e fácil de ser construído e adaptado às necessidades de que se deseja explorar.

Quanto a propulsão dos fluidos, estes podem ser à vazão ou à pressão constante. Empregando-se a vazão constante, a bomba peristáltica é utilizada para movimentar os fluidos pelo percurso analítico sob vazão determinada pela necessidade da análise, considerando a impedância hidrodinâmica que pode aumentar com o comprimento do percurso analítico, com viscosidade de soluções e o diâmetro interno da tubulação empregada. Em análises em fluxo contínuo a pressão constante, tem sido empregado dispositivo de ação gravitacional como propulsores de fluidos. Nessa configuração, a vazão do sistema é alterada conforme viscosidade de soluções e dimensões do percurso analítico (REIS; GINÉ; KRONKA, 1989).

Os detectores empregados na análise por injeção em fluxo são os mais usuais em química analítica como espectrofotômetros moleculares (BERGAMIN F. et al.,

1988; VANNECKE et al., 2001), espectrofotômetros de absorção atômica (NOROOZIFAR; KHORASANI-MOTLAGH; HOSSEINI, 2005), potenciômetros (VAHL et al., 2013), condutivímetros (ALTIOKKA; ATKOSAR; CAN, 2002), entre outros.

Segundo Zagatto; Oliveira; Collins (1999) o termo “análise em fluxo” é um termo genérico para todos os sistemas analíticos que são baseados na introdução e processamento de amostras em fluxo. Ao longo do tempo e sob abordagens e demandas múltiplas, as classificações dos sistemas de análise em fluxo foram atribuídas no intuito de promover e atender diferentes necessidades da química analítica, de modo a compor agregado de funcionalidades. Classificação mais simplista, ainda de acordo com os autores, sugere a divisão entre dois parâmetros principais: a forma como a amostra é introduzida, nesse caso de forma *contínua* ou *intermitentemente* e a característica básica do fluxo que classifica como *segmentado*, *não segmentado* ou *monossegmentado*. Essa segmentação refere-se à divisão do fluxo em compartimentos pequenos e regulares, separados por bolhas de ar para evitar a dispersão da amostra, o que foi considerado, por muitos anos, como estratégia vantajosa.

É interessante destacar que as abordagens e terminologias dos sistemas de análise em fluxo sofreram inúmeras modificações ao longo do tempo, o que não, necessariamente ofereceu funcionalidades distintas ao sistema e até evidenciou necessidade de uniformidade conceitual e melhor entendimento das particularidades de cada técnica vinculada na análise em fluxo. Zagatto e Rocha (2020) exploraram essas diferentes abordagens da análise em fluxo e propuseram análise crítica, bem como nova proposta de apresentação das modalidades do sistema FIA. Essa abordagem é baseada intrinsecamente na “essência” do analisador em fluxo contribuindo para a padronização de termos e definições entre as diferentes áreas do conhecimento e grupos de pesquisadores.

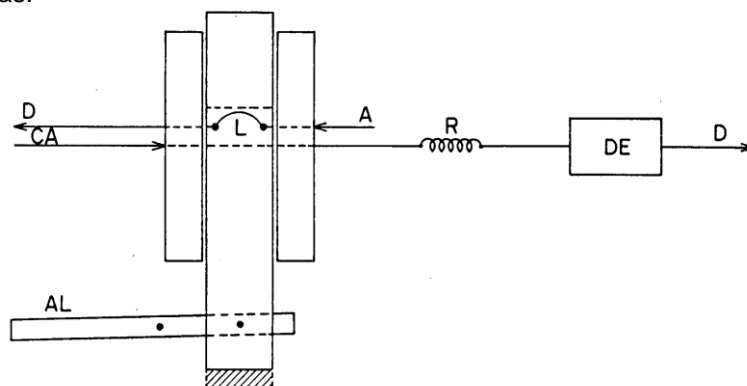
3.4.1 Configurações e elementos dos sistemas FIA

Considerando a relevância do estudo da análise em fluxo na química analítica, as configurações iniciais dos modelos analíticos são bem simples e rudimentares, variando conforme a necessidade de análises e avanços científicos.

O sistema de análise por injeção em fluxo mais elementar é o de linha única. Na Figura 01, o injetor está na posição de amostragem, amostra é bombeada para a

alça de amostragem. Na posição alternativa, alíquota da amostra é inserida no caminho do fluido carregador que a transporta rumo ao detector. Durante o percurso analítico, a amostra sofre dispersão, gerando um gradiente de concentração e o sinal analítico obtido tem característica de sinal transiente.

Figura 01: Diagrama de fluxo em linha única. D – descarte; DE – detector; A – amostra; R – reator; - CA – carregador de amostra; L – alça de amostragem; AL – alavanca. As linhas tracejadas indicam passagens internas.



Fonte: Retirado na íntegra de Reis; Giné; Kronka (1989).

O sistema em linha única apresenta algumas limitações mediante reações químicas durante o percurso analítico, pois o favorecimento ocorre por dispersão e, a concentração do reagente pode não ser suficiente, afetando a estequiometria da reação. Desta maneira, surgem outras configurações para a análise em fluxo como o sistema em confluência (adição do reagente por confluência), zonas coalescentes (onde são adicionadas alíquotas de amostra e reagentes ao mesmo tempo, evitando desperdício de reagente) e ainda os sistemas monossegmentados, em que a dispersão da amostra é minimizada devido as bolhas de ar (REIS; GINÉ; KRONKA, 1989).

3.4.2 Mecanização do sistema FIA

Os sistemas de análise em fluxo têm múltiplas abordagens que atendem a diferentes demandas da química analítica. Atualmente, o que vem ganhando espaço é a mecanização do sistema FIA, de modo a integrar ferramenta mais robusta e aplicável a diversas áreas do conhecimento.

Dentre as etapas dos sistemas de análise de fluxo que são frequentemente apontadas como propícia à mecanização, têm-se, segundo Bezerra et al. (2020):

- i. Inserção automatizada da amostra. Esse procedimento geralmente é realizado com o auxílio de amostrador automático;
- ii. Introdução da amostra (ou reagentes) no sistema e comutação dos fluídos. Procedimento que pode ser realizado por microbombas solenoide ou outros sistemas mecânicos controlados eletronicamente;
- iii. Controle da vazão e direção do fluxo por dispositivos de bomba, como as bombas peristálticas programáveis ou válvulas solenoide;
- iv. Controle do detector;
- v. Aquisição, armazenamento e processamento de dados.

Em termos de mecanização, um dos primeiros pontos a ser considerado é o emprego de amostrador automático, como o elaborado por Kamogawa e Teixeira (2009). Nesse trabalho, foi desenvolvido autoamostrador com materiais de baixo custo para promover configuração simplificada, facilmente reproduzível, tornando-o atrativo para rotinas laboratoriais.

A injeção da amostra no fluxo transportador também pode ser realizada através de dispositivos alternativos como as válvulas de 6 a 8 vias ou as válvulas e microbombas solenoide. O emprego desses dispositivos, tido como discretos, originou o processo de multicomutação, que se “baseia em módulos de análise com estrutura ativa, que pode ser reconfigurada por *software*” (MELCHERT, 2009), isto é, a implementação e administração das diferentes etapas do processo analítico são realizadas de forma independente, tornando o sistema mais versátil. Além disso, através desse mecanismo de injeção controlada, o volume de amostras e reagentes utilizados é da ordem de microlitros, reduzindo drasticamente o volume de resíduo gerado.

Estudo conduzido por Rocha et al. (2005) pretendeu investigar a contribuição do emprego das microbombas solenoide (em substituição à bomba peristáltica convencional) no intuito de minimizar o consumo de reagentes e, portanto, reduzir a geração de resíduos. A avaliação do sistema foi realizada a partir da determinação espectrofotométrica de ciclamato em adoçantes de mesa. Os resultados obtidos - limite de detecção de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, coeficiente de variação de 1,7%, sendo $n= 20$ e frequência analítica de 60 amostras por hora com consumo de reagentes da ordem de mg e μg , além da completa degradação do reagente mais tóxico, gerando 2,0 mL de resíduo - permitiram concluir que a miniaturização do sistema em fluxo mediante o

emprego de microbombas solenoide constitui ferramenta para adoção de procedimentos analíticos mais limpos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Soluções e reagentes

As soluções empregadas na determinação de formaldeído foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura (18 M Ω cm a 25°C).

As soluções padrão de formaldeído (0 – 20 mg L⁻¹) foram preparadas diariamente pela diluição de solução estoque de formaldeído 100 mg L⁻¹ (preparada a partir de padrão analítico 37% (m/v)).

O reagente de Nash foi preparado com acetilacetona 3,8 mol L⁻¹ e acetato de amônio 1,4 mol L⁻¹ com correção do pH para 5,5 com ácido acético PA, conforme Pinto (2017).

Solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,2 mol L⁻¹ foi preparada a partir de TCA PA em água.

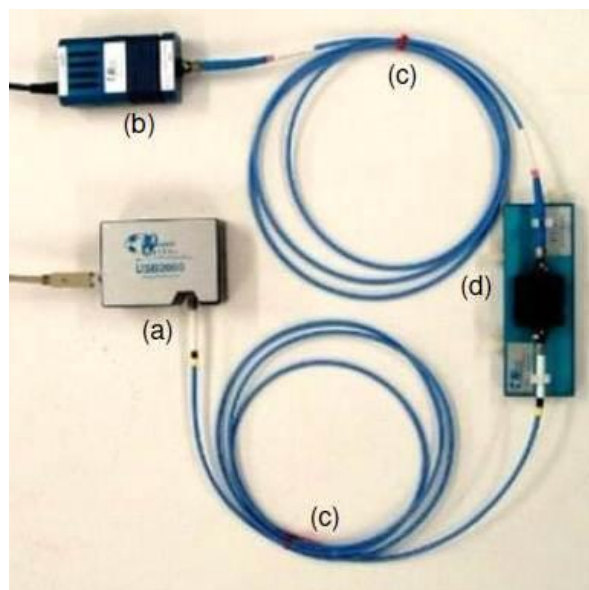
Soluções das espécies Cl⁻, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, K⁺, PO₄³⁻, Na⁺, SO₄²⁻ foram preparadas, separadamente, a partir do sal apropriado dissolvido em água. Solução aquosa de ureia também foi preparada mediante diluição do composto.

Amostras de leite UHT integral, desnatado e sem lactose foram obtidas em supermercados da cidade de Piracicaba (SP).

4.2 Quantificação do formaldeído

As medidas dos sinais foram obtidas por meio de um espectrofotômetro modular, composto por espectrômetro multicanal (Ocean Optics, USB 2000) acoplado à lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, LS-1), como pode ser visto na Figura 2 (a) e (b). Para o transporte da radiação foram empregadas fibras ópticas (Figura 2c) e as medidas foram efetuadas com cela de fluxo de quartzo com 1 cm de caminho óptico e 80 μ L de volume interno (Figura 2d).

Figura 02: Fotografia do espectrofotômetro modular empregado para as medidas em fluxo. (a) espectrômetro multicanal; (b) fonte de radiação; (c) cabos de fibra ópticas; (d) suporte para cela de fluxo de 1 cm.



Fonte: Autora (2020).

4.3 Sistema de análises em fluxo

4.3.1 Programação da ferramenta Arduino

Para o gerenciamento dos dispositivos discretos empregados no sistema de análise em fluxo, foi utilizado o Arduino, uma plataforma de prototipagem eletrônica de hardware livre e de placa única, dotada de um microcontrolador, suporte de entrada/saída embutido com linguagem de programação C++ (ARDUINO, 2020) (Figura 03), sendo o ambiente de desenvolvimento o Arduino DUE.

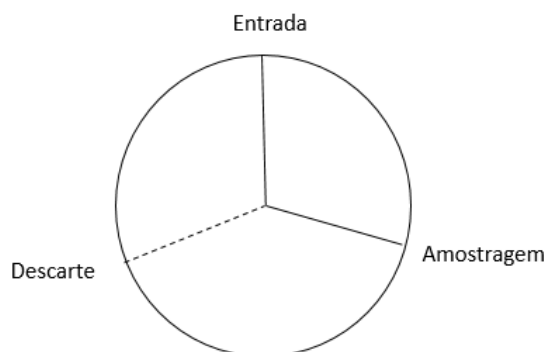
A programação desse sistema possibilitou o acionamento de válvulas de 3 vias (Figura 04) e microbomba solenoide para injeção de amostra, reagentes e carregador, parada de fluxos, tempo de transporte e limpeza do filtro de seringa.

Figura 03: Exemplo de microcontrolador Arduino. Placa com pinos de entradas/saídas, conexão USB.



Fonte: Arduino, 2020.

Figura 04: Esquema de uma válvula solenoide de 3 vias. Na posição de acionamento da válvula, o fluido é encaminhado para amostragem. Quando a válvula não é acionada, o fluido é encaminhado para o descarte ou recirculação.



Fonte: Autora (2020).

4.3.2 Limpeza da amostra em fluxo

Para promover a limpeza da amostra de leite, precipitação protéica, filtro de seringa modelo CHROMAFIL® Xtra H-PTFE com diâmetro de 25 mm e poros de 0,45 μm (MACHEREY-NAGEL, 2020) (Figura 05), foi empregado no sistema de multicomutação.

Figura 05: Filtro de seringa utilizado para limpeza da amostra.



Fonte: Macherey-Nagel (2020).

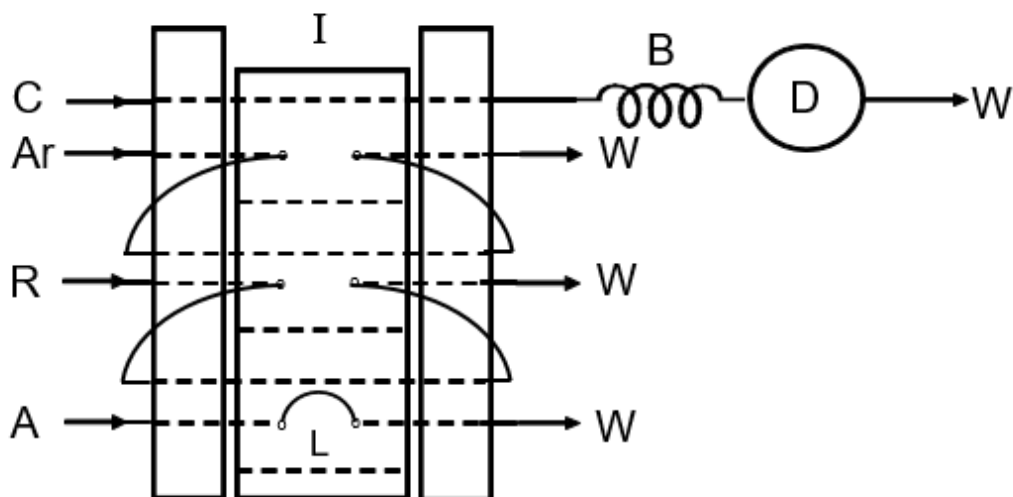
A mistura leite e TCA foi inserida pela parte superior do filtro. Na parte inferior, uma alíquota de amostra límpida (as proteínas ficaram retidas nos poros do filtro) foi encaminhada para bobina de armazenamento e, posteriormente para reação com o reagente de Nash (acetilacetona e acetato de amônio).

4.3.3 Sistema de análises em fluxo proposto inicialmente

O sistema de análises por injeção em fluxo empregado inicialmente foi composto por injetor-comutador com barra deslizante e bomba peristáltica (ISMATEC,

REGLO Digital) equipada com tubos de Tygon para a propulsão dos fluidos. O diagrama de fluxos do módulo de análises é apresentado na Figura 06.

Figura 06: Diagrama do sistema de análises em fluxo. I: injetor proporcional; A: amostra; R: reagente analítico; C: transportador; B: reator helicoidal; L: alça de amostragem; D: espectrofotômetro e W: descartes.



Na posição ilustrada, o reagente (R) e ar (Ar) foram propulsionados para preencher as alças. Água foi empregada como fluido carregador (C) e a alça de amostragem (L) foi preenchida com solução padrão de formaldeído.

Na posição alternativa do injetor, amostra e reagente foram simultaneamente inseridas entre duas bolhas de ar (fluxo monossegmentado), transportadas através do reator helicoidal em direção à cela de fluxo para a medida espectrofotométrica.

4.3.4 Sistema de multicomutação empregado nas análises de formaldeído

O sistema de análise em fluxo com multicomutação empregado está ilustrado na Figura 07. Uma bomba peristáltica (ISMATEC, REGLO Digital) equipada com tubos de Tygon foi utilizada para a propulsão dos fluidos.

De acordo com a sequência de acionamento descrita na Tabela 1, as válvulas V2 e V3 foram responsáveis pela inserção de amostra e TCA no percurso analítico, respectivamente. Na confluência 1 (Cf1) ocorria a mistura das soluções que foi encaminhada através da V5 para limpeza no filtro de seringa. Em seguida, amostra límpida foi transportada para bobina de armazenamento (C2), de onde foi introduzida, juntamente com o reagente no percurso analítico pelas válvulas V7 e V4 acionadas

por 10 s e transportada pela válvula V1 (ar) acionada por 10 s. Este ciclo de amostragem foi repetido por 3 vezes para introdução de 3 zonas de amostras.

Após a etapa de parada de fluxos (20 s), a válvula V1 foi acionada para que as zonas de amostras fossem transportadas até o detector, realizando a medida espectrofotométrica em 412 nm. As válvulas V2, V3 e V4, quando não acionadas, recirculavam amostra, TCA e reagente de Nash, respectivamente.

A limpeza do filtro de seringa empregado para retenção proteica da amostra foi realizada acionando-se a microbomba solenoide (Sp1) e as válvulas V5 e V6 em contra fluxo.

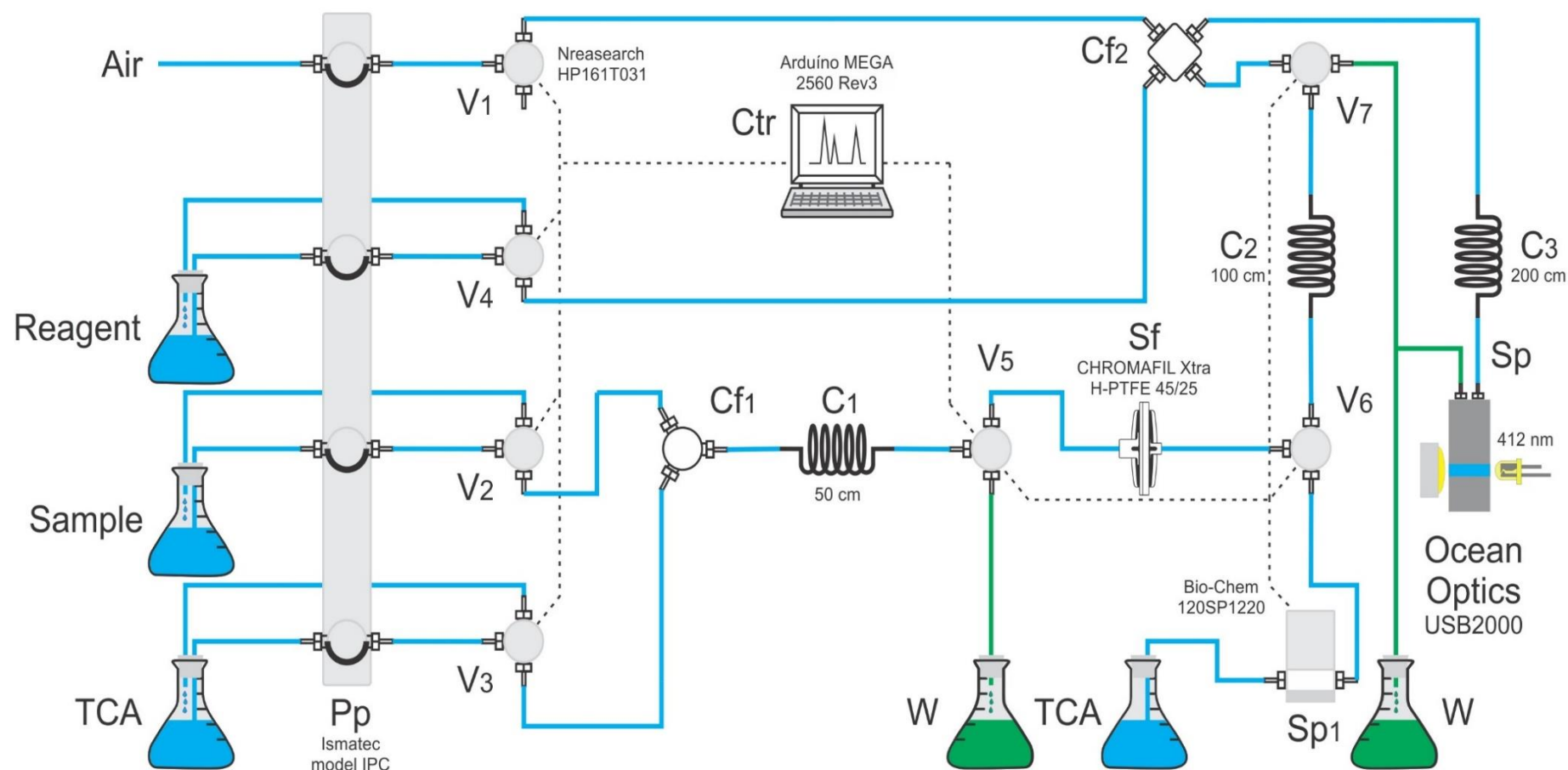
A substituição da amostra foi realizada acionando simultaneamente as válvulas V2 e V5, sendo esta responsável pelo direcionamento das soluções para o descarte.

Tabela 01: Sequência de acionamento dos dispositivos para determinação de formaldeído.

Etapas	Dispositivos	Função	Tempo (s) ou Pulsos
1	V2	Inserção da amostra	30
	V3	Inserção de TCA	80
2	V3, V4 e V7	Tempo de transporte	10*
3	V1	Transporte	10*
4	-	Parada de fluxos	20
5	V1	Transporte das zonas de amostras e detecção	100
6	V5, V6 e Sp1	Limpeza do filtro de seringa	120 s e 400 pulsos

* 3 ciclos de amostragem.

Figura 07: Diagrama de fluxos do módulo de análises para a determinação de formaldeído. Ctr: interface de controle Arduino; V1-V7: válvulas solenoide de 3 vias; Pp: bomba peristáltica; Air: ar; Sample: amostra; TCA: ácido tricloroacético; Reagent: reagente de Nash; Cf1 e Cf2: pontos de confluência; C1 e C2: bobinas de armazenamento; C3: reator (200 cm e 7 mm d.i.); Sf: filtro de seringa; Sp: cela de fluxo (1 cm); Sp1: microbomba solenoide e W: descarte.

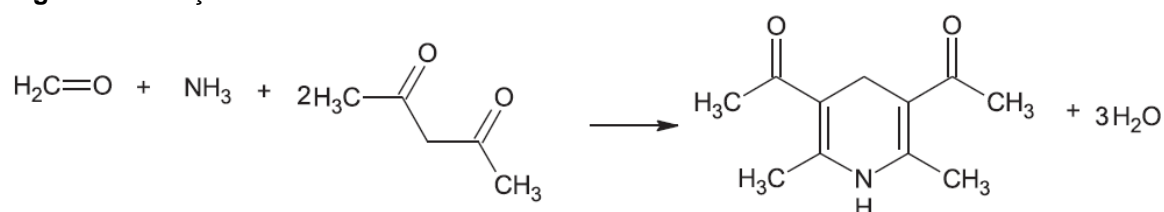


Fonte: Autora (2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de formaldeído foi baseada na reação de Hantzsch (Figura 08), que consiste na reação do formaldeído com acetilacetona (2,4-pentadiona) em presença de amônia, formando produto de coloração amarela, o 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL). Essa reação é seletiva para o formaldeído, que foi quantificado por espectrofotometria com máxima absorção em 412 nm (NASCIMENTO et al. 2015).

Figura 08: Reação de Hantzsch.



Fonte: Retirado na íntegra de Nascimento et al. (2015).

5.1 Otimizações do sistema proposto

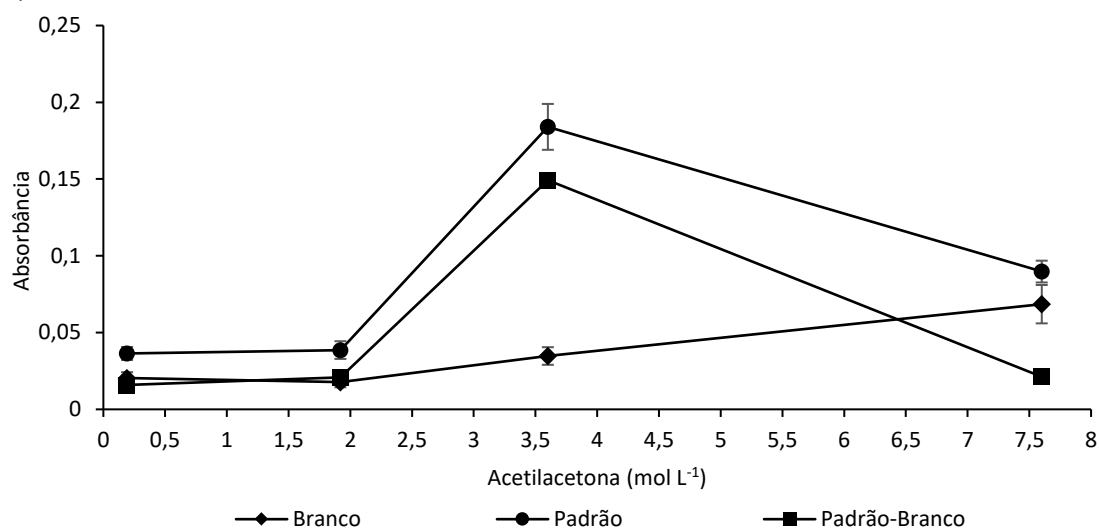
As medidas foram realizadas em triplicata e baseadas na altura do patamar característico do fluxo monossegmentado. Para otimização dos sistemas, utilizou-se procedimento univariado, levando em consideração a magnitude dos sinais analíticos e do branco analítico.

5.1.1 Estudo da concentração do reagente de Nash e influência do pH

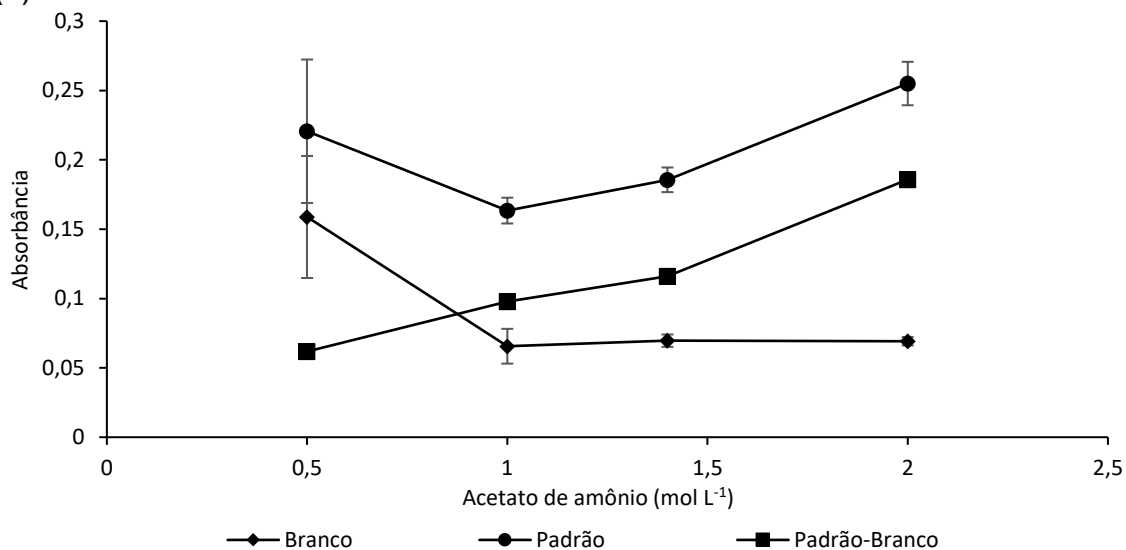
As concentrações de acetilacetona e acetato de amônio foram avaliadas de modo a garantir a estequiometria da reação química envolvida (Figura 08). As concentrações de acetilacetona avaliadas foram de 0,19 - 7,6 mol L⁻¹ com valor fixo de acetato de amônio (1,4 mol L⁻¹) e pH em 5,5 (Figura 09a). Após o estabelecimento da concentração de acetilacetona, foram avaliadas diferentes concentrações de acetato de amônio (0,5 – 2,0 mol L⁻¹), também com pH corrigido para 5,5 (Figura 09b). O pH no reagente de Nash também foi avaliado entre 4,0 - 5,5 com o emprego de ácido acético (Figura 09c). Os estudos foram realizados empregando solução de 10 mg L⁻¹ formaldeído.

Figura 09: Parâmetros químicos da reação de Hantzsch, otimização de (a): acetilacetona; (b): acetato de amônio e (c): pH do reagente de Nash.

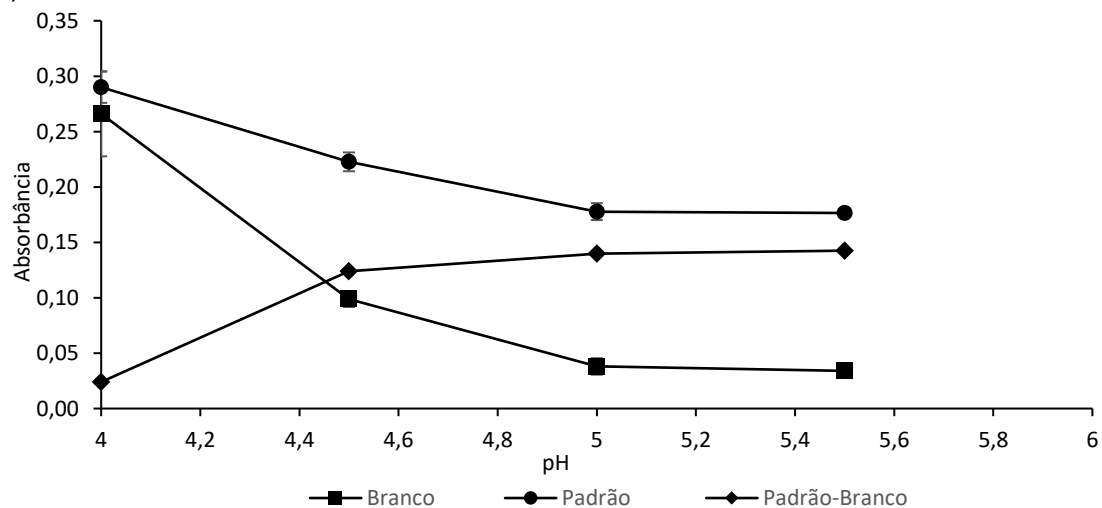
(a)



(b)



(c)



Com relação à concentração e pH dos reagentes, estes foram selecionados de acordo com a efetividade da reação em relação as maiores respostas analíticas, além de menores desvios e maior diferença de absorvância entre o branco e o sinal analítico. Por conseguinte, o reagente de Nash permaneceu com 3,8 mol L⁻¹ de acetilacetona, 1,4 mol L⁻¹ de acetato de amônio e pH ajustado para 5,5, conforme Pinto (2017).

A proporção entre amostra e reagente e o tamanho do reator helicoidal foram definidos anteriormente em sistema FIA convencional com injetor comutador de acrílico descrito no item 4.3.3.

Os comprimentos das alças foram estabelecidos de acordo com os valores de absorvância entre a diferença do sinal analítico e o branco analítico, condições que favoreceram maiores respostas analíticas. Além disso, também foi considerado o desvio padrão das medidas tanto do padrão de formaldeído quanto do branco. Sendo assim, os volumes otimizados foram 250, 180 e 1000 µL, respectivamente para alças da amostra, do reagente e do reator helicoidal.

As faixas estudadas e os valores selecionados estão listados na Tabela 02.

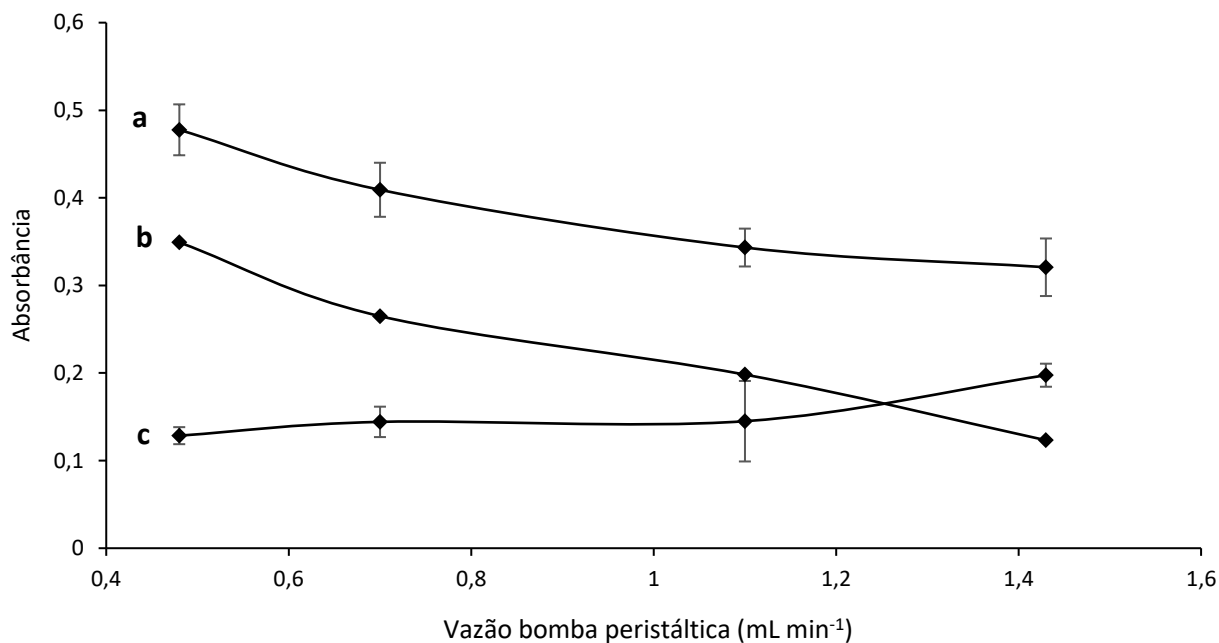
Tabela 02: Comprimento das alças de amostra e reagente e do reator helicoidal empregados na otimização do sistema FIA.

Parâmetros	Faixa estudada (cm)	Valor selecionado (cm)	Volume (µL)
<i>Alça da amostra</i>	24 - 125	50	250
<i>Alça do reagente</i>	12 – 100	36	180
<i>Reator</i>	100 - 300	200	1000

O sistema de análises por injeção em fluxo proposto inicialmente (item 4.3.3) foi alterado devido à complexidade da proposta na precipitação das proteínas de modo online. Desta maneira, foi proposto sistema com multicomutação descrito no item 4.3.4 com dispositivos discretos e acionamento eletrônico, facilitando o modo operacional. Nesse sistema, as otimizações realizadas foram a vazão da bomba peristáltica (0,48 – 1,43 mL min⁻¹) e o tempo de parada do fluxo no percurso analítico (0 – 120 s), além da etapa de limpeza da amostra de leite.

A vazão da bomba peristáltica foi avaliada (Figura 10) para favorecer principalmente a formação das zonas de amostras do monossegmentado, além da limpeza da amostra do leite.

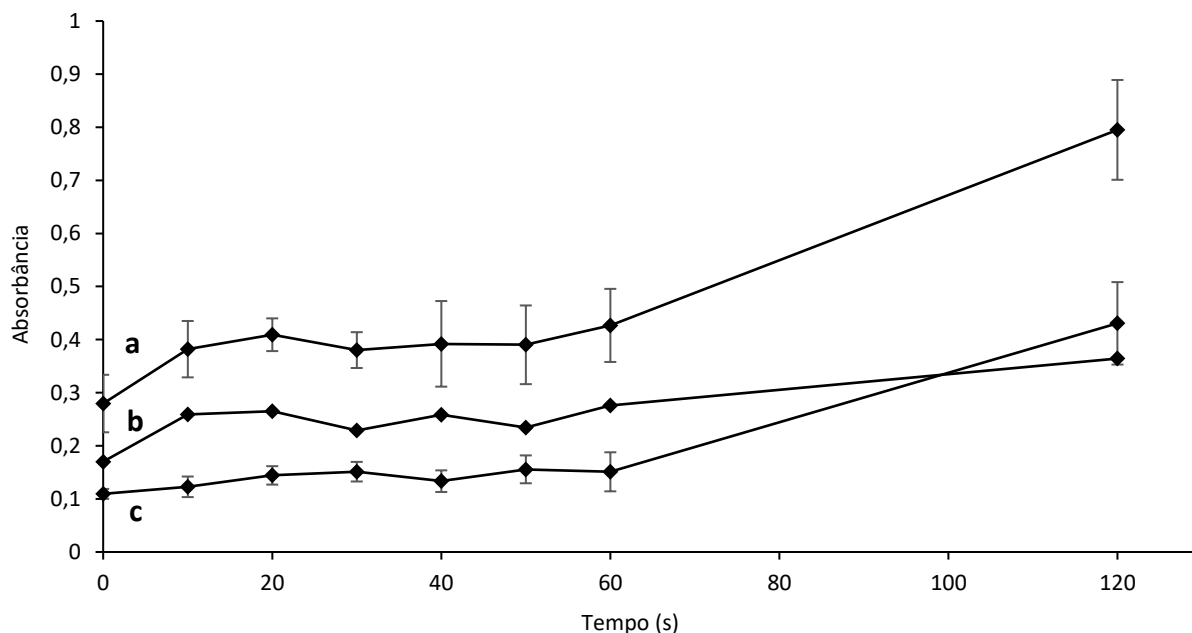
Figura 10: Efeito da vazão da bomba peristáltica sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (c). (b) é a diferença entre os sinais. Condições experimentais: Acionamento das válvulas de reagente de Nash ($3,8 \text{ mol L}^{-1}$ de acetilacetona e $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amônio) e formaldeído 10 mg L^{-1} por 10 s; bolha de ar de 10 s, parada de fluxo de 20 s, transporte por 120 s e reator de 200 cm (7 mm d.i.).



De acordo com o gráfico da Figura 10, a vazão escolhida foi $0,70 \text{ mL min}^{-1}$, por apresentar significativa distinção entre o sinal analítico e do branco e um menor desvio padrão. A menor vazão estudada não foi selecionada, mesmo com aumento aproximado de 20% do sinal analítico, pois comprometeria a frequência analítica do sistema.

O tempo de parada de fluxos, antes da detecção espectrofotométrica, foi requerido devido a reação de derivatização do formaldeído apresentar cinética lenta, os resultados são apresentados na Figura 11.

Figura 11: Efeito da parada de fluxos sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (c). (b) é a diferença entre os sinais. Condições experimentais: Acionamento das válvulas de reagente de Nash ($3,8 \text{ mol L}^{-1}$ de acetilacetona e $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amônio) e formaldeído 10 mg L^{-1} por 10 s; bolha de ar de 10 s, parada de fluxo de 20 s, transporte por 120 s e reator de 200 cm (7 mm d.i.).



Houve aumento do sinal analítico até 20 s de parada de fluxos, sem alterações significativas até 60 s do estudo. No entanto, o tempo selecionado foi de 20 s, considerando o menor desvio padrão.

A Tabela 03 resume todos os parâmetros que foram otimizados, bem como as faixas estudadas e os valores selecionados.

Tabela 03: Otimização dos parâmetros avaliados para a estratégia analítica proposta

Parâmetro	Faixa estudada	Valor selecionado
Tempo de parada (s)	0 – 120	20
Reator helicoidal (cm)	100 – 300	200
Vazão (mL min^{-1})	0,48 – 1,43	0,7
[Acetilacetona] mol L^{-1}	0,19 – 7,6	3,8
[Acetato de amônia] mol L^{-1}	0,5 – 2,0	1,4
pH do reagente	4,0 – 5,5	5,5

5.2 Limpeza da matriz

Para promover a limpeza das amostras de leite online foi empregado um filtro de seringa, descrito no item 4.3.2, no sistema com multicomutação. O emprego do filtro promoveu de forma satisfatória a limpeza, removendo a fração proteica, evitando

possível espalhamento de radiação e efeitos de matriz nas medidas espectrofotométricas.

Para promover a limpeza do filtro, considerando o acúmulo de proteínas advindas da amostra ao longo de múltiplos acionamentos, foi adicionado ao sistema 2 válvulas de 3 vias e uma microbomba solenoide, que integradas ao programa Arduino, foram responsáveis pela circulação de TCA em sentido contrário ao percurso analítico de modo a retirar as partículas sólidas do filtro de seringa, permitindo uma nova amostragem. Para avaliar a quantidade de acionamentos que um filtro suportou sem atrapalhar os sinais analíticos, foi realizado teste de exaustão, o qual consistiu em acionamentos subsequentes da rotina de amostragem de modo a avaliar a quantidade máxima de análises a serem executadas antes da troca do filtro.

O teste de exaustão demonstrou que cada filtro suportou 17 acionamentos da rotina de análises (em cada acionamento fez-se uma triplicata) para determinação espectrofotométrica do formaldeído, ou seja, 51 zonas de amostras. Um resultado bastante expressivo, considerando a complexidade da amostra analisada.

5.3 Características analíticas

Nas condições otimizadas, sinais transientes foram obtidos (Figura 12), destaque para o local da aquisição de dados (A) e curva de calibração foi construída, conforme Figura 13.

Figura 12: Sinais transientes do sistema de multicomutação. No detalhe, patamares formados retratando o sinal analítico entre perturbações ocasionadas pela bolha de ar. A= medida de absorvância do analito ou branco e B= carregador; ar.

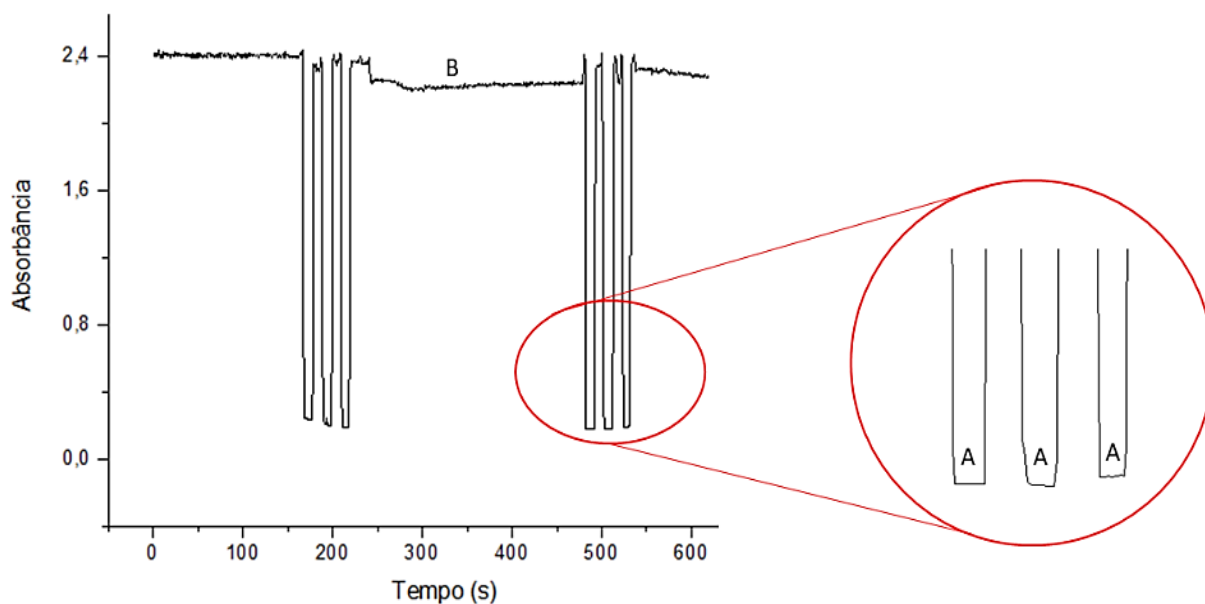
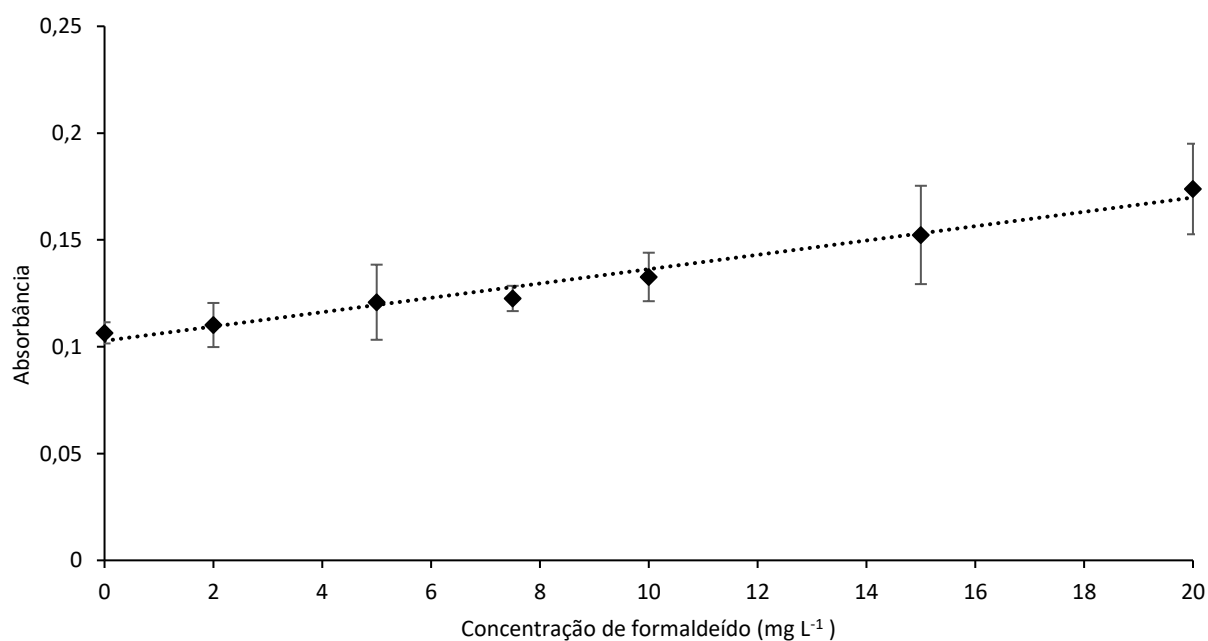


Figura 13: Curva de calibração com padrões de formaldeído em água. Acionamento das válvulas de reagente de Nash ($3,8 \text{ mol L}^{-1}$ de acetilacetona e $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amônio) e padrões de formaldeído até 20 mg L^{-1} por 10 s; bolha de ar de 10 s, parada de fluxo de 20 s, transporte por 100 s e reator de 200 cm (7 mm d.i.).



Resposta linear foi obtida entre até 20 mg L^{-1} formaldeído, descrita pela equação da reta: $A = 0,1028 + 0,0034 C \text{ mg L}^{-1}$ formaldeído, $R = 0,9788$. Limite de detecção, coeficiente de variação e frequência analítica foram estimados em $0,45 \text{ mg L}^{-1}$; 2,8% e 48 determinações h^{-1} , respectivamente. Em cada determinação foram consumidos $0,014 \text{ mL}$ de acetilacetona e $0,037 \text{ mg}$ de acetato de amônio e gerados 3 mL de resíduo, levando em consideração a limpeza do filtro com TCA.

5.4 Avaliação de interferentes da reação de Hantzsch

A reação de Hantzsch apresenta boa seletividade para o formaldeído, já que outros aldeídos não são reativos nessa condição, como relatado por Nascimento et al. (2015). Não obstante, foi avaliada se a presença de íons inorgânicos comumente encontrados no leite e ureia (empregada como adulterante) afetava a formação do produto da reação ou a concentração de formaldeído nas amostras analisadas.

Para tanto, foram testados os seguintes possíveis interferentes: Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} , Na^+ , SO_4^{2-} e ureia. Amostras de leite foram dopadas com 10 mg L^{-1} de formaldeído e 100 mg L^{-1} de cada uma das espécies e submetidas à análise nas condições otimizadas.

A Tabela 04 resume a concentração máxima tolerada das espécies concomitantes, sem alteração na resposta analítica em até 5%.

Tabela 04: Limite de tolerância para espécies concomitantes.

Interferente	Concentração máxima (mg L^{-1})
Cl^-	50
Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e K^+	75
PO_4^{3-} , Na^+ , ureia, SO_4^{2-}	100

Os dados permitem concluir que a reação de Hantzsch foi seletiva para o formaldeído. Além disso, a concentração destes interferentes no leite é normalmente muito abaixo das especificadas nas condições expostas neste experimento, demonstrando que o procedimento desenvolvido não será afetado pelas espécies concomitantes estudadas.

5.5 Análise de amostras de leite bovino

Estudos de adição e recuperação de formaldeído (10 e 20 mg L^{-1}) em amostras de leite integral (2), leite desnatado (2) e integral sem lactose (1) foram analisadas pelo sistema proposto (Tabela 05).

Tabela 05: Recuperação de formaldeído em diferentes amostras de leite. Resultados referem-se a triplicatas.

Amostras	Formaldeído (mg L⁻¹)	Recuperação (%)
<i>Leite integral 1</i>	10	104 ± 4
	20	91 ± 4
<i>Leite integral 2</i>	10	80 ± 6
	20	95 ± 5
<i>Leite desnatado 1</i>	10	107 ± 1
	20	89 ± 5
<i>Leite desnatado 2</i>	10	117 ± 1
	20	97 ± 6
<i>Leite integral zero lactose</i>	10	119 ± 1
	20	89 ± 1

Na Tabela 05 são apresentadas as porcentagens de recuperação obtidas que foram estimadas entre 80 – 119%, permitindo concluir que a metodologia utilizada se mostra robusta e sensível para determinação de formaldeído em amostras de leite. Nascimento et al. (2015) encontraram resultados semelhantes na determinação de formaldeído com FIA, empregando microextração líquido-líquido dispersiva (Tabela 06). É importante salientar que as recuperações mais elevadas (119%) na amostra de leite sem lactose, pode ser explicada pela quantidade de enzima lactase presente nesse produto, o que pode dificultar ainda mais a limpeza da matriz.

De uma maneira geral (Tabela 06) para determinação de formaldeído, as técnicas mais usualmente empregadas são técnicas cromatográficas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, da sigla em inglês) e detecção UV que, apesar de apresentarem ótima sensibilidade, requerem extenso preparo de amostra, bem como o emprego de grandes volumes de solventes para determinação. Outras alternativas incluem a Cromatografia Gasosa (CG) com detecção por espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*) para avaliação de adulterantes no leite como realizado por Guerreiro et al. (2018). Essa técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade, garantindo resultados confiáveis já que produzem “biomarcadores” e promovem a análise de molécula alvo. Entretanto, apresenta alto custo de implementação e extensivo tratamento de amostra.

O sistema proposto com multicomutação apresenta vantagem em relação ao preparo de amostra online, minimizando o consumo de reagentes e de amostra e

apresentando baixo coeficiente de variação (2,8%), demonstrando a robustez da ferramenta empregada. Além disso, evita a utilização de solventes orgânicos como acetonitrila empregada na maioria dos trabalhos listados na Tabela 06.

Tabela 06: Características analíticas de procedimentos para determinação de formaldeído em leite.

Técnica	Preparo de amostra	Faixa linear (mg L⁻¹)	CV (%)	Recuperação (%)	Referência
<i>HPLC - UV</i>	Extração com hexano e evaporação do solvente com nitrogênio	0,005 – 0,1		89,9 – 96,9	KAMINSKI; ATWAL; MAHADEVAN (KAMINSKI; ATWAL; MAHADEVAN, 1993)
<i>CG - MS</i>	SPME	0,005 – 1,0	1,4 – 15	68 – 128	JEONG et al. ((JEONG et al., 2015)
<i>FIA e DLLME</i>	TCA /centrifugação e filtração	0,5 – 5,0	3,3	91 – 106	NASCIMENTO et al. (2015)
<i>HPLC - UV</i>	Acetonitrila com centrifugação e filtração	1 – 100	6,81 – 7,29	93,2 – 93,6	WAHED et al. (2016)
<i>HPLC - UV</i>	LLE-LTP com acetonitrila	10 -400	2,5	102,2	REZENDE et al. (2017)
<i>HPLC - UV</i>	LLE com acetonitrila	0,03 – 0,1	1 – 4	98	TEIXEIRA (2018)
<i>Multicomutação</i>	TCA e filtração online	<20	2,8	80 – 119	Este trabalho

Notas: **LLE:** Extração líquido-líquido; **LLE-LTP:** Extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura; **SPME:** Microextração em fase sólida.

6 CONCLUSÃO

O sistema de multicomutação desenvolvido constituído de válvulas de 3 vias e microbomba solenoide e programador Arduino mostrou ser alternativa simples, rápida e robusta para a determinação de formaldeído. Apresenta vantagens como alta frequência analítica e baixo consumo de reagentes e baixa geração de resíduos, além da possibilidade do tratamento da amostra em linha.

A versatilidade dos sistemas de análise em fluxo permite ampla aplicação em rotinas laboratoriais e constitui uma ferramenta importante na detecção de fraudes em leite e, conseqüentemente, na segurança do produto ofertado aos consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTIOKKA, G.; ATKOSAR, Z.; CAN, N. O. The determination of levofloxacin by flow injection analysis using UV detection, potentiometry, and conductometry in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 881–885, 30 set. 2002.

ANASTAS, P. T. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology development. **Crit. Rev. Anal. Chem**, 1999, vol. 29, p. 167-175.

ARDUINO. Disponível em: <<https://www.arduino.cc/>>. Acesso em 05 ago 2020.

BÁNKUTI, F. I.; CALDAS, M. M. Geographical milk redistribution in Paraná State, Brazil: Consequences of institutional and market changes. **Journal of Rural Studies**, v. 64, p. 63–72, 1 nov. 2018.

BERGAMIN F, H. et al. On-line electrolytic dissolution of alloys in flow injection analysis. Part 2: Spectrophotometric determination of molybdenum in steels. **Analytica Chimica Acta**, v. 214, n. C, p. 397–400, 1 jan. 1988

BEZERRA, M. A. et al. Automation of continuous flow analysis systems: a review. **Microchemical Journal**. Elsevier Inc., 1 jun. 2020.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**, Brasília, DF, mar 2017. Disponível em:<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 18 jun. 20.

----- **Ministério da Agricultura**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa 30, 26/06/18. Brasília: Ministério da Agricultura, 2018.

----- **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Ficam estabelecidos os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887>. Acesso em 24 jun. 2020.

----- **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Ficam aprovados os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076>. Acesso em 24 jun. 2020.

-----. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa nº 78, de 26 de novembro de 2018. Estabelece requisitos e procedimentos para o registro de provas zootécnicas visando o controle leiteiro e avaliação genética de animais com aptidão leiteira. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52753396/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-78-de-26-de-novembro-de-2018-52753040>. Acesso em 24 jun. 2020.

CASTRO, Maria Tôrres de. Fraudes no leite: riscos para a segurança dos alimentos e para a Saúde Pública. **Food Safety Brazil**, 2019. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/fraudes-leite-saude-publica-e-seguranca-de-alimentos/>>. Acesso em 18 nov. 2020.

CETESB. **Formaldeído**. Ficha de Informação Toxicológica (FIT). Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Formaldeido.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

CIÊNCIA DO LEITE. **Leite: considerações gerais**. ago. 2008. Disponível em: <<https://cienciadoleite.com.br/noticia/96/leite--consideracoes-gerais.>> Acesso em 17 out. 2018.

EMERSON, Denis Willians Vargas. **MÉTODOS DE ANÁLISE DE FORMALDEÍDO E OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE HANTZSCHEN**. 2010. 91 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Industrial Madeireira, Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://www.madeira.ufpr.br/tccpublicados/tccdenisemerson.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

EMPRESA é interdita após operação sobre adulteração no leite no RS. **G1 RS**, Rio Grande do Sul, 08 de maio de 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2013/05/empresa-e-interditada-apos-operacao-sobre-adulteracao-no-leite-no-rs.html>>. Acesso em: 18 nov. 2020.

FAGNANI, Rafael. **Vale a pena ler de novo! Resumão das INs 76 e 77: elas estão chegando!** MilkPoint, 2019. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/rafael-fagnani/resumao-das-ins-76-e-77-elas-estao-chegando-212785/>>. Acesso em 26 jun. 2020.

GUERREIRO, T. M. et al. Evaluating the effects of the adulterants in milk using direct-infusion high-resolution mass spectrometry. **Food Research International**, v. 108, p. 498–504, 1 jun. 2018.

IARC, Internacional Agency for Research on Cancer (2006). Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tertbutoxypropan-2-ol. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 88: 1–478. PMID:17366697.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795>. Acesso: 07 nov. 2018.

JEONG, H. S. et al. Validation and determination of the contents of acetaldehyde and formaldehyde in foods. **Toxicological Research**, v. 31, n. 3, p. 273–278, 30 dez.

2015.

KAMINSKI, J.; ATWAL, A. S.; MAHADEVAN, S. High performance liquid chromatographic determination of formaldehyde in milk. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 16, n. 2, p. 521–526, 1 jan. 1993.

KAMOGAWA, M. Y.; TEIXEIRA, M. A. Autoamostrador de baixo custo para análise por injeção em fluxo. **Quim. Nova**. [s.l: s.n.].

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 1 abr. 2009.

LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F. R. P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 337–341, abr. 2004.

LENARDAO, Eder João et al. "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, jan. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000100020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 26 jun 2020.

MACHEREY-NAGEL. Disponível em: <<https://www.mn-net.com/filtration/syringe-filters/?p=1>>. Acesso em 13 de out. 2020.

MAREZE, Juliana et al. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 36, n. 1, p.283-290, ago. 2015. Mensal. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/19258/16930>>. Acesso em: 07 nov. 2018.

MEIRELES, Almir. **Por que bebemos leite**. São Paulo, SP: Editora de Cultura, 2015.

MELCHERT, W. R. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos limpos e com alta sensibilidade para a determinação de espécies de interesse ambiental**. 2009. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**. Elsevier, , 10 fev. 2012.

MILKPOINT. **Estatísticas**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/estatisticas/>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

MOREIRA, B. C. S. et al. Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo utilizando materiais alternativos de baixo custo para fins didáticos. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1566–1572, 2014.

NASCIMENTO, C. F. et al. Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid-

liquid microextraction: Spectrophotometric determination of formaldehyde in milk. **Talanta**, v. 144, p. 1189–1194, 12 ago. 2015.

NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; HOSSEINI, S. N. Flow injection analysis-flame atomic absorption spectrometry system for indirect determination of cyanide using cadmium carbonate as a new solid-phase reactor. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, n. 2, p. 269–273, 10 jan. 2005.

REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; KRONKA, E.A.M. A análise química por injeção em fluxo contínuo, **Quim. Nova**, 1989, vol. 12, p. 82-91.

REZENDE, F. B. de F et al. Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 383–389, 1 set. 2017.

RUI, Bruno Rogério *et al.* Principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Bandeirantes, v. 9, n. 16, jan. 2011. Semestral. Disponível em:
http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/m6Q26BL5uE3g5vW_2013-6-26-10-53-19.pdf. Acesso em: 23 dez. 2020.

ROCHA, Christiane Romanelli. **Desenvolvimento de método para análise de leite por espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Disponível em:
<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-9Z5FCD/disserta__o_christiane_romanelli_rocha_vers_o_final_.pdf?sequence=1>. Acesso em: 17 out. 2018.

SANTOS, Marcos Veiga. Padrões mínimos de qualidade do leite: é necessária uma nova revisão da IN 62? ago. 2014. Disponível em:
<<https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/padroes-minimos-de-qualidade-do-leite-e-necessaria-uma-nova-revisao-da-in-62-205597n.aspx>>. Acesso em: 19 out. 2018.

TEIXEIRA, Ana Carolina de Souza Miranda. **Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação do Teor de Formaldeído pela Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência como Alternativa para Implantação nas Plataformas de Recepção de Leite no Brasil**. 2018. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Processos Industriais, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em:<http://cassiopea.ipt.br/teses/2018_PI_Ana_Carolina.pdf> Acesso em: 22 nov. 2020.

TUNDO, P. et al., **Pure Appl. Chem.** vol. 72 (7), p. 1207 – 1228. 2000.

VAHL, K. et al. Determination of the titratable acidity and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis. **Talanta**, v. 111, p. 134–139, 15 jul. 2013.

VANNECKE, C. et al. Development of a generic flow injection analysis method for compounds with a secondary amine or amide function, using an experimental design approach: I. Selection and evaluation of the FIA system parameters. *Analytica Chimica Acta*. **Anais...**Elsevier, 19 nov. 2001

WAHED, P. et al. Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method. **Food Chemistry**, v. 202, p. 476–483, 1 jul. 2016.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994). **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 143–146, jan. 1999.

ZAGATTO, E. A. G.; ROCHA, F. R. P. The multiple facets of flow analysis. A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 1093, p. 75–85, 6 jan. 2020.