

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS GERAIS

FABIANE CARLA LOPES

DESENVOLVIMENTO DE UM PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO PARA
ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

BELO HORIZONTE

2022

FABIANE CARLA LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE UM PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO
PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Química de Minas
Gerais, do Centro Federal de Educação
Tecnológica de Minas Gerais, como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr.: Emerson Fernandes Pedroso
Coorientadora: Prof^a Dr^a: Zenilda de Lourdes Cardeal

BELO HORIZONTE

2022

Lopes, Fabiane Carla.
L864d Desenvolvimento de um preparador amostral automático para
análise cromatográfica / Fabiane Carla Lopes. – 2022.
82 f. : il.
Orientador: Emerson Fernandes Pedroso.
Coorientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica
de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em
Química de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.
Bibliografia.

1. Automação. 2. Arduino (Controlador programável). 3.
Cromatografia. 4. Derivatização. 5. Aminoácidos. I. Pedroso, Emerson
Fernandes. II. Cardeal, Zenilda de Lourdes. III. Título.

CDD: 543.8

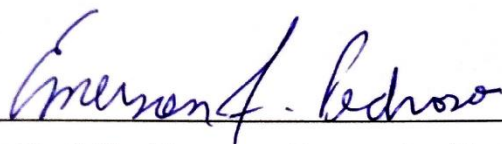
FABIANE CARLA LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE UM PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO PARA
ANÁLISE CROMATOGRÁFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Belo Horizonte, 03 de fevereiro de 2022.

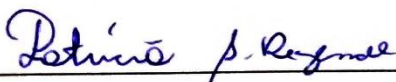
Aprovado pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Emerson Fernandes Pedrosa (Orientador)



Prof. Dr. Patterson Patricio de Souza



Prof. Drª. Patricia Sueli de Rezende



Prof. Drª. Zenilda de Lourdes Cardeal



Prof. Dr. Helvecio Costa Menezes

Agradecimento

Agradeço:

Ao Prof. Dr. Emerson Fernandes Pedroso por toda paciência e todo empenho dedicado para que este trabalho fosse concluído. Você não me deixou desistir!

À Prof^a. Dr^a. Zenilda de Lourdes Cardeal pelo suporte e apoio nas orientações e uso do laboratório RMCA (Rede Mineira de Cromatografia Avançada)

Ao Josimar Batista pelos ensinamentos e risadas.

Aos demais professores do IntechLab e RMCA.

Aos colegas do IntechLab e RMCA.

Ao Programa de apoio à Pós-Graduação do CEFET/MG.

À minha família que sempre me apoia e me incentiva a crescer.

Resumo

O avanço tecnológico tem trazido benefícios para o dia a dia das pessoas e das empresas permitindo a automação de atividades antes manuais. Essa inovação contínua, impacta a rotina dos laboratórios que demandam por análises cada vez mais rápidas, simples e sustentáveis. Isso induziu a mudança da etapa de preparo de amostras com a inclusão de equipamentos automatizados para miniaturização de sistemas, redução de riscos humanos, de erros aleatórios e, de tempo e custos dos tratamentos amostrais. Apesar do diminuto investimento financeiro às Instituições de pesquisas públicas brasileiras, o que tem atrasado o avanço tecnológico no Brasil na última década, as plataformas de robótica de código-aberto e a integração multidisciplinar têm possibilitado a construção de instrumentos laboratoriais automatizados a baixo custo. Foi construído um robô cartesiano com propriedades capazes de preparar soluções e amostras líquidas. Todo o equipamento é controlado por um *software* escrito em Python 3 que roda em um computador e por dois microcontroladores Atmel 328P programados em linguagem C. O *software* é responsável pelo deslocamento da microseringa nos eixos cartesianos que são movidos por motores. O objetivo é fazer com que os motores de passos desloquem corretamente a microseringa até a posição desejada dos frascos e reatores, e realize as funções de pipetar ou verter o volume almejado. O *software* também é responsável pelo funcionamento do bloco reacional: sistemas de aquecimento e agitação. Um motor de eixo desbalanceado é responsável pela agitação do bloco (2965 rpm). O equipamento é composto por: A) um bloco reacional (contém 7 reatores) com controle de temperatura (isolados termicamente por placas de isopor) e agitação; B) por uma microseringa, e; C) por suportes para colocar frascos de reagentes e descarte. Utilizou-se metodologias de validação para a temperatura do bloco (temperatura ambiente até $84,9 \pm 0,54$ °C) e para o volume da microseringa (até $159,0 \pm 0,34$ µL), e os resultados dos coeficientes de determinação foram: $R^2_{\text{TEMPERATURA}} = 0,9994$ e $R^2_{\text{VOLUME}} = 0,9999$. O preparador amostral desenvolvido foi utilizado para o preparo de curvas de calibração de soluções e de reações de derivatização seguida de análise cromatográfica: 1) Soluções com padrão de esteroides ($30,0 - 180,0$ mg L⁻¹): $0,9925 < R^2 < 0,9944$ – GC; 2) Solução padrão de diclofenaco de sódio ($25,0 - 125,0$ mg L⁻¹): $R^2 = 0,9995$ – HPLC; 3) Curvas com padrões de aminoácidos derivatizados ($10,0 - 35,0$ mg L⁻¹) com propil cloroformato: $0,9678 < R^2 < 0,9995$ – GC. Todos os resultados das curvas de linearidade das análises cromatográficas foram avaliados por testes estatísticos de normalidade e homoscedasticidade. A versatilidade desse preparador amostral automático vai além das aplicações desenvolvidas neste trabalho, pois ele executa funções que são responsáveis pelos principais parâmetros de estudos de otimização de processos. Podendo garantir maior repetibilidade/precisão de resultados.

Palavras chaves: Automação; Arduíno; cromatografia; derivatização; aminoácidos.

Abstract

Technological advances have brought benefits to everyday activities, allowing the automation of activities that were previously manual. This continuous innovation impacts the routine of laboratories that demand faster, simpler, and more sustainable analyses. This induced a change in the sample preparation stage with the inclusion of automated equipment for miniaturization of systems, reduction of human risks, random errors, and time and costs of sample treatments. Despite the shortage of financial investment in Brazilian public research institutions, which has delayed the technological advance in Brazil in the last decade, open-source robotics platforms and multidisciplinary integration have enabled the construction of automated laboratory instruments at a low cost. A cartesian robot with properties capable of preparing liquid solutions and samples was built. All equipment is controlled by: software written in Python 3 that runs on a computer, and two Atmel 328P microcontrollers programmed in C language. The software is responsible for displaced the microsyringe on cartesian axes that are driven by motors. The objective is to manipulate the stepper motors to correctly move the microsyringe to the desired position of the vials and reactors, to perform the functions of pipetting/pouring the desired volume. The software is also responsible for the functioning of the reaction block: heating and agitation systems. An unbalanced shaft motor is responsible for shaking the block (2965 rpm). The equipment is composed of: A) a reaction block (contains 7 reactors) with temperature control (thermally insulated by Styrofoam plates) and agitation; B) a microsyringe, and C) racks for placing reagent and waste vials. Validation methodologies were used for the temperature of the block (maximum temperature 84.9 ± 0.54 °C) and for the volume of the microsyringe (maximum volume 159.0 ± 0.34 µL), and the results of the coefficients of determination were: $R^2_{\text{TEMPERATURE}} = 0.9994$ and $R^2_{\text{VOLUME}} = 0.9999$. The sample preparation equipment developed was used for the preparation of calibration curves of solutions and of derivatization reactions followed by chromatographic analysis: 1) Standard steroid solutions ($30.0 - 180.0$ mg L⁻¹): $0.9925 < R^2 < 0.9944$ – GC; 2) Diclofenac sodium standard solution ($25.0 - 125.0$ mg L⁻¹): $R^2 = 0.9995$ – HPLC; 3) Curves with amino acid standards derivatized ($10.0 - 35.0$ mg L⁻¹) with propyl chloroformate: $0.9678 < R^2 < 0.9995$ – GC. All the results of the linearity curves of the chromatographic analyzes were evaluated by statistical tests of normality and homoscedasticity. The versatility of this automatic sampler surpasses the applications developed in this work, because it performs functions that are responsible for the main parameters of process optimization studies. Achieving greater repeatability/accuracy of results.

Keywords: Automation; Arduino; chromatography; derivatization; amino acids.

Lista de figuras

FIGURA 1: ESQUEMA DE DERIVATIZAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM MEIO AQUOSO-ÁLCOOL- PIRIDINA ($H_2O/R_2OH/Py$) USANDO REAGENTE E ÁLCOOL COM DIFERENTE CADEIA ALQUIL.	19
FIGURA 2: TEMPO MÉDIO GASTO EM ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS TÍPICAS.	20
FIGURA 3: FONTES DE ERROS GERADAS DURANTE A ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.	21
FIGURA 4: ILUSTRAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE INSTRUMENTOS AUTOMATIZADOS MAIS UTILIZADOS NA ATUALIDADE.	22
FIGURA 5: ESQUEMA DE DIFERENTES FORMAS DE INTEGRAÇÃO ENTRE O PREPARO DE AMOSTRA E A SEPARAÇÃO ANALÍTICA.	23
FIGURA 6: AVANÇO DO USO DE MICROCONTROLADORES ARDUÍNO NA ÁREA DA QUÍMICA NA ÚLTIMA DÉCADA.	25
FIGURA 7: DESENHO DO PROTÓTIPO DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO.	35
FIGURA 8: ILUSTRAÇÃO 3D DO SUPORTE VERTICAL E DO SISTEMA DE MOVIMENTO DO EIXO HORIZONTAL DO PROTÓTIPO. DESENHO REALIZADO USANDO O APLICATIVO THINKERCAD. (HTTPS://WWW.TINKERCAD.COM/)	36
FIGURA 9: IMAGEM DO SISTEMA VOLUMÉTRICO DA MICROSERINGA – EIXO V.	37
FIGURA 10: FRAGMENTO DA FIGURA 7 MOSTRANDO APENAS A PARTE DOS FRASCOS.	38
FIGURA 11: ILUSTRAÇÃO BIDIMENSIONAL DO BLOCO REACIONAL DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO COM CORTE SUPERIOR: REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE AQUECIMENTO E AGITAÇÃO.	39
FIGURA 12: PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO.	41
FIGURA 13: IMAGEM DA TELA PRINCIPAL DO PROGRAMA DE CONTROLE DO SISTEMA DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO.	44
FIGURA 14: IMAGEM DO PROGRAMA, OPÇÃO 1: CONEXÃO DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO AO COMPUTADOR.	45
FIGURA 15: IMAGEM DO PROGRAMA, OPÇÃO 2: CARREGAMENTO DO ARQUIVO DO TESTE QUE SERÁ EXECUTADO PELO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO.	45
FIGURA 16: IMAGEM DO PROGRAMA, OPÇÃO 3: VISUALIZAÇÃO DO PASSO A PASSO DO ARQUIVO CARREGADO NA OPÇÃO 2.	46

FIGURA 17: ILUSTRAÇÃO BIDIMENSIONAL DO BLOCO REACIONAL DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO COM CORTE FRONTAL: REPRESENTAÇÃO DOS ORIFÍCIOS QUE TIVERAM AS TEMPERATURAS AFERIDAS COM UM TERMÔMETRO DE MERCÚRIO.	49
FIGURA 18: CURVA DE AFERIÇÃO DA TEMPERATURA DO BLOCO REACIONAL OBTIDA A PARTIR DOS DADOS DA TEMPERATURA INDICADA PELO SOFTWARE VERSUS A TEMPERATURA AFERIDA EXPERIMENTALMENTE.	49
FIGURA 19: CURVA QUE CORRELACIONA O VOLUME INDICADO PELO <i>SOFTWARE</i> COM O VOLUME AFERIDO DA MICROSERINGA, APÓS A CORREÇÃO NO <i>SOFTWARE</i>	55
FIGURA 20: ILUSTRAÇÃO DO EXTRATO (SOLVENTE ORGÂNICO MAIS DENSO QUE A MATRIZ) SENDO COLETADO NO FUNDO DO REATOR E SENDO SEPARADO PARA ANÁLISE - GC/MS.	59
FIGURA 21: CROMATOGRAMA OBTIDO NO MODO <i>SIM</i> DOS CINCO AMINOÁCIDOS, CADA UM NA CONCENTRAÇÃO DE 20 MG L ⁻¹ : 1 – VALINA, 2 – METIONINA, 3 – ÁCIDO GLUTÂMICO, 4 – LISINA, 5 – TRIPTOFANO E PI – PADRÃO INTERNO/NORVALINA.	63
FIGURA 22: CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS DETERMINADOS POR GC/MS QUE SE ADEQUARAM À REGRESSÃO LINEAR PELO MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PONDERADOS.	81

Lista de tabelas

TABELA 1: RELAÇÃO ENTRE A TEMPERATURA (°C) AFERIDA DO BLOCO REACIONAL COM A TEMPERATURA (°C) INDICADA PELO <i>SOFTWARE</i>	52
TABELA 2: RELAÇÃO ENTRE VOLUMES DA MICROSERINGA DETERMINADO A 20 °C.	54
TABELA 3: RESULTADOS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE SOLUÇÕES PREPARADAS NO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO.	57
TABELA 4: COMPARAÇÃO DO EFEITO DE SAIS NO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS DERIVATIZADOS – VALOR DA ÁREA DO CROMATOGRAMA	60
TABELA 5: COMPARAÇÃO ENTRE O TEMPO DE EXTRAÇÃO NO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS DERIVATIZADOS – VALOR DA RAZÃO ÁREA ANALITO/PADRÃO INTERNO DO CROMATOGRAMA.....	61
TABELA 6: TEMPOS DE RETENÇÃO CROMATOGRÁFICA E RAZÕES <i>M/Z</i> DOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS ANALISADOS POR GC/MS.....	62
TABELA 7: FAIXAS LINEARES, EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS.....	64

Lista de quadros

QUADRO 1: RELAÇÃO ENTRE OS COMANDOS DO <i>SOFTWARE</i> E A EXECUÇÃO DAS FUNÇÕES.	43
QUADRO 2: MODO DE CONSTRUÇÃO DO ARQUIVO PARA EXECUÇÃO DAS FUNÇÕES DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO.	47
QUADRO 3: COMPARATIVO DE SOLVENTES DE ACORDO A DENSIDADE.	59

Lista de abreviaturas

AA	Aminoácidos
CE	Capillary Electrophoresis (Electroforese capilar)
CFA	<i>Continuos Flow Analysis</i> (Análise de Fluxo Contínuo)
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> (Análise de Injeção em Fluxo)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia a Gás)
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografia a Gás – Espectrometria de Massas)
Glu	<i>Glutamic Acid</i> (Ácido Glutâmico)
HPLC	<i>High Perfomance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado)
Lys	<i>Lysine</i> (Lisina)
Met	<i>Methionine</i> (Metionina)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Nuclear Magnética)
OIML	<i>Organisation Internationale de Métrologie Légale</i> (Organização Internacional de Metrologia Legal)
PI	Padrão Interno
PWM	<i>Pulse Width Modulation</i> (Modulação de Largura de Pulso)
SIA	<i>Sequential Injection Analysis</i> (Análise de Injeção Sequencial)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i> (Microextração em Fase Sólida)
Trp	<i>Tryptophane</i> (Triptofano)
USB	<i>Universal Serial Bus</i> (Barramento Serial Universal)
Val	<i>Valine</i> (Valina)

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	13
1.1. METABOLÔMICA.....	14
1.2. CROMATOGRAFIA GASOSA APLICADA À METABOLÔMICA.....	16
1.3. CROMATOGRAFIA GASOSA.....	17
1.4. DERIVATIZAÇÃO.....	18
1.5. PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	19
1.6. AUTOMAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA	21
1.7. AMOSTRADOR AUTOMÁTICO.....	24
1.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	25
1.8.1. Seletividade.....	26
1.8.2. Precisão	26
1.9. METODOLOGIA PARA CORREÇÃO: DA TEMPERATURA DO BLOCO REACIONAL E DO VOLUME DA MICROSERINGA DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO	26
2 – OBJETIVOS.....	28
3 – PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1. MATERIAIS	28
3.1.1. Materiais – Preparador amostral	28
3.1.2. Dispositivos elétricos e eletrônicos – Preparador amostral.....	28
3.2. SUPRIMENTOS, EQUIPAMENTOS E SOFTWARES.....	29
3.3. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES	29
3.3.1. Reagentes, soluções, gases – análise de aminoácidos.....	29
3.3.2. Preparo da solução padrão de aminoácidos	30
3.3.3. Preparo das soluções padrão de esteroides	31
3.3.4. Preparo das soluções padrão de diclofenaco de sódio	31
3.4. DERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS	31
3.5. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	33
3.5.1. Curvas de calibração das soluções padrão dos esteroides e do diclofenaco de sódio.	33
3.5.2. Análise cromatográfica dos aminoácidos derivatizados	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

4.1. CONSTRUÇÃO E FUNCIONAMENTO DO PREPARADOR AMOSTRAL	34
4.1.1. Montagem do protótipo - Hardware.....	35
4.1.2. Montagem do protótipo - Software	41
4.2. MODO OPERACIONAL DO PREPARADOR AMOSTRAL AUTOMÁTICO	43
4.3. TESTES INICIAIS DE FUNCIONAMENTO DO PREPARADOR AMOSTRAL	48
4.3.1. Aferição do agitador	48
4.3.2. Ajuste do volume pipetado	48
4.3.3. Correção da temperatura do bloco reacional	48
4.3.4. Correção do volume da microseringa.....	53
4.3.5. Teste do sistema mecânico e volumétrico do preparador amostral automático.....	56
4.4. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO	57
4.4.1. Escolha dos parâmetros de extração dos aminoácidos derivatizados	57
4.4.2. Determinação da temperatura de derivatização e extração dos aminoácidos	61
4.4.3. Análise da validação dos métodos cromatográficos.....	62
5 – CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO I.....	71
ANEXO II.....	74
ANEXO III.....	81

1 – Introdução

A terceira revolução industrial é marcada pelo uso da eletrônica e tecnologia da informação para automatizar a produção. E logo após, veio a quarta revolução industrial, a revolução digital, que vem ocorrendo desde meados do século XX. Caracterizam-se por uma fusão de tecnologias nas esferas física, digital e biológica. Essas revoluções, técnica-científica-informacional, trouxeram descobertas e evoluções no campo tecnológico e está associada à informática, robótica, química, biotecnologia, dentre outros (SCHWAB, 2016). A tecnologia aplicada aos conhecimentos multidisciplinares trouxe melhorias nos setores produtivo e analítico das indústrias químicas. Para os químicos, foi revolucionário a construção de instrumentos complexos e sensíveis, para a análise e descobertas de substâncias (CURTIUS, 1982).

A necessidade de resultados rápidos e confiáveis na indústria tornou a instrumentação de laboratório bem dinâmica. Por isso, os pesquisadores instrumentistas dão uma resposta rápida às demandas de automação, permitindo medições em níveis inferiores e maior facilidade na detecção de qualquer erro que possa apresentar em um produto ou processo (INTEREMPRESAS, 2010). Mesmo com tanta tecnologia disponível, os institutos de pesquisas públicos brasileiros sofrem defasagem de instrumentação devido à falta de fomento . Os altos custos dos equipamentos e o baixo investimento que é repassado a essas instituições retardam o desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro, quando comparado com países que incentivam e investem na ciência. (ARNAUD, 2017; MORENO, 2021; PIRES, 2020)

Contrariando as estatísticas de investimento, nos laboratórios de ensino é possível desenvolver instrumentação baseada em microcontroladores de baixo custo, como a plataforma Arduino. A microeletrônica de código aberto com o uso da programação, possibilitam a construção de instrumentos automatizados. Os protótipos instrumentais no campo da Química Analítica incluem fotômetros, dispositivos de medição, buretas e seringas automatizadas, dentre outros. (GRINIAS *et al*, 2016; KUBÍNOVÁ *et al*, 2015)

Protótipos para o preparo de amostras são promissores, porque a preparação de amostras é a parte mais desafiadora de todo procedimento analítico (MAJORS, 2013). Combinações de várias técnicas de preparo amostral são normalmente utilizadas para o tratamento. O foco na miniaturização e automatização são estratégias modernas para desenvolver um amostrador que realiza, simultaneamente, técnicas de diluição, ajuste de pH, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, filtração, evaporação, dentre outras. (DAVIS, 2021; GRINIAS *et al*, 2016; KUBÍNOVÁ *et al*, 2015; MEDINA, 2018; RAYNIE, 2016).

O tempo e o custo de preparo de amostra são essenciais, e alguns tipos de substâncias, como compostos ômicos, são mais complexos para o tratamento. As ciências ômicas analisam as mutações genéticas, genes, proteínas e metabólitos e, a maioria dos compostos alvos são polares. As substâncias polares são, muitas vezes, inviáveis de serem analisadas por cromatografia gasosa e já existem várias técnicas modernas de tratamento. Modificar os analitos por reações de derivatização é uma delas. O principal objetivo da derivatização é diminuir a polaridade da molécula para que ela possa ser analisada em cromatógrafo a gás. (MOLDOVEANU; DAVID, 2021).

A construção de um equipamento automático para preparar amostras é o objetivo deste trabalho. O protótipo é constituído por seringa e sistemas de aquecimento e agitação, com o uso de um microcontrolador Arduíno, utilizando microeletrônica de código aberto (*open-source*) e programação. A aplicabilidade do preparador amostral foi testada pelo estudo de aminoácidos derivatizados que são analisados por cromatografia gasosa.

1.1. Metabolômica

Os aminoácidos são os principais blocos de construção de qualquer célula e estão envolvidos em várias vias metabólicas, logo, a análise do perfil metabólico de aminoácidos é alvo de várias pesquisas que são realizadas há várias décadas. Apesar de existirem vários métodos que são comercializáveis, ainda assim, busca-se aperfeiçoar a qualidade e tempo de análise, robustez, sensibilidade, reprodutibilidade e custos. (KASPAR *et al.*, 2009)

Os metabólitos são biomarcadores que auxiliam no diagnóstico precoce de várias doenças, já que os estudos são voltados para o funcionamento celular e

alterações biológicas, portanto, esses estudos se enquadram no ramo da metabolômica (CANUTO *et al.*, 2018; DONG *et al.*, 2012; KHUHAWAR; MAJIDANO, 2011). O conceito de Metabolômica envolve as análises quantitativa e qualitativa do conjunto de metabólitos de baixa massa molar presentes nas células ou fluidos biológicos de um organismo sob condições fisiológicas (DUNN e ELLIS, 2005). Os estudos dos sistemas metabólicos e a descoberta de biomarcadores, proporcionam a compreensão mais profunda dos mecanismos de desenvolvimento de doenças como o câncer e da toxicidade de agentes químicos, que são métodos potenciais para melhorar a detecção precoce de doenças e o monitoramento terapêutico, bem como aplicações em ciências ambientais, nutrição e outros campos relacionados ao estudo do metabolismo (FEI *et al.*, 2019).

Os aminoácidos são compostos que contêm os grupos funcionais amino e carboxila e estão presentes em grande quantidade nas células e organismos vivos, pois são as unidades básicas dos peptídeos, dos polipeptídeos e das proteínas. Sabe-se que mais de 500 aminoácidos de ocorrência natural foram identificados pelo homem e que muitos deles são metabólitos importantes no campo da pesquisa científica. Porque o metabolismo é um processo essencial das células vivas e as suas variações metabólicas podem ser geradas por diversos fatores, por isso são alvos de estudos (BIANCHI *et al.*, 2019). Partindo desses princípios, um organismo modelo interessante é a levedura da espécie *S. cerevisiae*, cuja importância se relaciona aos estudos de câncer, pois suas células têm metabolismo similar ao de células tumorais e suas proteínas conservam as mesmas funções e sequências de aminoácidos de proteínas humanas (BATISTA *et al.*, 2020; DETTMER *et al.*, 2012). As leveduras são organismos amplamente estudados desde a década 1960 e, a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais explorada comercialmente, além de ser amplamente utilizada em pesquisas por conter ácidos nucleicos, elementos minerais, ácidos graxos, aminoácidos (CABALLERO-CÓRDOBA *et al.*, 1997).

Os aminoácidos são compostos polares e possuem baixa volatilidade, portanto, é viável que eles sejam derivatizados para que sejam compatíveis com a técnica cromatográfica a gás. Essa técnica de separação/identificação, analisa compostos voláteis e termicamente estáveis. A etapa de derivatização (modificação química da estrutura de uma molécula) torna a metodologia mais complexa, portanto, grande alvo de estudos. Hannelore Kaspar *et al.* (2009) relaciona de forma bem concisa em seu

artigo vários trabalhos que comparam os métodos analíticos com os respectivos derivatizantes nos equipamentos utilizados com o objetivo de obter a metodologia mais eficiente. Dentre esses equipamentos de análises instrumentais estão: cromatografia líquida acoplado com detecção óptica ou com espectrometria de massas (*High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry* – HPLC-MS), cromatografia gasosa com espectrometria de massas (*Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry* – GC-MS), eletroforese capilar com detecção por espectrometria de massas (*Capillary Electrophoresis with Mass Spectrometry detection* – CE-MS), infusão direta MS-MS *tandem* (*Tandem Mass Spectrometry*) e NMR (*Nuclear Magnetic Resonance* – Ressonância Nuclear Magnética). Destaca-se a reação de aminoácido derivatizado com alquil cloroformato seguida de quantificação por GC-MS, que é um método robusto, de alta reprodutibilidade, boa resolução, separação rápida e, apresenta um dos mais baixos limites de quantificação e de detecção em relação a outras técnicas analíticas (KRITIKOS *et al.*, 2015; MINK *et al.*, 2013).

1.2. Cromatografia gasosa aplicada à metabolômica

Por décadas, os aminoácidos são os principais alvos do perfil metabólico e suas análises antigamente eram realizadas, basicamente, por cromatografia líquida de troca catiônica ou de fase reversa acoplada à absorvância ultravioleta ou por detecção de fluorescência de aminoácidos pré-coluna ou pós-coluna derivatizados. Todavia, houve progresso no desenvolvimento da espectrometria de massas hifenizada na análise de aminoácidos livres em fluídos fisiológicos, porque a espectrometria de massas não apenas corresponde à detecção óptica na sensibilidade, mas também oferece uma seletividade superior. Porém, ainda há espaço para melhorias adicionais, incluindo expansão do escopo de analitos, redução do tempo de preparação e análise das amostras, automação e síntese de padrões isotópicos acessíveis. (BATISTA *et al.*, 2020; KASPAR *et al.*, 2009)

A cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massas é um dos principais métodos utilizados na análise de aminoácidos na atualidade, devido às várias vantagens desse método cromatográfico. Uma dessas vantagens sobre o uso da técnica de HPLC, é que essa pode conter matrizes complexas e apresentar perdas

significativas da seletividade e detectabilidade de aminoácidos. Nesse sentido, a técnica de GC apresenta uma resolução significativamente superior à HPLC dependendo do derivatizante utilizado na análise de aminoácidos. (DONADEL, 2015)

1.3. Cromatografia gasosa

A técnica de cromatografia gasosa (GC) consiste na separação de gases e/ou de substâncias voláteis. A separação dos analitos de uma amostra ocorre por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra, através de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas adequadas no injetor e no caminho até a coluna possibilita a vaporização destas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos bem característicos chegando à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dessas substâncias. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997)

A principal vantagem dessa técnica é o seu excelente poder de resolução (resultado de um cromatograma de uma boa eficiência e boa seletividade), tornando possível, a análise de dezenas de substâncias numa mesma amostra. Outro fator é a sensibilidade (mudança na resposta do detector em função da quantidade detectada) ser bem acentuada, chegando a detectar concentrações que variam de picogramas a miligramas, ou seja, há necessidade de apenas pequenas quantidades do analito, que em certos casos é um fator crítico e que limita a utilização de outras técnicas. Por outro lado, a cromatografia gasosa apresenta alguns inconvenientes. Ela pode ser empregada na análise de substâncias voláteis e estáveis termicamente, caso contrário há a necessidade de se formar um derivado com essas características, o que nem sempre é viável. Outra desvantagem é a longa e complexa etapa de preparo de amostras, que aumenta o tempo e custo da análise, pois a maioria das análises requer esta etapa para eliminar interferentes e contaminantes da coluna cromatográfica (fase sólida). (ADAIME , 2013; COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2018)

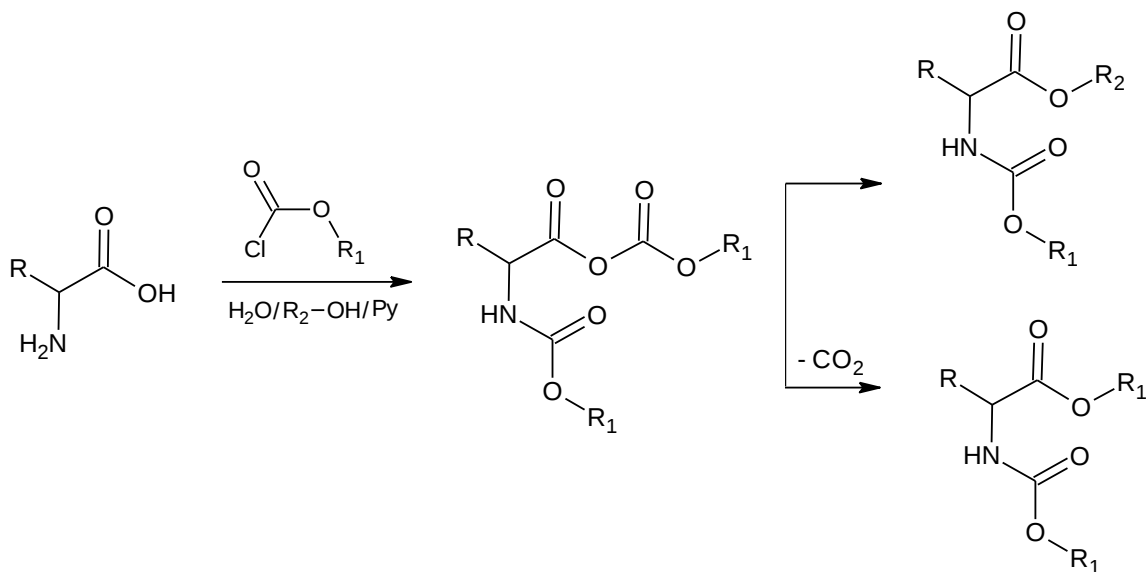
1.4. Derivatização

Os aminoácidos são substâncias quirais (exceto a glicina, no qual o grupo lateral é hidrogênio) e são polares devido à presença de grupos amino e carboxila. O carbono central está ligado a quatro substituintes: um átomo de hidrogênio, ao grupo carboxila ($-\text{COOH}$), ao grupo amino ($-\text{NH}_3$) e ao grupo lateral ($-\text{R}$). O grupo lateral vai diferenciar as propriedades físico-químicas de cada aminoácido. Portanto, a análise das moléculas de aminoácidos por cromatografia gasosa (GC) requer pelo menos uma etapa de derivatização para torná-las apolares, para serem solúveis em solventes orgânicos apolares e compatíveis com a técnica. O objetivo da derivatização é obter moléculas voláteis e termicamente estáveis para as condições adequadas da técnica GC. (BASKAL; BOLLENBACH; TSIKAS, 2021)

O procedimento de derivatização mais empregado é a sililação, em que um hidrogênio ativo é substituído por um grupo alquilsilil ou trimetilsilil, usando *N,O*-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) ou *N*-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). A análise por GC dos aminoácidos sililados é viável, mas nem todos os derivados são estáveis; por exemplo, a arginina se decompõe em rearranjos de ornitina e ácido glutâmico para formar ácido piroglutâmico. Além disso, reagentes e derivados são sensíveis à umidade. Alternativamente à sililação incluem a acilação/esterificação usando várias combinações de anidrido/álcool, como anidrido de pentafluoropropil e isopropanol, ou alquilação indireta via cloroformatos na presença de álcool e piridina/picolina. (DETTMER *et al.*, 2012; KASPAR *et al.*, 2009; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2003)

Utilizando-se o derivatizante alquil cloroformato, os grupos carboxila, dos aminoácidos, são convertidos diretamente em ésteres e os grupos amino em carbamatos, conforme ilustrado pela reação da FIGURA 1 (HUŠEK, 2005):

FIGURA 1: Esquema de derivatização de aminoácidos em meio aquoso-álcool-piridina ($\text{H}_2\text{O}/\text{R}_2\text{OH}/\text{Py}$) usando reagente e álcool com diferente cadeia alquil.



Fonte: (HUŠEK, 2005)

A vantagem da reação com cloroformato de alquila é que os aminoácidos livres podem ser derivatizados diretamente em solução aquosa sem remoção prévia de proteínas. Os aminoácidos reagem muito rapidamente e os derivados podem ser extraídos com um solvente orgânico. Uma alíquota do extrato pode ser injetada diretamente no GC-MS (HUŠEK, 1998; WELLS, 1999).

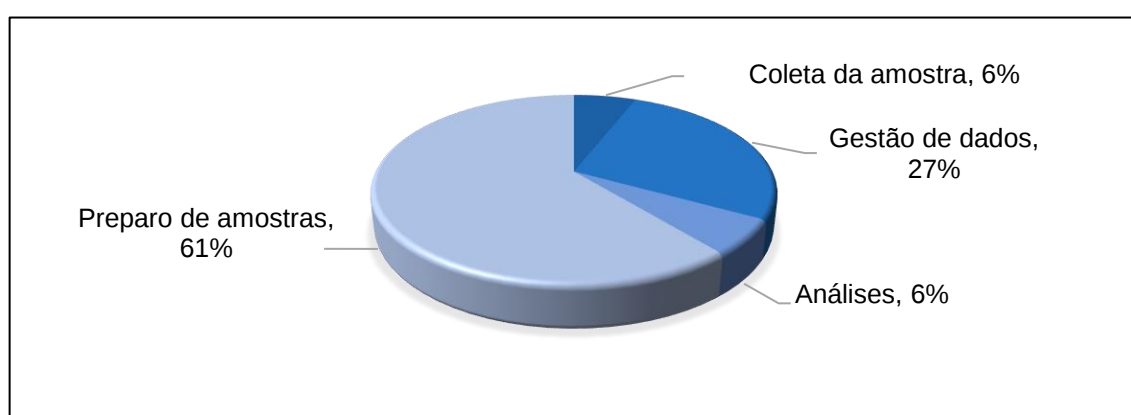
1.5. Preparo de amostra para análise cromatográfica

A preparação da amostra é uma parte essencial das análises cromatográficas e espectrométricas. O processo se destina a fornecer uma solução representativa, reprodutível e homogênea que seja adequada para injeção na coluna para análise cromatográfica. O objetivo da preparação da amostra é fornecer uma alíquota de amostra que (a) seja relativamente livre de interferências, (b) não danifique a coluna ou o instrumento, (c) seja compatível com o método analítico pretendido e (d) diminua os limites de detecção e quantificação. Na cromatografia, o solvente da amostra deve se dissolver na fase móvel da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou ser injetável em uma coluna de cromatografia a gás (GC) sem afetar a retenção ou resolução da amostra, a própria fase estacionária e sem interferir na detecção. É ainda

desejável concentrar os analitos e/ou derivatizá-los para uma melhor detecção ou separação. (MAJORS, 2013)

GC e HPLC são técnicas analíticas predominantemente automatizados, mas o pré-tratamento da amostra geralmente é realizado manualmente. Como resultado, o pré-tratamento da amostra pode exigir mais tempo para o desenvolvimento do método e análise de rotina do que o necessário para a separação e análise de dados (FIGURA 2).

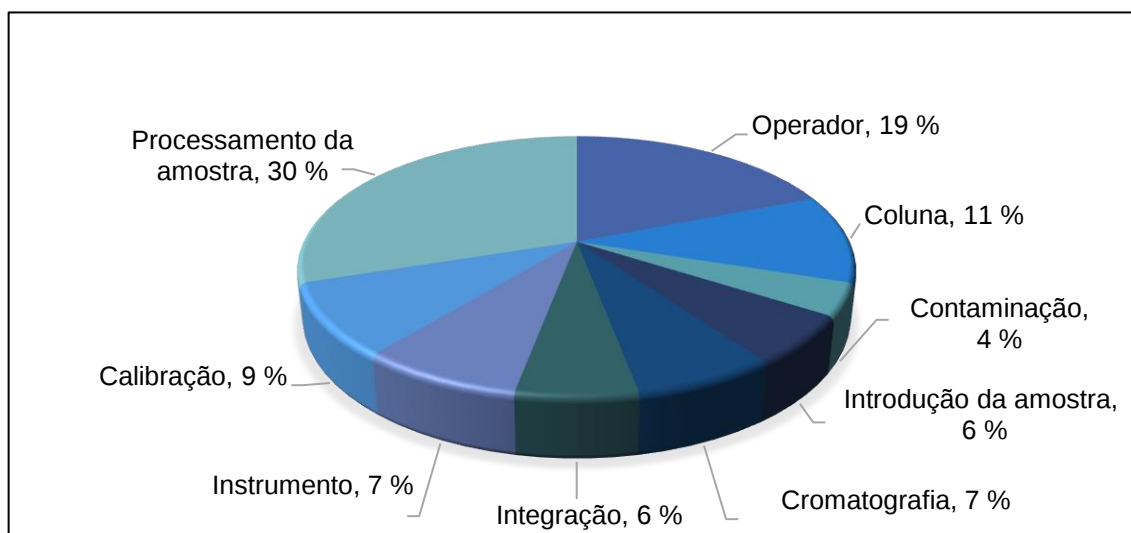
FIGURA 2: Tempo médio gasto em análises cromatográficas típicas.



Fonte: Enquete da Agilent Technologies (MAJORS, 2013)

O pré-tratamento da amostra pode incluir muitas metodologias e precisar de várias etapas operacionais, podendo se tornar uma etapa desafiadora do desenvolvimento do método cromatográfico. A precisão do método é frequentemente determinado na fase de tratamento amostral. Portanto, o desenvolvimento de um procedimento de pré-tratamento de amostra necessita de um planejamento cuidadoso e antecipado.

De acordo a FIGURA 3, observa-se que 49% da fonte de erros do método de análises cromatográficas são provenientes do operador e do processamento de amostras. Uma das formas de minimizar esses erros é desenvolver instrumentos laboratoriais automatizados que possam substituir tanto a etapa de preparo de amostra quanto a etapa do operador.

FIGURA 3: Fontes de erros geradas durante a análise cromatográfica.

Fonte: Enquete da Agilent Technologies (MAJORS, 2013).

1.6. Automação em química analítica

O avanço tecnológico da automatização e robotização de instrumentos na Química é uma integração complexa de robótica, computadores, manuseio de reagentes, dentre outras tecnologias. O primeiro procedimento automatizado na área da química analítica, publicado em 1875 nos Estados Unidos, foi de um dispositivo para lavar filtrados sem supervisão. O sistema foi projetado para que um gotejamento constante lavasse o material retido no filtro (STEVENS, 1875). Os objetivos que cercam a automatização instrumental laboratorial, praticamente não foram alterados ao longo do tempo. Almeja-se economizar tempo e melhorar o desempenho dos processos por meio da eliminação de erros humanos (OLSEN, 2012).

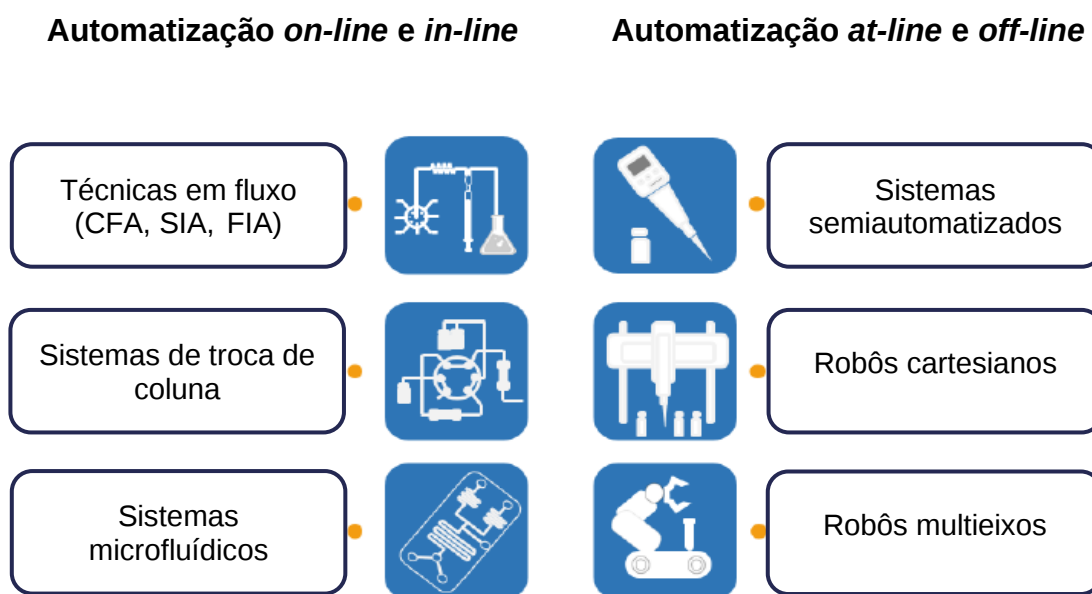
Laboratórios industriais com processos automatizados são recorrentes nas áreas de tecnologias químicas, biológicas, farmacêuticas, alimentares e medicinais. A automação apresenta vantagens de substituir humanos por robôs em tarefas perigosas, exaustivas e rotineiras, bem como otimizar procedimentos para obtenção de maior rendimento, qualidade ou previsibilidade da qualidade, robustez de processos, consistência da produção, redução de custos e despesas. Todavia, ela também apresenta desvantagens e limitações: a principal desvantagem está relacionada aos altos custos de pesquisa e desenvolvimento. As limitações podem

estar relacionadas com o tipo de tecnologia disponível, para os processos de maior complexidade. Além disso, as máquinas apresentam habilidades limitadas, porque executam etapas de processos pré-programadas. (EBUBEKIR; NURINNISA; NURCAN, 2017; HOLLAND; DAVIES, 2020)

Em níveis mais avançados, robôs podem ser programados para executarem etapas de tratamento e de preparo de amostra, injetando diretamente o extrato no instrumento analítico, substituindo o serviço humano. Nos laboratórios industriais e de pesquisa, as técnicas automatizadas de análise mais atuais são de: sistemas em fluxo, sistemas microfluídicos, sistemas de sínteses de compostos orgânicos, sistemas de placas de multipoços, analisadores centrífugos e as diferentes versões de extração em fase sólida *on-line*. (BARRETO *et al*, 2018; MEDINA, 2018, MEHR, 2020; XIE *et al*, 2021).

A FIGURA 4 apresenta, através de uma ilustração, um resumo dos principais instrumentos automatizados na área da química analítica.

FIGURA 4: Ilustração dos diferentes tipos de instrumentos automatizados mais utilizados na atualidade.

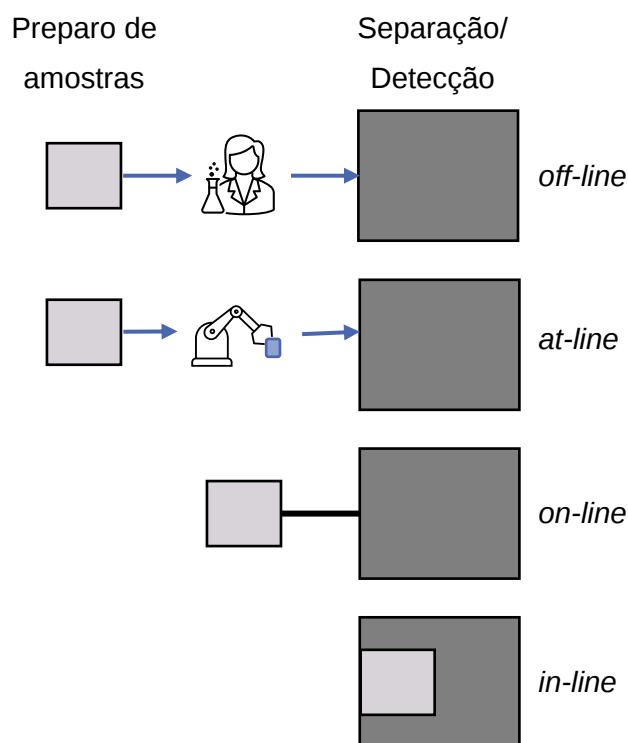


Fonte: (MEDINA, 2018).

Um sistema analítico é chamado *on-line* (integrado ou hifenado) quando o extrato ou efluente da preparação da amostra é transferido, sem intervenção do analista, para o sistema de separação. O sistema é definido *in-line*, quando a parte

final do tratamento da amostra é efetuada no instrumento utilizado. As análises *on-line* e *in-line* diferem essencialmente dos métodos *off-line* e *at-line* porque o tempo em que as informações sobre as propriedades do processo são obtidas, são menores do que o tempo em que essas propriedades mudam. Isso significa que as análises *on-line* e *in-line* permitem o controle contínuo do processo. Se o extrato ou efluente é transferido para o instrumento utilizado na determinação final com o uso de sistema mecânico ou robótico, diz-se que o sistema é *at-line*, e, se o extrato é transferido para o instrumento analítico pelo analista, o processo não é integrado, portanto, o sistema é definido como *off-line*. Ou seja, as análises *off-line* e *at-line*, são caracterizadas por amostragem manual seguida de preparação, medição e avaliação descontínuas da amostra. As propriedades do material podem mudar durante o tempo entre a amostragem e a disponibilidade dos resultados, portanto, o controle direto do processo não é possível. A FIGURA 5 ilustra a diferença entre os termos mencionados acima (NAMIESNIK, 2011)

FIGURA 5: Esquema de diferentes formas de integração entre o preparo de amostra e a separação analítica.



FONTE: Figura adaptada (SILVA, 2017).

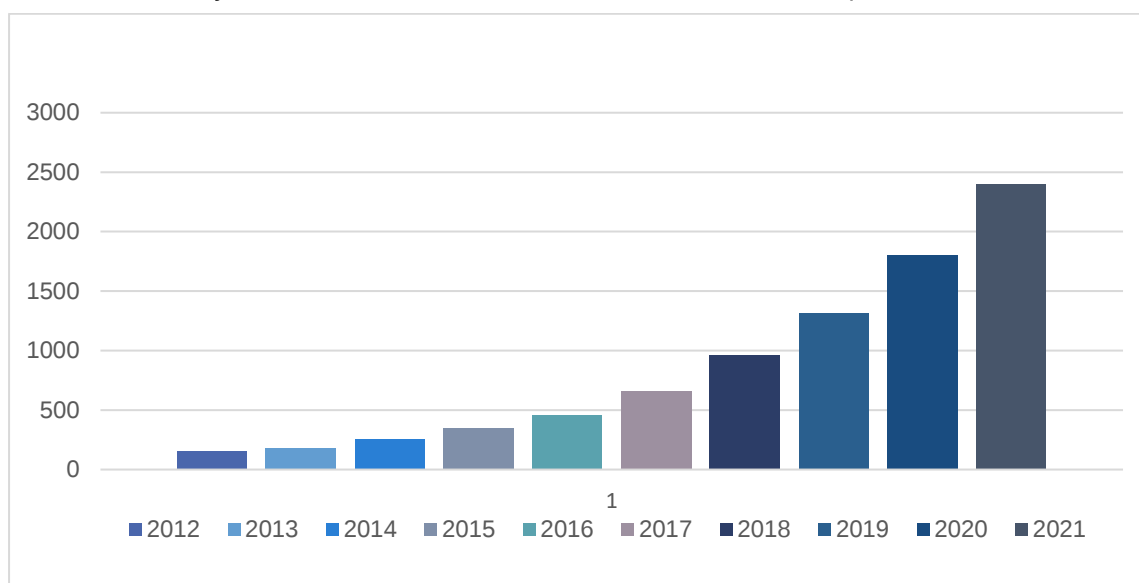
1.7. Amostrador automático

Amostradores automáticos (*autosamplers*) são os tipos de dispositivos mais utilizados na área da química analítica. Eles realizam movimentos lineares nos três eixos coordenados. Os injetores automáticos de cromatógrafos e espectrômetros de massas são os dispositivos mais utilizados. Dispositivos para extrair analitos utilizando fibras de microextração em fase sólida, também possuem os mesmos tipos de movimento. (BARRETO, 2018; KASPAR *et al*, 2008; MEDINA, 2018).

Dispositivos de código G fornecem movimentos lineares a equipamentos como impressoras 3D, gravadores a laser e roteadores de controle numérico computacional. O código G trouxe a padronização para o processo de fabricação e o desenvolvimento da indústria passou a ter uma linguagem universal. Isso inspirou o desenvolvimento de dispositivos para fins científicos de laboratório personalizado e de baixo custo. Alguns exemplos incluem dispositivos para síntese química, manipulação de líquidos e gases, fabricação de tecidos biológicos (CARVALHO; MURRAY, 2018; MEHR *et al*, 2020; THOMPSON *et al*, 2011).

Os microcontroladores são dispositivos de baixo custo e através dele é possível criar protótipos automatizados, relativamente rápidos e fáceis, devido à sua facilidade de uso e ampla faixa de aplicação. Um microcontrolador contém um processador de acesso à memória e periféricos de entrada/saída. É comprovada sua eficiência para pequenos protótipos que necessitam de baixa velocidade de processamento e pouca memória (EL *et al.*, 2013; GRINIAS *et al*, 2016; KUBÍNOVÁ *et al*, 2015). Existem várias marcas no mercado de microcontroladores como Atmel, Microchip Technology, ST Microelectronics, mas optou-se por trabalhar com microcontroladores Arduíno (Atmel), devido à sua grande aplicação em projetos de pesquisa na área de química analítica.

A FIGURA 6 é um levantamento estatístico, realizado na *Web of Science*, com a palavra “Arduíno” na área da química, revela um avanço exponencial desses microcontroladores utilizados para construção de protótipos na última década.

FIGURA 6: Avanço do uso de microcontroladores Arduino na área da química na última década.

1.8. Validação de métodos cromatográficos

A mensuração/avaliação de alguns parâmetros analíticos deve ser baseada pela qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos. Informações gerais sobre as características de desempenho são avaliadas rotineiramente durante a validação do método para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

Alguns dos parâmetros de desempenho são: seletividade, sensibilidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão e exatidão, robustez; com o propósito de assegurar a qualidade dos resultados da determinação de qualquer analito. Visando avaliar o funcionamento do protótipo, apenas os parâmetros de mérito seletividade e acurácia foram checados. A inviabilidade de avaliar outros parâmetros importantes foi devido ao tempo disposto para desenvolver a pesquisa, causado pelo uso restrito dos laboratórios durante a pandemia mundial da COVID-19 em 2020 e 2021.

(DOQ-CGCRE-008, 2016; Eurachem Guide, 2014)

1.8.1. Seletividade

A seletividade analítica é um parâmetro utilizado para determinar analitos específicos em misturas ou matrizes sem interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Dessa forma, a seletividade é um importante parâmetro para a determinação inequívoca e exata de qualquer analito presente em matrizes complexas.

1.8.2. Precisão

A precisão pode ser definida como: “concordância de similaridade entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições estipuladas”. A precisão de um conjunto de resultados de medições é quantificada como o desvio padrão obtido a partir de medições repetidas de uma amostra que é representativa em termos da concentração da matriz e do analito.

Os três requerimentos para o cálculo do desvio padrão: distribuição normal, não ter *outliers*, e não apresentar tendências. Geralmente a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD), também chamado de coeficiente de variação (CV), calculado a partir dos resultados obtidos pela execução de medições repetidas da amostra analisadas e sob condições específicas.

$$\text{RSD (\%)} = \text{CV (\%)} = (S / x_m) \times 100$$

Onde:

S é o desvio padrão das medições da replicata

x_m é a média das medições em replicata

1.9. Metodologia para correção: da temperatura do bloco reacional e do volume da microseringa do preparador amostral automático

A exatidão e precisão de um determinado dado medido estarão limitados à sofisticação do equipamento utilizado, ao operador, aos princípios físicos básicos do instrumento e do fenômeno que gerou o experimento e, o conhecimento que se tem

sobre o valor da grandeza física. Ou seja, o instrumento deve ser coerente com o experimento que se realiza. Diante disso, deve-se considerar a faixa dos valores reais possíveis e recorrer à estatística para auxiliar no processamento e no entendimento do conjunto de dados medidos. Nesse contexto, utiliza-se os termos de desvio, incerteza e/ou erro para expressar a variação do valor medido, e deseja-se que o valor esteja dentro da variação estatisticamente aceita.

Para o processo de correção da temperatura do bloco reacional, necessita-se comparar os resultados obtidos através de uma curva de aferição entre os valores da temperatura indicada, T_0 , pelo software do amostrador automático e os valores de temperatura aferida T_i , aferida com o auxílio de um termômetro. A partir da análise dos resultados, é possível corrigir a T_0 para equivaler à T_i .

Para a correção volumétrica da microseringa de vidro foi necessário realizar a validação pelo método gravimétrico. A gravimetria é a determinação da massa de água escoada ou contida no recipiente a calibrar na qual se realizam duas pesagens do recipiente cheio e outra com o recipiente vazio, utilizando-se água como líquido de calibração, à temperatura de 20 °C. Para determinar qual o volume correspondente à massa de água escoada ou contida utiliza-se a seguinte fórmula descrita na ISO 4787. (BATISTA; FILIPE; AZEVEDO, 2004).

$$V_{20} = (I_L - I_E) \times (\rho_W - \rho_A)^{-1} \times (1 - \rho_A \div \rho_B) \times [1 - \gamma(t - 20)]$$

V_{20} – volume, à temperatura de 20 °C, em mL;

I_L – resultado da pesagem com o recipiente cheio de água, em g;

I_E – resultado da pesagem com o recipiente vazio, em g;

ρ_W – massa volúmica da água, à temperatura de calibração t , em g mL⁻¹;

ρ_A – massa volúmica de ar, em g mL⁻¹ (para temperaturas próximas de 20 °C e à pressão atmosférica normal, pode-se usar o valor médio de 0,0012 g mL⁻¹);

ρ_B – massa volúmica de referência das massas da balança, em g mL⁻¹ (para massas conforme a OIML 33, normalmente o valor utilizado é de 8,0 g mL⁻¹);

γ – coeficiente da expansão cúbica do material de que é feita a microseringa, e °C⁻¹;

t – temperatura da água utilizada na calibração, em °C.

2 – Objetivos

- Desenvolver um sistema tipo robô cartesiano capaz de operar com o arranjo de uma microseringa e de um bloco reacional para o preparo de amostras.
- Validar o desempenho, funcionamento e aplicabilidade do protótipo construído, avaliando a precisão no manuseio de alíquotas de amostras e solventes através da microseringa, assim como a temperatura e agitação do bloco reacional.
- Realizar testes usando o sistema completo em reações de derivatização de aminoácidos para posterior análise em cromatógrafo gasoso.

3 – Parte experimental

3.1. Materiais

3.1.1. Materiais – Preparador amostral

1. Madeira MDF branca dupla face (15 mm);
2. Barra redonda de aço;
3. Bloco de alumínio (10 x 3 x 3 cm);
4. Filamento de PLA (Ácido Polilático);
5. Fuso trapezoidal (8 mm);
6. Ímãs de neodímio e isopor para isolamento térmico;
7. Parafusos;
8. Perfis de alumínio estrutural quadrado (40 x 40 mm);
9. Porcas.

3.1.2. Dispositivos elétricos e eletrônicos – Preparador amostral

1. Motores de passos NEMA 17, Neomotion (Oriental Motor, Tokio, Japão)
2. Cartucho aquecedor 12V (40 watts) (Ewigkeit, Shanghai, China);

3. *Driver* modelo DRV 8825 (Texas Instruments, Dallas, EUA);
4. Motor do tipo Brushless com eixo desbalanceado (Melody Sophia, Shangai, China);
5. Placas de desenvolvimento Arduino Uno e Nano, ambas com controlador Atmega 328P (Microchip Technology, Chandler, USA);
6. Sensores de fim de curso (Homyl, Shangai, China);
7. Sensores de temperatura analógicos do tipo LM35 Texas Instruments, Dallas, EUA);
8. Transistor *mosfet* modelo IRF520N (Inchange Semiconductor, Wuxi-New, China).

3.2. Suprimentos, equipamentos e softwares

1. Balança analítica, incerteza de medição $u = \pm 0,00001$ g, modelo AUW220D, Shimadzu;
2. Cromatógrafo a gás, modelo GC-2030, Shimadzu;
3. Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, modelo QP2010 Plus, Shimadzu;
4. Cromatógrafo líquido, modelo LC-2030, Shimadzu;
5. Frascos de vidro transparente com tampa e septo (1,5 e 4,0 mL), Agilent;
6. Impressora 3D, modelo Zmorph VX;
7. Interpretador Python 3.8 para Windows e Arduino IDE linguagem C para os microcontroladores;
8. Origin® (2021);
9. Seringa de 250 µL, Hamilton;
10. Tacômetro, modelo TD-812;
11. Thinkercad (<https://www.tinkercad.com/>).

3.3. Padrões analíticos e reagentes

3.3.1. Reagentes, soluções, gases – análise de aminoácidos

1. 1-propanol (pureza $\geq 99,9\%$; Merck, Alemanha);

2. 3-metilpiridina (pureza $\geq 99,0\%$; Merck, Alemanha);
3. Água ultrapura (ELGA, PURELAB Classic);
4. Clorofórmio (pureza $\geq 99,8\%$; J. T. Baker);
5. Gás hélio comprimido (pureza $\geq 99,999\%$, Air Products, Brasil);
6. Gás nitrogênio industrial comprimido (Air Products, Brasil);
7. Isooctano (pureza $\geq 99,5\%$; Merck, Alemanha);
8. Propil cloroformato (pureza $\geq 98\%$; Merck, Alemanha);
9. Reagente Derivatizante 1 (1-propanol a 77,0% v/v e 3-metilpiridina a 23,0% v/v), mantido a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$;
10. Reagente Derivatizante 2 (clorofórmio a 71,6% v/v; iso-octano a 11,0% v/v e propil cloroformato 17,4% v/v), mantido a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$;
11. Solução aquosa de hidróxido de sódio ($0,30\text{ mg L}^{-1}$);
12. Solução estabilizante (1,0 mL de 1-propanol; 1,0 mL de solução fenólica em água; 328,0 μL de tiodietanol; água ultrapura até completar o volume de 10,0 mL), mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
13. Solução fenólica em água ($6,2\text{ mg mL}^{-1}$; Merck, Alemanha);
14. Solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), Synth, Brasil;
15. Tiodietanol (pureza = 99 %; Merck, Alemanha).

3.3.2. Preparo da solução padrão de aminoácidos

Cinco padrões analíticos de aminoácidos da Merck (pureza $\geq 99\%$) foram utilizados como soluções padrão, e um padrão analítico L-norvalina, foi utilizado como padrão interno (PI). Os padrões de aminoácidos utilizados foram: L-valina (Val), L-metionina (Met), L-ácido glutâmico (Glu), L-lisina (Lys) e L-triptofano (Trp).

Soluções estoque de cada aminoácido a $4000,0\text{ mg L}^{-1}$ foram preparadas com massas medidas em balança analítica e diluídas em balão volumétrico com solução de ácido clorídrico (HCl) $0,07\text{ mol L}^{-1}$. O preparador amostral automatizado desenvolvido foi utilizado para preparar novas soluções contendo a mistura dos cinco aminoácidos, na faixa de concentrações de 10,0 a 35,0 mg L^{-1} .

3.3.3. Preparo das soluções padrão de esteroides

Três padrões de esteroides, propionato de testosterona (pro-t), isocaproato de testosterona (iso-t) e decanoato de testosterona (dec-t) (Sigma-Aldrich) foram utilizados para os estudos. Uma solução estoque contendo a mistura de pro-t 3000,0 mg L⁻¹, iso-t 5400,0 mg L⁻¹ e dec-t 5400,0 mg L⁻¹ foi preparada da mesma forma que a solução padrão de aminoácidos, porém utilizou-se o solvente metanol.

O amostrador automatizado desenvolvido foi utilizado para construir as soluções das curvas de calibração de cada padrão. Para as soluções estoques foram diluídas: pro-t entre 30,0 e 90,0 mg L⁻¹, as soluções iso-t e dec-t entre 54,0 e 162,0 mg L⁻¹. Ambas no intervalo de cinco pontos uniformemente distribuídos.

3.3.4. Preparo das soluções padrão de diclofenaco de sódio

A solução estoque do padrão diclofenaco de sódio (Sigma-Aldrich), a 1000,0 mg L⁻¹, foi preparada medindo o padrão em balança analítica e diluindo-o com metanol em balão volumétrico. O preparador amostral automatizado desenvolvido foi utilizado para preparar as soluções para construção da curva de calibração com concentrações entre 25,0 e 125,0 mg L⁻¹, a partir da solução estoque, em cinco pontos uniformemente distribuídos.

3.4. Derivatização e extração dos aminoácidos

O procedimento automatizado de derivatização dos aminoácidos com propilcloroformato/propanol foi baseado em trabalhos anteriores (DETTMER, 2012; BATISTA, 2020; KASPAR, 2009; HUŠEK, 1998) e visou a substituição do procedimento manual. O arquivo de processo com a sequência das etapas reacionais, descrito no Anexo I, foi utilizado pelo preparador amostral para controlar todos os processos relacionados à reação de derivatização e à extração.

O bloco reacional foi aquecido a 35,0 °C e esperando-se por trinta minutos para a estabilização da temperatura do bloco antes do início do procedimento. A utilização de apenas uma seringa, requer etapas de lavagens entre as pipetagens dos reagentes. A lavagem da microseringa (capacidade de 159,0 µL) foi feita três vezes

cada, com água (frasco 18) e propanol (frasco 19), respectivamente. Houve exceção após a pipetagem da solução básica de hidróxido de sódio e da solução salina de cloreto de sódio, sendo a microseringa lavada sete vezes com água (frasco 18), seguida de três lavagens com propanol (frasco 19).

Inicialmente a microseringa foi ambientada com água, pipetou-se cinco vezes do frasco 18, 159,0 μL de água tendo esse volume descartado entre os intervalos. O descarte das lavagens do procedimento é feito nos frascos 15 e 20 (frascos de resíduos). Posteriormente, foi pipetado do frasco 10, 165,0 μL de água e verteu-se no reator (localizado no frasco 4 – bloco reacional), esse volume foi dividido em duas etapas de 80,0 e 85,0 μL . Depois foi pipetado do frasco 8 o volume de 100,0 μL da solução de aminoácidos e a verteu no reator, seguiu-se o processo de lavagem. Logo em seguida foi pipetado do frasco 11, 100,0 μL da solução do padrão interno (norvalina) e a verteu no reator. A seringa foi lavada. Então, foi pipetado do frasco 9, 10,0 μL da solução estabilizante e a verteu no reator, a mistura do reator foi agitada por quinze segundos. Lavou-se a seringa.

A seguir, foi pipetado do frasco 17, 120,0 μL da solução de NaOH e vertida no reator. Lavou-se a seringa. 80,0 μL do reagente de derivatização 1 – DR1, contido no frasco 12, foi pipetado e vertido no reator, o qual foi agitado por doze segundos. Lavou-se a seringa. Então, 50,0 μL do reagente de derivatização 2 – DR2, no frasco 13, foi pipetado e vertido no reator. O reator foi agitado por doze segundos, deixado em repouso por sessenta segundos e novamente agitado por doze segundos. Lavou-se a seringa.

250,0 μL de solução saturada de NaCl, contida no frasco 16, foi pipetada e vertida no reator. Essa etapa foi dividida em duas vezes consecutivas de 125,0 μL . A seringa foi lavada. Posteriormente foi adicionado 250,0 μL de clorofórmio, frasco 14, no reator. A adição desse solvente foi feita em duas vezes de 125,0 μL no reator. A agitação do bloco reacional foi acionada por sessenta segundos, deixada em repouso por trinta segundos. Então, a microseringa pipetou no fundo do reator, 100,0 μL da mistura reacional e a verteu no frasco 1, o qual contém um *insert*. A seringa foi lavada. O extrato reacional contido no frasco 1 foi levado para injeção no GC-MS.

3.5. Análises cromatográficas

3.5.1. Curvas de calibração das soluções padrão dos esteroides e do diclofenaco de sódio.

A análise cromatográfica dos esteroides (propionato de testosterona, isocaproato de testosterona, decanoato de testosterona e femproprianato de testosterona) para as curvas de calibração foram feitas num cromatógrafo a gás, Shimadzu – GC 2030 equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metilpolisiloxano de 30,0 m, 0,25 mm, 0,25 μm). A análise cromatográfica do diclofenaco de sódio para a curva de calibração foi feita num cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu – LC 2030, coluna 10,0 μm C-18 (octadecil), LC 250,0 x 10,0 mm, 100 Å- Phenomenex.

Os métodos das duas análises foram estabelecidos em outros trabalhos do grupo de pesquisa – InTechLab, CEFET-MG – Campus VI. Trabalhos ainda não publicados.

3.5.2. Análise cromatográfica dos aminoácidos derivatizados

Para a execução da análise cromatográfica, foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (GC/MS-Q) Shimadzu, modelo QP2010. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna Phenomenex ZB-AAA (10,0 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,1 μm de espessura do filme). O volume de amostra injetado foi de 1,0 μL . Usou-se hélio como gás de arraste ($1,5 \text{ mL min}^{-1}$) com injeção no modo *split*, razão 1:20. A temperatura de injeção foi fixada em 270,0 °C. A rampa de aquecimento do forno se inicia e permanece constante por 1 minuto a 70,0 °C, logo em seguida a temperatura é elevada à taxa de $30,0 \text{ °C min}^{-1}$ até 270,0 °C e permanece a 270,0 °C por 3 min. A interface GC/MS é mantida a 290,0 °C e a ionização acontece a 240,0 °C, por impacto de elétrons, a 70,0 eV. A aquisição dos íons foi feita, inicialmente, no modo SCAN (45-450 m/z) e, posteriormente, no modo *SIM*.

4. Resultados e Discussão

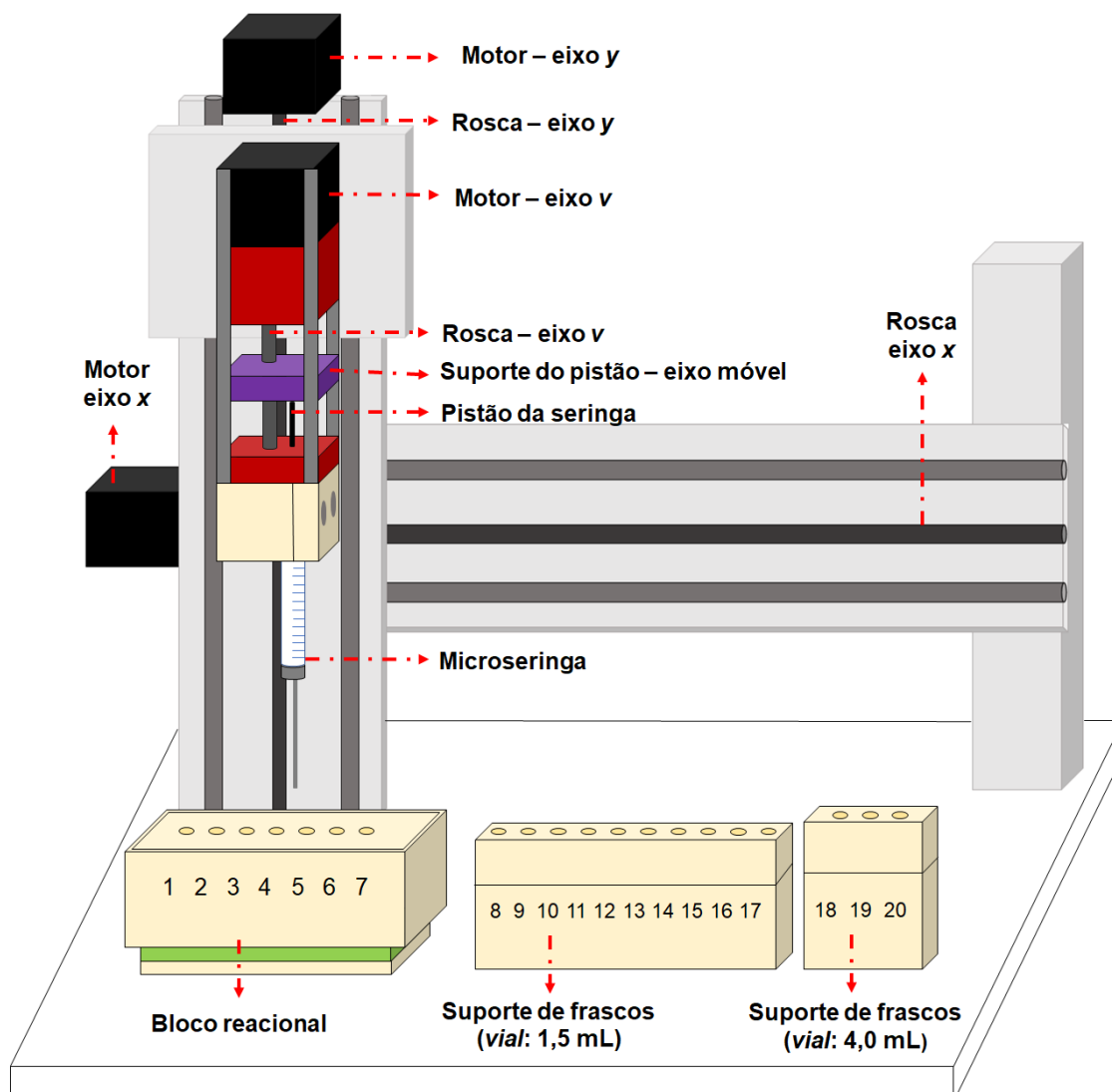
4.1. Construção e funcionamento do Preparador Amostral

O preparador amostral automático, baseado num sistema cartesiano de dois eixos (x e y), é constituído de uma parte mecânica responsável pelo posicionamento físico dos componentes, sistema de aquecimento e agitação do bloco reacional, parte eletrônica de controle e de *softwares* responsáveis pelo controle de todo o equipamento.

De acordo com as etapas de procedimento genérico do sistema de controle do preparador amostral automático, o sistema de automatização *off-line* desta técnica necessita de um sistema capaz de posicionar a microseringa corretamente em cada etapa e manipular o seu êmbolo com precisão. Além disso, realizar com precisão o aquecimento e agitação do bloco reacional.

O sistema cartesiano desenvolvido é constituído por um eixo de deslocamento na direção x que passa sobre os suportes para frascos de amostras (bloco reacional) e de reagentes e descarte, ambos ficam afixados numa base de madeira por meio de ímãs. Os deslocamentos lineares nas posições horizontal, x , e vertical, y , são feitos por dispositivos de movimentação, capazes de mover a microseringa até aos suportes. A representação do protótipo está ilustrada na FIGURA 7.

FIGURA 7: Desenho do protótipo do preparador amostral automático.

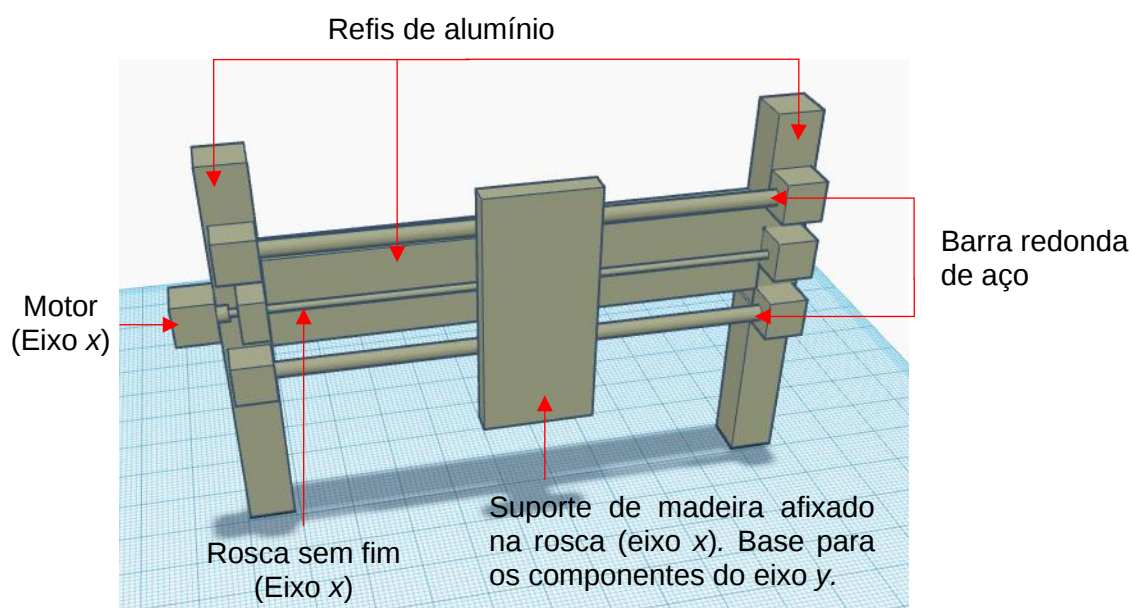


4.1.1. Montagem do protótipo - *Hardware*

Como ilustrado na FIGURA 7 o protótipo consiste em uma estrutura em perfil de alumínio, equipado com mecanismos de posicionamento horizontal, x, e vertical, y. Os movimentos realizados pela microseringa são comandados por motores de passos e roscas sem fim (fuso).

O suporte vertical construído com 3 perfis de alumínio em formato H, possui medidas vertical e horizontal de 35 e 45 cm, respectivamente, como ilustrado na FIGURA 8. Esse suporte está afixado numa base de madeira.

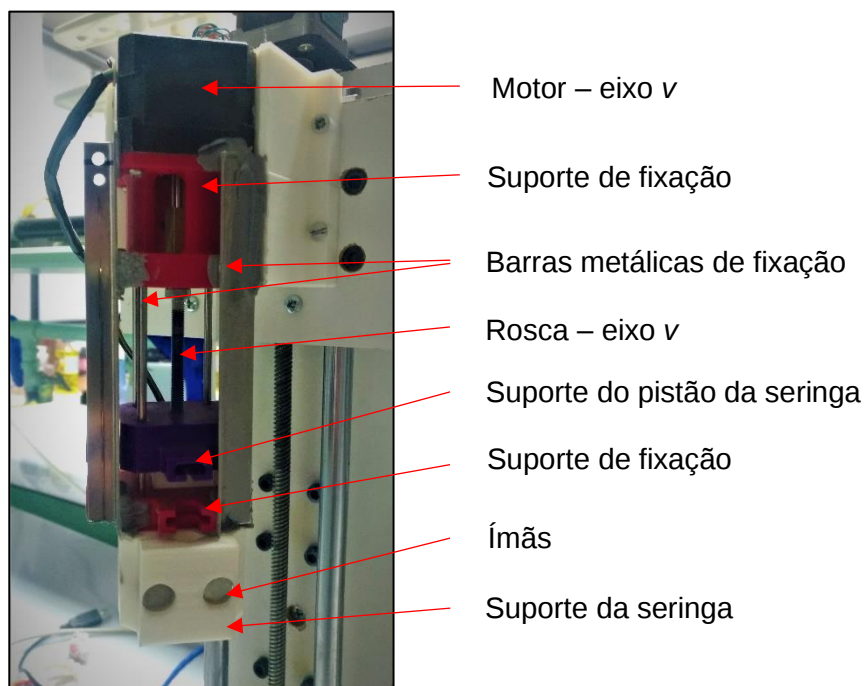
FIGURA 8: Ilustração 3d do suporte vertical e do sistema de movimento do eixo horizontal do protótipo. desenho realizado usando o aplicativo tinkercad. (<https://www.tinkercad.com/>)



O dispositivo de posicionamento é composto por um sistema responsável pelo eixo x (horizontal) afixado no suporte vertical (FIGURA 8) controlado por um motor de passo e uma rosca sem fim (fuso). Este sistema de posicionamento no eixo x mede 46 cm. Acoplado a esse sistema x, existe outro responsável pelo deslocamento na direção y (vertical). Este sistema y também é constituído por uma rosca sem fim acoplado a um motor de passo, apresentando um deslocamento de 35 cm (mostrado na FIGURA 7). Preso a este sistema de deslocamento na direção y está um módulo responsável pelo controle volumétrico da microseringa, eixo denominado v (FIGURA 7).

Oito barras metálicas alinham as peças do sistema que compõem o eixo v, como visto na FIGURA 8. O sistema de posicionamento do eixo v está fixo por dois suportes (cor vermelha) e o suporte do pistão da microseringa (cor roxa), ambos confeccionados em PLA usando-se uma impressora 3D. Um suporte de fixação da microseringa (cor branca) também foi confeccionado em PLA usando-se uma impressora 3D. Ele possui duas partes capazes de encaixar a microseringa entre elas, e são unidas através atração de dois pares de ímãs.

FIGURA 9: Imagem do sistema volumétrico da microseringa – eixo v.



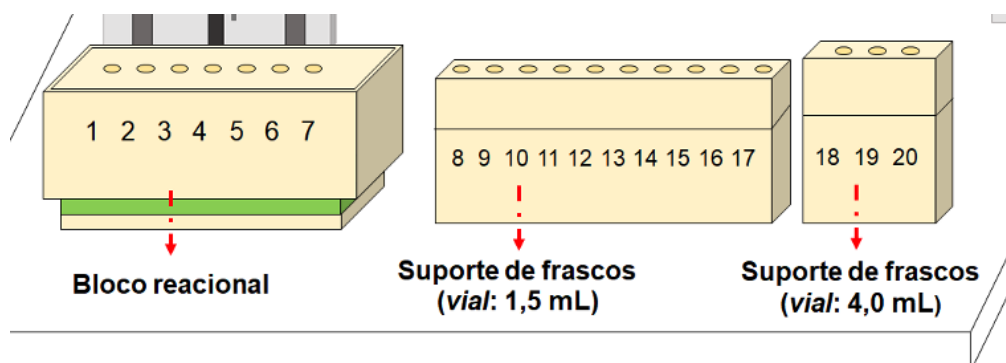
O sistema de controle da microseringa é composto por um motor de passo acoplado a uma barra roscada – eixo v (volume) com o suporte do pistão da microseringa afixado, que se move no meio. O motor faz a rosca do eixo v girar e, como suporte do pistão está fixo, ele sobe ou desce de acordo com o número de voltas que o motor gira.

Motores de passo são dispositivos que podem ser controlados por um computador ou microcontrolador de forma a realizar um deslocamento preciso de sua posição. Então, o motor de passo gira conforme o número de pulsos que ele recebe oriundos do computador, com isso, é possível programar o computador para fazer o motor deslocar um número conhecido de graus, ou dar um número definido de voltas, ou semivoltas.

Como ilustrado na FIGURA 7, logo abaixo do sistema de posicionamento se encontram três módulos para suportar os frascos. O módulo do centro e o da direita foi confeccionado em PLA em impressora 3D. O suporte da direita contém três orifícios para comportar até três frascos de 4,0 mL e é responsável por recolher os resíduos do processo de lavagem e por fornecer os solventes utilizados em maior quantidade, como água e álcool. O módulo central possui dez orifícios que comportam até dez

frascos de 1,5 mL, onde são inseridos os reagentes químicos e solventes utilizados em menor proporção (FIGURA 10).

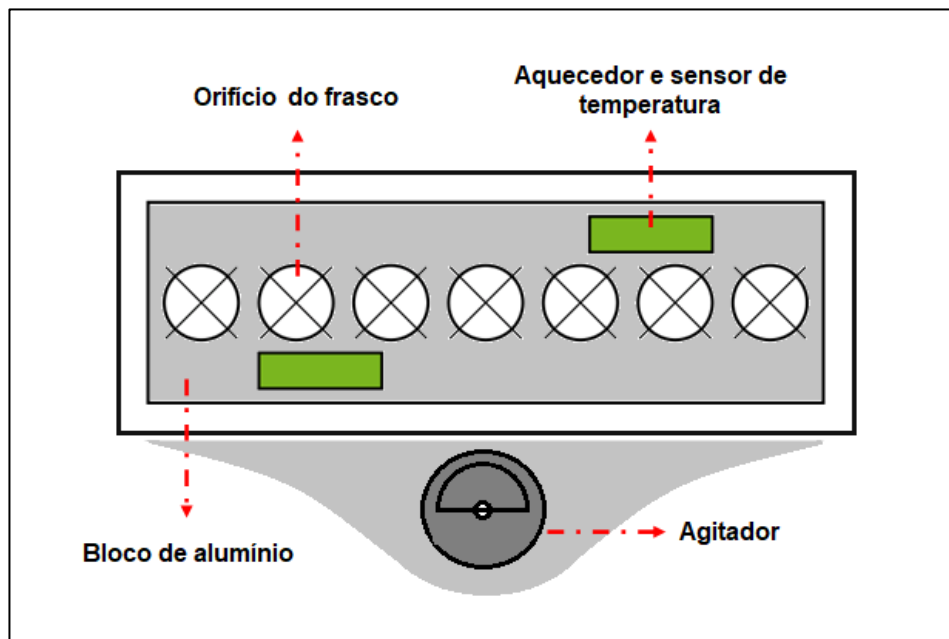
FIGURA 10: Fragmento da figura 7 mostrando apenas a parte dos frascos.



À esquerda, está o módulo do bloco reacional. Para a construção do bloco reacional utilizou-se um bloco de alumínio (10 x 3 x 3 cm) e nele existem sete orifícios capazes de comportar os frascos de 1,5 mL. Afixado ao bloco, foi colocado dois sistemas de aquecimento de 40 watts e 2 sensores de temperatura analógicos do tipo LM35 (FIGURA 11). Este sistema fica isolado termicamente do meio externo por duas paredes, sendo a mais externa feita de PLA em impressora 3D e o mais interno com placas de isopor.

Uma base impressa em PLA foi feita para alocar o sistema anteriormente citado e o motor do tipo Brushless que será usado como agitador, observe a FIGURA 11 que ilustra a vista superior do bloco reacional. O sistema de agitação é composto por um motor com eixo desbalanceado o que resulta em uma forte vibração do bloco de alumínio. O bloco reacional contém um sistema de amortecimento em sua base, para amenizar as trepidações quando o sistema de agitação é ligado.

FIGURA 11: Ilustração bidimensional do bloco reacional do preparador amostral automático com corte superior: representação do sistema de aquecimento e agitação.



Através do programa, que é executado no computador, é possível fazer o acionamento ou desligamento do sistema de agitação e do controle de temperatura, que cobre uma faixa de temperatura entre temperatura ambiente até aproximadamente 85 °C, com uma estabilidade de aproximadamente 0,2 graus Celsius. Este bloco reacional comporta até sete frascos de 1,5 mL, onde é possível a realização de reações químicas sob agitação e temperatura controlada.

De modo a controlar todos esses dispositivos utilizou-se dois módulos contendo microcontroladores ATmega 328P (módulos Arduino Uno e Nano). A vantagem no uso de microcontroladores é o fato deles serem responsáveis pela realização dos dois procedimentos sem a necessidade de um computador que, devido às suas características, apresentam diversas outras demandas geradas pelo sistema operacional.

O primeiro módulo microcontrolador (Arduino Uno) é responsável pelo sistema de controle dos dispositivos móveis, sendo os motores de controle dos eixos x e y e motor do sistema de controle da microseringa. Dessa forma, o computador poderá enviar comandos para o microcontrolador e este será responsável por executá-los. Enquanto isso, o computador poderá realizar outras tarefas até a finalização da

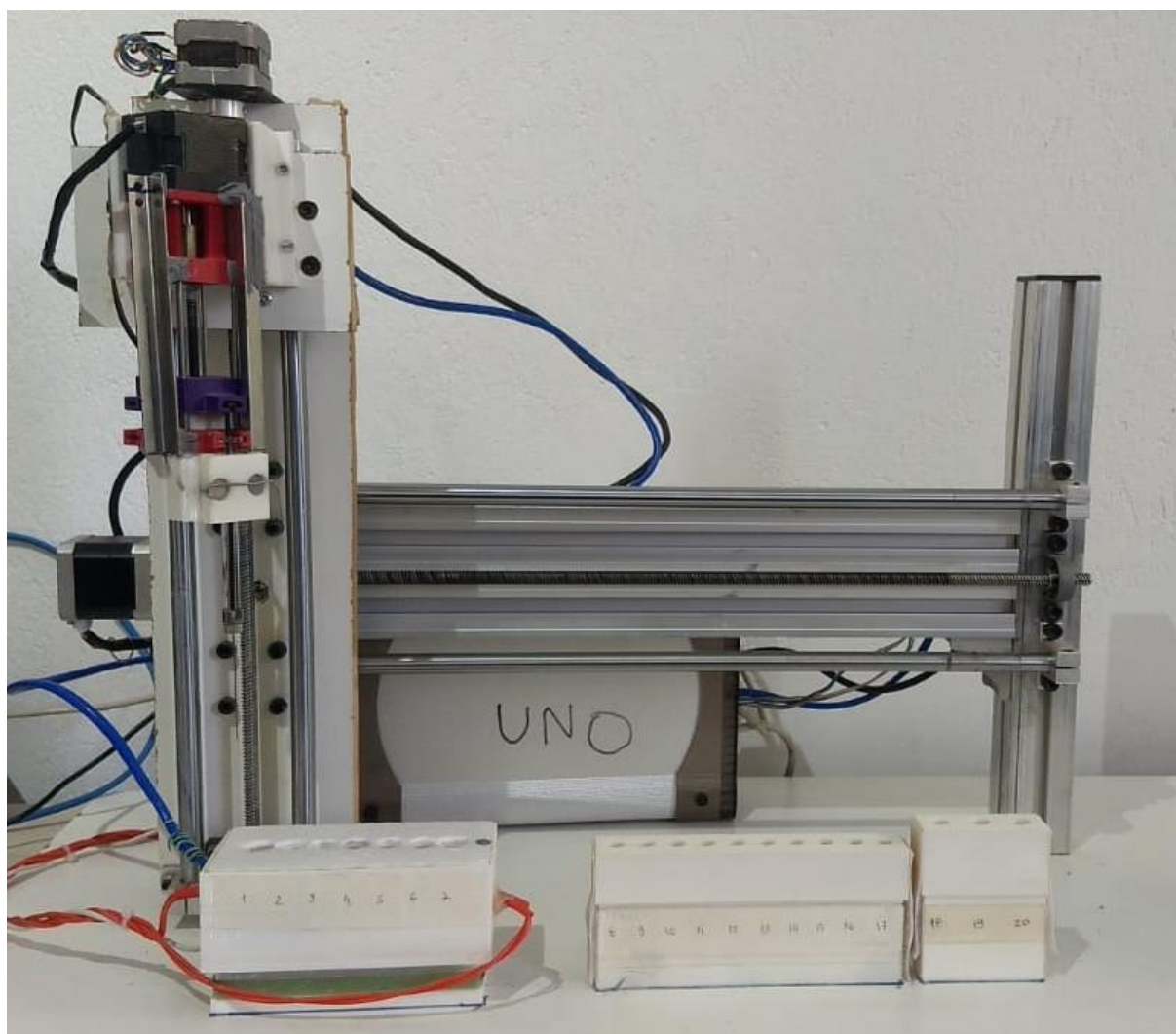
atividade solicitada. Para essa comunicação entre o microcontrolador e o computador ser efetiva foi desenvolvido um protocolo de comunicação.

Quando o sistema é ligado, o módulo microcontrolador Arduino Uno controla os motores de forma a movimentá-los buscando encontrar a posição “zero”, que é a posição na qual se encontra um sensor de fim de curso de cada eixo. Quando o sistema móvel toca esse sensor, o microcontrolador anota sua posição como posição “zero” e envia um comando ao computador, afirmando que o sistema foi inicializado corretamente. A partir desse momento, o microcontrolador poderá receber comandos, solicitando assim a movimentação do motor de forma a posicionar o sistema móvel em um local específico.

O módulo do bloco reacional é controlado por um microcontrolador diferente (Arduino Nano). A necessidade da utilização deste microcontrolador provém do fato do controle de temperatura necessitar de mais 5 portas de entrada e saída, que não estavam disponíveis no microcontrolador utilizado no sistema de posicionamento mecânico (Arduino Uno). Além do fato do controle de temperatura fazer as medições dos valores de temperatura muito rapidamente e da realização de diversos cálculos para o controle da potência enviada ao aquecedor. Este módulo mede a temperatura 800 vezes por segundo, fazendo uma média destes valores e, conseqüentemente, reduzindo o ruído do sensor de temperatura. Através desse microcontrolador também é possível fazer o acionamento e o desligamento do sistema de agitação (sistema composto por um motor do tipo Brushless com um eixo desbalanceado presente em controles de videogames) e o ajuste de temperatura deste bloco reacional na faixa de temperatura ambiente até aproximadamente 85 °C.

Os microcontroladores empregados não apresentam potência suficiente para a movimentação dos motores, nem fornecimento de energia para o módulo de aquecimento ou agitação, por isso, utilizam-se componentes eletrônicos denominados *drivers*. Portanto, os motores de passo são controlados pelos microcontroladores utilizando-se *drivers* específicos e, nesse caso, foram utilizados três *drivers* modelo DRV 8825. O sistema de aquecimento foi alimentado utilizando-se dois transistores *mosfet* (IRF520N) a partir do controle PWM (*Pulse Width Modulation*) do Arduino Nano. O acionamento do motor, associado ao sistema de agitação, foi realizado através de um relê comum.

A FIGURA 12 mostra o preparador amostral automático finalizado.

FIGURA 12: Preparador amostral automático

4.1.2. Montagem do protótipo - *Software*

O *software* responsável pelo controle de todo o protótipo desenvolvido é constituído por programas para controle independente para cada um dos motores de passo dos mecanismos cartesianos (eixos x, y e v), para os sistemas de aquecimento e agitação do bloco reacional.

Conforme apresentado anteriormente, o sistema é controlado por um *software* executado no computador. Esse *software* se comunica com os microcontroladores através de uma comunicação serial do tipo USB. Para reconhecer os comandos e executá-los de forma correta, os microcontroladores também devem ser programados.

Como se optou pela utilização de microcontroladores do tipo Arduino optou-se pela utilização da linguagem c, enquanto o *software* executado no computador foi escrito em Python versão 3. O professor doutor Emerson F. Pedroso, do departamento de Química do CEFET/MG, é o autor do programa do preparador amostral.

O *software* presente no microcontrolador Arduino Uno é responsável pelo deslocamento dos eixos *x*, *y* e *v*. O objetivo é fazer com que os motores de passos desloquem corretamente a microseringa até a posição desejada e realize a função de pipetar ou verter o volume almejado. O deslocamento no eixo *x* foi calculado para que a microseringa seja posicionada na região central de cada frasco (1 ao 20, FIGURA 7). Para o eixo *y*, o objetivo é abaixar a seringa até ao fundo de cada frasco quando exercer a função “pipetar”, para retirar o máximo volume possível dos reagentes/solventes; e abaixar a seringa até a tampa de cada frasco quando exercer a função “verter”, para que não entre em contato com reagentes que estejam presentes no reator/solução que estão sendo preparadas.

A conversão do número de passos das roscas sem fim dos eixos *x* e *y* é de 25 passos por milímetro, e possuem respectivamente, 10490 e 4000 passos (ou pulsos). A barra roscada do eixo *v* possui 9500 passos até a marca de 160,0 μL da microseringa, capacidade máxima de pipetagem sem calibração. Utilizando cálculos de regra de três, cada microlitro corresponde a 59,375 passos.

O *software* presente no microcontrolador Nano é responsável pelo funcionamento do bloco reacional, através do sistema de aquecimento e agitação. A função “agitar” criada no programa pode ser ligada e desligada todas as vezes que desejar. A função “esperar” foi criada para auxiliar o tempo que o bloco reacional permanece em agitação, mas também pode ser usada como intervalo temporal entre as funções do sistema cartesiano.

O programa desenvolvido para o sistema de aquecimento tem as funções de inserir a temperatura desejada e de monitorar a temperatura do bloco quando solicitada. É demasiado o tempo que leva para estabelecer uma temperatura constante, cerca de 30 minutos, para uma diferença entre a temperatura solicitada e a temperatura real menor que 5%. O bloco reacional não contém sistema de resfriamento, portanto, não tem a possibilidade de oscilar rapidamente a temperatura do bloco durante o processo reacional. Sendo necessário alterar a temperatura e esperar que o equilíbrio térmico seja reestabelecido.

4.2. Modo operacional do preparador amostral automático

Para operar o preparador amostral automático, o *software* envia comandos para o microcontrolador através de uma porta USB. Recebendo os comandos, o microcontrolador irá interpretá-los utilizando um protocolo próprio, assim este último irá interpretar esses comandos para executar a função desejada. O protocolo desenvolvido é composto de 2 letras e de 2 a 4 números, como exemplo temos XXnnnn, em que XX são letras e n são números. As letras representam o tipo de comando desejado, enquanto os números representam as grandezas associadas a este comando. O QUADRO 1 correlaciona os códigos destes comandos com as funções, o que caracteriza o protocolo desenvolvido para este sistema.

QUADRO 1: Relação entre os comandos do *software* e a execução das funções.

Tipo de comando	Função	Números	Função
PX	Posicionamento horizontal	nnnn	Número de passos até a posição desejada
PY	Posicionamento vertical		
PV	Posicionamento do êmbolo da microseringa		
AG	Controle de agitação	0 ou 1	0 ⇒ desliga 1 ⇒ Liga
AT	Controle de temperatura do bloco	nn.nn	Temperatura desejada (°C)
TB*	Mede temperatura do bloco		Retorna a temperatura do bloco (°C)

*O comando TB é utilizado apenas para aferir a temperatura.

Os comandos associados com a movimentação começam com a letra P (**P**osição), aqueles que são responsáveis pelo acionamento do sistema de agitação começam com a letra AG (**AG**itação) e, aqueles responsáveis pelo ajuste de temperatura, AT (**A**juste **T**emperatura). Quando se necessita determinar a temperatura do bloco reacional se utiliza o comando TB (**T**emperatura **B**loco). Este

último comando não necessita de números pois ele simplesmente retorna o valor da temperatura instantânea do bloco para o computador.

A FIGURA 13 apresenta a tela principal do programa na qual algumas opções são mostradas. Este *software* é executado no computador.

FIGURA 13: Imagem da tela principal do programa de controle do sistema do preparador amostral automático.

```
Prompt de Comando - programa-v0.6.py

PROGRAMA PARA CONTROLE DO SISTEMA DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA GC

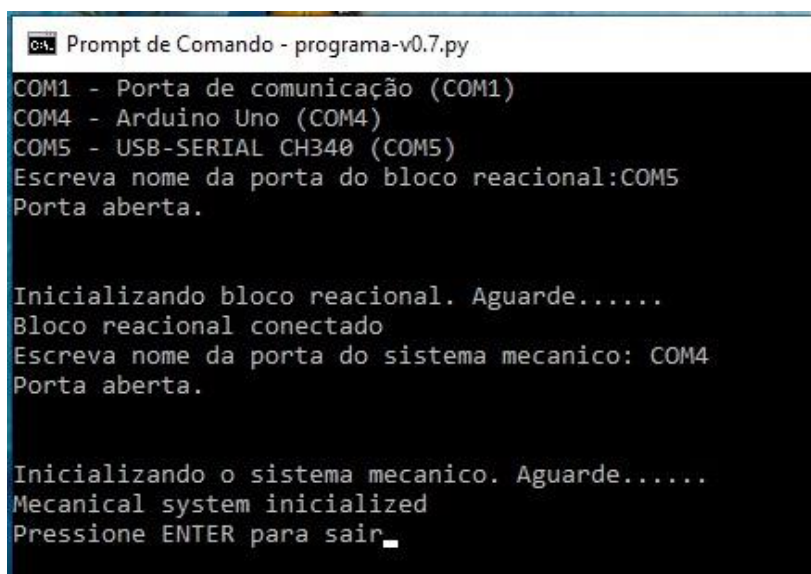
POR: PROF. Emerson Pedroso e Fabiane Lopes
CEFET-MG
VERSÃO: V0.6 SETEMBRO => 2020

Escolha uma opção (número):
1- Conectar equipamento ao computador
2- Abrir arquivo de processo
3- Visualizar arquivo de processo
4- Ajustar temperatura: Usar o comando ATnn.nn Onde n são números
5- Executar processo
6- Enviar comandos diretamente ao equipamento **** Olhar lista de comandos no manual :) ****
7- Esvaziar a pipeta (escolher o frasco de resíduo)
8- Sair

Opção:
```

Primeiramente, deve-se abrir o programa de controle do sistema. Após aberto, deve-se digitar a opção 1 para conectar o preparador amostral (*hardware*) ao computador. Outra tela é aberta, na qual é necessário indicar as portas utilizadas pelo computador para conectar com o sistema mecânico e com o bloco reacional. No caso de computadores com o sistema Windows as portas seriais são as COM4 e COM5, por isso estes dados devem ser escritos na tela do computador para que o computador saiba onde estão os microcontroladores Arduino Uno e Nano. Esses dois comandos são, respectivamente, do sistema mecânico e, do sistema de agitação e aquecimento do bloco reacional. A FIGURA 14 mostra a página desse sistema de conexão já concluída, em que consta todas as informações do passo a passo seguido.

FIGURA 14: Imagem do programa, opção 1: conexão do preparador amostral automático ao computador.



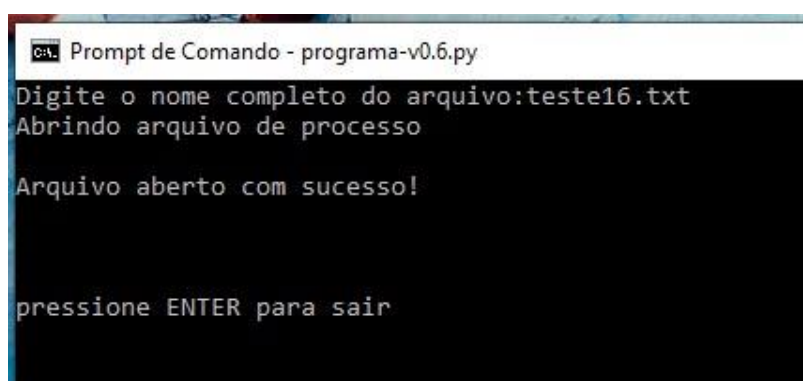
```
C:\> Prompt de Comando - programa-v0.7.py
COM1 - Porta de comunicação (COM1)
COM4 - Arduino Uno (COM4)
COM5 - USB-SERIAL CH340 (COM5)
Escreva nome da porta do bloco reacional:COM5
Porta aberta.

Inicializando bloco reacional. Aguarde.....
Bloco reacional conectado
Escreva nome da porta do sistema mecanico: COM4
Porta aberta.

Inicializando o sistema mecanico. Aguarde.....
Mechanical system initialized
Pressione ENTER para sair
```

Somente com o *hardware* conectado ao computador, que o programa pode funcionar e executar as funções. A opção 2 é responsável por carregar o arquivo do teste experimental desejado. A FIGURA 15 mostra que deve ser digitado o nome desse arquivo corretamente para ser aberto, caso contrário emitirá a mensagem: “Arquivo não encontrado”.

FIGURA 15: Imagem do programa, opção 2: carregamento do arquivo do teste que será executado pelo preparador amostral automático.



```
C:\> Prompt de Comando - programa-v0.6.py
Digite o nome completo do arquivo:teste16.txt
Abrindo arquivo de processo

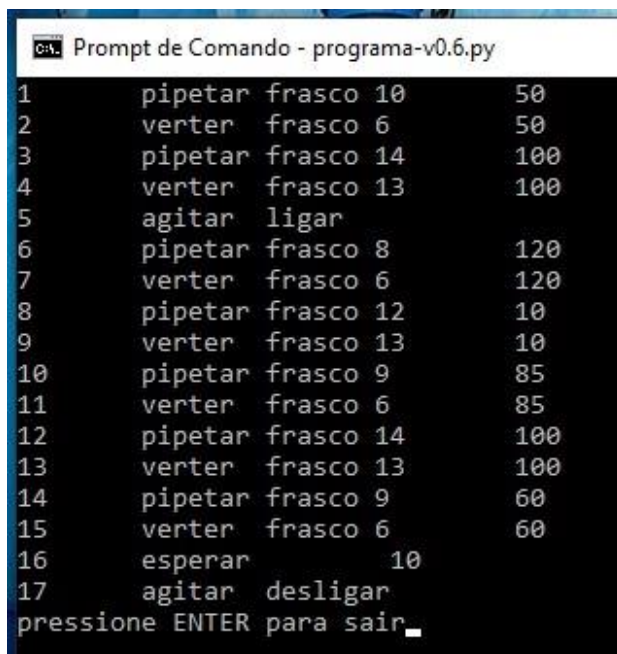
Arquivo aberto com sucesso!

pressione ENTER para sair
```

Logo em seguida, é importante confirmar se o arquivo carregado é realmente o proposto, por isso a opção 3, exemplificada na FIGURA 16, permite visualizar todo o passo a passo do teste que será feito antes de ir para a opção 5. A opção 5 interpreta

os arquivos com as etapas e envia os comandos para o sistema mecânico e para o bloco reacional, executando assim o processo.

FIGURA 16: Imagem do programa, opção 3: visualização do passo a passo do arquivo carregado na opção 2.



```

C:\> Prompt de Comando - programa-v0.6.py
1      pipetar frasco 10      50
2      verter  frasco 6       50
3      pipetar frasco 14      100
4      verter  frasco 13      100
5      agitar  ligar
6      pipetar frasco 8       120
7      verter  frasco 6       120
8      pipetar frasco 12      10
9      verter  frasco 13      10
10     pipetar frasco 9       85
11     verter  frasco 6       85
12     pipetar frasco 14      100
13     verter  frasco 13      100
14     pipetar frasco 9       60
15     verter  frasco 6       60
16     esperar          10
17     agitar  desligar
pressione ENTER para sair_
  
```

As opções 4 e 6 seguem os comandos do QUADRO 2, como mostrado anteriormente. O importante da opção 4 é ajustar temperatura do bloco antes mesmo de começar um procedimento que requer aquecimento, até que ele entre em estabilidade térmica.

O arquivo de processo do teste segue alguns parâmetros e deve ser escrito corretamente. Utiliza-se uma planilha no Excel para que esse arquivo seja escrito no modelo de tabela, o que evita erros, porém o arquivo é salvo na forma de texto no aplicativo bloco de notas. O QUADRO 2 apresenta todas as opções possíveis de execução do amostrador. O índice mostra o número total de funções que serão executadas; a coluna de operação está exemplificando todas as habilidades que o amostrador possui: agitar (ligar/desligar) e aquecer (temperatura) são funções do bloco reacional: abrange simultaneamente os frascos 1 ao 7, pipetar e verter são funções de volume da microseringa, *esperar* apresenta como variável o tempo em segundos, e, *resetar* tem a função do preparador amostral ser reinicializado na posição “zero” de seu sistema mecânico.

QUADRO 2: Modo de construção do arquivo para execução das funções do preparador amostral automático.

Índice	Operação	Frasco / Agitação	Volume (µL) / Tempo (s) / Temperatura (°C)
1	pipetar	frasco 1	10.00
2	agitar	ligar	—
3	esperar	—	60.00
4	verter	frasco 20	50.53
5	agitar	desligar	—
6	aquecer	—	60.00
7	resetar	—	—

É importante que a cada teste executado, o amostrador seja reiniciado, para garantir que a posição horizontal não seja alterada no decorrer do uso. A área do septo da tampa do frasco é pequena, o que requer uma grande precisão do sistema mecânico. Para evitar uma quebra da agulha se reinicia o sistema mecânico a cada início de análise, por isso foi criado a função “resetar” (QUADRO 2).

O símbolo “—”, apresentado em algumas colunas do QUADRO 2, significa que aquela área da linha, segundo a operação, não deve ser preenchida (espaço em branco). Os frascos são correspondentes aos números marcados no bloco reacional e nos suportes (ver FIGURA 7). Os frascos numerados seguem em ordem crescente do 1 ao 20, da esquerda para a direita. A quarta coluna corresponde às grandezas de volume, tempo e temperatura, e podem ser utilizados até duas casas decimais, que diminui a incerteza de cada função.

Portanto, para montar os parâmetros do arquivo, as funções devem estar na ordem das colunas estabelecida do QUADRO 2. No ANEXO I contém o arquivo utilizado para o procedimento de derivatização e extração dos aminoácidos.

4.3. Testes iniciais de funcionamento do preparador amostral

4.3.1. Aferição do agitador

Utilizando um Tacômetro – TD-812, foram feitas três leituras de rotação do motor do bloco reacional. As medidas foram: 2955, 2964 e 2976 rpm (rotações por minuto). Isso equivale à média de 2965 rpm. Essa rotação do motor de eixo desbalanceado é capaz de provocar agitação no bloco reacional, conseqüentemente, agita os reagentes presentes nos frascos do bloco reacional.

4.3.2. Ajuste do volume pipetado

Ao realizar os primeiros testes volumétricos com líquidos de diferentes densidades, os volumes oscilavam e não pipetavam corretamente. Isso ocorria devido à formação de uma pequena bolha de ar entre o pistão e o líquido no cilindro da seringa. Essa bolha sofre expansão volumétrica com a diminuição da pressão interna da seringa durante o processo de sucção. Para corrigir essa expansão até estabelecer o equilíbrio do volume de ar, foi adicionado um *delay* de 3 s após terminar o processo de pipetagem, pois o líquido continua sendo succionado até que se alcance o equilíbrio entre a pressão do ar dentro da bolha na seringa e o ar fora da seringa. Essa bolha de ar formada foi considerada na etapa de correção volumétrica da microseringa.

4.3.3. Correção da temperatura do bloco reacional

Diversas leituras de temperatura do bloco reacional foram realizadas para estimar numericamente o valor da incerteza associada ao processo de medição. De acordo com as regras estatísticas, a sequência de medição dos orifícios do bloco foi feita aleatoriamente, todavia, aferiu-se a temperatura de três dos sete orifícios, sendo os dois da extremidade e o central, assim como representado na FIGURA 17. Inicialmente, determinou-se a temperatura pelo *software* (soft.) de controle do amostrador e esperava-se 2 h para que a temperatura do bloco estivesse o mais

estabilizada possível, em seguida o termômetro (term.) oscilava entre os três orifícios a cada uma hora e anotava-se a temperatura do bloco. A TABELA 1 especifica todas as medidas e resultados. Por dia, foram coletados seis dados e em cada temperatura foram utilizados três dias distintos para coleta da temperatura do bloco. Ou seja, para cada temperatura analisada, foram feitas dezoito medições e calculou-se a média e o desvio padrão associado. Os valores testados para aferir a temperatura estão na faixa de 35,0 a 90,0 °C, e pôde-se comprovar que a temperatura média máxima que o bloco reacional atinge é de 84,9 °C.

FIGURA 17: Ilustração bidimensional do bloco reacional do preparador amostral automático com corte frontal: representação dos orifícios que tiveram as temperaturas aferidas com um termômetro de mercúrio.

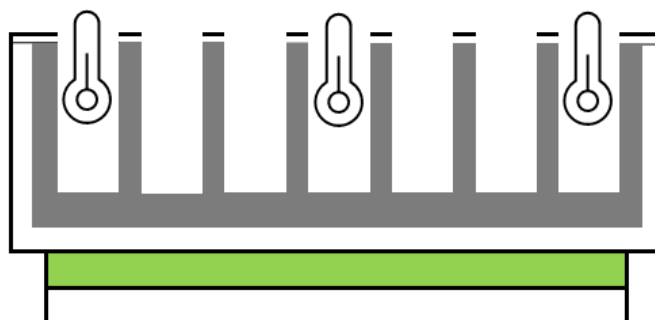
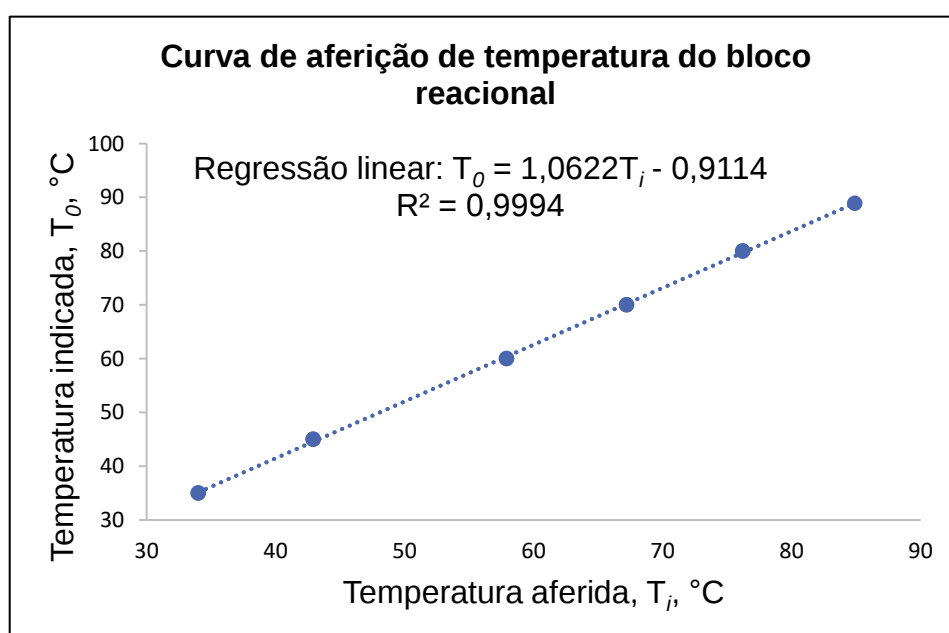


FIGURA 18: Curva de aferição da temperatura do bloco reacional obtida a partir dos dados da temperatura indicada pelo software versus a temperatura aferida experimentalmente.



O processo de correção da temperatura do bloco reacional passou pela análise de comparação dos valores da temperatura indicada, T_0 , pelo *software* e (soft.) e dos valores de temperatura aferida, T_i , com o auxílio de um termômetro (term.). Como representado na FIGURA 18, observou-se que os valores T_i foram relativamente menores do que T_0 indicados pelo *software*, mas de acordo a equação da regressão linear obtida, é possível fazer a correção da temperatura indicada, de modo que o valor da temperatura real seja equivalente estatisticamente com o valor desejado.

O programa Origin®, foi utilizado para os cálculos e construção dos gráficos. Primeiramente, avaliou-se a normalidade utilizando o *Teste de Shapiro-Wilk* para os valores das temperaturas e, este foi válido para a todos os dados. Posteriormente, o *Teste F* foi aplicado nas replicatas dos pontos de menor e maior temperatura da curva para avaliar a homogeneidade das variâncias, e estes foram homocedásticos. Portanto, foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários, no intervalo de 95% de confiança para a construção da curva de temperatura do bloco reacional.

Conforme os resultados obtidos, FIGURA 18, o processo de correção da temperatura do bloco reacional será válido, pois o coeficiente de determinação obtido, $R^2 = 0,9994$, indicou alta correlação entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo. Portanto, para correção da temperatura aferida, T_i , deve-se substituir o valor desejado na fórmula da regressão linear: $T_0 = 1,0622T_i - 0,9114$ para encontrar o valor T_0 a ser digitado no *software* do preparador. O desvio padrão de todos os ensaios das temperaturas analisados foram calculados e optou-se por considerar o desvio padrão de maior variabilidade, ou seja, $\sigma_T = 0,54\text{ }^\circ\text{C}$, correspondente à temperatura média de $42,9\text{ }^\circ\text{C}$ como apresentada na TABELA 1.

Por exemplo:

Se a temperatura do bloco reacional precisar ser mantida a $50,0\text{ }^\circ\text{C}$, $T_i = 50,0\text{ }^\circ\text{C}$, o valor da temperatura indicada, T_0 , no *software* será:

$$T_0 = 1,0622 \times 50,0 - 0,9114 = 52,2 \pm 0,54\text{ }^\circ\text{C}.$$

Este desvio do valor medido com o termômetro e com o sensor interno do bloco reacional pode estar associado ao fato do bloco reacional ter uma área superior com pouco isolamento térmico, o que causa uma diminuição de sua temperatura. Outra

explicação seria baseada no fato da possibilidade de saída de calor pela parede do termômetro, visto que ele apresenta sua ponta dentro do bloco, porém seu corpo se localiza externamente ao bloco, estando desprotegido termicamente.

TABELA 1: Relação entre a temperatura (°C) aferida do bloco reacional com a temperatura (°C) indicada pelo *software*.

Temperatura teste (°C)	35,0		45,0		60,0		70,0		80,0		90,0	
	Soft.	Term.	Soft.	Term.	Soft.	Term.	Soft.	Term.	Soft.	Term.	Soft.	Term.
	35,2	34,0	45,0	42,4	59,9	58,0	70,0	67,1	79,9	76,5	88,8	85,0
	35,1	33,5	45,1	43,4	60,0	57,5	69,8	67,0	79,9	76,0	88,7	84,9
	35,1	34,5	45,0	42,4	60,0	58,0	70,0	67,1	79,8	76,5	88,8	85,0
	35,2	34,0	44,8	42,8	60,0	57,8	70,0	67,0	79,9	76,3	88,9	84,5
	35,1	33,2	45,0	43,8	60,0	58,0	70,0	67,0	80,0	76,5	88,9	84,9
	35,1	34,5	45,0	42,4	60,0	57,9	70,0	67,1	79,9	76,0	89,3	85,3
	35,2	34,0	45,0	42,8	60,0	57,9	70,0	67,0	79,8	76,1	88,7	85,0
	35,2	33,5	45,1	43,4	59,9	57,7	69,9	67,0	80,0	76,1	88,9	85,0
	35,2	34,5	45,0	42,5	60,0	58,0	69,9	67,1	79,9	75,9	88,8	85,0
	35,2	34,0	45,0	42,7	60,0	57,7	70,0	67,1	79,9	76,1	88,9	84,7
	35,1	33,7	45,0	43,4	60,0	58,0	70,1	67,0	79,9	76,2	88,9	84,6
	35,2	34,0	45,1	42,4	60,0	57,9	70,0	67,0	79,9	76,2	88,9	84,9
	35,2	34,0	45,0	42,7	60,0	58,0	70,0	67,8	79,9	76,6	88,8	84,5
	35,2	33,5	45,1	43,6	60,0	58,0	70,0	67,5	79,9	76,6	88,9	84,7
	35,2	34,5	45,0	42,8	60,0	58,0	70,0	67,5	79,9	76,5	88,9	84,5
	35,2	34,0	45,0	42,4	60,0	58,0	70,0	67,7	79,8	76,2	88,9	84,9
	35,2	34,0	45,1	43,8	60,0	58,0	70,0	67,2	79,9	76,0	89,1	85,1
	35,2	34,5	45,0	42,4	60,0	58,0	70,0	67,5	79,9	76,0	89,3	85,1
Temp. Média (°C)	35,2	34,0	45,0	42,9	60,0	57,9	69,99	67,2	79,9	76,2	88,9	84,9
Desvio Padrão (°C)	0,04	0,40	0,06	0,54	0,03	0,15	0,06	0,27	0,05	0,24	0,17	0,23
CV (%)	0,11	1,18	0,13	1,26	0,05	0,26	0,09	0,4	0,06	0,31	0,19	0,27

4.3.4. Correção do volume da microseringa

Para determinar com precisão que o volume indicado pelo *software* condiz com o volume aferido, realizou-se um experimento de correção do volume da microseringa do amostrador e, a partir dos dados obtidos, foi possível fazer a correção do volume no *software* e estimar estatisticamente a variabilidade da medida volumétrica.

O método sem evaporação, baseado na norma ISO 8655, não contabiliza as perdas por evaporação da massa do líquido utilizado no método gravimétrico para aferir o volume da microseringa. Primeiramente, onze frascos de 1,5 mL, foram preenchidos com água destilada e suas massas foram determinadas. O preparador amostral automático foi utilizado para pipetar o volume pretendido, que oscilou entre 5,0 e 140,0 μL . Mediu-se a massa dos frascos após a pipetagem de água e por diferença, determinou-se o valor da massa dos volumes pipetados. Repetiu-se cada ensaio por dez vezes de forma incremental, isto é, sem esvaziar os frascos. Registrou-se o valor da massa em cada medição (TABELA 2).

TABELA 2: Relação entre volumes da microseringa determinado a 20 °C.

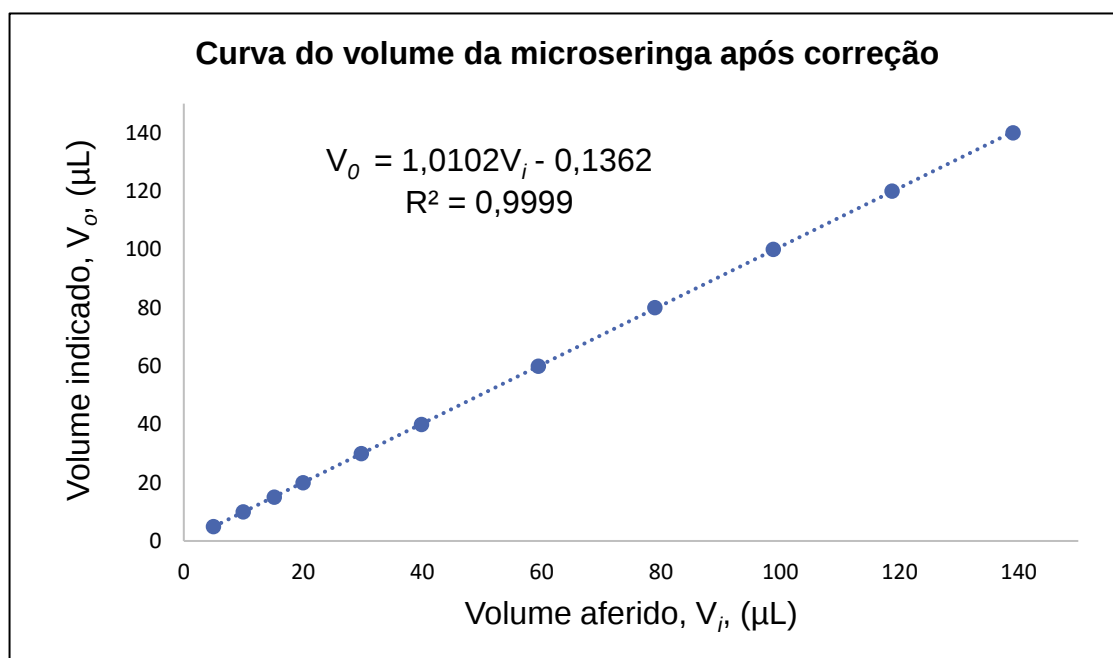
Volume teste (µL)	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0	40,0	60,0	80,0	100,0	120,0	140,0
Massa de água (mg)	4,8	9,8	14,9	19,9	30,0	39,6	59,1	78,5	98,8	118,7	139,1
	5,4	10,1	15,3	20,0	29,7	40,0	59,9	79,1	99,4	118,6	139,0
	5,0	10,0	15,7	20,0	29,5	40,0	59,5	78,8	98,9	118,6	139,0
	5,1	10,0	15,0	20,1	29,7	39,9	59,7	79,1	98,7	118,6	138,8
	4,9	10,1	15,4	20,1	29,8	39,8	59,5	78,9	98,7	118,8	139,7
	4,8	10,1	14,9	20,0	29,5	39,8	59,6	79,2	98,9	118,6	138,8
	5,2	9,9	15,1	19,9	29,9	39,8	59,2	79,0	99,1	119,0	139,0
	5,0	9,9	15,3	20,0	30,0	40,0	59,8	79,5	98,8	119,0	139,0
	4,9	10,1	15,1	20,1	29,8	40,0	59,6	78,6	98,9	119,0	139,0
	5,1	10,1	15,3	20,0	29,6	39,8	59,3	79,5	98,7	118,8	139,1
Média (mg)	5,0	10,0	15,2	20,0	29,8	39,9	59,5	79,0	98,9	118,8	139,1
Desvio Padrão (mg)	0,19	0,11	0,25	0,07	0,18	0,13	0,26	0,34	0,22	0,18	0,25
Volume (µL) à 20 °C	5,0	10,1	15,3	20,1	29,9	40,0	59,8	79,3	99,3	119,2	139,6
*CV (%)	3,77	1,09	1,64	0,35	0,60	0,32	0,44	0,43	0,22	0,15	0,18

O volume determinado a 20,0 °C foi calculado de acordo a fórmula descrita na ISO 4787, como explicada na metodologia do item 3.4. Sendo possível através das medidas de massas, converter nos volumes correspondentes.

*Para o cálculo dos valores de CV foi mantido os valores do desvio padrão em massa (mg) em vez de volume (µL), pois os resultados do desvio padrão praticamente não seriam alterados, consequentemente, inalterados os cálculos de CV.

Com os dados do melhor resultado, foi possível montar uma curva comparando os valores do volume indicado, V_o , pelo *software*, com o volume aferido, V_i , apresentada na FIGURA 19. O programa Origin®, foi utilizado para os cálculos e construção dos gráficos. Inicialmente foi avaliado a normalidade dos dados utilizando o *Teste de Shapiro-Wilk* para os valores volumétricos e, este foi válido para a todos os dados. Posteriormente, o *Teste F* foi aplicado nas replicatas dos pontos de menor e maior volume da curva para avaliar a homogeneidade das variâncias, e estes foram homocedásticos. Portanto, foi utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários, no intervalo de 95% de confiança para a construção da curva de temperatura do bloco reacional. O valor da equação da regressão linear obtida foi utilizado para corrigir no *software* o valor do volume indicador, V_o .

FIGURA 19: Curva que correlaciona o volume indicado pelo *software* com o volume aferido da microseringa, após a correção no *software*.



O desvio padrão de todos os ensaios dos volumes (μL) analisados foram calculados e optou-se por considerar o desvio padrão de maior variabilidade, ou seja, $\sigma_v = 0,34 \mu\text{L}$ correspondente volume de 80,00 μL (TABELA 1). O resultado obtido pela curva do volume da microseringa mostra a equação da regressão linear, $V_o = 1,0102V_i - 0,1362$. A constante da equação, 0,1362, significa a interceptação da

reta no eixo vertical, V_0 , e por ser um valor próximo a zero, indica quão próximos estão os resultados de V_0 do V_i , mas quando se considera o valor do σ_v , estatisticamente, $V_0 = V_i$. O coeficiente de determinação, $R^2 = 0,9999$, vem para reafirmar quão reprodutíveis são os resultados quando se automatiza as etapas do procedimento. Essa vantagem está entre os principais objetivos da automação na química analítica.

4.3.5. Teste do sistema mecânico e volumétrico do preparador amostral automático

Como teste preliminar da capacidade de repetibilidade mecânica e volumétrica do preparador amostral automático, foram preparadas quatro curvas de calibração para análises cromatográficas. Alguns padrões de esteroides e um padrão de diclofenaco de sódio foram utilizados para a construção de curvas de calibração, capaz de avaliar a linearidade do procedimento analítico.

Os resultados das curvas de calibração dos quatro padrões, apresentados na TABELA 3, obtiveram coeficientes de variação abaixo de 16%. Utilizando o programa Origin®, avaliou-se a normalidade dos dados através do *Teste de Shapiro-Wilk* para os valores das áreas da triplicata de cada concentração e, este foi válido para a todos os dados dos quatro analitos. Posteriormente, o *Teste F* foi aplicado nas replicatas dos pontos de menor e maior concentração da curva para avaliar a homogeneidade das variâncias. Os resultados das curvas analíticas mostraram que os quatro analitos da TABELA 3 são homocedásticos.

TABELA 3: Resultados das curvas de calibração de soluções preparadas no preparador amostral automático.

Analito	Eq. Calibração	Faixa linear (mg L ⁻¹)	R ²	CV	Técnica
Diclofenaco de sódio	$A_i = 43456 C_i - 88163$	25,0 – 125,0	0,9995	4,2	HPLC
Propionato de testosterona	$A_i = 2662 C_i - 11036$	30,0 – 90,0	0,9925	8,9	GC
Isocrapoato de testosterona	$A_i = 2448,2 C_i - 15731$	60,0 – 180,0	0,9944	5,1	GC
Decanoato de testosterona	$A_i = 3503,2 C_i - 48855$	60,0 – 180,0	0,9936	6,5	GC

A TABELA 3 apresenta as equações das retas obtidas, em que C_i é a concentração (mg L⁻¹) e A_i é o valor da área obtida nos cromatogramas. Todos os coeficientes de determinação, R^2 , foram acima de 0,99. Além disso, o coeficiente de variação, CV, é útil porque o desvio padrão dos dados deve ser compreendido no contexto da média dos dados, ou seja, baixos valores de CV testam a precisão dos resultados. De acordo Wood (1999) os valores aceitáveis de CV variam com a concentração para valores de concentração em mg L⁻¹ (10⁻⁶) serem considerados precisos, devem ser menores ou igual a 16%.

Esses resultados atestam favoravelmente a precisão de um sistema automatizado *off-line*. Logo, contribui para melhores resultados porque diminui os possíveis erros aleatórios e sistemáticos causados pelo operador. O equipamento desenvolvido demonstrou ser capaz de manipular volumes com alta precisão.

4.4. Avaliação do procedimento analítico

4.4.1. Escolha dos parâmetros de extração dos aminoácidos derivatizados

O objetivo do estudo de parâmetros de validação do método cromatográfico foi analisar os mesmos aminoácidos derivatizados por Batista (2020) e fazer o estudo comparativo dos resultados dos procedimentos realizados entre as formas manual e

a automatizada. Todavia, foi inviável automatizar todas as etapas e técnicas utilizadas por Batista, portanto, foram selecionados apenas os aminoácidos que apresentaram heterocedasticidade no Teste *F*. O método de extração desenvolvido era baseado na adsorção dos analitos com mNTC (nanotubos de carbono), seguido de dessorção e separação com solventes e pré-concentração com nitrogênio gasoso. Neste trabalho, optou-se por desenvolver um método de extração líquido-líquido, o qual foi otimizada de acordo os parâmetros descritos abaixo.

MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

O método desenvolvido por Batista (2020) usou isooctano como solvente para a etapa de extração de aminoácidos derivatizados por adsorção/dessorção com mNTC (nanotubos de carbono magnéticos). A proposta deste trabalho foi simplificar o método através do uso de extração e/ou pré-concentração líquido-líquido. O método desenvolvido foi baseado nos estudos de Dettmer *et al* (2012) e por Hušek *et al* (1998 e 2005), Kaspar *et al* (2009) e Kritikos *et al* (2015), os quais utilizaram derivatização de aminoácidos com propil cloroformato/propanol.

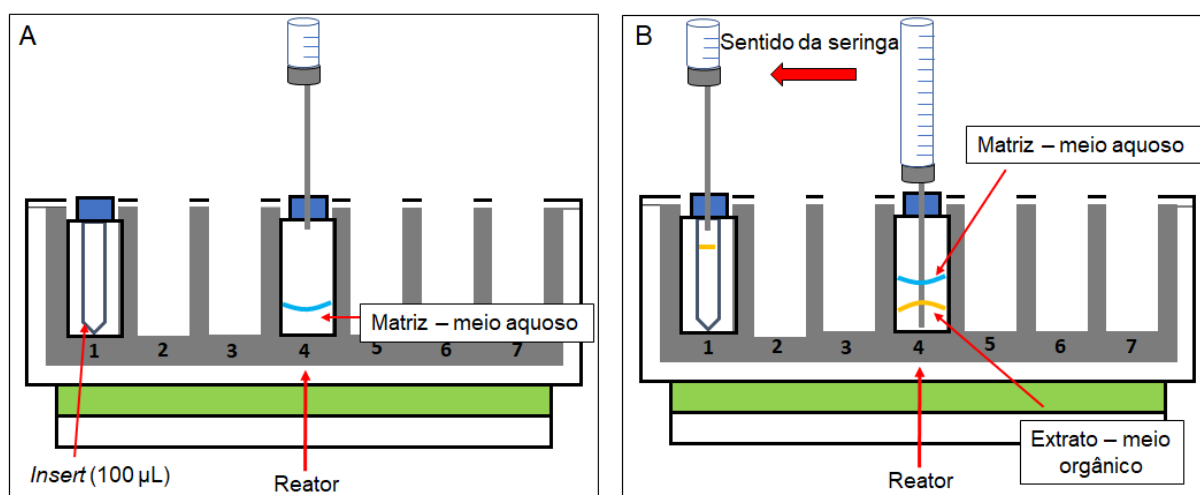
SOLVENTE DE EXTRAÇÃO

Os processos de extração líquido-líquido ocorrem através da distribuição de analitos entre as fases extratora e a matriz. O solvente orgânico deve ter baixa solubilidade ou insolubilidade em água (matriz – meio aquoso); baixa volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração; solubilidade adequada para o analito (BORGES *et al*, 2015; OLIVEIRA, 2008). Além disso, como o preparador amostral é capaz de pipetar até o fundo do frasco, buscou-se um solvente orgânico de maior densidade que a água para facilitar o processo de remoção do extrato do frasco. O QUADRO 3 faz um comparativo entre a água e os solventes isooctano e clorofórmio.

QUADRO 3: Comparativo de solventes de acordo a densidade.

Solvente	Densidade (m g ⁻³)	Fonte
Água (20 °C)	0,998	Salvagnini, Wilson, Densidade de Líquidos. EPUSP – UNIP. Disponível em: http://www.hottopos.com.br/regeg3/densidad .
Isooctano (15 °C)	0,690	https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Isooctane,MDA_CHEM-104718
Clorofórmio (25 °C)	1,49	https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Chloroform,MDA_CHEM-107024

Batista (2020), Dettmer *et al* (2012) e Kaspar (2009) trabalharam com isooctano, mas Hušek *et al* (1998 e 2005) e Kritikos (2015) também obtiveram bons resultados de análise utilizando clorofórmio como solvente de extração. Portanto, optou-se por fazer a extração dos analitos contidos na matriz (fase aquosa) com clorofórmio, porque a sua maior densidade faz com que ele esteja na fase inferior do frasco do reator. A FIGURA 20 ilustra a separação e coleta do extrato (solvente orgânico contendo os analitos após a extração) do meio reacional para que seja analisado posteriormente por cromatografia gasosa.

FIGURA 20: Ilustração do extrato (solvente orgânico mais denso que a matriz) sendo coletado no fundo do reator e sendo separado para análise - GC/MS.

ADIÇÃO DE SAIS

Em sistemas de duas fases, a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica pode ser melhorada com a adição de sais, como cloreto de sódio. A eficiência da extração pode ser aumentada, porque nesse processo as moléculas da fase doadora passam a hidratar os íons adicionados ocorrendo, então, a redução de moléculas de analito dissolvidos na solução aquosa por mecanismos de competição. (BORGES *et al*, 2015; OLIVEIRA, 2008).

Foi testado em triplicata dois tipos de procedimentos, um com adição de solução saturada de NaCl e o outro sem. Utilizou-se uma solução padrão de metionina ($20,0 \text{ mg L}^{-1}$) e para testar o procedimento de derivatização e extração descrito no item 3.4. A TABELA 4 apresenta os resultados das áreas obtidas.

TABELA 4: Comparação do efeito de sais no procedimento de extração de aminoácidos derivatizados – valor da área do cromatograma

Aminoácido	Com adição de sal/Área	Sem adição de sal/Área
Padrão interno/Norvalina	19770 ± 1257	2830 ± 180
Metionina	12029 ± 765	8072 ± 513

A área do padrão interno foi significativamente maior quando se compara os resultados. Houve um aumento de 7 vezes quando se adicionou a solução salina. Não obstante, também houve um aumento no valor da área da metionina. Isso significa que esse parâmetro contribuiu para o processo de extração sendo por isso estabelecido como uma das etapas do procedimento de derivatização dos aminoácidos – item 3.4.

TEMPO DE EXTRAÇÃO

O tempo de extração líquido-líquido é outro parâmetro que contribui para a transferência do analito entre as fases. É um processo de equilíbrio e, portanto, a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de saturação. (BORGES *et al*, 2015; OLIVEIRA, 2008).

O tempo de extração utilizado por Batista (2020) e Kaspar *et al.* (2009) foi de apenas 12 s, feito sob agitação em vortex, que possui alta rotatividade, favorecendo

a interação entre as fases. A agitação entre a matriz e o solvente de extração no bloco reacional do preparador amostral é mais branda, portanto, aumentou-se em cinco vezes este tempo, ou seja, para 60 s ou 1 min. Para verificar se o equilíbrio tinha sido atingido, o mesmo procedimento foi testado aumentando-se o tempo de extração para 5 min.

A TABELA 5 mostra a média dos resultados feitos em triplicata para cada tempo de extração dos aminoácidos derivatizados. O valor apresentado é obtido pela razão entre a áreas do analito e do padrão interno.

TABELA 5: Comparação entre o tempo de extração no procedimento de extração de aminoácidos derivatizados – valor da razão área analito/padrão interno do cromatograma.

Aminoácido	Razão de áreas (1 min)	Desvio Padrão	Razão de áreas (5 min)	Desvio Padrão
Valina	0,994	± 0,050	1,015	± 0,084
Metionina	0,647	± 0,003	0,621	± 0,014
Ácido Glutâmico	0,160	± 0,040	0,154	± 0,038
Lisina	0,244	± 0,044	0,237	± 0,018
Triptofano	0,484	± 0,048	0,404	± 0,046

Observa-se na TABELA 5 que todas as razões das áreas dos picos dos cromatogramas relativos aos aminoácidos, quando associado com a variação do desvio padrão, são estatisticamente iguais. Portanto, escolheu-se o tempo de 1 min para agitação do bloco reacional na etapa de extração dos analitos com clorofórmio.

4.4.2. Determinação da temperatura de derivatização e extração dos aminoácidos

A temperatura do bloco reacional apresenta ótima estabilidade durante o aquecimento, mas não tem função de resfriamento. Por outro lado, nas metodologias de Batista (2020), Kaspar *et al* (2009), Kritikos *et al* (2015) e Hušek *et al* (1998 e 2005) as etapas reacionais à temperatura ambiente são intercaladas com aquecimento. O bloco reacional do preparador amostral ainda não possui uma função capaz de ajustar a temperatura num tempo curto, pode ser uma opção a ser criada em etapas futuras.

Os melhores resultados dos limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) para os aminoácidos valina, metionina, ácido glutâmico, lisina e triptofano foram relatados por Kaspar *et al* (2009) que executou as etapas de aquecimento a 35,0 °C. Portanto, a temperatura de 35,0 °C foi utilizada para as etapas reacional e de extração neste trabalho. Batista (2020) utilizou 60,0 °C, mas se torna inviável uma temperatura tão próxima à temperatura de ebulição do clorofórmio ($T_{\text{ebulição}} = 61,2 \text{ °C}$), solvente de extração, por isso foi descartada essa opção.

4.4.3. Análise da validação dos métodos cromatográficos

A escolha dos cinco aminoácidos deste trabalho foi baseada em alguns dos resultados dos dezessete aminoácidos de Batista (2020). Os aminoácidos: valina, metionina, ácido glutâmico e lisina foram os que apresentaram heterocedasticidade de variância nos valores das áreas utilizados para a construção da curva de calibração de cada aminoácido e, o triptofano nem foi detectado.

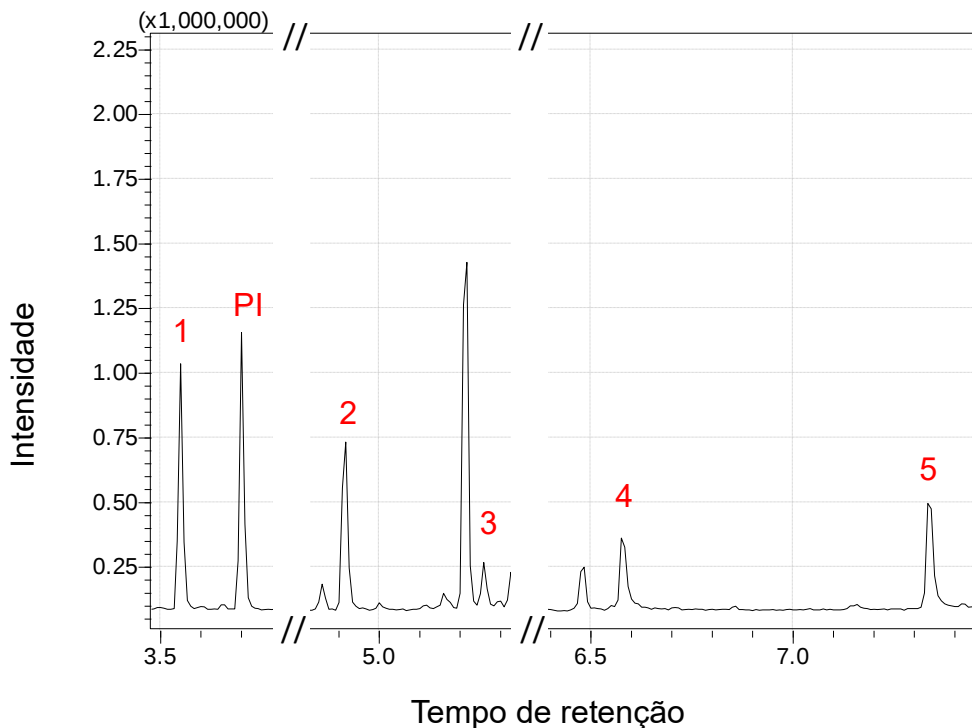
A TABELA 6 apresenta os tempos de retenção e as respectivas massa/carga, m/z , de cada aminoácido derivatizado na solução padrão de 20,0 mg L⁻¹.

TABELA 6: Tempos de retenção cromatográfica e razões m/z dos derivados de aminoácidos analisados por GC/MS.

Pico	Aminoácido	Tempo de retenção (min)	Íons m/z de identificação		Íons m/z de quantificação
1	Valina	3,551	116	158	72
PI	Padrão Interno	3,701	158	72	116
2	Metionina	4,915	61	101	56
3	Ácido Glutâmico	5,258	84	230	170
4	Lisina	6,577	170	84	128
5	Triptofano	7,335	130	131	77

A seletividade do método foi estudada através da técnica de separação cromatográfica, que é avaliada pelas relações massa/carga, m/z , de identificação e quantificação dos íons de cada analito/aminoácido contidos na solução padrão. A FIGURA 21 mostra o cromatograma dos cinco analitos estudados e o padrão interno.

FIGURA 21: Cromatograma obtido no modo *sim* dos cinco aminoácidos, cada um na concentração de 20 mg L^{-1} : 1 – valina, 2 – metionina, 3 – ácido glutâmico, 4 – lisina, 5 – triptofano e PI – padrão interno/norvalina.



Os picos cromatográficos dos analitos analisados, de modo geral, foram bem separados. Entretanto, a baixa intensidade dos picos 3 e 4, ácido glutâmico e lisina, respectivamente, foram obstáculos para tentar construir a curva de calibração em baixas concentrações, intervalo de $1,0$ a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Por isso foi estabelecido o intervalo mínimo de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Cinco curvas analíticas foram construídas para os padrões valina, metionina, ácido glutâmico, lisina e triptofano para determinação da linearidade. O padrão interno, a $200,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, foi mantido constante em todos os procedimentos, volume de $100 \text{ } \mu\text{L}$, para a concentrações de $10,0$ a $35,0 \text{ mg L}^{-1}$ das curvas de calibração. A regressão linear foi feita utilizando-se a razão entre a área do pico analito/padrão interno *versus* concentração.

Através do programa Origin®, foi utilizado para os cálculos e gráficos construídos. Primeiramente, avaliou-se a normalidade utilizando o *Teste de Shapiro-Wilk* para os valores das áreas da triplicata de cada concentração e, este foi válido para a todos os dados dos cinco analitos. Posteriormente, o *Teste F* foi aplicado nas

replicatas dos pontos de menor e maior concentração da curva para avaliar a homogeneidade das variâncias. Os resultados mostraram que valina, metionina, ácido glutâmico, lisina e triptofano foram heterocedásticos. Portanto, foi utilizado o modelo de regressão pelo método dos mínimos quadrados ponderados, no intervalo de 95% de confiança.

Os gráficos das curvas estão no ANEXO III (FIGURA 22). Os resultados das distribuições dos resíduos dispersos aleatoriamente em torno do zero, com variâncias constantes, indicaram boa qualidade de ajuste.

A TABELA 7 apresenta os resultados da linearidade das curvas de calibração.

TABELA 7: Faixas lineares, equações da reta e coeficientes de determinação das curvas de calibração dos aminoácidos.

Aminoácido	Faixa linear (mg L⁻¹)	Equação da curva	R²
Valina	10,0 a 35,0	$y = 0,04094x + 0,13099$	0,9972
Metionina	10,0 a 35,0	$y = 0,04699x - 0,08049$	0,9995
Ácido Glutâmico	10,0 a 35,0	$y = 0,01045x - 0,02006$	0,9904
Lisina	10,0 a 35,0	$y = 0,01642x - 0,06846$	0,9678
Triptofano	10,0 a 35,0	$y = 0,02643x - 0,11991$	0,9970

Os ajustes dos parâmetros desenvolvidos para a derivatização e extração dos aminoácidos foram eficientes. A seletividade do método foi avaliada, pois foi capaz de observar cada analito com picos bem definidos após a comparação com o cromatograma do branco. A linearidade dos resultados das curvas de calibração mostra que amostras reais poderão ser testadas pela metodologia desenvolvida.

A sensibilidade do método não pode ser avaliada, devido à instabilidade do GC-MS em detectar baixos limites de detecção e quantificação, porque o método de derivatização não foi otimizado, por isso trabalhou-se com altas concentrações para as curvas analíticas dos padrões (10,0 a 35,0 mg L⁻¹). A escolha dos melhores parâmetros para derivatização e extração dos aminoácidos, foram baseadas nos trabalhos de Batista (2020), Kaspar *et al* (2009), Kritikos *et al* (2015) e Hušek *et al* (1998 e 2005). Não houve tempo (restrição do uso de laboratório devido à pandemia mundial da Covid-19) para otimizar esse procedimento, apesar que foi capaz de evidenciar a sua aplicabilidade como mostraram os resultados supracitados.

5 – Conclusão

O robô cartesiano proposto para preparar amostras foi construído e o seu sistema operacional foi testado e validado experimentalmente. Testes de linearidade volumétrica e de temperatura comprovaram alta precisão do equipamento nessas funções, $R^2_{\text{VOLUME}} = 0,9999$ e $R^2_{\text{TEMPERATURA}} = 0,9994$. Outras vantagens são: preparar pelo menos dez soluções simultaneamente e, realizar até sete reações simultaneamente sob agitação/aquecimento. O preparo das soluções/reações é feito em sistema fechado, frascos com tampa/septo, o que minimiza a perda por evaporação de substâncias voláteis.

A validação do método cromatográfico na determinação de derivados de aminoácido foi avaliada por meio dos parâmetros de seletividade e linearidade. O método mostrou ser seletivo para os 5 aminoácidos pré-selecionados. O intervalo linear da faixa de concentração foi de 10,0 a 35,0 mg L⁻¹, $R^2 > 0,9678$.

Em um único equipamento desenvolvido, foi capaz de agrupar funções de vários instrumentos de laboratório. A utilização de uma seringa do preparador amostral é capaz de substituir várias micropipetas e ponteiras, o bloco reacional substitui o uso de pelo menos dois equipamentos como uma chapa aquecedora/banho maria e um vortex. Outra vantagem observada foi a possibilidade de realizar ensaios químicos em sistemas fechados, o que minimiza a evaporação de compostos voláteis e evita a contaminação pelo ar de amostras e reagentes.

A versatilidade desse preparador amostral automático vai além das aplicações desenvolvidas neste trabalho. Ele executa funções que são responsáveis pelos principais parâmetros de estudos de otimização de processos. Além do fato de garantir maior repetibilidade/precisão de resultados, minimizando erros aleatórios.

Trabalhos futuros poderão explorar o acoplamento do preparador amostral ao analisador (automatização *at-line*), implementar sistemas de resfriamento, desenvolver outras técnicas de separação/concentração dos analitos e analisar amostras reais.

Referências

- ADAIME, M. B. Cromatografia - fundamentos, instrumentação e aplicações. **Departamento de Química/UFSM**, 2013.
- ARNAULD, C. H. What could chemistry do with more expensive instruments?. **Analytical Chemistry**, v.95. ed. 13, 2017.
- BARRETO, I.S.; ANDRADE, S. I. E. *et al.* A Robotic Magnetic Nanoparticle Solid Phase Extraction Sytem Coupled to Flow-Batch Analyzer and GFAAS for Determination of Trace Cadmium in Edible Oils Without External Pretreatment. **Talanta**, v. 178, p. 384-391, 2018.
- BASKAL, S.; BOLLENBACH, A.; TSIKAS, D. Two-step derivatization of amino acids for stable-isotope dilution gc–ms analysis: Long-term stability of methyl ester-pentafluoropropionic derivatives in toluene extracts. **Molecules**, v. 26, n. 6, 2021.
- BATISTA, E.; FILIPE, E.; AZEVEDO, M. Metodologias de validação na calibração de instrumentos volumétricos. p. 1–8, 2004.
- BATISTA, J. M. Aplicação de cromatografia a gás e extração por mNTC em estudos de metabolômico de contaminação ambiental por poluentes emergentes. **Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de química**, Belo Horizonte, 2020.
- BATISTA, J. M. *et al.* Metabolomic studies of amino acid analysis in *Saccharomyces* cells exposed to selenium and gamma irradiation. **Analytical Biochemistry**, v. 597, n. March, p. 113666, 2020.
- BIANCHI, F. *et al.* Regulation of Amino Acid Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1–38, 2019.
- BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos**. GEN, Ed.1, 2015.
- BUSTILLOS, Oscar Vergas. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Analytica**. São Paulo, fev/mar, 2020. Disponível em: <<[https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-a-gas-acoplada-a-espectrome tria-de-massas-gc-ms/](https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-a-gas-acoplada-a-espectrome-tria-de-massas-gc-ms/)>>. Acesso em 03/08/2021.
- CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica: Definições, Estado-Da-Arte E Aplicações Representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.
- CARVALHO, M. C.; MURRAY, R. H. Osmar, the open-source microsyringe autosampler. **HardwareX**, v. 3, n. January, p. 10–38, 2018.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introducao a Métodos Cromatograficos**. Unicamp, ed. 7, 1997.

CURTIUS, A. J. A química analítica. **Química Nova**, p. 134 - 137, 1982.

DAVIS, J. FOSTER, S. W.; GRINIAS, J.P. Low-Cost and *Open-Source* Strategies for Chemical Separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1638, p. 1-22, 2021.

DETTMER, K. et al. Amino Acid Analysis in Physiological Samples by GC-MS with Propyl Chloroformate Derivatization and iTRAQ-LC-MS/MS. **Methods in Molecular Biology**, p. 173–190, 2012.

DONADEL, J. Z. Determinação por cromatografia em fase gasosa de aminoácidos livres em salames submetidos a ultrassom. **Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, 2015.

DONG, J. et al. Association analyses identify multiple new lung cancer susceptibility loci and their interactions with smoking in the Chinese population. **Nature Genetics**, v. 44, n. 8, p. 895–898, 2012.

EBUBEKIR, B.; NURINNISA, O.; NURCAN, K. B. Klinik laboratuvar otomasyonu: Çeşitli analitik ve laboratuvar içi pre- ve post-analitik sistemlerin entegrasyonu. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1–13, 2017.

NOBUO, O. ; MANTOVANI, S. C. A. Projeto de Robôs Móveis. **Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira- Departamento de Engenharia Elétrica**, 2013.

FEI, Q. et al. Combining NMR and MS with chemical derivatization for absolute quantification with reduced matrix effects. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 6, p. 4055–4062, 2019.

GRINIAS, J. P.; WHITFIELD, J. T. *et al.* An Inexpensive, Open-Source USB Arduino Data Acquisition Device for Chemical Instrumentation. **J. Chem. Educ.** 93, 7, p. 1316-1319, 2016.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: Principles and applications**. Wiley 3a ed. 2007.

HOLLAND, I.; DAVIES, J. A. Automation in the Life Science Research Laboratory. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. November, p. 1–18, 2020.

HUŠEK, P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. **Journal of chromatography B**, v.717 (1 – 2), n. Oct 9, p. 57 – 91, 1998.

HUŠEK, P. 1.1.1. Quantitation of amino acids as chloroformates-A return to gas chromatography. **Journal of Chromatography Library**, v. 70, n. C, p. 2–38, 2005.

HUŠEK, P.; ŠIMEK, P. Alkyl Chloroformates in Sample Derivatization Strategies for GC Analyses. Review on a Decade Use for the Reagents as Esterifying Agents. **Current Pharmaceutical Analyses**, 2, p.23-43, 2006.

KASPAR, H. et al. Advances in amino acid analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 445–452, 2009.

KASPAR, H; DETTMER, K. *et al.* Automated GC-MS Analysis of Free Amino Acids in Biological Fluids. **Journal of Chromatography B**, v.870, p. 222-232, 2008.

KHUHAWAR, M. Y.; MAJIDANO, S. A. GC analysis of amino acids using trifluoroacetylacetone and ethyl chloroformate as derivatizing reagents in skin samples of psoriatic and arsenicosis patients. **Chromatographia**, v. 73, n. 7–8, p. 701–708, 2011.

KRITIKOS, N. *et al.* Liquid chromatography coupled to quadrupole-time of flight tandemmass spectrometry based quantitative structure-retentionrelationships of amino acid analogues derivatized via n-propylchloroformate mediated reaction. **Journal of Chromatography A**, v. 1403, p. 70–80, 2015.

KUBÍNOVÁ, S.; SLÉGR, J. ChemDuino: Adapting Arduino for Low-Cost Chemical Measurements in Lecture and Laboratory. **J. Chem. Educ.** 92, 10, p. 1751-1753, 2015.

MAJORS, R. Sample Preparation Fundametal for Chormatography. **Agilent Technologies, Mississauga, Canada**, p. 364, 2013.

Medição de dados experimentais, incerteza e propagação de erro. Faculdade de Engenharia Mecânica – Unicamp. Campinas. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~instmed/Incerteza.htm>>. Acesso em 12 de julho de 2021.

MEDINA, D. A. V. Aplicações de robótica *open-source* na automatização do preparo de amostras para a análise cromatográfica de compostos orgânicos. **Universidade de São Paulo**. São Carlos, 2018.

MEHR, S. H. M.; CRAVEN, M. *et al.* A Universal System for Digitization and Automatic Execution of the Chemical Synthesis Literature. **Organic Chemistry**, 307, p. 101-108, 2020.

MINK, T. *et al.* Determination of efficacy of fingerprint enhancement reagents; the use of propyl chloroformate for the derivatization of fingerprint amino acids extracted from paper. **Science and Justice**, v. 53, n. 3, p. 301–308, 2013.

MOLDOVENEANU, S; DAVID, V. **Modern Sample Preparation for Chromatography**. Ed. 2, 2021.

MORENO, A. Análise: "A crise da Ciência e Pesquisa no Brasil é um projeto": os impactos das restrições. **Brasil de Fato**. 12/11/2021. Disponível em: <<<https://www.brasildefato.com.br/2021/11/12/analise-a-crise-da-ciencia-e-pesquisa-no-brasil-e-um-projeto-os-impactos-das-restricoes>>>. Acesso em: 05/01/2022.

NAMIESNIK, S. Estado-da-arte da Química. **Análítica Verde**. Departamento de Química da PUC-Rio. Cap. 3. p. 40-56. n. 2010, 2011.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A. *et al.* **Cromatografia Gasosa - Aspectos teóricos e práticos**. Imprensa Universitária UFC. Fortaleza. 2018.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S. *et al.* Microextração em Fase Líquida: Fundamentos da Técnica e Aplicações na Análise de Fármacos em Fluidos Biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637 - 644, 2008.

OLSEN, K. The first 110 years of laboratory automation: Technologies, applications, and the creative scientist. **Journal of Laboratory Automation**, v. 17, n. 6, p. 469–480, 2012.

DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre os métodos de validação. **Coordenação Geral de Acreditação - INMETRO**. 5 de Agosto de 2016. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf>>. Acesso em: 16/07/2021.

PIRES, B. Ciência brasileira sofre com cortes de verbas e encara cenário dramático para pesquisas em 2021. **El País**. 30/12/2020. Disponível em: <<https://brasil.elpais.com/brasil/2020-12-31/ciencia-brasileira-sofre-com-cortes-de-verbas-e-encara-cenario-dramatico-para-pesquisas-em-2021.html>>. Acesso em: 05/01/2022.

RAYNIE, D. E. Trends in Sample Preparation. **LCGC - North American**, v. 34, n. 3, p. 174-188, 2016.

SCHWAB, K. The fourth industrial revolution: What it means, how to respond. **World Economic Forum**. 2016. Disponível em: <<https://www.weforum.org/agenda/2016/01/the-fourth-industrial-revolution-what-it-means-and-how-to-respond/>>. Acesso em 14/02/2022.

SILVA, M. R. DA. Novas estratégias de preparo de amostras complexas para a determinação de sulfonamidas. **Universidade de São Carlos - Instituto de química**, São Carlos, 2017.

STEVENS, T. M. Rapid and Automatic Filtration. **Am. Chemist**, v. 6, p.102-106,1875.

THE FITNESS FOR PURPOSE OF ANALYTICAL METHODS – A LABORATOY GUIDE TO METHOD VALIDATION AND RELATED TOPICS. **Eurachem Guide**. Ed. 2. 2014.

THE IMPORTANCE OF THE NEW ANALYTICAL TECHNIQUES AND ITS LABORATOY INSTRUMENTATION. **Interempresas**. 22/02/2010. Disponível em: <<<https://www.interempresas.net/Quimica/Articulos/37875-La-importancia-de-las-nuevas-tecnicas-analiticas-y-su-instrumental-de-laboratorio.html>>>. Acesso em 05/01/2022.

THOMPSON, C. M; POOE, J. L. *et al.* Small Molecule Library Synthesis Using Segmented Flow. **Molecules**, v. 16; p. 9161-9177, 2011.

VILLAS-BÔAS, S. G. DELICADO, D. G. *et al.* Simultaneous Analysis of Amino and Nonamino Organic Acids as Methyl Chloroformate Derivates Using Gas Chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 843, p. 134-138, 2003.

XIE, Z.; PU, H.; SUN, D. W. Computer Simulation of Submicrom Fluid Flow in Microfluidic Chip and Their Applications in Food Analysis. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, p. 3818-3837, 2021.

WELLS, R. J. Recent Advances in non-Silylation Techniques for Gas Chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 1-18, 1999.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, p. 624-632, 1999.

Anexo I

Arquivo de processo da reação de derivatização de aminoácidos.

1	pipetar	frasco 18	159
2	verter	frasco 20	159
3	pipetar	frasco 18	159
4	verter	frasco 20	159
5	pipetar	frasco 18	159
6	verter	frasco 20	159
7	pipetar	frasco 18	159
8	verter	frasco 20	159
9	pipetar	frasco 18	159
10	verter	frasco 20	159
11	pipetar	frasco 10	85
12	verter	frasco 4	85
13	pipetar	frasco 10	80
14	verter	frasco 4	80
15	pipetar	frasco 8	100
16	verter	frasco 4	100
17	pipetar	frasco 18	159
18	verter	frasco 20	159
19	pipetar	frasco 18	159
20	verter	frasco 20	159
21	pipetar	frasco 18	159
22	verter	frasco 20	159
23	pipetar	frasco 19	100
24	verter	frasco 20	100
25	pipetar	frasco 19	100
26	verter	frasco 20	100
27	pipetar	frasco 19	100
28	verter	frasco 20	100
29	pipetar	frasco 11	100
30	verter	frasco 4	100
31	pipetar	frasco 18	100
32	verter	frasco 20	100
33	pipetar	frasco 18	100
34	verter	frasco 20	100
35	pipetar	frasco 18	100
36	verter	frasco 20	100
37	pipetar	frasco 19	100
38	verter	frasco 20	100
39	pipetar	frasco 19	20
40	verter	frasco 20	20
41	pipetar	frasco 19	20
42	verter	frasco 20	20
43	pipetar	frasco 9	10
44	verter	frasco 4	10
45	agitar	ligar	

46	esperar		15
47	agitar	desligar	
48	pipetar	frasco 19	120
49	verter	frasco 20	120
50	pipetar	frasco 19	120
51	verter	frasco 20	120
52	pipetar	frasco 19	120
53	verter	frasco 20	120
54	pipetar	frasco 17	120
55	verter	frasco 4	120
56	pipetar	frasco 18	159
57	verter	frasco 20	159
58	pipetar	frasco 18	159
59	verter	frasco 20	159
60	pipetar	frasco 18	159
61	verter	frasco 20	159
62	pipetar	frasco 18	159
63	verter	frasco 20	159
64	pipetar	frasco 18	159
65	verter	frasco 20	159
66	pipetar	frasco 18	159
67	verter	frasco 20	159
68	pipetar	frasco 18	159
69	verter	frasco 20	159
70	pipetar	frasco 19	159
71	verter	frasco 20	159
72	pipetar	frasco 19	100
73	verter	frasco 20	100
74	pipetar	frasco 19	100
75	verter	frasco 20	100
76	pipetar	frasco 12	80
77	verter	frasco 4	80
78	agitar	ligar	
79	esperar		12
80	agitar	desligar	
81	pipetar	frasco 19	80
82	verter	frasco 20	80
83	pipetar	frasco 19	80
84	verter	frasco 20	80
85	pipetar	frasco 19	80
86	verter	frasco 20	80
87	pipetar	frasco 13	50
88	verter	frasco 4	50
89	agitar	ligar	
90	esperar		12
91	agitar	desligar	
92	esperar		60
93	agitar	ligar	
94	esperar		12
95	agitar	desligar	

96	pipetar	frasco 19	60
97	verter	frasco 20	60
98	pipetar	frasco 19	60
99	verter	frasco 20	60
100	pipetar	frasco 19	60
101	verter	frasco 20	60
102	pipetar	frasco 16	125
103	verter	frasco 4	125
104	pipetar	frasco 16	125
105	verter	frasco 4	125
106	pipetar	frasco 18	159
107	verter	frasco 15	159
108	pipetar	frasco 18	159
109	verter	frasco 15	159
110	pipetar	frasco 18	159
111	verter	frasco 15	159
112	pipetar	frasco 18	159
113	verter	frasco 15	159
114	pipetar	frasco 18	159
115	verter	frasco 15	159
116	pipetar	frasco 18	159
117	verter	frasco 15	159
118	pipetar	frasco 18	159
119	verter	frasco 15	159
120	pipetar	frasco 19	159
121	verter	frasco 15	159
122	pipetar	frasco 19	100
123	verter	frasco 15	100
124	pipetar	frasco 19	100
125	verter	frasco 15	100
126	pipetar	frasco 14	125
127	verter	frasco 4	125
128	pipetar	frasco 14	125
129	verter	frasco 4	125
130	agitar	ligar	
131	esperar		60
132	agitar	desligar	
133	esperar		30
134	pipetar	frasco 4	100
135	verter	frasco 1	100
136	pipetar	frasco 19	150
137	verter	frasco 15	150
138	pipetar	frasco 19	150
139	verter	frasco 15	150
140	resetar		

Anexo II

Programa do Preparador Amostral Automático – Autor: Emerson F. Pedroso

```

import serial, time, os, serial.tools.list_ports
# Comprar 1l smoother

def moverZ(numero_de_passosZ): # Sobe e desce um avlor pré determinado de passos ou mm
    codigo_enviar = "PZ"+str(numero_de_passosZ)
    s.write(str.encode(codigo_enviar)) # Envia codigo_enviar para o arduino a partir da porta serial já aberta
    while s.in_waiting!= 23: # Monitora a porta serial aguardando o retorno do arduino - 23 caracteres sao esperados
        no_op = 0
        #time.sleep(1)
    retorno = s.read(23)

def mover_para_frasco(frascoN): # Desloca na direção X para centralizar em um frasco especifico Frasco 1,2,3 etc
    codigo_enviar = "PX"+str(posicao_frascos[frascoN])
    s.write(str.encode(codigo_enviar)) # Envia codigo_enviar para o arduino a partir da porta serial já aberta
    while s.in_waiting!= 23: # Monitora a porta serial aguardando o retorno do arduino - 23 caracteres sao esperados
        no_op = 0
    retorno = s.read(23)

def pipetar(volume): # Move o motor de passo um numero que é relacionado ao volume de solução pipetada
    global posicao_pipetaZ
    # declara que a variável usada será global.
    numero_de_passos = posicao_pipetaZ + float(volume)*59.375 + 47.499 # MAXIMO de 159 microlitros faz a conversao de volume
    para numero de passos. 5900 PASSOS = 100 MICROLITROS APROX. **
    codigo_enviar = "PV"+str(int(numero_de_passos)) # A equacao é invertida se comparado ao de verter
    s.write(str.encode(codigo_enviar)) # Envia codigo_enviar para o arduino a partir da porta serial já aberta
    while s.in_waiting!= 17: # Monitora a porta serial aguardando o retorno do arduino - 23 caracteres
        sao esperados
        no_op = 0
    retorno = s.read(17)
    time.sleep(3)
    posicao_pipetaZ = numero_de_passos

def verter(volume): # Move o motor de passo um numero que é relacionado ao volume de solução a ser depejada
    global posicao_pipetaZ
    # declara que a variável usada será global.
    numero_de_passos = posicao_pipetaZ - float(volume)*59.375 - 47.499 # MAXIMO de 160 microlitros faz a conversao de volume para
    numero de passos **Lembrar que o embolo deve descer para despejar
    codigo_enviar = "PV"+str(int(numero_de_passos)) # A equacao é invertida se comparado ao de pipetar
    s.write(str.encode(codigo_enviar)) # Envia codigo_enviar para o arduino a partir da porta serial já aberta
    while s.in_waiting!= 17: # Monitora a porta serial aguardando o retorno do arduino - 23 caracteres sao esperados
        no_op = 0
    retorno = s.read(17)
    time.sleep(0.5)
    posicao_pipetaZ = numero_de_passos

def agitar(acao):
    if acao=="liga":
        codigo_enviar = "AG"+"1"
    elif acao=="desliga":
        codigo_enviar = "AG"+"0"
    else:
        codigo_enviar = "" #sai do comando sem fazer nada
    codigo_retorno = ""
    print("Enviando comando para o arduino:",codigo_enviar)

def trata_tarefa(tarefa):
    tarefa=tarefa.rstrip() #Retira o /n do final. Sinal de fim de linha
    tarefa_separada=tarefa.split("\x09") #Separa os dados da linha em tres colunas - Funcao:origen:destino:volume TAB ("\x09")

    if tarefa_separada[1]=="pipetar":
        tarefa_separada[3]=float(tarefa_separada[3])
        print("Etapa {0}:".format(tarefa_separada[0]))
        log.append("Etapa {0}:".format(tarefa_separada[0]))
        print("Pipetando {0} \u03BCL do {1}:".format(tarefa_separada[3],tarefa_separada[2]))
        log.append("Pipetando {0} L do {1}:".format(tarefa_separada[3],tarefa_separada[2]))
        print("Aguarde")
    # Movimentacao do sistema
    moverZ(posicaoZ_alta) # Eleva o sistema de posicionamento para o alto
    mover_para_frasco(tarefa_separada[2]) # Delizar o eixo X para a posição do frasco n
    moverZ(posicaoZ_baixa_pipetar) # Deslizar o eixo Z para a posição próxima ao fundo do frasco
    pipetar(tarefa_separada[3])# Realizar o processo de pipetagem
    moverZ(posicaoZ_alta) # Retornar o pipetador para a posição Z padrão

```

```

log.append("Aguarde")
log.append("Terminado")
print(" ")
log.append(" ")
arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log","w+")
arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
arquivo_log.close()

elif tarefa_separada[1]=="verter":
    tarefa_separada[3]=float(tarefa_separada[3])
    print("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    log.append("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    print("Despejando {0} \u03BCL no {1}.".format(tarefa_separada[3],tarefa_separada[2]))
    log.append("Despejando {0} L no {1}.".format(tarefa_separada[3],tarefa_separada[2]))
    print("Aguarde")
    moverZ(posicaoZ_alta) # Eleva o sistema de posicionamento para o alto
    mover_para_frasco(tarefa_separada[2]) # Delizar o eixo X para a posição do frasco n
    moverZ(posicaoZ_baixa_versar) # Deslizar o eixo Z para a posição de penetração do septo (baixar)
    verter(tarefa_separada[3])# Realizar o processo de pipetagem
    moverZ(posicaoZ_alta) # Retornar o pipetador para a posição Z padrão
    log.append("Aguarde")
    print("Terminado")
    log.append("Terminado")
    print(" ")
    log.append(" ")
    arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log","w+")
    arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
    arquivo_log.close()

elif tarefa_separada[1]=="agitar":
    if tarefa_separada[2]=="ligar":
        print("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
        log.append("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
        print("Agita bloco reacional.")
        log.append("Agita bloco reacional.")
        sreacional.write(str.encode("AG1"))
        while sreacional.in_waiting == 0:
            pass
        # time.sleep(1)
        # time.sleep(1)
        retorno = sreacional.readline()
        # print(retorno.decode("utf-8"))
        print("Comando executado.")
        log.append("Comando executado.")
        print(" ")
        log.append(" ")
        arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log","w+")
        arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
        arquivo_log.close()
        # time.sleep(1)

    elif tarefa_separada[2]=="desligar":
        print("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
        log.append("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
        print("Desliga agitação do bloco reacional.")
        log.append("Desliga agitação do bloco reacional.")
        sreacional.write(str.encode("AG0"))
        while sreacional.in_waiting== 0:
            pass
        # time.sleep(1)
        # time.sleep(1)
        retorno = sreacional.readline()
        # print(retorno.decode("utf-8"))
        print("Comando executado.")
        log.append("Comando executado.")
        print(" ")
        log.append(" ")
        arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log","w+")
        arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
        arquivo_log.close()
        # time.sleep(1)

    else:
        print("Comando não reconhecido na função agita. Opções aceitas: liga ou desliga")
        time.sleep(5)

elif tarefa_separada[1]=="aquecer":
    tarefa_separada[3]=float(tarefa_separada[3])
    print("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    log.append("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    tarefa_separada[3]=float(tarefa_separada[3])
    print("Aquecendo o bloco reacional a {0}oC.".format(tarefa_separada[3]))
    log.append("Aquecendo o bloco reacional a {0}oC.".format(tarefa_separada[3]))

```

```

print("Aguarde") # Arduino responde "Ajustando temperatura:" + comando.substring(2) (os numeros enviados apenas)
log.append("Aguarde")
temperatura_desejada = tarefa_separada[3]
comando_aquecimento = "TB"
comando_enviar = comando_aquecimento+str(temperatura_desejada)
sreacional.write(str.encode(comando_enviar))
while sreacional.in_waiting== 0:
    time.sleep(1)
# Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres são esperados
time.sleep(1)
retorno = sreacional.readline()
# Lê a porta serial e coloca o String em retorno
print(retorno.decode("utf-8"))

# Envia comando para o arduino
# Mede a temperatura a cada 1 segundo e calcula a diferença entre a temperatura anterior e a nova
# Verifica se a temperatura está estável

print("Terminado")
log.append("Terminado")
print(" ")
log.append(" ")
arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log", "w+")
arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
arquivo_log.close()
time.sleep(1)

elif tarefa_separada[1]=="secar": #NÃO USAR ESTA FUNÇÃO AINDA. NÃO IMPLEMENTADA
    tarefa_separada[3]=float(tarefa_separada[3])
    print("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    log.append("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    print("Secando o {0} por {1} segundos com nitrogênio.".format(tarefa_separada[2],tarefa_separada[3]))
    log.append("Secando o {0} por {1} segundos com nitrogênio.".format(tarefa_separada[2],tarefa_separada[3]))
    print("Aguarde")
    log.append("Aguarde")
    time.sleep(tarefa_separada[3])
    print("Terminado")
    log.append("Terminado")
    print(" ")
    log.append(" ")
    arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log", "w+")
    arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
    arquivo_log.close()
    time.sleep(1)

elif tarefa_separada[1]=="limpar": #NÃO USAR ESTA FUNÇÃO AINDA. USAR A PIPETAR E VERTER POR ENQUANTO
    print("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    log.append("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    print("Limpendo a microseringa.")
    log.append("Limpendo a microseringa.")
    print("Aguarde, esta etapa pode demorar!")
    log.append("Aguarde, esta etapa pode demorar!")
    time.sleep(6)
    print("Terminado")
    log.append("Terminado")
    print(" ")
    log.append(" ")
    arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log", "w+")
    arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
    arquivo_log.close()
    time.sleep(5)

elif tarefa_separada[1]=="esperar": #ROTINA AINDA EM TESTES
    print("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    log.append("Etapa {0}.".format(tarefa_separada[0]))
    print("Esperando {0} segundos.".format(tarefa_separada[3]))
    log.append("Esperando {0} segundos.".format(tarefa_separada[3]))
    print("Aguarde!")
    log.append("Aguarde!")
    tempo = int(tarefa_separada[3])
    time.sleep(tempo)
    print("Terminado")
    log.append("Terminado")
    print(" ")
    log.append(" ")
    arquivo_log=open(nome_aquivo.split(".")[0]+".log", "w+")
    arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
    arquivo_log.close()

elif tarefa_separada[1]=="resetar":
    codigo_enviar = "RE"
    print("Iniciando o sistema mecanico. Aguarde.....")
    s.write(str.encode(codigo_enviar)) # Envia codigo_enviar para o arduino a partir da porta serial já aberta
    while s.in_waiting!= 28: # Monitora a porta serial aguardando o retorno do arduino - 23 caracteres sao esperados
        no_op = 0

```

```

        retorno = s.read(28)
        print(retorno.decode("utf-8"))
        time.sleep(2)

    else:
        print("Comando não reconhecido.")

os.system("cls")
opcao=0
posicaoZ_alta = 700 # Número de passos do zero até a posição alta => cuidado, o zero é no alto => Passa sobre todos os frascos
posicaoZ_baixa_pipetar = 2000 # Número de passos do zero até a posição alta => cuidado, o zero é no alto ****. USADO PARA PIPETAR-----
posicaoZ_baixa_versar = 1500 # posicao baixa para versar o liquido => necessário verificar se vai versar em qual frasco. Tem que ser perto da
boca do tubo.
posicao_pipetaZ = 0
#Abaixo está um dicionário com a posicao X de cada frasco
posicao_frascos = {"frasco 1":260,"frasco 2":605,"frasco 3":970,"frasco 4":1345,"frasco 5":1720,"frasco 6":2080,"frasco 7":2430,"frasco
8":4360,"frasco 9":4725,"frasco 10":5095,"frasco 11":5470,"frasco 12":5840,"frasco 13":6195,"frasco 14":6565,"frasco 15":6940,"frasco
16":7310,"frasco 17":7670,"frasco 18":8380,"frasco 19":8870,"frasco 20":9370}
#POSICOES ANTIGAS posicao_frascos = {"frasco 1":300,"frasco 2":650,"frasco 3":1000,"frasco 4":1370,"frasco 5":1760,"frasco
6":2140,"frasco 7":2300,"frasco 8":4440,"frasco 9":4800,"frasco 10":5190,"frasco 11":5550,"frasco 12":5890,"frasco 13":6260,"frasco
14":6640,"frasco 15":6980,"frasco 16":7360,"frasco 17":7720,"frasco 18":8425,"frasco 19":8940,"frasco 20":9400}
time.sleep(1)

while opcao!=8:
    os.system("cls")
    print(" ")
    print(" ")
    print("PROGRAMA PARA CONTROLE DO SISTEMA DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA GC")
    print(" ")
    print(" ")
    print("POR: PROF. Emerson Pedroso e Fabiane Lopes")
    print("CEFET-MG")
    print("VERSÃO:V0.6 SETEMBRO => 2020")
    print(" ")
    print(" Escolha uma opção (número): ")
    print(" 1- Conectar equipamento ao computador ")
    print(" 2- Abrir arquivo de processo ")
    # print(" 2- NAO USAR ESTA FUNCAO #####Testar arquivo de processo: o tempo de processo é reduzido em 10x ")
    print(" 3- Visualizar arquivo de processo ")
    print(" 4- Ajustar temperatura: Usar o comando ATnn.nn Onde n são números ")
    print(" 5- Executar processo ")
    print(" 6- Enviar comandos diretamente ao equipamento **** Olhar lista de comandos no manual :) **** ")
    print(" 7- Esvaziar a pipeta (escolher o frasco de resísuo) ")
    print(" 8- Sair ")
    print(" ")
    opcao=int(input("Opção: "))

    if opcao ==2:
        os.system("cls")
        nome_arquivo=input("Digite o nome completo do arquivo:")
        try:
            print("Abrindo arquivo de processo")
            processo = open(nome_arquivo,"r") #Le arquivo txt
            print(" ")
            print("Arquivo aberto com sucesso!")
            #print(processo.read())

        except:
            print("Arquivo não encontrado")

        print(" ")
        print(" ")
        print(" ")
        input("pressione ENTER para sair")

    elif opcao ==20: # NAO USAR
        os.system("cls")
        nome_arquivo=input("Testando arquivo de processo. Pressione ENTER para começar.")
        print(" ")
        print("Executando a simulação")
        print("Acompanhe o log abaixo:")
        print(" ")
        print(" ")
        #log=[]
        arquivo_log=open(nome_arquivo.split(".")[0]+".log","w+") #cria string para depois gravar o LOG do processo
        processo.seek(0)
        tarefa_n=(processo.readline()) #Lê a primeira linha do arquivo
        while tarefa_n != "": #Enquanto a linha não estiver vazia => executa o loop
            trata_tarefa(tarefa_n) # envia os dados para a realização das atividades
            tarefa_n=(processo.readline())
        time.sleep(3)
        input("Simulação terminada, verifique se todas as etapas estão corretas e pressione ENTER.")

    elif opcao ==3:
        os.system("cls")

```

```

try:
    processo.seek(0)
    print(processo.read())
    input("pressione ENTER para sair")
except:
    print("Inicialmente você deverá abrir o arquivo usando a opção 2")
    input("Pressione ENTER para sair")

elif opcao ==5:
    os.system("cls")
    print("Executando o processo")
    print("Acompanhe o log abaixo:")
    print(" ")
    log=[]
    arquivo_log=open(nome_arquivo.split(".")[0]+".log","w+") #cria string para depois gravar o LOG do processo
    processo.seek(0)
    tarefa_n=(processo.readline()) # Lê a primeira linha do arquivo
    print("Começar em 3")
    time.sleep(1)
    print("Começar em 2")
    time.sleep(1)
    print("Começar em 1")
    time.sleep(1)
    while tarefa_n != "": #Enquanto a linha não estiver vazia => executa o loop
        try:
            trata_tarefa(tarefa_n) # envia os dados para a realização das atividades
            tarefa_n=(processo.readline()) # Lê a próxima linha do arquivo de atividades
        except KeyboardInterrupt:
            print("")
            print("Você suspendeu a execução desta etapa de forma voluntária. Escolha uma das opções
            abaixo:")

            print("1 - Cancelar todas as tarefas restantes")
            print("2- Pausar o programa por um tempo")
            print("3- Ir direto para uma etapa específica (Atenção e necessidade de limpeza da seringa antes de
            voltar/pular etapas)")

            opcaobreak = int(input("Opção: "))
            if opcaobreak ==1:
                break

            if opcaobreak ==2:
                input("Tecla ENTER quando quiser para que o programa na próxima etapa. Atenção,
                caso esta interrupção seja feita em uma etapa PAUSAR ela será cancelada")
                # O programa envia os comandos para o microcontrolador e o mesmo executa as
                tarefas e envia um resultado quando termina.
                # Não sei o que ocorre quando uma etapa é suspensa. Talvez o microcontrolador envia um
                comando para o buffer da serial. isso vai atrapalhar as outras etapas.
                # Este buffer deve ser limpo. Então uma rotina de leitura do buffer deve ser realizada
                aqui. mas somente se for em uma rotina que envolve o microcontrolador.
                # A unica rotina que não envolve microcontrolador é a ESPERAR.

            if opcaobreak ==3:
                novo_ponto_recomeco = int(input("Escolha o número da tarefa que você deseja que o
                sistema retorne a execução: "))

                processo.close # Fecha arquivo txt
                processo = open(nome_arquivo,"r") # Abre arquivo txt
                a=1
                while a < novo_ponto_recomeco: # lê a cada linha do arquivo até chegar na linha de
                onde quer que pare. Neste momento ele sai do loop e lê a linha certa.
                    tarefa_n=(processo.readline())
                    a=a+1
                tarefa_n=(processo.readline())
                print("")
                print("")

            #time.sleep(3)
            arquivo_log.write('\n'.join(map(str, log)))
            arquivo_log.close()

    elif opcao ==4:
        comando_enviar=input("Digite ATn.nn, onde n é a temperatura desejada: ")
        if comando_enviar[0:2] == "AT":
            sreacional.write(str.encode(comando_enviar))
            while sreacional.in_waiting == 0:
                time.sleep(1)
            # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres são esperados
            time.sleep(1)
            retorno = sreacional.readline()
            # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
            print(retorno.decode("utf-8"))

        else:
            print("Opção inválida, tente novamente")

```

```

        time.sleep(2)
    n = 0
    ## medir a temperatura até a tecla nnn ser teclada
    while n<36000 : #Enquanto numero de temperaturas <1000 faça
        try:
            sreacional.write(str.encode("TB"))
            time.sleep(3)
            retorno = sreacional.readline()
            # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
            P1 = " "
            retorno2 = retorno.decode("utf-8")
            print(time.strftime("%H:%M:%S")+P1+retorno2, end="")
            #
            print(retorno2, end="")
            n = n+1

        except KeyboardInterrupt:
            print("")
            print("Você suspendeu a execução desta etapa de forma voluntária. Escolha uma das aopções
abaixo:")

            break
            time.sleep(1)

elif opcao ==1:
    os.system("cls")
    # Limpa tela
    ports = list(serial.tools.list_ports.comports()) # Lista as portas seriais disponíveis
    numero_portas = len(ports)
    #
    #porta_A = ports[0]
    print(type(porta_A))
    #
    #print(porta_A.index(" "))
    print("Foram encontras",numero_portas,"portas no sistema")
    #
    # time.sleep(10)
    for p in ports:
        print(p)
        # Imprimir a lista de portas seriais disponíveis
    porta_escolhida=input("Escreva nome da porta do bloco reacional:")
    sreacional = serial.Serial(port=porta_escolhida, baudrate=9600) # Abre a porta do bloco reacional
    print("Porta aberta.")
    print(" ")
    print(" ")
    print("Iniciando bloco reacional. Aguarde.....")
    retorno = sreacional.read(25)
    print(retorno.decode("utf-8"))
    porta_escolhida=input("Escreva nome da porta do sistema mecanico: ")
    s = serial.Serial(port=porta_escolhida, baudrate=9600) # Abre a porta do sistema mecanico
    print("Porta aberta.")
    print(" ")
    print(" ")
    print("Iniciando o sistema mecanico. Aguarde.....")
    retorno = s.read(28)
    print(retorno.decode("utf-8"))
    time.sleep(2)
    input("Pressione ENTER para sair") # Solicita a saída da rotina apertando enter.

elif opcao ==6:
    os.system("cls")
    comando_enviar=input("Digite o comando: ")
    if comando_enviar[0:2] == "AT":
        sreacional.write(str.encode(comando_enviar))
        while sreacional.in_waiting == 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres sao esperados
        time.sleep(1)
        retorno = sreacional.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))

    elif comando_enviar[0:2] == "AG":
        sreacional.write(str.encode(comando_enviar))
        while sreacional.in_waiting== 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres sao esperados
        time.sleep(1)
        retorno = sreacional.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))

    elif comando_enviar[0:2] == "TB":
        sreacional.write(str.encode(comando_enviar))
        while sreacional.in_waiting== 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres sao esperados
        time.sleep(1)

```

```

        retorno = sreacional.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))

    elif comando_enviar[0:2] == "PX":
        s.write(str.encode(comando_enviar))
        while s.in_waiting == 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres são esperados
        time.sleep(1)
        retorno = s.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))

    elif comando_enviar[0:2] == "PZ":
        s.write(str.encode(comando_enviar))
        while s.in_waiting == 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres são esperados
        time.sleep(1)
        retorno = s.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))

    elif comando_enviar[0:2] == "PV":
        s.write(str.encode(comando_enviar))
        while s.in_waiting == 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres são esperados
        time.sleep(1)
        retorno = s.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))

    elif comando_enviar[0:2] == "RE":
        s.write(str.encode(comando_enviar))
        while s.in_waiting == 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres são esperados
        time.sleep(1)
        retorno = s.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))

    else:
        print("Opção inválida, tente novamente")
        time.sleep(2)

    input("pressione ENTER para sair")
    time.sleep(1)

    elif opcao == 7:      # Esvaziar pipeta
        os.system("cls")
        frasco_descarte = input("Digite o número do frasco onde será esvaziada a pipeta. Usar Frasco N, onde N é o número do
frasco: ")

        moverZ(posicaoZ_alta)      # Eleva o sistema de posicionamento para o alto
        mover_para_frasco(frasco_descarte) # move para frasco descarte
        moverZ(posicaoZ_baixa_versar)
        print("Pipeta sendo esvaziada, aguarde")
        s.write(str.encode("PV0"))
        while s.in_waiting == 0:
            time.sleep(1)
        # Monitora a porta serial aguardando o retorno da inicialização dos 3 motores - 23 caracteres são esperados
        time.sleep(1)
        retorno = s.readline()
        # Lê a porta serial e coloca o String em retorno
        print(retorno.decode("utf-8"))
        moverZ(posicaoZ_alta)      # Eleva o sistema de posicionamento para o alto
        print("Pipeta esvaziada. Verificar necessidade de realização de limpeza.")
        input("Pressione ENTER para sair")
        posicao_pipetaZ = 0

    elif opcao == 8:
        # os.system("cls")
        s.close()
        sreacional.close()
        print("Exit.....")

    else:
        print("Opção inválida, tente novamente")
        time.sleep(2)

time.sleep(1)
os.system("cls")

```

ANEXO III

FIGURA 22: Curvas de calibração dos derivados de aminoácidos determinados por GC/MS que se adequaram à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados.

