



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

Dissertação de Mestrado

**Método Automático para Determinação Fotométrica
Direta de Fe (III) em Amostras de Óleos Comestíveis**

Maria Daisy Oliveira da Nóbrega

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2013



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

Dissertação de Mestrado

Método Automático para Determinação Fotométrica Direta de Fe (III) em Amostras de Óleos Comestíveis

Maria Daisy Oliveira da Nóbrega*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida

*** Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2013

N754m Nóbrega, Maria Daisy Oliveira da.

Método automático para determinação fotométrica direta de Fe (III) em amostras de óleos comestíveis / Maria Daisy Oliveira da Nóbrega.- João Pessoa, 2013.

62f. : il.

Orientador: Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima

Coorientador: Luciano Farias de Almeida

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

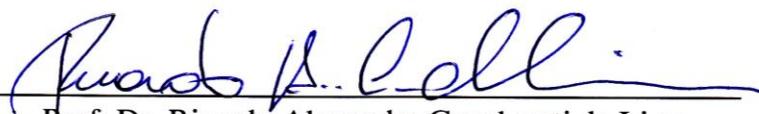
1. Química. 2. Analisador fluxo-batelada. 3. Calibração in-line.
4. Determinação de Fe(III). 5. Óleo comestível. 6. Matrizes viscosas.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

“Um método automático para determinação fotométrica direta de Fe(III) em amostras de óleos combustíveis”

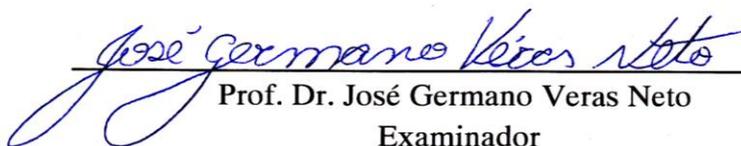
Dissertação de Mestrado de Maria Daisy Oliveira da Nóbrega aprovada pela banca examinadora em 29 de agosto de 2013:



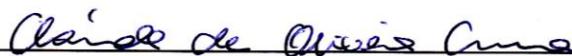
Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
2º. Orientador



Prof. Dr. José Germano Veras Neto
Examinador



Profa. Dra. Cláudia de Oliveira Cunha
Examinadora

*Dedico esta Dissertação a meu Pai,
Hotúlio, a quem devo minha criação e
dedico todo meu amor, aos meus
irmãos, Hotúlio Júnior e Hotonni pelo
companheirismo e a todos os meus
amigos que me deram apoio.*

Agradecimentos

- A Deus, por sempre me abençoar e me guiar pelos caminhos certos;
- A meu pai, Hotúlio José da Nóbrega, por todo o amor e bons ensinamentos;
- Aos meus irmãos, Hotúlio Jr e Hotonni, pela amizade, companheirismo;
- A minha tia Marleide, pelos vários conselhos e ajudas que me levaram a chegar até aqui;
- Aos professores Luciano Farias de Almeida e Ricardo Alexandre Cavalcanti de Lima, pela orientação e ensinamentos transmitidos em todo o mestrado;
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo, pelo acolhimento no LAQA e pelos ensinamentos transmitidos no mestrado;
- Aos amigos Marcelo Batista de Lima e Francisco Antônio da Silva Cunha pelo apoio, contribuição e ajuda em todos os momentos na realização deste trabalho;
- Aos amigos Gláucio Jefferson, Anabel, Rômulo Wilker, Diego Araújo, Eduardo Matos, Camylla Brandão, Saloana Santana, Willy, Renato Alan, Aline Santos, Daniel Jackson e a todos do LAQA, pela amizade e pela ajuda que de alguma forma me levaram até aqui;
- Ao CNPQ, pela bolsa concedida.

Sumário

Lista de Figuras	VIII
Lista de Siglas e Abreviaturas	XI
Resumo.....	XII
Abstract	XIII
Capítulo 1 Introdução	1
1.1 Caracterização da problemática.....	2
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Geral.....	3
1.2.2 Específicos	3
1.3 Óleos comestíveis	4
1.4 Determinação de Fe(III) em óleo comestível.....	7
1.5 Sistemas automáticos de análise	9
1.5.1 Analisador em Fluxo-Batelada	10
1.6 Análise de matrizes viscosas em sistemas em fluxo	13
Capítulo 2 Experimental.....	15
2.1 Reagente, amostras e soluções	16
2.2 Material e equipamento.....	16
2.2.1 Analisador fluxo-batelada proposto	16
2.3 Procedimento do FBA proposto para a determinação de Fe (III) em óleos comestíveis	21
2.4 Procedimento para o método de referência.....	25
2.5 Procedimentos de avaliação do fluxo-batelada proposto	26
Capítulo 3 Resultados e Discussão	29
3.1 Parâmetros do analisador fluxo-batelada	30
3.2 Validação da curva analítica para determinação de Fe (III).....	34
3.3 Aplicações analíticas do FBA proposto	36
3.4 Determinação analítica de Fe (III) em óleos comestíveis	37
3.5 Comparação do FBA proposto com outros sistemas	37
Capítulo 4 Conclusão	39

4.1 CONCLUSÃO	40
4.2 PERSPECTIVAS	41
Referências.....	42

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Reação de esterificação entre o glicerol e ácidos graxos saturados na produção de triacilgliceróis.	5
Figura 1.2 - Bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos em um sistema FBA. (a) motor de passos (b) câmara de mistura (c) visualização interna da câmara de mistura com o pistão inserido em seu interior. As setas indicam os sentidos de movimento do pistão.	12
Figura 2.1 - Diagrama esquemático FBA proposto. Câmara de mistura (CM), bomba peristáltica (BP), haste de mistura (h), motor de drive de DVD (MD), diodo emissor de luz (LED, $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$), fototransistor (FT), válvulas solenoides (V1, V2, V3, V4 e V5), amostra ou solução padrão (A), metil isobutil cetona (R1), tiocianato de amônio (R2), metanol/clorofórmio (25:75) para solução de limpeza (L) e descarte (D).	17
Figura 2.2 - Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009 ^[49]	19
Figura 2.3 - Interface do programa de controle do FBA proposto.	20
Figura 2.4 - Interface do programa para realizar o estudo de calibração das válvulas solenoides do FBA proposto.	21
Figura 2.5 - Diagrama de tempos (em segundos) usado na etapa de enchimento de canais. t_{V1} , t_{V2} , t_{V3} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3, V4 e V5, respectivamente.	22
Figura 2.6 - Diagrama de tempos (em segundos) usado no procedimento de medida do branco. t_{V2} , t_{V3} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V2, V3 e V5, respectivamente.	23
Figura 2.7 - Diagrama de tempos (em segundos) usado na etapa de obtenção da curva de calibração. Onde, t_{V1} , t_{V2} , t_{V3} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3 e V5, respectivamente.	24

Figura 2.8 - Diagrama dos tempos (em segundos) usada para a limpeza da câmara de mistura e troca de amostra. t_{V1} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V4 e V5, respectivamente.	25
Figura 3.1 - Estudo da concentração ótima de tiocianato de amônio (representado por SCN^-).....	32
Figura 3.2 - Estudo do tempo ótimo de homogeneização.	33
Figura 3.3 - Estudo da concentração ótima da solução de limpeza clorofórmio em metanol (v/v %).	34

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Parâmetros de qualidade de óleos comestíveis ^[6]	6
Tabela 3.1 - Parâmetros selecionados do FBA proposto para o procedimento de determinação de Fe (III) em óleo comestível.....	30
Tabela 3.2 - Valores de LOD e LOQ em mg L ⁻¹ para a determinação de Fe (III), estimados ao nível de 95% de confiança.	35
Tabela 3.3 - Valores das concentrações (n = 3) das amostras de óleos comestíveis para a determinação de Fe (III) em mg kg ⁻¹ utilizando o FBA proposto e o espectrofotométrico de referência.....	36
Tabela 3.4 - Teste de recuperação de Fe (III) em óleo comestível (n = 3).....	37
Tabela 3.5 - Quadro comparativo entre as características analíticas do FBA proposto e as de outros procedimentos para determinação de Fe (III) em óleo comestível.....	38

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAS – *Atomic adsorption spectrometry* (espectrometria de absorção atômica)

ANOVA - *Analysis of variance* (análise de variância)

BHA – *Butylated hydroxyanisole* (butil-hidroxi-anisol)

BHT – *Butylated hydroxytoluene* (butil-hidroxi-tolueno)

DPR – Desvio padrão relativo

FB – Fluxo-batelada

FBA – *Flow-batch analyzer* (analisador em fluxo-batelada)

FIA– *Flow injection analyzer* (analisador por injeção em fluxo)

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

LED – *Light emitting diodo* (diodo emissor de luz)

LOD – *Limit of detection* (limite de detecção)

LOQ – *Limit of quantitation* (limite de quantificação)

MIBK - *Methyl isobutyl ketone* (metil isobutil cetona)

MFA – *multicommutation in flow analyser* (analisador em fluxo multicomutado)

MSFA - *Monosegmented flow analyser* (analisador em fluxo monosegmentado)

PG – *Propyl gallate* (propil galato)

PTFE – *Polytetrafluoroethylene* (Politetrafluoroetileno)

SFA - *Segmented flow analyser* (analisador em fluxo segmentado)

SIA - *Sequential injection analyser* (analisador por injeção sequencial)

TBHQ – *Tert-butylhydroquinone* (terc-butil-hidroquinona)

UV-Vis – Espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível

Resumo

Titulo: **Método Automático para Determinação Fotométrica Direta de Fe (III) em Amostras de Óleos Comestíveis**

Neste estudo, um analisador em fluxo-batelada (FBA) foi desenvolvido e seu desempenho foi avaliado na determinação de Fe (III) em óleos comestíveis sem pré-tratamento da amostra. O método utiliza a reação entre os íons Fe(III) e o tiocianato solubilizado em meio orgânico. O complexo vermelho formado foi monitorado utilizando um diodo emissor de luz (LED, $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) e um fototransistor acoplados ao interior da câmara de mistura por meio de fibras ópticas. As soluções-padrão foram preparadas em linha e todas as etapas de análise foram efetuadas através de simples alterações nos parâmetros operacionais no programa de gerenciamento do sistema. Ao comparar os resultados obtidos com o método proposto e com o de referência, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao se aplicar o teste t pareado com nível de confiança de 95%. Para os três tipos de amostras em estudo o desvio-padrão relativo estimado foi menor que $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ ($n = 3$). A frequência analítica foi de 95 h^{-1} , o limite de detecção foi $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $0,013 \text{ mg kg}^{-1}$. Estudos com amostras fortificadas mostraram resultados de recuperação entre 98,4% e 104,2% para ambas as matrizes. De modo geral, o método proposto apresentou melhor desempenho analítico quando comparado com analisadores em fluxo automático anteriores. Assim, o método automático proposto é potencialmente útil como uma alternativa para a determinação de outros íons em amostras semelhantes aos óleos investigados ou em outras matrizes viscosas sem necessidade de um pré-tratamento.

Palavras-chave: Analisador fluxo-batelada; calibração *in-line*; determinação de Fe (III), óleo comestível; matrizes viscosas.

Abstract

Title: **Automatic method for the direct photometric determination of Fe (III) in edible oil samples**

In this study a flow-batch analyzer (FBA) was utilized and its performance was evaluated for the determination of Fe(III) in edible without external pretreatment. The FBA method uses the reaction between Fe(III) and thiocyanate in organic medium. The formed red complex was monitored by employing a light emitting diode (LED, $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) and a phototransistor linked to the mixing chamber by optical fibers. All standard solutions were prepared in-line and all analytical processes were carried out by simply changing the operational parameters in FBA control software. Comparing with the reference method, no statistically significant differences were observed when applying the paired t-test at a 95% confidence level. For the three types of samples studied the estimated standard deviation was less than 0.03 mg kg^{-1} ($n = 3$). The analytical frequency was 95 h^{-1} , the limit of detection was 0.004 mg kg^{-1} and the limit of quantification was 0.013 mg kg^{-1} . The recovery study shows results between 98.4% and 104.2%. The FBA method showed better analytical features when compared with previous automatic flow methods. Thus, the automated method proposed is potentially useful as an alternative for the determination of other ions in similar samples or in other viscous matrices without external pretreatment.

Keywords: Flow-batch analyzer; In-line calibration; Fe (III) determination; Edible oil; Viscous matrices.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Caracterização da problemática

Os métodos oficiais utilizados para a determinação dos parâmetros de qualidade de óleos comestíveis são geralmente os métodos de titulação que são lentos e laboriosos. Estes métodos utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos, incluindo os solventes clorados prejudiciais a saúde e ao meio ambiente [1]. Visando aproveitar-se das vantagens inerentes a analisadores automáticos analíticas tais como: versatilidade, elevada frequência analítica e baixo consumo de reagente e amostra, pode ser uma boa alternativa para a análise de matrizes viscosas, como óleos comestíveis, desde que esses métodos permitam executar a análise em meio orgânico com alta velocidade analítica, boa precisão e baixa produção de resíduos [2].

Contudo, a complexidade das amostras oleosas, sua viscosidade e elevada carga orgânica causam sérias dificuldades em sua análise direta em analisadores em fluxo tradicionais como o sistema de análise por injeção em fluxo (do inglês *Flow-Injection Analysis - FIA*) [1], tornando-se necessário a utilização de um pré-tratamento para solubilização da amostra, gerando contaminação entre amostras, perda de analito e obstrução dos canais. Assim, adaptações nas configurações dos sistemas em fluxo para a análise de amostras oleosas, originam metodologias em que as vantagens inerentes às técnicas em fluxo podem não ser tão evidentes como as observadas na análise de soluções aquosas [3]. Para superar tais inconvenientes, uma alternativa é desenvolver um método automático empregando a técnica de análise fluxo-batelada (*FBA*) [4].

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

- Desenvolver um analisador em fluxo-batelada para determinação de Fe (III) em óleos comestíveis sem pré-tratamento da amostra, utilizando a reação deste íon com tiocianato em meio orgânico

1.2.2 Específicos

- Montar o analisador em fluxo-batelada proposto para a determinação de Fe (III) em óleos comestíveis.
- .Construir um fotômetro usando um diodo emissor de luz (LED, $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) e um fototransistor, ambos conectados à câmara de mistura FBA via fibra óptica.
- Desenvolver um programa para controle das operações do sistema, aquisição e tratamento dos dados obtidos.
- Avaliar o desempenho analítico do analisador proposto em termos dos parâmetros de desempenho analítico.

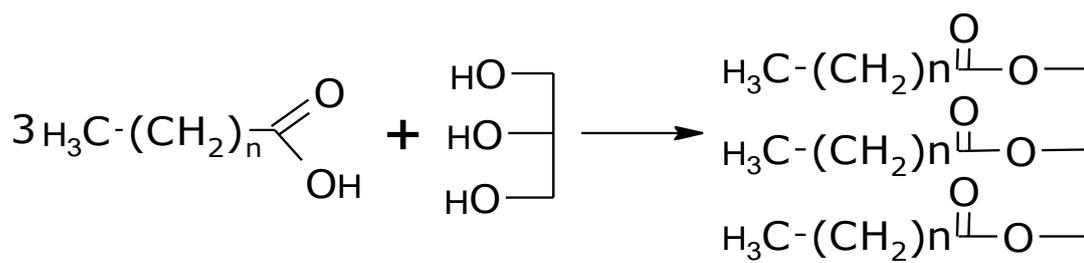
1.3 Óleos comestíveis

Os óleos são líquidos viscosos, geralmente imiscíveis em água, mas solúveis em vários solventes orgânicos [1,3]. São usados na fabricação de alimentos, sabões e velas. Os óleos são ainda utilizados como matéria prima na fabricação de combustíveis, como por exemplo, o biodiesel (composto por uma mistura de alquilésteres de cadeia linear, que pode ser formado a partir de uma reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura com álcoois de cadeia curta na presença de um catalisador) [1].

Os óleos comestíveis podem ser provenientes de vegetais ou gordura animal [1]. Os óleos e gorduras comestíveis são utilizados na dieta humana, com um papel fundamental nos processos metabólicos e bioquímicos, como fonte de energia e na formação e funcionamento das membranas celulares, etc [1, 5].

Os óleos vegetais brutos são compostos por: triglicerídeos, produtos de decomposição dos triglicerídeos, fosfolipídios, esteróis, vitaminas, pigmentos, carboidratos, ceras, hidrocarbonetos, metais (Ca, Mg, Fe, Cu, etc.) e traços de outras substâncias [6].

Os óleos comestíveis são formados predominantemente por ésteres de triacilgliceróis ou triglicerídeos ($\pm 97\%$), que são formados por grupos glicerol e ácidos graxos (Figura 1.1). Os triglicerídeos podem conter diferentes tipos de ácidos graxos saturados ou insaturados. As cadeias saturadas dos ácidos graxos são mais bem empacotadas fazendo com que os triacilgliceróis apresentem ponto de fusão relativamente alto e forma sólida. Por outro lado, os compostos de triacilgliceróis formados a partir de ácidos graxos insaturados apresentam pontos de fusão relativamente baixo e se apresentam na forma líquida à temperatura ambiente [6].



3 ácidos graxos + glicerol → triacilgliceróis

Figura 1.1 - Reação de esterificação entre o glicerol e ácidos graxos saturados na produção de triacilgliceróis.

A qualidade dos óleos e gorduras é ditada por vários parâmetros físicos e químicos, os chamados índices, que são: índice de refração, índice de acidez, índice de iodo, índice de peróxido e índice de saponificação, entre outras determinações ^[6]. Estes parâmetros estão diretamente relacionados com a qualidade da matéria-prima (fonte do óleo), como por exemplo, fatores geográficos, climáticos e variáveis do crescimento agrônômico no caso dos óleos vegetais, bem como as condições do processamento e armazenamento. Assim, os parâmetros de qualidade podem depender em parte do tipo de óleo sob investigação, bem como de outros fatores que podem variar dependendo do interesse e regulamentos que variam de país para país. A **Tabela 1.1** mostra os diferentes parâmetros de qualidade dos óleos comestíveis e suas condições.

Tabela 1.1 - Parâmetros de qualidade de óleos comestíveis [6].

Parâmetros	Condições
Composição e distribuição de ácidos graxos	Percentagem: depende do tipo de matéria prima
Densidade relativa	a 20 °C ou 40°C em relação a água a 20°C (<1)
Índice de refração	a 40 °C
Viscosidade	a 20 °C
Cor	Visual ou colorimétrica
Turbidez	Visual ou instrumental
Ponto de solidificação, conteúdo da gordura sólida e curva de resfriamento	Para ácidos graxos insaturáveis em água
Odor e sabor	Avaliação sensorial (Reação de <i>Kreis</i>)
Índice de saponificação	mg KOH/g
Índice de iodo (IV)	g de iodo/ 100 g de amostra (método Wijs)
Material insaponificável	g/kg
Acidez total	mg KOH/ g
Fumaça, flash e ponto de fogo	°C
Estados de oxidação	
Índice de peróxido (PV)	mg de oxigênio/ 100 g de amostra
Ácido tiobarbitúrico reativo	
Substâncias (TBARS)	µmol/g
para-anisidina (<i>p</i> -Anv)	Ppm
TOTOX	2 PV + <i>p</i> -Anv
OSI, reancimat e valor de AOM	—
Lépidos polares	Percentagem
Polímeros	Percentagem
Substâncias voláteis (%)	a 105°C
Fosforo	Ppm
Ferro, cobre, chumbo e arsênio	Ppm
Cadmio	Ppm
Ácidos graxos trans	Percentagem
Contaminantes e materiais estranhos	—
Incluindo plastificantes (%)	
Carotenóides e clorofila	Ppm
Esqualeno	C ₃₀ H ₅₀
Tocóis	Determinação por HPLC
Antioxidantes sintéticos	BHA, BHT, TBHQ, PQ
Agentes antiespumantes	Dimetilpolisiloxano, isoladamente ou com dióxido de silício
Metais quelantes	Ácido cítrico ou citratos, ácidos fosfórico
Inibidor de cristalização	Impressões digitais utilizado esteróis ou outros componentes menores

Abreviações: BHA *butil-hidroxil-anisol* BHT = *butil-hidroxil-tolueno*; TBHQ = *terc-butil-hidroquinona* e PG = *propil galato*.

A qualidade dos óleos comestíveis está diretamente relacionada com a concentração de metais em nível-traço. Metais em nível-traço, tais como Fe, Cu, Ca, Mg, Co, Ni, e Mn são conhecidos por aumentarem a taxa de oxidação nos óleos, enquanto Cr, Cd e Pb são conhecidas por terem papel importante nos processos metabólicos devido a sua

toxicidade [5, 8-10]. Os metais presentes em óleos comestíveis podem ser de origem natural ou devido ao processo de fabricação, tais como o branqueamento (Fe), o endurecimento (Ni, Cu) e corrosão do equipamento do processamento (Fe, Ni) [11].

1.4 Determinação de Fe(III) em óleo comestível

A auto-oxidação devido à presença de metais em nível-traço em óleos comestíveis produz compostos oxidantes tais como peróxidos, aldeídos, cetonas, ácidos, epóxidos e outras substâncias que podem desenvolver efeitos patológicos no sistema digestivo e aumentar o efeito cancerígeno por reações com outros compostos alimentares, tais como, proteínas e pigmentos [8, 12].

O ferro está presente nos óleos comestíveis na forma de Fe (III). Sua presença nos óleos comestíveis está diretamente relacionada com alteração do sabor e à estabilidade devido ao processo de oxidação. Além disso, o Fe (III) na presença de oxigênio atua como um pré-oxidante durante a oxidação catalítica de hidroperóxidos presentes nos óleos [2]. Por tanto, "The International Olive Oil Council" estabeleceu o limite máximo de 3 mg kg⁻¹ de ferro em óleos [13] e "Codex Alimentarius Commission (FAO/WHO)" estabeleceu um limite máximo de 5 mg kg⁻¹ e 2,5 mg kg⁻¹ de ferro em azeites virgens e óleos refinados, respectivamente [14].

Vários métodos têm sido desenvolvidos e aplicados para a determinação de ferro em óleos comestíveis, geralmente utilizando espectrometria de absorção atômica [5, 11, 15, 16], espectrometria de emissão atômica [9, 16, 17] e espectrometria de massa [8]. No entanto, estes métodos apresentam algumas desvantagens, tais como a baixa frequência analítica, elevado consumo de reagentes e amostra, bem como a necessidade de uma etapa de pré-tratamento da amostra.

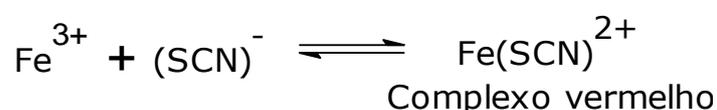
Os sistemas de análise em fluxo também vêm sendo utilizados para a determinação de ferro em óleos comestíveis. Em 1991, Carbonell

[15], desenvolveu um analisador por injeção em fluxo (do inglês: *Flow Injection Analyzer* - FIA) para a determinação direta de cobre e ferro usando espectrômetro de absorção atômica.

Anthemidis et al. [9] desenvolveram um sistema para a formação *on-line* de emulsão com determinação multielementos por espectrometria de emissão atômica. Para isso, foi desenvolvido um sistema SIA utilizado uma câmara de mistura e um agitador magnético para a contínua emulsificação do óleo comestível com Triton X-100 e para a introdução subsequente da emulsão em ICP-AES.

Pinto et al. [2] propôs um analisador por injeção sequencial (do inglês: *Sequential Injection Analyser* - SIA) para a análise de Fe (III) em óleos comestíveis, utilizando o método de reação com tiocianato em meio orgânico formando um complexo vermelho ($\lambda = 520$ nm). A principal vantagem deste método é que a amostra de óleo é analisada diretamente no sistema de fluxo sem que haja a necessidade de uma etapa de pré-tratamento da amostra. Além disso, a utilização de uma câmara de mistura se fez necessário para atingir as ótimas condições de dissolução da amostra.

A reação de Fe^{3+} com o íon tiocianato (SCN^-), a qual produz um complexo de cor avermelhada, é considerada uma reação clássica, descrita pela primeira vez para indicar o ponto final da titulação de prata (Ag^+) em solução de HNO_3 , proposta por Volhard em 1874 [18].



Nos estudos que envolvem a formação de complexos, o tiocianato tem recebido uma atenção especial, pois este íon pode ligar-se ao metal tanto pelo átomo de enxofre (NCS^-), quanto pelo átomo de nitrogênio (SCN^-), resultando em isotiocianato, ambos complexos de grande estabilidade [19-21].

1.5 Sistemas automáticos de análise

Nas últimas décadas, houve um grande aumento na demanda por análises químicas, principalmente nas áreas clínica, de controle ambiental e de controle de qualidade. Surgiu, então, a necessidade de se desenvolver novos métodos e sistemas automatizados que permitissem a obtenção do maior número possível de informações a respeito de uma amostra, que exigisse menos tempo, recursos e esforço humano. A automação de métodos analíticos [22] contribuiu muito para suprir essa necessidade.

Os sistemas automáticos de análise são classificados em três grupos [22]:

- analisadores automáticos discretos ou em batelada;
- analisadores automáticos robóticos;
- analisadores em fluxo.

Os analisadores automáticos discretos ou em batelada caracterizam-se por utilizar um dispositivo mecânico para a transferência da amostra até o detector. A amostra é armazenada em frascos individuais. Os sistemas discretos normalmente simulam as operações que seriam realizadas pelo operador [18, 23]. Além disso, os sistemas discretos podem ser usados quando a amostra for um sólido ou quando a análise necessita de uma amostra moída, pesada, calcinada ou filtrada [23].

Os analisadores automáticos robóticos são caracterizados por efetuarem as operações analíticas utilizando um braço mecânico. A complexidade mecânica, a baixa taxa de amostragem e o custo de aquisição e manutenção torna este sistema inconveniente para seu uso em análises de rotina. No entanto, eles desempenham um importante papel em etapas preliminares do procedimento analítico, como em tarefas que envolvam, por exemplo, a manipulação de substâncias

tóxicas, radioativas e/ou explosivas, evitando a exposição do analista nessas situações.

Os analisadores em fluxo baseiam-se na inserção e processamento da amostra em um fluido transportador que é direcionado até o detector. Os sistemas em fluxo apresentam uma mecânica simples, com baixo consumo de reagente e amostra, atingindo uma alta frequência analítica com a mínima intervenção do operador. Além disso, apresentam poucos componentes como bombas peristálticas e válvulas solenoides e de comutação, por exemplo [24]. Desde o desenvolvimento do primeiro analisador automático em fluxo (*Segmented Flow Analyser* – SFA), em 1957 [8], muitos outros analisadores têm sido propostos ao longo do tempo [4, 25-28].

1.5.1 Analisador em Fluxo-Batelada

O analisador em fluxo-batelada (do inglês: *Flow-batch Analyser* – FBA) foi proposto por HONORATO e colaboradores em 1999 [4]. Este sistema é caracterizado por aliar as vantagens analíticas favoráveis dos sistemas automáticos em batelada (amostra é processada dentro de uma câmara de mistura aberta) e em fluxo (transporte de reagentes, amostra, tampão, etc.) [29].

De maneira geral, nos analisadores fluxo-batelada a adição da amostra, reagentes, soluções padrão, tampão, diluentes, indicadores, na câmara de mistura são realizadas em fluxo usando um processo de multicomutação simultânea e/ou intermitente dos fluidos de acordo com o método analítico desenvolvido.

A amostra é processada em batelada, assim, as medidas podem ser realizadas com a máxima sensibilidade, pois os equilíbrios físico e químico do processo analítico podem ser obtidos e a dispersão ou diluição da amostra pode ou não ocorrer.

A medida do sinal analítico é geralmente feita em fluxo, mas pode ser realizada diretamente na câmara de mistura [4, 29-36].

A principal característica do sistema em fluxo-batelada está na utilização de uma câmara de mistura (pequena peça cilíndrica, geralmente de PTFE). Na câmara de mistura ou câmara reacional ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como por exemplo, a adição, homogeneização, reações e acondicionamento dos fluidos, preparo de soluções de calibração, detecção do analito [4].

Todos os procedimentos descritos acima podem ser controlados com o auxílio de um microcomputador, garantindo dessa forma a reprodutibilidade e velocidade analítica. Além disso, o analisador FB pode ser utilizado para realizar diferentes processos analíticos sem alterar sua configuração física, apenas modificando os parâmetros operacionais do *software* de controle.

Várias aplicações deste sistema têm sido relatadas na literatura como: extração líquido-líquido [30] e digestão [31], análise screening [32], titulação [33], exploração de gradientes de concentração [34], adição de padrão [35], análise multicomponente [36], turbidimetria [37], reação de cinética lenta [38], abordagens explorando quimiluminescência [39], fluorescência [30] e nefelometria [40].

Variantes da configuração básica do FBA têm sido propostas com sucesso. ALMEIDA e colaboradores [41] desenvolveram um sistema FBA utilizando uma bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos (Figura 1.2). Nesse tipo de dispositivo a propulsão é promovida dentro da própria câmara de mistura devido à ação de um pistão pneumático inserido no seu interior. O funcionamento desse sistema é baseado na diferença de pressão dentro da câmara de mistura pelo movimento do pistão. O acoplamento entre a câmara de mistura e o pistão forma a unidade de propulsão do analisador, que funciona de forma similar a uma bomba seringa.

Os volumes dos fluidos que são aspirados para a câmara de mistura são controlados pelo tempo de acionamento das válvulas

solenoides, que atuam como interruptoras de fluxo, e pela rotação de um motor de passos, responsável pelo movimento do pistão, que é controlado por meio de um microcomputador.

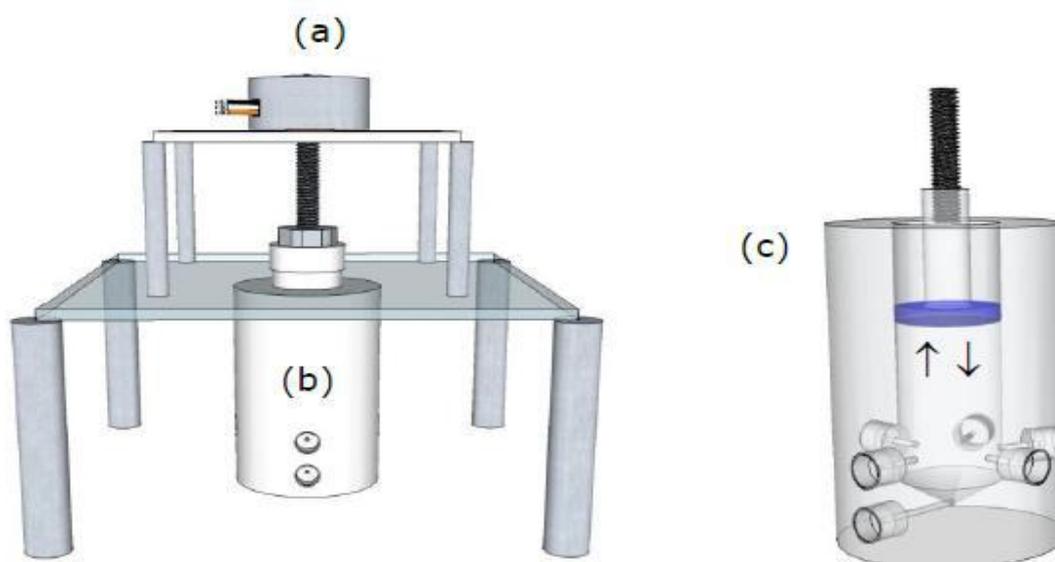


Figura 1.2 - Bomba pistão acoplada à câmara de mistura para propulsão dos fluidos em um sistema FBA. (a) motor de passos (b) câmara de mistura (c) visualização interna da câmara de mistura com o pistão inserido em seu interior. As setas indicam os sentidos de movimento do pistão.

Outra modificação foi a miniaturização do FBA, usando a técnica de litografia UV em polímero comercial uretana-acrilato para construção da câmara de mistura [42].

BARRETO e colaboradores [38] desenvolveram um sistema fluxo-batelada monossegmentado (do inglês *Monosegmented Flow-batch System* – MSFB). Este sistema combina as características favoráveis dos sistemas em fluxo-batelada e as dos analisadores em fluxo monossegmentado, permitindo o uso deste sistema para reações de cinética lenta sem prejudicar a sensibilidade ou a frequência de amostragem. O MSFB foi avaliado durante a determinação espectrofotométrica de boro em extrato de plantas, baseado no método que envolve a reação lenta entre o boro e a azometina-H. As soluções

de calibração são preparadas de forma *in-line*. Neste sistema, quantidades adequadas de reagente e amostra são adicionadas e homogeneizadas dentro da câmara de mistura. Em seguida uma alíquota da mistura reacional é armazenada entre bolhas em uma bobina de armazenamento.

Recentemente, outra modificação foi desenvolvida por LIMAL e colaboradores [43, 44], para o analisador micro-flow-batch (μ FBA) utilizando microbombas solenoides para a seleção e propulsão dos fluidos para a câmara de mistura.

1.6 Análise de matrizes viscosas em sistemas em fluxo

A análise direta de amostras oleosas torna-se complexa, devido a sua viscosidade e sua carga orgânica. A introdução de matrizes orgânicas em detectores espectrométricos, por exemplo, está associada a problemas instrumentais como a dificuldade de inserção da amostra no sistema e aparecimento de índices de refração. Assim, existe uma necessidade de se introduzir uma ou várias etapas de pré-tratamento da amostra como diluição com solventes orgânicos, extração ou lixiviação, incineração ou combustão, dissolução ácida e emulsificação. Contudo, este processo pode ocasionar perda de analito ou contaminação da amostra [3].

A determinação dos parâmetros de qualidade de amostras oleosas utilizando as metodologias tradicionais, na maioria métodos titulométrico, são dispendiosas e laboriosas, além de utilizarem grandes quantidades de reagentes orgânicos. Dessa forma, os analisadores em fluxo apresentam-se como uma alternativa vantajosa para a análise de tais parâmetros, obtendo vantagens, como: simplicidade, versatilidade, baixo consumo de reagente e amostra e baixa geração de resíduo. Entre os analisadores em fluxo descritos na literatura, o mais aplicado para análises de amostras oleosas é o analisador por injeção em fluxo (FIA) [3].

Em 1990, Mesa et al. [45] propuseram um método para a determinação de polifenóis em amostras de azeite de oliva, onde os analitos são extraídos para fase aquosa por meio de uma extração líquido-líquido empregando um analisador por injeção em fluxo.

Sistemas de análise por injeção sequencial também vem sendo utilizados para análise de amostras oleosas como, por exemplo, o método proposto por Ríó et al. [46], em 2010, que descreveram um sistema de titulação utilizando um analisador por injeção sequencial (SIA) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos para a obtenção de sinais de segunda ordem. O método é aplicado para determinação de acidez total em amostras de óleos vegetais e biodiesel.

O sistema fluxo-batelada pode ser usado para a análise de líquidos viscosos e suspensões, que são difíceis de misturar e requerem mistura mecânica assistida [47]. Recentemente, Lima et al. [48] descreveram um sistema de fluxo-batelada para determinação de glicerol livre em biodiesel com o pré-tratamento da amostra acoplado à câmara de mistura.

Capítulo 2

Experimental

2.1 Reagente, amostras e soluções

Todas as soluções e amostras foram preparadas com reagentes de grau analítico. Água recém deionizada com um sistema Milli-Q Plus[®] (Millipore), com resistividade específica $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, foi utilizado para preparar todas as soluções.

Solução de tiocianato de amônio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada por dissolução de uma quantidade adequada do sólido numa mistura de metanol/clorofórmio (35:65) com ácido nítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ [2]. Soluções padrão de Fe (III) organometálico ($0,1 - 1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) foram preparadas a partir de diluições adequadas da solução estoque 50 mg kg^{-1} de Fe (III) (Aldrich) em uma matriz oleosa isenta de metal (metil isobutil cetona, MIBK Synth).

Todas as diluições foram realizadas por pesagem, devido à dificuldade em pipetar rigorosamente os óleos por conta de sua natureza viscosa. A solução de limpeza foi preparada através de uma mistura de metanol/clorofórmio (25:75). A metodologia foi aplicada a dez amostras de óleos comestíveis (quatro de oliva, três de soja e três de girassol).

2.2 Material e equipamento

2.2.1 Analisador fluxo-batelada proposto

Na Figura 2.1 são mostrados os componentes principais utilizados na montagem do FBA para determinação de ferro (III) em óleos comestíveis.

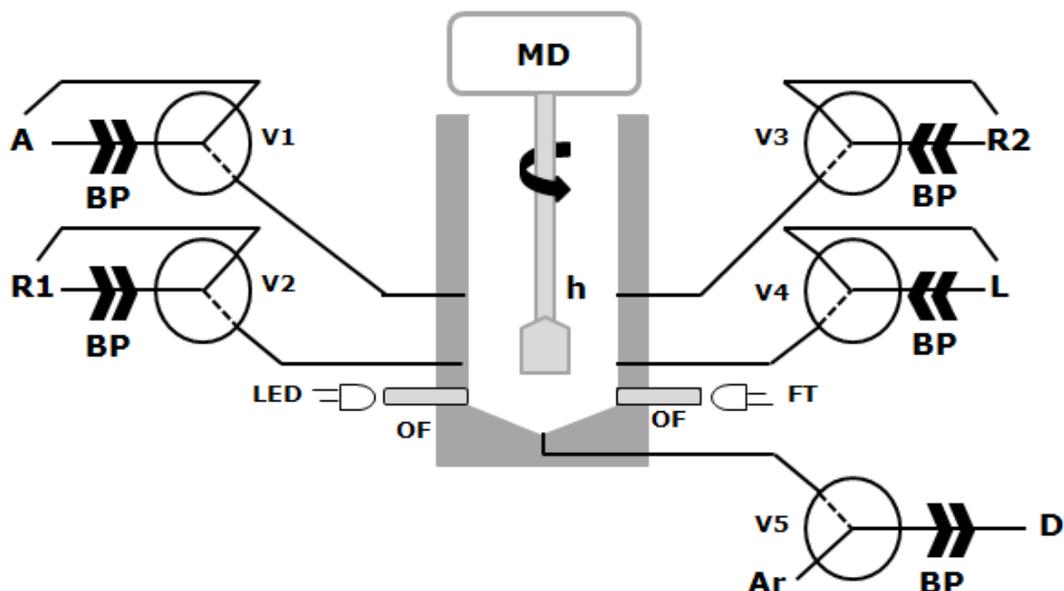


Figura 2.1 - Diagrama esquemático FBA proposto. Câmara de mistura (CM), bomba peristáltica (BP), haste de mistura (h), motor de drive de DVD (MD), diodo emissor de luz (LED, $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$), fototransistor (FT), válvulas solenoides (V1, V2, V3, V4 e V5), amostra ou solução padrão (A), metil isobutil cetona (R1), tiocianato de amônio (R2), metanol/cloroformio (25:75) para solução de limpeza (L) e descarte (D).

Foi utilizada uma câmara de mistura (CM) para promover a homogeneização entre amostras e reagentes, preparo das soluções de calibração e detecção do analito. Esta câmara foi projetada no LAQA e foi construída na Oficina Mecânica do Departamento de Física da UFPB com um cilindro de PTFE (Teflon[®]) composto por quatro canais de entrada e um canal de saída, com um volume interno de 1,0 mL.

Uma bomba peristáltica (BP) *Ismatec*[®] IPC, modelo 78002-00 foi utilizada possibilitando o bombeamento simultâneo de todas as soluções empregadas por ser equipada com 8 canais para a propulsão. Para o bombeamento dos fluidos foram utilizados tubos de Tygon[®], com diâmetro interno de 1,14 mm. Para o transporte e armazenamento dos fluidos foram utilizados tubos de Teflon[®], com diâmetro interno de 0,8 mm.

Uma vazão de $149,4 \pm 1,5 \mu\text{L s}^{-1}$ ($n = 20$) foi utilizada para a propulsão do reagente tiocianato de amônio (R2), solução de limpeza metanol/clorofórmio (L) e para o descarte (D). Devido elevada viscosidade das amostras (S) e do reagente metil isobutil cetona (R1) foi utilizado uma vazão de $127,1 \pm 1,7 \mu\text{L s}^{-1}$ ($n = 20$).

No FBA proposto foram utilizadas quatro válvulas solenoides de três vias da Cole Parmer, modelo EW-01540-13, para seleção e direcionamento dos fluidos para a câmara de mistura. Uma quinta válvula foi utilizada para o descarte. As válvulas solenoides são controladas por um acionador de válvulas conectado a um notebook via porta USB, utilizando uma interface de controle *National Instruments*[®] modelo NI USB-6009.

A homogeneização dos fluidos foi realizada por uma haste de PTFE (h) com uma das extremidades achatada, de 0,8 mm de diâmetro. A haste de mistura foi acoplado a um motor de *drive* de DVD, modelo MDN3 GT3 CPAC, até 2000 rpm, 5 V cc. O agitador é controlado por um acionador de válvulas conectado a um notebook via porta USB, utilizando uma interface de controle *National Instruments*[®] modelo NI USB-6009.

O controle das válvulas solenoides e do agitador foram realizados utilizando um acionador de válvulas *labmade*. Um diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvula e a interface *National Instruments*[®] modelo NI USB-6009 é mostrado a seguir na [Figura 2.2](#). Este dispositivo baseia-se na utilização de um circuito integrado ULN2803, capaz de suportar altas tensões e corrente, além de permitir o controle simultâneo ou independente de até 8 portas de saída.

Quando o circuito integrado ULN2803 recebe uma tensão maior que 3,8 V em suas portas de entrada, gerando uma corrente de 150 mA nas portas de saída, permitindo assim, uma potência suficiente para o acionamento das válvulas solenoide e do agitador simultaneamente. O acionador de válvulas é controlado via notebook, utilizando uma

interface de controle USB da *National Instruments*[®] modelo NI USB-6009.

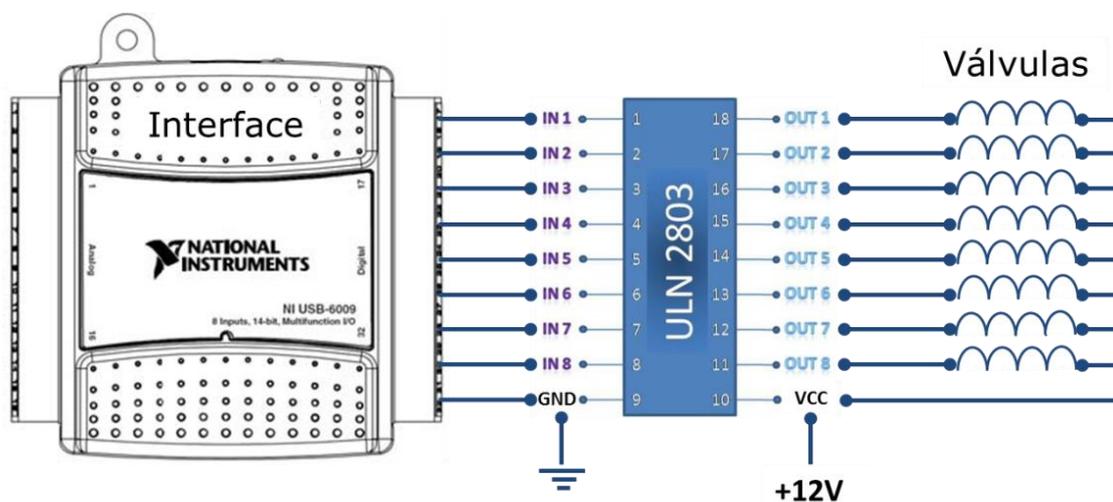


Figura 2.2 - Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009 [49].

Para as medidas analíticas, foi utilizado um diodo emissor de luz (LED, $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) e um fototransistor, ambos conectados à câmara de mistura FBA através de fibras ópticas.

O programa utilizado para gerenciamento do sistema automático proposto (FBA) foi escrito em linguagem *LabVIEW*[®] 7.1 da *National Instruments*[®]. Esse programa de gerenciamento apresenta uma interface simplificada, como pode ser visto na tela principal abaixo (Figura 2.3).

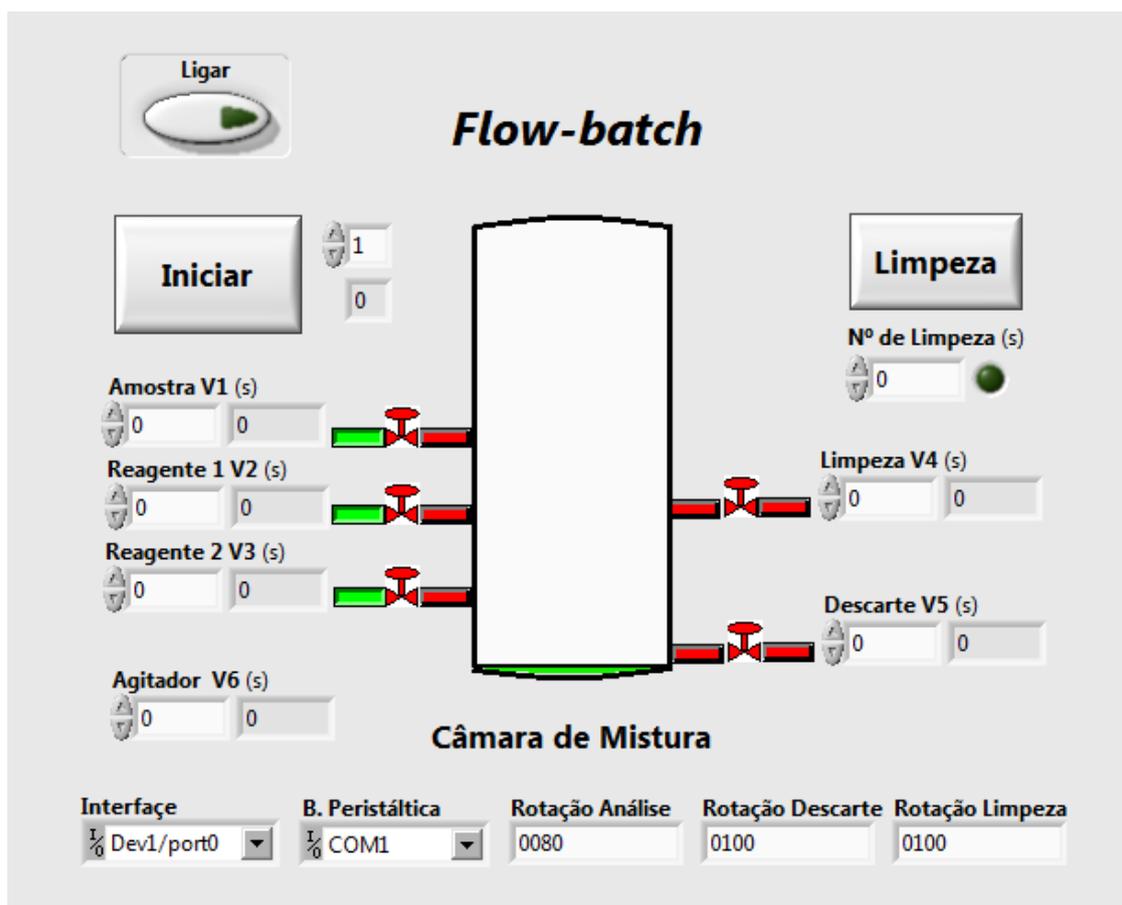


Figura 2.3 - Interface do programa de controle do FBA proposto.

O programa desenvolvido permite ao usuário controlar e gerenciar o tempo de abertura das válvulas solenoides dos reagentes, amostra e descarte, tempo de agitação dos fluidos, limpeza da câmara de mistura, além de obter e salvar em uma tabela do *Excel* o sinal analítico instrumental obtido na análise.

Os tempos de abertura das válvulas da amostra (V1), do reagente metil isobutil cetona (V2), do reagente tiocianato de amônio (V3), solução de limpeza metanol/clorofórmio (25:75) (V4) e do descarte (V5) são configuradas em suas respectivas caixas de controle digital. O programa permite ainda controlar o número de replicatas, o número de ciclos de limpeza e a rotação da bomba peristáltica.

Os tempos de acionamento das válvulas solenoides são proporcionais ao volume adicionado na câmara de mistura. Assim, um

estudo preliminar de calibração de cada canal foi necessário para obter com precisão a medida dos volumes adicionados a câmara de mistura.

A vazão em cada linha de fluxo foi determinada pelos volumes de água coletados e medidos em massa numa balança analítica (Scientech modelo SA210) segundo os tempos de abertura das válvulas de 1 a 7 segundos.

O programa de gerenciamento do FBA desenvolvido apresenta uma interface (Figura 2.4) que possibilita que este procedimento seja realizado com maior facilidade. Na interface do programa é possível configurar o tempo de abertura e o acionamento de cada válvula isoladamente.

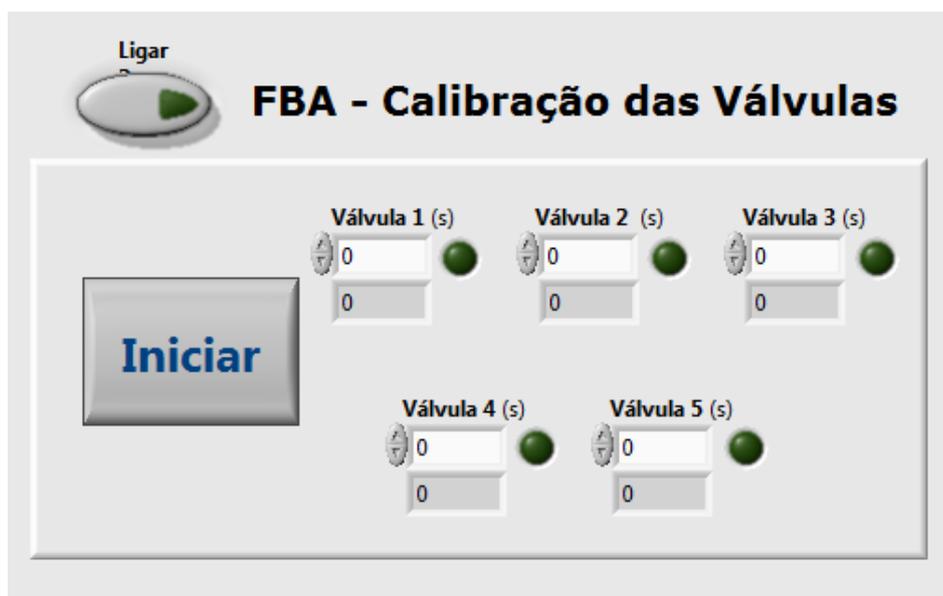


Figura 2.4 - Interface do programa para realizar o estudo de calibração das válvulas solenoides do FBA proposto.

2.3 Procedimento do FBA proposto para a determinação de Fe (III) em óleos comestíveis

Para a determinação de Fe (III) em óleos comestíveis utilizando o FBA proposto é necessário efetuar as seguintes etapas analíticas:

1. Enchimento de canais;

Antes de iniciar qualquer procedimento analítico, deve ser realizado o preenchimento de todos os canais do sistema. Nesta configuração, com todas as válvulas desativadas, as soluções são bombeadas e retornam aos seus respectivos recipientes. Em seguida, as válvulas V1, V2, V3 e V4 são acionadas simultaneamente durante 1,5 s (Figura 2.5) e as soluções utilizadas na análise são bombeadas em direção à câmara de mistura (CM) preenchendo assim, todos os canais localizados entre as saídas das válvulas e a câmara de mistura.

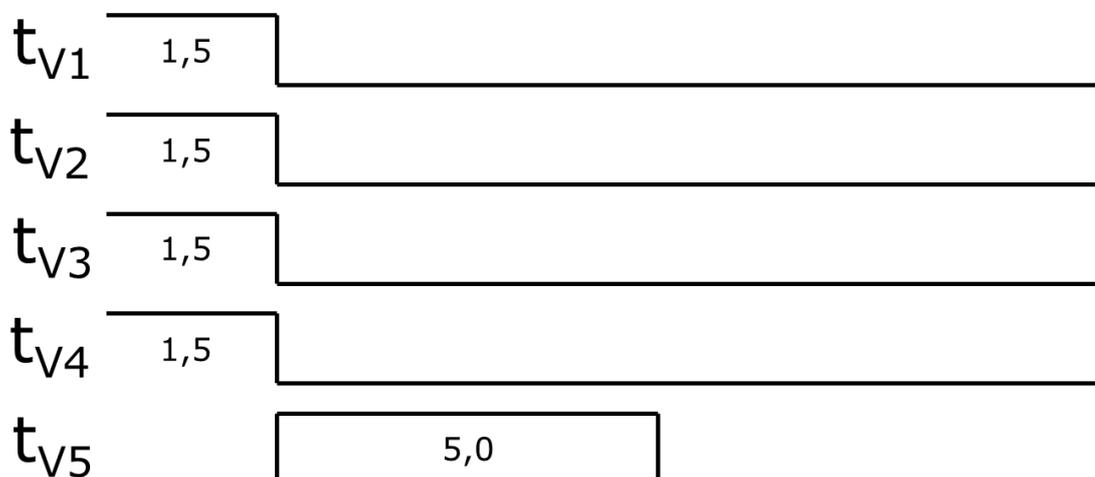


Figura 2.5 - Diagrama de tempos (em segundos) usado na etapa de enchimento de canais. t_{V1} , t_{V2} , t_{V3} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3, V4 e V5, respectivamente.

Em seguida, a válvula V5 é acionada durante 5,0 s e a solução presente na CM é descartada por aspiração da bomba peristáltica (BP). Este procedimento deve ser realizado sempre que houver uma troca de amostra.

2. Preparação das misturas

A etapa de análise é iniciada com todas as válvulas desativadas. Posteriormente, o preparo da solução do branco através do FBA

proposto é realizado na câmara de mistura acionando simultaneamente as válvulas V2 e V3, adicionando cerca de 250 μL de cada solução. Em seguida, após homogeneização da mistura, é efetuada a medida a absorvância do branco. Em seguida, a válvula V5 é acionada durante 3,5 s e a solução presente na CM é descartada por aspiração da bomba peristáltica (BP). Na [Figura 2.6](#) é mostrado o diagrama de tempos de abertura das válvulas para o procedimento da medida do branco.

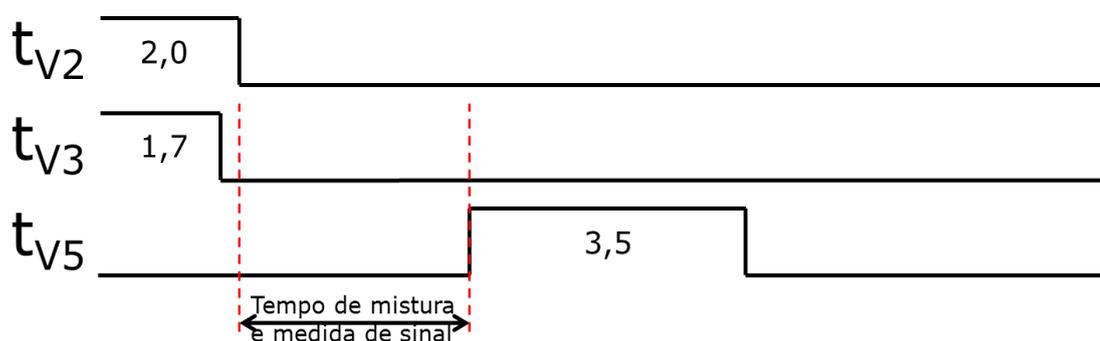


Figura 2.6 - Diagrama de tempos (em segundos) usado no procedimento de medida do branco. t_{V2} , t_{V3} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V2, V3 e V5, respectivamente.

As soluções de calibração na faixa de 0,1 a 1,0 mg kg^{-1} de Fe (III) foram preparadas automaticamente na CM, utilizando uma solução padrão de 2,0 mg kg^{-1} de Fe (III) preparada a partir de diluição da solução estoque (50 mg kg^{-1}). Durante a preparação das soluções, as válvulas V1 (solução padrão) e V2 (metil isobutil cetona) são acionadas simultaneamente e, após homogeneização desta mistura por 2,0 s, a válvula V3 é ativada por 1,7 s, permitindo a inserção do tiocianato de amônio na CM. Uma nova homogeneização é efetuada por 2,0 s e a mistura resultante é submetida à medição de absorvância. O descarte é feito através do acionamento da válvula V5, durante 3,5 s. Os tempos de acionamento das válvulas V1 e V2 variam proporcionalmente, de modo que a soma dos tempos t_{V1} e t_{V2} seja constante e igual a 2,0 s. Na

Figura 2.7 é apresentado o diagrama de tempos para execução da etapa de obtenção da curva de calibração. Na figura é apresentada a configuração de tempos para preparação da solução referente ao primeiro ponto da curva, onde $t_{V1} = 0,4$ s e $t_{V2} = 1,6$ s. O último ponto da curva foi obtido com a configuração $t_{V1} = 0,8$ s e $t_{V2} = 1,2$ s, mantendo assim, a proporcionalidade entre estes parâmetros, necessária para obtenção da curva de calibração.

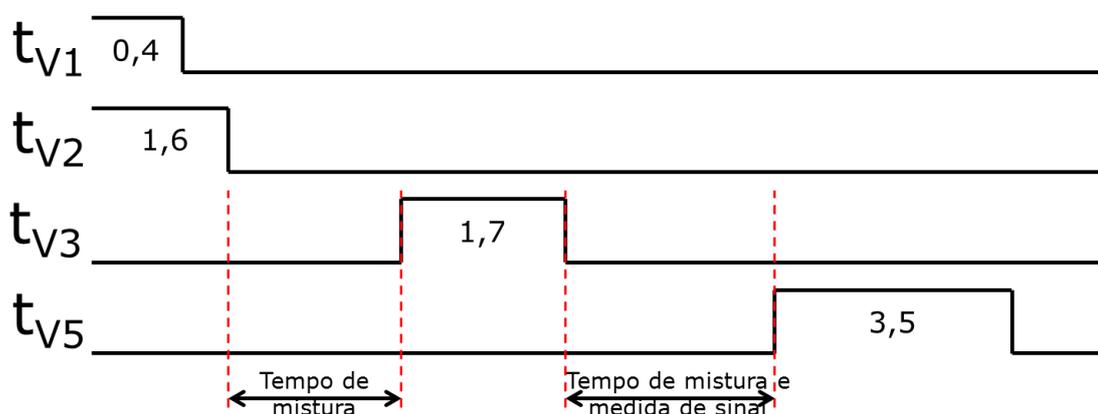


Figura 2.7 - Diagrama de tempos (em segundos) usado na etapa de obtenção da curva de calibração. Onde, t_{V1} , t_{V2} , t_{V3} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3 e V5, respectivamente.

O procedimento para a determinação da amostra na CM é idêntico ao procedimento usado para preparar as soluções de calibração, exceto pelos tempos de acionamento das válvulas V1 e V2 que são de 0,8 s e 1,2 s, respectivamente. Nesta etapa, a solução-padrão é retirada do sistema e amostra é bombeada em seu lugar.

Para todas as amostras foi necessária a diluição das mesmas, a qual foi efetuada na própria câmara de mistura, acionando as válvulas V1 e V2 durante intervalos de tempo adequados, de modo que os sinais obtidos estivessem dentro da faixa de calibração. O controle da diluição é feito com base na expressão $t_{V1}/(t_{V1}+t_{V2})$ que representa o fator de diluição baseado em tempo.

Não foi necessário efetuar nenhum ciclo de limpeza do sistema entre replicatas de uma amostra devido à ausência de *carry-over* durante as medições.

3. Troca da amostra e limpeza

Terminada a análise de uma amostra, a mesma deve ser retirada do sistema, esvaziando o canal da amostra para que uma nova amostra seja analisada. Para tanto, ao trocar a amostra é necessário efetuar um ciclo de limpeza, usando a configuração de tempos de acionamento das válvulas apresentadas no diagrama dos tempos na [Figura 2.8](#). Para isso, as válvulas V1 e V4 são acionadas simultaneamente, permitindo o enchimento do canal (V1) com uma nova amostra e a inserção da solução de limpeza (V4). Este procedimento é necessário para minimizar a ocorrência de efeito de memória. Em seguida, um segundo ciclo de limpeza é realizado adicionando apenas a solução de limpeza para lavar a câmara de mistura, permitindo assim, efetuar uma nova análise.

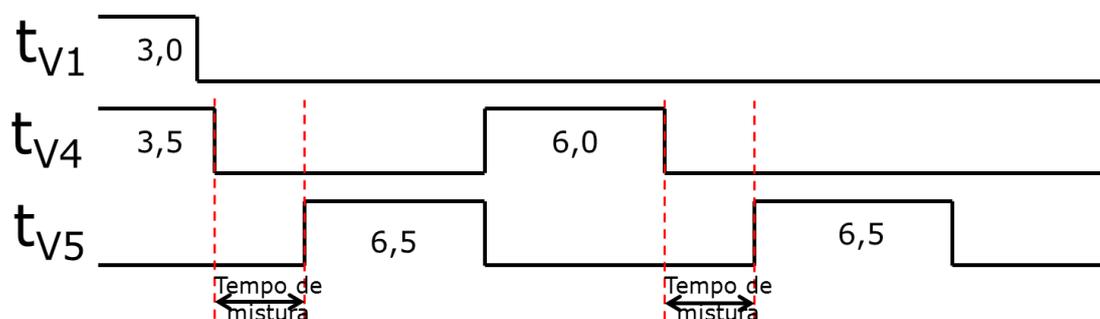


Figura 2.8 - Diagrama dos tempos (em segundos) usada para a limpeza da câmara de mistura e troca de amostra. t_{V1} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V4 e V5, respectivamente.

2.4 Procedimento para o método de referência

O procedimento espectrofotométrico de referência para a determinação de Fe (III) em óleo comestível foi realizado de acordo

com o método do tiocianato [3]. As soluções de calibração (0,1 a 1,0 mg kg⁻¹) de Fe (III) foram preparadas por diluições adequadas da solução estoque 50 mg kg⁻¹ de Fe (III). Os sinais analíticos foram medidos em uma absorvância de aproximadamente 520 nm. A análise de cada amostra foi realizada em triplicata e as concentrações foram estimadas a partir das equações obtidas pelas curvas analíticas.

Para o método de referência foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard (HP) com arranjo de diodos, modelo 8453, equipado com uma cubeta (Hellma QS 1000, célula de fluxo de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm), e monitorando o sinal analítico em 520 mm.

2.5 Procedimentos de avaliação do fluxo-batelada proposto

O desempenho do sistema fluxo-batelada proposto (FBA) foi avaliado em termos de sensibilidade, com os valores do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e faixa dinâmica. Os parâmetros foram comparados com os resultados obtidos em um espectrofotômetro comercial.

De acordo com a IUPAC, a sensibilidade de calibração de um método instrumental é definido como a inclinação da curva de calibração a uma dada concentração do analito [18, 23].

A sensibilidade de um método é definida pelos limites de detecção e de quantificação. O limite de detecção (*limit of detection* – LOD) é a menor concentração do analito de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental escolhido, com certo nível de confiança. O limite de quantificação (*limit of quantification* – LOQ) é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método escolhido [50, 51].

O limite de detecção e de quantificação foram estimados matematicamente pelas expressões mostradas a seguir:

$$LOD = \frac{3 \cdot S_b}{\beta} \quad (a) \quad LOQ = \frac{10 \cdot S_b}{\beta} \quad (b)$$

onde a expressão (a) é o limite de detecção e (b) é o limite de quantificação. β é a inclinação da curva analítica estimada pela regressão linear através do método dos mínimos quadrados e S_b é o desvio padrão do branco para 20 amostras. Assim como a sensibilidade de calibração foi definida pelo valor da inclinação da curva analítica (β). Também foi avaliada a frequência analítica e a quantidade de amostras e reagentes gastos por medida efetuada.

O método da relação sinal/ruído corresponde ao inverso do desvio padrão relativo (DPR), que utiliza de 20 a 30 medidas do sinal do branco, é amplamente utilizado devido a sua rapidez e simplicidade dos cálculos estatísticos. O método da estimativa do limite de detecção e quantificação baseado em parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística e robustez, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. Neste caso, o LOD e o LOQ são estimados a partir do intervalo de confiança e pode ser medido a 95% de confiança estatística. Tais estimativas foram realizadas por intermédio de uma planilha eletrônica para validação de métodos analíticos univariados [50] e disponível na internet [52]. A estimativa do sinal analítico a partir da equação de regressão apresenta um erro padrão, e o produto deste erro pelo valor da distribuição *t* de Student apropriado, permite calcular o intervalo de confiança da curva analítica [50].

O teste de recuperação [53] é estimado usando análises de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do analito (podem ser adicionadas as amostras, pelo menos três concentrações diferentes do analito). O Teste de recuperação foi utilizando para avaliar a exatidão do método proposto. A taxa de recuperação é calculada empregando a expressão a seguir:

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

onde C_1 é a concentração total do analito na amostra após adição de uma quantidade conhecida do mesmo, C_2 é a concentração original do analito determinado na amostra e C_3 é a concentração do analito adicionado na amostra.

Capítulo 3

Resultados e

Discussão

3.1 Parâmetros do analisador fluxo-batelada

Para obter parâmetros de desempenho analítico do FBA proposto, foram realizados estudos preliminares para a obtenção dos parâmetros de concentrações e de volumes de reagentes e amostras adicionados à câmara de mistura. Para tanto, todos os estudos foram realizados no sistema automático FBA proposto, seguindo o método e os intervalos de avaliação utilizados por Pinto ^[2]. Na [Tabela 3.1](#) são apresentados os resultados do estudo dos parâmetros avaliados e os valores selecionados para cada deles.

Tabela 3.1 - Parâmetros selecionados do FBA proposto para o procedimento de determinação de Fe (III) em óleo comestível.

Parâmetro	Intervalo avaliado	Valor selecionado
Concentração do reagente tiocianato de amônio (mmol L^{-1})	10 – 100	50
Tempo de agitação (s)	0,5 – 5,0	2
Concentração da solução de limpeza metanol/clorofórmio (v/v %)	10:90 – 45:55	25:75
Volume da amostra (μL)	25 – 150	100
Volume de metil-isobutil-cetona (μL)	50 – 200	150
Volume do reagente tiocianato de amônio (μL)	50 – 300	250
Volume total (μL)	125 – 650	500

Os parâmetros operacionais do analisador foram balizados em função do volume total da câmara, tempo total de análise e sinal analítico, de modo a minimizar os dois primeiros e maximizar o último. Os volumes de amostra, de MIBK e de tiocianato de amônio foram avaliados dentro das faixas apresentadas na [Tabela 3.1](#). O volume total de mistura reacional dentro da câmara foi fixado em 500 μL , uma vez que a utilização de grandes volumes na câmara implica em maior

consumo de reagentes e de amostra, e conseqüentemente em um aumento no tempo total de análise.

A otimização da proporção volumétrica ótima entre amostra e reagentes foi realizada através da preparação automática de misturas reacionais onde os volumes de amostra cobriram a faixa de 25 a 150 μL sendo acrescentados 25 μL de amostra em cada mistura preparada. Os volumes de MIBK e tiocianato de amônio foram varridos dentro das faixas de 50 a 200 μL e de 50 a 300 μL , respectivamente, sendo acrescentados 50 μL de cada solução em cada mistura preparada. O maior sinal analítico foi obtido com a proporção 100 μL de amostra: 150 μL de MIBK: 250 μL de tiocianato de amônio, corroborando a proporção descrita por Pinto [2].

Uma vez determinada a proporção volumétrica na mistura reacional, foi investigada a concentração ótima da solução de tiocianato de amônio. Para tanto, foi avaliada uma faixa de concentração deste reagente de 10 a 100 mmol L^{-1} , variando-se de 10 em 10 μL , reagindo com uma solução de Fe (III) com 0,8 mg Kg^{-1} . Os dados deste estudo são apresentados na Figura 3.1. Na curva apresentada, verifica-se que os valores de concentração de tiocianato acima de 50 mmol L^{-1} praticamente permanecem constantes. Desta forma, foi escolhido este valor como sendo a concentração de tiocianato de amônio a ser usada no analisador automático.

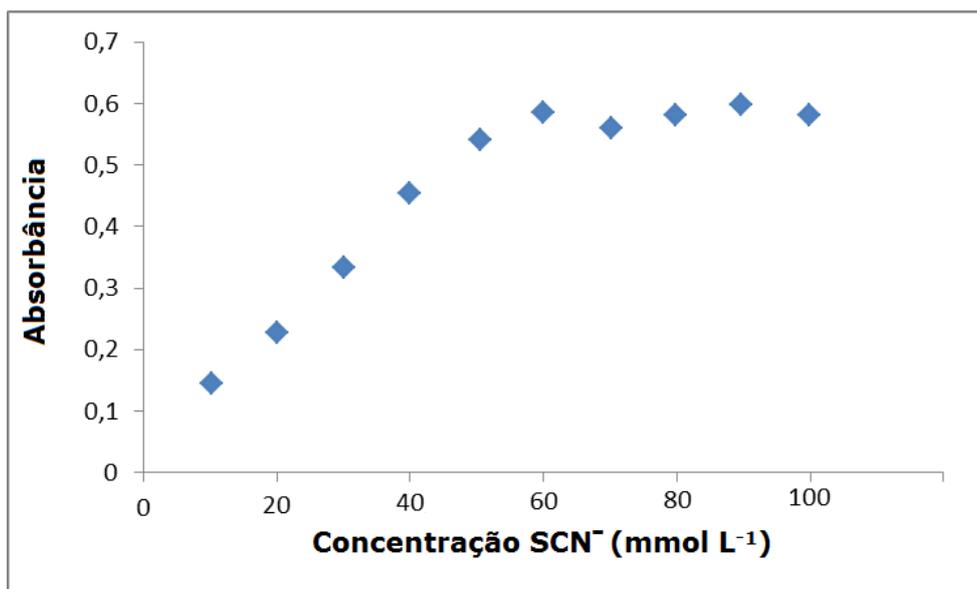


Figura 3.1 - Estudo da concentração ótima de tiocianato de amônio (representado por SCN⁻).

Até então, para garantir uma mistura homogeneizada, todas as análises foram realizadas com um tempo de mistura de 10 s. De modo a aumentar a velocidade analítica, o tempo de agitação suficiente para a homogeneização satisfatória da mistura reacional foi avaliado experimentalmente através da medição dos sinais de absorbância de uma mistura reacional com a seguinte composição: 100 μL Fe(III) 0,8 mg Kg^{-1} + 150 μL de MIBK + 250 μL de tiocianato de amônio 50 mmol L^{-1} . Foi observado que os valores de absorbância para tempos de agitação maiores que 2,0 s permaneceram constantes (Figura 3.2). Assim, o tempo de agitação de 2,0 s foi selecionado como valor ótimo.

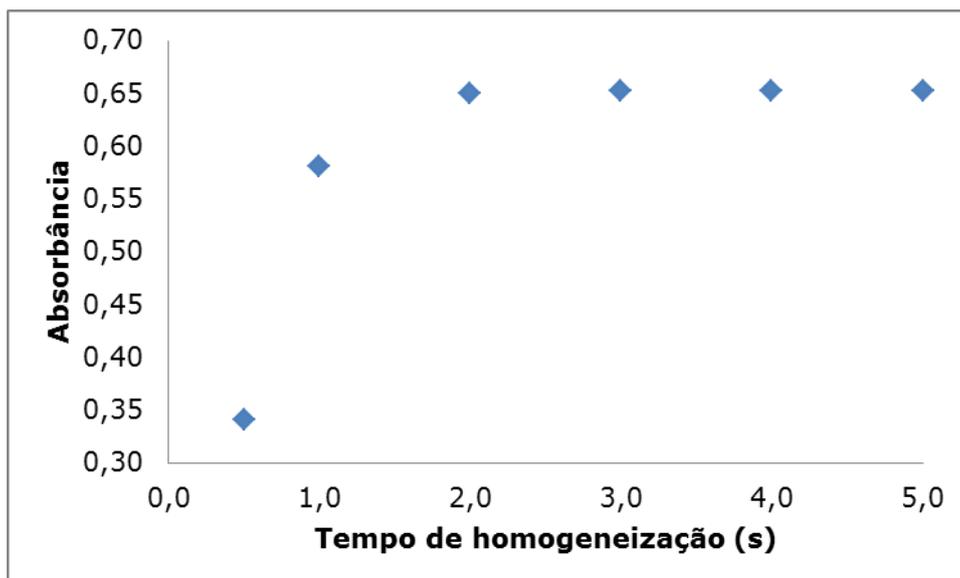


Figura 3.2 – Estudo do tempo ótimo de homogeneização.

A composição da solução de limpeza foi avaliada em termos de aparecimento de sinal analítico após efetuar o procedimento de limpeza da câmara em duplicata. Os dados deste estudo são apresentados na [Figura 3.3](#). Foi observado que proporções de clorofórmio menores que 75% (v/v) e de metanol maiores que 25% (v/v) não solubilizavam bem a mistura reacional e havia, com isso, aumento de absorbância da linha de base após a execução de dois ciclos de limpeza do sistema. Sendo, portanto, mais eficiente na limpeza a mistura metanol/clorofórmio a 25:75 em proporção.

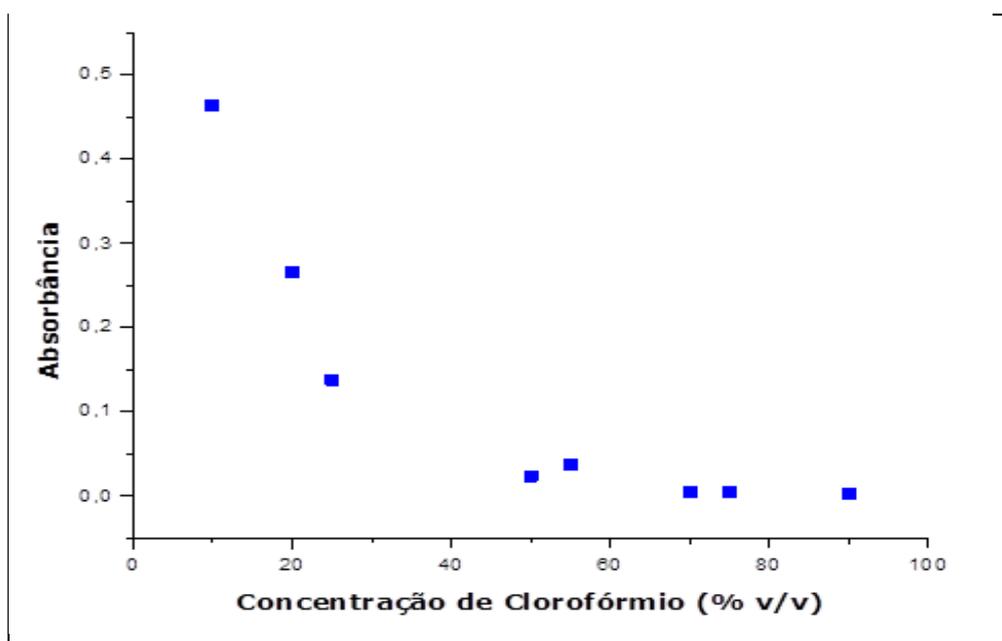


Figura 3.3 - Estudo da concentração ótima da solução de limpeza clorofórmio em metanol (v/v %).

3.2 Validação da curva analítica para determinação de Fe (III)

Foram construídas duas curvas analíticas para determinação de Fe(III) em duas diferentes faixas de concentração: uma construída a partir de medidas feitas usando o FBA proposto na faixa de 0,1 a 1,0 mg kg⁻¹ e outra usando as medidas feitas através do método de referência na faixa de 1,0 a 2,2 mg kg⁻¹. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

Para construção da curva analítica utilizando o FBA proposto foram usadas soluções de calibração com os níveis de concentração: 0,1; 0,3; 0,5; 0,8 e 1,0 mg kg⁻¹ de Fe(III). A equação de regressão obtida pelo FBA proposto foi $A = 0,592C + 0,0649$, (onde A é a resposta analítica e C é a concentração do analito em mg kg⁻¹).

Os níveis de concentração das soluções de calibração usadas na construção da curva analítica obtida através do método de referência foram: 1,0; 1,4; 1,6; 2,0 e 2,2 mg kg⁻¹ de Fe(III). A equação de regressão obtida pelo método de referência foi $A = 0,3488C - 0,047$,

(onde A é a resposta analítica e C é a concentração do analito em mg kg^{-1}).

Os altos valores dos coeficientes de correlação ($R^2=0,9984$ para o FBA proposto e de $R^2=0,9914$ para o método de referência) são forte indício de que ambas as curvas obtidas apresentam comportamento linear entre as respostas analíticas e a concentração de Fe(III) nas soluções de calibração. As curvas de calibração foram validadas estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), não mostrando falta de ajuste em um nível de confiança de 95%.

Após a validação da curva analítica, foram estimados os valores do limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), com base em critérios estabelecidos pela IUPAC ^[54] para o sistema proposto e para o método de referência baseado no uso do espectrofotômetro comercial. Os resultados, apresentados na [Tabela 3.2](#), mostra que os valores de LOD e LOQ obtidos pelo método de referência são um pouco menores que aqueles obtidos através do FBA proposto. Estas diferenças estão diretamente relacionadas ao tipo de detector e ao caminho óptico utilizado. O FBA proposto apresenta um LED ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) e um fototransistor, com um caminho óptico de 0,8 cm. Já o espectrofotômetro apresenta um arranjo de fotodiodos como detector, e o caminho óptico de 1,0 cm, o que lhe confere maior sensibilidade. Desta maneira, estes resultados apresentam-se coerentes com as diferenças entre os dois instrumentos utilizados.

Tabela 3.2 - Valores de LOD e LOQ em mg L^{-1} para a determinação de Fe (III), estimados ao nível de 95% de confiança.

	Referência	FBA
LOD	0,00376	0,00402
LOQ	0,0125	0,0134

3.3 Aplicações analíticas do FBA proposto

As curvas analíticas construídas pelo FBA proposto e pelo método de referência foram obtidas para a determinação de Fe (III) em amostras de óleos comestíveis. A [Tabela 3.3](#) mostra os resultados obtidos com medidas em triplicata.

Tabela 3.3 – Valores das concentrações ($n = 3$) das amostras de óleos comestíveis para a determinação de Fe (III) em mg kg^{-1} utilizando o FBA proposto e o espectrofotométrico de referência.

Amostra	FBA	Referência
Oliva	1,56 ± 0,03	1,55 ± 0,02
	0,89 ± 0,02	0,91 ± 0,01
	1,05 ± 0,01	1,07 ± 0,02
	0,92 ± 0,02	0,89 ± 0,02
Soja	0,62 ± 0,02	0,64 ± 0,01
	0,55 ± 0,01	0,57 ± 0,01
	1,27 ± 0,03	1,21 ± 0,02
Girassol	0,49 ± 0,02	0,51 ± 0,01
	0,72 ± 0,01	0,74 ± 0,01
	0,70 ± 0,02	0,65 ± 0,01

Na [Tabela 3.3](#), pode-se observar que os procedimentos FBA e de referência apresentaram desempenhos similares. Os valores do desvio padrão foram, em geral, menores que $0,03$ e $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ para as amostras analisadas via FBA e pelo método de referência, respectivamente. Além disso, a aplicação do teste t -pareado mostrou não haver diferenças estatísticas significativas a um nível de 95% de confiança.

O FBA proposto apresentou uma frequência analítica de 95 amostras por hora.

3.4 Determinação analítica de Fe (III) em óleos comestíveis

Para a realização do teste de recuperação foram utilizadas três amostras de óleos comestíveis (soja, oliva e girassol). Um volume de 50 μL de solução padrão de Fe (III) com concentrações conhecidas de 0,1; 0,5 e 0,7 mg kg^{-1} foram adicionadas a 100 μL de óleo comestível (1,55, 1,21 e 0,51 mg kg^{-1} de Fe (III)), para as medidas utilizando o FBA proposto.

A Tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos na determinação de Fe (III) em óleos comestíveis utilizando o teste de recuperação.

Tabela 3.4 - Teste de recuperação de Fe (III) em óleo comestível ($n = 3$).

Amostras	Recuperação %		
	$0,1 \pm t_{n-1} S/\sqrt{n}^a$	$0,5 \pm t_{n-1} S/\sqrt{n}^a$	$0,7 \pm t_{n-1} S/\sqrt{n}^a$
Oliva	$99,1 \pm 1,4$	$104,2 \pm 1,3$	$102,6 \pm 1,7$
Soja	$98,7 \pm 1,2$	$101,4 \pm 1,1$	$99,3 \pm 1,2$
Girassol	$98,4 \pm 1,4$	$102,8 \pm 1,6$	$103,1 \pm 1,2$

^a Onde n é o número de medições repetidas, t_{n-1} é o parâmetro estatístico de t de Student (com $n = 3$, ao nível de confiança de 95%) e S é o desvio padrão

Os resultados obtidos pelo teste de recuperação para cada uma das amostras de óleo comestível estavam dentro da faixa de 98,4% a 104,2%.

3.5 Comparação do FBA proposto com outros sistemas

A Tabela 3.5 apresenta características analíticas selecionadas do FBA proposto, análise de injeção sequencial (SIA) [2] e análise por injeção em fluxo (FIA) [15] para a determinação de Fe (III) em óleos

comestíveis. Em geral, o FBA (em comparação com outros processos) apresenta parâmetros satisfatórios, tais como: o limite de detecção, frequência analítica e ausência de fluido transportador.

Tabela 3.5 - Quadro comparativo entre as características analíticas do FBA proposto e as de outros procedimentos para determinação de Fe (III) em óleo comestível.

Parâmetro	FBA	SIA [2]	FIA [15]
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,004	0,31	0,6
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	0,1 – 1,0	0,5 – 25	0 – 10
Desvio padrão relativo (%)	< 2,0	< 3,5	2
Frequência analítica (h ⁻¹)	95	20	–
Consumo de amostras	100 µL	150 µL	4 – 20 g
Volume de reagente (µL)	250	250	–
Volume de resíduos (µL)	2300	4200	10000
Método	UV-Vis ^a	UV-Vis ^a	AAS ^b
Pré-tratamento	Ausente	Ausente	Presente
Deteccção integrado	Presente	Ausente	Ausente
Fluido Transportador	Ausente	Presente	Presente

^a espectrofotometria de absorção UV-Vis

^b espectrometria de absorção atômica.

Capítulo 4

Conclusão

4.1 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um analisador fluxo-batelada para a determinação direta (sem pré-tratamento da amostra) de Fe(III) em óleos comestíveis. Para isso, foi utilizada uma câmara de mistura confeccionada em PTFE (Teflon[®]), utilizando como detector um diodo emissor de luz e um fototransistor, ambos conectados à câmara de mistura FBA através de fibras ópticas, cujo caminho óptico de 0,8 cm. A determinação de Fe(III) em amostras de óleos comestíveis baseada na reação destes íons com tiocianato em meio orgânico [2] foi efetuada com sucesso.

O analisador proposto mostrou características analíticas satisfatórias quando comparado com sistemas de fluxo [2,15] que utilizaram o mesmo método. Além disso, o sistema automático desenvolvido apresentou uma instrumentação simples, com baixo consumo de reagente e amostra, baixa geração de resíduos e elevada frequência analítica (95 amostras por hora). O limite de detecção, de quantificação e a precisão obtida foram compatíveis com os parâmetros regulamentados por órgãos de fiscalização, dos óleos comestíveis [13, 14]. As soluções-padrão foram preparadas em linha e todos os processos analíticos foram efetuados com simples alterações nos parâmetros operacionais no programa de controle construído em ambiente LabVIEW 7.1.

Conclui-se, desta forma, que o analisador fluxo-batelada desenvolvido pode ser uma alternativa potencialmente útil para a determinação de Fe(III) em óleos comestíveis sem pré-tratamento da amostra. Além disso, este tipo de analisador pode também ser muito útil para o monitoramento de outros parâmetros de qualidade em amostras complexas, similares aos óleos comestíveis, como por exemplo, a determinação de outros metais, sulfatos, e aditivos em óleos lubrificantes, gasolina e biodiesel. No entanto, possíveis problemas de sensibilidade e seletividade também precisam ser investigados.

4.2 PERSPECTIVAS

Com o sucesso obtido no desenvolvimento e aplicação do analisador em fluxo-batelada, partiu-se, após a finalização do trabalho, para a aplicação do mesmo analisador à determinação do índice de iodo em óleos comestíveis. Este parâmetro também é regulamentado pela ANVISA e o método de referência é volumétrico [55]. Entretanto, ao utilizar a mesma configuração física usada no trabalho ora apresentado, a qual foi baseada em propulsão peristáltica, verificou-se que os tubos de bombeamento não apresentavam compatibilidade com os principais reagentes utilizados, sendo inutilizados quase imediatamente.

Tentou-se então, a utilização de uma configuração com propulsão a pistão acoplado à câmara. Nesta configuração, ocorreram problemas de corrosão do anel de vedação do pistão e de reprodutibilidade na tomada de volumes dos reagentes e amostras devido à alta pressão de vapor do ácido acético. Como última alternativa, foi utilizada uma configuração com propulsão a base de microbombas diafragma. Esta configuração também apresentou falhas em sua execução devido à baixa reprodutibilidade na tomada de volumes tanto de amostras como de reagente (solução de Wijs em ácido acético glacial).

Em virtude da ocorrência de todos os problemas encontrados nesta nova aplicação, é apresentado como perspectiva futura de trabalho, o desenvolvimento de uma nova modalidade de analisador em fluxo-batelada. Esta modalidade será baseada na propulsão por uma bomba seringa comercial multicanal, equipada com seringas de precisão construídas em vidro e com êmbolo de PTFE. Com isso, espera-se que todos os problemas acima discutidos sejam solucionados de forma simples com sistema de fácil automação e controle. O programa de controle deste novo sistema já está em fase de desenvolvimento, bem como a configuração de acoplamento e comutação de válvulas solenoides.

Referências

- [1] THOMAIDIS, N. S.; GEORGIUO C. A.; Edible oil analysis by flow injection, *Lab. Autom Inform. Manag.*, **34:101, 1999**.
- [2] PINTO, P.C.A.G.; SARAIVA, M.L.M.F.S.; LIMA, J.L.F.C. A flow sampling strategy for the analysis of oil samples without pre-treatment in a sequential injection analysis system, *Anal. Chim. Acta*, **555:377, 2006**.
- [3] BURGUERA, J.L.; BURGUERA, M. Pretreatment of oily samples for analysis by flow injection-spectrometric methods, *Talanta*, **83:691, 2011**.
- [4] HONORATO, R.S.; ARAÚJO, M.C.U.; LIMA, R.A.C.; ZAGATTO, E.A.C.; LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search, *Anal. Chim. Acta*. **396:91, 1999**.
- [5] MENDIL, D.; ULUÖZLÜ, Ö.D.; TÜZEN, M.; SOYLAK, M. Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry, *J. Hazard. Mater.* **165:724, 2009**.
- [6] SHAHIDI, F. Quality Assurance of Fats and Oils, em *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6 ed, editado por Fereidoon Shahidi, John Wiley & Sons, New York, **565, 2005**.
- [7] ZAMORA, R.; OLMA, C.; NAVARRO, J. L.; HIDALGO, F. J. Contribution of phospholipid pyrrolization to the color reversion produced during deodorization of poorly degummed vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.*, **52:4166, 2004**.
- [8] LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, M.L.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; RUIZ-MEDINA, A. Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain, *Food Chem.* **127:1257, 2011**.
- [9] ANTHEMIDIS, A. N.; ARVANITIDIS, V.; STRATIS, J.A. On-line emulsion formation and multi-element analysis of edible oils by

- inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **537:271, 2005**.
- [10] ZHU, F.; FAN, W.; WANG, X.; QU, L.; YAO, S. Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetable oils consumed in China, *Food Chem. Toxicol.* **49:3081, 2011**.
- [11] HENDRIKSE, P.W.; SLIKERVEER, F.J.; ZAALBERG, J.; HAUTFENNE, A. Determination of copper, iron and nickel in oils and fats by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Pure & Appl. Chem.* **60:893, 1988**.
- [12] GARRIDO, M. D.; FRÍAS, I.; DÍAZ, C.; HARDISSON, A. Concentrations of metals in vegetable edible oils, *Food Chemistry* **50:237, 1994**.
- [13] INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. *Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils*. COI/T.15/NC No. 3/Rev. 4. **2003**.
- [14] CODEX ALIMENTARIUS. *Codex standard for named vegetable oils*. Codex Stan. **2009**.
- [15] CARBONELL, V.; MAURÍ, A.R.; SALVADOR, A.; GUARDIA, M. Direct determination of copper and iron in edible oils using flow injection flame atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* **6:581, 1991**.
- [16] ZEINER, M.; STEFFAN, I.; CINDRIC, I. J. Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: A pilot study on the geographical characterization, *Microchem. J.* **81:171, 2005**.
- [17] CHAVES, E.S.; LOOS-VOLLEBREGT, M. T. C. de; CURTIUS, A. J.; VANHAECKE, F. Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution, *Spectrochim. Acta Part B* **66:733, 2011**.
- [18] SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Fundamentos de química analítica*, 8ª ed., São Paulo, Tomson, **2005**.

- [19] MIRANDA, J. C. Desenvolvimento de um equipamento portátil e de sistema de análise em fluxo empregando multicomutação. Determinação fotométrica de ferro em águas de rios. Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, 81p, **2011**.
- [20] SADER, A. P. O. Estudo espectrofotométrico do sistema cobalto(II)/tiocianato e seu aproveitamento analítico. Departamento de Química, USP, 112p, **2002**.
- [21] SANTANA, H.: VIEIRA, K. E.: ZAIA, C. T. B. V.: ZAIA, D. A. M. Estudo da reação entre tiocianato de amônio e Fe (II) ou Fe (III) utilizando a espectroscopia no infravermelho: um experimento de química prebiótica. Semina: Ciências Exatas e Tecnologia, **31:15, 2010**.
- [22] STOCKWELL, P. B.; CORNS, W. T. Automatic Chemical Analysis, London: Taylor & Francis, **1996**.
- [23] HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. *Princípios de análise instrumental*, 6ª ed., Porto Alegre, Bookman, **2009**.
- [24] SKEGGS Jr., L.T. An automatic method for colorimetric analysis, *American Journal of Clinical Pathology*, **28:311, 1957**.
- [25] RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow analysis, *Analytica Chimica Acta*, **781:145, 1975**.
- [26] PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W.A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromiun(vi), ammonia and phosphorus. *Analytical Chemistry*, **57:2575, 1985**.
- [27] RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential Injection - A New Concept for Chemical sensors, Process Analysis and Laboratory Assays, *Analytica Chimica Acta*, **237:329, 1990**.
- [28] REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digests, *Analytica Chimica Acta*, **293:129, 1994**.

- [29] DINIZ, P.H.G.D.; ALMEIDA, L.F.; HARDING, D.P.; ARAÚJO, M.C.U.; Flow-batch analysis, *Trends Anal. Chem.* **35:39, 2012.**
- [30] LIMA, M.B. *et al.* Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. *Talanta.* **89: 21, 2012.**
- [31] DOMÍNGUEZ, M.A.; GRÜNHUT, M.; PISTONESI, M. F.; Di NEZIO, M. S.; CENTURIÓN, M. E. Automatic flow-batch system for cold vapor atomic absorption spectroscopy determination of mercury in honey from argentina using online sample treatment. *J. Agric. Food Chem.* **60: 4812, 2012.**
- [32] LIMA, R.A.C.; SANTOS, S.R.B.; COSTA, R.S.; MARCONE, G.P.S.; HONORATO, R.S.; NASCIMENTO, V.B.; ARAÚJO, M.C.U. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system, *Anal. Chim. Acta*, **518:25, 2004.**
- [33] OLIVEIRA, S.C.B.; COELHO, E.C.S.; SELVA, T.M.G.; SANTOS, F.P.; ARAÚJO, M.C.U.; ABREU, F.C.; NASCIMENTO, V.B. A coulometric flow cell for in-line generation of reagent, titrant or standard solutions, *Microchem. J.* **82:220, 2006.**
- [34] MEDEIROS, E.P.; NASCIMENTO, E.C.L.; MEDEIROS, A.C.D.; VERAS NETO, J.G.; SILVA, E.C.; ARAÚJO, M.C.U. Multicommutated generation of concentration gradients in a flow-batch system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs, *Anal. Chim. Acta*, **511:113, 2004.**
- [35] ALMEIDA, L.F.; MARTINS, V.L.; SILVA, E.C.; MOREIRA, P.N.T.; ARAUJO, M.C.U. Implementation of an automatic standard addition method in a flow-batch system: application to copper determination in an alcoholic beverage by atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **486:143, 2003.**
- [36] GRÜNHUT, M.; CENTURIÓN, M.E.; FRAGOSO, W.D.; ALMEIDA, L.F.; ARAÚJO, M.C.U.; BAND, B.S.F. Flow-batch technique for the simultaneous enzymatic determination of levodopa and carbidopa

in pharmaceuticals using PLS and successive projections algorithm, *Talanta*, **75:950, 2008**.

- [37] LIMA, M.B.; ANDRADE, S.I.E.; HARDING, D.P.; PISTONESI, M. F.; BAND, B.S.F.; ARAÚJO, M.C.U. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer, *Talanta*, **88:717, 2012**.
- [38] BARRETO, I.S.; ANDRADE, S.I.E.; LIMA, M.B.; SILVA, E.C.; ARAÚJO, M.C.U.; ALMEIDA, L.F. A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants, *Talanta*, **94:111, 2012**.
- [39] GRÜNHUT, M.; MARTINS, V. L.; CENTURION, M. E.; ARAÚJO, M. C. U.; BAND, B. S. F. Flow-batch analyzer for the chemiluminescence determination of catecholamines in pharmaceutical preparations. *Anal. Letter.* **44: 67, 2011**.
- [40] ACEBAL, C.C.; INSAUSTI, M.; PISTONESI, M. F.; LISTA, A. G.; BAND, B. S. F. A new automated approach to determine monosodium glutamate in dehydrated broths by using the flow-batch methodology. *Talanta*. **81: 116, 2010**.
- [41] ALMEIDA, L. F.; VALE, M. G. R.; DESSUY, M. B.; SILVA, M. M.; LIMA, R. S.; SANTOS, V. B.; DINIZ, P. H. D.; ARAÚJO, M. C. U. A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. *Talanta*. **73:906, 2007**.
- [42] MONTE-FILHO, S.S.; LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; HARDING, D. P.; FAGUNDES, Y. N. M.; SANTOS, S. R. B.; LEMOS, S. G.; ARAÚJO, M. C. U. Flow-batch miniaturization. *Talanta*. **86:208, 2011**.
- [43] LIMA, M. B.; BARRETO, I. S.; ANDRADE, S. I. E.; NETA, M. S. S.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U. Photometric determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps, *Talanta*, **98:118, 2012**.

- [44] LIMA, M. B.; BARRETO, I. S.; ANDRADE, S. I. E.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U. A micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps for the photometric determination of iodate in table salt, *Talanta*, **100:308, 2012**.
- [45] MESA, J. A. G.; LINARES, P.; CASTRO, M. D. L.; VALCÁRCEL, M. Direct automatic determination of polyphenols in olive oils in the aqueous phase of a flow-injection liquid-liquid extraction system without phase separation, *Analytica Chimica Acta*, **235:441, 1990**.
- [46] RÍO, V.; LARRECHI, M. S.; CALLAO, M. P. Sequential injection titration method using second-order signals: Determination of acidity in plant oils and biodiesel samples, *Talanta*, **81:1572, 2010**.
- [47] PASQUINI, C.; REBOUÇAS, M.V.; in: KOLEV, S.D.; MCKELVIE, I.D. (EDS.), *Comprehensive Analytical Chemistry Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, Elsevier, Amsterdam, pg. 617–638, **2008**.
- [48] LIMA, M.B.; INSAUSTI, M.; DOMINI, C.E.; PISTONESI, M.F.; ARAÚJO, M.C.U.; BAND, B.S.F. Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction, *Talanta*, **89:21, 2012**.
- [49] ANDRADE, S. I. E. Um analisador fluxo-batelada em imagem digital para determinação de Al (III) e Cr (VI) em águas. João Pessoa, Departamento de Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 89p, **2012**.
- [50] RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, *Química Nova*, **31:164, 2008**.
- [51] Guidance for industry. Q2B Text on validation of analytical procedures: methodology. s.l. : *International Conference on Harmonisation*, **1996**

- [52] FERREIRA, M.M.C. Planilha Eletrônica para Validação de Métodos Analíticos Univariados, disponível em: <<http://lqta.igq.unicamp.br/portugues/downloads/validar.xls>>. Acessado em **21/09/2012**.
- [53] DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. INMETRO, **2003**.
- [54] MCNAUGHT, A.D;. WI LKINSON, A. IUPAC *Compendium of Chemical Terminology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **1997**.
- [55] Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th, Cd 1 - 25, Champaign, USA, A.O.C.S., **1995**.