



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

VITÓRIA REGINA BISPO SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE METANOL E GLICEROL TOTAL EM
AMOSTRAS DE BIODIESEL EMPREGANDO ANÁLISE POR
INJEÇÃO EM FLUXO**

**SALVADOR
2014**

VITÓRIA REGINA BISPO SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE METANOL E GLICEROL TOTAL EM
AMOSTRAS DE BIODIESEL EMPREGANDO ANÁLISE POR
INJEÇÃO EM FLUXO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira

**SALVADOR
2014**

*A minha amada mãe Inês,
que nunca mediu esforços na busca pela meu sorriso.
A meu irmão Rodrigo Augusto (in memorian), sei que
está torcendo por mim.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida...

À minha família (Inês, Messias, Ricardo, Rodrigo, Kaliane, Gui e Dudu) pela base sólida que me deu força para encarar a vida de frente, por ter acreditado em mim, apoiado todas as minhas escolhas. Agradeço a meu irmão Ricardo pelos desenhos e ajudas em dias de domingo. Mãe, obrigada pelo incentivo incondicional, essa tese é em sua homenagem.

Contei com o estímulo, ajuda e carinho de todos os outros membros da minha família (vó, tios, primos e sogros), que permaneceram comigo mesmo com toda a ausência provocada por este curso. Agradeço pelo apoio e torcida. Gostaria de agradecer especialmente à meu marido, Eduardo, sem seu amor, companheirismo e compreensão, eu certamente não seguiria em frente. Sei que é difícil a convivência de quem decide acompanhar uma candidata a Doutora.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira, pelo incentivo, dedicação e enriquecimento do trabalho através das discussões travadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis, orientação, carinho e atenção constante prestada na minha estadia no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP). Agradeço a todo o seu grupo de pesquisa pelo acolhimento.

Ao Prof. Dr. Silvio do Desterro Cunha pela colaboração com os mecanismos de reação.

Ao Prof. Dr. Mauro Korn pela paternidade científica e pelos ensinamentos.

Aos amigos do grupo de pesquisa IDEIA pelas alegrias, discussões, tristezas, suor, animação e tudo mais que dividimos em todos estes anos. Com certeza vivemos muitas emoções. Vocês estiveram comigo em momentos importantes da minha vida. Um agradecimento especial a aluna de iniciação científica Paloma Muller. Com ela compartilho o mérito deste trabalho. Agradecimentos especiais também aos amigos Anaildes, Jorge, Adriana, Quelle, Aldo, Roberta e Creuza.

Agradeço a meu amigo Josué por ajuda nas árduas correções e amizade e a minha amiga Daniela pela correção do abstract.

Aos amigos do Departamento de Química do IFBA (Salvador), vocês foram muito importante ao apoiarem a realização desse trabalho.

A todos os meus amigos pela torcida e incentivo.

À Capes pela bolsa concedida para execução desse trabalho no primeiro ano do doutorado.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia.

Agradecer não é uma tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço a todos que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para a construção de quem sou hoje e para realização desse trabalho.

Obrigada por acreditarem em mim.

RESUMO

Os combustíveis automotivos exigem controle de qualidade para garantir a melhor utilização de energia com mínima poluição ambiental. Características dos combustíveis podem ser modificadas pelo transporte, armazenamento e manuseio inadequados, bem como adulteração. O monitoramento contínuo é de suma importância para reduzir tais irregularidades, exigindo, portanto, métodos analíticos confiáveis, que devem ser simples, rápidos, minimizando o consumo de reagentes e geração de resíduos. Nesse sentido, os sistemas em fluxo podem contribuir por meio de manipulação automatizada de amostras e reagentes em sistemas fechados em condições reprodutíveis. O metanol e o glicerol são, respectivamente, reagente e coproduto da transesterificação, processo mais comum de obtenção de biodiesel. O excesso de metanol no biodiesel pode provocar corrosão de partes metálicas do motor, aumento do número de cetanos, além de poder modificar o ponto de fulgor do biodiesel. Já o alto teor de glicerol pode provocar problemas de armazenamento, danos ao motor, formação de depósitos, entupimentos dos bicos injetores e sua combustão pode gerar problemas ambientais. No presente trabalho, foram realizadas duas propostas de sistemas em linha para contribuir com o controle de qualidade de biodiesel. Um módulo foi desenvolvido para preparo de amostra em linha explorando extração líquido-líquido de etanol em biodiesel em meio aquoso. E, um segundo módulo foi elaborado para determinação de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel. A extração líquido-líquido foi realizada em uma câmara de vidro acoplada às linhas de fluxo e o gerenciamento das soluções foi promovido por computador e válvulas solenóides de três vias. A eficiência da extração foi avaliada juntamente com parâmetros como número de extrações, tempo de agitação da mistura, fracionamento do volume da amostra e substituição da solução extratora por solução salina. É possível explorar o potencial do módulo construído para extrações líquido-líquido envolvendo matrizes semelhantes ao biodiesel e analitos com características semelhantes às do etanol. Também é possível empregar o módulo desenvolvido para estratégias de pré-concentração do analito no meio extrator a partir da injeção de novas alíquotas de amostra na câmara de extração. Dessa forma, todas as etapas da extração líquido-líquido podem ser mecanizadas, reduzindo a manipulação humana. A segunda etapa do trabalho consistiu na construção de um módulo para determinação simultânea de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) e detecção espectrofotométrica (453 nm). Não foram obtidas figuras de mérito satisfatórias para determinação de metanol na amostra em estudo. Para determinação de glicerol total, empregou-se um diagrama FIA com injetor comutador e solução carregadora de NaOH em meio aquoso ($0,003 \text{ mol L}^{-1}$), $300 \mu\text{L}$ de solução de glicerol e reagente NQS ($7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) cada. O comprimento da bobina era 100 cm , vazão do carregador de $3,90 \text{ mL min}^{-1}$ e pH do meio em 12. A faixa linear obtida foi de 0,15 a 1,00 % v/v em glicerol, quando pré-concentração do analito não foi realizada. Os resultados encontrados através do método proposto concordaram com os resultados do método de referência ao nível de confiança de 95% e estiveram no intervalo de média robusta $\pm 3s$. Diferentes amostras de biodiesel foram analisadas após procedimento de pré-concentração pelo método proposto e o teor de glicerol encontrado variou de $(0,059 \pm 0,005)$ a $(0,240 \pm 0,005)$ % (m/m).

Palavras-chave: biodiesel, glicerol total, metanol, extração líquido-líquido, 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio, análise por injeção em fluxo.

ABSTRACT

Automotive fuels require quality control to ensure the best use of energy with minimal environmental pollution. Fuel characteristics can be modified by unsuitable transportation, storage and handling as well as adulteration. The continuous monitoring is extremely important to reduce such irregularities, requiring, therefore reliable analytical methods, which must be simple, fast, minimizing reagent consumption and waste generation. In this sense, flow systems can contribute through automated handling of samples and reagents in closed systems under reproducible conditions. Methanol and glycerol are, respectively, reagent and coproduct of transesterification, the most common process for biodiesel obtaining. The excess of methanol in biodiesel can cause corrosion of metal parts of the engine, increase of the cetane number, and it can modify the flash point of biodiesel. The high content of glycerol can cause storage problems, engine damage, formation of deposits, clogging of nozzles and its combustion can generate environmental problems. In this work, two proposals of flow systems were performed to contribute to the biodiesel quality control. A module was developed for on-line sample preparation by exploring liquid-liquid ethanol extraction from biodiesel in aqueous medium. Besides, a second module was developed for determination of methanol and total glycerol in biodiesel samples. The liquid-liquid extraction was performed in a glass chamber coupled with the flow lines and the management of the solutions was performed by a computer and three-way solenoid valves. The extraction efficiency was evaluated along with parameters such as number of extractions, time of mixture stirring, fractioning of the sample volume and replacement of the extraction solution by saline solution. It's possible to explore the potential of the built module for liquid-liquid extractions involving matrices similar to biodiesel and analytes with characteristics similar to ethanol ones. It's also possible to employ the developed module for strategies of analyte pre-concentration in the extractor by injection of new aliquots of the sample through the extraction chamber. Thus, all stages of liquid-liquid extraction can be mechanized resulting in an human manipulation reduction. The second stage of the work consisted in building a module for simultaneous determination of methanol and total glycerol in biodiesel samples by using sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) and spectrophotometric detection (453 nm). No satisfactory figures of merit were obtained for determination of methanol in the target sample. For total glycerol determination, it was employed a FIA diagram with switch injector and NaOH aqueous solution ($0,003 \text{ mol L}^{-1}$) as carrier, $300 \mu\text{L}$ of a glycerol solution and reagent NQS ($7.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) each of them. The coil length was 100 cm, the carrier flow of 3.90 ml min^{-1} and medium pH of 12. The linear range obtained was between 0.15 to 1.00% v/v in glycerol when pre-concentration of the analyte was not performed. The obtained results through the proposed method agreed with the results of the reference method at a confidence level of 95% and they were in the range of robust mean $\pm 3s$. Different biodiesel samples were analyzed by the proposed method after pre-concentration and the glycerol content found varied from (0.059 ± 0.005) to $(0.240 \pm 0.005) \%$ (m/m).

Keywords: biodiesel, total glycerol, methanol, liquid-liquid extraction, sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, flow injection analysis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO

1:

- Figura 1.1.** *Etapas de uma reação de transesterificação para produção de biodiesel.* 14
- Figura 1.2.** *Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo.* 18
- Figura 1.3.** *Diagrama de sistema de análise por injeção sequencial.* 20

CAPÍTULO

3:

- Figura 3.1.** *Câmara de separação desenvolvida em borossilicato acoplada ao motor de corrente contínua.* 48
- Figura 3.2.** *(i) Digrama de fluxo em que há o acoplamento do sistema de extração líquido-líquido com um fotômetro e uma cela de detecção posicionada na vertical ($\lambda = 590$ nm). (ii) Base de tempo de acionamento das válvulas solenóides v_i e motor correspondem a T_i e T_m , respectivamente.* 50
- Figura 3.3.** *Diagrama do sistema de análise por injeção em fluxo inicial empregado para a etapa de medida do sinal analítico ($\phi = 1,60$ mL/min).* 54

CAPÍTULO

4:

- Figura 4.1.** *Diagramas de extração líquido-líquido em linha empregando a injeção da mistura na câmara de separação (A) e empregando a injeção de cada uma das fases individualmente na câmara de separação (B).* 64
- Figura 4.2.** *Digrama de fluxo em que há o acoplamento do sistema de extração líquido-líquido com um espectrofotômetro Femto 432 ($\lambda = 590$ nm).* 66
- Figura 4.3.** *Efeito do número de extrações sobre o sinal analítico para o sistema de extração de etanol em biodiesel.* 67

Figura 4.4.	<i>Efeito do tempo de agitação sobre o sinal analítico para o sistema de extração de etanol em biodiesel.</i>	69
Figura 4.5.	<i>Espectros na região entre 350 e 800 nm do reagente NQS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso durante 90 min sem e com exposição a luz ambiente.</i>	72
Figura 4.6.	<i>Espectros na região do visível do produto da reação entre de soluções de referência de metanol em diferentes concentrações (% v/v) com o reagente NQS.</i>	74
Figura 4.7.	<i>Comparação dos espectros entre 400 e 800 nm correspondentes aos produtos da reação do NQS com soluções de referência de metanol (preto) e etanol (vermelho) 4% v/v.</i>	75
Figura 4.8.	<i>Avaliação da absorvância em função do tempo de reação entre metanol e NQS em meio alcalino a partir de medidas espectrofotométricas em 453 nm.</i>	76
Figura 4.9.	<i>Curva analítica construída a partir de experimentos em batelada para determinação de metanol com NQS em meio alcalino, tempo de equilíbrio = 55 min.</i>	77
Figura 4.10.	<i>Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol.</i>	80
Figura 4.11.	<i>Efeito da concentração do reagente NQS sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol.</i>	83
Figura 4.12.	<i>Efeito do comprimento da bobina de reação sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol.</i>	83
Figura 4.13.	<i>Fiograma do registro da região alcalina da avaliação do efeito da acidez do meio sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol.</i>	85
Figura 4.14.	<i>Avaliação do sinal analítico e do perfil do pico com a concentração do carregador NaOH.</i>	86
Figura 4.15.	<i>Curva analítica referente aos sinais apresentados na</i>	88

Tabela 4.7, método para determinação de metanol empregando NQS.

- Figura 4.16.** *Curva analítica referente ao método para determinação de metanol empregando NQS aplicada na análise das amostras A1 a A7.* 89
- Figura 4.17.** *Sinais analíticos registrados para curva construída com adição de borato como possível mascarante do glicerol no sistema para determinação de metanol empregando NQS.* 92
- Figura 4.18.** *Curva analítica para solução de metanol com adição conhecida e fixa de glicerol empregando tampão Britton Robinson como solução transportadora.* 93
- Figura 4.19.** *Sinais registrados no comprimento de onda de máxima absorção do espectro do produto de reação em função do tempo de aquisição do sinal.* 95
- Figura 4.20.** *Curvas analíticas para determinação de metanol empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo.* 97
- Figura 4.21.** *Curvas analíticas para determinação de glicerol empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo.* 98
- Figura 4.22.** *Curvas analíticas para determinação de metanol (i), glicerol(ii) empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo.* 100
- Figura 4.23.** *Curvas analíticas para determinação de metanol e glicerol na mistura (i) resposta em função de metanol, (ii) resposta em função de glicerol, empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo.* 101
- Figura 4.24.** *Avaliação do efeito da concentração do reagente sobre a sensibilidade analítica para determinação de glicerol em pH 2.* 105
- Figura 4.25.** *Avaliação do efeito da concentração do reagente sobre a sensibilidade analítica para determinação de glicerol em pH 12.* 105

Figura 4.26.	<i>Efeito do comprimento de bobina reacional sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de glicerol.</i>	107
Figura 4.27.	<i>Efeito da vazão da solução transportadora sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de glicerol.</i>	107
Figura 4.28.	<i>Curva analítica para soluções de glicerol obtidas através do procedimento nas condições otimizadas.</i>	108
Figura 4.29.	<i>Curva analítica desenvolvida nas condições otimizadas para o sistema de determinação de glicerol empregada para validação com adição de analito.</i>	109
Figura 4.30.	<i>Curva analítica desenvolvida nas condições otimizadas para o sistema de determinação de glicerol para análise de amostras do interlaboratorial.</i>	111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO

1:

- Tabela 1.1.** *Especificações para o biodiesel com suas respectivas normas reguladoras (ANP, resolução nº14/2012)* 9
- Tabela 1.2.** *Aplicações de sistemas em fluxo para análises de biodiesel.* 41

CAPÍTULO

3:

- Tabela 3.1.** *Parâmetros fixados para avaliação dos sistemas de extração líquido-líquido em linha das amostras de biodiesel.* 49

CAPÍTULO

4:

- Tabela 4.1.** *Efeito do número de divisões da alíquota final da amostra versus volume de amostra por extração sobre o sinal analítico para o sistema de extração líquido-líquido de etanol em biodiesel.* 68
- Tabela 4.2.** *Sinais analíticos registrados para soluções de referências de metanol sem e com emprego de interrupção de fluxo de 5 min.* 79
- Tabela 4.3.** *Efeito do aquecimento da bobina de reação em aquecimento condutivo (temperatura = 53 °C) e em micro-ondas sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol.* 82
- Tabela 4.4.** *Efeito do pH sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol.* 85
- Tabela 4.5.** *Sinais analíticos registrados para curva analítica e amostra sem e com adição de metanol.* 89
- Tabela 4.6.** *Sinais analíticos registrados para estudo do efeito do glicerol como possível interferente no sistema para determinação de metanol empregando NQS.* 90

Tabela 4.7.	<i>Sinais analíticos registrados para estudo do efeito do glicerol como possível interferente no sistema para determinação de metanol empregando NQS.</i>	92
Tabela 4.8.	<i>Efeito do pH sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de glicerol em biodiesel.</i>	96
Tabela 4.9.	<i>Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico do branco.</i>	99
Tabela 4.10.	<i>Efeito da concentração do reagente NQS sobre o sinal analítico no sistema para determinação de glicerol.</i>	104
Tabela 4.11.	<i>Figuras de mérito obtidas pelo método proposto para determinação de glicerol total em amostras de biodiesel a partir da curva apresentada na Figura 4.33.</i>	108
Tabela 4.12.	<i>Resultados referente ao teste de adição de analito em diferentes concentrações ao óleo de soja.</i>	109
Tabela 4.13.	<i>Comparação entre os resultados obtidos para concentração (%v/v) de glicerol total empregando o método proposto e o método de referência.</i>	112
Tabela 4.14.	<i>Teores de glicerol total em amostras de biodiesel obtidos a partir do procedimento proposto empregando NQS como reagente (n=3).</i>	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEAC	Álcool etílico anidro combustível
AEHC	Álcool etílico hidratado combustível
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	American Society of Testing and Materials
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo
EN	Norma Europeia
F AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica com Chama
FIA	Análise por Injeção em Fluxo
FI-FT-IR	Sistema de injeção em fluxo com infravermelho com transformada de Fourier
FT-IR	Infravermelho com transformada de Fourier
NQS	1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio
SIA	Análise por Injeção em Sequencial
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Introdução	1
1.1. Combustíveis líquidos automotivos	1
1.1.1. Gasolina e Diesel	2
1.1.2. Etanol e Biodiesel	4
1.2. Controle de qualidade de combustíveis	10
1.3. Automatização de procedimentos analíticos	16
1.4. Procedimentos de análises por injeção em fluxo no controle de qualidade de combustíveis automotivos	23
1.4.1. Gasolina e Diesel	23
1.4.2. Etanol combustível	27
1.4.3. Biodiesel	33
CAPÍTULO 2: Objetivos	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
CAPÍTULO 3: Experimental	43
3.1. Reagentes e soluções	43
3.2. Amostras	45
3.3. Equipamentos e materiais	46
3.4. Procedimento experimental	47
3.4.1. Módulo para extração líquido-líquido de etanol em amostras de biodiesel	47
3.4.2. Determinação espectrofotométrica de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS)	53
3.4.2.1. Determinação de metanol em amostras de Biodiesel	53
3.4.2.2. Determinação de glicerol total em amostras de Biodiesel	58

CAPÍTULO 4: Resultados e Discussão	62
4.1. Módulo para extração líquido-líquido de etanol em amostras de biodiesel	62
4.2. Determinação espectrofotométrica de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS)	71
4.2.1. Determinação de metanol em amostras de biodiesel	71
4.2.1.1. Procedimento em batelada	71
4.2.1.2. Procedimento em análise por injeção em fluxo (FIA)	77
4.2.2. Determinação simultânea de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel	94
4.2.3. Determinação de glicerol total em amostras de biodiesel	102
CAPÍTULO 5: Conclusões	114
CAPÍTULO 6: Referências Bibliográficas	116

1 – Introdução

1.1 – Combustíveis líquidos automotivos

A história da humanidade está intimamente ligada à história da energia. Uma das maiores características da sociedade moderna é a demanda por energia para obtenção da qualidade de vida, que resulta em crescente consumo de combustíveis.

Com o avanço das áreas técnicas no século XIX, milhares de transformações se impuseram no cenário urbano em todo o mundo. As ferrovias, navios a vapor, fábricas e eletricidade modificaram as paisagens rurais, mas, sobretudo, as urbanas. Uma dessas máquinas fabricadas, que se tornou componente obrigatório das paisagens urbanas, foi o automóvel. Essa relevante máquina passou a ser considerada para o planejamento de cidades e países, visando o gerenciamento da circulação desse veículo (ANP, 2014).

A indústria do automóvel, assim como a indústria siderúrgica, apresentou grande crescimento com o surgimento de várias empresas e uma grande concentração de capital em alguns poucos grupos, devido aos crescentes custos para o desenvolvimento de um automóvel e à grande quantidade de tecnologia envolvida no processo de sua fabricação. A produção em massa, uma inovação que visava diminuir os custos, passou a ser vista como a única forma de garantir a rentabilidade dos fabricantes.

A legislação se tornou, juntamente com o consumidor, mais exigente em relação aos padrões de qualidade e segurança, requerendo cada vez mais cuidado e detalhamento na fabricação de automóveis. Isso colaborou para que a indústria automobilística se tornasse um dos ramos industriais mais importantes (ANP, 2014).

No Brasil e em praticamente toda a América Latina, a produção dos veículos em série só se concretizou após a segunda guerra mundial, período em que o Brasil

viveu a explosão da indústria automobilística. No governo de Juscelino Kubitschek, montadoras de veículos do mundo inteiro se instalaram no país. Atualmente, os automóveis podem ter muitos significados, que vão desde a necessidade de mobilidade ao conforto e status social. De qualquer forma, o setor automobilístico, após pequenas oscilações econômicas na história, continua como um dos mais fortes do mundo (ANP, 2014).

Os primeiros automóveis não utilizavam os combustíveis atualmente empregados para gerar energia mecânica. Inicialmente, os veículos eram autopropulsionados através de motores a vapor. Devido ao elevado peso, esse motor não era uma boa solução para os automóveis. Mas constituíram o projeto básico das locomotivas. A invenção do motor de combustão interna de quatro tempos de Nicolau Augusto Otto, no entanto, foi o que veio a revolucionar o uso do automóvel. Em 1883, o alemão Rudolph Diesel criou o motor que foi denominado como diesel. Esse motor apresentou maior robustez que o motor de quatro tempos devido à ampla faixa de compressão de ar (Biodiesel Brasil, 2011).

Devido à necessidade do emprego de combustível nesses motores, pode-se notar que o petróleo ainda é fator fundamental e estratégico no desenvolvimento contínuo das economias mundiais e uma das principais fontes de energia mundial, essencial para o planejamento futuro. Entre os principais combustíveis utilizados em veículos automotivos estão os derivados de petróleo: gasolina e diesel, e os biocombustíveis: etanol e biodiesel.

1.1.1 – Gasolina e Diesel

O petróleo é um combustível fóssil resultante da transformação e decomposição de matéria orgânica de plantas aquáticas e animais pré-históricos,

que foram se acumulando ao longo de milhões de anos (de 15 a 500 milhões de anos) no fundo dos mares, lagos e pântanos (Campos e Leontsinis, 1990). É constituído por uma complexa mistura de diferentes substâncias químicas, consistindo predominantemente de hidrocarbonetos (ANP, 2014). O petróleo cru tem pouca aplicação, mas com o refino, obtêm-se diversas frações úteis que continuam sendo misturas de hidrocarbonetos, porém com menos componentes que o petróleo cru original. Devido à grande variedade de petróleos existentes, foi necessário classificá-los em grupos que respeitem sua constituição química e suas propriedades. Isso é importante porque define os parâmetros comerciais e operacionais. São diversos os sistemas de classificação de petróleo, mas em todos eles, seus principais derivados empregados como combustíveis – a gasolina e o diesel – pertencem a diferentes classes devido a distintas propriedades físico-químicas (Suslick e Novaes, 2003).

Gasolina e diesel são derivados do petróleo e consistem principalmente em hidrocarbonetos. As gasolinas automotivas são os combustíveis utilizados em motores de combustão interna com ignição por centelha, que operam segundo o ciclo Otto, e trata-se de uma mistura complexa de hidrocarbonetos olefínicos, parafínicos, naftênicos e aromáticos. Os hidrocarbonetos que compõem a gasolina são, em geral, mais “leves” do que aqueles que compõem o óleo diesel, pois são formados por moléculas de menores cadeias carbônicas (normalmente de 4 a 12 átomos de carbono) (Teixeira et al., 2007).

A gasolina atualmente disponibilizada em nosso país para o consumidor final e que é comercializada pelos postos revendedores possui compostos oxigenados em sua composição, como aldeídos, fenóis, furanos e, em maior quantidade, álcool

etílico anidro. A gasolina comercializada é denominada como gasolina tipo “C” que contém álcool etílico anidro (AEAC) em teor determinado pela legislação em vigor.

Já o diesel é a fração de hidrocarbonetos que entram em ebulição entre 150 e 370°C. São os hidrocarbonetos destilados intermediários do petróleo. Apesar de ampla faixa de ebulição, geralmente são hidrocarbonetos que possuem entre 9 e 20 átomos de carbono. Propriedades como densidade, poder calorífico, viscosidade, ponto de fluidez e número de cetanos variam com a distribuição dos diversos hidrocarbonetos.

O diesel é selecionado de acordo com suas características de ignição e de escoamento, adequadas ao funcionamento dos motores ciclo diesel. Esse combustível quando comprimido juntamente com ar e sofre ignição, provoca forte explosão, que favorece o emprego desse combustível em veículos de grande porte. A predominância por transporte rodoviário faz com que o diesel seja o combustível mais utilizado no Brasil (Campos e Leontsinis, 1990).

1.1.2 – Etanol e Biodiesel

No início da década de 1970, os poucos países produtores de petróleo, formaram um cartel com a finalidade de unificar e controlar o preço do petróleo no mercado internacional, esses países constituíram a Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP). O Cartel provocou três grandes choques à economia mundial, devido à elevação dos preços do barril de petróleo. Os primeiros choques ocorreram em 1973 e 1980, e o mais recente, no início de 2008, quando o preço do barril de petróleo atingiu U\$ 150. Devido à recessão econômica mundial, em 2009, o preço do barril diminuiu para valores próximos de U\$ 70 (Lopes Neto, 2009). O retorno do crescimento da economia mundial provoca o aumento do

consumo e dos preços do petróleo (Schuchardt et al., 2001), afetando os países dependentes de sua importação, principalmente os que estão em fase de desenvolvimento. Uma das soluções para reduzir essa dependência à importação de petróleo é o uso de fontes energéticas alternativas e renováveis (Kammen, 2006; Hamelincka e Faaij, 2006).

O emprego de biocombustíveis tem sido uma alternativa aos combustíveis derivados de petróleo e já tem contribuído muito à matriz energética mundial. Basicamente dois componentes contribuíram para este fato: o emprego do etanol como substituto da gasolina nos motores de ciclo Otto e a utilização de biodiesel como substituto de fração do diesel nos motores de ciclo diesel. Em 2014, uma medida provisória (647/14) foi aprovada no congresso para comercialização do diesel contendo 7% de biodiesel.

No Brasil, os motores ciclo Otto operam utilizando gasolina ou etanol na forma direta. Um programa pioneiro no Brasil (Proálcool) para o emprego de etanol da cana-de-açúcar foi implementado em 1970 como uma resposta às crises geradas pelos combustíveis derivados de petróleo. O programa tinha como objetivo garantir o suprimento de etanol no processo de substituição da gasolina. Tinha também como meta apoiar o desenvolvimento tecnológico da indústria sucroalcooleira (Anciães et al., 1981).

Na primeira fase do programa, até 1979, a ênfase foi dada a produção de álcool etílico anidro combustível (AEAC) para ser misturado à gasolina. Essa adição confere maior poder antidetonante ao combustível.

Na segunda fase, a ênfase passou a ser o álcool etílico hidratado combustível (AEHC), usado puro em motores adaptados para o combustível. Dessa forma, houve um grande crescimento do uso de etanol como combustível automotivo.

Entre 1983 e 1988, mais de 90% dos automóveis vendidos no país eram movidos a etanol. Quando os preços do petróleo começaram a cair e surgiram problemas no motor no fim da década de 80, a produção do álcool etílico hidratado declinou. Ao fim da década de 90, apenas cerca de 1% dos carros vendidos tinham motores a etanol. Apesar das flutuações conjunturais, o etanol manteve-se como importante componente na matriz energética brasileira, uma vez que passou a ser misturado à gasolina em percentuais de até 25% (ANP), e usado na forma anidra nos veículos bicombustíveis.

Os veículos conhecidos como bicombustíveis funcionam com dois distintos combustíveis. O mais comum entre esses veículos opera com motores ciclo Otto que funcionam tanto com gasolina quanto com álcool. Os dois combustíveis podem ser queimados simultaneamente e esses motores são empregados para carros leves. No Brasil, esses carros começaram a ser produzidos em 2003 e, em 2008, a maioria dos carros que circulavam no país já podiam operar com os dois combustíveis. A alta aceitação do AEHC, juntamente com o álcool que é adicionado a gasolina tem impulsionado o consumo de etanol no Brasil. Mas a utilização do álcool etílico como combustível automotivo ou como aditivo à gasolina não foi só por motivos econômicos. A esse combustível não é necessário adicionar aditivos tóxicos como o éter metil-terc-butílico (MTBE). O álcool é um combustível mais limpo ambientalmente e a sua queima reduz as emissões de SO₂, CO e hidrocarbonetos (Anciães et al.,1981).

Grande parcela do diesel é usada em atividades que provocam impactos diversificados e acumulativos sobre a economia: transporte de cargas e pessoas, geração de energia e na agricultura (MME, 2006). Assim, é natural que países dependentes de petróleo continuem na busca por saídas alternativas ao diesel

convencional. Neste contexto, o biodiesel ocupa posição de destaque entre os combustíveis alternativos já que pode substituir parcial (pela mistura ao diesel convencional) ou integralmente o diesel de petróleo para utilização em motores ciclo diesel. Apresenta, ainda, baixa toxidez, baixo teor de compostos sulfurados e ausência de compostos aromáticos, sendo ecologicamente mais limpo do que o diesel (Sharma et al., 2006).

O biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, que pode ser obtido por diferentes processos, tais como o craqueamento, a esterificação e a transesterificação, sendo o último o mais empregado (ANP, 2014). Na reação de transesterificação, o óleo vegetal ou a gordura animal reage com um álcool (usualmente metanol ou etanol) na presença de um catalisador (usualmente uma base forte) para formar os compostos alquil éster correspondentes aos ácidos graxos encontrados no óleo ou gordura precursores (Knothe, 2006). Os óleos vegetais ou gorduras animais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres derivados do glicerol (triacilgliceróis ou triglicerídeos), cujos ácidos graxos contêm cadeias de 8 a 24 átomos de carbono com diferentes graus de insaturação.

Vários países vêm adotando o biodiesel em sua matriz energética, sempre o adicionando ao diesel convencional. Uma nomenclatura própria vem sendo adotada para designar o percentual de biodiesel na mistura: a letra “B” seguida do percentual de biodiesel na mistura. Assim o B15 indica que é uma mistura constituída de 15% de biodiesel e 85% de diesel convencional; o B4 possui 4% de biodiesel diluído em diesel e o B100 é o biodiesel puro.

A Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Essa lei tornou obrigatória a utilização da mistura B2 para o diesel automotivo, ou seja, adição de 2% de biodiesel ao diesel derivado de

petróleo e estipulou a meta de 5% de adição do produto ao óleo diesel no prazo de oito anos. Desde então, diversas espécies de oleaginosas têm investigadas para a produção do biodiesel em território nacional, tais como mamona, soja, dendê, girassol, amendoim, pequi e algodão (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, 2014), apesar de nem todas as variedades resultarem em combustível para fins comerciais. A resolução 06/2009 oriunda do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE, 2009) estabeleceu que todo diesel comercializado no Brasil após 01 de janeiro de 2010 deveria conter 5% de biodiesel. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis (ANP, 2014). Esses percentuais não foram definidos aleatoriamente, são quantidades que não afetam o funcionamento dos motores desenvolvidos para trabalhar exclusivamente com diesel (Ribeiro, 2006). Os principais parâmetros de qualidade monitorados em biodiesel incluem glicerol livre e total, água, teor de álcool residual, índice de iodo, íons metálicos e as concentrações de não metais (Monteiro et al., 2008). As especificações da ANP biodiesel para que o mesmo possa ser comercializado em território nacional juntamente com suas normas reguladoras estão apresentadas na Tabela 1.1. (ANP, resolução nº14/2012).

Tabela 1.1. Especificações para o biodiesel com suas respectivas normas reguladoras (ANP, resolução nº14/2012)

PARÂMETRO	UNIDADE	Especificações	Método	
			ABNT NBR	ASTM D
Número de Cetano, mín.	-	Anotar**		
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850-900	7148 14065	1298 4052
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445
Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0	14598	93
Resíduo de carbono, max.	% massa	0,050	15586	4530
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	5-19*	14747	6371
Teor de Água, máx.	mg/kg	200	-	6304
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15553 15554 15555 15556	-
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 15771	6584
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 15908	6584
Mono, di, triacilglicerol	% massa	Anotar**	15342 15344	6584
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,80	15342 15344 15908	6584
Diacilglicerol, max.	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	
Índice de lodo	g/100g	Anotar**	-	-
Estabilidade à oxidação a 110°C	h	6	-	-

*Variável de acordo com mês e estado. **Anotar: apenas registrar resultados, mas não está especificado teor limite.

1.2 – Controle de qualidade de combustíveis

Os parâmetros para controle de qualidade de um determinado produto estão relacionados com a destinação que aquele produto terá. Assim, é normal que o etanol empregado como combustível automotivo tenha especificações totalmente distintas do etanol que será empregado para fins medicinais. A substância é a mesma, mas por terem usos diferentes, são produtos distintos e, conseqüentemente, terão um conjunto de especificação diferente.

A qualidade dos combustíveis é estabelecida por lei e reforçada por especificações técnicas estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Dessa forma, é necessário que haja um rígido controle da qualidade desses combustíveis, garantindo que os direitos do consumidor sejam preservados, uma vez que os combustíveis automotivos podem não atender às especificações da ANP devido a problemas na produção, transporte, armazenamento e manipulação.

O processo de produção é característico de cada tipo de combustível e em cada um desses processos, devem ser monitorados parâmetros que influenciarão na qualidade do produto que será comercializado. O conjunto de parâmetros de qualidade também deve conter características que reproduzam a tendência do combustível para sofrer degradação durante o transporte, armazenamento e mistura ao diesel. Este é um fator importante, pois os efeitos da oxidação causados pelo contato do combustível com o ar (auto-oxidação), temperatura, luz, presença de metais catalíticos, entre outros, reduzem a sua qualidade durante o armazenamento (Ferrari e Souza, 2009).

Além disso, alguns combustíveis (gasolina e diesel, geralmente) podem ser adulterados pela adição ilegal de outras substâncias como solventes, refinados

petroquímicos, querosene e óleo diesel. A presença dessas substâncias pode acarretar problemas no motor, corrosão prematura do tanque e de peças, e aumento na emissão de poluentes. A adulteração do combustível também implica em sonegação fiscal, uma vez que, normalmente, os impostos cobrados sobre as substâncias irregularmente adicionadas a esses combustíveis são menores. Todavia, os baixos preços das substâncias empregadas nessas fraudes em relação ao combustível, principalmente se comparado à gasolina, a facilidade de aquisição dos mesmos e misturas dessas substâncias com a gasolina, tornam o valor final do combustível menor.

A ANP é um órgão governamental que regula o uso dos combustíveis automotivos, estabelecendo os parâmetros de qualidade e os métodos para obter estes parâmetros para a comercialização (ANP, 2014). A ANP exige a execução de uma série de ensaios para verificação de um grupo de parâmetros químicos e físico-químicos que permitem avaliar a adequação dos combustíveis que são requisitos básicos para o bom desempenho do motor, comercializados por distribuidores e revendedores. Esses ensaios devem gerar resultados confiáveis (precisão e exatidão). Seria ideal que fossem ensaios simples e rápidos. Isso porque pode ocorrer grande demanda de análises de combustíveis fora das especificações. Para garantia de intervenções legais rápidas, é necessário repetir todo processo analítico como contraprova ou amostra testemunho, visando garantir a confiabilidade dos resultados, antes que os estabelecimentos que comercializam este tipo de produto sofram as punições previstas por lei (Lei 9847/99).

O intervalo de tempo necessário para emissão de resultados sobre a qualidade do combustível e tomada de decisões é crítico para a redução do número de consumidores possivelmente lesados. Dessa forma, a monitoração continua na

produção, transporte e comercialização da qualidade dos combustíveis automotivos é necessária, uma vez que os consumidores e a União podem ser lesados por fraudes.

A adoção de parâmetros internacionais para o controle de qualidade de combustíveis para avaliação dos combustíveis nacionais, numa primeira avaliação, aumenta a confiabilidade de resultados, uma vez que métodos foram validados e empregados por diferentes laboratórios do mundo. Por outro lado, combustível como a gasolina que apresenta baixo teor de etanol em outros países em relação ao etanol adicionado à gasolina brasileira, apresenta propriedades físico-químicas diferentes, podendo provocar a obtenção de dados errôneos.

Há uma série de procedimentos analíticos que empregam a espectrometria atômica e cromatografia gasosa, a primeira principalmente para determinação de metais e a segunda para promover separação de determinação de alguns compostos orgânicos. Essas duas técnicas requerem instrumentação de alto custo e manutenção. Além disso, os tempos requeridos nas análises cromatográficas são usualmente superiores a 30 min, comprometendo a frequência de determinações e, conseqüentemente, alimentando o desafio para redução de tempos de análises dos combustíveis automotivos.

Outro problema que dificulta o emprego de técnicas cromatográficas é a necessidade de padrões específicos para cada tipo de combustível. Limitando o combustível somente a biodiesel, seria necessária uma diversidade de padrões, uma vez que o biodiesel pode ser originado de diversas oleaginosas que apresentam diferentes composições de ácidos graxos.

As titulações, caracterizadas como técnicas clássicas, ainda são responsáveis por uma gama de métodos de referência de diversos tipos de amostra e não seria

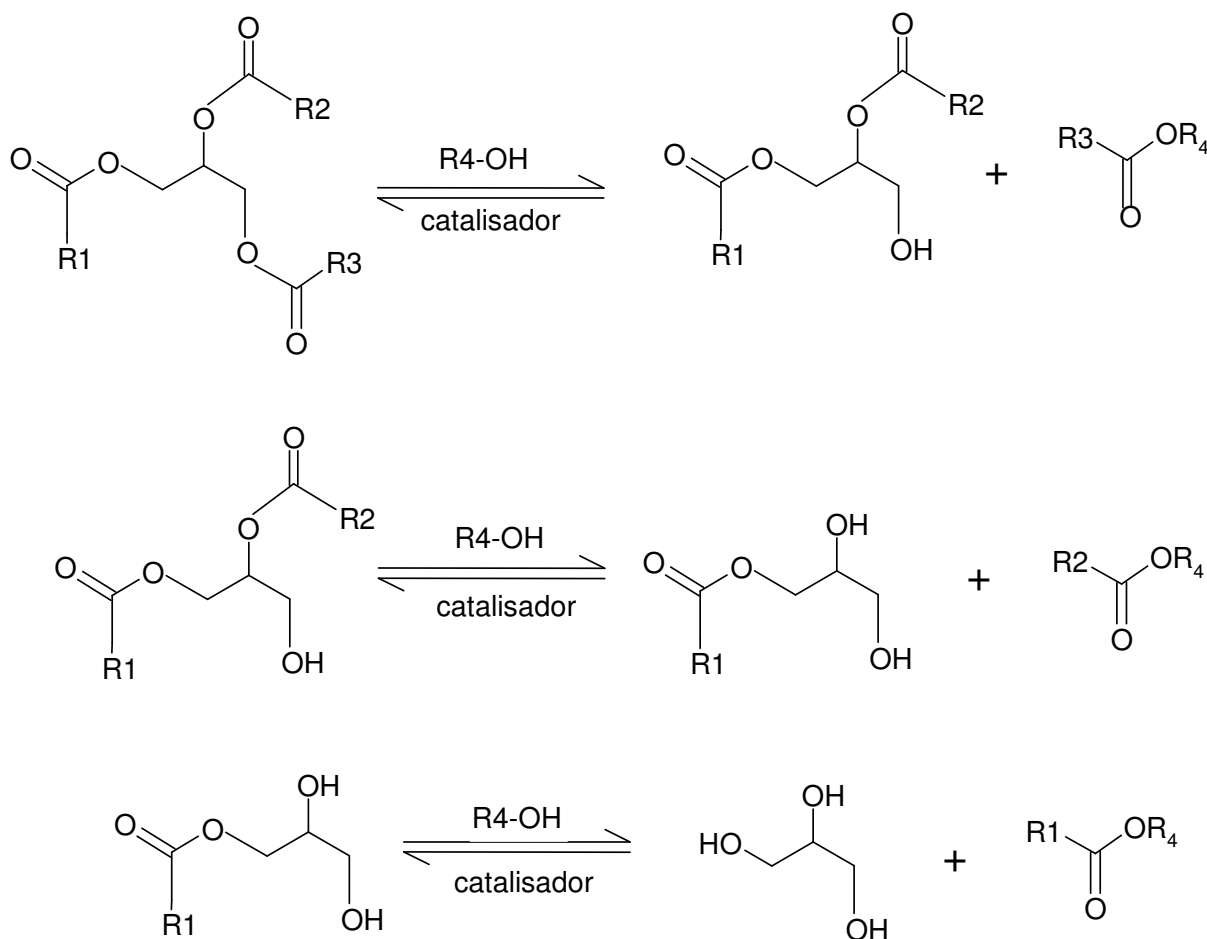
diferente para análise de amostras de combustíveis. Exemplos de titulações podem ser constatados para determinação do índice de iodo (EN 14111) e índice de acidez (ABNT NBR 14448) em biodiesel.

Métodos empregando espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) ou médio (MID) têm constituído alternativas promissoras para as análises de combustíveis, uma vez que é uma técnica simples, rápida e não destrutiva. Entretanto, o emprego da técnica está relacionada à necessidade de técnicas de calibração multivariada para melhor aproveitamento dos dados e necessidade de uma grande diversidade de amostras para calibração para garantir a confiabilidade dos resultados. A cromatografia também é empregada para determinação das frações de glicerol, glicerol total (ABNT NBR 15342 e ASTM 6584) e metanol (ABNT NBR 15343) em biodiesel. O glicerol e o metanol são coprodutos e reagente, respectivamente, do processo de produção de biodiesel a partir da transesterificação (Figura 1.1). Essas espécies podem estar presentes como contaminantes no produto final, e, podem ser removidos, em grande parte, na etapa de lavagem do biodiesel produzido.

O principal contaminante é o glicerol que constitui cerca de 10% da mistura final da reação de transesterificação. O teor de glicerol residual no biodiesel aponta a eficiência do processo de purificação, e o controle desses parâmetros deve ser monitorado uma vez que os níveis de mono, di e triglicerídeos, bem como da glicerina, provocam além de danos aos motores, problemas ambientais. O limite estabelecido pela ANP para glicerol livre em biodiesel é de 0,02 % (m/m) como pode ser observado na Tabela 1.1. O parâmetro glicerol ligado é definido como a soma dos valores tanto do glicerol livre como das espécies mono, di e triacilgliceróis. O valor limite estabelecido pela ANP de glicerol ligado é de 0,25% (m/m) (ANP,

resolução nº14/2012). O biodiesel com alto teor de glicerol pode provocar problemas de armazenamento, danos ao motor, formação de depósitos, entupimentos dos bicos injetores e problemas ambientais como emissões de aldeídos. Além disso, sua degradação térmica produz um composto altamente tóxico no ar atmosférico que é a acroleína (Lide, 2005).

Figura 1.1. Etapas de uma reação de transesterificação para produção de biodiesel. R1, R2 e R3= cadeias alquílicas, Biodiesel =Mistura dos ésteres obtidos nas etapas 1, 2 e 3.



A presença de metanol, em concentrações superiores ao especificado pela legislação vigente, modifica o ponto de fulgor do combustível, propriedade importante que está relacionada às condições de segurança relativas ao transporte

do biodiesel. O metanol ainda pode ser responsável pela corrosão de partes metálicas do motor, particularmente de alumínio, e pelo aumento do número de cetanos, indicador da qualidade do sistema de ignição (Araujo et al., 2008). De acordo com a resolução nº 14/2012 da ANP, o teor máximo permitido de álcool (metanol ou etanol) é de 0,20% em massa de biodiesel, mesmo limite estabelecido pelas normas americana (ASTM D6751) e europeia (EN 14214). Como mencionado, os métodos oficiais para a determinação do teor de metanol são caros e laboriosos. A maioria dos métodos oficiais é baseada em cromatografia (Lobo et al., 2009). A especificação europeia EN 14214 utiliza amostragem por *headspace* (Knothe, 2005) o que eleva o preço do sistema cromatográfico. Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos baseados em espectroscopia no infravermelho próximo, que envolve a necessidade de ferramentas quimiométricas para a análise dos resultados gerados (Baptista et al., 2007). A determinação de metanol em amostras de biodiesel empregando mecanização do sistema foi recentemente proposta a fim de explorar a automatização do processo analítico (Araujo et al., 2008). Dessa forma, pretendia-se realizar a determinação de metanol em amostras de biodiesel com redução do consumo de reagentes e diminuição da geração de resíduos, atendendo aos princípios da Química Verde e ainda reduzir a manipulação humana das soluções.

Sistemas de injeção em fluxo têm se apresentado como excelente alternativa para manipulação de soluções em linha, preenchendo os requisitos da química verde, além de permitir análises rápidas e automatização de procedimentos analíticos.

1.3 – Automatização de procedimentos analíticos

A automatização, miniaturização e simplificação de procedimentos analíticos são três entre as tendências da Química Analítica Moderna, todas coerentes com os avanços científicos e tecnológicos. A automatização tem objetivos como redução (i) da intervenção humana; (ii) do tamanho de instrumentos e dispositivos e (iii) do trabalho do operador (Valcárcel e Cárdenas, 2000).

A automatização implica a substituição parcial ou completa da participação humana em uma operação ou numa sequência de operações (Valcárcel e Cárdenas, 2000). A automatização deve ser explorada no sentido de permitir avanços na quantidade e qualidade dos resultados analíticos obtidos, o que implica a melhoria das características analíticas (exatidão, precisão, reprodutibilidade, etc).

A automatização apresenta diversas vantagens como:

- Ampliação do campo de aplicação da Química Analítica: abordagem de novos problemas e processos analíticos que não poderiam ser empregados sem substituição humana;
- Diminuição de erros aleatórios, devidos à intervenção humana;
- Estímulo à qualificação profissional para a execução de trabalhos mais criativos, além de supervisão e controle;
- Possibilidade de redução de custos;
- Segurança do operador e do meio ambiente, uma vez que a automatização substitui a intervenção humana na realização de procedimentos de risco e, na maioria das vezes, reduz o consumo de reagentes e a produção de resíduos.

Porém, é necessário alertar para algumas desvantagens da automatização de procedimentos de análises químicas. Muitas vezes os equipamentos que substituem

as atividades humanas são vendidos pelo fabricante como “caixas pretas” e o usuário desconhece ou não entende de forma plena o seu funcionamento, podendo utilizá-lo em condições inadequadas ou explorando o mínimo da capacidade destes dispositivos. Isso pode provocar um distanciamento entre o operador e o experimento. Esse distanciamento, aliado à facilidade de geração de resultados (informações) pelo sistema automatizado, pode acarretar na redução do senso crítico, visto que o analista pode confiar totalmente no sistema e não interpretar adequadamente os dados gerados no processo. Vale ressaltar que mesmo diante de um sistema automatizado ou até mesmo automático, a Química e a realidade no contexto do problema analítico nunca devem ser desconsiderados.

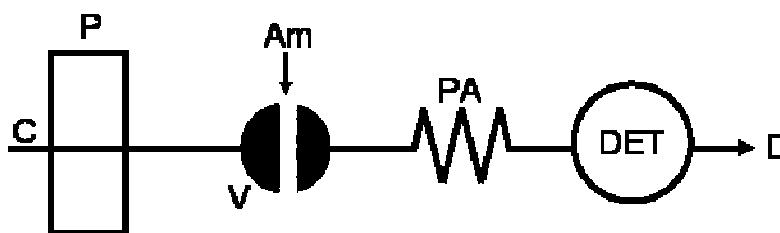
Em diferentes áreas tem-se observado um aumento significativo na demanda por métodos analíticos que forneçam resultados rápidos e confiáveis, com um menor consumo de reagentes e amostras e menor geração de resíduos. A procura por procedimentos que eliminem ou reduzam significativamente a geração de resíduos, bem como a substituição de reagentes tóxicos ao ambiente por outros menos agressivos são os alicerces para inserção da Química Analítica nos princípios da Química Verde (Winterton, 2000). A análise de combustíveis automotivos compõe uma área de interesse por esses métodos rápidos, uma vez que ocorrem com frequência adulterações nos combustíveis comercializados e uma maneira de se automatizar os ensaios para caracterização de combustíveis é através do emprego de sistemas por injeção em fluxo.

Desde o seu surgimento na década de 1970, as análises por injeção em fluxo (FIA) têm se constituído em uma alternativa na procura por métodos mais limpos, ao contemplar em sua concepção muitos dos princípios da Química Verde. Os sistemas FIA destacam-se pela alta versatilidade, permitindo integrar as diferentes etapas

envolvidas nos procedimentos analíticos. Nestes sistemas, uma alíquota de amostra (e eventualmente dos reagentes) é inserida no percurso analítico em um fluxo contínuo e não segmentado, sendo então, direcionada para o detector por um sistema de propulsão (e.g. bomba peristáltica ou de pistão ou ação da gravidade) a baixa pressão onde é produzido um sinal analítico relacionável com a concentração. De acordo com a concepção do sistema, durante o transporte, os componentes da amostra podem ser submetidos a diferentes processos, tais como derivatização, pré-concentração, separação de interferentes, difusão gasosa, entre outros (Yamane e Koshino, 1996). Dessa forma, a amostra desloca-se principalmente em condições de fluxo laminar ao longo de tubulações, dispersando-se fisicamente de forma reprodutível e produzindo uma zona bem definida que é detectada por um sinal transiente na forma de pico.

Os sistemas FIA são constituídos por poucos componentes, a maioria disponíveis em laboratórios, daí sua simplicidade e baixo custo. Os componentes fundamentais dos sistemas FIA são: sistema de propulsão (geralmente, bomba peristáltica), unidade de inserção da amostra (injetor comutador proporcional, válvula rotária e válvulas solenóides), sistema de transporte (tubos de pequenos diâmetros internos) e unidade de detecção contínua (Figura 1.2).

Figura 1.2. Diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo. C = solução transportadora, Am = amostra, P = sistema de propulsão, V = válvula injetora, PA = percurso analítico, DET = detector, D = descarte.



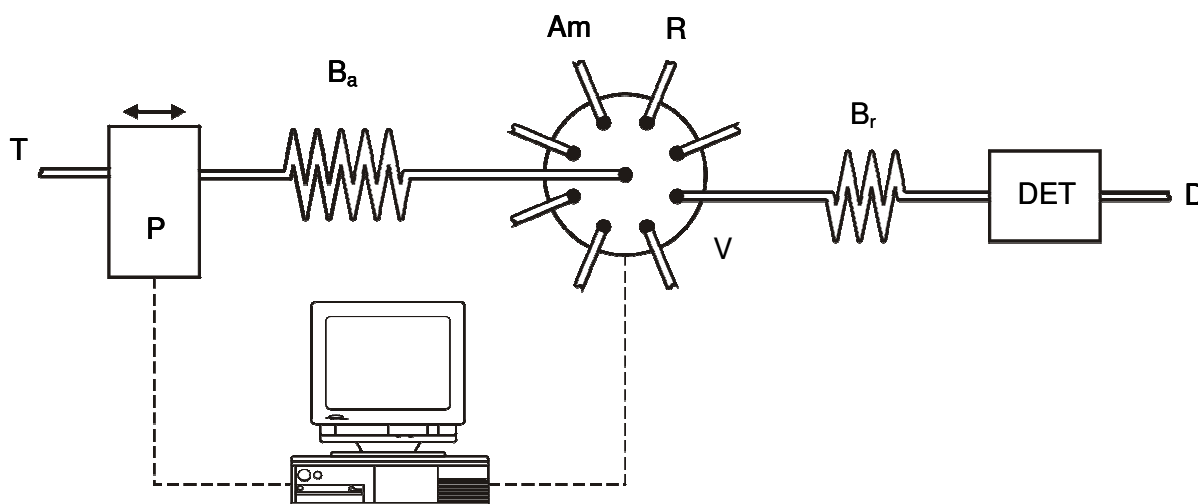
Devido às vantagens apresentadas, os sistemas FIA tiveram rápida repercussão mundial e foram considerados como a primeira geração entre as estratégias de análises em fluxo não segmentado. Desde então, diversas estratégias têm sido desenvolvidas visando aprimorar o desempenho de sistemas de análises em fluxo, como multicomutação (Reis et al., 1994), *flow-batch* (Honorato et al., 1999), análise por injeção sequencial (SIA) (Ruzicka e Marshall, 1990), entre outras, associando novos dispositivos aos sistemas, como aqueles para a propulsão de soluções: multisseringas (Miro et al., 2002), minibombas (Santos et al., 2007) e bombas piezelétricas (Ribeiro et al., 2007).

A análise por injeção sequencial (SIA) surgiu como uma alternativa versátil e robusta para a automatização de procedimentos analíticos complexos e é designada como a segunda geração dos sistemas de análises em fluxo. Sua denominação foi devida à forma de inserção das soluções no percurso analítico, a qual é realizada de forma sequencial. As análises por injeção sequencial são baseadas no conceito de fluxo descontínuo, bidirecional programado com controle computadorizado e necessita de uma válvula multiposição que permite modificações em diversas variáveis operacionais sem a necessidade de alterar a configuração do módulo de análise.

Pela seleção do canal da válvula multiposição é possível efetuar a inserção de alíquotas de amostras e reagentes em uma sequência, previamente estabelecida. O primeiro passo consiste na aspiração sequencial, uma a uma, das soluções (amostra e reagentes) posicionadas nos canais de acesso às portas da válvula multiposição, para uma bobina de armazenamento (B_a), conectada a porta central da válvula. Então, seleciona-se a porta onde está posicionado o detector e, com a inversão do sentido do fluxo, a zona composta (amostra + reagentes) é bombeada

pelo canal correspondente para o detector e, finalmente, o produto formado é quantificado. As alíquotas das soluções (amostra e reagentes) apresentam uma única interface entre si, a partir da qual é formada a zona de mistura. A inversão do sentido de fluxo contribui para melhorar a mistura da amostra com os reagentes devido ao aumento da dispersão (Ruzicka e Marshall, 1990). Na Figura 1.3 é apresentado um diagrama geral para sistemas SIA.

Figura 1.3. Diagrama de sistema de análise por injeção sequencial. *T = solução transportadora, Am = amostra, R = reagente, P = sistema de propulsão bidirecional, V = válvula multiposição, B_r = bobina de reação, B_a = bobina de armazenamento, DET = detector, D = descarte.*



Com relação às características necessárias aos componentes do sistema SIA, a bobina de armazenamento (B_a) deve ser suficientemente longa para armazenar as alíquotas das soluções da amostra e reagentes sem que estas atinjam o dispositivo de propulsão de fluidos e contaminem a solução transportadora (Ruzicka e Gubeli, 1991). O dispositivo propulsor de fluidos deve ser bidirecional, ou seja, deve permitir aspirar e bombear os fluidos pelos canais, bem como deve apresentar alta precisão e baixa inércia (Lenehan et al., 2002), para minimizar erros na tomada das alíquotas.

Assim, bombas de pistão ou peristáltica são empregadas para propulsão de líquidos nos sistemas SIA.

O funcionamento de um sistema SIA associado à válvula seletora de fluidos (válvula multiposição), possibilita que, além do gerenciamento das soluções, seja possível realizar procedimentos de pré-tratamento de amostras. O número de soluções e operações está limitado pelo número de posições da válvula. No entanto, há a possibilidade de incorporar outros dispositivos à válvula multiposição de seleção, incrementando a versatilidade do sistema.

Os princípios de dispersão controlada da zona de amostra, reprodutibilidade no tempo e natureza cinética dos processos químicos e físicos são similares aos princípios das análises por injeção em fluxo. Ao contrário dos sistemas FIA, nos sistemas SIA a mistura só é realizada através do processo de sobreposição de zonas. Com isso, a extensão com que a reação acontece depende do tempo de residência no sistema e do grau de sobreposição das zonas de reagentes e amostras. Alguns parâmetros clássicos como diâmetro, comprimento e geometria da bobina de reação também influenciam no grau de sobreposição de zonas (Cerdeira, 2006).

As aplicações dos sistemas SIA têm sido amplas na determinação de vários analitos por diferentes técnicas de análises químicas, como espectrofotometria UV-VIS (Pereira e Rocha, 2014), espectroscopia atômica (Lima et al., 2012c), condutimetria (Silva et al., 1999), quimiluminescência (Mervartova et al., 2007; Payán e López, 2009), amperometria (Maruta e Paixão, 2012), potenciometria (Lima et al., 2007; Vahl et al., 2013) e fluorimetria (Nakaya et al., 2011). Entretanto, os sistemas SIA pouco têm sido utilizados para preparos de amostras em linha.

As principais vantagens dos sistemas SIA com relação às outras estratégias de análises em fluxo são relacionadas à sua versatilidade. O canal único central da válvula multiposição disponível no operacional do SIA permite a implementação de uma ampla gama de ensaios sem que o sistema precise ser reconfigurado (Economou, 2005). O consumo de reagentes também é drasticamente reduzido nos procedimentos que empregam sistemas SIA, visto que o volume de reagente pode afetar a mistura e prejudicar as análises (Cerdá et al., 2001; Economou, 2005). Se o volume for grande, haverá dificuldade de mistura por sobreposição de zonas e dificilmente alíquotas das extremidades serão misturadas. Como o volume de trabalho deve ser pequeno, não são alcançadas altas sensibilidades em sistema SIA.

Entretanto, um sistema SIA requer o uso de uma válvula multiposição de atuação eletromecânica e controlável por computador, o que eleva consideravelmente o investimento para a construção do sistema. As posições da válvula poderiam ser alteradas manualmente, mas não haveria garantia de repetitividade na tomada de alíquotas; portanto, é indispensável o controle rígido tanto da válvula (posição e tempo) quanto do sistema de propulsão (vazão e sentido de rotação). Usualmente, a frequência de amostragem nos sistemas SIA é menor que nos análogos em sistemas FIA, pois todas as etapas de manipulação de soluções são inerentemente executadas de forma sequencial.

1.4 – Procedimentos de análises por injeção em fluxo no controle de qualidade de combustíveis automotivos

1.4.1 – Gasolina e Diesel

As determinações de contaminantes inorgânicos e orgânicos em gasolina e diesel são importantes para o controle de qualidade desses combustíveis. Algumas estratégias de análises em fluxo têm sido aplicadas visando essas determinações. No entanto, o potencial dessas estratégias de manipulações de soluções não tem sido totalmente explorado devido à complexidade das matrizes desse tipo de amostra. Geralmente, são necessários preparos de amostra para disponibilizar o analito para a fase aquosa e posterior determinação.

Chumbo tetrametila (TML) e chumbo tetraetila (TEL) são aditivos que eram misturados à gasolina e atuavam como antidetonantes podendo contribuir para poluição ambiental. Um procedimento em fluxo com detecção por F AAS foi desenvolvido para determinação de chumbo, onde o tratamento da amostra era realizado *off-line*. A amostra foi tratada com iodo, corante Aliquat-336 e diluída com 4-metilpent-2-ona para posterior injeção em fluxo de acetona (Taylor e Trevaskis, 1986).

Também com preparo de amostra *off-line*, foi proposto um método para determinação de chumbo em gasolina de alta octanagem (Zenki et al., 2005). As determinações foram realizadas empregando o Arsenazo III em um sistema de análise por injeção em fluxo cíclico. Dessa forma, uma mini-coluna de troca catiônica foi incorporada após a cela de fluxo contínuo para regeneração em linha do reagente tóxico e acumulação do analito, fazendo reuso do reagente e simplificando a etapa de tratamento de resíduos.

A presença de potássio na gasolina é um indicativo para avaliar a presença de aditivos nesse combustível. Visando a determinação desse analito, foi desenvolvido um procedimento alternativo para determinação de potássio em amostras de gasolina empregando sistemas de injeção em fluxo acoplado a técnica analítica de espectrometria de emissão atômica com chama (F AES). No procedimento citado, não houve necessidade de diluição prévia e ainda assim a presença do combustível concentrado não apresentou interferência na chama emitida (Roscoe et al., 1990). Em estudo recente, foi possível a determinação de cobre (presente em alguns aditivos) em gasolina empregando pré-concentração em sementes de *Acácia-branca* (*Moringa Oleifera*) como bioissorvente empregando detecção em F AAS (Do Carmo et al., 2013) em sistema FIA composto por válvulas solenóides.

Um dos maiores poluentes presentes na gasolina é o benzeno. Sua presença no ar é frequentemente atribuída a emissão através de motores veiculares. Devido a sua natureza carcinogênica e a conseqüente preocupação com a qualidade do ar, foi estabelecido 1% (v/v) como limite máximo de benzeno permitido na gasolina (ANP, 2013; Bonfim et al., 2012). O emprego da espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) se apresentou como uma alternativa para determinação de benzeno em amostras de gasolina com análise direta da amostra após adições de padrão *on-line* e *off-line* e os resultados concordaram entre si (Galignani et al., 1993). O procedimento permitiu a determinação direta de benzeno nas amostras após simples diluição em hexano. Em outro trabalho, foi possível mecanizar a determinação de benzeno na gasolina explorando duas estratégias de FIA: tradicional e multicomutação (Ródenas-Torralba et al., 2004) com o emprego de válvulas solenóides. Foi possível controlar a diluição em linha das amostras, bem

como a calibração externa e a adição de padrão. As principais vantagens obtidas foram as reduções de consumo de reagentes e geração de resíduos, contribuindo para uma análise mais limpa e evitando a acumulação de resíduos tóxicos. Outras abordagens exploraram FI-FT-IR (Sistema de injeção em fluxo com infravermelho com transformada de Fourier) para determinação de tolueno e éter metil-terc-butílico (MTBE) em gasolina explorando derivadas de primeira ordem do espectro de IR adquirido em linha em um sistema de fluxo (de la Guardia et al., 1993). Esses procedimentos de FI-FT-IR são mais simples e mais baratos do que as técnicas cromatográficas e podem ser uma boa alternativa para o controle de qualidade de combustíveis.

O método oficial para determinar o teor de água na mistura de gasolina e álcool é a titulação convencional de Karl Fischer (ASTM D6304). Um sistema em fluxo baseado nessa titulação foi proposto para aumentar a frequência analítica desse tipo de análise (Escott e Taylor, 1985). Solução de Karl Fischer foi empregada como reagente e os sinais analíticos foram obtidos a partir de detecções potenciométricas e amperométricas. Também foram avaliadas diversas configurações de celas e eletrodos com objetivo de obter as melhores condições para a análise. A melhor condição foi obtida empregando detecção potenciométrica com eletrodo de platina, permitindo 60 determinações por hora.

Uma alternativa para promover a propriedade antidetonante da gasolina é a adição de etanol a esse combustível em substituição aos compostos de alquil-chumbo. No entanto, em altas quantidades, o etanol pode danificar as partes de borracha e diafragmas de motores. Sistemas automatizados FIA foram propostos para determinação de etanol em gasolina utilizando álcool oxidase (AOD), peroxidase (HRP), 4-aminofenzazona e fenol em solução ou imobilizadas. Em todos

os casos, foram empregadas detecções colorimétricas (Alhadeff et al., 2004). Em outro trabalho, AOD e HRP foram imobilizadas em esferas de vidro. Foram exploradas diluições em linha e realizadas as medidas espectrofotométricas do produto vermelho formado com a 4-aminofenazona para determinação do etanol na mistura de gasolina e álcool (Alhadeff et al., 2005). Já no terceiro trabalho do mesmo grupo, diferentes sistemas integrados de biosensores bi-enzimáticos exploraram diagramas FIA e SIA para determinação de etanol em gasolina (Alhadeff et al., 2008).

Compostos que podem melhorar o desempenho do motor podem ser adicionados à gasolina ou ao óleo diesel para promover ao combustível funções específicas como antidetonantes, inibidores de corrosão, aditivos de lubricidade e detergentes. O controle e determinação de um aditivo desse tipo são de extrema relevância e mesmo assim, apenas um trabalho foi encontrado empregando sistemas em fluxo para análise de amostras de óleo diesel. Isto pode ser devido à alta viscosidade do combustível causando dificuldades de transporte desse combustível em sistemas de fluxo. Visando determinar o teor do aditivo dodecilamina em diesel, foi desenvolvido um procedimento em sistema FIA acoplado a extração em fase sólida em linha com detecção por quimiluminescência (Fletcher et al., 2003). O objetivo do trabalho consistiu na construção de um sistema portátil para implantação nos pontos de distribuição de combustíveis. As colunas eram compostas por 50 mg de aminopropil como material adsorvente e o método foi baseado na reação da sulforodamina 101 e o oxalato bis-(2,4-dinitrofenil) e a emissão quimiluminescente do produto da reação era finalmente medida. Na espectrofotometria em fase sólida *on-line* podem ser observadas vantagens como (i) capacidade de automatizar totalmente o processo analítico; (ii) análise de todo o

extrato enquanto que na extração por espectrofotometria em fase sólida *off-line*, apenas uma alíquota é retirada para análise; e (iii) medições podem ser realizadas com baixos volumes de amostras, sem perdas de exatidão, dessa forma, reduz a quantidade de resíduos gerada e os custos da extração.

1.4.2 – Etanol combustível

O etanol é utilizado como combustível na forma hidratada ou como aditivo na gasolina. O etanol é de interesse crescente como substituto para os combustíveis de hidrocarbonetos convencionais devido a possibilidade de redução de gases de efeito estufa e minimização da dependência do petróleo (Teixeira et al., 2012). Diante desse cenário, é necessário o controle da qualidade desse combustível automotivo, bem como o desenvolvimento de procedimentos adequados com essa finalidade.

A maioria das aplicações para análise de amostras de combustíveis em sistema em fluxo sem pré-tratamento é para amostras de etanol combustível. Entre os combustíveis automotivos, o etanol é o único que apresenta completa solubilidade em meio aquoso. Essa característica também permite que as etapas de limpeza do interior do tubo ocorram sem necessidade do uso de detergentes e formação de emulsões, facilitando a exploração de procedimentos empregando análises em fluxo.

Os parâmetros de qualidade monitorados em etanol combustível empregando análises em fluxo geralmente envolvem espécies inorgânicas que conferem maiores problemas de corrosão no etanol do que a gasolina. Isso ocorre devido à maior solubilidade dos sais como sulfatos e cloretos nesse meio. Os limites máximos estabelecidos pela ANP para sulfato e cloreto são de 4 mg kg^{-1} e 1 mg kg^{-1} , respectivamente (ANP, resolução nº7/2011). Um procedimento para a determinação

de sulfato em amostras de etanol combustível foi proposto por Oliveira & Korn (2006) com base na redução da coloração do complexo DMSA-Ba e gerenciamento de soluções com válvula multiposição (SIA). A amostra era previamente tratada fora das linhas de fluxo com adição de solução de Na_2CO_3 5% e queimada por cerca de 20 min para eliminar a matriz. O método proposto foi muito promissor como método alternativo para a determinação rotineira de sulfato em etanol combustível e os resultados foram compatíveis aos resultados obtidos a partir do método volumétrico para determinação de sulfato empregado pela ANP na época (ABNT NBR 12120). Além de apresentar parâmetros compatíveis para medidas na faixa dos valores estabelecidos para o controle de qualidade, esse método apresentou frequência analítica de 27 determinações por hora de análise após o preparo de amostra. No trabalho citado, assim como os demais com essas características, a natureza orgânica das amostras poderia resultar na degradação dos tubos empregados na propulsão. A aspiração de cada amostra para o tubo de armazenamento, característica dos sistemas SIA, é uma vantagem dessas montagens porque a amostra não passa pelo tubo de propulsão. A estratégia SIA permite flexibilidade nas montagens e a robustez requerida para análises de rotina no controle de qualidade de combustíveis. Para determinação de cloretos, eletrodos modificados quimicamente com polianilinas foi acoplado ao sistema de análise por injeção em fluxo para medidas por voltametria cíclica (de Paula et al., 2008).

O uso do etanol como combustível automotivo também aumenta a concentração de compostos carbonílicos na atmosfera urbana. Os aldeídos fazem parte desses compostos e requerem atenção, pois exercem forte influência nas reações fotoquímicas que ocorrem na atmosfera e promovem a formação de poluentes gasosos. Além disso, também apresentam natureza carcinogênica e

provocam irritações nas atividades sensoriais (Thrasher et al., 2001). A presença de quantidades excessivas de aldeídos nos combustíveis também afeta a atividade do motor, reduzindo a faísca durante a ignição e provocam o aumento local desses poluentes.

De acordo com a legislação brasileira, não há limite estabelecido para a concentração de aldeído em etanol combustível (ANP, resolução nº7/2011), entretanto esse limite existe para alcoóis comercializados na indústria. Esses limites são expressos para acetaldeído e formaldeído como 75 e 65 mg kg⁻¹.

É esperado que todos os combustíveis oxigenados, incluindo metanol e etanol, promovam a geração de aldeídos e esse processo deve ocorrer com diferentes perfis, devido à diversidade do combustível. A quantidade gerada depende, além da composição do combustível, também do tipo de motor, condições de operação, tempo e estado do veículo (Oliveira et al., 2005).

Restringindo os aldeídos ao formaldeído, o mesmo não está presente na gasolina, mas pode ser gerado durante a combustão incompleta na região interna do motor. Já no álcool hidratado, a presença do formaldeído é esperada, uma vez que pode ser formado durante a produção de etanol pelo processo de fermentação alcoólica (Teixeira et al., 2004).

Dois aplicações visando a determinação de aldeídos em amostras de etanol combustível em sistemas de análises em fluxo foram reportadas. A primeira visava a determinação apenas de formaldeído (Teixeira et al., 2004) enquanto a segunda visava a determinação de aldeídos alifáticos totais (Oliveira et al., 2005).

A espectrofotometria em fase sólida foi empregada para a determinação de formaldeído em amostras de álcool combustível para medição direta no suporte sólido (C18) (Teixeira et al., 2004). O método foi baseado na reação entre

formaldeído e o reagente Fluoral P produzindo 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL) e posterior retenção em C18 empregado como suporte sólido. O produto dessa reação pode ser medido tanto por espectrofotometria quanto por fluorimetria, sendo o segundo, mais sensível. Mesmo assim foi explorada a espectrofotometria, uma vez que a fase sólida e o sistema de fluxo integravam as etapas de pré-concentração e detecção no material sólido empacotado, o que promoveu sensibilidade, seletividade e redução dos tempos requeridos para as análises.

As características inerentes de um sistema SIA, anteriormente discutidas, foram exploradas no desenvolvimento de um método para determinação de aldeídos alifáticos em amostras de etanol combustível empregando essa estratégia de manipulação de soluções (Oliveira et al., 2005). Esse método se baseou na reação do aldeído alifático com 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) e solução de íons Fe^{3+} como agente oxidante. Monossegmentação, amostragem binária e aquecimento em forno micro-ondas foram utilizados para melhorar a mistura, minimizar a dispersão da amostra e acelerar a reação, melhorando assim a sensibilidade. O sistema proposto apresentava problemas para limpeza dos tubos de fluxo entre as amostras. Portanto, para substituição das amostras, era feita ambientação dos tubos com excesso de amostra sem leitura de sinal. Esse processo só possível devido ao volume disponível desse tipo de amostra para esse fim. Caso contrário, uma estratégia de limpeza seria necessária.

Íons metálicos são considerados os principais contaminantes do etanol combustível. Esses íons geralmente estão associados com a corrosão de partes metálicas do motor do veículo. Além disso, podem contribuir para emissão de metais tóxicos para o meio ambiente (Teixeira et al., 2005). Como esses metais geralmente estão presente em baixas concentrações, suas determinações têm sido um desafio

para a química analítica. A regulação brasileira estabelece como teores máximos de ferro e cobre em etanol combustível 5 mg kg⁻¹ e 0,07 mg kg⁻¹, respectivamente (ANP, resolução nº7/2011).

A presença de cádmio no etanol combustível é possível, uma vez que a cana de açúcar pode absorver, durante o plantio, enzimas e elementos essenciais ao metabolismo, ou elementos não essenciais ou tóxicos como metais pesados. Se esse metal for mantido no etanol combustível, ele pode comprometer a qualidade do combustível, provocando a corrosão de componentes veiculares e ainda provocar poluição ambiental. Ao mesmo tempo, os métodos de referência ainda são laboriosos e requerem longos tempos de análise (Alves et al., 2012). Como estratégia para determinação de baixos teores de espécies metálicas, procedimentos de pré-concentração em linha, acoplados a espectrometria de absorção atômica, foram explorados para determinar traços de metais em álcool combustível.

Um método para determinação de Cu, Fe, Ni e Zn em etanol combustível por F AAS usando pré-concentração on-line foi desenvolvido empregando uma minicolumna com Amberlite-XAD-4 funcionalizado com ácido 3,4-di-hidroxibenzoico. O XAD-4 funcionalizado atuou como adsorvente das espécies metálicas e os metais retidos eram eluídos com solução de HCl diretamente para o nebulizador do F AAS (Teixeira et al., 2005). Em outro trabalho, explorou-se um sistema de pré-concentração *on-line* utilizando como adsorvente gel de sílica quimicamente modificada com nióbio (Nb₂O₅ - SiO₂) para sorção de Cu, Cd, Co e Zn em etanol combustível (da Silva et al., 2004). Outros sólidos também foram empregados como adsorventes para pré-concentrações de metais. Foi observado o emprego de materiais híbridos constituídos por SiO₂, Al₂O₃ e TiO₃ preparados em sol gel para

adsorção de cobre em pH 9,1. Nesse trabalho, a eluição era realizada com solução de HNO₃ diluído e a detecção por F AAS (Lima et al., 2012c). O uso de sementes como bioSORVENTES foi proposto para determinação de Cd (Alves et al., 2010) e Zn (Alves et al., 2012) em etanol combustível utilizando a estratégia de pré-concentração e detecção por F AAS explorando pré-concentração em linha. Para pré-concentração de Cd, foi empregado como bioSORVENTE um vermicomposto (comumente utilizado em fertilização de jardim e rico em ácido húmico) e a determinação foi realizada por F AAS alcançando rendimento de 20 determinações por hora (Bianchin, 2009).

O número de trabalhos reportados empregando F AAS mostrou que a técnica é amplamente explorada para a análise de álcool combustível acoplado a pré-concentração em linha para determinação de metais nesse tipo de amostra. Amostras de etanol podem ser processadas normalmente sem qualquer pré-tratamento laborioso, evitando o uso de ácidos concentrados e aquecimento. Após enriquecimento na fase sólida, uma solução aquosa pode ser usada para eluição dos analitos, como apresentado nos trabalhos descritos, diretamente para o sistema de detecção. Dessa forma, pode-se reduzir o uso de solventes e exposição do analista aos combustíveis e solventes. Essa simplicidade quanto às análises, permite também a calibração com padrões aquosos.

As aplicações para análise de combustíveis empregando a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) têm sido um desafio analítico, uma vez que há muitas dificuldades relacionadas a introdução da amostra. A introdução direta após a diluição no solvente, apesar de simples e rápida, requer um sistema de nebulização mais complexo para reduzir a carga de solvente para o plasma (de Souza et al., 2012). Além disso, é necessário inserir oxigênio ao plasma

para evitar a formação de carbono. A análise direta de etanol combustível por ICP-MS foi proposta para determinação de Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni e Pb utilizando nebulizador ultrassônico para introdução da amostra (Saint´Pierre et al., 2006). O sistema de injeção em fluxo foi empregado para introdução de volumes discretos de amostras diluídas (10 % v/v), evitando-se a formação de depósitos de carbono sobre a superfície dos cones.

A acidez é um parâmetro que deve ser controlado em etanol combustível hidratado, uma vez que alta acidez pode afetar o tanque e a tubulação veicular. A ANP estabelece como limite máximo de acidez 30 mg L^{-1} , expresso como mg L^{-1} de ácido acético (ANP, resolução nº7/2011). Um procedimento em fluxo em linha única com detecção condutométrica foi proposto para determinação da acidez em etanol combustível. As amostras eram inseridas em uma solução transportadora de hidróxido de sódio e a condutividade resultante da zona composta era medida e proporcional a acidez do meio (Fatibello-Filho e Borges 1998). A temperatura do banho era controlada em 20°C , uma vez que a temperatura influenciava diretamente na condutividade do meio. Esse procedimento permitiu 120 determinações por hora de análise.

1.4.3 – Biodiesel

Apesar do grande avanço das estratégias de análise em fluxo, bem como as diversas vantagens apresentadas, as aplicações explorando análises em fluxo para amostras de biodiesel ainda são limitadas. É possível que entre as razões que colaboram para essa limitação seja a predominância de sistemas químicos em soluções aquosas nesse tipo de sistema. Alguns trabalhos já demonstraram a possibilidade de desenvolver procedimentos analíticos envolvendo sistemas

heterogêneos, incluindo medições diretas em fase sólida (Silva et al., 2011) e solventes pouco miscíveis (Silvestre et al., 2009). Além disso, também foram relatados procedimentos envolvendo o preparo de amostras em linha (Burguera e Burguera, 2011).

Como anteriormente citado, o glicerol é um dos coprodutos da produção do biodiesel via transesterificação que requer atenção, pois o mesmo provoca a emissão de substâncias nocivas como a acroleína que, na ausência de conversores catalíticos, provocará poluição durante a emissão. Altos teores de glicerídeos, principalmente triglicerídeos, podem formar depósitos nas válvulas que constituem o motor. A maioria dos procedimentos para determinação de glicerol livre em sistemas FIA explora a oxidação do analito com periodato para formação de formaldeído e ácido fórmico (Bondioli e Della Bella, 2005). O aldeído formado é determinado a partir da reação de Hantzsch com acetilacetona em meio amoniacal em que o produto formado (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina) é medido por espectrofotometria (Pinzi et al., 2009; Silva e Rocha, 2010) ou fluorimetria (Silva et al., 2011). Como estratégia de manipulação de soluções, foi empregado sistemas de injeção em fluxo com multibombas (Silva et al., 2011).

O pré-tratamento da amostra para determinação de glicerol livre tem tido avanços quanto a toxicidade dos solventes ao substituir o uso de 4 mL de hexano (Bondioli e Della Bella, 2005) por água (Silva e Rocha, 2010). O avanço quanto à minimização do contato com solventes tóxicos foi observado a partir de extração *online* (Pinzi et al., 2009). Nesse trabalho, foi proposto um procedimento para extração e reação do glicerol livre em fluxo em amostras de biodiesel. As manipulações das amostras e soluções foram automatizadas e a reação de Hantzsch foi novamente utilizada para determinação do glicerol livre. A extração era

promovida com periodato e acetilacetona assistida por ultrassom. Para a determinação do teor de glicerol total, à amostra, era acrescentada solução etanólica de hidróxido de sódio para que o glicerol ligado fosse extraído através da saponificação. Era realizada a reversão do fluxo para evitar que a amostra entrasse em contato com os tubos da bomba peristáltica. Para a limpeza, foi empregado etanol. O limite de quantificação apresentado esteve bem próximo do limite para glicerol livre no biodiesel. Uma preocupação em relação a esse procedimento foi em relação a representatividade que pode ser prejudicada devido a baixa massa da amostra (15 mg) e variações na viscosidade do biodiesel que pode prejudicar a amostragem baseada em tempo e vazão (Pinzi et al., 2009).

Sistemas de análise por injeção fluxo com detecção amperométrica foram utilizados para reduzir para determinação de glicerol livre em biodiesel. O tratamento foi realizado a partir de extrações *off-line em meio aquoso* e a oxidação eletrocatalítica foi realizada em um eletrodo de cobre (Maruta e Paixão, 2012). Foi obtido limite de quantificação compatível com os níveis estabelecidos pela regulação brasileira (ANP) e europeia (EN 14214), bem como o método de referência (ASTM D6584). Também com detecção amperométrica, foi proposto um diagrama FIA com eletrodo de ouro adaptado a uma cela de fluxo para determinação de glicerol livre. O sistema tem capacidade de promover 85 determinações por hora com emprego apenas de solução de NaOH no meio aquoso. O preparo de amostra foi feito a partir de extrações líquido-líquido em meio aquoso (Barbosa et al., 2012).

Os procedimentos para determinação de glicerol total geralmente ocorrem após saponificação com etilato de sódio (extração líquido-líquido) e são determinados através da reação de Hantzsch. Se esse pré-tratamento fosse realizado apenas com água, só poderia ser determinado no extrato coletado, o

glicerol livre (Silva et al., 2011). Esse é um exemplo de como o preparo de amostra interfere na espécie que será medida e como é decisivo o controle do preparo de amostra. Alguns procedimentos exploraram a estratégia de preparo de amostra *off-line* e determinação em linha, uma vez que as condições de tratamento de amostras como altas temperaturas e concentração do ácido eram incompatíveis com o sistema em fluxo. Exemplo como esse, em que tratamentos de amostras foram realizados *off-line*, foi empregado para determinação de fósforo após a conversão para fosfato (Lira et al., 2011). Para determinação de enxofre, a formação de suspensões reprodutíveis de sulfato de bário promovidas no sistema em fluxo foi explorada. O precipitado formado foi monitorado por dispersão de luz por espectrometria de reflectância difusa (Turbino e Queiroz, 2009).

Foram observadas montagens de sistema em fluxo para a extração de sulfato presente no biodiesel com mistura de etanol e água em que somente diluições eram necessárias (del Rio et al., 2010a). Para determinação, foi empregada reação clássica reação entre o sulfato e o dimetilsulfonazo de bário (DMSA-Ba).

Como alternativa rápida a titulação não aquosa para determinação de acidez em amostras de biodiesel, foi desenvolvido um SIA em que carregador (etanol), amostra e indicador ácido-base (alizarina) eram aspirados, nessa ordem, para tubo de armazenamento e posteriormente direcionado ao detector (del Rio et al., 2010b). O gerenciamento das amostras era realizado a partir de válvula SIA e a titulação baseada na proporção de concentração das formas ácidas e básicas de alizarina que era modificada com a presença de titulante hidróxido de sódio ou ácido graxo livre presente nas amostras. Além de apresentar resultados compatíveis com o método de referência (ABNT NBR 14448) para esse parâmetro, também foi reduzido

o tempo por análise, permitindo frequência analítica de 12 determinações por hora, além de gerar apenas 3,3 mL de resíduo por titulação.

Um procedimento que também tinha biodiesel como amostra foi desenvolvido para a determinação de metanol residual (Araújo et al., 2008). Uma vez que o metanol é utilizado em excesso na reação de transesterificação (principal processo de obtenção do biodiesel), resíduos desse álcool podem estar presentes no biodiesel comercializado. O procedimento proposto explorou um sistema em fluxo com separação líquido-líquido em linha através de uma membrana hidrofílica acoplada a uma cela composta por dois blocos de Teflon. Parte do metanol presente na amostra era transportada para a fase aquosa através da membrana hidrofílica, com fluxo coletor de água. O metanol era oxidado pelo álcool oxidase imobilizada e após reação enzimática, o peróxido produzido era quantificado pela formação de um radical absorvente com 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS). A desvantagem do uso de xileno como transportador foi compensado pelo baixo consumo por determinação (186 μL). A automação foi realizada visando a redução de erros, da contaminação, da perda de analito, bem como evitar os problemas gerados com interfaces entre líquidos pouco miscíveis.

Visando a determinação de mercúrio em amostras de biodiesel por espectrofotometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS), um sistema de injeção em fluxo foi desenvolvido para formação de emulsões de óleo em água (Aranda et al., 2009). Com o procedimento proposto, foram obtidas vantagens como limites de quantificação de 0,2 mg L^{-1} e simplificação do pré-tratamento da amostra.

Também foram reportados sistemas de fluxo para introdução de amostras para determinação de metais (Mn, V, Si e Cu) em derivados de petróleo e biodiesel por ICP OES (Sanchez et al., 2012). Essa estratégia além de reduzir os erros

inerentes a injeção manual também permitia a calibração com apenas um padrão a partir da variação do volume injetado no fluxo carregador.

O índice de iodo é uma medida do grau de insaturação dos ésteres graxos presentes no biodiesel, expresso como a massa de I_2 consumida por 100g de amostra quando iodo é adicionado aos compostos com ligação dupla. O alto grau de insaturação leva à formação de depósitos de carbono e gomas no motor, devido à reações de oxidação e polimerização, podendo ainda deteriorar o óleo lubrificante (Ramos et al., 2009). Um procedimento de fluxo baseado na microextração/reação de compostos insaturados com triodeto explorando multicomutação sem pré-tratamento da amostra foi proposto para determinação do índice de iodo em amostras de biodiesel (Pereira e Rocha, 2014). As medidas espectrofométricas se basearam na descoloração das soluções de I_3^- e houve baixo consumo de amostra e reagente, 224 μ L de amostra e 200 μ g de I_2 por determinação, permitindo até 208 determinações por hora.

Estratégias empregando *flow-batch* foram recentemente divulgadas para determinação de glicerol livre (Lima et al., 2012a; Diniz et al., 2013) e fósforo (Lima et al., 2012b) em amostras de biodiesel. Nesses sistemas, uma câmara foi acoplada às tubulações de fluxo para que as soluções, amostras e reagentes fossem transportados através da tubulação e a câmara funcionasse como um béquer, mantendo uma característica dos sistemas em batelada sem que haja dispersão. Para determinação de glicerol livre, foram propostos procedimentos sem necessidade de pré-tratamento de amostra *off-line*. No primeiro trabalho reportado, glicerol livre era extraído (extração líquido-líquido) ao mesmo passo que sofria oxidação com periodato gerando formaldeído e era determinado por fluorimetria empregando a reação de Hantzsch já mencionada (Lima et al., 2012a). Outra

estratégia sem emprego de reagente, além de água deionizada, foi explorada para determinação de glicerol livre por sonoluminescência (Diniz et al., 2013). A mesma água empregada na extração foi utilizada no banho para gerar a cavitação e sinais de sonoluminescência. Esses sinais foram calibrados para associar com a quantidade de glicerol extraído. Para a determinação de fósforo, diferente das estratégias anteriores, foi necessário o preparo da amostra de biodiesel *off-line* e o biodiesel mineralizado era inserido no percurso para análise no sistema *flow-batch* empregando a reação com azul de molibdênio e detecção fotométrica (Lima et al., 2012b).

Mais recente, foi divulgado um procedimento alternativo ao método de Karl Fisher (ASTM D 6304) para determinação de água em amostras de biodiesel. A manipulação das soluções foi gerenciada por válvulas solenóides de três vias explorando amostragem binária. Foi utilizado ar como carregador para evitar dispersão da amostra e geração de resíduo de etanol que era empregado na etapa de lavagem. O método foi baseado na medida do descoloramento do cloro complexo de cobalto (CoCl_2) na presença de diferentes teores de água (Pereira et al., 2015)

Estão apresentadas na Tabela 1.2, as características principais dos trabalhos relatados aqui para o combustível biodiesel.

No sentido de atender as necessidades de controle de qualidade de combustíveis automotivos por meio de métodos expeditos, foi objetivo da presente tese o desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando análise por injeção em fluxo e espectrofotometria de absorção molecular no visível.

Para conhecimento do trabalho efetuado, tendo em conta os objetivos, esta tese foi organizada em capítulos onde está descrito o desenvolvimento do trabalho para análise de biodiesel.

No capítulo 3 – Experimental – apresenta-se uma descrição detalhada dos materiais, equipamentos e metodologias empregadas no trabalho desenvolvido.

No capítulo 4 são apresentados os resultados e discussões dos diagramas de fluxo desenvolvidos tanto para extração líquido-líquido em amostras de biodiesel quanto para determinação de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel.

As considerações finais encontram-se reunidas no capítulo 5, onde foram salientados os aspectos relevantes de todo trabalho desenvolvido, buscando evidenciar as potencialidades do método proposto, perspectivas de novas aplicações e possíveis melhorias dos trabalhos desenvolvidos.

Tabela 1.2. Aplicações de sistemas em fluxo para análises de biodiesel.

Parâmetro	Observações	FA (h ⁻¹)	CV (%)	LR (mg L ⁻¹)	Referência
Acidez total	Titulação ácido-base espectrofotométrica e calibração multivariada	12	1,3	—	del Río et al., 2010b
Água	Descoloração do cloro complexo de cobalto e determinação espectrofotométrica	30	0,7	100-5000 ^b	Pereira et al., 2015
Glicerol (livre)	Extração em linha de glicerol com solução água: etanol assistida por ultrassom	7	—	200-10000 ^b	Pinzi et al., 2009
	Sistema em fluxo com multibombas, extração <i>off-line</i> com água	34 ^a	1,5	5-50	Silva e Rocha 2010
	Deteção fluorimétrica em montagem em fluxo multibombas	35 ^a	0,9	5-70	Silva et al., 2011
	Extração do analito, derivatização e deteção por fluorimetria em montagem <i>flow-batch</i>	14	1,5	0,1-5,0	Lima et al., 2012a
	Oxidação eletrocatalítica em eletrodo de cobre e deteção amperométrica	90 ^a	5,0	3-160	Maruta e Paixão 2012
	Deteção amperométrica pulsada em eletrodo de ouro	85	1,5	0.1-28	Barbosa et al., 2012
	Extração com água e deteção por sonoluminescência em montagem <i>flow-batch</i>	14	1,5	0,004-400 ^b	Diniz et al., 2013
	Glicerol (total)	Sistema de injeção em fluxo, saponificação do glicerol ligado assistida por ultrassom	7	—	1000-30000 ^b
Sistema em fluxo com multibombas; saponificação do glicerol ligado assistida por ultrassom		35 ^a	1,4	25-300	Silva et al., 2011
Índice de Iodo	Extração/reacção com triodeto, deteção espectrofotométrica por descolorimetria	208	1,7	13-135 ^d	Pereira e Rocha 2014
Mercúrio	Emulsão óleo em água e especiação por degradação UV em linha	—	8,0	(1,0-15)x10 ⁻³	Aranda et al., 2009
Metais	Diluição de amostras diretamente em xileno inseridas em ar carregador	—	1,0-3,0	13-108 (Mn), 119-298 (Ni), 19-988 (Si), 27- 386 (Cu) ^c	Sánchez et al., 2012
Metanol	Determinação enzimática após separação em membrana hidrofílica	12	4,5	2-150	Araujo et al., 2008
Fósforo	Digestão de amostra <i>off-line</i> e determinação de fosfato em sistema de injeção em fluxo	100 ^a	2,2	1-10	Lira et al., 2011
	Digestão de amostra <i>off-line</i> e determinação de fosfato em sistema <i>flow-batch</i>	189 ^a	4,5	0,1-10	Lima et al., 2012b
Enxofre	Calcinação de amostra e deteção de suspensão de BaSO ₄ por reflectância difusa	120 ^a	3,0	20-120	Tubino e Queiroz 2009
Sulfato	Extração com etanol:água e reacção com dimetilsulfonazo (III)	15 ^a	—	1,4-15	del Río et al., 2010a

FA: Frequência analítica; CV: coeficiente de variação; LR: faixa de resposta linear; a. FA frequência analítica sem considerar o preparo de amostra; b. concentração do analito no biodiesel (mg/kg); c. concentração do analito no biodiesel (µg/kg), d. concentração do analito no biodiesel (g/100g).

2.0 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

A presente tese apresenta como objetivo principal o desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando análise por injeção em fluxo e espectrofotometria de absorção molecular no visível.

2.2 – Objetivos específicos

- Propor estratégia para pré-tratamento de amostras de biodiesel empregando extrações líquido-líquido em sistemas em fluxo.
- Estabelecer condições ótimas de preparo de amostra de biodiesel empregando o sistema em fluxo proposto;
- Propor um sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação simultânea espectrofotométrica de metanol e glicerol total, empregando o reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio em amostras de biodiesel;
- Empregar os procedimentos validados para avaliação da exatidão do método proposto a partir da análise de amostras de biodiesel e comparar os resultados com as análises realizadas por programa interlaboratorial baseadas na ABNT NBR ISO/IEC 17043:11 utilizando cromatografia gasosa;
- Aplicar o método proposto em amostras de biodiesel oriundas de diferentes oleaginosas.

3.0 – Experimental

3.1 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico de pureza e as soluções foram sempre preparadas com água deionizada (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Os incrementos de etanol adicionados às amostras de biodiesel foram realizados a partir da adição de diferentes alíquotas de uma solução aquosa 10% (v/v) em etanol previamente preparada pela diluição de 5,0 mL de etanol (FMaia, 99,8% v/v) em 50 mL de água deionizada.

Solução de dicromato de potássio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,8820 g do reagente (Synth, 99,95-100,05% m/m) em 22 mL de ácido sulfúrico (FMaia, 98% m/v) e aferido para 100 mL com água. A solução de NaCl 5% (m/v) foi preparada pela dissolução de 5 g do reagente (Synth, 99,95-100,05% m/m) para 50 mL de água.

Solução etanólica de NaOH foi preparada a partir da mistura de 2,5 mL de solução aquosa de NaOH (FMaia, 97% m/m P.A.) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com 2 mL de etanol (Fmaia, 99,8% v/v).

As soluções denominadas soluções de referência são as soluções empregadas nas construções das curvas, soluções em concentrações conhecidas de uma dada espécie. As soluções de referência de metanol de concentrações entre 0,1 e 4,0% (v/v) utilizadas nos procedimentos em batelada foram preparadas a partir de diluições adequadas de metanol (FMaia, 99,8% v/v) com água. Todas as etapas investigadas para determinação de metanol empregando o sistema FIA, foram usadas soluções de metanol preparadas a partir do reagente 99,0% (v/v) (Merck). O

preparo da solução de etanol 4,0% (v/v) foi efetuado pela diluição de solução de etanol (FMaia, 99,8% v/v) com água.

As soluções de 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) em diferentes concentrações foram preparadas diariamente pela dissolução da massa do reagente (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 97,0\%$) em água.

Nos estudos para avaliação do efeito da acidez, as soluções foram preparadas a partir dos seguintes reagentes: ácido clorídrico (Fmaia, 36 - 37% m/m), hidróxido de sódio (FMaia, 97% m/m P.A.), Tris hidroximetil aminometano (J.T.Baker, 99% m/m), ácido bórico (Merck, 99,8% m/m), borato de sódio (Quimibras, 99,5-105% m/m), citrato de sódio tribásico (Química Moderna, 99% m/m), ácido cítrico (Merck, 99,5-100,5% m/m), ácido acético glacial comercial (Synth, 100%) e acetato de sódio anidro (Synth, 99% P.A.). Para preparo de solução em pH próximo de 0, foi realizada a dissolução de 1,25 mL de ácido clorídrico (Fmaia, 36-37% m/m), para 15 mL de solução. Diluições adequadas do mesmo reagente foram realizadas para o preparo das soluções em pH 1,0 e 2,0.

Soluções tampão aquosas $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir de citrato de sódio/ácido cítrico (pH 2,0 e 3,0); acetato de sódio/ácido acético (pH 4,0 e 5,0); hexametenotetramina/ácido clorídrico (pH 6,0 a 7,0), tris/ácido clorídrico (pH 8,0 e 9,0) e borato de sódio/ácido bórico (10,0 a 11,0). Os ajustes de pH dessas soluções foram realizados com ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e/ou NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com o auxílio de um pHmetro e posterior diluição para 15 mL.

Para preparo de solução em pH aproximadamente 14 foi realizada a dissolução de 1,5 mL da solução de NaOH 50% (m/v) (Fmaia, P.A.) para 15 mL de solução. Diluições adequadas da solução em pH 14 foram realizadas para o preparo das soluções em pH 12,0 e 13,0. O ajuste do pH foi novamente controlado com o

auxílio de um pHmetro. O preparo da solução Britton-Robinson no intervalo entre $7,5 \times 10^{-3}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi realizado com a mistura da massa apropriada de ácido bórico (Merck, 99,8% m/m) e volumes adequados de ácido orto-fosfórico (Merck, 85% m/m) e ácido acético glacial comercial (Synth, 100%). O ajuste para pH 12 das soluções em concentração $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi realizado empregando ácido acético glacial comercial ou solução de NaOH $0,8 \text{ mol L}^{-1}$. Para soluções de borato foi empregado como sal precursor o borato de sódio (Quimibras, 99,5-105% m/m) e ajustando a massa para as distintas concentrações empregadas em meio aquoso.

Soluções de referência de glicerol (0,025 a 0,5%, v/v) foram preparadas a partir de diluições apropriadas de uma solução estoque de glicerol 2,0% (v/v) anteriormente preparada através da diluição de 1 mL do reagente glicerol (Sigma, Alemanha, pureza $\geq 99\%$) em água para balão de 50 mL.

Em ambos sistemas desenvolvidos empregando o reagente NQS, o branco analítico era água, uma vez que as soluções de metanol e glicerol eram preparadas em meio aquoso. Todos os experimentos conduzidos com as soluções de metanol e glicerol foram também conduzidos com o branco.

3.2 – Amostras

Para os estudos do procedimento de extração líquido-líquido, foram empregadas amostras de biodiesel de diferentes oleaginosas (soja, mamona, girassol e sebo animal).

As amostras de biodiesel empregadas nesse trabalho na etapa de determinação de metanol, glicerol livre e glicerol total foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa empregando diferentes oleaginosas (óleo de frango (gordura coletada nas máquinas de assar conhecidas popularmente como "televisão de cachorro" ou resíduos gerados do processamento de carne de frango), soja, girassol, palma,

algodão, sebo e milho). Para etapa de validação do método, foram empregadas amostras de biodiesel de soja utilizadas em testes interlaboratoriais nos anos de 2012 e 2013. Não foi necessária filtração, nem outro pré-tratamento, antes do procedimento de extração líquido-líquido.

3.3 – Equipamentos e materiais

Todas as pesagens foram realizadas utilizando uma balança analítica Sartorius, modelo TE214 S, com precisão de $\pm 0,1$ mg.

Para as medidas dos sinais analíticos foram empregados os seguintes espectrofotômetros: Femto 432 (São Paulo, Brasil) equipado com cela de fluxo de vidro (Hellma) com 10 mm de caminho ótico e 120 μ L de volume, fotômetro confeccionado no laboratório com cela vertical de vidro com cerca de 5 cm de caminho ótico e 500 μ L de volume, espectrofotômetro multicanal Cary|1E| UV-Visível (Varian) e espectrofotômetro multicanal Ocean Optics acoplado com fibra óptica de 300 microns, cubeta de fluxo com 70 μ L de volume interno e 10 mm de caminho ótico. Neste último, o software operacional *Spectra Suite* (Ocean Optics) foi utilizado na aquisição dos dados. Para manipulação das soluções no sistema de análise em fluxo foram empregadas válvulas de três vias (Valco, EUA) e confluência confeccionada em acrílico para promover encontro/mistura entre as soluções. Uma bomba peristáltica de oito vias Gilson Minipuls 3 (Villiers-Le-Bell, França) equipada com tubos de propulsão de Isoversinic® foi empregada para propulsão dos fluidos. Tubos de PTFE (0,8 mm *d.i.*) foram utilizados nas linhas de transmissão.

Um microcomputador Pentium II equipado com saída RS-232 e saída paralela foi utilizado para desenvolvimento e aplicação do software na etapa de preparo das amostras em linha. Este software promovia o controle da vazão e do sentido da

propulsão dos fluidos e aquisição dos dados gerados pelo espectrofotômetro. O software foi desenvolvido em linguagem de programação QuickBasic 4.5 em ambiente MS-DOS.

As medidas de pH foram realizadas empregado um potenciômetro 827 pH LAB (Metrohm, Suíça), acoplado a um eletrodo de vidro combinado com eletrodo de referência interna $\text{Ag}|\text{AgCl}_{(s)}$. O eletrodo foi calibrado com soluções tampão em meio aquoso.

Na etapa de extração envolvendo ultrassom, foi empregado um banho ultrassônico de baixa potência Aquasonic 75D de 40 kHz e 90 W (VWR Scientific Instrument, EUA). Ainda para as extrações em batelada, foram empregadas centrífuga (FANEM, modelo EXCELSA 4) com faixa de trabalho 0 – 5000 RPM e, por fim, placa de aquecimento e agitador Logen Scientifica Stirrer Hot Plate 300.

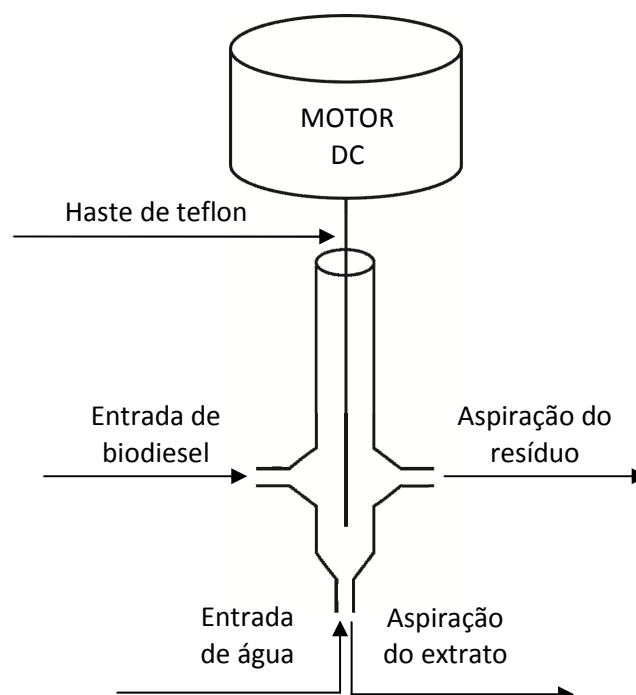
3.4 – Procedimento experimental

3.4.1 – Módulo para extração líquido-líquido de etanol em amostras de biodiesel

Visando promover a extração do analito presente no biodiesel para fase aquosa e descartar a matriz do biodiesel do restante do processo de detecção, foi proposto um procedimento de extração líquido-líquido em linha. Para essa investigação, foi utilizado etanol como espécie a ser extraída. As configurações estudadas para o sistema de extração em linha tinham em comum a introdução de biodiesel e água em uma câmara de borosilicato confeccionada no CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo), conforme Figura 3.1. Essa câmara de separação apresentava capacidade interna de 1,3 mL distribuídos em uma coluna de aproximadamente 8 cm. Não foi possível medir o diâmetro interno

da câmara, uma vez que o mesmo sofre redução ao longo da câmara. A parte inferior é mais estreita para adaptação da tubulação de fluxo. Toda essa etapa foi realizada em estágio orientado pelo Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis no laboratório do CENA na cidade de Piracicaba-SP. As câmaras de separação foram estudadas com diferentes configurações em que eram alteradas as alturas dos orifícios de entrada e saída do fluxo de biodiesel, bem como a saída do extrato aquoso. Após mistura entre amostra e meio extrator (água), o motor de corrente contínua acionava uma haste de teflon para promover a agitação do sistema, sendo posteriormente avaliado o tempo de repouso, após agitação. Esse tempo era necessário para promover a separação de fases na interface entre o biodiesel e a fase aquosa. Além dessa parada, também havia o tempo de aspiração do biodiesel residual até que fosse retirado o filme formado nessa interface. A limpeza era realizada com água.

Figura 3.1. *Câmara de separação desenvolvida em borossilicato acoplada ao motor de corrente contínua. DC: corrente contínua.*



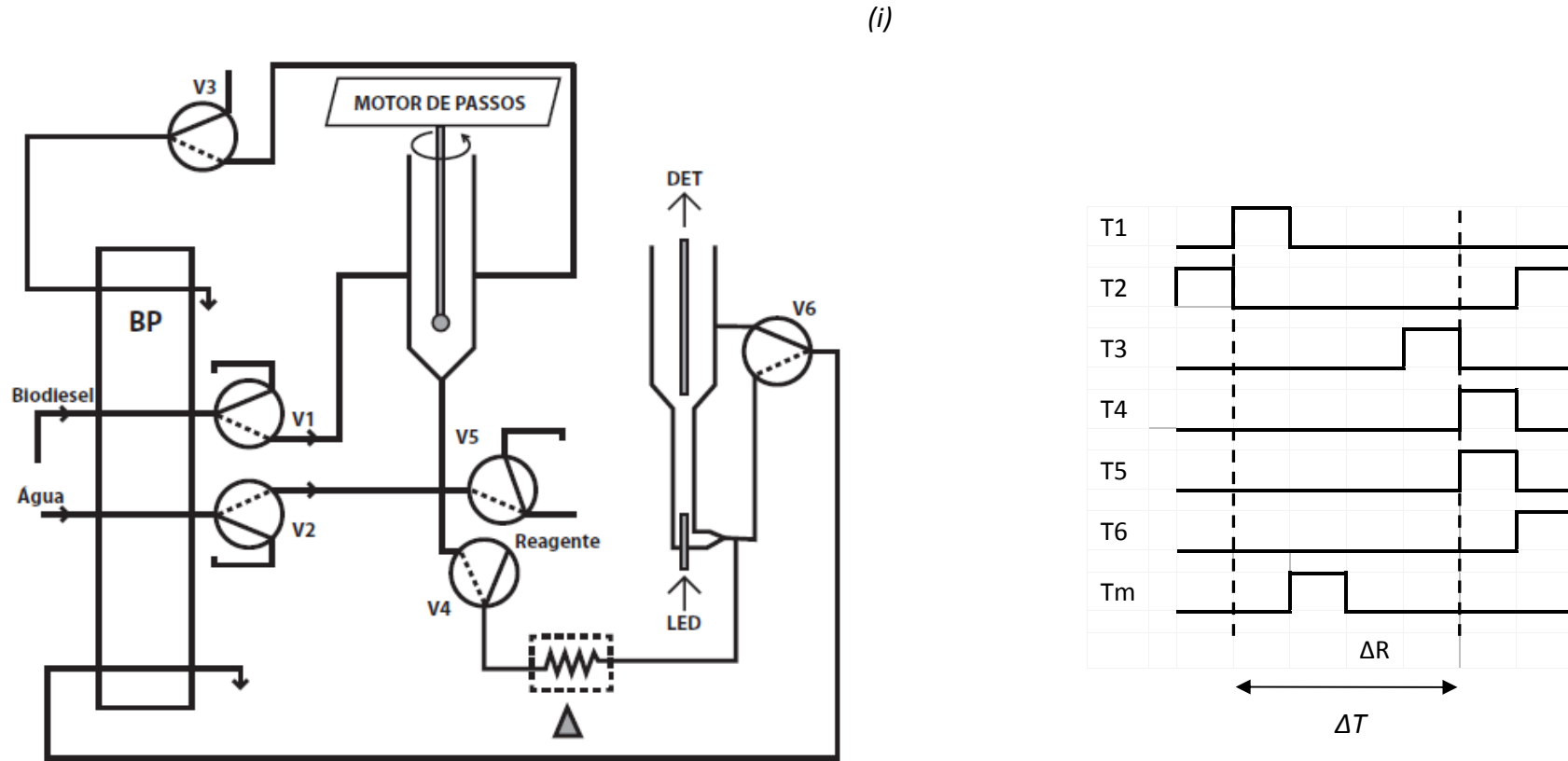
Em todo estudo sobre a etapa de extração foi utilizada amostra de biodiesel de soja com adição de etanol como analito em concentrações finais de aproximadamente 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0% (v/v) e a reação do mesmo com íon dicromato em meio de ácido sulfúrico para determinação do analito extraído. Os sinais de absorvância do produto da reação entre o etanol e o dicromato foram medidos por espectrofotometria de absorção molecular em 590 nm (Comitre et al., 2000; Choengchan et al. 2006).

Algumas condições foram estabelecidas para avaliar as montagens do sistema de extração em linha e estão apresentados na Tabela 3.1. A configuração do sistema FIA empregado está discriminada na Figura 3.2.

Tabela 3.1. *Parâmetros fixados para avaliação dos sistemas de extração líquido-líquido em linha das amostras de biodiesel.*

Parâmetro	Valor
Vazão, mL min⁻¹	
Água	1,20
Biodiesel	3,32
Tempo, s	
Injeção de água	30
Injeção de biodiesel em cada extração	10
Agitação	30
Aspiração do biodiesel por cada extração	30
Repouso	120
Remoção do resíduo de biodiesel após repouso	30
Aspiração para o canal de detecção	120
Extração	
Número de extrações	20

Figura 3.2. (i) Digrama de fluxo em que há o acoplamento do sistema de extração líquido-líquido com um fotômetro e uma cela de detecção posicionada na vertical ($\lambda = 590 \text{ nm}$). V_i =válvulas solenóides de três vias, M = mini-motor CC (12V), BP =bomba peristáltica, C = cela de separação, DET = detector, B = biodiesel ($\phi = 3,3 \text{ mL min}^{-1}$) e A =água ($\phi = 1,2 \text{ mL min}^{-1}$). (ii) Base de tempo de acionamento das válvulas solenóides v_i e motor correspondem a T_i e T_m , respectivamente. ΔT = tempo referente a etapa de adição e aspiração de biodiesel correspondente a n extrações e ΔR = tempo de repouso após extração.



Para o processo de extração, uma alíquota de 332 μL de biodiesel foi bombeada para câmara de separação juntamente com 600 μL de água através das válvulas V1 e V2, respectivamente. Após agitação, a mistura era mantida em repouso. Em seguida, a fase contendo biodiesel residual era aspirada para descarte, enquanto o extrato aquoso seguia para análise.

Foram avaliados os sinais analíticos referentes aos extratos coletados após a extração de amostras de biodiesel enriquecidas com etanol em diferentes concentrações. Sem a adição de analito à amostra, foi avaliado o número de extrações no intervalo de 1 a 40 vezes que corresponde a quantidade de vezes que um determinado volume de amostra é adicionado ao sistema de extração, descartado, e uma nova alíquota da amostra é adicionada. Além disso, foi avaliado o número de vezes que um volume fixo, nesse caso 540 μL , pode ser dividido para aumentar o número de etapas em que a amostra entra em contato com o meio extrator. A divisão ocorreu em 1, 2, 4 e 8 vezes.

Visando melhorar as condições de extração, foi verificada a influência do tempo de agitação. Dessa forma, realizou-se uma investigação acerca da variação do sinal analítico após análise do extrato aquoso obtido para tempos de agitação no intervalo de 0 e 40 s. Adicionalmente, foi testado o emprego de uma solução de NaCl 0,5% (m/v) como solução extratora visando facilitar a quebra da emulsão.

Acoplou-se a detecção espectrofotométrica explorando a reação do etanol com dicromato em meio ácido à etapa de extração líquido-líquido. Nesta configuração do sistema, foi necessário o aquecimento para favorecer a reação de oxidação para determinação do analito. Para tal, a mistura do extrato e o reagente em meio ácido era direcionada para a bobina de reação onde era aquecida para promover de forma mais efetiva e rápida a oxidação do etanol.

No primeiro módulo de detecção estudado nessa etapa, foi avaliada a reação entre o etanol e o dicromato de potássio utilizando um fotômetro com fonte em comprimento de onda fixo ($\lambda = 590 \text{ nm}$). Curvas analíticas foram obtidas a fim de se avaliar a reprodutibilidade e sensibilidade de detecção. A aquisição de dados foi realizada com um multímetro e a absorvância (A) foi calculada através da operação matemática: $Abs = -\log (S/Sa)$ em que: S = sinal referente a solução da amostra ou referência e Sa= sinal referente a água (sinais em mV).

3.4.2 – Determinação espectrofotométrica de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS)

3.4.2.1 – Determinação de metanol em amostras de biodiesel

Na etapa de implementação do módulo de detecção para determinação de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel, foi estudada a reação direta entre o reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) com o metanol e etanol (Li e Zhang, 2008a), assim como entre o NQS e o glicerol. Esses procedimentos foram realizados em batelada.

Foi avaliada a estabilidade do reagente NQS a partir do registro do espectro molecular da solução aquosa do mesmo em função do tempo. Uma solução de NQS $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada em meio aquoso e acondicionada com e sem exposição à luz (envolvida em papel alumínio). Ambas as soluções foram submetidas a medida do espectro na faixa de 350 a 800 nm, em intervalos de 10 min, durante 90 min. As medidas foram realizadas contra a água.

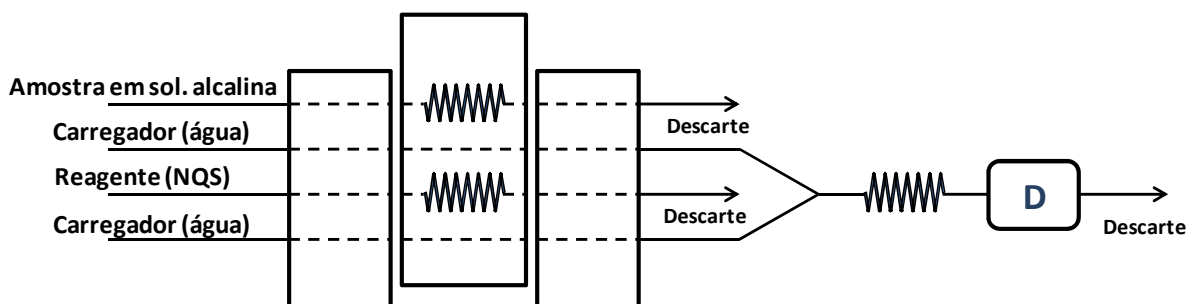
Ensaio preliminares em batelada foram realizados a partir da reação entre soluções de referência de metanol com NQS em meio alcalino. Em seguida, foram registrados os espectros do produto formado no intervalo de 400 a 800 nm. As soluções foram preparadas pela adição de 1,0 mL de solução de metanol, 5,0 mL da solução do reagente NQS $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em meio aquoso e 2,5 mL de solução alcalina de NaOH (pH 13) para 15 mL de solução aquosa. Esse procedimento foi realizado para soluções de metanol em concentrações na faixa de 0,1 a 1,0 % (v/v). Para verificar a diferença entre os sinais produzidos a partir da reação do NQS com metanol e etanol foram realizadas medidas para ambos os analitos sob condições

reacionais já mencionadas. Para essa comparação, foram empregadas soluções de referência de metanol e etanol nas mesmas concentrações (4%, v/v). Esse teor de metanol também foi utilizado para investigação da cinética de reação com o NQS ao longo de 150 min.

Foram construídas curvas analíticas a partir de soluções de referência de metanol em concentrações de 0,01 a 1,0% (v/v) com no mínimo 05 pontos. As medidas foram realizadas 55 min após a mistura das soluções.

Para aplicação desse procedimento em sistema FIA, inicialmente, as condições estabelecidas em batelada foram transportadas para o sistema como concentração do reagente e manutenção do pH do meio. Posteriormente, foram testadas as seguintes condições: soluções padrão preparadas em meio alcalino, emprego de 2 bobinas de mesmo tamanho para reagente e amostra (60 cm = 300 μL), redução da concentração do reagente em cinco vezes (de 5×10^{-3} para 1×10^{-3} mol L^{-1}), emprego do reagente na própria solução carregadora, parada de fluxo e aquecimento condutivo e em micro-ondas. Para essas avaliações foram empregadas soluções de metanol em 3 diferentes concentrações (0,5; 1,0 e 2,0% v/v) além do branco. O sistema FIA proposto está apresentado na Figura 3.3.

Figura 3.3. Diagrama do sistema de análise por injeção em fluxo inicial empregado para a etapa de medida do sinal analítico ($\phi=1,60$ mL/min).



Para avaliação do efeito do tempo de parada de fluxo, foram medidos os sinais líquidos para as soluções de referência de metanol em diferentes tempos de interrupções de fluxo na bobina reacional. O sinal líquido correspondeu à diferença entre o sinal referente ao produto de reação e a média do sinal do branco analítico. Inicialmente foi verificado o efeito dessa interrupção realizando experimentos sem e com a interrupção de fluxo de 5 min. Em uma segunda etapa, foi feita a investigação com a parada de fluxo variando em intervalos de 2 min em 2 min até tempo máximo de 10 min para soluções de referência de metanol a partir de duas concentrações: 0,5 e 1,0% (v/v).

O efeito da temperatura foi avaliado empregando aquecimento condutivo e em forno micro-ondas doméstico, sem a estratégia de parada de fluxo. No estudo com aquecimento condutivo, os sinais transientes do produto de reação foram avaliados nas temperaturas de 30, 39, 45 e 53 °C. Ao empregar o forno de micro-ondas doméstico, a bobina reacional era mantida no interior do forno sem uso de banho de água e a potência incidida era monitorada. No forno micro-ondas doméstico a potência selecionada era média, que equivale a aproximadamente 50% da potência do equipamento que era de 1400 Watts. O efeito da concentração do reagente NQS foi investigado no intervalo de $1,5 \times 10^{-4}$ até $7,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, enquanto a influência do comprimento da bobina de reação foi investigada de 100 e 250 cm, correspondente a volumes entre 500 e 1250 µL, respectivamente.

O pH de diferentes soluções empregadas como transportador foi avaliado no intervalo de 0 e 14. Para cada condição de pH, foram registrados os perfis dos picos e os sinais líquidos referentes aos produtos de reação entre a solução de referência de metanol e o reagente NQS. Nessa avaliação, foi empregada solução de referência de metanol 1,0% (v/v). Além disso, foi feita uma avaliação acerca da

diluição do carregador NaOH a partir da exploração dos sinais transientes dos produtos da reação proposta. Dessa forma, foram realizadas diluições do carregador mantendo o meio alcalino e foram registrados os sinais correspondentes ao produto formado para solução de referência de metanol 1,0% v/v em cada condição concentração de NaOH na solução transportadora (0,1 até 0,03 mol L⁻¹).

Foram executados experimentos com amostras reais de biodiesel. Para tal, foram analisadas sete amostras (A1 a A7) em que duas (A6 e A7) estavam com adição de metanol em dois níveis de concentração: 0,5 e 0,7 % (v/v), respectivamente. Para o preparo dessas amostras de biodiesel, procedeu-se a extração do metanol por extração líquido-líquido em meio aquoso em que 1 g da amostra foi pesada diretamente em um tubo de centrifuga de 15 mL. Foram adicionados 4 mL de água deionizada e a mistura foi submetida a agitação em uma plataforma por 30 min. Em seguida, o sistema era centrifugado por 5 min a 3000 rpm e o biodiesel sobrenadante removido com pipeta de Pauster (Silva e Rocha, 2010). O teor de metanol foi determinado na fase aquosa utilizando as condições otimizadas para esse procedimento. As condições otimizadas para determinação de metanol foram: solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹ como carregador, NQS a 2,5x10⁻³ mol L⁻¹, bobina reacional de 175 cm e tempo de interrupção de fluxo de 10 min. Os volumes da amostra e reagente foram iguais a 300 µL e a vazão da solução transportadora de 1,60 mL min⁻¹.

A presença do glicerol como potencial interferente no sistema para determinação de metanol foi avaliada a partir da adição de glicerol em diferentes concentrações (0,07 a 0,3%, v/v) às soluções de metanol (0,5 e 1,0%, v/v). Adicionalmente, o efeito do glicerol a 0,25% (v/v) foi avaliado frente a variações no

comportamento de curvas analíticas para soluções de metanol (na presença e ausência deste composto).

O efeito do íon borato como mascarante para glicerol foi avaliado nas concentrações entre 0,005 e 0,1 mol L⁻¹ na mistura de metanol e glicerol. Também foi investigado o poder mascarante a partir da substituição da solução transportadora por tampão Britton-Robinson (ácido bórico, ácido acético e ácido orto-fosfórico), neste caso na faixa de concentração de 7,5x10⁻³ a 0,02 mol L⁻¹.

3.4.2.2 – Determinação de glicerol total em amostras de biodiesel

Para avaliar o perfil do espectro do produto formado por metanol e glicerol na mesma solução com o reagente NQS, foi preparada solução contendo metanol e glicerol em meio alcalino a partir da adição de alíquota adequada de cada um dos analitos à mesma solução. Tanto o metanol quanto o glicerol estavam em concentrações iguais a 0,25% (v/v).

A fim de investigar a diferença de sinal frente ao metanol e ao glicerol, foi registrado o espectro do produto de reação de metanol e glicerol, respectivamente com o reagente NQS após diferentes tempos de reação em intervalos de 5 min até tempo máximo de 35 min.

O efeito do pH sobre o sinal analítico para o produto de reação entre o NQS e o glicerol foi investigado de forma semelhante à investigação desse efeito no sistema para determinação de metanol. Para tal finalidade, eram injetados no sistema, alíquotas de solução de referência de glicerol e de reagente NQS sob o transporte de uma solução transportadora com pH controlado (0 a 14). Para essa investigação, os demais parâmetros foram conservados: concentração de NQS em $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, comprimento de bobina de 175 cm, vazão em $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de interrupção de fluxo de 10 min. A concentração de glicerol utilizada nessa investigação foi de 0,25 % (v/v). Para verificar se havia alteração significativa do pH do meio ao misturar a solução de referência de glicerol com a solução transportadora, foram realizadas medidas de pH após o ponto de detecção. A configuração do sistema foi a mesma empregada no sistema para determinação de metanol apresentado na Figura 3.2.

De posse dos estudos sobre o efeito do pH para determinação de metanol e glicerol no sistema proposto, foram construídas curvas analíticas visando a

determinação de metanol e glicerol em pH 12 em diferentes tempos de interrupções de fluxo. Dessa forma, pretendia-se determinar metanol e glicerol em mesmo sistema, explorando duas injeções em tempos de interrupções de fluxo distintos explorando diferentes cinéticas de reação. Inicialmente, construiu-se curvas para ambos os analitos (metanol e glicerol) sem parada de fluxo e com paradas de 3, 5 e 10 min. Nesse mesmo procedimento, foi possível investigar o efeito do tempo de interrupção do fluxo sobre o sinal analítico do branco.

De posse dessas investigações, foi realizada a otimização do procedimento para determinação de glicerol nas amostras de biodiesel. Os parâmetros otimizados foram semelhantes aos investigados no sistema para determinação de metanol com exceção da vazão da solução transportadora que foi investigada entre 1,6 e 5,8 mL min⁻¹. Em todas as otimizações, foram empregadas soluções de glicerol em concentrações 0,25 e 1,0 % v/v. Para concentrações de reagentes da ordem de 10⁻³ (1,0x10⁻³, 2,5x10⁻³, 5,0x10⁻³ e 7,5x10⁻³ mol L⁻¹), foram construídas curvas analíticas com mínimo de 06 pontos a partir de soluções de glicerol entre 0,025 e 1,0 % (v/v) em duas condições de pH: 2 e 12.

Para investigar se o metanol apresentaria interferência no sistema otimizado para a determinação de glicerol, foram construídas curvas para soluções de glicerol em presença de metanol sob concentração fixa (0,2%) sem interrupção de fluxo. As concentrações de glicerol empregadas estiveram no intervalo de 0,075 e 2,5% (v/v).

Foram estabelecidas as figuras de mérito a partir da construção de curva analítica nas condições otimizadas. Para validação do método proposto, foram adicionadas alíquotas definidas de glicerol a amostras de óleo de soja para concentração final de glicerol entre 0,15 e 0,55%. O óleo de soja foi selecionado para essa etapa, uma vez que é a matriz que mais se assemelha a matriz do

biodiesel e não apresentaria contaminação de glicerol. Para análise dessas amostras e determinação do glicerol, procedeu-se a etapa de extração líquido-líquido semelhante a descrita no item 3.4.2.1.

Nas condições otimizadas para determinação de glicerol, empregou-se como carregador solução de NaOH $0,003 \text{ mol L}^{-1}$, NQS $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, comprimento de bobina de 100 cm, vazão da solução transportadora em $3,90 \text{ mL min}^{-1}$. Os volumes das bobinas de amostra e reagente eram de $300 \mu\text{L}$ e os sinais transientes também eram registrados em 453 nm.

Visando comparar o método proposto com o método de referência e investigar a eficácia do método para glicerol total, foi realizada análise de amostras de biodiesel submetidas a testes interlaboratoriais.

O preparo das amostras consistiu em extração líquido-líquido em solução etanólica de NaOH. Para esse procedimento, a extração foi realizada seguindo a proposta de Silva e colaboradores (2011) sem a etapa de neutralização, onde 0,5 g da amostra de biodiesel foi pesada em tubo de centrífuga de 15 mL e adicionados 2,0 mL de etanol e 2,5 mL de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O tubo foi inserido no banho ultrassônico na potência máxima (90 W) por 30 min e depois submetido a agitação em um vortex por 15 min. O sobrenadante foi coletado com uma pipeta de Pasteur e o extrato analisado no sistema FIA proposto. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com os resultados obtidos com os métodos de referência ASTM D 6584 e EN 14105 (Método Padrão para Determinação de Monoglicerídeo Total, Diglicerídeo Total, Triglicerídeo Total e Glicerina Livre e Total em Biodiesel B100 por Cromatografia Gasosa/ Determinação de Glicerina Livre e Total e mono-, di-, triglicerídeos em Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos). Foi empregado o teste t para comparação de média de dados independentes, uma vez

que as amostras eram distintas e o número de réplicas realizadas utilizando o método proposto foi diferente do número de medidas empregando o método de referência. Foi realizado o cálculo da variância agrupada e do grau de liberdade do conjunto de dados. O valor de t calculado foi comparado com o valor de t tabelado ao nível de significância de 99,5%.

Uma vez validado o procedimento proposto, esse mesmo foi aplicado à amostras de biodiesel oriundas de diferentes oleaginosas descritas no item Amostras em 3.2.

4.0 – Resultados e Discussão

4.1 – Módulo para extração líquido-líquido

Os sistemas automatizados até então desenvolvidos em instrumentação analítica geralmente empregam a automatização a partir da etapa de construção da curva analítica. No sistema proposto, visava-se incorporar desde a etapa de preparo de amostra com extração líquido-líquido até a etapa de construção da curva analítica e determinação do analito.

Para promover a extração do metanol e do glicerol livre das amostras de biodiesel para o meio aquoso foi construída uma câmara de borosilicato onde foi realizada uma estratégia de extração líquido-líquido. A manipulação de amostras oleosas em linha é difícil quando comparada com a manipulação de solução aquosas. Inúmeros são os fatores que contribuem para essa dificuldade: a viscosidade, a pouca miscibilidade das soluções orgânicas com soluções aquosas e a dificuldade de limpeza entre as injeções das amostras. Para avaliar o procedimento de extração, optou-se por trabalhar com etanol para evitar a manipulação de metanol. Assumindo que houvesse extração de etanol, o mesmo era esperado para metanol e glicerol.

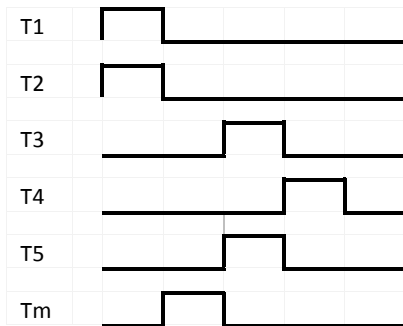
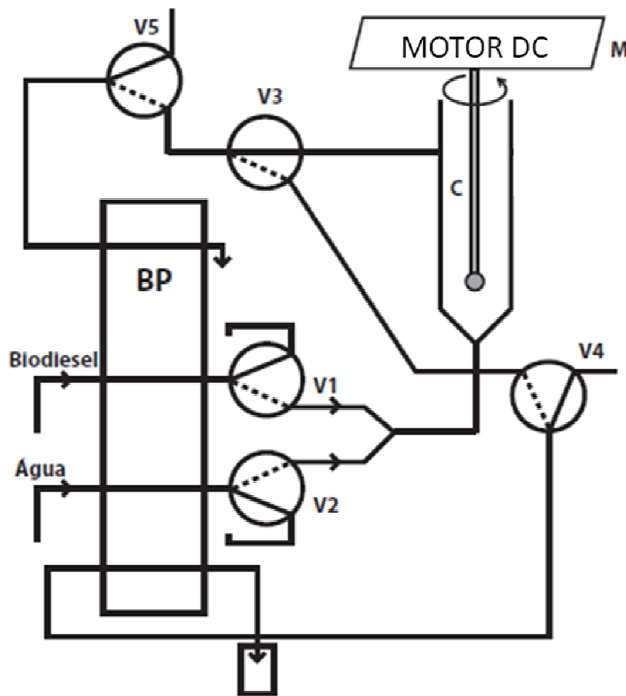
O volume de água injetado como extrator na câmara de separação foi de 600 μL , enquanto que o volume de biodiesel inserido foi de 332 μL . O volume de água correspondia ao volume interno da câmara de separação desde a entrada de água até o orifício de entrada do biodiesel. O volume inicial de biodiesel foi calculado a partir do produto da vazão pelo tempo. Duas configurações de sistema em fluxo foram estudadas e diferenciavam entre si na entrada e saída dos reagentes. Um primeiro sistema (Figura 4.1 (A)) foi testado inserindo biodiesel e extrator (água desionizada) concomitantemente na câmara e o resíduo de biodiesel era removido

pela parte inferior da câmara após coleta da fase aquosa. Dessa forma, em todas as extrações realizadas, resíduo de biodiesel era direcionado para o detector, contaminando a cela de detecção e comprometendo o sinal analítico.

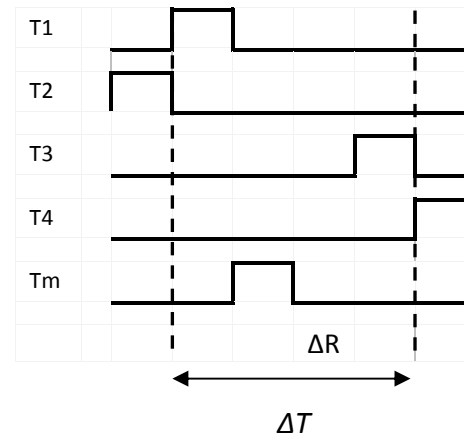
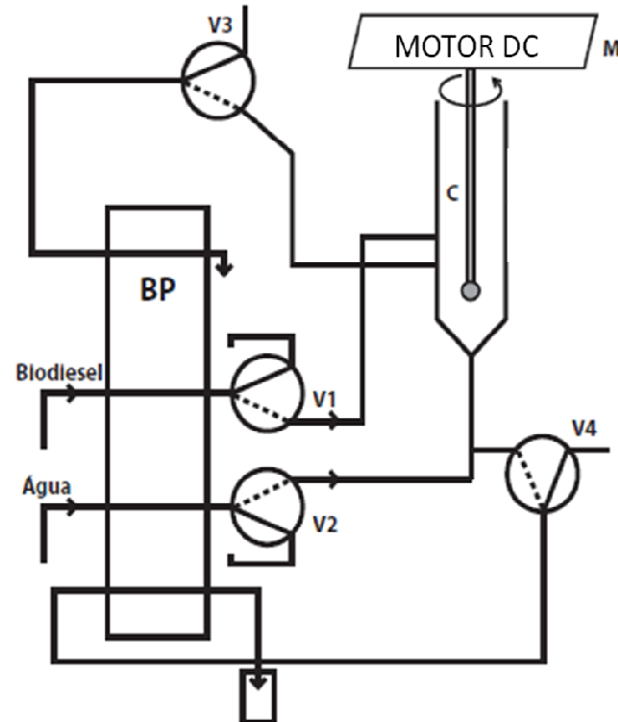
No diagrama de fluxo apresentado na Figura 4.1(B), está ilustrada a entrada da amostra e o extrator na câmara de separação individualmente. Nesse sistema, o biodiesel residual era removido pela parte central da cela e o extrato aquoso pela parte inferior da câmara. O volume coletado de extrato aquoso era menor que o volume de água inicialmente injetado. Isso porque uma parte da fase aquosa era perdida quando era realizada a aspiração da fase orgânica já que, quando havia o contato entre as duas fases, era formado um filme na interface entre as fases aquosa e orgânica. Para evitar que parte da fase orgânica contaminasse o extrato aquoso, a interface era coletada juntamente com o excesso de fase orgânica de biodiesel através do acionamento da válvula V3 após a remoção do extrato aquoso.

Figura 4.1. Diagramas de extração líquido-líquido em linha empregando a injeção da mistura na câmara de separação (A) e empregando a injeção de cada uma das fases individualmente na câmara de separação (B). V_i =válvulas solenóides de três vias, M = mini-motor CC (12V), BP =bomba peristáltica, C = cela de separação, B = biodiesel($\phi=3,3 \text{ mL min}^{-1}$) e A =água($\phi=1,2 \text{ mL min}^{-1}$). Base de tempo de acionamento das válvulas solenóides v_i e motor correspondem a T_i e T_m , respectivamente, ΔT = tempo referente a etapa de adição e aspiração de biodiesel correspondente a n extrações e ΔR = tempo de repouso após extração.

(A)



(B)



Alguns parâmetros foram inicialmente fixados para investigação do procedimento de extração. A vazão de injeção da água foi selecionada mais baixa ($1,20 \text{ mL min}^{-1}$) do que a vazão de injeção da amostra ($3,32 \text{ mL min}^{-1}$) porque a mesma entrava por canal na extremidade inferior e era importante que não houvesse agitação antes da etapa apropriada para esse fim. Dessa forma, evitava-se resíduo de biodiesel no canal de entrada de água. O tempo de agitação foi fixado aleatoriamente em 30 s. Esse parâmetro foi otimizado em uma etapa posterior. O tempo de aspiração de resíduo de biodiesel foi o tempo necessário para que esse resíduo fosse transportado da câmara de separação para o descarte. O tempo de aspiração para o canal de detecção era o tempo necessário para que o extrato fosse coletado, encontrasse o reagente dicromato em meio de ácido sulfúrico, e passasse pela detecção. O diagrama desse sistema foi descrito na Figura 4.2. Com o aquecimento da bobina reacional, havia a formação de bolhas na etapa de detecção. Simultaneamente a procura por outra estratégia de detecção, os extratos dos experimentos eram coletados para medida do sinal analítico fora de linha.

Durante a investigação do sistema de extração, foi avaliado se o número de injeções de novas alíquotas de biodiesel promoveria aumento da extração do etanol presente no biodiesel para o mesmo volume de fase aquosa. Esse parâmetro foi denominado número de extrações. Após a realização de sucessivas extrações, o extrato coletado através do canal de aspiração para detecção, tinha o sinal analítico registrado da mesma forma como descrito no parágrafo anterior. Na Figura 4.3, são apresentados os registros dos sinais em função do número de extrações.

Figura 4.2. Digrama de fluxo em que há o acoplamento do sistema de extração líquido-líquido com um espectrofotômetro Fento 432 ($\lambda = 590 \text{ nm}$). Vi=válvulas solenóides de três vias, M= mini-motor CC (12V), BP=bomba peristáltica, C= cela de separação, B= biodiesel ($\phi = 3,3 \text{ mL min}^{-1}$) e A=água ($\phi = 1,2 \text{ mL min}^{-1}$). Base de tempo de acionamento das válvulas solenóides vi e motor correspondem a T_i e T_m , respectivamente, ΔT = tempo referente a etapa de adição e aspiração de biodiesel correspondente a n extrações e ΔR = tempo de repouso após extração.

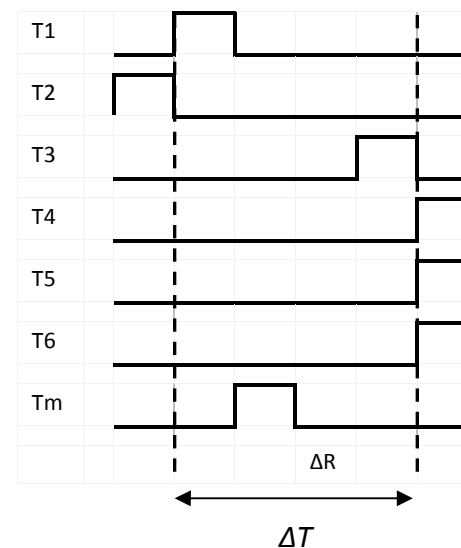
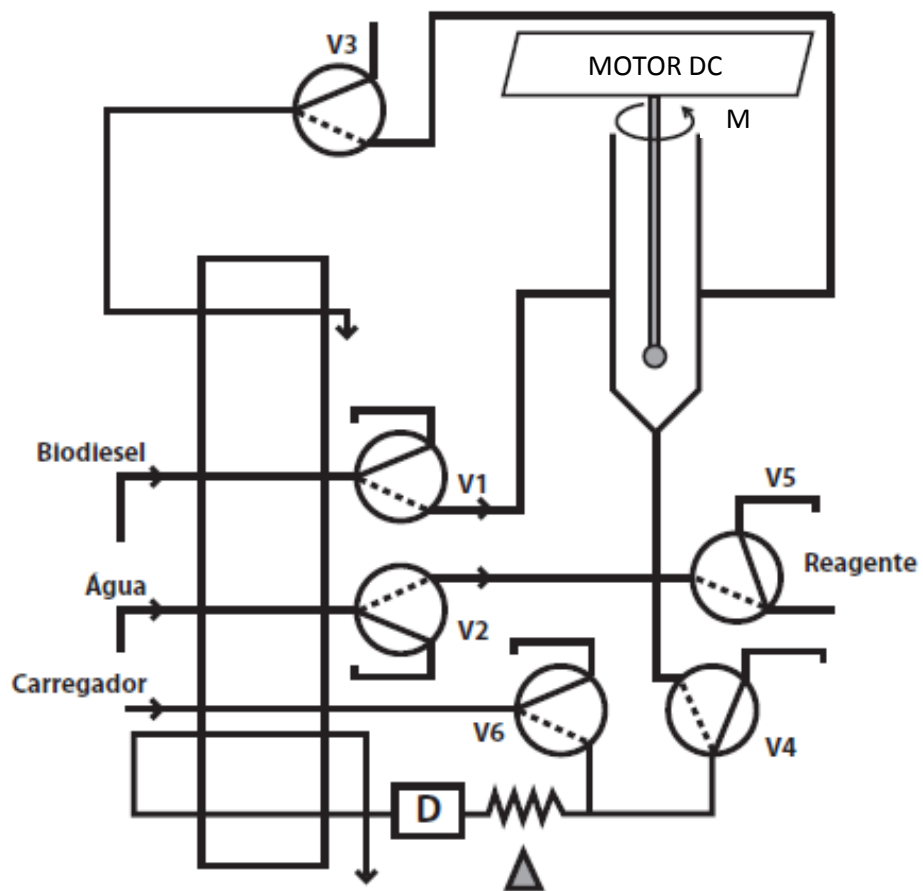
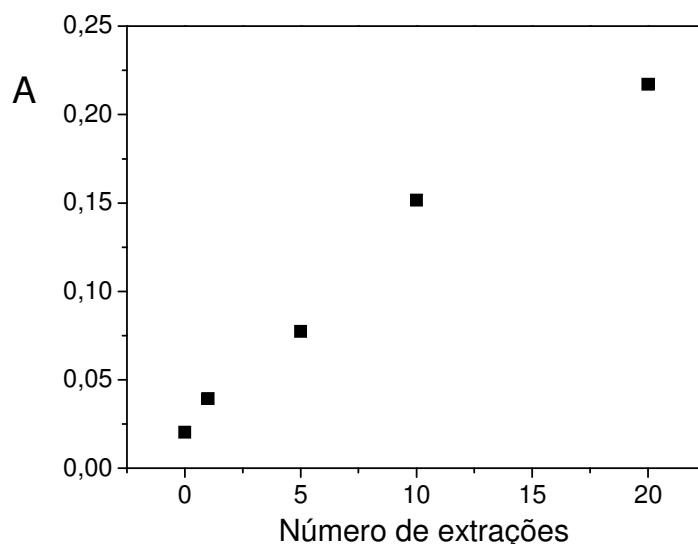


Figura 4.3. Efeito do número de extrações sobre o sinal analítico para o sistema de extração de etanol em biodiesel.



Foi possível observar a partir dos registros apresentados na Figura 4.3 que o aumento do número de injeções de novas alíquotas de biodiesel (número de extrações) no sistema de extração, provocou aumento no sinal após reação com dicromato de potássio. Para número de extrações até 20, esse aumento foi mais pronunciado. A partir de 20, a cada 10 extrações, o aumento do sinal foi inferior a 10%. Isso pode ter ocorrido devido a falta de reagente para determinação do teor de analito extraído para o extrato aquoso. O aumento do sinal com o acréscimo de mais injeções de alíquotas de biodiesel mantendo o mesmo volume de solução extratora implica que mais analito é extraído para essa fase aquosa, ocorrendo, portanto, uma pré-concentração do analito nesse extrato. Observou-se que procedimentos a partir de 20 extrações já não seriam mais vantajoso devido a demanda de tempo e de amostra de biodiesel, além do menor incremento na pré-concentração. Essa estratégia de preparo de amostra em linha pode ser empregada em casos de

amostras que apresentam baixas concentrações do analito e que possam se encaixar na faixa linear de trabalho do método de análise disponível.

Foi avaliado se empregando um volume fixo de amostra de biodiesel ou dividindo esse volume em diferentes alíquotas, haveria alteração na eficiência de extração. Portanto verificou-se qual o volume máximo que a câmara de vidro comportaria de amostra de biodiesel a partir da altura do canal de aspiração do resíduo da fase orgânica sem que transbordasse amostra quando houvesse agitação da mistura no interior da câmara. Esse volume foi de 540 μL . Portanto foi realizado o procedimento empregando uma alíquota de 540 μL e posteriormente extrações com esse mesmo volume final de amostra dividido em 2, 4 e 8 vezes. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1. É possível perceber que se o volume de amostra de biodiesel for dividido em alíquotas menores, ocorre um aumento na eficiência da extração. Entretanto, para número de alíquotas de biodiesel igual a 8, o aumento do sinal analítico já não é significativo.

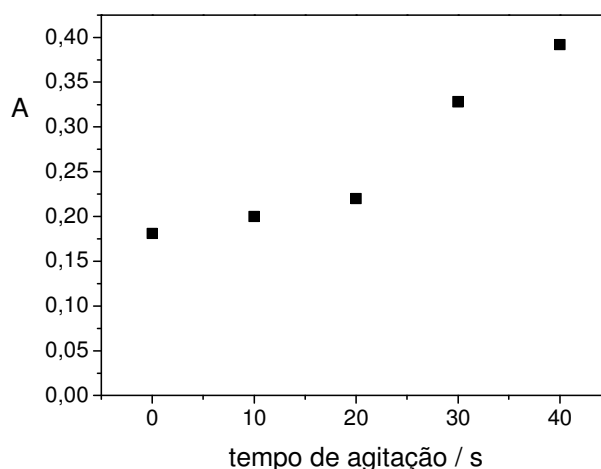
Tabela 4.1. Efeito do número de divisões da alíquota final da amostra versus volume de amostra por extração sobre o sinal analítico para o sistema de extração líquido-líquido de etanol em biodiesel.

Número de alíquotas de biodiesel	Volume de biodiesel / μL	Sinal analítico
1	540	0,261
2	270	0,402
4	135	0,514
8	67,5	0,531

Visando melhorar as condições da extração líquido-líquido proposta, foi avaliado o tempo de acionamento do motor de corrente contínua, que tinha uma haste acoplada de teflon promovendo a agitação da amostra de biodiesel com a água. Para tempos de agitação até 20 s, não foi observada diferença significativa na

variação dos sinais analíticos (Figura 4.4). A diferença de sinais só foi perceptível após 30 s de agitação. Tempos de agitação superiores a 40 s formavam uma emulsão com difícil separação de fases e, portanto, esse foi tomado como tempo máximo de agitação.

Figura 4.4. Efeito do tempo de agitação sobre o sinal analítico para o sistema de extração de etanol em biodiesel.



Foi avaliada a possibilidade de empregar como meio extrator uma solução salina de NaCl 5% (m/v), mas não foi verificado aumento dos sinais analíticos. Dessa forma, não se justificou a substituição de água desionizada por solução de cloreto de sódio para a realização da extração.

Após a investigação acerca das condições das extrações, foram avaliadas formas de detecção mais adequadas para os analitos em questão. Inicialmente, durante o desenvolvimento da extração, foi empregada a reação entre o etanol e dicromato em meio ácido. Foi observado que antes de alcançar 60 °C havia a formação de bolhas, as quais não eram retiradas por um sistema removedor de bolhas. Portanto, como alternativa, se construiu uma cela de detecção com abertura superior. Essa cela foi construída em vidro e acoplada a um fotômetro, ambos

construídos pelo Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis no laboratório do CENA-USP. Dessa forma, visava-se promover a remoção das bolhas formadas durante o aquecimento por meio da dispersão e eliminação desta pela parte superior da cela. O diagrama empregado com essa finalidade está apresentado na Figura 3.2 (Experimental). Apesar do bom desempenho do fotômetro desenvolvido para a leitura das soluções de referência posicionando a cela de detecção na posição vertical, ainda houve problemas na leitura do sinal analítico do extrato gerando em alguns momentos sinal negativo. Essa ocorrência pode ter sido provocada pelo filme formado na interface entre as duas fases: orgânica e aquosa ou pelo longo tempo para remoção das bolhas formadas no meio. Portanto, descartou-se a estratégia de empregar esse fotômetro no acoplamento, e optou-se por empregar um espectrofotômetro com o feixe na horizontal. Se houvesse algum filme orgânico superior a fase aquosa, não haveria interferência na medida do sinal analítico já que a alíquota direcionada para detecção deveria ser otimizada para conter apenas do extrato aquoso.

Com o módulo de extração proposto, foi possível explorar a configuração e as variáveis a partir da aplicação e concentração do analito. Nesse sentido, é possível, por exemplo, adequar o número de vezes que a alíquota da amostra é inserida no sistema com a faixa de concentração do analito.

4.2 – Determinação espectrofotométrica de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS)

4.2.1 – Determinação de metanol em amostras de biodiesel

4.2.1.1 – Procedimento em batelada

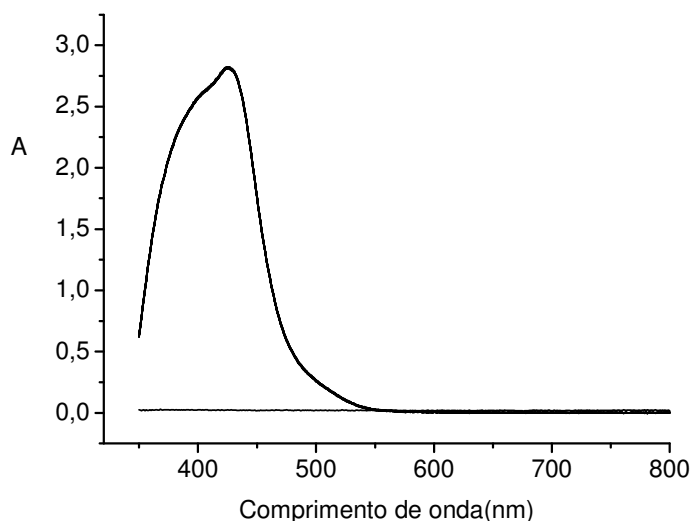
No Brasil, o álcool empregado na reação de transesterificação para produção de biodiesel, normalmente, é o metanol. Além disso, o principal coproduto desse processo é o glicerol. Diante desse cenário, o analito foi substituído por metanol e glicerol. Ao substituir os estudos do analito etanol por metanol e glicerol, foi explorada a reação direta do metanol com 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) e posteriormente do mesmo reagente com o glicerol em meio alcalino. Inicialmente, foram realizados testes de bancada, já que pouco havia na literatura sobre a reação em estudo.

Além da determinação de metanol com detecção espectrofotométrica em meio aquoso (Li e Zhang, 2008a), foram verificados trabalhos explorando reações catalíticas, principalmente envolvendo grupos aminos, uma vez que NQS é um reagente geralmente empregado para grupos aminos primários e secundários. Normalmente, essas reações ocorrem em meio básico em temperaturas na faixa de 50 a 80 °C (Hernández-Cassou e Saurina, 2011) e todas as aplicações encontradas foram realizadas em meio básico. Foi reportado procedimento para determinação espectrométrica de tiopronina em fármacos explorando seu poder catalisador na reação entre o NQS e o íon hidroxila (Li e Gao, 2009). Outro trabalho com atuação de catalisador foi registrado para determinação de aminofilina em amostras farmacêuticas em que o metanol que atuou como catalisador (Li e Zhang, 2008b). No mesmo sentido, foi possível a determinação espectrofotométrica de boro em

amostras de fármacos a partir do complexo formado por lisina, NQS e boro (Ma et al., 2011). Outras poucas aplicações foram reportadas como emprego do reagente em resina para redução de azocompostos (Cervantes et al., 2010) e para determinação espectrofotométrica de ciclamato em adoçantes empregando sistema FIA (Cabero e Saurina, 1999).

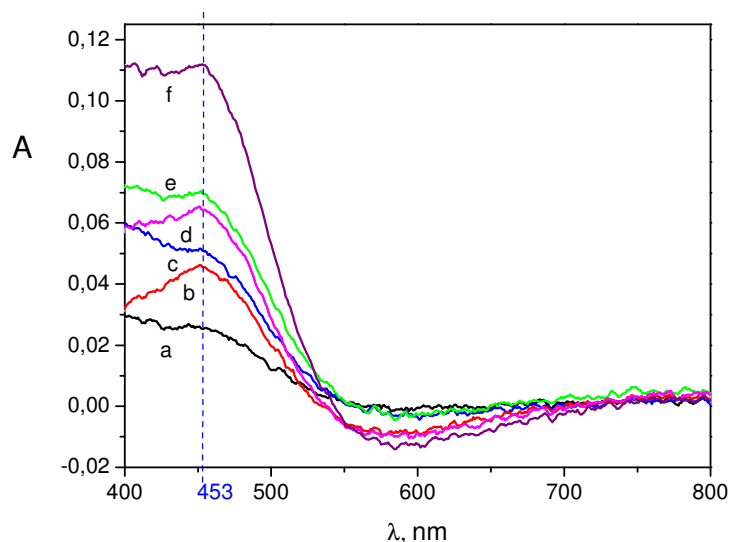
Uma vez que o reagente seria empregado durante todo um dia de análise, foi feita a avaliação da estabilidade da solução do reagente NQS ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) após o seu preparo. Metade da solução preparada foi mantida ao abrigo da luz em recipiente envolto em papel alumínio e o restante foi mantido em recipiente exposto a luminosidade do laboratório. O espectro foi acompanhado por 90 min (Figura 4.5) e não foi observada mudança no comportamento do espectro, bem como alterações na intensidade do sinal analítico na região de comprimento de onda registrada. Tempos de exposições superiores a 90 min não foram investigados.

Figura 4.5. Espectros na região entre 350 e 800 nm do reagente NQS $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso durante 90 min sem e com exposição a luz ambiente.



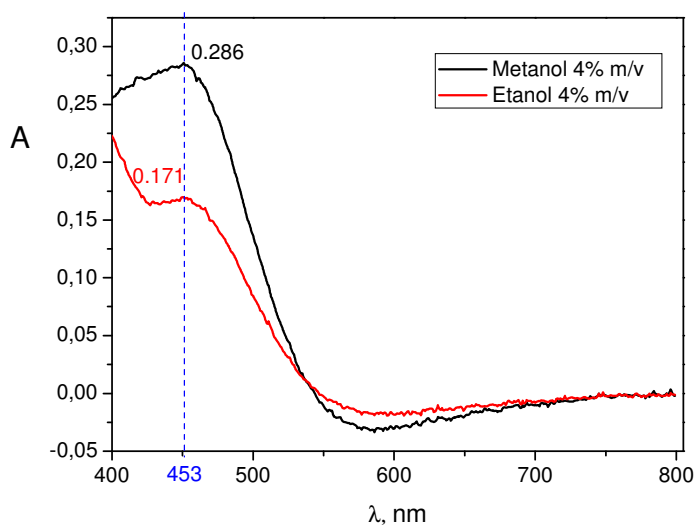
A fim de investigar a ocorrência da reação do NQS com metanol, fez-se uma varredura do sinal analítico do produto da reação entre o metanol presente nas soluções e o reagente NQS no intervalo entre 400 a 800 nm (4-metoxi-1,2-naftoquinona). Esse estudo foi necessário, uma vez que esse reagente foi poucas vezes utilizado para fins analíticos, como já mencionado. Foi observado que os sinais analíticos máximos do produto de reação entre metanol e NQS ocorrem em 453 nm. Os espectros do produto de reação entre o reagente NQS e soluções de referência de metanol em diferentes concentrações estão apresentados na Figura 4.6. Pôde-se observar que houve aumento do sinal analítico no comprimento de onda de máxima absorção do produto (453 nm) com o aumento da concentração de metanol. Esses estudos contribuíram para que fosse considerada possível a exploração dessa reação para determinação de metanol em amostras de biodiesel. Dessa forma, pretendia-se determinar o metanol empregando NQS como reagente derivatizante, embora não tivesse tido o controle do tempo para registro dos espectros.

Figura 4.6. Espectros na região do visível do produto da reação entre soluções de referência de metanol em diferentes concentrações (% v/v) com o reagente NQS. (a) 0,1; (b) 0,2; (c) 0,4; (d) 0,6; (e) 0,8; (f) 1,0. Condições: Concentração de NQS $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, reação promovida em pH 13. Espectros realizados contra um branco analítico do reagente.



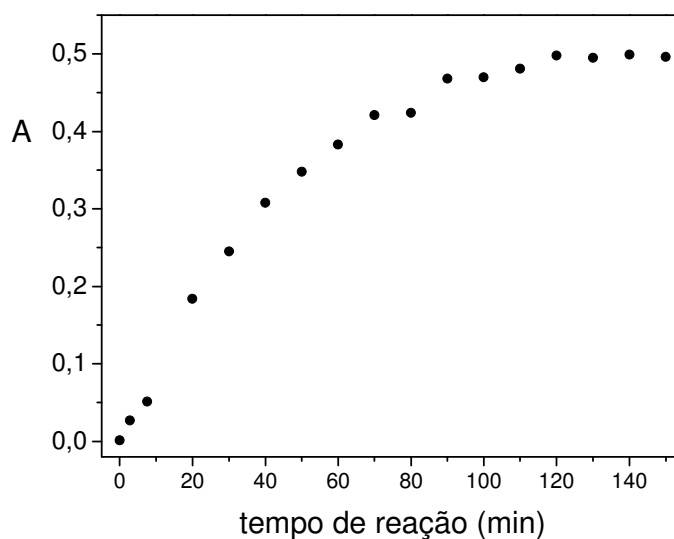
Para verificar se a reação também responderia a etanol, foi realizada uma comparação entre o valor do sinal para solução contendo metanol 4,0% e etanol 4,0%, respectivamente e foi possível verificar que o sinal do produto da reação com etanol foi aproximadamente a metade do sinal do produto da reação com metanol. Esses dados podem ser observados nos espectros apresentados na Figura 4.7. Ainda assim, o método poderia possuir alguma validade para detecção de etanol se fossem investigados maiores tempos de reação.

Figura 4.7. Comparação dos espectros entre 400 e 800 nm correspondentes aos produtos da reação do NQS com soluções de referência de metanol (preto) e etanol (vermelho) 4% v/v.



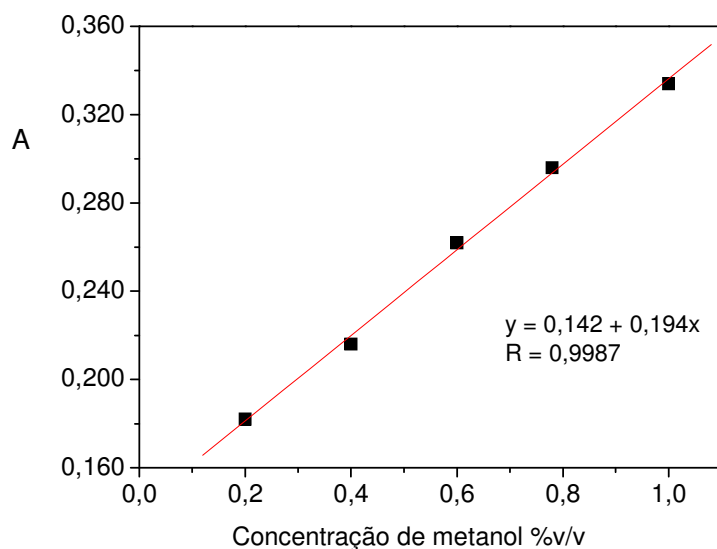
Relato anterior indicou que a reação entre metanol e NQS tem cinética lenta, já que o sinal do produto obtido por espectrofotometria foi medido após 55 min de reação (Li e Zhang, 2008a). Ainda em testes em batelada, foi investigada o progresso da formação do produto da reação em estudo. Os resultados referentes a evolução do sinal do produto da reação ao longo do tempo estão apresentados na Figura 4.8. Foi possível observar que houve crescimento significativo do sinal com o tempo de reação. Não houve variação sensível do sinal analítico para tempos de reação superiores a 100 min, indicando que esse é o período necessário para que a reação em estudo atinja o estado de equilíbrio.

Figura 4.8. Avaliação da absorvância em função do tempo de reação entre metanol e NQS em meio alcalino a partir de medidas espectrofotométricas em 453 nm.



De posse desses resultados, foram construídas curvas para soluções de referência de metanol e as medidas foram registradas após 55 min de reação. Como se tratava de estudos prévios, já que não se manteria o sistema em batelada, não foram realizadas triplicatas. Mesmo assim, foi possível observar a linearidade nos sinais correspondentes a concentrações distintas para soluções de referência de metanol (Figura 4.9). Sinais referentes a soluções em faixa de concentração da ordem de 10 vezes menores (0,01 - 0,1 % v/v) não apresentaram mesmo comportamento. Os dados obtidos indicaram a potencialidade da reação para determinação de metanol, inclusive com melhoria da faixa de trabalho e linearidade através de um controle maior no tempo entre as medidas, uma vez que a reação não é imediata.

Figura 4.9. Curva analítica construída a partir de experimentos em batelada para determinação de metanol com NQS em meio alcalino, tempo de equilíbrio = 55 min. Condições experimentais: concentração de NQS = $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 13, ($\lambda=453 \text{ nm}$).



4.2.1.2 – Procedimento em análise por injeção em fluxo (FIA)

A reprodutibilidade no tempo de medida pode ser obtida com a mecanização do processo de manipulação das soluções, mistura com reagente e medida do sinal analítico. Essa mecanização pode ser alcançada com o emprego de sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA). Essa estratégia de manipulação de solução também pode aumentar a frequência de determinação, uma vez que não necessita esperar o equilíbrio para medida do sinal do produto da reação.

Testes foram realizados para otimizar a configuração do sistema onde se promovia a reação do analito em meio aquoso com o reagente NQS. Para essa estratégia, foi empregado um sistema de análise por injeção em fluxo convencional com um injetor comutador (Reis e Bergamin Filho, 1993) como foi apresentado em 3.4.2.1 na Figura 3.2.

Tentando reproduzir no sistema em fluxo o mesmo processo de reação promovido em batelada, nos primeiros experimentos, a amostra e o reagente foram inseridos no sistema sem alças de amostragem, empregando a mesma concentração de NQS empregada em batelada ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Os sinais de absorvância do produto formado entre NQS e metanol foram muito altos, e, indicaram a necessidade de um controle melhor do processo. Isso porque o sinal referente à solução do reagente extrapolava a escala do equipamento.

Ainda na tentativa de redução do sinal referente ao reagente, tanto o reagente quanto a amostra foram inseridos em alças de amostragens com volumes fixos iniciais de 250 e 350 μL , respectivamente. A vazão ainda não estava otimizada e eram necessárias otimizações para promover aumento de sinal com aumento da concentração das soluções de referência de metanol. O volume de amostra foi escolhido inicialmente maior do que o volume do reagente porque o reagente apresentava concentração alta em relação à concentração de metanol nas soluções de referência. Quando foi realizada a tentativa de utilizar a solução do reagente NQS como solução carregadora, o sinal do equipamento atingia seu limite, inviabilizando as medidas, portanto, essa condição foi desconsiderada.

Os primeiros sinais que diferenciavam soluções de metanol em diferentes concentrações ocorreram para concentrações de reagentes cinco vezes menores que a concentração originalmente empregada em batelada. A concentração do reagente foi, portanto, reduzida de $5,0 \times 10^{-3}$ para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Essas observações foram alcançadas empregando alças de amostragens semelhantes para amostra e reagentes (300 μL cada), não houve interrupção de fluxo na bobina de reação que era de 100 cm e a vazão da solução transportadora foi controlada em $1,60 \text{ mL min}^{-1}$. Os sinais analíticos referentes aos experimentos realizados com e

sem parada de fluxo estão expressos na Tabela 4.2. Pode-se perceber que os sinais sem o emprego de parada de fluxo não são resultados conclusivos para garantir que houve aumento de sinal analítico com o aumento de concentração do analito nas soluções de referência. Essa observação já era esperada, uma vez que o tempo para atingir o equilíbrio da reação em batelada foi de 100 min. Experimentos foram conduzidos com o mesmo sistema, mantendo a zona composta pela mistura de amostra e reagente, antes da detecção, em repouso por 5 min. Os sinais medidos após essa parada de fluxo também estão apresentados na Tabela 4.2. Apesar de tratar de poucas concentrações e de não ter a construção de uma curva analítica, são resultados suficientes para concluir que há uma tendência crescente no sinal analítico com o aumento da concentração da solução de referência em metanol quando há interrupção do fluxo. Esses resultados eram indicativos de que o procedimento poderia sofrer melhorias e funcionar para o projeto almejado.

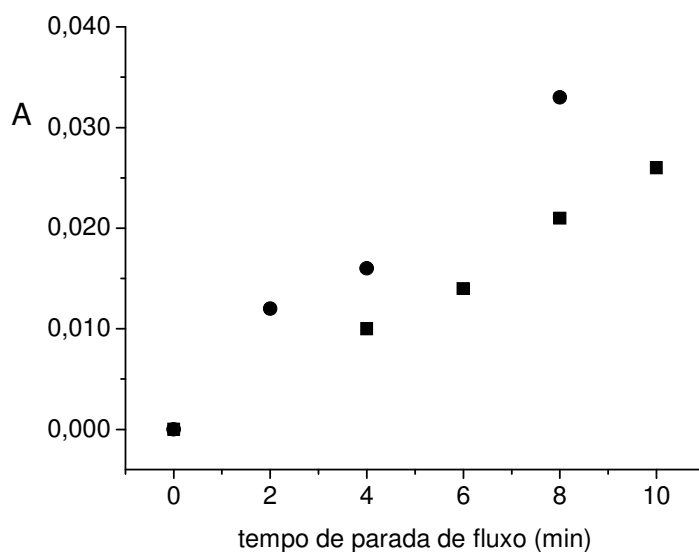
Tabela 4.2. Sinais analíticos registrados para soluções de referências de metanol sem e com emprego de interrupção de fluxo de 5 min. Condições: 300 μL de solução de metanol, concentração do reagente NQS= $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, bobina de reação de 100 cm e \varnothing transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).

Concentração da solução de referência em pH 13	Sinal analítico (Abs)	Sinal analítico (Abs)
	Sem interrupção de fluxo	Interrupção de fluxo 5 min
Branco	0,080 \pm 0,001	0,110 \pm 0,004
0,5%	0,081 \pm 0,002	0,133 \pm 0,002
1,0%	0,092 \pm 0,002	0,153 \pm 0,004
2,0%	0,093 \pm 0,002	0,184 \pm 0,004

O emprego de parada de fluxo sobre o sinal analítico do produto entre metanol e NQS foi investigado, já que, no estudo realizado em batelada, foi observado que o produto de reação atinge o equilíbrio em aproximadamente 100 min. O efeito do tempo de parada de fluxo foi avaliado em até 10 min. Os resultados

dessa avaliação estão ilustrados na Figura 4.10. Esse tempo de 10 min está acima de qualquer tempo estimado em sistemas FIA, já que entre os objetivos desses sistemas, está a obtenção de altas frequências de análise. Mesmo assim, o estudo foi mantido, já que se empregasse o módulo de preparo de amostra em linha proposto e houvesse necessidade de pré-concentração, o tempo em que uma amostra estaria passando pela etapa de preparo, outra amostra estaria sendo analisada.

Figura 4.10. Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol. Condições: 300 μL de solução de metanol 0,5 (■) e 1,0% (●) v/v em pH 13, concentração do reagente NQS= $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, bobina de reação de 100 cm, ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).



Foi observado aumento do sinal analítico com o aumento do tempo de parada de fluxo tanto para solução de referência 0,5 quanto 1,0% (v/v) em metanol. Também foi observado comportamento crescente dos sinais e tendência linear com o aumento do tempo de interrupção de fluxo (Figura 4.10). Os sinais registrados

eram baixos e ainda não eram suficientes para diferir pequenas variações de concentrações de metanol, e, portanto realizar a determinação de metanol no extrato aquoso após o preparo da amostra de biodiesel. Outros parâmetros que poderiam contribuir para o aumento do sinal analítico desse produto de reação foram investigados.

Uma vez que a cinética da reação é lenta, foi feita a avaliação do efeito do aquecimento da bobina reacional. Mesmo o metanol sendo volátil, não havia problemas de perdas já que o aquecimento foi promovido em sistema fechado (no interior da tubulação de fluxo). Apesar de não ocorrer perdas, foi verificada a ocorrência de bolhas quando a temperatura era alta (acima de 55°C) tanto empregando aquecimento condutivo quanto submetido a radiação em forno de micro-ondas doméstico. A ocorrência de excesso de bolhas inviabilizou as medidas de absorvância na cubeta de fluxo. Portanto, a temperatura da água do aquecimento condutivo foi controlada para permanecer entre 50 e 53°C e a potência empregada em forno de micro-ondas foi média. Nessas condições, um removedor de bolhas atuava eficientemente na remoção das microbolhas geradas no aquecimento.

Os resultados do estudo empregando os dois tipos de aquecimento estão apresentados nas Tabelas 4.3. Foi possível perceber que independente da fonte de aquecimento empregada, houve discreto aumento do sinal analítico com o aumento da temperatura e com o aumento da concentração de metanol. Empregando o aquecimento via micro-ondas, esse aumento de sinal com o aumento da temperatura também ocorreu para o branco analítico e o desvio padrão aumentou com o aumento da concentração da solução de metanol. Diante desses resultados, é possível concluir que o aquecimento não foi uma estratégia vantajosa para o aumento do sinal analítico do método em investigação.

Tabela 4.3. Efeito do aquecimento da bobina de reação em aquecimento condutivo (temperatura = 53 °C) e em micro-ondas sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol. Condições: 300 µL de solução de metanol, concentração do reagente NQS= $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, bobina de reação de 100 cm e \varnothing transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).

Concentração da solução de referência em pH 13	Sinal analítico (Abs)	Sinal analítico (Abs)
	Aquecimento condutivo (53 °C)	Aquecimento micro-ondas
Branco	0,066 ± 0,002	0,194 ± 0,003
0,5%	0,075 ± 0,002	0,206 ± 0,004
1,0%	0,0795 ± 0,0007	0,221 ± 0,009
2,0%	0,0870 ± 0,0001	0,23 ± 0,02

Outros parâmetros que poderiam contribuir para a sensibilidade do método foram investigados como o efeito da concentração do reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (Figura 4.11) e o do comprimento da bobina de reação (Figura 4.12) sobre o sinal analítico. A bobina da reação corresponde a bobina após o ponto de confluência entre o reagente e a amostra. Nessa bobina, há a mistura entre o reagente e a amostra e essa zona composta por essa mistura é transportada pela solução transportadora/carregadora.

Figura 4.11. Efeito da concentração do reagente NQS sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol. Condições: 300 μL de solução de metanol 0,5% v/v, tempo de parada de fluxo de 10 min, bobina de reação de 100 cm e ϕ transportador = 1,60 mL min^{-1} (n=1).

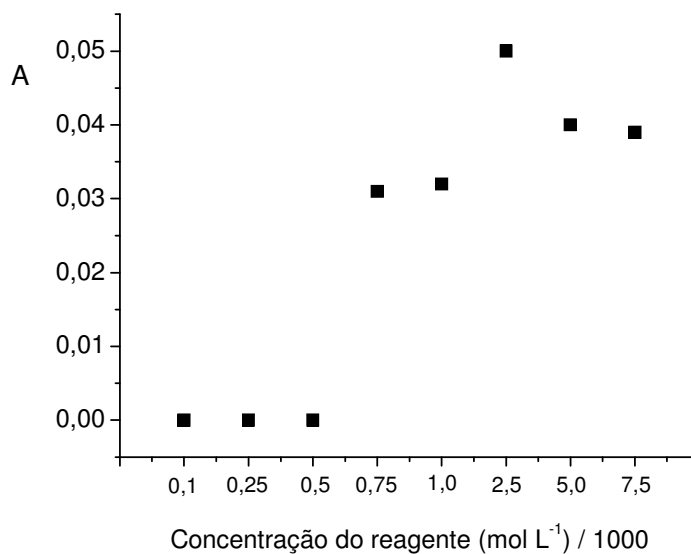
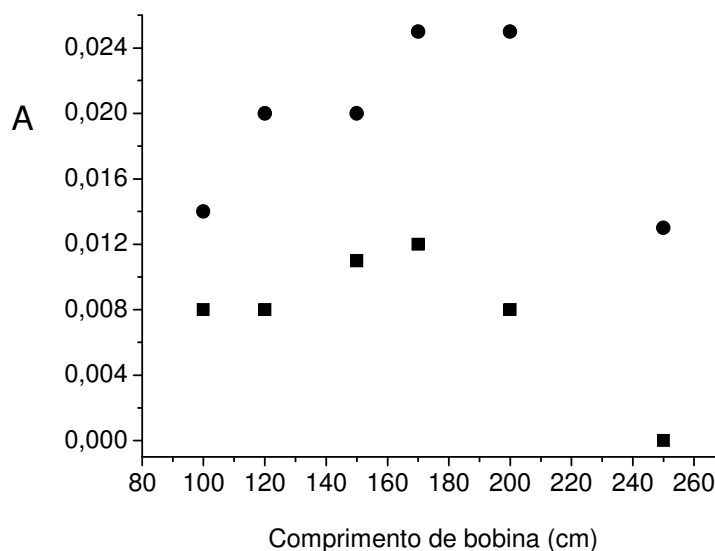


Figura 4.12. Efeito do comprimento da bobina de reação sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol. Condições: 300 μL de solução de metanol 0,5% (■) e 1,0% (●), concentração do reagente NQS = $2,5 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e ϕ transportador = 1,60 mL min^{-1} (n=1).



Os resultados referentes ao estudo do comprimento de bobina apresentaram padrão de comportamento esperado, uma vez que em menores comprimentos de bobina ainda não ocorria um alcance do sinal máximo, ou seja, ainda não tinha sucedido a reação ou mistura máxima entre reagente e amostra. Foi observado um aumento pronunciado no sinal analítico no intervalo de comprimento de bobina de 100 a 175 cm (Figura 4.13). O decaimento do sinal analítico a partir do comprimento de bobina de 175 cm foi relacionado com a dispersão da mistura na solução transportadora.

O mesmo comportamento é observado na curva que apresenta a otimização da concentração do reagente. Após a ocorrência do sinal máximo referente ao produto da reação entre o NQS em uma concentração ótima e a solução de metanol, houve o decréscimo do sinal devido a dispersão dessa zona composta (Figura 4.12).

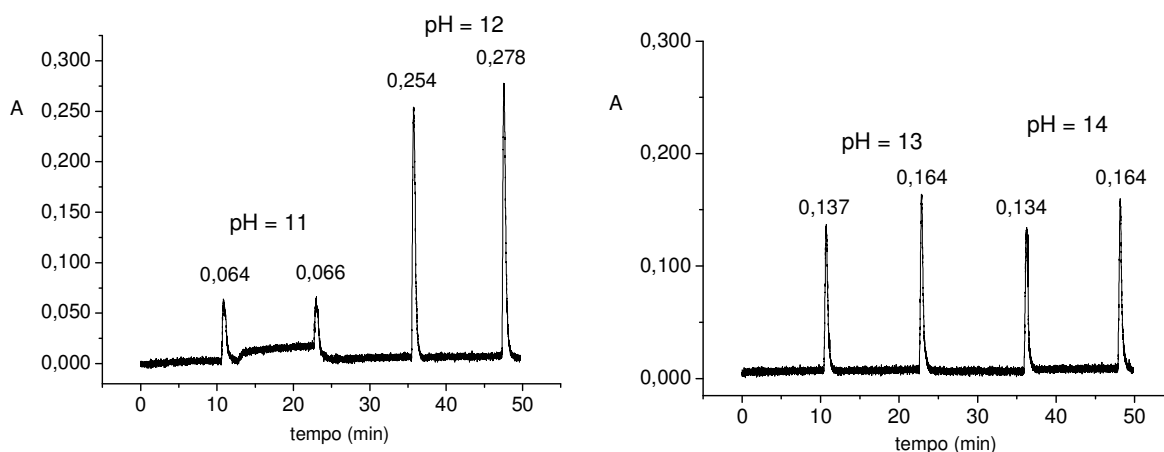
As condições otimizadas empregadas, em que houve maiores sinais líquidos, foram estabelecidas em comprimento de bobina de reação de 175 cm, concentração do reagente em $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e tempo de parada de fluxo de 10 min.

Otimizados esses parâmetros, foi feito o estudo do efeito da acidez sobre o sinal analítico. A investigação foi feita em condições de pH de 0 a 14. Foram realizadas as medidas dos sinais analíticos dos produtos de reação entre a solução de metanol 1,0% e o reagente NQS nas condições otimizadas citadas. Os sinais registrados na Tabela 4.4 são os sinais líquidos entre o sinal analítico do produto de reação e o branco analítico. Os diagramas referentes aos melhores valores de sinais líquidos estão na região de $\text{pH} \geq 12$, como pode ser observado na Tabela 4.4 e Figura 4.13. Entretanto, algumas vezes, houve dificuldades de mistura em pH 14 devido a diferença de viscosidade dos meios, provocando desvios padrão altos, inviabilizando as medidas nessa região de pH.

Tabela 4.4. Efeito da acidez do meio sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol. Condições: 300 μL de solução de metanol 1,0% v/v, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ ($n=3$).

pH da solução	Sinal do branco (Abs)	Sinal da solução de metanol (Abs)	Sinal líquido (Abs)
0	0,5786	0,5896	0,0110
1	0,5005	0,5198	0,0194
2	0,4962	0,4984	0,0022
3	0,5003	0,5004	0,0001
4	0,5090	0,4801	-0,0288
5	0,5106	0,4966	-0,0141
6	0,5190	0,5324	0,0134
7	0,6228	0,6304	0,0076
8	0,4495	0,4501	0,0006
9	0,3663	0,3665	0,0002
10	0,0674	0,0740	0,0066
11	0,0638	0,0660	0,0022
12	0,2538	0,2779	0,0241
13	0,1371	0,1640	0,0269
14	0,1344	0,1640	0,0296

Figura 4.13. Fiagrama do registro da região alcalina da avaliação do efeito da acidez do meio sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de metanol. Condições: 300 μL de solução de metanol 1,0% v/v, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ ($n=3$), 1º pico= branco e 2º pico=produto de reação para cada condição de pH.

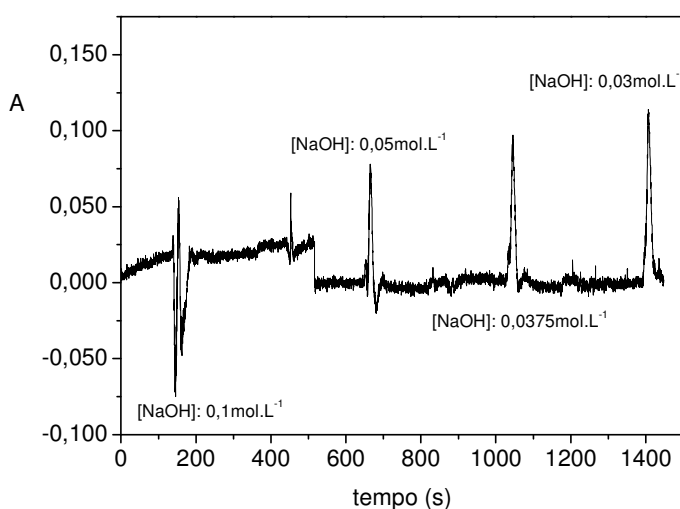


Visando a manutenção do meio em $\text{pH} \geq 12$ e mistura efetiva da solução de referência com reagente e carregador (solução aquosa de NaOH) sem que

ocorresse problemas com diferenças de viscosidade do carregador, foi feita uma avaliação de quanto era possível diluir o carregador sem que comprometesse o sinal analítico. Dessa forma, o pH seria mantido e promoveria a melhor mistura das soluções no interior da tubulação de fluxo. O diagrama com os registros dos sinais após o emprego de soluções transportadoras de NaOH em diferentes concentrações está apresentado na Figura 4.14. Para essa análise, não foram observados apenas os sinais máximos, mas também foram observados os perfis dos sinais transientes registrados.

Em concentrações mais altas de NaOH, não houve mistura eficiente devido a alta viscosidade da solução transportadora para formação da zona composta. Essa ausência de mistura pode ser observada no diagrama no sinal registrado correspondente a concentração de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. É possível perceber que esse pico não é formado por um sinal transiente bem definido, bem como os sinais transientes registrados em concentrações de NaOH inferiores a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Após várias diluições foi obtido uma concentração ótima em de NaOH de $0,03 \text{ mol L}^{-1}$.

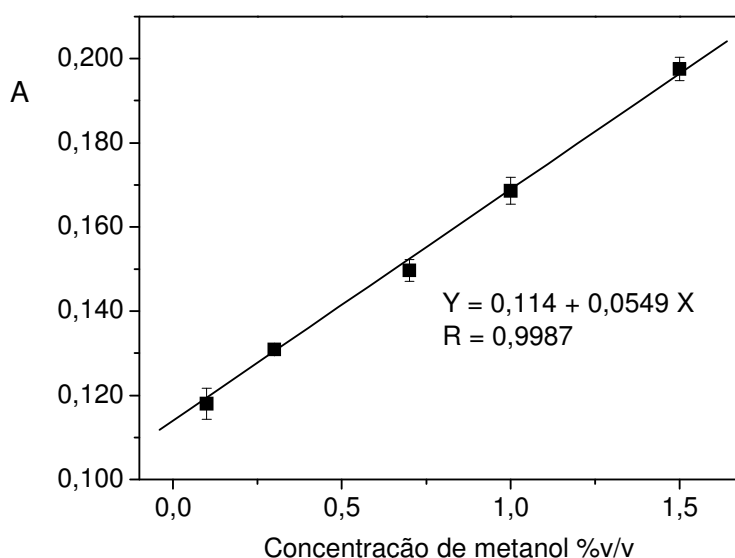
Figura 4.14. Avaliação do sinal analítico e do perfil do pico com a concentração do carregador NaOH.



O potencial do método foi investigado a partir da construção de curvas analíticas realizando comparações da sensibilidade a partir do coeficiente angular da curva. Registros de sinais de uma curva nas condições otimizadas estão apresentados na Figura 4.15. Apesar de comportamento linear em uma boa região de concentração (Figura 4.15), visando melhorar as figuras de mérito, ainda era necessário reduzir a faixa de trabalho, uma vez que a concentração de metanol residual no biodiesel estabelecido pela ANP é de no máximo 0,20% (m/m) (ANP, resolução nº14/2012). Vale a pena ressaltar que os resultados expressos nas tabelas e gráficos estão em unidades de concentração em percentual em termos de volume (% v/v), enquanto que o regulamentado pela ANP está expresso em percentual em massa. A unidade foi escolhida pela maior facilidade de execução das atividades e a redução de propagação de erros, entretanto, na etapa de validação, a correção para a unidade em % m/m foi realizada.

A fim de reduzir a faixa de trabalho do método proposto e otimizar condições de medida do sinal analítico, foram realizadas investigações de efeitos de parâmetros físicos como alteração de espectrofotômetro, aplicação de fibra ótica, ajuste de variáveis para aquisição de dados como tempo de integração do sinal e média de sinais. Não foram observados ganhos significativos na qualidade do sinal analítico, indicando que a baixa sensibilidade é decorrente do sistema químico em estudo.

Figura 4.15. Curva analítica referente aos sinais apresentados na Tabela 4.7, método para determinação de metanol empregando NQS. Condições: 300 μL de solução de referência metanol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ ($n= 3$).



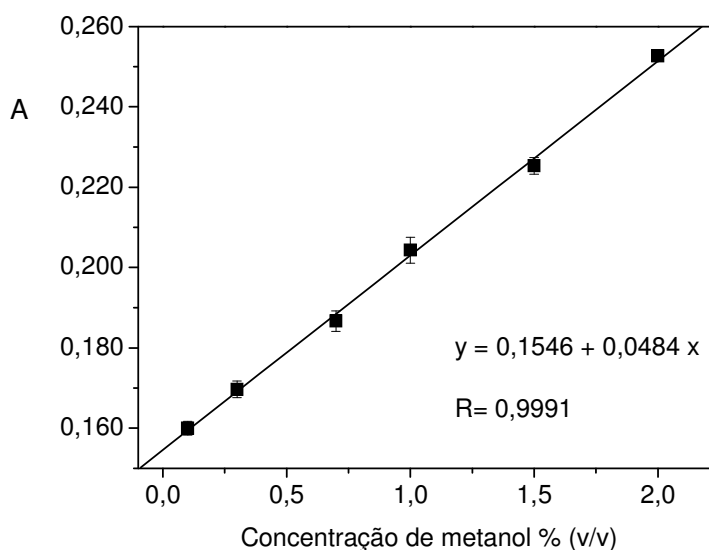
Mesmo antes de estabelecer figuras de mérito, nas condições otimizadas até o momento, foram analisadas amostras com e sem adição externa de metanol e os sinais analíticos correspondentes estão apresentados na Tabela 4.5. A curva com a equação da reta ajustada está apresentada na Figura 4.16. Tanto os resultados correspondentes às amostras com adição de analito (A6 e A7), quanto às amostras sem adição de analito (A1 a A5) apresentaram sinais superiores aos sinais solução de referência contendo 1,5% (v/v) de metanol. Se esses sinais fossem referentes apenas a metanol, os resultados indicariam que o teor de metanol presente nas amostras de biodiesel analisadas seriam superiores a 1,5%. Outras amostras foram analisadas empregando outras faixas de trabalho e o mesmo comportamento foi observado. Portanto, esses valores não estavam dentro de qualquer estimativa. Isso pode ter ocorrido devido a presença de demais compostos presentes no biodiesel que apresentam características próximas ao metanol e podem ter sido direcionados para a fase aquosa na etapa de extração e ainda reagiram com o reagente NQS

como as espécies de glicerol que apresentam essas características: monoglicerídeo, diglicerídeo e glicerol livre.

Tabela 4.5. Sinais analíticos registrados para curva analítica e amostra sem e com adição de metanol. Condições: 300 μL de solução de referência metanol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ ($n= 3$).

Concentração % (v/v)	Abs	Abs	Abs	media	Desvio padrão
Branco	0,154	0,154	0,159	0,156	0,003
0,1	0,159	0,159	0,162	0,160	0,002
0,3	0,172	0,168	0,169	0,170	0,002
0,7	0,189	0,187	0,184	0,187	0,003
1,0	0,203	0,202	0,208	0,204	0,003
1,5	0,223	0,226	0,227	0,225	0,002
2,0	0,253	0,252	0,253	0,253	5×10^{-4}
3,5	0,285	0,279	0,270	0,278	0,008
6,0	0,316	0,306	0,312	0,311	0,005
A1	0,226			0,226	
A2	0,231			0,231	
A3	0,237			0,237	
A4	0,404			0,404	
A5	0,225			0,225	
A6	0,346			0,346	
A7	0,438			0,438	

Figura 4.16. Curva analítica referente ao método para determinação de metanol empregando NQS aplicada na análise das amostras A1 a A7. Condições: 300 μL de solução de referência metanol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ ($n= 3$).



Diante da evidência apresentada de que outras espécies poderiam estar respondendo à reação em estudo, foi investigado o efeito do glicerol como potencial interferente. Foram adicionadas alíquotas de glicerol às soluções de metanol para concentrações finais de glicerol crescente na faixa de 0,07 a 0,30 % (v/v). Dessa forma, foi possível observar que o aumento da concentração de glicerol livre provocou aumento no sinal analítico medido. Os sinais estão registrados na Tabela 4.6. Entretanto, foram necessárias mais investigações a cerca dessa espécie junto ao reagente empregado para as análises.

Tabela 4.6. Sinais analíticos registrados para estudo do efeito do glicerol como possível interferente no sistema para determinação de metanol empregando NQS. Condições: 300 μL de solução de referência metanol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e \varnothing transportador = 1,60 mL min^{-1} (n=3).

Soluções de referência	Concentração de metanol % (v/v)	Concentração de glicerol % (v/v)	Média Abs
1	0,5	-	0,199 \pm 0,002
2	0,5	0,07	0,214 \pm 0,004
3	0,5	0,10	0,22 \pm 0,02
4	0,5	0,20	0,247 \pm 0,002
5	0,5	0,30	0,257 \pm 0,002
6	1,0	-	0,254 \pm 0,006
7	1,0	0,07	0,272 \pm 0,003
8	1,0	0,10	0,279 \pm 0,009
9	1,0	0,20	0,332 \pm 0,005
10	1,0	0,30	0,367 \pm 0,003

Confirmada a interferência do glicerol na reação entre o NQS e o metanol, foi explorada uma tentativa de eliminação desse interferente no sistema para determinação de metanol. Nenhuma tentativa de eliminação de interferência foi realizada na etapa de extração já que que as características do metanol e do glicerol são próximas para extração líquido-líquido. Possivelmente, os solventes

empregados para extração de uma dessas espécies fariam a extração de ambas ou pelo menos de parte. Portanto, a estratégia explorada partiu da adição de borato de sódio às soluções de referência na etapa de determinação. Isso porque o ácido bórico e o borato de sódio são utilizados em reações com hidroxilas vicinais formando ésteres em meio aquoso em vários campos da ciência e tecnologia, e em alguns casos, para promover a seletividade, que é o caso proposto (Berg et al., 1994). Diversos estudos foram realizados acerca desse mascarante e os melhores resultados estão expressos na Tabela 4.7. Foi possível verificar que a adição de borato em concentrações inferiores a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ não promoveu o efeito mascarante. A partir de concentrações superiores a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de borato, pôde-se observar redução do sinal analítico referente a mistura composta pelas soluções de metanol, glicerol e borato. Ao adicionar borato para concentração final $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à mistura de metanol e glicerol, foi observado que o sinal analítico se aproximou ao sinal analítico da solução de metanol sem glicerol, dando indicativos de que o glicerol podia estar sendo mascarado pelo borato, assim como esperado. Concentrações de borato de sódio acima de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ não foram avaliadas, já que acima dessa concentração, havia dificuldade de solubilização do borato de sódio sólido em água.

A investigação do efeito do borato como mascarante continuou a partir da construção da curva analítica semelhante a curva anteriormente apresentada na Figura 4.17 com soluções de referências de metanol em concentração fixa de glicerol na presença de borato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). A concentração de glicerol foi escolhida como 0,25 % (v/v) uma vez que é a concentração de glicerol total próxima a concentração estabelecida pela ANP como limite para distribuição do biodiesel. Nessa avaliação, foi observada perdas de linearidade da curva proposta, destacada

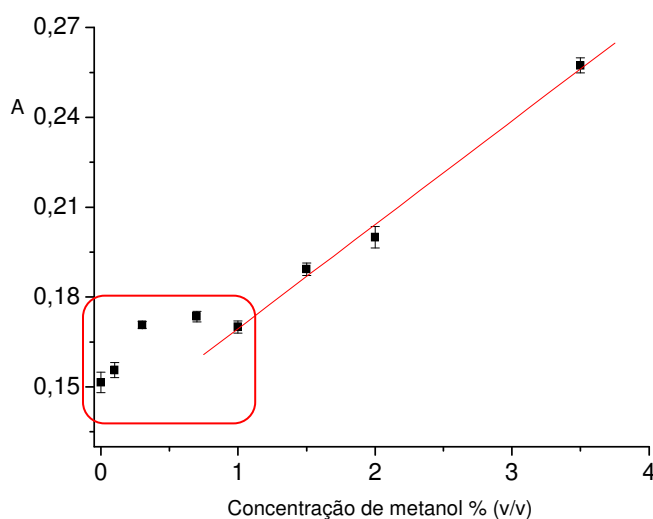
na Figura 4.17. A tendência linear da curva foi restrita a faixa de concentrações mais altas de metanol.

Tabela 4.7. Sinais analíticos registrados para estudo do efeito do glicerol como possível interferente no sistema para determinação de metanol empregando NQS. Condições: 300 μL de solução de referência metanol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (N= 3).

Concentração de íon borato (mol L^{-1})	Abs Branco	Abs Solução de metanol	Abs Mistura
0,005	0,156	0,165	0,230
0,010	0,158	0,163	0,225
0,050	0,120	0,135	0,163
0,080	0,109	0,119	0,147
0,100	0,107	0,121	0,136

Mistura: Solução de metanol e glicerol em presença de borato em diferentes concentrações.

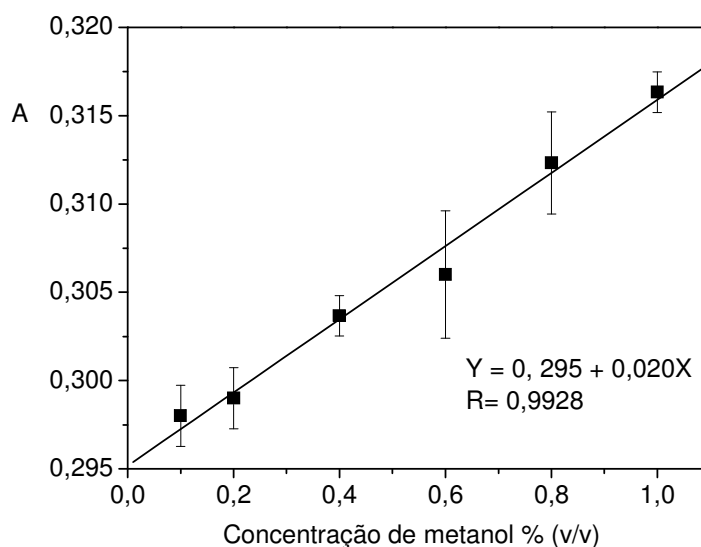
Figura 4.17. Sinais analíticos registrados para curva construída com adição de borato como possível mascarante do glicerol no sistema para determinação de metanol empregando NQS.



Apesar de ter observado a redução de sinal em mistura de metanol e glicerol contendo borato (Tabela 4.7), não foi alcançado o mascaramento quantitativo do glicerol utilizando esse reagente (borato de sódio).

Outra tentativa de mascaramento do glicerol explorando a mesma reação foi realizada a partir da substituição da solução transportadora por tampão Britton Robinson (composto por ácido bórico, ácido acético e ácido orto-fosfórico). Essa estratégia não promoveu uma curva para soluções de metanol com um resultado satisfatório (Figura 4.18). Não houve mascaramento do glicerol presente, ou seja, não houve redução do sinal analítico indicando reação do NQS somente com o analito metanol. Além disso, foram observados altos desvios padrão entre as réplicas e baixo coeficiente angular que indicaria a sensibilidade do método.

Figura 4.18. Curva analítica para solução de metanol com adição conhecida e fixa de glicerol empregando tampão Britton Robinson como solução transportadora. Condições: 300 μL de solução de referência metanol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e \varnothing transportador = 1,60 mL min^{-1} (n=3).

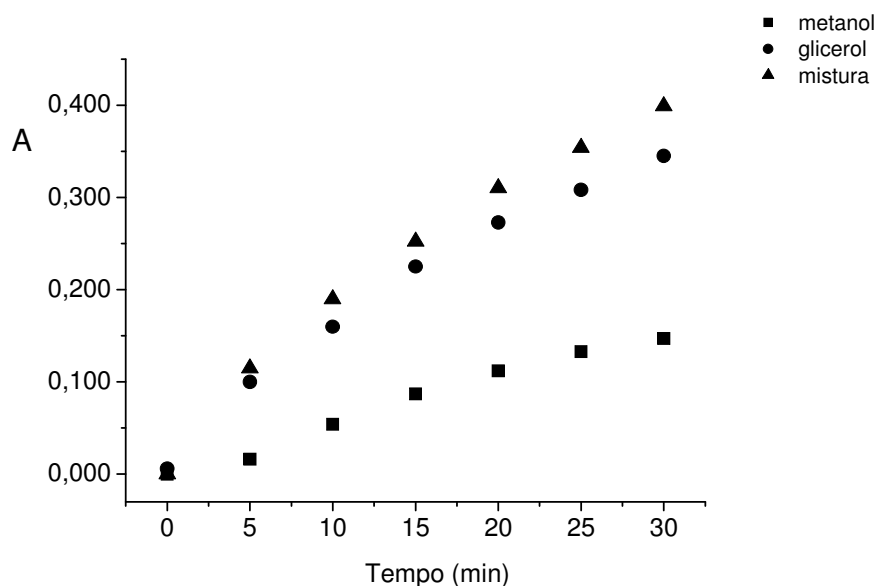


4.2.2 – Determinação simultânea de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel

Visando a determinação simultânea de metanol e glicerol em amostras de biodiesel, foi registrado o espectro do produto de reação das espécies em questão com o reagente NQS. Esses primeiros estudos foram realizados em batelada. O comprimento de onda de máxima absorção do produto da reação do NQS com o metanol e glicerol são semelhantes ($\lambda = 453 \text{ nm}$). Os sinais registrados no comprimento de onda de máxima absorção para metanol, glicerol e a mistura de ambos estão apresentados na Figura 4.19. Já foram descontados o sinal do branco analítico em todas as condições. Assim como já havia sido observada para o analito metanol, também foi constatada que a reação entre NQS e o glicerol não é imediata, já que houve aumento do sinal com o tempo de medida. Além disso, o mesmo comportamento foi observado para os registros quando foi adicionada solução de NQS à mistura (solução de metanol e glicerol) em solução aquosa. Esses sinais são indicativos de que a reação entre o glicerol e o NQS também tem cinética lenta e a vantagem da aplicação em sistema FIA citada quanto a reprodutibilidade do tempo das medidas também pode ser explorada para a determinação de glicerol empregando a reação proposta.

Os sinais para o produto entre glicerol e NQS são superiores aos sinais para o produto de reação do mesmo reagente com metanol em qualquer tempo de medida. Foi possível identificar a influência do glicerol no sistema, já que houve um aumento mais pronunciado do sinal analítico com o tempo para o sistema glicerol e NQS em relação ao sistema metanol e NQS. A mesma observação foi percebida no sistema glicerol+metanol e NQS.

Figura 4.19. Sinais registrados no comprimento de onda de máxima absorção do espectro do produto de reação em função do tempo de aquisição do sinal. Sinais para o produto de reação entre o NQS e metanol (■), glicerol (●) e mistura de ambos (▲). Condição: concentração do reagente NQS= $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 12. Concentração de metanol e de glicerol na solução: 0,25% v/v, cada.



De posse desses dados, uma nova proposta foi realizada, vislumbrando a determinação simultânea de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel utilizando o mesmo sistema FIA proposto para a determinação de metanol. Dessa forma, foi necessário um estudo envolvendo a mistura de ambos analitos para implementação desse sistema com essa finalidade.

Ao avaliar a concentração hidrogenionica do meio na reação para determinação de metanol empregando o reagente NQS, foi possível perceber que a acidez do meio foi uma variável que apresentou forte influência sobre a reação em estudo. E, em condições de pH inferiores a 12, não houve registro do produto de reação. Portanto, o efeito do pH também foi avaliado para a reação entre o glicerol e o reagente NQS sob as mesmas condições empregadas para a determinação de metanol. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.8. Foram verificados sinais

líquidos significativos em condições de pH 2 para o produto de reação entre glicerol e NQS. Nessa condição de pH, não havia formação de algum sinal transiente para o analito metanol com o NQS. Portanto, outra estratégia para a determinação de ambos os analitos seria a determinação alternada em diferentes condições de pH.

Tabela 4.8. Efeito do pH sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de glicerol. Condição: 300 μL de solução de glicerol 0,25% v/v, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de parada de fluxo de 10 min e \varnothing transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).

pH	Sinal do branco	Sinal da solução de glicerol	Sinal líquido
1	0,460	0,457	-0,003
2	0,447	0,490	0,043
3	0,313	0,323	0,010
4	0,459	0,531	0,072
5	0,532	0,400	-0,132
6	0,298	0,303	0,005
7	0,509	0,558	0,049
8	0,419	0,417	-0,002
9	Picos não definidos	Picos não definidos	---
10	Picos não definidos	Picos não definidos	---
11	Picos não definidos	Picos não definidos	---
12	0,248	0,336	0,088
13	0,093	0,104	0,011
14	0,342	0,342	0,000

Visando a determinação de metanol e glicerol na mesma condição alcalina (pH = 12), foram construídas curvas analíticas empregando diferentes tempos de interrupção de fluxo (Figuras 4.20 e 4.21). Foram registrados diferentes perfis e distintos coeficientes angulares que são relacionados a sensibilidade de cada condição. Apesar de ser um estudo inicial para essa determinação simultânea, foi possível observar a partir dos coeficientes angulares das curvas, que as sensibilidades apresentaram crescimentos com o aumento do tempo de interrupção

de fluxo. Também foi possível perceber que os coeficientes angulares das curvas para soluções de metanol (Figuras 4.20) são muito inferiores aos mesmos coeficientes das curvas construídas para soluções de glicerol nas mesmas condições (Figuras 4.21). Dessa forma, foi possível confirmar que empregando o mesmo procedimento, houve maior variação de sinal para variações pequenas nas concentrações de glicerol em relação a variação de sinais referente a incrementos de metanol.

Figura 4.20. Curvas analíticas para determinação de metanol empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo. Condição: 300 μL de solução de referência metanol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e \varnothing transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3). Tempo de interrupção de fluxo: 0 (■), 3 min (●), 5 min (▲) e 10 min (◄).

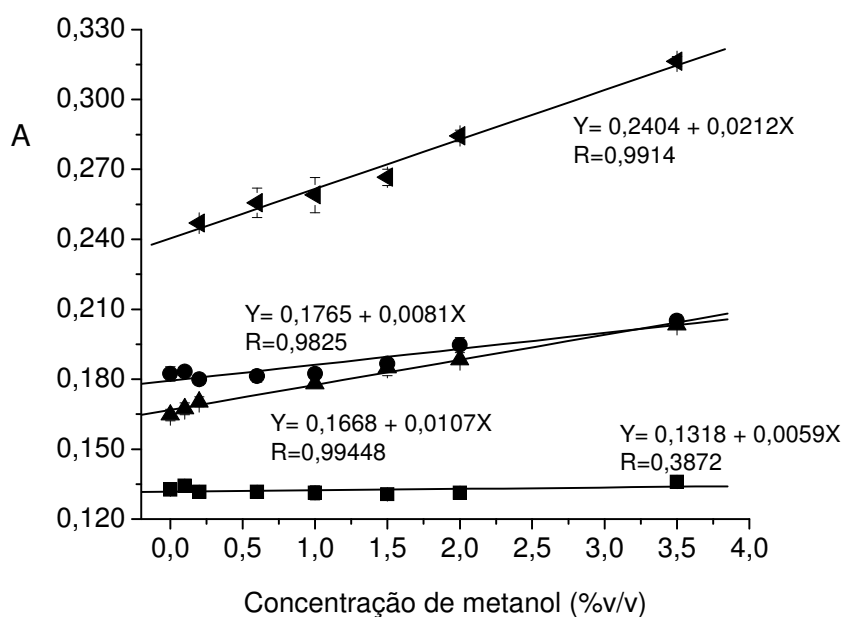
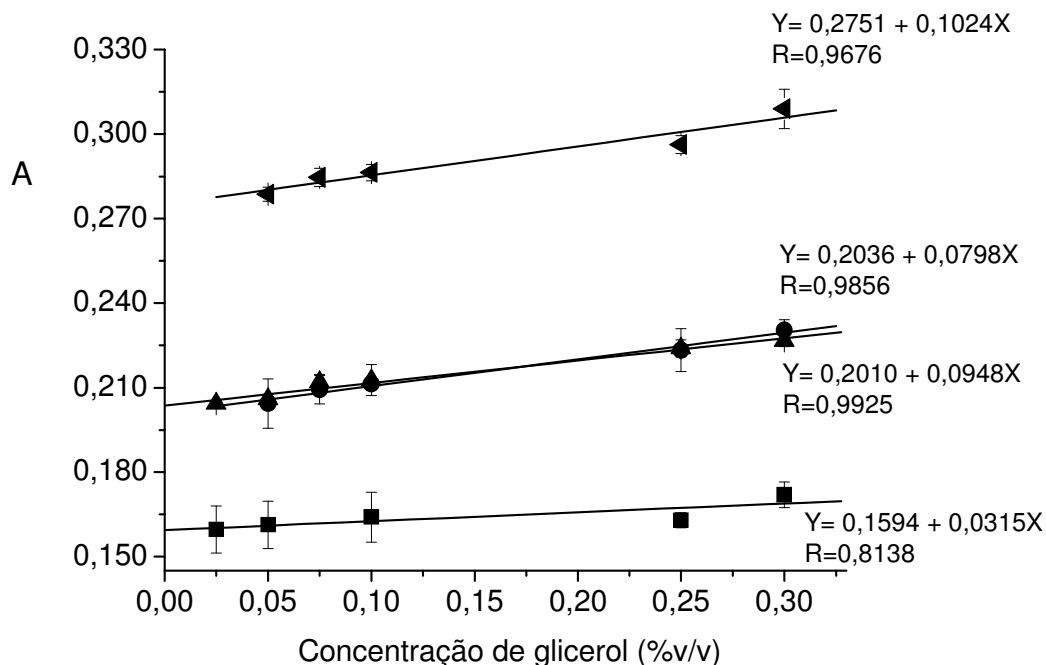


Figura 4.21. Curvas analíticas para determinação de glicerol empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo. Condição: 300 μL de solução de referência glicerol, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ ($n=3$). Tempo de interrupção de fluxo: 0 (■), 3 min (●), 5 min (▲) e 10 min (◄).



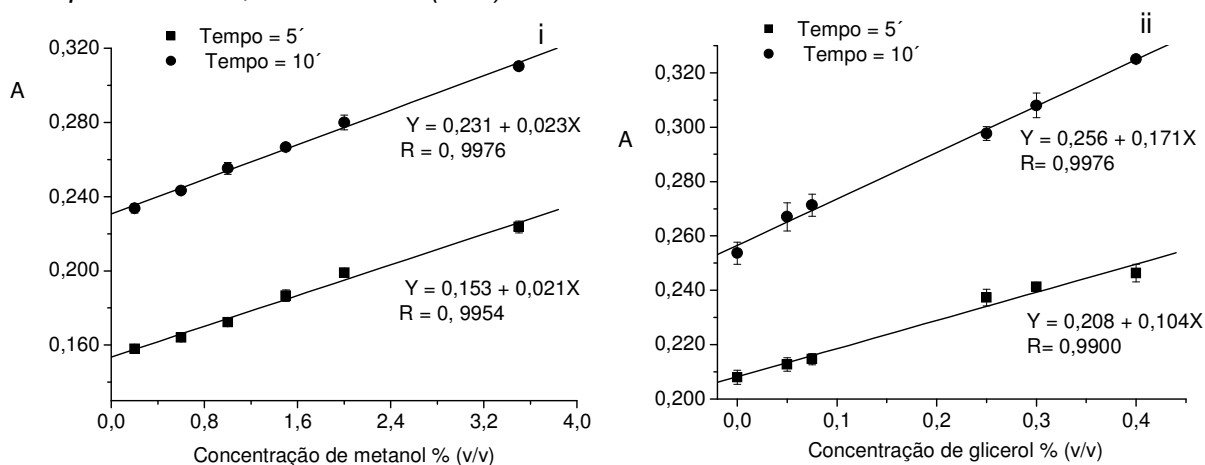
Ainda para continuar testes aplicando parada da zona composta na bobina reacional, foi feita a avaliação do comportamento do branco analítico com o tempo de parada de fluxo. Com o aumento desse tempo, foram observados aumentos dos sinais do branco e desvios padrão referente ao branco analítico (Tabela 4.9). Mesmo assim não eram sinais que poderiam inviabilizar o emprego de parada de fluxo, uma vez que os desvios padrão relativos (RSD %) eram próximos em todos os tempos investigados.

Tabela 4.9. Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico do branco. Condição: 300 μL de branco, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e \varnothing transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$.

Tempo de interrupção de fluxo = 0 min								
SOLUÇÃO	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Média	Desvio padrão	RSD (%)
Branco	0,240	0,246	0,246	0,249	0,250	0,247	0,004	1,6
	0,240	0,246	0,242	0,251	0,248			
	0,252	0,243	0,246	0,252	0,248			
Tempo de interrupção de fluxo = 5 min								
SOLUÇÃO	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Média	Desvio padrão	RSD (%)
Branco	0,324	0,298	0,309	0,314	0,323	0,310	0,009	2,9
	0,296	0,302	0,313	0,316				
	0,297	0,304	0,313	0,316				
Tempo de interrupção de fluxo = 10 min								
SOLUÇÃO	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Média	Desvio padrão	RSD (%)
Branco	0,374	0,370	0,388	0,394		0,384	0,012	3,1
	0,369	0,371	0,394	0,401				
	0,371	0,395	0,392					

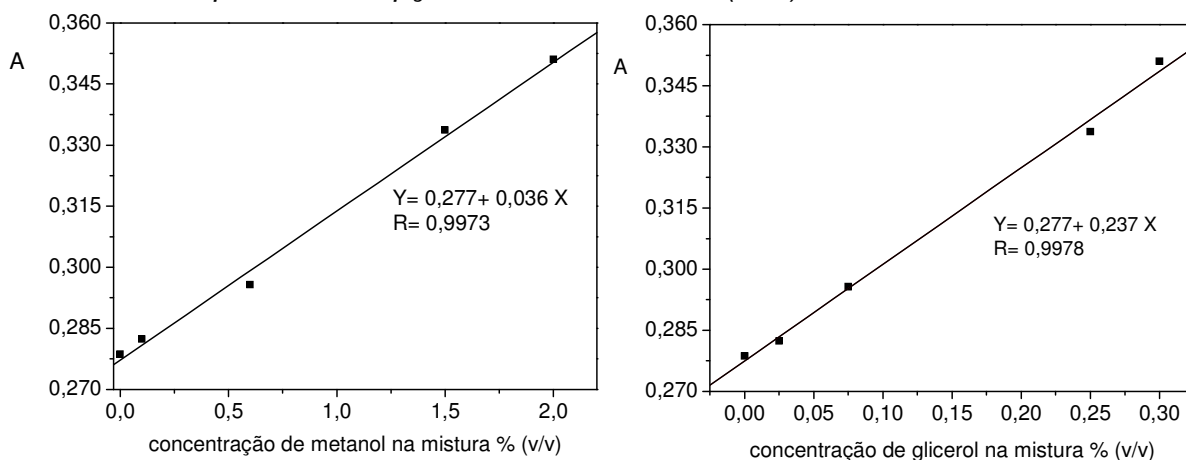
Curvas analíticas foram construídas para os analitos separadamente nos tempos de interrupções de fluxo de 5 e 10 min. Esses gráficos estão apresentados na Figura 4.26. Nas curvas obtidas para soluções de metanol, pôde-se constatar que os coeficientes angulares eram praticamente os mesmos para tempos de interrupção de fluxo de 5 e 10 min (Figura 4.22.(i)). Quando se tratou de curvas para soluções de glicerol, foi possível perceber que dobrando o tempo de interrupção de fluxo (de 5 para 10 min), o coeficiente angular da reta aumentou (Figura 4.22.(ii)), indicando que a interrupção de fluxo teve efeito mais sensível para o segundo analito (glicerol). Em tempos de interrupção semelhantes, a sensibilidade para glicerol foi significativamente maior do que para metanol, como já havia sido constatado.

Figura 4.22. Curvas analíticas para determinação de metanol (i), glicerol(ii) empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo. Condição: 300 μL de solução de referência, concentração do reagente NQS= $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e \varnothing transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).



Para a mistura das espécies - quando as curvas foram construídas a partir de soluções contendo ambos os analitos - não foi registrada linearidade para tempo de interrupção de 5 min. Já em termos de interrupções de 10 min, foram observados bons coeficientes de correlação linear ($R > 0,99$). Na Figura 4.23 estão expostas as curvas em que a resposta é a mesma, ou seja, para a mistura de glicerol e metanol. Na Figura 4.23.(i), o gráfico está apresentado em função da concentração de metanol, enquanto que em Figura 4.23.(ii), a resposta está em função da concentração de glicerol.

Figura 4.23. *Curvas analíticas para determinação de metanol e glicerol na mistura: (i) resposta em função de metanol, (ii) resposta em função de glicerol, empregando diferentes tempos de interrupções de fluxo. Condição: 300 μ L de solução de referência, concentração do reagente NQS = $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de interrupção de fluxo = 10 min (n=1).*



Ainda foram feitas tentativas de melhoria de sensibilidade do método para determinação de metanol visando a sua determinação em biodiesel para obter limite de quantificação menor do que limite máximo regulamentado pela ANP (0,20% m/m). Com essa finalidade, foram realizados experimentos com tempos de interrupções de fluxo de até 20 min. Mesmo tendo conhecimento de que o tempo de interrupção de fluxo investigado era inadequado para um sistema de FIA, o estudo foi realizado, a fim de investigar mais sobre a reação e possíveis soluções. O maior coeficiente angular obtido foi de $0,051 \text{ uA } \%v/v^{-1}$, gerando limites de detecção e quantificação iguais a 0,3 e 1,0% (v/v), respectivamente. Esse valor de sensibilidade é mais baixo do que a sensibilidade encontrada para determinação de glicerol sem interrupção de fluxo em estudos sem otimização do sistema. Dessa forma, as determinações de metanol nas amostras de biodiesel foram inviáveis, uma vez que não foi acoplado o procedimento de extração e feita a pré-concentração do analito. Portanto, foi descartada a determinação simultânea de metanol e glicerol total em biodiesel empregando o sistema proposto.

4.2.3 – Determinação de glicerol total em amostras de biodiesel

O mesmo sistema foi direcionado para determinação somente de glicerol total nas amostras de biodiesel com possível presença de resíduo de metanol. Foi implementada a determinação direta do glicerol com o reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) empregando o sistema FIA proposto com detecção espectrofotométrica. Os parâmetros otimizados foram semelhantes aos parâmetros investigados no estudo para determinação de metanol pelo mesmo sistema como: comprimento da bobina de reação, tipo de carregador empregado, pH da reação e concentração de NQS. Além desses parâmetros em comum, foi investigado o efeito da vazão sobre o sinal analítico.

Houve a preocupação sobre a interferência de metanol quando realizada a determinação de glicerol já que o metanol sempre estará presente no biodiesel como resíduo da etapa de transesterificação. Entretanto, como foi observado nos estudos anteriores, o metanol só começa a influenciar efetivamente no sinal analítico se houver algum tempo de interrupção de fluxo já que o tempo para que a reação entre metanol e NQS atinja o equilíbrio é longo e maior em relação a reação entre glicerol e NQS. Não foi verificada curva analítica para o analito metanol sem tempo de parada de fluxo, portanto, se a determinação de glicerol fosse realizada sem interrupção de fluxo, a expectativa é de que não houvesse interferência do metanol na determinação de glicerol. Para confirmar essa expectativa, foram construídas curvas analíticas para determinação de glicerol a partir das soluções de glicerol com e sem metanol na solução. Nas soluções em que a presença de metanol foi fixa, o teor foi mantido em 0,20% (v/v) que estava próximo ao limite estabelecido pela ANP de 0,20% (m/m) (ANP, resolução nº14/2012). Foi perceptível o aumento do sinal com o aumento da concentração de glicerol e não foram apresentadas diferenças

significativas nas curvas referentes às soluções de glicerol sob a mesma concentração na presença e ausência de metanol. Esses dados podem ser comparados a partir das equações das retas para as curvas citadas. Não há diferença significativa nos coeficientes lineares, angulares e de correlação (Equação da retas para curva sem glicerol: $Y = 0,1149 (\pm 0,002) + 0,0776 (\pm 0,005) X$, $R = 0,9869$ e curva com glicerol: $Y = 0,1186 (\pm 0,002) + 0,0791 (\pm 0,007) X$, $R = 0,9889$). Dessa forma, foi possível constatar que é possível a determinação de glicerol em presença de metanol sob as condições de concentrações avaliadas.

Otimizações a cerca da concentração do reagente NQS e do pH do meio foram realizadas visando o aumento do sinal analítico do método proposto para determinação de glicerol em amostras de biodiesel. Quando investigado o efeito da concentração do reagente NQS, foi observada uma tendência crescente do sinal analítico com o aumento da concentração do reagente (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Efeito da concentração do reagente NQS sobre o sinal analítico no sistema para determinação de glicerol. Condição: 300 μL de solução de referência e \varnothing transportador = 1,60 mL min^{-1} ($n=3$).

Concentração do reagente (mol L^{-1})	Solução de glicerol % (v/v)	Sinal líquido
$1,0 \times 10^{-4}$	0,25	0,000
	1,00	0,000
$2,5 \times 10^{-4}$	0,25	0,004
	1,00	0,040
$5,0 \times 10^{-4}$	0,25	0,008
	1,00	0,043
$7,5 \times 10^{-4}$	0,25	0,006
	1,00	0,044
$1,0 \times 10^{-3}$	0,25	0,009
	1,00	0,049
$2,5 \times 10^{-3}$	0,25	0,009
	1,00	0,072
$5,0 \times 10^{-3}$	0,25	0,036
	1,00	0,124
$7,5 \times 10^{-3}$	0,25	0,044
	1,00	0,170
$1,0 \times 10^{-2}$	0,25	Dificuldade de solubilização do reagente
	1,00	Dificuldade de solubilização do reagente

Reagentes com concentrações da ordem de 10^{-3} mol L^{-1} promoveram melhores condições para o método de análise, portanto foram minuciosamente avaliados a partir da sensibilidade da curva analítica, não somente pelos sinais líquidos apresentados. Foram obtidas as curvas analíticas para essas condições em pH 2 e 12 e estão apresentadas nas Figuras 4.24 e 4.25. Para as duas condições de pH avaliadas, houve aumento da sensibilidade (coeficiente angular da reta ajustada) com o aumento da concentração do reagente. A melhor condição de sensibilidade foi obtida em pH 12 e concentração de NQS igual a $7,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (curva (◀) na Figura 4.25).

Figura 4.24. Avaliação do efeito da concentração do reagente sobre a sensibilidade analítica para determinação de glicerol em pH 2. Condição: 300 μL de solução de referência e ϕ transportador = 1,60 mL min^{-1} ($n=3$). $[\text{NQS}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (■), $[\text{NQS}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (●), $[\text{NQS}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (▲) e $[\text{NQS}] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (◄).

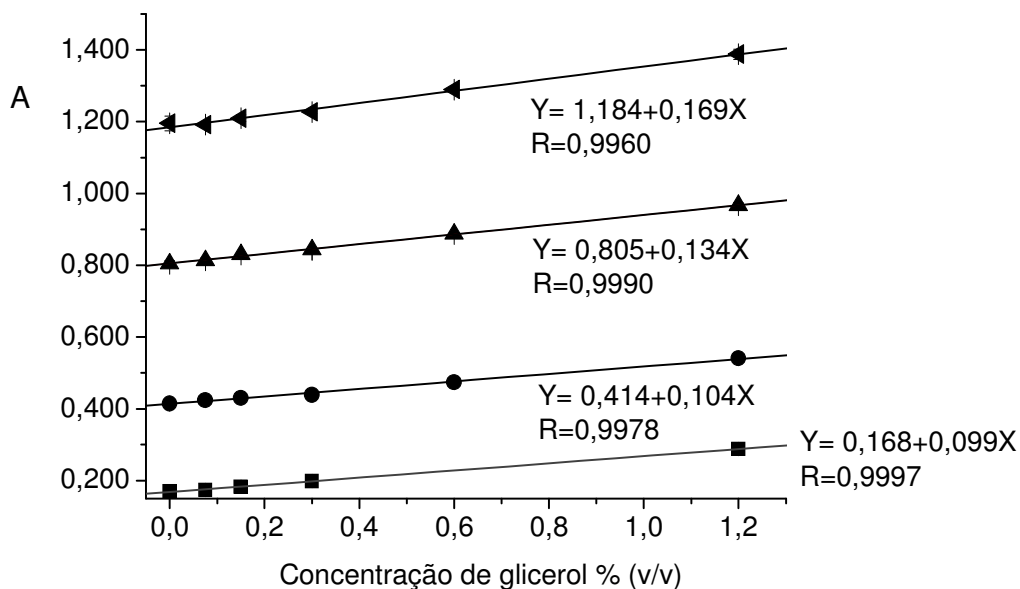
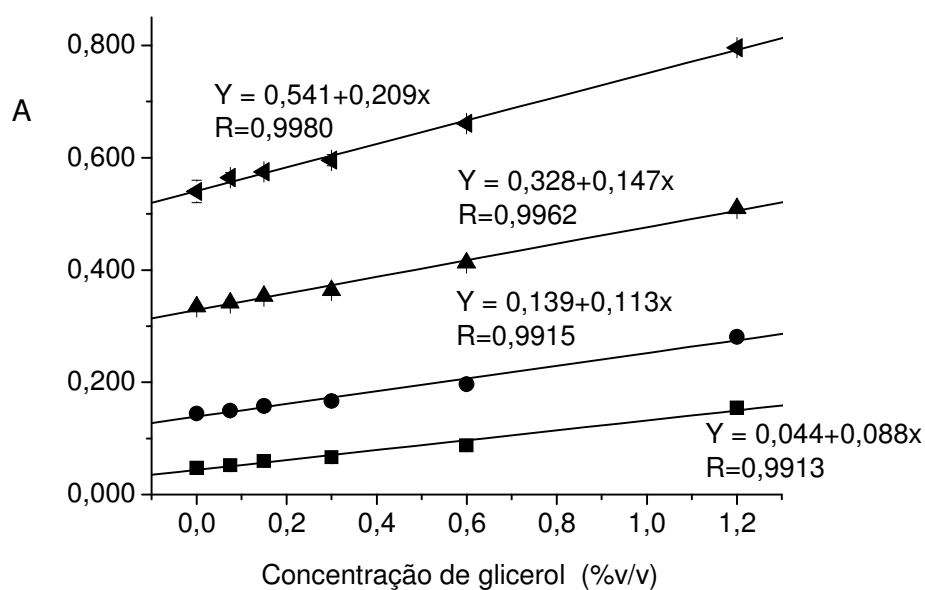


Figura 4.25. Avaliação do efeito da concentração do reagente sobre a sensibilidade analítica para determinação de glicerol em pH 12. Condição: 300 μL de solução de referência e ϕ transportador = 1,60 mL min^{-1} ($n=3$). $[\text{NQS}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (■), $[\text{NQS}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (●), $[\text{NQS}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (▲) e $[\text{NQS}] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (◄).



Parâmetros físicos e hidrodinâmicos que poderiam influenciar nas figuras de méritos dos procedimentos analíticos foram otimizados: comprimento da bobina de reação e vazão da solução transportadora. Os efeitos dessas variáveis sobre esse sistema foram diferentes em relação aos efeitos das mesmas no sistema para determinação de metanol. A melhor condição para comprimento de bobina foi encontrada em 100 cm (Figura 4.26) e vazão otimizada em $3,90 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 4.27). Para determinação de metanol, foi requerido maior comprimento de bobina e menor vazão devido a cinética lenta da reação que requer maior tempo de equilíbrio. O maior tempo necessário para atingir o equilíbrio na reação entre o metanol e o NQS também podia ser observado através dos resultados mais satisfatórios em maiores tempos de interrupções de fluxo, enquanto que a parada de fluxo é desnecessária nesse método para determinação de glicerol. O comprimento de bobina e a vazão ótimos para a determinação de glicerol foram apenas as condições necessárias para permitir a mistura entre o analito e o reagente promovendo a mínima dispersão possível.

Figura 4.26. Efeito do comprimento de bobina reacional sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de glicerol. Condição: 300 μL de solução de glicerol 0,25 (■) e 1,0 (●)% v/v, concentração do reagente NQS= $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e ϕ transportador = $1,60 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).

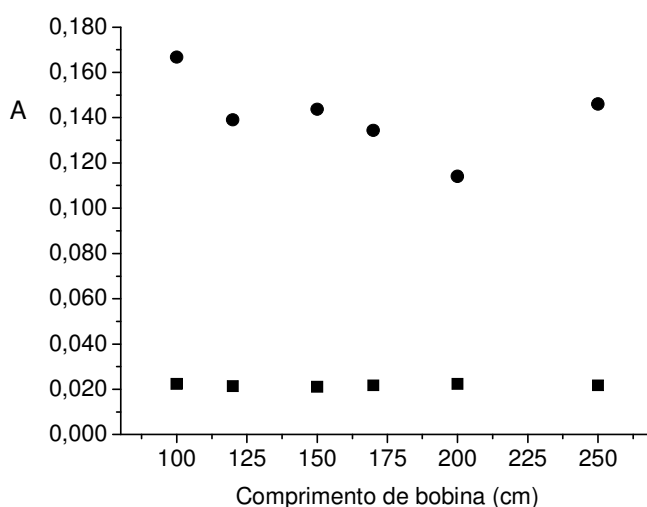
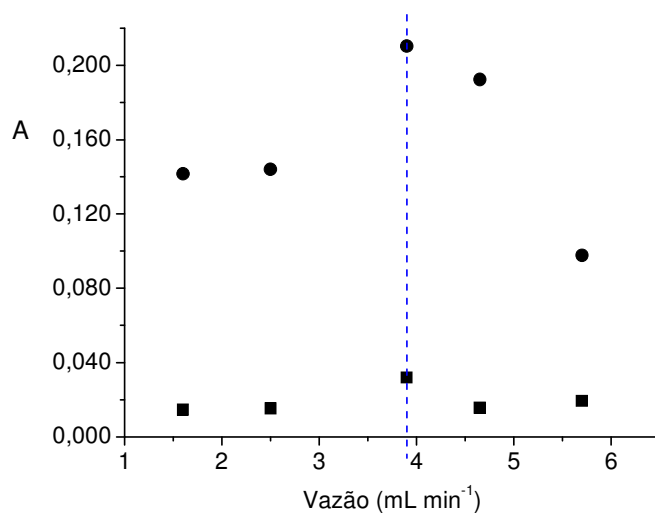


Figura 4.27. Efeito da vazão da solução transportadora sobre o sinal analítico para o sistema de determinação de glicerol. Condição: 300 μL de solução de glicerol 0,25 (■) e 1,0 (●)% v/v, concentração do reagente NQS= $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, comprimento de bobina= 100 cm (n=3).



Nas condições otimizadas, foi desenvolvida curva analítica a fim de estabelecer as figuras de mérito do método proposto e aplicar a amostras de biodiesel (Figura 4.28). As figuras de mérito principais estão apresentadas na Tabela 4.11.

Figura 4.28. Curva analítica para soluções de glicerol obtidas através do procedimento nas condições otimizadas. Condições: 300 μL de solução de glicerol, concentração do reagente NQS= $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, comprimento de bobina= 100 cm e ϕ transportador = $3,90 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).

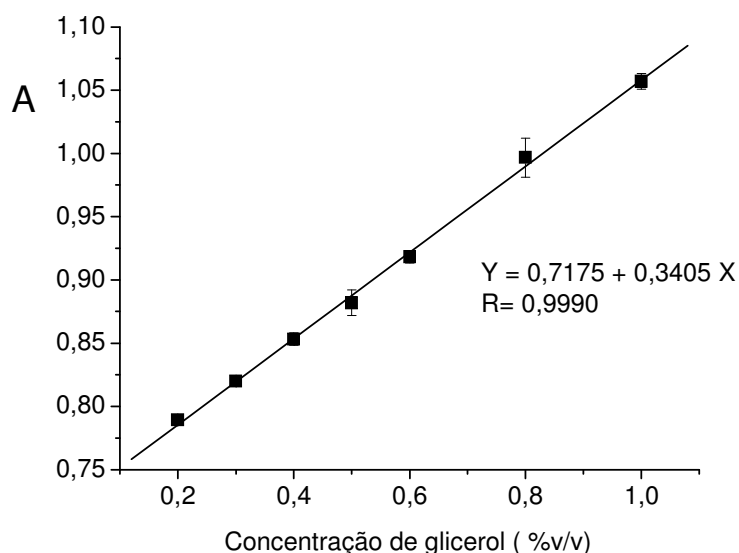


Tabela 4.11. Figuras de mérito obtidas pelo método proposto para determinação de glicerol total em amostras de biodiesel a partir da curva apresentada na Figura 4.32. Condições: 300 μL de solução de glicerol, concentração do reagente NQS= $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, comprimento de bobina= 100 cm e ϕ transportador = $3,90 \text{ mL min}^{-1}$ (n=3).

FIGURAS DE MÉRITO	
Sensibilidade (S) ($\mu\text{A } \%v/v^{-1}$)	0,340
Desvio padrão do branco (s_b)	0,005
LOD= $3 \cdot s_b/S$ (%v/v)	0,04
LOQ= $10 \cdot s_b/S$ (%v/v)	0,15
RSD (%) (0,2 e 0,8 % v/v)	0,5 e 1,0
R	0,9990
F.A. (h^{-1})	120

μA : unidade de absorvância, LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação, RSD: desvio padrão relativo, R: coeficiente de correlação linear e F.A.: frequência analítica após tratamento da amostra.

Estudos com adição de glicerol a óleo de soja também foram realizados como uma etapa inicial da validação do método. A curva empregada para análise das amostras de óleo está apresentada na Figura 4.29. Os resultados encontrados para as amostras com adição de analito estão apresentados na Tabela 4.12.

Figura 4.29. Curva analítica desenvolvida nas condições otimizadas para o sistema de determinação de glicerol empregada para validação com adição de analito. Condição: 300 μL de solução de glicerol, comprimento de bobina= 100 cm e ϕ transportador = 3,90 mL min^{-1} ($n= 3$).

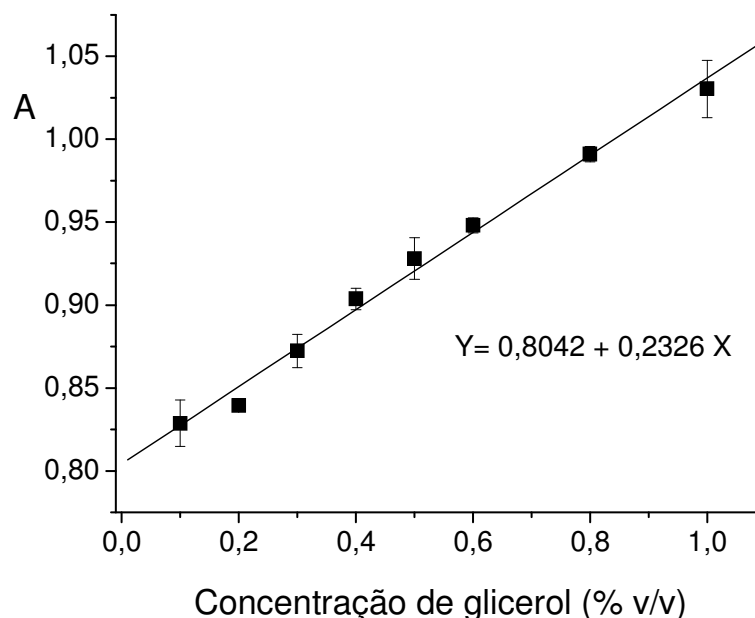


Tabela 4.12. Resultados referente ao teste de adição de analito em diferentes concentrações ao óleo de soja.

Amostras	Adição de analito % v/v	Concentração obtida % v/v
AM2	0,25	0,259
AM3	0,35	0,344
AM4	0,45	0,457
AM5	0,55	0,550

Apesar da grande concordância entre os resultados encontrados e os resultados esperados, essa estratégia aplicada não é a melhor forma de validação de um método. Nesse caso, ainda há o agravante de que no momento da adição de analito na amostra, não há certeza alguma sobre a penetração desse analito na fase orgânica para validação da etapa de extração líquido-líquido. Portanto, duas amostras fornecidas por programa comparação interlaboratorial foram processadas

para medida do teor de glicerol total. A fim de validar o método proposto, os resultados obtidos foram confrontados com os resultados apresentados no relatório emitido pelo grupo de laboratórios responsáveis por essa análise que foi conduzido seguindo as recomendações da norma ABNT NBR ISO/IEC 17043:11. O número de amostras foi restrito, uma vez que o programa ocorre uma vez por ano e as análises ocorrem em um período em que as características das amostras não são comprometidas pelo armazenamento. As amostras analisadas pelos testes interlaboratoriais tiveram suas estabilidades monitoradas pelo período de 24/09/12 a 05/10/12 e 16 a 27/09/2013, respectivamente; que correspondem ao período de preparação e realização da homogeneidade até o término das medições pelos laboratórios participantes.

Foi necessária realizar três extrações para que o sinal analítico referente a amostra estivesse compreendido na curva analítica otimizada utilizada para análise dessas amostras (Figura 4.30), realizando, dessa forma uma pré-concentração. Nas extrações, um volume fixo de amostra foi adicionado ao sistema extrator três vezes, sem adição de mais extrator (água).

Para essas amostras, visando a determinação do glicerol total, foi empregada a extração após saponificação com solução etanólica de NaOH, empregando um procedimento adaptado ao proposto por Silva e colaboradores (2011), já que a extração com água só permitiria a extração do glicerol livre e talvez de parte de monoglicerol e diglicerol. A etapa de neutralização com ácido clorídrico após a extração utilizada no procedimento original não foi necessária. Isso porque o meio reacional do sistema proposto era alcalino.

Os resultados obtidos pelo método proposto estão apresentados na Tabela 4.13, bem como os resultados encontrados pelo método de referência pelo

programa interlaboratorial. Em cada uma dessas determinações, o consumo de reagente foi de 0,585 mg.

Os resultados referentes ao método proposto estão estatisticamente concordantes com os resultados adquiridos pelo método de referência ao nível de confiança de 99,5%. As médias encontradas estão dentro do intervalo: média robusta $\pm 3s$, mesmo critério considerado para não exclusão de dados dos laboratórios participantes dos ensaios interlaboratoriais.

Figura 4.30. Curva analítica desenvolvida nas condições otimizadas para o sistema de determinação de glicerol em biodiesel para análise de amostras do interlaboratorial. Condição: 300 μL de solução de glicerol, comprimento de bobina= 100 cm e \varnothing transportador = 3,90 mL min^{-1} ($n= 3$).

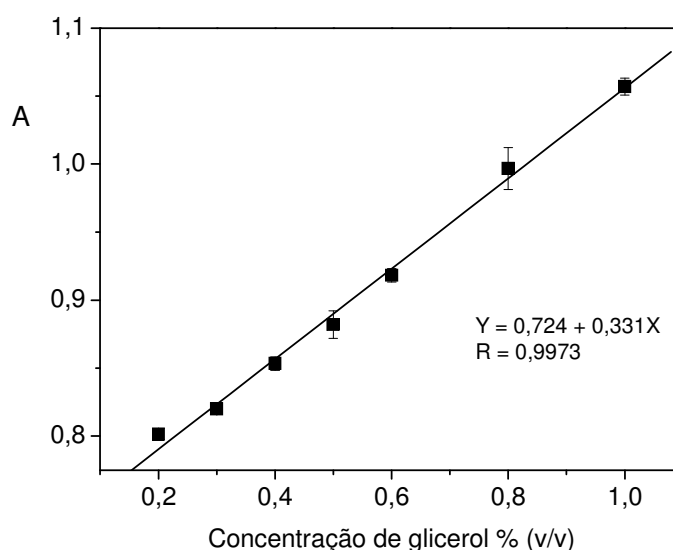


Tabela 4.13. Comparação entre os resultados obtidos para concentração (%v/v) de glicerol total empregando o método proposto e o método de referência.

AMOSTRA	2012	2013
MÉTODO PROPOSTO	0,119 ± 0,001	0,160 ± 0,004
Média ± s	(n = 3)	(n = 3)
MÉTODO DE REFERÊNCIA	0,150 ± 0,060	0,140 ± 0,066
Média ± 3s	(n = 27)	(n = 36)
s ² (variância agrupada)	3,7x10 ⁻⁴	4,6x10 ⁻⁴
gl (graus de liberdade)	27	18
t cal	2,64	1,55
t tab	2,87	2,77
α(%)	0,5	0,5

t: distribuição t bilateral, n: número de observações e α: nível de significância.

Outras amostras de biodiesel foram analisadas empregando o método desenvolvido para a determinação de glicerol total. Foram analisadas amostras de diferentes matérias-primas e de diferentes origens. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 4.14. A mesma estratégia de empregar três extrações foi adotada a essas amostras, portanto os resultados de concentrações apresentados já foram corrigidos considerando o número de pré-concentrações.

Tabela 4.14. Teores de glicerol total em amostras de biodiesel obtidos a partir do procedimento proposto empregando NQS como reagente (n=3).

Matéria prima do biodiesel	Concentração de glicerol total % (m/m)
Algodão	0,177 ± 0,008
Milho	0,068 ± 0,003
Óleo de Frango	0,238 ± 0,006
Girassol A	0,085 ± 0,001
Girassol B	0,059 ± 0,005
Palma	0,203 ± 0,004
Sebo animal	0,260 ± 0,002
Soja A	0,113 ± 0,002
Soja B	0,096 ± 0,004
Soja C	0,240 ± 0,005
Soja D	0,091 ± 0,002
Soja E	0,064 ± 0,009

Os teores de glicerol total encontrados estão expressos em unidades de concentração percentual m/m. Pode-se observar que apenas a amostra de biodiesel de sebo apresentou teor de glicerol total superior a 0,25% m/m que é o máximo estabelecido pela ANP. Mas vale ressaltar que essas amostras não foram produzidas para fins comerciais e não estiveram em condições controladas de armazenamento. Mesmo assim, esses resultados estão dentro das previsões realizadas, já que desde que foi implementado o programa de monitoramento da qualidade do biodiesel, houve melhoria de qualidade do biodiesel produzido no mesmo ritmo em que ocorreu maior fiscalização e crescimento do número de laboratórios que participam dessas análises.

5 – Conclusões

A presente tese apresentou como objetivo geral o desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando análise por injeção em fluxo e espectrofotometria de absorção molecular no visível. Foi empregada como estratégia o desenvolvimento de sistemas FIA para o preparo de amostra e para detecção do analito disponibilizado no meio extrator aquoso.

Para determinação de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel, foi proposto como etapa do preparo de amostra, um procedimento de extração líquido-líquido. Essa extração ocorria em uma cela de separação acoplada ao sistema em fluxo. Foram avaliados parâmetros para otimização da extração e foi possível realizar a extração do etanol presente em amostras de biodiesel para o meio aquoso. De acordo com a similaridade de características do etanol com metanol e glicerol, é possível concluir que esse sistema pode ser aplicado para extração dessas espécies para o meio aquoso. Além disso, pode-se explorar o sistema proposto caso queira empregar a configuração montada para extrações em aplicações semelhantes. Foram avaliados estudos para pré-concentração do analito e pôde-se concluir que é possível associar o número de vezes que a alíquota da amostra é inserida no sistema de extração com a faixa de concentração desejada para determinação do analito. Essa estratégia pode ser empregada em situações que a concentração do analito na amostra é baixa e a pré-concentração favorecerá para encaixar na faixa linear de trabalho do método de análise disponível. Apesar de não ter realizado o acoplamento com o sistema de detecção, foram apresentadas as potencialidades dessas propostas separadamente e estudos posteriores podem ser realizados para incorporar a etapa de preparo de amostra à etapa de detecção.

Foi avaliada a possibilidade de implementar um procedimento para determinação simultânea de metanol e glicerol total em amostras de biodiesel empregando o reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) e detecção espectrofotométrica ($\lambda = 453 \text{ nm}$). Após investigação do efeito de diversos parâmetros e estudo da reação do metanol com o reagente NQS, não foi obtida sensibilidade satisfatória para permitir a determinação de metanol em biodiesel. Isso porque o teor máximo de metanol regulamentado pela ANP em biodiesel é de 0,20% (m/m) e após otimização do sistema proposto ainda não era possível quantificar teores de metanol nessa escala. Caso houvesse o acoplamento com o procedimento de pré-concentração empregando extração líquido-líquido proposto ou até mesmo pré-concentração, ainda não seria possível a determinação de metanol nessas amostras de biodiesel sem novas otimizações.

Foi alcançado o objetivo da presente tese relacionado ao desenvolvimento de um procedimento para determinação de glicerol total em amostras de biodiesel empregando NQS em sistema FIA. Esse procedimento possibilitou a determinação de glicerol em amostras de biodiesel, apresentando simplicidade, repetibilidade (RSD $\leq 1,0\%$) e limite de quantificação de 0,15 % (v/v). O método proposto para determinação de glicerol total em amostras de biodiesel apresentou resultados concordantes com os obtidos pelo programa interlaboratorial empregando o método de referência (cromatografia gasosa), possibilitando até 120 determinações por hora após o preparo de amostra e consumo de 0,585 mg de NQS por determinação. Portanto, além da robustez e simplicidade, eram consumidas pequenas quantidades de reagente e amostras, com conseqüente diminuição dos custos operacionais por determinação e da quantidade de material descartado para o ambiente quando comparado com o método cromatográfico.

A extração líquido-líquido em batelada permitiu a pré-concentração do analito e determinação do teor de glicerol em amostras de biodiesel oriundos de diferentes oleaginosas e foi observado que apenas o biodiesel de sebo apresentou teor de glicerol total superior ao máximo estabelecido pela ANP que é de 0,25% m/m. Esses resultados estão dentro da previsão, já que desde que foi implementado o programa de monitoramento da qualidade do biodiesel, houve melhoria de qualidade do biodiesel atendendo às especificações para comercialização pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional.

A incorporação do preparo de amostra à medição dos sinais em sistemas de análise por injeção em fluxo para determinação simultânea de metanol e glicerol total em biodiesel é uma estratégia que pode ser empregada para miniaturização do sistema de análise. Dessa forma, haverá mecanização dessas etapas de uma sequência analítica. Englobaria desde a etapa do preparo de amostra com extração líquido-líquido até a etapa de construção da curva analítica e determinação do analito.

6 – Referências Bibliográficas

- ABNT NBR 12120. Álcool Etílico - **Determinação do teor de sulfato por volumetria**, Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Cancelada sem substituição em julho de 2007.
- ABNT NBR 14448 Produtos de petróleo – **Determinação do índice de acidez pelo método de titulação potenciométrica**, *Associação Brasileira de Normas Técnicas* – ABNT. Revisada em 05 de novembro de 2013.
- ABNT NBR 15342 Biodiesel – **Determinação de monoglicerídeos, diglicerídeos e ésteres totais em biodiesel de mamona por cromatografia em fase gasosa**, *Associação Brasileira de Normas Técnicas* – ABNT. Revisada em 18 de maio de 2009.
- ABNT NBR 15343 Biodiesel – **Determinação da concentração de metanol e/ou etanol por cromatografia gasosa**, *Associação Brasileira de Normas Técnicas* – ABNT. Revisada em 04 de abril de 2012.
- ABNT NBR ISO/IEC 17043:11 – **Avaliação de conformidade — Requisitos gerais para ensaios de proficiência**, *Associação Brasileira de Normas Técnicas* – ABNT. Revisada em 25 de agosto de 2011.
- ALHADEFF, E.M., SALGADO, A.M.S., PEREIRA JR., N., VALDMAN, B. Development and application of an integrated system for monitoring ethanol content of fuels. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 113, 125-136, 2004.
- ALHADEFF, E.M., SALGADO, A.M.S., PEREIRA JR., N., VALDMAN, B. A sequential enzymatic microreactor system for ethanol detection of gasohol mixtures. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 121, 361-371, 2005.
- ALHADEFF, E.M., SALGADO, A.M.S., CÓS, O., PEREIRA JR., N., VALERO, F., VALDMAN, B. Integrated biosensor systems for ethanol analysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 1146, 129-136, 2008.
- ALVES, V.N., MOSQUETTA, R., COELHO, N.M.M., BIANCHIN, J.N., ROUX, K.C.P., MARTENDAL, E., CARASEK, E. Determination of cadmium in alcohol fuel using *Moringa oleifera* seeds as a biosorbent in an on-line system coupled to FAAS. **Talanta**, 80, 1133-1138, 2010.
- ALVES, V.N., MOSQUETTA, R., CARASEK, E., COELHO, N.M.M. Determination of Zn(II) in alcohol fuel by flame atomic absorption spectrometry after on-line preconcentration using a solid phase extraction system. **J. Anal. Chem**, 67, 448-454, 2012.

ANCIÃES, A.W.F., De FIGUEIREDO, D.B., CASSIOLATO, J. E., PAULA, M.C.S., ZAMBONI, S.P. **Avaliação Tecnológica do Álcool Etílico**, CNPq, 3a ed., Brasília, 1981.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução 07 de 09 de fevereiro de 2011**. Estabelece as especificações para comercialização do Álcool Etílico Anidro Combustível (AEAC) e do Álcool Etílico Hidratado Combustível (AEHC) produzido em todo o território nacional.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução 14 de 11 de maio de 2012**. Estabelece a especificação do biodiesel a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução 40 de 25 de outubro de 2013**. Regular as especificações das gasolinas de uso automotivo e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional.

ANP, 2014. Disponível em: <www.anp.gov.br>, acessada em fevereiro de 2014.

ARANDA, P.R., PACHECO, P.H., OLSINA, R.A., MARTINEZ, L.D., GIL, R.A. Total and inorganic mercury determination in biodiesel by emulsion sample introduction and FI-CV-AFS after multivariate optimization. **J. Anal. At. Spectrom.**, 24, 1441-1445, 2009.

ARAUJO, A.R.T.S., SARAIVA, M.L.M.F.S., LIMA, J.L.F.C., KORN, M.G.A. Flow methodology for methanol determination in biodiesel exploiting membrane-based extraction. **Anal. Chim. Acta**, 613, 177-183, 2008.

ASTM D 6304 **Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fisher Titration**, American Society of Testing and Materials – ASTM. Revisada em abril de 2004.

ASTM D 6584 **Determination of Free and Total Glycerine in Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography**, American Society of Testing and Materials – ASTM. Revisada em 2013.

ASTM D 6751 **Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels**, American Society of Testing and Materials – ASTM. Revisada em 2012.

- BAPTISTA, P., FELIZARDO, P., MENEZES, J.C., NEIVA CORREIA, M.J. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel. *Anal. Chim. Acta*, 595, 107-113, 2007.
- BARBOSA, T.G.G., RICHTER, E.M., MUNOZ, R.A.A. Flow-injection pulsed-amperometric determination of free glycerol in biodiesel at a gold electrode. **Electroanal.**, 24, 1160-1163, 2012.
- BERG, R.V.D., PETERS, J.A., BEKKUM, H.V., The structure and (local) stability constants of borate esters of mono- and di-saccharides as studied by ¹¹B and ¹³C NMR spectroscopy, **Carbohydrate Research**, 253, 1-12, 1994.
- BIANCHIN, J.N., MARTENDAL, E., MIOR, R., ALVES, V.N., ARAÚJO, C.S., COELHO, N.M.M., CARASEK, E., Development of a flow system for the determination of cadmium in fuel alcohol using vermicompost as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry , **Talanta**, 78, 333-336, 2009.
- Biodiesel Brasil. Disponível em: <www.biodieselbr.com.br>, acessada em fevereiro de 2014.
- BONDIOLI, P., DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol.**, 107, 153-157, 2005.
- BONFIM, R.R., ALVES, M.I.R. Antoniosi Filho, N.R. Fast-HRGC method for quantitative determination of benzene in gasoline. **Fuel**, 99, 165-169, 2012.
- BURGUERA, J.L., BURGUERA, M. Pretreatment of oily samples for analysis by flow injection-spectrometric methods, **Talanta**, 83, 691-699, 2011.
- CABERO, C., SAURINA, J., HERNÁNDEZ-CASSOU, S. Flow-injection spectrophotometric determination of cyclamate in sweetener products with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. **Anal. Chim. Acta**, 381, 307-313, 1999.
- CAMPOS, A.C., LEONTSINIS, E. **Petróleo & derivados: obtenção, especificações, requisitos de desempenho**. São Paulo: Editora Técnica, 1990.
- CERDA, V., CERDA, A., CLADERA, A., OMS, M.T., MAS, F., GÓMEZ, E., BAUZÁ, F., MIRÓ, M., FORTEZA, R., ESTELA, J.M., Monitoring of environmental parameters by sequential injection analysis. **Trends Anal. Chem.**, 20, 407-418, 2001.

- CERDA, V. **Introducción a los Métodos de Análisis em Flujo**. 1ªed., Palma de Mallorca: Sciware, 2006.
- CERVANTES, F.J., GARCIA-ESPINOSA, A.M., MORENO-REYNOSA, A., RANGEL-MENDES, R. Immobilized Redox Mediators on Anion Exchange Resins and Their Role on the Reductive Decolorization of Azo Dyes. **Environ. Sci. Technol.**, 44, 1747-1753, 2010.
- CHOENGCHAN, N., MANTIM, T., DASGUPTA, P.K., NACAPRICHIA, D. A membrane gas diffusion unit: Design and its application to determination of ethanol in liquois by spectrophotometric flow injection. **Anal. Chim. Acta**, 579, 33-37, 2006.
- CNPE - Conselho Nacional de Política Energética, **Resolução 06 de 16 de setembro de 2009**. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final.
- COMITRE, A.L. D., REIS, B. F. Automatic Multicommutated Flow System for Ethanol determination in Alcoholic beverages by spectrophotometry. **Lab. Robot. Autom.**, 12, 31-36, 2000.
- Congresso Nacional - **LEI 9.847/1999** - Dispõe sobre a fiscalização das atividades relativas ao abastecimento nacional de combustíveis, que trata a Lei 9.478, de 06 de agosto de 1997, que estabelece sanções administrativas e dá outras providências.
- DA SILVA, E.L., BUDZIAK, D., CARASEK, E. Determination of trace metals in fuel alcohol by FAAS using Nb₂O₅-SiO₂ as sorbent material in a flow injection on-line preconcentration system. **Anal. Lett.** 37, 1909-1924, 2004.
- DE LA GUARDIA, M., GALLIGNANI, M., GARRIGUES, S. Flow-injection derivative Fourier transform infrared determination of methyl tert-butyl ether in gasolines. **Anal. Chim. Acta**, 282, 543-550, 1993.
- DE PAULA, D.T., YAMANAKA, H., DE OLIVEIRA, M.F., STRADIOTTO, N.R. Determination of chloride in fuel ethanol using a polyaniline-chemically modified electrode in flow injection analysis. **Chem. Technol. Fuels Oils**, 44, 435-440, 2008.
- DE SOUZA, J.R., DUYCK, C.B., FONSECA, T.C.O., SAINT'PIERRE, T.D. Multielemental determination in oil matrices diluted in xylene by ICP-MS with a

- dynamic reaction cell employing methane as reaction gas for solving specific interferences. **J. Anal. At. Spectrom.**, 27, 1280-1286, 2012.
- DEL RIO, V., LARRECHI, M.S., CALLAO, M.P. Determination of sulphate in water and biodiesel samples by a sequential injection analysis—Multivariate curve resolution method. **Anal. Chim. Acta**, 676, 28-33, 2010a.
- DEL RIO, 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, 1572-1577, 2010b.
- DINIZ, P.H.G.D., PISTONESI, M.F., ARAÚJO, M.C.U., BAND, B.S.F. Eco-friendly sonoluminescent determination of free glycerol in biodiesel samples. **Talanta**, 114, 38-42, 2013.
- DO CARMO, S.N., DAMÁSIO, F.Q., ALVES, V.N., MARQUES, T.L., COELHO, N.M.M. Direct determination of copper in gasoline by flame atomic absorption spectrometry after sorption and preconcentration on *Moringa oleifera* husks. **Microchemical Journal**, 110, 320-325, 2013.
- ECONOMOU, A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. *Trends Anal. Chem.*, 24, 416-425, 2005.
- EN 14105 **Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents**, European Standard— EN. Revisada em 2011.
- EN 14111 **Fat and oil derivatives - Fatty Acid methyl Esters (FAME) - Determination of iodine value**, European Standard— EN. Revisada em 2003.
- EN 14214 **Liquid petroleum products - Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications - Requirements and test methods**, European Standard— EN. Revisada em 2014.
- ESCOTT, R.E.A., TAYLOR, A.F. Determination of water by flow injection analysis using Karl Fischer reagent with electrochemical detection. **Analyst**, 110, 847-849, 1985.
- FATIBELLO-FILHO, O., BORGES, M.T.M.R. Flow-injection conductometric determination of acidity in industrial hydrated ethyl alcohol. **Anal. Chim. Acta**, 366, 81-85, 1998.
- FERRARI, R. A., SOUZA, W. L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Quím. Nova**, 32, 106-111, 2009.

- FLETCHER, P.J., ANDREW, K.N., FORBES, S., WORSFOLD, P.J. Automated Flow Injection Analyzer with On-Line Solid-Phase Extraction and Chemiluminescence Detection for the Determination of Dodecylamine in Diesel Fuels. **Anal. Chim. Acta**, 75, 2618-2625, 2003.
- GALLIGNANI, M., GARRIGUES, S., DE LA GUARDIA, M. Direct determination of benzene in gasoline by flow-injection Fourier transform infrared spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, 214, 261-274, 1993.
- HAMELINCKA, C. N., FAAIJ, A. P. C. Outlook for advanced biofuels. **Energy Policy**, 34 3268-3283, 2006.
- HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques. **J Chromatogr B**, 879, 1270-1281, 2011.
- HONORATO, R.S., ARAUJO, M.C.U., LIMA, R.A.C., ZAGATTO, E.A.G., 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, 91-97, 1999.
- KAMMEN, D.M. **A hora e a vez da energia renovável**. Scientific American. 53, 52-59, 2006.
- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters, **Fuel Process. Technol.**, 86, 1059-1070, 2005.
- KNOTHE, G. **Manual de Biodiesel**. Edgard Blücher, São Paulo: 2006.
- LENEHAN, C.E., BARNETT, N.W., LEWIS, S.W., Sequential Injection Analysis. **Analyst**, 127, 997-1020, 2002.
- LI, Q., GAO, L. Spectrophotometric Determination of Tiopronin Using Its Catalytic Reaction between Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate and Hydroxyl Ion. **Anal. Sci.**, 25, 89-93, 2009.
- LI, Q., ZHANG, H. Study of methanol catalyzed reaction between sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate and hydroxyl ion and its application in the determination of methanol. **Spectrochim. Acta. A**, 71, 245-251, 2008a.
- LI, Q., ZHANG, H. A novel spectrophotometric method for the determination of aminophylline in pharmaceutical samples in the presence of methanol. **Spectrochim. Acta. A**, 70, 284-289, 2008b.
- Lide. Handbook of Chemistry and Physics. CRC California, 2005.

- LIMA, J.L.F.C., LAPA, R.A.S., SANTOS, J.R. Development of a tubular fluoride potentiometric detector for flow analysis: Evaluation and analytical applications. **Anal. Chim. Acta**, 583, 429-436, 2007.
- LIMA, M.B., INSAUSTI, M., DOMINI, C.E., PISTONESI, M.F., ARAÚJO, M.C.U., BAND, M.B.S.F. Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction. **Talanta**, 89, 21-26, 2012a.
- LIMA, M.B., BARRETO, I., 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, 118-122, 2012b.
- LIMA, G.F., OHARA, M.O., CLAUSEN, D.N., NASCIMENTO, D.R., RIBEIRO, E.S., SEGATELLI, M.G., BEZERRA, M.A., TARLEY, C.R.T. Flow injection on-line minicolumn preconcentration and determination of trace copper ions using an alumina/titanium oxide grafted silica matrix and FAAS. **Microchim. Acta**, 178, 61-70, 2012c.
- LIRA, L.F.B., SANTOS, D.C.M.B., GUIDA, M.A.B., STRAGEVITCH, L., KORN, M.G.A., PIMENTEL, M.F., PAIM, A.P.S. Determination of phosphorus in biodiesel using FIA with spectrophotometric detection. **Fuel**, 90, 3254-3258, 2011.
- LOBO, I.P., FERREIRA, S.L., CRUZ, R.S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Quim. Nova**, 32, 1596-1608, 2009.
- LOPES NETO, V.R. **Exame de qualificação de doutorado**, Universidade Federal da Bahia, 2009.
- MA, L., ZHANG, Z., LI, Q. Spectrophotometric determination of boron based on charge transfer reaction. **Spectrochim. Acta. A**, 79, 599-602, 2011.
- MARUTA, A.H., PAIXÃO, T.R.L.C. Flow injection analysis of free glycerol in biodiesel using a copper electrode as an amperometric detector. **Fuel**, 91, 187-191, 2012.
- Medida provisória 647/14: **Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, e dá outras providências**. Congresso Nacional: Poder Executivo, 29.05.2014.
- MERVARTOVA, K.; POLASEK, M.; CALATAYUD, J.M. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 45, 367-381, 2007.

MME – Ministério de Minas e Energia, **Balço Energético Nacional 2006** – Relatório Final, disponível em www.mme.gov.br, acesso em 06/01/2010

MIRO, M., CERDA, V., ESTELA, J.M. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. **Trends Anal. Chem.**, 21, 199-210, 2002.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, 77, 2008.

NAKAYA, M., OSHIMA, M., TAKAYANAGI, T., MOTOMIZU, T., MOTOMIZU, S., YAMASHITA, H. Sensitive fluorimetric flow injection analysis for fluoride ion with a novel reagent, 2',7'-dichlorofluorescein di-*tert*-butyldimethylsilyl ether, **Talanta**, 84, 1361-1365, 2011.

OLIVEIRA, F.S., LEITE, B.C.O., ANDRADE, M.V.S., KORN, M., Determination of Total Aldehydes in Fuel Ethanol by MBTH Method - Sequential Injection Analysis, **J. Braz. Chem. Soc.**, 16, 87-92, 2005.

OLIVEIRA, F.S., KORN, M. Spectrophotometric determination of sulphate in automotive fuel ethanol by sequential injection analysis using dimethylsulphonazo(III) reaction. **Talanta**, 68, 992-999, 2006.

PAYÁN, M.R., LÓPEZ, M.A.B., FERNÁNDEZ-TORRES, R., NAVARRO, M.V., MOCHÓN, M.C., Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of ibuprofen followed by FIA-chemiluminescence determination using the acidic permanganate–sulfite system. **Talanta**, 79, 911-915, 2009.

PEREIRA, A.C., ROCHA, F.R.P., Liquid-liquid microextraction in a multicommuted flow system for direct spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel. **Anal. Chim. Acta**, 829, 28-32, 2014.

PEREIRA, A.C., REIS, B.F., ROCHA, F.R.P. An air carrier flow system for the spectrophotometric determination of water in biodiesel exploiting bleaching of the cobalt chloride complex. **Talanta**, 131, 21-25, 2015.

PINZI, S., PRIEGO CAPOTE, F., RUIZ JIMÉNEZ, J., DORADO, M.P., LUQUE DE CASTRO, M.D. Flow injection analysis-based methodology for automatic on-line monitoring and quality control for biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, 100, 421-427, 2009.

Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. Disponível em www.mme.gov.br/programas/biodiesel, acessada em julho de 2014.

- RAMOS, M.J., FERNÁNDEZ, M.C, RODRÍGUEZ, A.C.L., PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresour. Technol.**, 100, 261-268, 2009.
- REIS, B. F. e BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos Injetores Empregados Em Sistemas de Análise Química Por Injeção Em Fluxo. **Quím. Nova**, 16, 570-573, 1993.
- REIS, B.F., GINÉ, M.F., ZAGATTO, E.A.G.L., LIMA, J.L.F.C., LAPA, R.A.S. Multicommutation In Flow Analysis. Part 1. Binary Sampling: Concepts, Instrumentation And Spectrophotometric Determination Of Iron In Plant Digest. **Anal. Chim. Acta**, 293, 129-138, 1994.
- RIBEIRO, S.K. Aposta no Biodiesel. **Scientific American**. 53, 60-64, 2006.
- RIBEIRO, M.F.T., SANTOS, J.L.M., LIMA, J.L.F.C. Piezoelectric pumping in flow analysis: Application to the spectrophotometric determination of gabapentin. **Anal. Chim. Acta**, 600, 14-20, 2007.
- RÓDENAS-TORRALBA, E., VENTURA-GAYETE, J., MORALES-RUBIO, A., GARRIGUES, S., GUARDIA, M. Multicommutation Fourier transform infrared determination of benzene in gasoline. **Anal. Chim. Acta**, 512, 215-221, 2004.
- ROSCOE, G.A., MILES, R., TAYLOR, C.G. Determination of potassium in gasoline and lubricating oils by a flow-injection technique with flame atomic emission spectrometric detection. **Anal. Chim. Acta**, 234, 439-444, 1990.
- RUZICKA, J., MARSHALL, G.D. Sequential Injection - a New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays. **Anal. Chim. Acta**, 237, 329-343, 1990.
- RUZICKA, J., GUBELI, T. Principles of stopped-flow sequential injection analysis and its application to the kinetic determination of traces of a proteolytic enzyme. **Anal. Chem.**, 63, 1680-1685, 1991.
- SAINT'PIERRE, T.D., TORMEN, L., FRESCURA, V.L.A., CURTIUS, A.J. The direct analysis of fuel ethanol by ICP-MS using a flow injection system coupled to an ultrasonic nebulizer for sample introduction. **J. Anal. At. Spectrom**, 21, 1340-1344, 2006.
- SANCHEZ, R., TODOLÍ, J.S., LIENEMANN, C.P., MERMET, J.M. Universal calibration for metal determination in fuels and biofuels by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry based on segmented flow injection and a 350 °C heated chamber. **J. Anal. At. Spectrom**, 27, 937-945, 2012.

- SANTOS, J.L.M., RIBEIRO, M.F.T., DIAS, A.C.B., LIMA, J.L.F.C. ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping flow systems: The potential of simplicity. **Anal. Chim. Acta**, 600,21-28, 2007.
- SCHUCHARDT, U., RIBEIRO, M.L., GONÇALVES, A.R.A. Indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria- prima? **Quím. Nova**, 24, 247-251, 2001.
- SHARMA, Y.C., SINGH, B., UPADHYAY, S.N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, 87, 2355-2373, 2008.
- SILVA, S.V., SOUZA, G.B., FERRAZ, L.F.N., NOGUEIRA, A.R.A. Determination of chloride in milk using sequential injection automated conductimetry. **Food Chem.**, 67, 317-322, 1999.
- SILVA, F.G., ROCHA, F.R.P. A flow injection procedure based on solenoid micropumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel, **Talanta**, 83, 559-564, 2010.
- SILVA, S.G., MORALES-RUBIO, A., DE LA GUARDIA, M., ROCHA, F.R.P. Sequential spectrofluorimetric determination of free and total glycerol in biodiesel in a multicommutated flow system. **Anal. Bioanal. Chem.** 401, 365-371, 2011.
- SILVESTRE, C.I.C., SANTOS, J.L.M., LIMA, J.L.F.C., ZAGATTO, E.A.G. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. **Anal. Chim. Acta**, 652, 54-65, 2009.
- SUSLICK, S.B., NOVAES, K. **Sistema de classificação de reservas de petróleo,utilizando geotecnologias.** 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás. Rio de Janeiro, 2003.
- TAYLOR, C.G., TREVASKIS, J.M. Determination of lead in gasoline by a flow-injection technique with absorption spectrometric detection. **Anal. Chim. Acta**, 179, 491-496, 1986.
- TEIXEIRA, L.S.G., LEÃO, E.S., DANTAS, A.F., PINHEIRO, H.L.C., COSTA, A.C.S., ANDRADE, J.B. Determination of formaldehyde in Brazilian alcohol fuels by flowinjection solid phase spectrophotometry, **Talanta**, 64, 711-715, 2004.
- TEIXEIRA, L.S.G., BEZERRA, M.A., LEMOS, V.A., SANTOS, H.C., JESUS, D.S., COSTA., A.C.S. Determination of copper, iron, nickel, and zinc in ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry using on-line preconcentration system. **Sep. Sci. Technol.**, 40, 2555-2565, 2005.

- TEIXEIRA, L.S.G., SOUZA, J.C., SANTOS, H.C., PONTES, L.A.M., GUIMARÃES, P.R.B., SOBRINHO, E.V., VIANNA, R.F. The influence of Cu, Fe, Ni, Pb and Zn on gum formation in the Brazilian automotive gasoline. **Fuel Process. Technol.**, 88, 73-76, 2007.
- TEIXEIRA, L.S.G., SANTOS, E.S., NUNES, L.S. Determination of copper, iron, nickel and zinc in ethanol fuel by energy dispersive X-ray fluorescence after pre-concentration on chromatography paper. **Anal. Chim. Acta**, 722, 29-33, 2012.
- THRASHER, J.D., KILBURN, K.H., ROTHENBERG, S.J. Embryo Toxicity and Teratogenicity of Formaldehyde. **Archives of Environ. Health**, 56, 300, 2001.
- TUBINO, M., QUEIROZ, C.A.R. Flow injection visible diffuse reflectance quantitative analysis of total sulfur in biodiesel, in plant leaves and in natural waters. **Ecl. Quím.**, 34, 29-36, 2009.
- VAHL, K., KAHLERT H., MÜHLEN von L., ALBRECHT, A., MEYER, G., BEHNERT, J. Determination of the titratable acidity and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis. **Talanta**, 111, 134-139, 2013.
- VALCÁRCEL, M., CÁRDENAS, M.S. **Automatización y miniaturización em química analítica**. Barcelona: Springer-Verlag, 2000.
- WINTERTON, N. Chlorine: the only green element - towards a wider acceptance of its role in natural cycles. **Green Chem.**, 2, 173-225, 2000.
- YAMANE, T., KOSHINO, K. Flow-injection systems for determination of trace manganese in various salts by catalytic photometric detection. **Talanta**, 43, 963-969, 1996.
- ZENKI, M., MINAMISAWA, K., YOKOYAMA, T. Clean analytical methodology for the determination of lead with Arsenazo III by cyclic flow-injection analysis. **Talanta**, 68, 281-286, 2005.