



NATHÁLIA CARVALHO COSTA

**SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO PARA DETERMINAÇÃO DE
ACIDEZ EM AMOSTRAS DE VINAGRE E ÓLEOS VEGETAIS**

Alfenas-MG

2018

NATHÁLIA CARVALHO COSTA

**SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO PARA DETERMINAÇÃO DE
ACIDEZ EM AMOSTRAS DE VINAGRE E ÓLEOS VEGETAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química,
Área de concentração: Química Analítica
Orientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Giovana de Fátima Lima
Martins

Alfenas-MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Costa, Nathália Carvalho

C837s Sistema de análise em fluxo contínuo para determinação de acidez em amostras de vinagre e óleos vegetais. / Nathália Carvalho Costa – Alfenas/MG, 2018.

55 f.: il --

Orientador: Pedro Orival Luccas.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.

Bibliografia.

1. Óleos vegetais. 2. Vinagre. 3. Acidez. 4. Titulometria. 5. Automação. 6. Análise por injeção de fluxo. I. Luccas, Pedro Orival. II. Título.

CDD-543

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

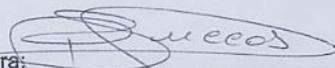
Nathália Carvalho Costa

“Sistema de análise em fluxo contínuo para determinação de acidez em amostras de vinagre e óleos vegetais”

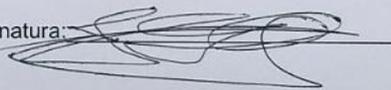
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 27/07/2018

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. José Maurício S. Ferreira da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Lidiane Raquel Verola Mataveli
Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Assinatura: Lidiane R. V. Mataveli

*Dedico esse trabalho a Deus e
a minha família que sempre
foram minha base e a
inspiração pra eu chegar até
aqui.*

*Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver **amor**, serei como o sino que ressoa ou como o prato que retine. O amor é paciente, o amor é bondoso.*

*Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. O amor nunca perece; mas as profecias desaparecerão, as línguas cessarão, a **Ciência** passará. Pois em parte conhecemos e em parte profetizamos; quando, porém, vier o que é **perfeito**, o que é imperfeito desaparecerá.*

(Adaptado de 1Cor 13)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiro a Deus que sem a sua graça e misericórdia eu não teria chegado até aqui e por ter colocado tantas pessoas no meu caminho, que com certeza posso chamar de “anjos”, aos quais continuo agradecendo:

Aos maiores anjos da minha vida mãe, pai, padrasto, sobrinha, irmã e irmão (que Alfenas me deu), vocês são a razão de tudo, obrigada por existirem, amo vocês.

Aos amigos que se tornaram minha família, que tive a graça de conhecer através da PUCA (Pastoral Universitária Católica de Alfenas) gratidão, vocês ajudam as dificuldades se tornarem mais leves e me levam pra mais perto céu.

À professora e querida amiga Dra. Cristiana Schmidt de Magalhães, agradeço pelo carinho de mãe que me ofertou durante todos esses anos, mostrando que a humanidade ainda conta com pessoas que exercitam a generosidade e o amor com o próximo sem restrições.

Ao melhor laboratório que a Unifal poderia ter representado pela professora e querida coorientadora Dra. Giovana de Fátima Lima Martins e as companheiras de congresso, dias inteiros no laboratório, melhores cafés, almoços e “fotossíntese” Gizele e Mariele, vocês são lindas, obrigada por toda ajuda, essa vitória também é de vocês.

E sem dúvida, ao professor Dr. Pedro Orival Luccas, quem sempre nos ajudou e acolheu como um amigo. Gratidão professor por nos mostrar que o ser humano não é feito apenas de interesses pessoais, pelos ensinamentos durante o curso e orientação... Alguém que me fez pensar: *“eu quero ser assim quando eu crescer”*.

Iniciei agradecendo meus maiores anjos e finalizo agradecendo todos os anjos que já passaram pela minha vida.

“Deus é bom o tempo todo, o tempo todo Deus é bom”.

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método analítico para determinação do índice de acidez em vinagres e óleos vegetais, utilizando os sistemas de análise em fluxo (FIA). No desenvolvimento do sistema construiu-se, no laboratório, um colorímetro portátil utilizando uma placa arduino uno® para leitura e processamento de sinal, diodo emissor de luz (LED) como fonte de radiação, fotodiodo como detector e cubetas de fluxo em acrílico (passo ótico de 2 cm). Na determinação de ácido acético em Vinagre, a avaliação do efeito dos fatores químicos e de fluxo foi realizada utilizando planejamento fatorial de dois níveis na otimização multivariada do sistema. A faixa de resposta linear, para a curva analítica obtida com HCl em meio aquoso, foi de $3,55 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ a $1,10 \text{ g L}^{-1}$, a frequência analítica foi de aproximadamente 30 leituras por hora. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram respectivamente $9,28 \times 10^{-5}$ e $3,55 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$. A precisão foi avaliada em termos do desvio padrão relativo ($n=10$), para concentrações de HCl $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ como sendo 0,58 e 1,2% respectivamente. A exatidão foi atestada empregando comparação com a titulação convencional, e os resultados foram condizentes (test-t pareado, $p=0.05$). Não foi possível a utilização do sistema FIA na determinação de acidez de óleos vegetais. A imiscibilidade entre amostra e fluxo carregador, provocou perturbações no fluxo, formação de emulsões e não repetibilidade dos sinais, inviabilizando a aplicação do sistema nessa determinação. O uso do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) em substituição ao solvente orgânico (éter) na titulação padrão, apresentou resultados satisfatórios com a vantagem de ser biodegradável e, portanto, menos agressivo ao meio ambiente. Determinações do índice de acidez, em amostras de óleos vegetais, obtidas no comércio local, com o método titulométrico proposto (empregando SDS), apresentaram os mesmos resultados que a titulação padrão, sendo, portanto, mais uma alternativa plausível para essa aplicação.

Palavras-chave: Óleo vegetal. Vinagres. Acidez. Titulação ácido-base. Automação. FIA

ABSTRACT

This work describes the development of an analytical method to determine the acidity index in vinegars and vegetable oils using Flow Injection Analysis systems (FIA). As the sensor, a portable colorimeter was constructed using an arduino uno® board for sign readings, a light emitting diode (LED) as a radiation source, photodiode as detector and an acrylic flow cuvette (optical pass of 2 cm). In the determination of acetic acid in Vinegar, the effects of chemical and flow factors were performed using the two-level factorial design in a multivariate optimization of the system. The linear response for the analytical curve, obtained with aqueous HCl, was $3.55 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ to 1.10 g L^{-1} , and the analytical frequency was approximately 30 readings per hour. The detection and quantification limits were 9.28×10^{-5} and $3.55 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$, respectively. Precision was evaluated in terms of the relative standard deviation ($n = 10$) for HCl concentrations of 0.005 mol.L^{-1} and 0.01 mol.L^{-1} as 0.58 and 1.2% respectively. Accuracy was checked using comparison with conventional titration, and the results were consistent (paired t-test, $p = 0.05$). It was not possible to use the FIA system to determine the acidity of vegetable oils. The sample immiscibility in the carrier solution caused perturbations in the flow, formation of emulsions and non-repeatability of the signals, becoming impossible the application of this method. Instead, it was used the sodium dodecyl sulfate (SDS) surfactant in substitution of the organic solvent (ether) in the standard titration. The results were satisfactory with the advantage of the SDS to be biodegradable and less aggressive to the environment. Determinations of the acid value, in samples of vegetable oils from local market using SDS, showed the same results as the standard titration, being a plausible alternative for this application.

Keywords: Vegetable oil. Vinegars. Acidity. Acid-base titration. Automation. FIA.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Ácido acético em vinagres.....	13
2.2	Óleos vegetais.....	14
2.3	Métodos para determinação de acidez em óleos	18
2.4	Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA).....	20
2.5	Surfactantes em sistemas imiscíveis	25
2.6	Otimização multivariada de processos em química analítica.....	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Generais	29
3.2	Específicos	29
4	JUSTIFICATIVA	30
5	METODOLOGIA	31
5.1	Equipamentos e acessórios.....	31
5.2	Reagentes e soluções.....	33
5.3	Sistema titulométrico padrão para a determinação do índice de acidez em amostras de vinagre e óleo.....	33
5.4	Sistema FIA proposto para determinação do índice de acidez	34
5.5	Procedimento de otimização.....	35
5.5.1	<i>Planejamento fatorial de dois níveis</i>	36
5.6	Figuras de mérito.....	38
5.6.1	<i>Faixa de resposta linear e linearidade</i>	38
5.6.2	<i>Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)</i>	38
5.6.3	<i>Precisão</i>	39
5.6.4	<i>Sensibilidade de calibração</i>	39
5.6.5	<i>Frequência de Leitura (FL)</i>	39

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	Perfil do sinal analítico no sistema	40
6.2	Procedimento de otimização	41
6.2.1	<i>Planejamento fatorial de dois níveis</i>	41
6.3	Figuras de Mérito e Validação do sistema FIA	44
6.4	Aplicação da metodologia em amostras aquosas	45
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

O vinagre é um fermentado alcoólico proveniente do mosto de frutas, vegetais, cereais, misturas hidroalcoólica ou mistura de vegetais¹.

Produzido através de processos bioquímicos distintos e resultantes da atividade de microrganismos por meio da fermentação alcoólica geralmente pela ação de espécies de *Saccharomyces* sobre as matérias-primas açucaradas e/ou amiláceas, acompanhado pela fermentação acética e pela ação de bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter*.

O vinagre poder ser utilizado na forma alimentícia, como condimentos concedendo sabor ácido e como conservante evitando o crescimento de microrganismos, podendo também ser utilizado como amaciante de carnes temperadas e legumes em conservas². Além dessas funcionalidades o vinagre pode apresentar efeitos fisiológicos positivos em relação à regulação da glicose sanguínea³, controle da pressão arterial, auxílio da digestão e promoção da absorção de cálcio⁴.

Já o óleo vegetal é extraído quase sempre das sementes de plantas, sendo encontrado geralmente na forma líquida em temperatura ambiente ele é composto predominantemente de triglicerídeos provenientes da condensação do glicerol e ácidos graxos. Considerando o panorama mundial observa-se um crescente aumento no consumo de óleos vegetais em comparação as gorduras animais, isso em virtude da disponibilidade de matéria-prima, custos de produção, saúde e desenvolvimento industrial. Como consequência também eleva-se a produção de óleos de diversas espécies vegetais, sendo as principais fontes de matéria-prima: a soja, amendoim, palma, mamona, dendê, girassol, milho, coco, linhaça, entre outros⁵.

O Brasil destaca-se mundialmente como um importante processador e exportador de óleos vegetais para diversos países. Tendo em vista o tipo de produto e em decorrência da disponibilidade e custos o óleo de soja lidera o consumo de óleos vegetais no Brasil, garantindo ao país papel expressivo no mercado mundial também em termos de produção. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC Nº. 270, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005, descreve o regulamento técnico para óleos e gorduras vegetais visando características mínimas de qualidade aos óleos vegetais⁶.

Dentre os parâmetros relacionados à qualidade dos óleos vegetais, têm-se as medidas de acidez, o índice de peróxidos, teor de iodeto e o índice de saponificação. O índice de acidez em particular é um importante indicador da qualidade em óleos vegetais, podendo ser expresso em termos da quantidade em miligramas de KOH consumidos na neutralização de ácidos graxos, nas formas livres em 1 g de óleo^{7,8}.

No óleo de oliva, por exemplo, acidez se refere à proporção de ácidos graxos livres, em relação ao ácido 13leico presente no azeite, não podendo ser superior a 2% no óleo destinado ao consumo humano⁹. Já o índice de peróxidos, determina a oxidação inicial do azeite e a deterioração que podem ter sofrido os antioxidantes, por exemplo, os polifenóis. Entretanto, níveis baixos de peróxidos, pode não significar uma boa estabilidade oxidativa¹⁰.

As técnicas mais empregadas para a determinação de acidez em vinagre e óleo vegetal são titulações manuais com indicadores convencionais e titulações potenciométricas com eletrodo de vidro. Contudo, esses procedimentos podem apresentar inconvenientes como erro visual do analista, utilização de equipamentos especiais que demandam grande tempo de execução¹¹. Diante disso, o presente trabalho traz como foco o desenvolvimento de um sistema que busca minimizar as limitações existentes nos procedimentos convencionais para determinação do índice de acidez em vinagres e óleos vegetais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido acético em vinagre

Produzidos a partir da fermentação alcoólica, os vinagres são produtos líquidos muito utilizados como remédios e relatados, por muitas culturas, como um grande fornecedor de efeitos benéficos á saúde quando consumidos regularmente. Possui vários tipos de polifenóis, micronutrientes e compostos bioativos que contribuem para seus efeitos farmacológicos, dentre eles, antidiabéticos, antimicrobianos, antiobesidade, antioxidantes e efeitos anti-hipertensivos. Existe uma grande variedade de vinagre no mercado como, por exemplo, vinagre de arroz, de maçã, balsâmico, preto e vinho branco e tinto, sendo todos produzidos com diferentes procedimentos de fermentação e matérias-primas, o que dá a cada um deles um sabor único. O ácido acético é o principal composto volátil encontrado no vinagre e o responsável pelo seu aroma forte e sabor azedo¹².

O ácido acético é muito utilizado na indústria alimentar como aditivo para controle de níveis de pH e melhoria do sabor, na produção de plásticos, pesticidas, corantes, polímeros sintéticos e cola. Devido a sua forte propriedade corrosiva pode causar doenças estomacais¹³.

Segundo a legislação brasileira, independente da forma em que o vinagre foi obtido, o mínimo de ácido acético que deve conter em sua constituição é de 40 gramas de ácido acético por litro de solução, correspondendo a 4g/100 mL de solução¹⁴. Este teor pode ser determinado por volumetria de neutralização, entre um ácido fraco e uma base forte, ocorrendo uma reação rápida e completa¹⁵.

Apesar de esta técnica ser simples e com resultados confiáveis, existem algumas desvantagens quando utilizadas, incluindo geração de resíduo excessivo, etapas tediosas de operação, uso de extensos objetos de vidro e necessidade de grandes volumes de reagentes.

Embora a literatura reporte diferentes procedimentos para fins de determinação do índice de acidez, algumas limitações ainda persistem. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos que busquem contornar ou minimizar tais inconvenientes possibilitando a medida desse parâmetro de forma mais simples, rápida e de baixo custo é de grande significado. Os sistemas de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica podem ser uma boa alternativa nesse sentido, uma vez que propiciam menor manipulação, baixo consumo de reagentes e amostras, além de permitir o desenvolvimento de sistemas com tratamento de amostra *on-line* e versatilidade na automação e acoplamento com diversos sistemas de detecção.

2.2 Óleos vegetais

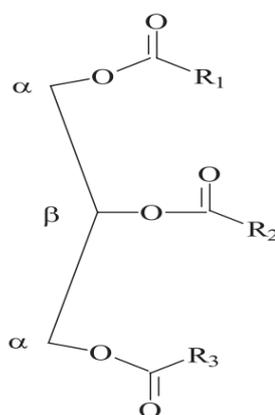
Os óleos e gorduras vegetais são substâncias hidrofóbicas, constituídas principalmente de glicerídeos de ácidos graxos, na maioria das vezes extraídos das sementes de plantas. A designação de óleos ou gorduras baseia-se na sua forma física a temperatura ambiente, os óleos no caso são líquidos e a designação de gorduras é conferida aos produtos que se encontram na forma sólida a essa temperatura⁸.

Os compostos orgânicos, constituintes dos óleos, possuem de uma a quatro ligações duplas entre os átomos de carbono (insaturações), o maior número de insaturações e conseqüente menor ponto de fusão, explica a forma líquida à temperatura ambiente¹¹. Por outro lado, gorduras como manteiga, banha e sebo comestível são exemplos de gordura animal, que contém um número de ligações simples entre átomos de carbono (saturações) maior que o número de insaturações possuindo alto ponto de fusão e, portanto são sólidos a temperatura ambiente.

Além de triacilgliceróis (Figura 1), os óleos possuem vários componentes em menor proporção como: mono e diglicerídeos (importantes como emulsificantes) ácidos graxos livres; tocoferol (importante antioxidante) proteínas, esteróis e vitaminas. Os lipídeos, proteínas e carboidratos são compostos de grande importância na indústria, por serem fonte de energia e participarem da produção de ácidos graxos, glicerina, lubrificantes, carburantes, biodiesel, além de inúmeras outras aplicações¹⁶.

Podendo ser utilizados como produtos alimentícios, matéria-prima para tintas, cosméticos, lubrificantes, vernizes entre outras aplicações os óleos vegetais são conhecidos desde a antiguidade. Atualmente os óleos vegetais representam um dos principais produtos extraídos de plantas sendo cerca de dois terços da produção utilizados na dieta humana. O crescimento da demanda desse tipo de produto em comparação as gorduras animais está associado principalmente a mudanças nos hábitos alimentares, disponibilidade de matéria-prima, custos de produção e desenvolvimento industrial⁵.

Figura 1. Estrutura geral de um triacilglicerol [R_1 , R_2 , R_3 = grupo alquil saturado ou insaturado; podendo ser igual ou diferente].

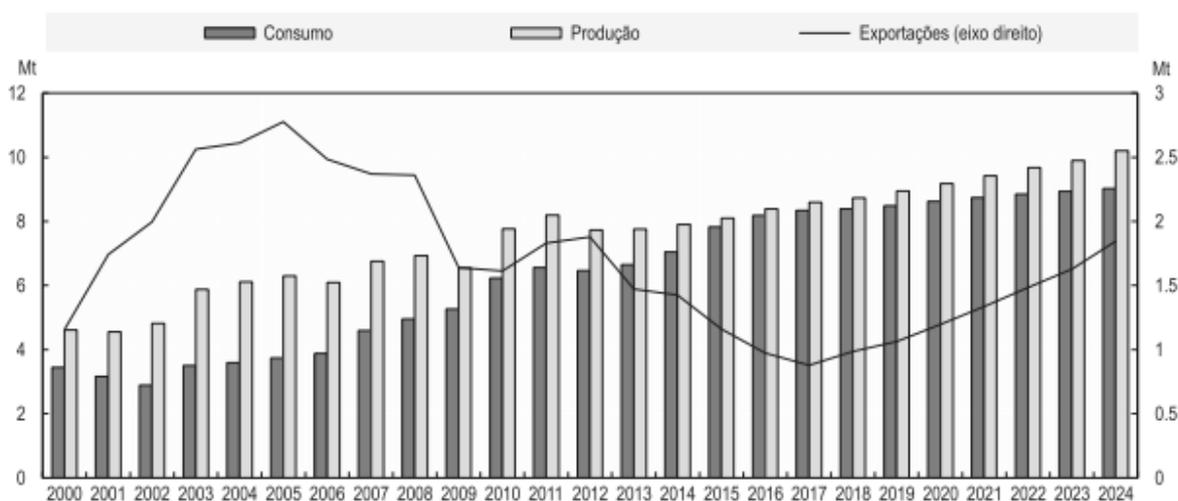


Fonte: Reda et al., 2007.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil tem grande potencial de expansão da produção de oleaginosas, dentre os principais produtores e exportadores desse setor. A produção média brasileira é comparável a dos Estados Unidos, com taxa média anual da produção de óleo vegetal crescendo 2,5% estimando-se um aumento para 10,2 milhões de toneladas até 2024. No entanto, para o consumo humano a demanda interna de óleo vegetal aumentará com uma taxa menor, crescendo apenas 2,2% ao ano, cerca de 5,2 milhões de toneladas (Figura 2). Para alcançar 24,2 kg por pessoa o consumo per capita de óleo vegetal deve crescer em torno de 1,5% ao ano.

Parte da produção de oleaginosas é destinada para a obtenção de biodiesel. O consumo desse tipo de óleo aumentará num total de 1,4% ao ano para 9 milhões de toneladas, equivalente a 34%, aumentando assim fortemente a demanda de biodiesel. No setor de exportações de óleo vegetal são previstas 1,8 milhões de toneladas em 2024, praticamente sem alteração da 1,6 milhões de toneladas no período base¹⁷.

Figura 2. Consumo, produção e exportações de óleos vegetais no Brasil.



Fonte: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação-FAO

Os óleos vegetais possuem ainda propriedades benéficas para a saúde. Estudos mostram que, uma vez isolados e concentrados, alguns ingredientes ativos nos óleos podem ser utilizados no tratamento de uma série de doenças, como síndrome do cólon irritável e doença hepática crônica. Alguns exemplos são: as propriedades hipocolesterolêmicas associadas ao ácido 17onsequen (ácido graxo polinsaturado), o ácido ricinoléico que é um poderoso estimulante laxativo, o óleo de onagra com benefícios ao tratamento de dores no peito e eczemas atópicos. Na extração do óleo vegetal, muitos ingredientes benéficos podem ser extraídos e concentrados a partir do processo de refinação do subproduto, como os betacarotenos, vitamina K, fosfatidilcolina que é utilizada no tratamento de doenças hepáticas e a fosfatidilserina, utilizada na prevenção do envelhecimento cerebral¹⁸.

Segundo Fonseca e Yoshida¹⁹ os óleos vegetais que possuem grande quantidade de ácidos graxos insaturados podem ser mais passíveis aos ataques de agentes oxidantes

como os radicais livres, enzimas e metais, o que favorece os processos de degradação. As principais alterações que ocorrem nos óleos estão associadas a auto-oxidação, polimerização térmica ou a oxidação térmica, que podem ser acelerados pelo calor, luz (foto-oxidação), ionização, traços de metais ou catalisadores.

A acidez de óleos e gorduras é proveniente da hidrólise enzimática, que ocorre na semente ou no fruto em condições de alta umidade. Alterações na acidez também podem ser observadas por processos de oxidação não enzimática, o que acarreta aumento no valor de acidez. A vitamina E contida nos óleos vegetais comporta-se como um poderoso antioxidante. Assim podem-se mencionar três agentes que contribuem com a modificação estrutural dos óleos e diminuição da qualidade: o oxigênio do ar que causa alteração oxidativa, a umidade dos alimentos causando alteração hidrolítica e a elevação da temperatura, por volta de 180°C, que provoca alteração térmica²⁰.

O índice de acidez baseia-se na determinação da quantidade, em miligramas, de hidróxido necessária para neutralizar os ácidos graxos livres (R-COOH) em 1 grama de amostra do óleo em análise. Devido ao aquecimento e a exposição à luz a rancidez dos óleos e gorduras quase sempre é acompanhada pela formação de ácido graxo livre, podendo ser expressa também, em miligramas de solução normal % m/m. A acidez livre de uma gordura é variável, intimamente relacionada com a qualidade e natureza da matéria-prima, pureza, qualidade e principalmente, com as condições de conservação. Um alto índice de acidez expressa o desenvolvimento de reações hidrolíticas e esse tipo de análise revela o estado de conservação do óleo²¹. A Tabela 1 apresenta o índice de acidez de alguns óleos.

Tabela 1- Índice de acidez de alguns óleos vegetais

Tipos	Ácido oleico % p/p
Óleo de oliva	1,692
Óleo de soja	0,25
Óleo de amendoim	0,423
Óleo de gergelim	0,423
Óleo de girassol	0,423
Banha extra	0,282

Fonte: Morreto et al. 2008.

A grande utilização dos óleos comestíveis na preparação de produtos fritos com oxidação e produção de substâncias potencialmente tóxicas pode trazer efeitos maléficos que incluem pré-disposição à aterosclerose, ação mutagênica ou carcinogênica, que são os principais riscos a saúde com o consumo de tais substâncias²². Neste sentido se faz necessário um controle rigoroso dos óleos de frituras, uma vez que a utilização desse produto depende, na maioria das vezes, da boa qualidade.

2.3 Métodos para determinação de acidez em óleos

Tendo em vista a relação entre o parâmetro índice de acidez e a qualidade dos óleos, a literatura relata vários métodos para essa determinação, sendo grande parte baseadas nas técnicas de titulações ácido-base em solventes não aquosos. Contudo, observa-se inconvenientes como: a toxicidade dos solventes orgânicos; solubilidade incompleta de alguns óleos em álcool (mesmo sob aquecimento); condições ideais para a titulação⁷.

A literatura reporta várias metodologias para a determinação dos índices de acidez. A AOAC (Official Methods of Analysis)²³, o Instituto Adolfo Lutz²⁴ e a Farmacopéia Brasileira²⁵ preconizam a titulometria para a determinação quantitativa desse índice.

Visando a proteção da saúde da população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu características e identidade mínimas que a qualidade dos óleos vegetais e gorduras devem seguir. Tais normas metodológicas descritas devem estar de acordo com a qualidade mínima exigida. Segundo a ANVISA⁶ o índice de acidez para o óleo vegetal expresso em gramas de ácido oleico/100g de amostra é de no máximo 0,3% para óleos refinados e para os não refinados é aceitável teor de máximo correspondente a 1%.

Um dos maiores desafios na determinação da acidez de óleos vegetais, segundo Mahesar et al.²⁶ é determinar o ponto final precisamente durante a titulação, quando se trata de óleos crus escuros, com o uso de um indicador. Embora dificuldades possam ocorrer também em titulações potenciométricas, uma vez que o eletrodo de vidro

originalmente responde a concentração hidrogeniônica em meio aquoso e tem sua resposta alterada em meio orgânico²⁷, alguns trabalhos reportam a viabilidade da titulação potenciométrica para essas determinações, principalmente quando a quantidade de amostra é um fator limitante¹¹.

As titulações potenciométricas envolvem medidas de potencial utilizando um eletrodo indicador, que responde a atividade do analito em solução, e um eletrodo de referência, com potencial constante e conhecido, e um dispositivo de medida do potencial. Como resultado pode-se construir curvas de titulação relacionando o volume de titulante, com o potencial da solução titulada. Em comparação, a titulação convencional a potenciométrica apresenta como principais vantagens: obtenção de dados mais confiáveis; uma vez que não faz uso de indicador aplicam-se em reações onde a titulação convencional é inviável devido a carência de indicador adequado, permite titulações em amostras diluídas, não se restringe pela cor ou turbidez das soluções⁷. No entanto, como principal desvantagem tem-se o maior tempo de análise e assim, buscando maior eficiência é comum à automação dos sistemas envolvendo titulações potenciométricas e o uso de tituladores automáticos, disponíveis comercialmente²⁸.

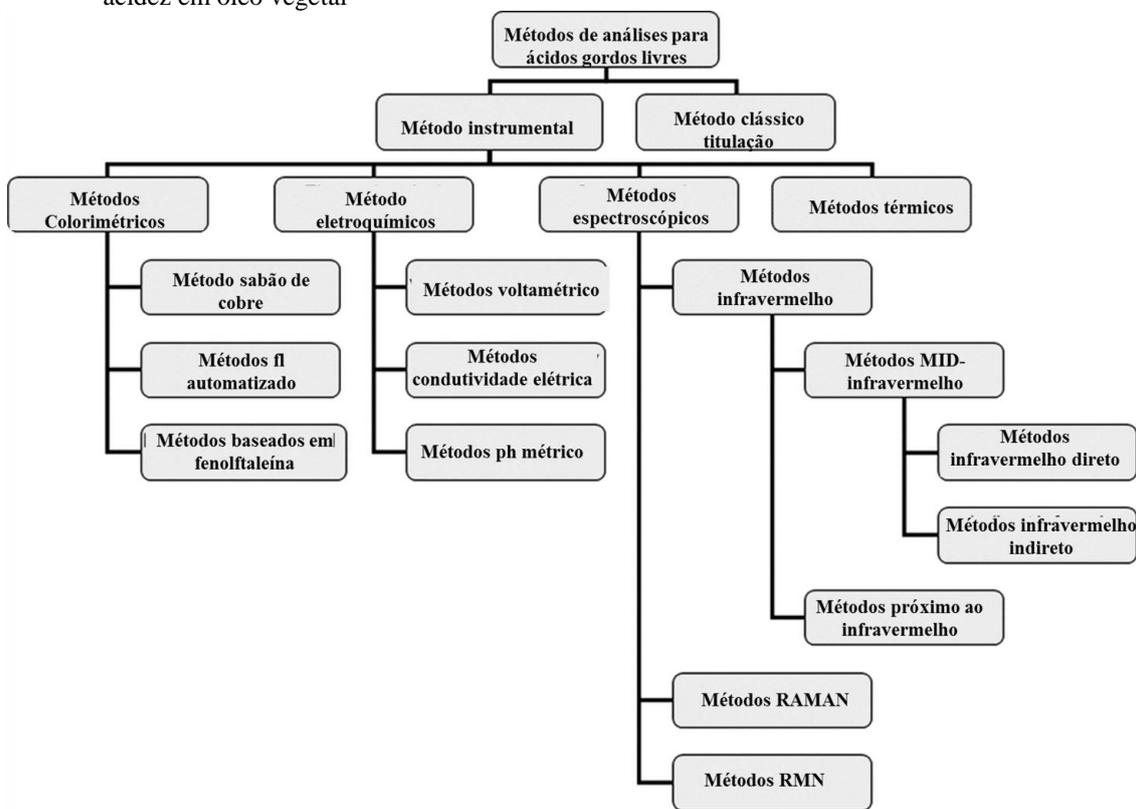
Atualmente têm sido utilizados diversos tituladores automáticos com softwares com a capacidade de determinar os pontos de inflexão da curva de titulação partindo de tratamentos matemáticos como: o método da tangente, de Tubbs e da derivada das curvas de titulação²⁹. Precisão, exatidão e versatilidade são as principais vantagens desde tipo de titulador, enquanto como desvantagens se têm o preço e a relativa dificuldade nas etapas de preenchimento da bureta.

Além desses, vários outros métodos para a determinação de acidez em óleos vegetais têm sido estudados nos últimos anos, desde a década de 1950, onde as técnicas espectrofotométricas foram muito abordadas e publicadas utilizando métodos colorimétricos, podendo citar também técnicas eletroquímicas e uso de métodos espectroscópicos de infravermelho (IR).

Outras técnicas que não utilizam titulação, como a cromatografia em fase gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar, podem também serem utilizadas nesse tipo de determinação, porém embora apresente características satisfatórias, podem necessitar de pré-tratamento da amostra como: extração líquido-líquido, extração em fase sólida ou derivatização³⁰. A Figura 3

apresenta o diagrama de blocos que mostra o desenvolvimento dos métodos para a determinação do teor de acidez em óleos vegetais nas últimas décadas.

Figura 3: Adaptado-Diagrama em blocos dos métodos desenvolvidos para a determinação do teor de acidez em óleo vegetal



Fonte: TROJANOWICZ et al; 2016.

2.4 Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)

O primeiro sistema em fluxo foi proposto por Skeggs e consistiu de um sistema em fluxo contínuo segmentado (CFA) com bolhas de ar. Essa segmentação era usada visando melhorias na mistura amostra/reagente e limpeza do sistema entre amostras sucessivas³¹.

Em meados dos anos setenta, outro grupo de pesquisadores desenvolveu um sistema semelhante, porém sem a introdução de bolhas de ar, essa nova alternativa foi proposta por Ruzicka e Hansen, juntamente com pesquisadores brasileiros do Centro de

Energia Nuclear na Agricultura, e denominada sistema de análise por injeção em fluxo (do inglês, *Flow Injection Analysis –FIA*), o qual possibilita diferentes configurações, de acordo com a necessidade do sistema, e impulsionou uma série de trabalhos, aprimorando o nível de automação dos sistemas de análise química³².

De maneira simples pode-se explicar um sistema FIA como sendo a canalização e bombeamento de reagentes, de maneira estratégica, para provocar reações de interesse e introduzir em um detector com capacidade de gerar sinal proporcional a concentração do analito. Onde a tubulação geralmente possui diâmetro interno da ordem de 0,8 mm.

Nestes sistemas reagentes e amostras são inseridos no fluxo carregador, podendo estes ser impulsionados por uma bomba peristáltica ou por meio de gravidade a uma vazão previamente definida. A zona de amostra, criada em linha, passa pelo detector e gera ao sinal analítico que posteriormente é registrado^{33, 34}.

O sistema mais simples, linha única, consiste em um fluxo principal constituído de uma solução denominada carregadora, na qual são inseridas alíquotas da amostra a ser transportada até o detector. No percurso, podem ocorrer interações entre amostra e fluxo carregador provocando reações de interesse.

Dentre as vantagens que esses sistemas possuem destacam-se a versatilidade, rapidez, reprodutibilidade, mínima manipulação de amostra, simplicidade, menor consumo de amostra e reagentes e conseqüente baixa geração de resíduos³⁵. Desde 1970 observa-se um crescente número de trabalhos publicados sobre análise por injeção em fluxo³⁶.

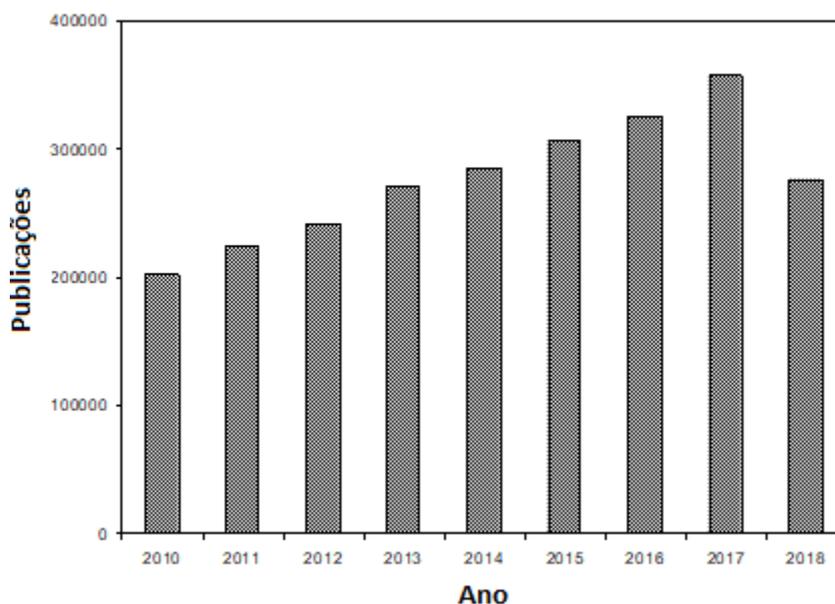
Tituladores automáticos baseados em sistemas de injeção em fluxo não segmentados, sistemas monossegmentados e flow-batch ou tituladores gravimétricos tem sido propostos. Destacam-se como principais vantagens desse tipo de titulador o registro do sinal analítico a cada adição do titulante, onde se obtém a curva de titulação em que o ponto final é determinado, mesmo onde o salto potenciométrico não é intenso ou o sinal analítico no ponto de equivalência seja em função da concentração do analito. Em casos assim, pode-se utilizar os métodos gráficos ou de linearização para a identificação do ponto final (métodos de Gran II, Sorensen, da derivada primeira e segunda etc)³⁷.

De acordo com a base de dados Science Direct³⁶, nos últimos dez anos foram publicados aproximadamente 30 mil artigos, tendo FIA, flow system, continuous flow, segmented flow, flow injection, como tópicos pesquisados. Os gráficos apresentados

nas Figuras 4 e 5 abaixo apresentam a soma de publicações, por anos, das palavras citadas nos últimos dez anos em porcentagem e a porcentagem total de publicações.

Segundo estudos realizados por Bahruddin et al.³⁸, em uma determinação de acidez de óleo vegetal com amostras de altas concentrações é possível utilizar um sistema de análise em fluxo de linha única, com pré-diluição *off-line* de amostras empregando indicadores fenolftaleína e azul de bromotimol, onde os resultados demonstram superioridade do método em amostras coloridas, a qual é inviável utilizando método titulométrico convencional. Além dos bons resultados para óleos vegetais ela também pode ser facilmente aplicada em biocombustíveis, permitindo ainda a automatização do sistema, obtendo-se método com mínima intervenção humana e baixo custo.

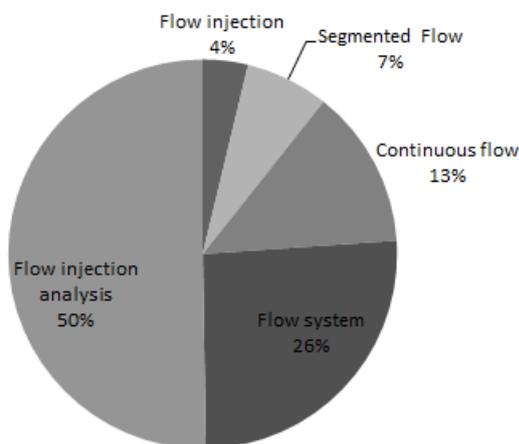
Figura 4: Publicações nos ultimos 10 anos com as seguintes palavras chave: *FIA, flow system, continuous flow, segmented flow, flow injection*.



Fonte: Science Direct, acessado 05/06/2018.

Figura 5: Porcentagem dos trabalhos publicados com a seguinte palavra chave: *Flow injection analysis*, *Flow system*, *Continuous flow*, *Segmented flow* e *Flow injection*

Porcentagem total de trabalhos publicados



Fonte: Science Direct, acessado 05/06/2018,

Conforme citado por Trojanowicz et al.³⁰ a lista abaixo contém de 17 livros onde encontram-se metodologias sobre injeção em fluxo publicadas.

Ademais tendo em vista a diversidade de fatores que podem estar relacionados à eficiência das metodologias analíticas, a otimização dos parâmetros que afetam significativamente o sistema é de grande relevância, para essa finalidade as ferramentas quimiométricas são bastante úteis.

- a) J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Flow Injection analysis*, Wiley, New York, USA, 1st edn, 1981; 2nd edn, 1988.
- b) M. Valcarcel and M. D. Luque de Castro, *Flow-Injection Analysis, Principles and Applications*, Ellis Horwood, Chichester, UK, 1987.
- c) *Flow Injection Atomic Spectroscopy*, ed. J. L. Burguera, Marcel Dekker, New York, USA, 1989. • B. Karlberg and G. E. Pacey, *Flow Injection Analysis. A Practical Guide*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1989.
- d) Z.-L. Fang, *Flow-Injection Separation and Preconcentration*, VCH Verlag, Weinheim, Germany, 1993.
- e) W. Frenzel, *Flow Injection Analysis. Principles, Techniques and Applications*, Technical University Berlin, Germany, 1993.
- f) Z.-L. Fang, *Flow Injection Atomic Spectrometry*, Wiley, Chichester, UK, 1994.

- g) J. M. Calatayud, *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory*, Taylor and Francis, London, UK, 1997.
- h) *Flow Analysis with Spectrometric Detectors*, ed. A. Sanz-Medel, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1999.
- i) M. Trojanowicz, *Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications*, World Scientific, Singapore, 2000.
- j) *Advances in Flow Analysis*, ed. M. Trojanowicz, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2008.
- k) *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, ed. S. D. Kolev and I. D. McKelvie, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2008.
- l) M. C. Yebra-Biurrun, *Flow Injection Analysis of Marine Samples*, Nova Science Publishers, Hauppauge, USA, 2009.
- m) E. A. G. Zagatto, C. C. Oliveira, A. Townshend and P. Worsfold, *Flow Analysis with Spectrophotometric and Luminometric Detection*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2011.
- n) V. Cerda, L. Ferrer, J. Avivar and A. Cerda, *Flow Analysis: A Practical Guide*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2014.
- o) *Flow Injection Analysis of Food Additives*, ed. C. Ruiz-Capillas and L. M. L. Nollet, CRC Press, Taylor and Francis, New York, USA, 2015.

Também de acordo com a literatura, durante os últimos três anos, encontra-se uma série de relatos de uso de análise por injeção em fluxo (FIA) automatizado em procedimentos de titulação³⁹. No sistema de análise por injeção em fluxo, certa quantidade de amostra pode ser introduzida na corrente transportadora ou diretamente no reagente da reação onde em um tempo constante ou curto período a concentração do analito pode ser controlada. Também chamadas de pseudotitulações, as titulações em sistema FIA são alternativas de fluxo de determinadas titulações, em que um gradiente de concentração é produzida no aparelho após a introdução da amostra no fluido carregador⁴⁰. Como parâmetro de medição uma das alternativas é considerar a largura do sinal gerado tirando a metade do pico de altura⁴¹. No presente trabalho optou-se por medir a distancia entre os picos gerados pelas partes frontal e final da zona de amostra.

2.5 Surfactantes em sistemas imiscíveis

Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos são moléculas que possuem grupos orgânicos polares (hidrofílicos) e também grupos apolares (hidrofóbicos). Por apresentarem essas características os surfactantes são utilizados como mediador de fases imiscíveis, gerando suspensões, emulsões, espumas, microemulsões ou facilitando umectação, detergência das superfícies e geração de filmes líquidos⁴².

Utilizados na formulação de inúmeros produtos comerciais, os surfactantes possuem uma ampla aplicação em produtos industriais, como produtos químicos domésticos e cosméticos⁴³. Os tensoativos são utilizados em meios reacionais permitindo a solubilização de espécies de baixa solubilidade em água, ou possibilitar métodos novos para modificar a velocidade da reação, a direção do equilíbrio químico e em algumas circunstâncias a estereoquímica, dependendo da natureza da reação, da micela, dependendo da sua forma ou tipo e do reagente (eletrofílico, nucleofílico, etc)⁴⁴. A Tabela 2 indica os principais agentes tensoativos utilizados para melhorar o desempenho analítico.

Tabela 2- Principais agentes tensoativos⁴⁵

TIPO	AGENTE TENSOATIVO	FORMULA
CATIÔNICOS	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
	Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
	Cloreto de cetilpiridino (CICP)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{C}_5\text{H}_5)\text{Cl}^-$

	Dodecil sulfato sódico (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
ANIÔNICOS	Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{OCO}]_2\text{CHSO}_3^-\text{Na}^+$
	Dihexadecil fosfato (DHF)	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}]_2\text{PO}_2^-$
NÃO IÔNICOS	Polioxietileno (9-10) p- tercotil fenol (Triton X- 100)	$(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_2)_2$  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$
	Polioxietileno (23) dodecanol (brij 35)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$
ANFÓTEROS	3-(dodecildimetil amônio) propano 1- sulfato (SB-12)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{OSO}_3^-$
	4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$

Fonte: DALTIM; 2012.

Existem várias características que devem ser levadas em conta quando se faz uma determinada aplicação com tensoativos, sendo a polaridade a principal delas. Podem-se destacar também algumas características dos principais tensoativos como:

Tensoativos aniônicos: Podem ser encontrados em detergentes, sabões, xampus e sabonetes, sendo considerada a maior e mais utilizada classe de tensoativos dentro da indústria. Devido à neutralização de cargas essa classe de tensoativos normalmente não é compatível com tensoativos catiônicos, mas geralmente são sensíveis à água dura que

devido ao seu alto teor de cálcio e magnésio podem neutralizar o tensoativo ocorrendo então a sua precipitação.

Tensoativos catiônicos: caracteriza uma pequena parte de uma classe de tensoativos. Atualmente no mercado brasileiro encontra-se apenas tensoativos catiônicos baseados no nitrogênio quaternário. Não são compatíveis com os aniônicos e possuem maior taxa de toxicidades aquáticas em comparação as demais classes de tensoativos. Possui alta capacidade de se ligar a superfície sólida, podendo ser utilizado como aditivos de lubrificantes, amaciantes e anti corrosivos.

Tensoativos não iônicos: Considera-se a segunda classe mais utilizada no mercado, geralmente sendo compatíveis com todos demais classes de tensoativos. Apresentam baixa sensibilidade à água dura, porém suas propriedades físicos-químicas dependem da temperatura e sua solubilidade é inversamente proporcional à temperatura.

Tensoativos anfóteros: São pouco utilizados no mercado devido ao alto custo, porém são compatíveis com todas as classes de tensoativos. Possuem propriedade de organização com as moléculas em tensoativo aniônico e catiônico por apresentarem ambas as cargas, positiva e negativa⁴⁵.

Assim, considerando a possibilidade de se trabalhar com amostras não aquosas e tendo em vista as limitações desse tipo de amostra o uso de surfactantes tende a favorecer o desempenho analítico do método.

2.6 Otimização multivariada de processos em química analítica

O processo de otimização consiste em realizar experimentos de maneira sistemática com o intuito de verificar quais as melhores condições para se realizar uma determinada tarefa. No presente trabalho a tarefa a ser otimizada é o sistema FIA para determinação de acidez em amostras de Vinagre e de óleos vegetais.

Convencionalmente pode-se verificar duas maneiras principais de se fazer a otimização, que são os sistemas monovariado e multivariado. A Quimiometria é uma área da ciência que envolve ferramentas da estatística para se otimizar sistemas químicos de maneira multivariada⁴⁶. Os sistemas univariados consistem em fixar todas as variáveis e alterar apenas uma de cada vez, já nos sistemas multivariado, como a

própria denominação indica, faz-se experimentos variando-se todas as variáveis simultaneamente.

Dentre as vantagens dos sistemas multivariados estão: menor número de experimentos, portanto maior rapidez e menor custo, e também a produção de resultados mais confiáveis uma vez que fornece informações sobre possíveis interações entre as variáveis. Por outro lado, os sistemas multivariados exigem um conhecimento de estatística maior e cálculos matemáticos mais complexos, quando comparados ao sistema monovariado.

Tipicamente, na otimização multivariada, faz-se uma triagem empregando planejamento fatorial em dois níveis, para se verificar quais as variáveis que são significativas no sistema, e numa segunda etapa pode-se se empregar uma matriz de Doehlert para produzir modelos quadráticos que permitem a construção de superfícies de resposta e subsequente obtenção de valores máximos e ou mínimos de cada variável. Opcionalmente pode-se fazer diretamente uma matriz de Doehlert, pulando a etapa de triagem com planejamento fatorial⁴⁷. No presente trabalho com a aplicação do planejamento fatorial foi possível avaliar os fatores que influenciam no sistema e encontrar as melhores condições em termos de resposta analítica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- a) Propor um método para determinar ácido acético em vinagre, utilizando sistema de análise por injeção em fluxo impulsionado por gravidade, acoplado a um colorímetro desenvolvido em laboratório para quantificação;
- b) Propor a determinação titulométrica de índice de acidez em óleos vegetais, empregando surfactantes como solventes, dispensando, portanto, o uso de solventes orgânicos;
- c) Propor um sistema FIA para a determinação de acidez em óleos vegetais.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Construir e avaliar as potencialidades de um colorímetro portátil, de baixo custo, para determinação do índice de acidez;
- b) Desenvolver uma metodologia com sistema FIA em linha única para determinação de acidez de amostras de Vinagre e de Óleos vegetais;
- c) Empregar ferramentas quimiométricas para a otimização da metodologia proposta;
- d) Determinar as figuras de mérito (limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, frequência de leitura e faixa linear) para os métodos propostos;
- e) Estudar a exatidão através de comparação dos resultados obtidos pelo método proposta com metodologia padrão descrita na literatura;

- f) Verificar a potencialidade do surfactante Dodecil Sulfato de Sódio na substituição de solventes orgânicos na determinação de acidez em óleos vegetais;
- g) Avaliar o desempenho do método proposto aplicando em amostras reais coletadas no comércio da região de Alfenas-MG.

4 JUSTIFICATIVA

Dada a forte relação entre as medidas de acidez e a qualidade do produto, tanto em amostras de vinagre quanto em óleos vegetais, é plausível propor métodos alternativos para a determinação desse analito, principalmente no que concerne ao uso de métodos menos agressivos ao meio ambiente, isto é, menor geração de resíduos e evitar uso de reagentes tóxicos.

5 METODOLOGIA

Os materiais necessários para a realização desse projeto encontram-se disponíveis no Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, Laboratório de Análise Química de Fármacos (Q204), e estão listados abaixo.

5.1 Equipamentos e acessórios

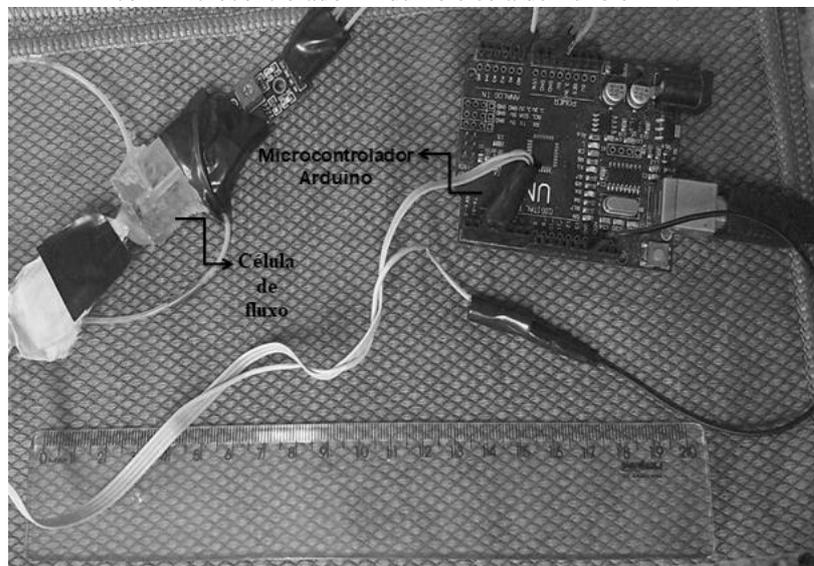
Para a execução dos experimentos realizados neste projeto foram empregados os seguintes equipamentos:

- a) Balança analítica Mettler Toledo (modelo HD, SP, Br); com precisão de $\pm 0,1$ mg;
- b) Microcomputador;
- c) Tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno, utilizados na confecção das bobinas helicoidais, alças de amostragem e linhas de condução de soluções de referência, amostras e reagentes;
- d) Sistema deionizador Milli-Q® (Millipore®, Bedford, MA, USA);
- e) Injetor proporcional construído em acrílico;
- f) Vidrarias de grau analítico;
- g) Colorímetro portátil (ver abaixo);
- h) Cubetas de fluxo em acrílico (ver abaixo);

Na busca de viabilizar análises rápidas *in situ* foi confeccionado um colorímetro portátil e de baixo custo, projetado com LED (RGB), uma placa arduino uno®, LED RGB e acoplado a um microcomputador. A Figura 6 apresenta o sistema desenvolvido, mostrando a cubeta de fluxo em Z e o colorímetro UV, o qual é controlado pelo circuito eletrônico com Microcontrolador Arduino, montado no próprio laboratório de pesquisa.

A aquisição de sinais foi feita via interface serial (USB) através de um software em linguagem Visual Basic®.

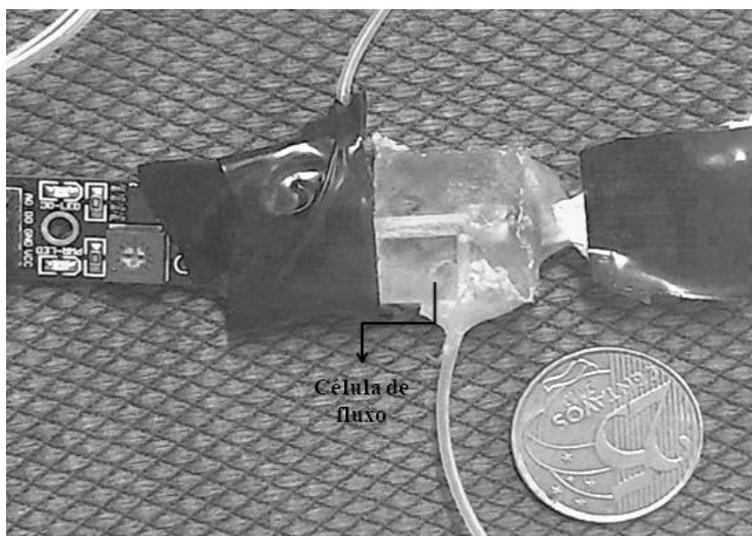
Figura 6- Colorímetro portátil como fonte de emissão LED RGB, Circuito eletrônico com microcontrolador Arduino e cела de fluxo em Z.



Fonte: Do autor

A Figura 7 apresenta a cела de fluxo em “Z” utilizada no sistema proposto, a qual foi desenvolvida em acrílico com caminho óptico de 2 cm. Como pode-se observar tal configuração viabilizou o acoplamento direto do LED (*Light Emitting Diode*) RGB, e também do fotodiodo (sensor).

Figura 7 – Cubeta de fluxo em Z desenvolvida no laboratório e acoplada ao sistema.



Fonte: Do autor

5.2 Reagentes e soluções

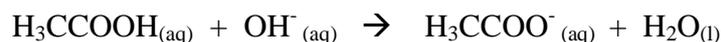
Os principais reagentes utilizados na execução deste trabalho foram:

- a) Fenolftaleína P.A.-A.C.S., Synth;
- b) Hidróxido de sódio 97%, P.A. (Lentilhas), VETEC;
- c) Ácido clorídrico 37%, P.A. – A.C.S., Química Moderna;
- d) Ácido acético 99,7%, A.C.S., Sigma-Aldrich;
- e) Dodecilsulfato de sódio – A.C.S., Proquímios.

5.3 Sistema titulométrico padrão para a determinação do índice de acidez em amostras de vinagre e óleo

Por meio da volumetria de neutralização pode-se obter o teor de ácido acético em vinagre, através da titulação de ácido fraco com base forte, onde ocorre uma reação rápida e completa⁴⁸. Segundo a AOAC²³ para determinar a acidez total do vinagre transfere-se 10 mL do analito para um erlenmeyer ou béquer de 250 mL contendo 100 mL de água, com ausência de dióxido de carbono, previamente neutralizada. Titula-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até obter uma coloração rósea, utilizando indicador ácido-base fenolftaleína de 2-3 gotas ou pHmetro até obter pH 8,2.

A reação envolvida na titulação encontra-se abaixo:



A acidez total do ácido acético é expressa em meq /L pela seguinte fórmula:

$$At = \frac{1000 \times n \times N}{V}$$

Em que:

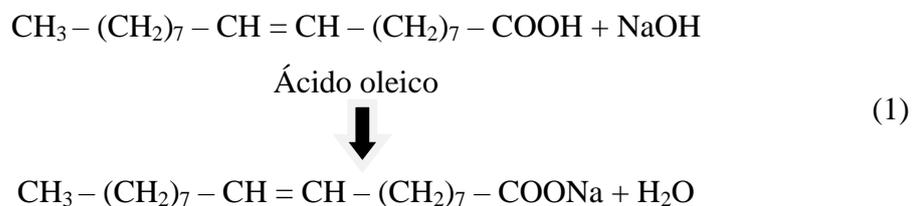
At = Acidez total em meq/L.

n = Volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, em mL.

N = Normalidade da solução de hidróxido de sódio.

V = Volume da amostra em mL.

Para os óleos vegetais segundo a metodologia descrita por Morreto et al. 2008²², para a determinação do índice de acidez titula-se, ácido oleico empregando uma solução neutra de éter-etílico (2 : 1), com hidróxido de sódio 0,1 ou 0,01 mol.L⁻¹, utilizando como indicador fenolftaleína até obter coloração rósea. A reação que ocorre no sistema é apresentada na Equação 1.



No presente trabalho substituiu-se o uso de solventes orgânicos (éter-alcool) por um surfactante, o dodecil sulfato de sódio (SDS). Foram testadas diferentes concentrações de SDS (2%, 5%, 7% e 10%) e observado a olho nu que apenas a concentração de 10% solubilizava o óleo não formando micelas. Portanto para os testes com titulação padrão envolvendo óleo vegetal utilizou como solvente o dodecil sulfato de sódio 10%.

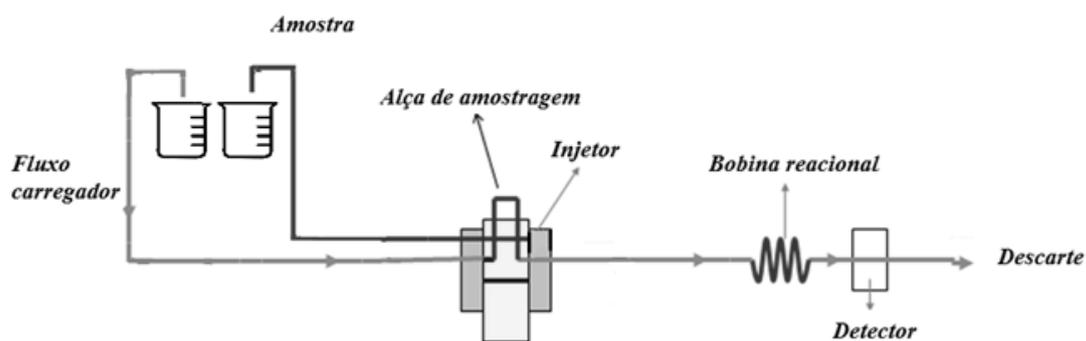
5.4 Sistema FIA proposto para determinação do índice de acidez

Considerando o exposto anteriormente, o sistema desenvolvido traz uma proposta diferencial na avaliação do índice de acidez. O diagrama esquemático do sistema FIA proposto para determinação do índice de acidez é apresentado na Figura 8 e consiste em um sistema em linha única, que faz uso da gravidade na condução dos reagentes.

A solução carregadora consiste de uma solução de hidróxido de sódio, as amostras ácidas (aquosas) são diluídas com água e adicionam-se 20 gotas de fenolftaleína; Após a introdução da amostra, durante o percurso analítico, ocorre interação na parte frontal e final da zona de amostra, gerando sinais com dois picos, a distância entre esses picos esta correlacionada com a concentração ácida das amostras.

Cabe lembrar que a proposta do método traz ainda a propulsão dos fluidos por gravidade, dispensando, portanto, o uso de bomba peristáltica e diminuindo o custo. Os frascos de reagente carregador e amostra foram mantidos a uma altura de 185 cm em relação à saída de descarte (chão), propiciando uma vazão de $1,8 \text{ ml min}^{-1}$.

Figura 8. Sistema de análise em fluxo em linha única.



Fonte: do autor

5.5 Procedimento de otimização

Os principais fatores pertinentes ao sistema proposto são: Alça de Amostragem (L), Reator (R), Vazão do fluido transportador (V), concentração da solução carregadora (NaOH) (CB). Assim, esses fatores foram otimizados de maneira multivariada.

A concentração da amostra teste (HCl) foi mantida em $0,007 \text{ mol.L}^{-1}$. O parâmetro utilizado como resposta analítica foi a distância entre os picos duplos de cada leitura. Os dados experimentais foram processados usando-se o programa *STATISTICA 7.0* (StatSoft, Tulsa, USA), estabelecendo significância estatística com nível de confiança 95%.

5.5.1 Planejamento fatorial de dois níveis

O efeito dos 4 fatores selecionados foram investigados utilizando-se um planejamento fatorial 2^4 envolvendo 16 experimentos, cuja combinação dos níveis, a matriz do planejamento encontram-se na Tabela 3. Estes experimentos foram realizados em duplicata e em ordem aleatória.

Tabela 3 - Níveis dos fatores no planejamento 2⁴

Sigla	Fator		Níveis	
			Mínimo (-)	Máximo (+)
AA	Alça de amostragem (µL)		200	400
R	Reator (cm)		50	150
H	Altura soluções (cm)		75	145
CB	Concentração da Base (mol.L ⁻¹)		0,005	0,2
Ensaio	AA	R	H	CB
1	- (200)	- (50)	- (75)	- (0,005)
2	+ (400)	- (50)	- (75)	- (0,005)
3	- (200)	+ (150)	- (75)	- (0,005)
4	+ (400)	+ (150)	- (75)	- (0,005)
5	- (200)	- (50)	+ (145)	- (0,005)
6	+ (400)	- (50)	+ (145)	- (0,005)
7	- (200)	+ (150)	+ (145)	- (0,005)
8	+ (400)	+ (150)	+ (145)	- (0,005)
9	- (200)	- (50)	- (75)	+ (0,2)
10	+ (400)	- (50)	- (75)	+ (0,2)
11	- (200)	+ (150)	- (75)	+ (0,2)
12	+ (400)	+ (50)	- (75)	+ (0,2)
13	- (200)	- (50)	+ (145)	+ (0,2)
14	+ (400)	- (50)	+ (145)	+ (0,2)
15	- (200)	+ (150)	+ (145)	+ (0,2)
16	+ (400)	+ (150)	+ (145)	+ (0,2)

Os valores entre parênteses expressam os níveis reais dos fatores estudados.

5.6 Figuras de mérito

5.6.1 Faixa de resposta linear e linearidade.

A faixa de resposta linear consiste na faixa de concentração em que o coeficiente angular é constante (linear). Define-se a menor concentração, da faixa de resposta linear, como sendo o limite de quantificação. A linearidade foi então determinada pelo coeficiente de correlação obtido da curva analítica.

Foram construídas 2 curvas de calibração sendo a primeira utilizando ácido clorídrico e a segunda ácido acético. Ambas as curvas de calibração foram realizadas mediante a injeção de padrões nas concentrações 0,001, 0,003, 0,005, 0,007, 0,009, 0,01 e 0,03 mol.L⁻¹, mantendo-se as seguintes condições experimentais: alça de amostragem 300 cm, concentração de HCl 0,001; 0,003; 0,005; 0,007; 0,009; 0,01; 0,03 mol.L⁻¹; Reator 100 cm; concentração de base 0,001 mol.L⁻¹ e vazão de 1,8 mL.min⁻¹.

5.6.2 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Na determinação de espécies químicas em baixas concentrações o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) é de grande importância para avaliar o desempenho do método analítico. Define-se o limite de detecção como a menor quantidade de analito detectável por um método, no entanto, sem precisão e exatidão satisfatórias. Podendo ser ainda definido como a menor quantidade que pode ser detectada estatisticamente diferente do branco.

O limite de quantificação indica, com precisão e exatidão consideráveis, a menor quantidade do analito que pode ser medida na amostra. Segundo a IUPAC (*International Union Pure and Applied Chemistry*), matematicamente os cálculos referentes ao limite de detecção e quantificação baseiam-se na razão entre o desvio padrão obtido de dez leituras do branco (S_{br}) e o coeficiente angular da curva analítica

(b) da equação da curva analítica. Multiplicando-se o valor obtido por três obtém-se o LD (Equação 2) e multiplicando-se por dez o LQ (Equação 3).

$$LD = \frac{(\bar{X}_{br} + 3xS_{br})}{b} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{(\bar{X}_{br} + 10xS_{br})}{b} \quad (3)$$

Sendo: X_{br} = média de dez leituras do sinal do branco

S_{br} = Desvio padrão dos sinais de branco

b = coeficiente angular da curva analítica

5.6.3 Precisão

A precisão expressa, sob condições determinadas, a dispersão de resultados entre ensaios independentes, reproduzidos de um mesmo padrão, mesma amostra ou amostras semelhantes. Pode-se representar a precisão pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), expresso também como coeficiente de variação ($CV = 100 \times RSD$).

5.6.4 Sensibilidade de calibração

A sensibilidade de calibração é numericamente igual ao coeficiente angular da curva analítica, esse parâmetro indica o quanto o método é capaz de diferenciar (detectar) amostras com concentrações próximas.

5.6.5 Frequência de Leitura (FL)

Corresponde ao número de leituras que podem ser realizadas por intervalo de tempo. No presente trabalho é considerado o tempo para inserção total da alça de amostra no sistema, até o completo aparecimento do sinal analítico e retorno a linha base.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

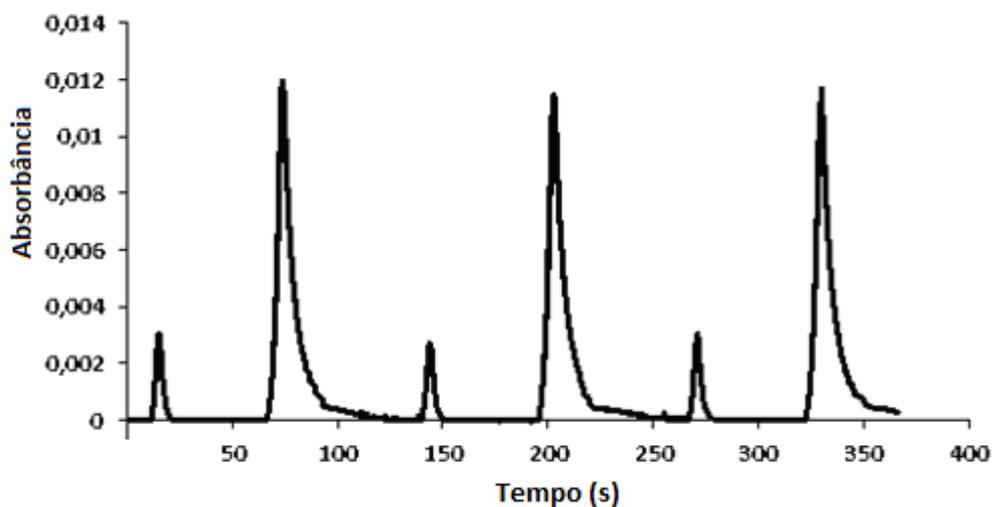
Inicialmente foram feitos estudos com soluções aquosas objetivando a determinação de ácido acético em amostras de vinagre, conforme abaixo. Na segunda etapa desse trabalho fez-se o estudo com amostra de óleo.

6.1 Perfil do sinal analítico no sistema

A Figura 9 apresenta o perfil do sinal analítico obtido no sistema proposto, descrito na Figura 8, quando se injetou uma solução ácida contendo o indicador fenolftaleína em um fluxo carregador alcalino.

Uma vez que o sistema de análise possui picos duplos, resultantes da interação entre fluxo carregador e amostra, sendo o primeiro pico referente a interação na parte frontal da zona de amostra e o segundo na parte final, notou-se uma correlação entre a distância entre os dois picos e a concentração ácida da amostra. Assim, adotou-se essa distância como sinal analítico.

Figura 9 - Perfil do sinal analítico obtido no sistema proposto. Concentração de HCl $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$, alça de amostragem 300 cm, reator 100 cm e vazão de $1,8 \text{ mL/min}$.



f

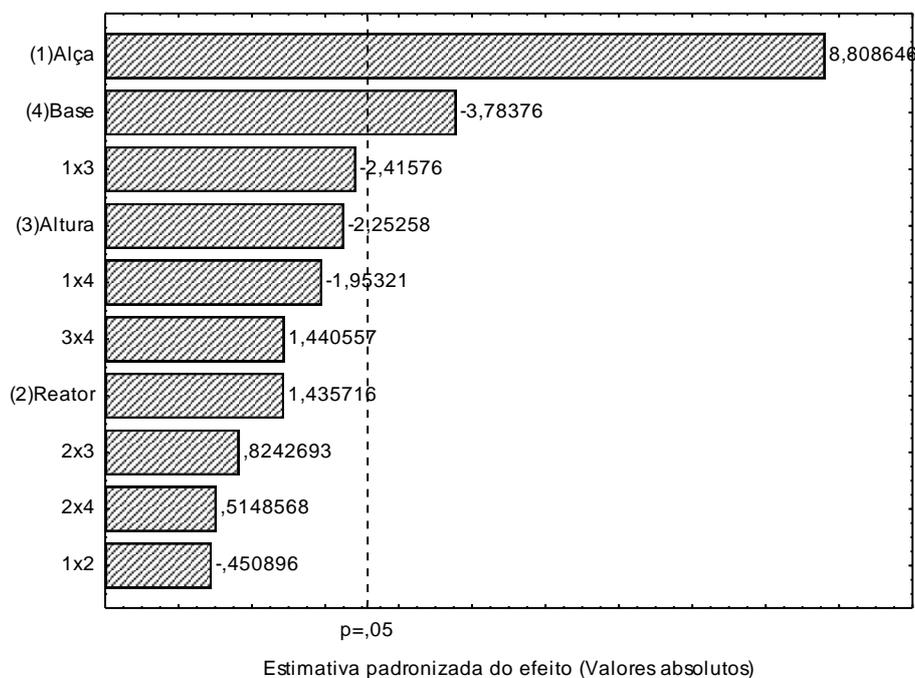
Fonte: Do autor

6.2 Procedimento de otimização

6.2.1 Planejamento fatorial de dois níveis

Os resultados experimentais obtidos com o planejamento fatorial 2^4 , descrito na Tabela 2, estão apresentados no Diagrama de Pareto mostrado na Figura 10.

Figura 10: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para as variáveis do sistema de determinação on-line da acidez de óleos. 95% de confiança.



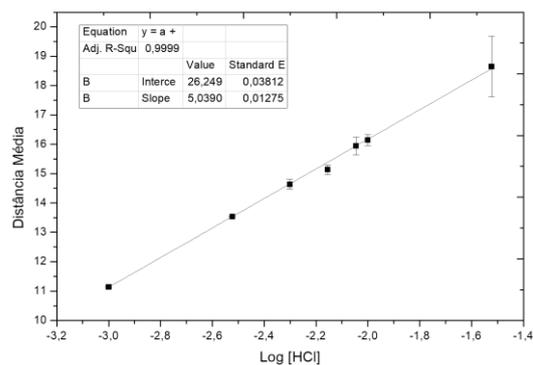
Fonte: Do autor

Com base nos resultados, apresentados no Diagrama de Pareto, observam-se que a alça de amostragem e a concentração da base são os fatores que exerceram influência significativa no sistema proposto. A alça de amostragem apresentou efeito positivo, mostrando que o nível superior do planejamento oferece maior sinal analítico. A concentração da base apresentou efeito negativo, indicando que o nível inferior deste fator favorece a resposta analítica.

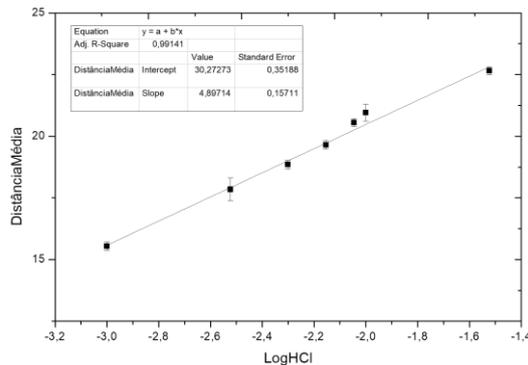
Considerando que aumentando a alça de amostragem sempre acarretará no aumento da distância entre os dois picos (sinal), optou-se por um estudo monovariado para a continuidade da otimização. Nesse sentido, estipulou-se como resposta do sistema a sensibilidade de calibração e, fez-se curvas analíticas com diferentes alças de amostragens, as quais são apresentadas na Figura 11. Como pode ser observado, o método proposto apresentou região de resposta linear nas concentrações de HCl entre 0,001 e 0,03 mol.L⁻¹, com valores de coeficientes de correlação satisfatórios.

Os outros fatores e as interações não se mostraram significativos no domínio estudado e, portanto, foram fixados de acordo com o conhecimento do sistema e revisão bibliográfica. Deste modo as melhores condições de trabalho foram: Concentração da base 0,001 mol.L⁻¹, alça de amostragem 300 cm (1,5 mL), Reator 100 cm; vazão 1,8 ml/min.

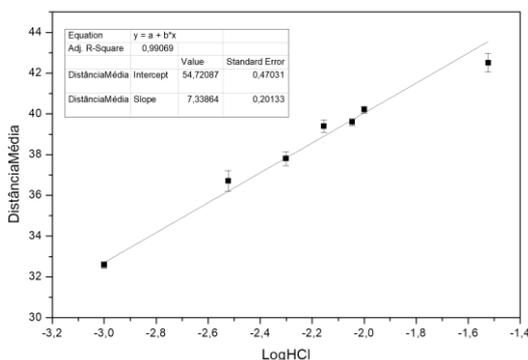
Figura 11- Curva de calibração para determinação da acidez em óleos utilizando HCl. (a) Alça de amostragem = 50 cm; (b) Alça de amostragem = 100 cm; (c) Alça de amostragem = 200 cm (d) Alça de amostragem = 300 cm; (e) Alça de amostragem = 400 cm; (f) Alça de amostragem = 500 cm.



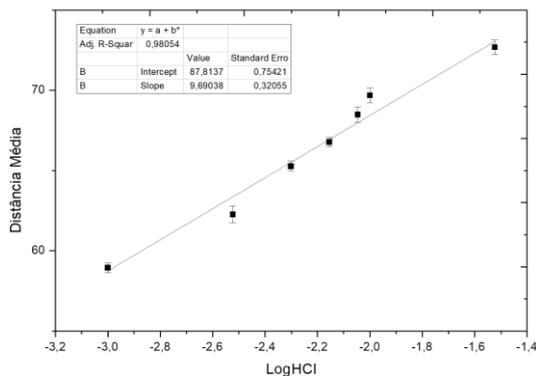
(a)



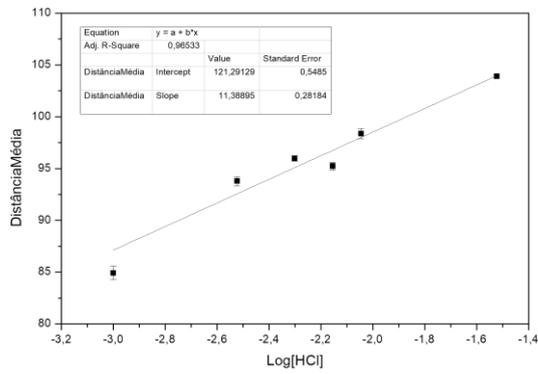
(b)



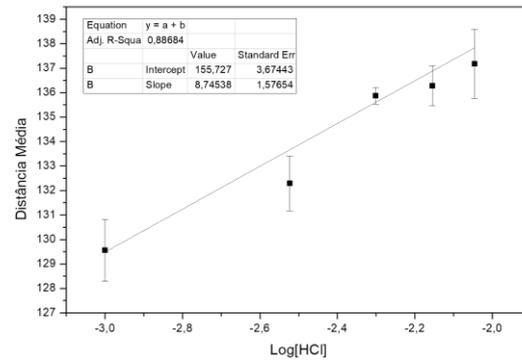
(c)



(d)



(e)

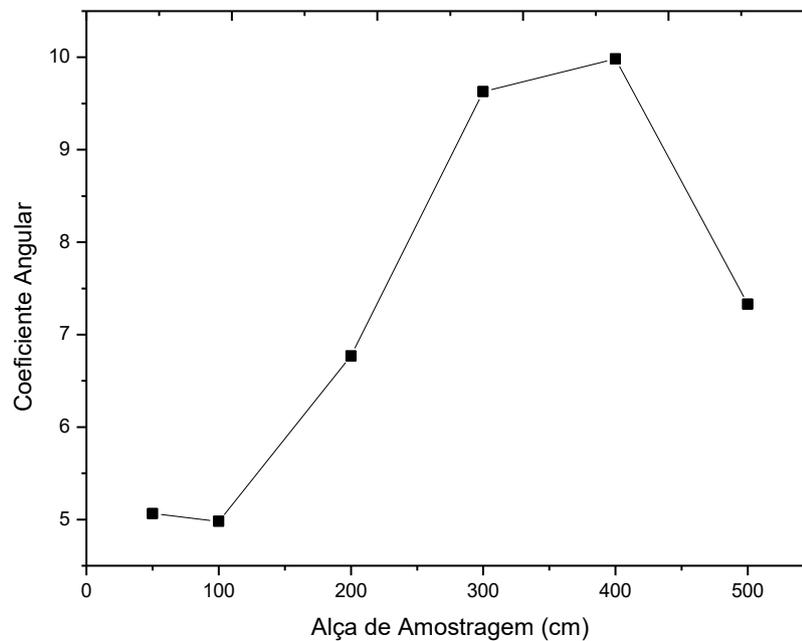


(f)

Fonte: Do autor

Com base nas curvas analíticas obtidas observou-se uma relação entre a sensibilidade e o tamanho da alça de amostragem utilizada. Deste modo construíram-se diferentes curvas analíticas para os tamanhos de alças de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 cm. A Figura 12 apresenta os resultados expressos em termos de coeficiente angular para cada uma das curvas analíticas obtidas.

Figura 12- Comparação dos coeficientes angulares em relação a alça de amostragem.



Fonte: Do autor

Com base nos resultados apresentados na Figura 12, observa-se que as alças de 300 e 400 cm apresentaram maior sensibilidade, nota-se ainda uma pequena diferença nos coeficientes angulares para essas duas alças, assim visando manter um compromisso entre sensibilidade e frequência analítica escolheu-se a alça de 300 cm para trabalho.

6.3 Figuras de Mérito e Validação do sistema FIA

Visando a descrição do desempenho analítico do sistema proposto, as seguintes figuras de mérito foram investigadas: faixa linear da curva analítica, frequência de leitura, precisão, limites de detecção e quantificação.

A faixa de resposta linear, para a curva analítica obtida com HCl em meio aquoso, foi de $3,55 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ a $1,10 \text{ g L}^{-1}$.

No sistema proposto sabe-se que o tempo gasto para uma análise é de 2,02 minutos. Dessa forma, pode-se dizer que, teoricamente, em uma hora são efetuadas cerca de 30 leituras.

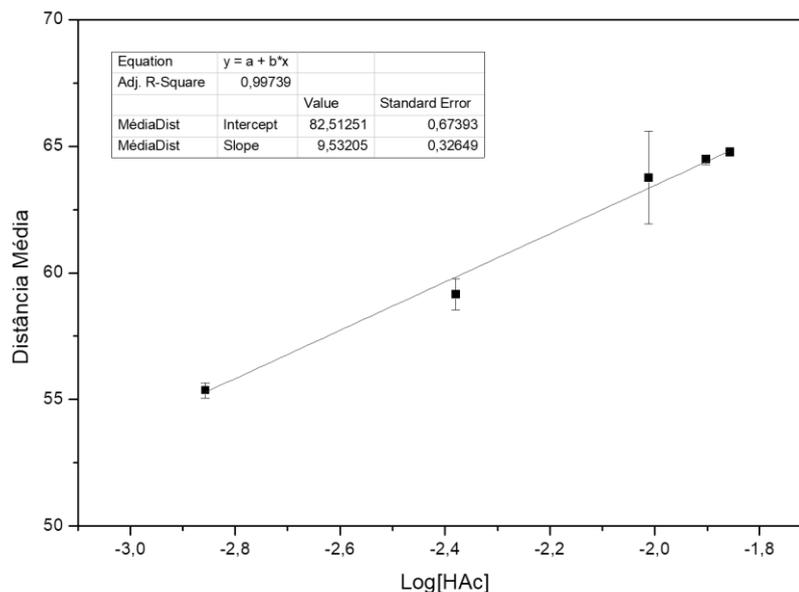
A partir da curva analítica com alça de 300 cm (Figura 11) foram obtidos os limites de detecção e quantificação respectivamente $9,28 \times 10^{-5}$ e $3,55 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$.

A precisão foi avaliada em termos do desvio padrão relativo ($n=10$), para concentrações de HCl $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,010 \text{ mol.L}^{-1}$ como sendo 0,58 e 1,2% respectivamente.

Em seguida, visando a determinação de ácido orgânico fez-se uma curva analítica com ácido acético.

A curva analítica construída utilizando ácido acético é mostrada na Figura 13, a partir da qual foram obtidos os limites de detecção e quantificação respectivamente $1,02 \times 10^{-3}$ e $3,37 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$.

Figura 13- Curva de calibração para determinação da acidez em óleos utilizando Ácido acético.
Alça de amostragem = 300 cm.



Fonte: Do autor

6.4 Aplicação da Metodologia em amostras aquosas

A fim de verificar a exatidão do método para determinação da acidez em amostras de vinagre, utilizaram-se técnicas de comparação do método proposto com o método de referência⁴². O Procedimento consistiu apenas em diluir 1 mL de amostra de vinagre à 100 mL com água e inserir no sistema FIA. De acordo com a Tabela 4, estatisticamente não há diferença (teste t pareado, 95% de confiança) entre o método proposto e o método de referência, o que indica a exatidão do método para determinação da acidez nessas amostras.

Tabela 4: Determinação da acidez em amostras de vinagre usando o método proposto e o método referência padrão. n = 3; Valor t calculado = 0,36 ; valor t crítico = 12,7, com 95% de confiança.

Amostra	% Acidez (m/v)	
	Método FIA proposto	Método referência
Vinagre de alho	4.10 ± 0,20	4.58 ± 0,03
Vinagre de maçã	6.87 ± 0,11	6.59 ± 0,08

Fonte: Do autor

6.5 Estudos preliminares para determinação em amostras não aquosas

A determinação de acidez em óleos vegetais geralmente é feita por titulação empregando solvente orgânico (éter e álcool), conforme descrito no item 5.3. No presente trabalho, optou-se por substituir o solvente orgânico por um meio micelar, empregando o surfactante Dodecil Sulfato de Sódio (SDS).

Inicialmente, testou-se em 2%, 5%, 7% e 10% as concentrações das soluções de SDS se eram miscíveis com as amostras de óleo, observou-se empiricamente que a concentração de 10% de SDS quando misturados na proporção de 15mL de SDS e 25 mL de amostra de óleo apresentou os melhores resultados.

Foram feitas titulações de maneira convencional, de amostras de óleos vegetais, obtidas no mercado local, que foram diluídas na proporção supracitada (15:25, SDS:óleo). O titulante empregado foi uma solução aquosa de hidróxido de sódio $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e o indicador a fenolftaleína.

Os dados, apresentados na Tabela 5, demonstram a viabilidade do uso do tensoativo Dodecil sulfato de sódio (SDS) como mediador na titulação de amostras de óleos vegetais, uma vez que, os resultados obtidos quando comparados ao método de referencia²³ são estatisticamente condizentes (test-t pareado, $p=0.05$).

Tabela 5: Determinação da acidez em amostras não aquosas usando o método padrão convencional e o método padrão adaptado com SDS. $n = 4$; Valor t calculado = 1.39 ; valor t crítico = 3.18, com 95% de confiança.

Amostra	% Acidez (m/v)	
	Valor encontrado no Método padrão adaptado SDS	Valor encontrado no Método padrão convencional
Óleo Comercial	$0.184 \pm 0,001$	$0.178 \pm 0,001$
Azeite	$1.581 \pm 0,010$	$1.451 \pm 0,002$
Óleo Composto	$0.225 \pm 0,002$	$0.203 \pm 0,001$
Óleo de Fritura	$0.250 \pm 0,001$	$0.248 \pm 0,002$

Fonte: Do autor

Contudo, a determinação de acidez em óleos, empregando sistema FIA, não apresentaram resultados satisfatórios. Os principais problemas encontrados estão relacionados à imiscibilidade entre amostra e fluxo carregador, ocasionando a formação de emulsões e, portanto não houve repetibilidade dos sinais. Mesmo quando se empregou o SDS o sistema FIA, não reproduziu os sinais.

Deste modo, experimentos adicionais e estudos mais aprofundados serão necessários visando adaptar o sistema FIA proposto, empregando ou não SDS, na determinação de acidez de amostras de óleos vegetais.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no sistema FIA proposto foram adequados para a determinação de acidez em amostras aquosas (Vinagre) e as principais vantagens foram simplicidade, baixo custo do equipamento (~100 reais), rapidez 30 leituras/h, bom desempenho analítico em termos de precisão e exatidão. Adicionalmente o método agrega vantagens, no que tange ao conceito de Química Verde, com pequena geração de resíduos, sendo ecologicamente viável.

Para a determinação da acidez em óleos vegetais, foi proposta a titulação sem o uso de solventes orgânico, empregando o surfactante o dodecil sulfato de sódio, os resultados foram condizentes com o método padrão, portanto com exatidão, e apresentaram um custo menor, e menor geração de resíduos.

Ambos os métodos propostos: FIA para determinação de ácido acético em Vinagre e titulação com SDS para a determinação de acidez de óleos, são ecologicamente melhores devido ao fato de não empregarem reagentes nocivos e gerarem menos resíduos.

O Sistema FIA, para a determinação em meio orgânico não apresentou resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 36, de 14 de outubro de 1999. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentados acéticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, out. 1999, Seção 1, p. 76.
2. BORTOLINI, F.; SANT`ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinida deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 236- 243, 2001.
3. EBIHARA, K.; NAKAJIMA, A. Effect of acetic acid and vinegar on blood glucose and insulin responses to orally administered sucrose and starch. **Agricultural and biological chemistry**, Tokyo, v. 52, n. 5, p. 1311-1312, 1988.
4. HADFIELD, L. C.; BEARD, L. P.; LEONARD-GREEN, T. K. Calcium content of soup stocks with added vinegar. **Journal of the american dietetic association**, Chicago, v. 89, n. 12, p. 1810-1811, 1989.
5. NUNES, S.P. Análise da produção e consumo de óleos vegetais no Brasil. **Boletim eletrônico do deser**, Curitiba, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.deser.org.br/>>. Acesso em: 30 mai. 2018.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. **Resolução-RDC n°270**, 2005. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 11 mai. 2018
7. KARDASH, Elena; TUR`YAN, Yakov I. Determination of Acid Value in Vegetable Oils by Indirect Titration in Aqueous-Alcohol Medium. **CROATICA CHEMICA ACTA** , Laboratório Nacional de Física de Israel, v. 78, p. 99-103 ,oct. 2005.
8. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de gestão da fiscalização**. 2017. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sigef/>>. Acesso em: 01 mar. 2018.
9. SOUZA, E. C; **Estudo da oxidação do óleo de soja com diferentes concentrações de aditivos anti-oxidantes, para uso de tratamento térmicos de**

têmpera. 2007. 160f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais- Universidade de São Paulo, USP, São Carlos, 2007.

10. BALDOA, M. A.; et al. A novel electroanalytical approach based on the use of a room temperature ionic liquid for the determination of olive oil acidity. **Talanta**, p.881–887, 2016.

11. OSAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. **Química Nova**, Campinas, v.29, n. 3, p. 593-599, abr./ago. 2006.

12. CW, H. et al. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. **Food Chemistry**, v. 15, n. 221, p. 1621-1630, oct. 201.

13. SUPHAROEK, S. et al. Employing natural reagents from turmeric and lime for acetic acid determination in vinegar sample. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 583-590. Apr. 2018.

14. BRASIL, ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Instrução Normativa número 6, de 03 de abril de 2012**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 31 maio 2018.

15. BACCAN, N. et al. **Química analítica quantitativa elementar**. 3 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

16. REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Analytica**, n.27, fev./mar. 2007.

17. Organização das nações unidas para alimentação e agricultura (FAO). **Consumo, produção e exportações de óleos vegetais no Brasil**. Disponível em: < <http://www.fao.org/brasil/pt/> >. Acesso em: 13 fev. 2018.

18. BRASIL, ingredientes alimentar. **Dossiê óleos**. Disponível em: < http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060563192001464890846.pdf >. Acesso em: 16 fev. 2018.

19. FONSECA, Marcelo Marques Da; YOSHIDA, Maria Irene. Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado. **Vértices**, Campos dos Goytacazes, v. 11, p. 61-75, jan. 2009.

20. VIANA, RD et al. Ação antioxidante não reafirmante de óleos vegetais. *Revista Interdisciplinar, Uninovafapi*, v. 7, n. 4, dez. 2014.
21. MORETTO, E. et al. **Introdução à ciência de alimentos**. 2 ed. Florianópolis: UFSC, 2008. p.237.
22. JORGE, N. et al. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. **Química Nova**, São José do Rio Preto: Unesp, v. 28, n. 6, p. 947-951, jul. 2005.
23. HELRICH, K.C. **Aoac: official methods of analysis**. 15 ed. Virgínia, 1990. 1298 p.
24. ZENEBO, O. et al. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.: Óleos e gorduras**. São Paulo: 2008. p.589-625
25. BRASIL, **Agência nacional de vigilância sanitária**. 5 ed. Brasília: FIOCRUZ, 2010. 184-187 p.
26. MAHESAR, S. A. et al. Analytical approaches for the assessment of free fatty acids in oils and fats. **Analytical Methods**, Pakistan, v. 6, p. 4956-4963. Feb./May. 2014.
27. WANG, J. XU, C. SONG, Q. Rapid and Environmentally Friendly Three-Dimensional-Printed Flow Injection Analysis System for the Determination of the Acid Number in Thermal Conductive Oil. **Energy fuels**. People's Republic of China, v. 29, n. 2, p. 1040-1044. Jan. 2015.
28. SOUTO, R. T. et al. **Estudo comparativo de modelos de determinação da alcalinidade em amostras de água subterrânea**. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - UFPE, Recife, 2006.
29. OLIVEIRA, A. F. et al. Desenvolvimento de um titulador baseado na contagem de gotas. **Química nova**, v. 33, n. 3, jan. 2010.
30. TROJANOWICZ, Marek, Kamila Kołacińska. Recent advances in flow injection analysis. **Analyst**, n. 141, p. 2085-2139. Feb. 2016.
31. VIEIRA, J. A. **Estudo comparativo de sistemas de análises químicas em fluxo empregando FIA com multicomutação e amostragem binária, FIA com amostragem sanduíche, fluxo monossegmentado e injeção sequencial**. 2001, 108f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

32. VALCARCEL, M.; CASTRO, L. M. D. **Análisis por inyección en flujo**. Córdoba: Implenta San Pablo, 1984.
33. FANG, Z., XU, S., ZHANG, S., Fundamental and practical considerations in the design of on-line column preconcentration for flow-injection atomic spectrometric systems. **Anal. Chim. Acta** 200, 2007, p. 35-49.
34. FANG, Z. **Flow injection separation and preconcentration**. Nova York: 1993, p. 259.
35. RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow injection analysis**. 2 ed. New York: 1988.
36. SCIENCE DIRECT. Disponível em: <29. <http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 05 jun. 2018.
37. SKEGGS, JR., L. T. Persistence ... and prayer: from the artificial kidney to the autoanalyzer. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 9, 2000.
38. BAHARUDDIN, A. S. et al. Evaluation of pressed shredded empty fruit bunch (EFB)-palm oil mill effluent (POME) anaerobic sludge based compost using Fourier transform infrared (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 10, n. 41, p. 8082-8089, Jun. 2011.
39. MANOUCHEHRI, Firouzeh; IZADMANESH, Yahya; B.GHASEMI, Jahan. Characterization of the interaction of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid with bovine serum albumin by spectrophotometric-gradient flow injection titration technique and molecular modeling simulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 92-103. Oct. 2017.
40. NEMCOVÁ, I. et al. FIA titrations of phenothiazine derivatives in aqueous micellar and non-aqueous media. **Talanta**, v. 15, n. 65, p. 632-7, feb. 2015.
41. LIMA, J.A. et al. Fully automated photometric titration procedure employing a multicommutated flow analysis setup for acidity determination in fruit juice, vinegar, and wine. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 207-212. Feb. 2017.
42. BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO (BNDES). **Potencial de diversificação da indústria química brasileira**. Disponível em: < https://www.bndes.gov.br/arquivos/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_tensoativos.pdf >. Acesso em: 21 jun. 2018.

43. SEWERYN, Artur. Interactions between surfactants and the skin – Theory and practice. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 256, p. 242-255. Jun. 2018.
44. MANIASSO, Nelson. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, Piracicaba, v. 24, n. 1, p. 87-93, abr. 2001.
45. DALTIM, D. **Tensoativos químicos, propriedades e aplicações**. São Paulo: Edgard Blücher, 2012. p. 45-84.
46. FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review, **Talanta**. v.63, p.1061–1067. July 2004.
47. NOVAES, et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta - parte i: variáveis de processo. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, abr. 2017. No prelo.
48. SKOOG, et al. **Fundamentos da química analítica**. 8 ed. Cengage Learning: 2005. 1124 p.