UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

SIDNEI GONÇALVES DA SILVA

**Sistemas de análises em fluxo para a determinação
de glicerol em biodiesel e manganês em águas**

Versão corrigida da tese defendida conforme resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na CPG:

12/09/2011

SIDNEI GONÇALVES DA SILVA

**Sistemas de análises em fluxo para a determinação
de glicerol em biodiesel e manganês em águas**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química*

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

São Paulo

2011

**“Sistemas de análises em fluxo para a determinação
de glicerol em biodiesel e manganês em águas”**

SIDNEI GONÇALVES DA SILVA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências –

Programa: Química

Aprovado por:

Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

(orientador e Presidente)

Prof. Dr. Lúcio Angnes

IQ-USP

Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

IQ-USP

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

UFSCar

Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder

IQ-UNICAMP

São Paulo

18 de outubro de 2011

A DEUS

Que com sua misericórdia Divina permitiu que eu superasse muitos obstáculos.

“Deus é capaz de trocar reinos por ti, abre mares para que possas atravessar

*E se preciso fosse daria novamente a vida por ti, Deus só não é capaz de deixar de te
amar”*

(Walmir Alencar)

Aos meus pais Mauricio e Maria

Obrigado, mãe, por ter me ensinado a ser persistente e nunca me dar por satisfeito com respostas incompletas; duas qualidades fundamentais para um pesquisador, que me ensinastes, talvez sem perceber.

E ao meu pai pela oportunidade de ter os primeiros contatos com uma bancada, embora ainda não fosse a de um laboratório de química, a experiência ao seu lado foi muito positiva para minha formação profissional e humana.

E claro, por todo amor e carinho ao longo desses anos.

À minha doce noiva, quase esposa, Andressa

Obrigado por toda a paciência, carinho e amor. Desde o mestrado você sempre esteve do meu lado, apoiando, rezando e fazendo parte da minha vida.

Ao Prof. Fábio

Muito obrigado por ter contribuído na minha formação profissional e humana. Seu apoio e dedicação foram muito além da orientação científica e hoje o tenho como exemplo de profissionalismo, no qual se dedica com muito comprometimento.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Aos meus irmãos Simone e Fábio, pelos momentos compartilhados, apoio e carinho. Por ser o filho mais novo, muito aprendi apenas observando vocês.
- ❖ Aos meus sobrinhos Felipe e Gabriele por me fazer voltar várias vezes no tempo, me sentindo uma criança ao lado de vocês. “Agora, Felipe, seu tio terminou de escrever a tese, vou largar o computador e brincar com você”.
- ❖ Ao meu amigo, irmão e grande parceiro Bira, pela amizade e pelas pizzas de sexta-feira e à Tamar, futura madrinha e amiga de todas as horas.
- ❖ À minhas cunhadas Shirley, Franciele e Tauane, “minhas cunhadas prediletas”!
- ❖ Aos meus futuros sogros Ailton e Cirleia, por todo carinho e paciência, principalmente quando eu levava o computador nos finais de semana para escrever relatórios e a tese.
- ❖ Ao meu amigo Sebastian, pelas orações, conversas e pela amizade de longa data.
- ❖ À minha *familia española: Francisco, Guadalupe e Lupita, muchas gracias por haberme dado muchos momentos de alegría, apoyo y por ayudar a disminuir la nostalgia de Brasil. Nunca me olvidaré de vosotros.*
- ❖ À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro.
- ❖ À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado sanduíche.
- ❖ Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo e seus funcionários, especialmente a Priscila, Cristina e Lúcia.
- ❖ Ao Departamento de Química Analítica, Edificio de Investigacion da Universidad de Valencia, Valência, Espanha, pela acolhida durante o estágio do doutorado sanduíche, especialmente aos profs. Ángel Morales Rúbio e Miguel de la Guardia.
- ❖ Os amigos de laboratório, Mariana, Mauricio e Wanessa, em especial ao Diogo pela grande amizade, sugestões e bons momentos compartilhados.

- ❖ Aos Profs. Mauro Bertotti e Jorge C. Masini pelas importantes contribuições no exame de qualificação.
- ❖ Ao Prof. Pedro Vitoriano pelas inúmeras contribuições e sugestões ao longo do mestrado e doutorado.
- ❖ Ao Prof. Joaquim Nóbrega pela colaboração principalmente no trabalho do manganês; como sempre suas contribuições e sugestões foram de grande valia.
- ❖ À Profa. Maria Encarnación pela amizade e contribuição significativa durante minha pós-graduação.
- ❖ À Prof. Cassiana S. Nomura, pela ajuda nas medidas por GF AAS e pela amizade.
- ❖ Ao Prof. Thiago R. L. C. da Paixão, pela amizade, sugestões e paciência em me aguentar no laboratório.
- ❖ À Profa. Juliana Naozuka pela amizade, sugestões e diversas outras contribuições.
- ❖ Aos Profs. Leonardo S. G. Teixeira (UFBA) e Maria F. Pimentel (UFPE) pelas amostras de biodiesel utilizadas na determinação de glicerol.
- ❖ Aos amigos do CENA – Andréia, Rejane e Sheila pela acolhida em Piracicaba.
- ❖ Aos Profs. Elias A. G. Zagatto e Boaventura F. dos Reis pelos comentários, críticas e sugestões.
- ❖ Aos amigos da UFABC, Rodrigo, Samara e Vivian, sempre terei vocês guardados em meu coração.
- ❖ Aos amigos que conheci na Universidade de Valência, em especial à Saray e Mariela, *muchas gracias!*
- ❖ Aos amigos do IQ-USP: Angerson, Gislayne, Valeska, Alexandre, Daniel, Maciel, Marília, Renata, Luiza, Roselyn, Ana, Maiara, Poliana e Alex.
- ❖ Ao Prof. Lúcio Angnes e ao Eric (Pop) pela ajuda na construção de acessórios dos sistemas em fluxo.

Ao Prof. Eduardo F. A. Neves (*in memoriam*)

"Sem dúvida, ideias geram ideias...Ideias surgem frequentemente em debates científicos, daí a importância de seminários e dos congressos de ciências em que ouvintes atentos podem encontrar soluções inspiradas momentaneamente para seus problemas de pesquisa. Melhor ainda é o debate científico informal e diário."

(Eduardo F. A. Neves)

Foi em uma dessas conversas informais que surgiu a ideia da determinação de manganês explorando a formação do complexo Mn(III)/EDTA. Um debate informal que o Prof. Eduardo Neves teve com o Prof. Joaquim Nóbrega, que por sua vez conversou com o Prof. Fábio e este comigo. Que esta corrente de boas ideias jamais se acabe!

RESUMO

Silva, S.G. **Sistemas de análises em fluxo para a determinação de glicerol em biodiesel e manganês em águas**. 2011. 144p. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sistemas de análises em fluxo com minibombas solenoide foram desenvolvidos para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel e manganês em águas. Em um primeiro trabalho, glicerol livre foi determinado por espectrofotometria após oxidação com periodato, levando à formação de formaldeído, que reagiu com acetilacetona, formando o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL). O analito foi extraído com água, em substituição à extração utilizando solventes orgânicos. Resposta linear foi observada de 5 a 50 mg L⁻¹, com limite de detecção estimado em 1 mg L⁻¹ (99,7% de confiança), equivalente a 0,0004% em massa de biodiesel, valor 50 vezes menor que o limite estabelecido pelas legislações Brasileira, Norte americana e Europeia. O coeficiente de variação foi inferior a 1,5% (n = 10) e a frequência de amostragem foi estimada em 34 amostras h⁻¹, com consumo de 340 µg de KIO₄ e 15 mg de acetilacetona por determinação. A mesma reação foi explorada para detecção fluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel, sendo essa espécie quantificada após reação de saponificação dos mono-, di- e triglicerídeos remanescentes no biodiesel. Para a determinação de glicerol livre, resposta linear foi observada no intervalo de 5 – 70 mg L⁻¹, com limite de detecção estimado em 0,5 mg L⁻¹, equivalente a 0,0002% (m/m) de biodiesel, com coeficiente de variação menor que 1,0 % (n = 20). Na determinação de glicerol total, faixa linear foi observada no intervalo de 25 – 300 mg L⁻¹, com limite de detecção de 1,5 mg L⁻¹ e coeficiente de variação de 1,4% (n = 10). As frequências de amostragem foram de 35 e 30 amostras h⁻¹, para glicerol livre e total, respectivamente, consumindo 190 µg de KIO₄ e 13 mg de acetilacetona por determinação. Os resultados obtidos para as análises de biodiesel foram concordantes com os procedimentos de referência. A formação do complexo Mn(III)/EDTA foi explorada para a determinação de manganês em amostras de águas. Mn(II) foi oxidado em linha em um reator contendo dióxido de chumbo imobilizado em um poliéster. Espectrofotometria com longo caminho óptico foi empregada para aumento de sensibilidade, visando atender o limite máximo tolerado deste metal, estabelecido pelas legislações ambientais vigentes. Resposta linear foi observada no intervalo de 25 a 1500 µg L⁻¹, com limite de detecção estimado em 6 µg L⁻¹ (99,7% de confiança). Frequência de amostragem e coeficiente de variação foram estimados em 36 amostras h⁻¹ e 2,6 % (n = 10), respectivamente, consumindo 500 µg de EDTA por determinação. A quantidade de chumbo no resíduo corresponde a 250 µg por determinação e, com o reator empregado, é possível realizar até 1600 determinações. Interferências causadas por matéria orgânica nas amostras foram observadas e carvão ativo foi usado para remoção destes interferentes. Os resultados obtidos pelo procedimento proposto e por GF AAS foram concordantes (99,7 % de confiança).

Palavras chaves: análises em fluxo, multicomutação, biodiesel, glicerol, manganês.

ABSTRACT

Silva, S.G. **Flow Injection procedures for glycerol determination in biodiesel and manganese in water samples.** 2011. 144p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Flow injection procedures based on solenoid micro pump were developed for free and total glycerol determination in biodiesel samples and manganese in fresh water. In a first work, free glycerol was determined by spectrophotometry, after glycerol oxidation by periodate, yielding formaldehyde, followed by formation of the colored product 3,5-diacetyl-1,4-dihidrolutidine (DDL) upon reaction with acetylacetone. The analyte was extracted with water in replacement of organic solvents. A linear response was observed from 5 to 50 mg L⁻¹, and detection limit was estimated as 1 mg L⁻¹ (99.7% confidence level) equivalent to 0.0004% (w/w), 50 times lower than the threshold value established by Brazilian, European and American regulations. The coefficient of variation was lower than 1.5% (n=10) and sampling rate was estimated at 34 samples h⁻¹, consuming 340 µg of KIO₄ and 15 mg of acetylacetone per determination. The same reaction was exploited for fluorimetric detection of free and total glycerol in biodiesel, and glycerol total was quantified after saponification of mono-, di- and triglycerides remaining in biodiesel. To free glycerol determination a linear response was observed from 5 to 70 mg L⁻¹, with a detection limit of 0.5 mg L⁻¹, which corresponds to 0.0002% (w/w) in biodiesel, and coefficient of variation was lower than 1.0% (n=10). To total glycerol determination, a linear response was observed from 25 to 300 mg L⁻¹, with a detection limit of 1.5 mg L⁻¹, and coefficient of variation of 1.4% (n=10). The sampling rate was estimated at 35 and 30 samples h⁻¹, to free and total glycerol, respectively. The results obtained to biodiesel samples agreed at the 95% confidence level with reference procedures. The formation of the Mn(III)/EDTA complex was exploited for manganese determination in water. Mn(II) was oxidized in a reactor containing lead dioxide immobilized on polyester. Long pathlength spectrometry was exploited to increase sensitivity, aiming to reach the threshold limit established by environmental legislation. A linear response was observed from 25 to 1500 µg L⁻¹, with a detection limit of 6 µg L⁻¹ (99.7% confidence level). Sample throughput and coefficient of variation were 36 samples h⁻¹ and 2.6% (n=10), respectively, consuming 500 µg of EDTA. The amount of lead in the residue corresponds to 250 µg per determination, and it is possible to perform up to 1600 measurements. Interferences by organic matter were observed and active charcoal was employed to remove the interfering species. Results were in agreement with those attained by GF AAS at the 95% confidence level.

Keywords: flow injection analysis, multicommutation, biodiesel, glycerol, manganese.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amostra
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	Sociedade Norte Americana de normalização (do inglês <i>American Society for Testing and Materials</i>)
B	Reator helicoidal
CCD	Dispositivos de Carga Acoplada (do inglês <i>charge-coupled devices</i>)
CG	Cromatografia a gás (do inglês <i>gas chromatography</i>)
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
D	Detector
DDL	3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>)
ET AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (do inglês <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i>)
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (do inglês <i>flame atomic absorption spectrometry</i>)
FIA	Análises por injeção em fluxo (do inglês <i>flow injection analysis</i>)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i>)

ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
LWC	Guia de ondas com núcleo líquido (do inglês <i>liquid-core waveguide</i>)
MBTH	3-metil-2-benzetiazolinona hidrazona
MCFA	Análises em fluxo com multicomutação (do inglês <i>multicommuted flow analysis</i>)
MPFA	Análises em fluxo com minibombas solenoide (do inglês <i>multi-pumping flow analysis</i>)
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
R	Reagente
W	Descarte

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Sistemas de análises em fluxo com minibombas solenoide	23
1.2. Biodiesel	28
2.2.1. Determinação de glicerol em biodiesel	31
1.3. Manganês	34
1.4. Espectrofotometria com longo caminho óptico	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. EXPERIMENTAL	43
3.1. Equipamentos e acessórios	45
3.2. Reagentes e soluções	46
3.2.1. Determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel	46
3.2.2. Determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel...	47
3.2.3. Determinação de manganês em águas.....	47
3.3. Sistemas de análises em fluxo	47
3.3.1. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel	48
3.3.2. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel	50

3.3.3. Sistemas de análises em fluxo para a determinação de manganês em águas	<u>52</u>
3.4. Preparo de amostras.....	<u>55</u>
3.4.1. Determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel	<u>55</u>
3.4.2. Determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel ...	<u>55</u>
3.4.3. Determinação de manganês em águas	<u>56</u>
3.5. Procedimentos de referência	<u>56</u>
3.5.1. Determinação de glicerol livre em batelada	<u>56</u>
3.5.2. Método volumétrico para a determinação de glicerol total	<u>57</u>
3.5.3. Determinação de manganês por GF AAS.....	<u>59</u>
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	<u>61</u>
4.1. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel.....	<u>63</u>
4.1.1. Aspectos gerais	<u>63</u>
4.1.2. Otimização.....	<u>65</u>
4.1.3. Preparo da amostra	<u>80</u>
4.1.4. Características analíticas e aplicação.....	<u>83</u>
4.2. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel	<u>88</u>
4.2.1. Aspectos gerais	<u>88</u>
4.2.2. Otimização.....	<u>88</u>
4.2.3. Preparo da amostra	<u>97</u>

4.2.4. Características analíticas e aplicação	<u>99</u>
4.3. Sistemas de análises em fluxo para a determinação de manganês em águas.....	<u>105</u>
4.3.1. Aspectos gerais.....	<u>105</u>
4.3.2. Otimização	<u>107</u>
4.3.2. Características analíticas	<u>114</u>
4.3.3. Determinação de manganês em águas.....	<u>118</u>
5. Conclusões	<u>127</u>
6. Referências bibliográficas	<u>131</u>

Lista de figuras

Figura 1 – Componentes de uma minibomba solenoide e esquema de acionamento de uma minibomba solenoide para propulsão de fluidos.....	25
Figura 2 – Reação de transesterificação entre ésteres e álcoois.....	29
Figura 3 - Sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide para a determinação de glicerol livre em biodiesel.....	49
Figura 4 - Sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel.....	50
Figura 5 - Sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide para a determinação de manganês em águas.....	52
Figura 6 – Etapas no preparo da minicoluna para oxidação de manganês.	54
Figura 7 – Reações envolvidas na determinação volumétrica de glicerol total em biodiesel..	58
Figura 8 - Esquema da reação de oxidação do glicerol por periodato.	63
Figura 9 - Reação entre formaldeído e acetilacetona em presença de amônia levando à formação do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina.	64
Figura 10 - Espectro de absorção do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina.	65
Figura 11 - Variação da absorbância em função do tempo na reação de formação do composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina.....	66
Figura 12 - Efeito da concentração de metaperiodato de potássio sobre o sinal analítico.....	68
Figura 13 - Efeito da concentração de acetilacetona sobre o sinal analítico..	69
Figura 14 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico.	70
Figura 15 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico para formaldeído.....	71
Figura 16 - Variação do sinal analítico com a concentração de acetato de amônio..	73
Figura 17 – Influência do número de pulsos de amostra, acetilacetona e periodato sobre o sinal analítico.	75

Figura 18 - Influência do tamanho do reator sobre o sinal analítico.	77
Figura 19 - Efeito do número de ciclos de amostragem no sinal analítico.	78
Figura 20 - Influência do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico..	79
Figura 21 – Curvas de calibração construídas em meios aquoso e aquo-etanólico.....	82
Figura 22 - Curvas analíticas obtidas em diferentes tempos de parada de fluxo	84
Figura 23 - Sinais transientes para soluções de glicerol.....	85
Figura 24 - Efeito da concentração de acetilacetona sobre o sinal analítico.	89
Figura 25 - Efeito da concentração de metaperiodato sobre o sinal analítico.....	90
Figura 26 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico.....	91
Figura 27 - Variação do sinal analítico com a concentração de acetato de amônio.....	92
Figura 28 - Influência do número de pulsos de amostra, acetilacetona e periodato sobre o sinal analítico.....	93
Figura 29 – Influência do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico.....	95
Figura 30 - Efeito do número de ciclos de amostragem.....	96
Figura 31 – Efeito da concentração de NaOH na reação de saponificação.....	98
Figura 32 – Efeito da variação do volume de etanol na reação de saponificação	99
Figura 33 – Curva de calibração para a determinação fluorimétrica de glicerol livre em biodiesel.....	100
Figura 34 - Curva de calibração para a determinação fluorimétrica de glicerol total em biodiesel.....	101
Figura 35 - Formação do complexo [MnHEDTA] após oxidação de Mn(II) por PbO ₂	105
Figura 36 –.Espectro de absorção do complexo MnHEDTA obtido após oxidação em linha de 1 mg L ⁻¹ de Mn(II).....	106
Figura 37 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico.....	108
Figura 38 - Efeito da massa de PbO ₂ imobilizado em poliéster	109

Figura 39 - Influência do tamanho do reator sobre o sinal analítico.....	110
Figura 40 - Efeito da concentração de EDTA sobre o sinal analítico.....	112
Figura 41 - Sinais transientes e curva analítica para a determinação de manganês.....	116
Figura 42 - Espectros de absorção para a amostra de Rio1, com e sem pré-tratamento.....	120

Lista de tabelas

Tabela 1 – Rotina de acionamento das minibombas solenoide para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel.....	49
Tabela 2 – Rotina de acionamento das minibombas solenoide para determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel.	51
Tabela 3 – Parâmetros instrumentais para a determinação de Mn por GF AAS.....	59
Tabela 4 – Programa de aquecimento para a determinação de Mn em águas por GF AAS....	60
Tabela 5 – Valores médios de absorbância e desvios obtidos pelo procedimento proposto em três diferentes situações de preparo dos reagentes	72
Tabela 6 – Parâmetros otimizados para a determinação de glicerol em biodiesel em sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide.	80
Tabela 7 - Valores de absorbância obtidos em diferentes procedimentos de extração.	81
Tabela 8 – Parâmetros analíticos estimados em diferentes tempos de parada de fluxo.	83
Tabela 9 – Determinação de glicerol livre em biodiesel.	86
Tabela 10 - Parâmetros otimizados para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel.....	96
Tabela 11 – Características analíticas de procedimentos baseados na reação de Hantzsch para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel.	102
Tabela 12 – Determinação de glicerol livre e total em biodiesel.	103
Tabela 13 - Parâmetros otimizados para a determinação de manganês em águas.....	114
Tabela 14 – Características analíticas do procedimento desenvolvido.	115
Tabela 15 – Constantes de formação de íons complexos com EDTA.....	117
Tabela 16 – Determinação de manganês em águas.	119
Tabela 17 – Efeito da separação da matéria orgânica com carvão ativado.	121
Tabela 18 - Determinação de manganês em amostras de águas após pré-tratamento.	122

Tabela 19 - Características analíticas de procedimentos em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de manganês.....	125
---	-----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistemas de análises em fluxo com minibombas solenoide

Os sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA) constituem um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa (e eventualmente os reagentes) é introduzida em um fluxo contínuo e não segmentado de um fluido transportador. Nestes sistemas, a zona de amostra sofre dispersão durante o transporte, sendo então misturada com as soluções transportadora e reagente. A zona de amostra resultante é conduzida em direção à cela de medida, gerando um sinal transiente, que é registrado em um sistema apropriado para aquisição de dados e quantificado, usualmente, em relação à altura máxima. Durante o transporte, a amostra pode sofrer tratamento em linha mediante a adição de reagentes e através de colunas de separação, pré-concentração ou contendo reagentes sólidos [1]. Nestes sistemas alguns dispositivos podem ser utilizados para a inserção da amostra como injetor proporcional, válvulas rotatórias de 6 ou 8 vias e válvulas ou minibombas solenoide [2].

Em 1994, Reis e colaboradores [3] utilizaram válvulas solenoide para gerenciar a inserção de reagentes e amostra em sistemas de análises em fluxo. Como esses dispositivos podem ser controlados independentemente através de um microcomputador, a estrutura física dos módulos de análise pode ser reconfigurada por *software* [4]. O uso destes dispositivos para gerenciamento de soluções deu origem ao processo de multicomutação, que consiste no emprego de dispositivos ativos de comutação (válvulas ou minibombas solenoide) em sistemas de análises em fluxo. Essa estratégia permite aumentar a versatilidade dos sistemas e proporciona uma diminuição dos custos operacionais, do consumo de reagentes e amostras e, conseqüentemente, da quantidade de resíduos [5].

A multicomutação pode ser aplicada para diversas finalidades, como: (i) diluições controladas, buscando expandir a faixa de concentração em que os procedimentos analíticos podem ser aplicados; (ii) determinações sequenciais sem a necessidade de alterar a estrutura

física do módulo de análises, pelo controle independente da adição de diferentes reagentes e alteração das condições reacionais; (iii) aumento do tempo de residência, para melhorar a sensibilidade em procedimentos baseados em reações relativamente lentas; (iv) titulações e (v) concentrações e separações em linha.

Válvulas solenoide são os dispositivos mais utilizados na construção de sistemas de análises em fluxo com multicomutação e permitem a comutação de soluções em momentos pré-estabelecidos, requerendo um sistema de propulsão (*e.g.* bomba peristáltica ou seringas) ou a ação da força da gravidade [6]. Minibombas solenoide são dispositivos eletromecânicos que dispensam volumes de soluções da ordem de microlitros. Minibombas com volumes internos entre 8 – 250 μL geralmente são as mais utilizadas. Com operação em uma frequência de 2 Hz, cada minibomba pode realizar cerca 20 milhões de ciclos, correspondente a 3000 horas de funcionamento contínuo [7]. Além de exercerem a função de comutadores, as minibombas são responsáveis pela propulsão das soluções em sistemas de análises em fluxo [8]. A Figura 1A apresenta um esquema com os componentes de uma minibomba solenoide e a Figura 1B apresenta um esquema da sequência de acionamento de uma minibomba solenoide. O canal de passagem de solução no interior da minibomba solenoide é isolado de seu mecanismo de operação por um diafragma flexível conectado a um pistão envolto ao solenoide. Quando a corrente elétrica de *ca.* 100 mA atravessa o solenoide, gera-se um campo magnético que contrai a mola, retraindo o diafragma, diminuindo a pressão interna e permitindo a entrada de solução no interior da minibomba. Quando o campo magnético é desativado, consequência da interrupção da corrente elétrica pelo solenoide, a mola impulsiona o pistão para baixo, fechando o diafragma e expelindo a solução da câmara da minibomba [9]. Desta forma, para que uma alíquota de solução seja dispensada pela minibomba é necessário que corrente elétrica flua pelo solenoide (ON) e seja interrompida (OFF).

Figura 1 – Componentes de uma minibomba solenoide (A) e esquema de acionamento de uma minibomba solenoide (B) para propulsão de fluidos. OFF minibomba desativada e ON minibomba ativada.

A utilização de minibombas solenoide na construção de sistemas de análises em fluxo foi proposta em 1996 por Weeks e Johnson [10]. Nesse trabalho pioneiro, estes dispositivos foram empregados em substituição à bomba peristáltica na propulsão de reagentes e solução transportadora, em um sistema de análises em fluxo. Para a inserção da

amostra foi empregada uma válvula rotatória de 4 vias e uma bomba peristáltica para preencher a alça de amostragem. Alguns anos depois, Lapa *et al.* [9] propuseram um novo sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide como únicos componentes ativos, para a propulsão das soluções e inserção da amostra, conferindo maior versatilidade aos sistemas. Dessa forma, a inserção de reagentes e amostras pode ser realizada em quantidades realmente necessárias ao processamento da amostra, com consumo de soluções na ordem de microlitros [9]. Essa característica faz desses dispositivos uma ferramenta ideal para o desenvolvimento de procedimentos analíticos ambientalmente corretos, caracterizados pela redução de consumo de reagentes e amostras e minimização da quantidade de resíduos gerados [8]. As pequenas dimensões (*ca.* 7 cm) e o baixo consumo de corrente tornam as minibombas atraentes para o desenvolvimento de sistemas portáteis.

Uma característica de sistemas de análises em fluxo com minibombas solenoide é o fluxo pulsado inerente a estes dispositivos, que favorece o transporte de massa radial, minimizando a dispersão axial. Forte *et al.* [11] avaliaram o desempenho de sistemas de análises em fluxo com multicomutação empregando minibombas solenoide (MPFA) ou válvulas solenoide (MCFA), sendo que neste último uma bomba peristáltica foi empregada como unidade propulsora dos fluidos, que fornecia fluxo laminar. Mantendo constantes as vazões, o tamanho do reator e o volume de amostra, os autores avaliaram o perfil do sinal analítico para as duas situações, com soluções diluídas de verde de bromocresol para simular a zona de amostra. O sistema utilizando minibombas solenoide apresentou picos mais simétricos, com menor tempo de limpeza aumentando a sensibilidade e a frequência de amostragem e evidenciando o aumento do transporte de massa radial e diminuição da dispersão axial. Imagens das zonas de amostras foram obtidas com uma câmera de alta resolução para as duas situações avaliadas. As imagens revelaram que um perfil parabólico é

obtido em MCFA, evidenciando fluxo laminar, enquanto na imagem obtida em MPFA foi observada a presença de vórtices, caracterizando o fluxo turbulento [11].

O efeito dos fluxos laminares e pulsados na eficiência de transporte de calor foi avaliado por Alves e colaboradores [12]. O procedimento envolvia uma etapa de aquecimento em linha para a determinação espectrofotométrica de açúcares redutores em melaço e caldo de cana. A eficiência de degradação alcalina de açúcares redutores (sacarose e frutose) foi avaliada em diferentes temperaturas para os sistemas MCFA e MPFA e melhores resultados foram obtidos com o sistema com minibombas solenoide. Durante o acionamento da minibomba solenoide, o deslocamento súbito do diafragma proporciona um movimento desordenado das soluções gerenciadas por esses dispositivos, tendo como resultado um fluxo pulsado característico [13]. Por conta disso, as condições de mistura entre amostra e reagentes são melhoradas e a temperatura na zona de amostra é mais homogênea, permitindo reduzir o tamanho do reator de mistura, minimizando a dispersão da amostra e, consequentemente, aumentando a sensibilidade analítica [12]. Em condições otimizadas, o sinal analítico foi 25% maior em MPFA comparado ao sinal obtido por MCFA.

Vantagens devido à pulsação característica de minibombas solenoide foram observadas na determinação de zinco em digeridos de plantas empregando uma câmara preenchida por uma resina de troca iônica com leito fluidizado para a pré-concentração em linha do analito [14]. A pulsação fornecida pelas minibombas solenoide favoreceu a circulação das partículas sólidas da resina no interior da câmara, melhorando o contato entre as fases, favorecendo a troca iônica [14].

Sistemas com muticomutação permitem que as alíquotas de amostra e reagentes sejam inseridas simultaneamente (zonas coalescentes) ou por amostragem binária [15]. Nesse processo, as alíquotas de reagentes são intercaladas entre as alíquotas de amostras, formando

um ciclo de amostragem que pode ser repetido quantas vezes forem necessárias. Desta forma, a reação se inicia durante a etapa de amostragem, diferentemente dos sistemas de análises em fluxo convencionais, contribuindo para o aumento do tempo de residência e da frequência de amostragem [9].

1.2. Biodiesel

A demanda energética mundial vem crescendo significativamente em virtude do aumento populacional e industrial [16,17] e, devido à escassez de petróleo e seus derivados, novas fontes de energia, de menor impacto ambiental, vem sendo estudadas [17]. Neste contexto, o biodiesel surgiu como uma fonte de energia alternativa aos combustíveis fósseis [18]. Em 2004, o Congresso Nacional aprovou a Medida Provisória 214, abrindo a possibilidade do uso do biodiesel fora do campo de pesquisa. No ano seguinte, a lei nº 11.097 regularizou a introdução do mesmo no território brasileiro, tornando obrigatória a mistura de biodiesel ao óleo diesel inicialmente na proporção de 2% (v/v), com aumento gradativo previsto até janeiro de 2010, quando a proporção passou a ser de 5% [19]. O biodiesel pode substituir totalmente ou parcialmente o óleo diesel de petróleo em motores movidos a diesel (*e.g.* motores de caminhões, tratores e camionetas) ou estacionários (*e.g.* geradores de eletricidade e calor). O biodiesel puro é chamado de B100, a mistura de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B5 [19].

Biodiesel é um combustível biodegradável produzido a partir de diferentes fontes, como óleos vegetais e gorduras animais, formado principalmente por ésteres de cadeia menores que os presentes na matéria prima [16,18]. No Brasil, cerca de 80% do biodiesel produzido é proveniente do óleo de soja, seguido de sebo bovino (*ca.* 15%), de acordo com o Boletim mensal publicado pela ANP para o ano de 2010 [20]. Outras fontes, tais como óleos

de mamona, dendê, girassol, babaçu, amendoim e pinhão manso também têm sido utilizadas para a fabricação de biodiesel [21,22].

Óleos vegetais são constituídos basicamente por moléculas de triacilglicerídeos, formadas por três ácidos graxos de cadeia longa ligados a uma molécula de glicerol; apresentam elevada viscosidade e baixa volatilidade, dificultando seu uso como combustível. Para superar essas dificuldades, os triacilglicerídeos devem passar por um processo de derivação para obtenção de ésteres de cadeias menores [23-25]. Existem várias metodologias para obtenção do biodiesel, tais como craqueamento, esterificação ou transesterificação [26,27]. A transesterificação de óleos vegetais tem sido o método mais empregado para a obtenção de biodiesel principalmente por gerar ésteres de ácidos graxos com características físico-químicas semelhantes às do diesel [28-31]. Este método consiste na reação química dos óleos vegetais ou gorduras animais com um álcool (etanol ou metanol), na presença de um catalisador (Figura 2) [30,31]. Nesta reação, catalisada por ácidos ou bases fortes, também se formam resíduos de glicerol, produto com diversas aplicações na indústria química e que pode ser removido a partir de um processo de lavagem com água [32].

Figura 2 – Reação de transesterificação entre ésteres e álcoois.

Quantidades remanescentes dos reagentes utilizados na produção do biodiesel, assim como subprodutos da reação (*e.g.* etanol residual, glicerídeos que não reagiram, glicerol e ácidos graxos livres) podem causar diversos danos ao motor do veículo, contribuindo para o aumento do depósito de carbono na engrenagem do motor [33] e do consumo de combustível [34,35]. O glicerol livre é o principal produto residual. Apesar de ser insolúvel no biodiesel, o glicerol forma pequenas gotículas que permanecem dispersas nesse biocombustível e, portanto, sua determinação serve para avaliar a eficiência do processo de purificação [24]. Além disso, o glicerol residual no biodiesel pode se acumular no sistema de injeção de combustível, afetando o desempenho dos motores dos automóveis, elevando a emissão de aldeídos e podendo ocasionar a corrosão do sistema de injeção de combustível [36]. Outro aspecto relevante é que a queima desta substância junto com o biodiesel, a partir de 180°C, pode causar a formação de acroleína, substância altamente tóxica para o ambiente [36]. Outro parâmetro importante para o controle de qualidade de biodiesel é o teor de glicerol total, definido como a soma das concentrações de glicerol livre e combinado, que consiste nos mono-, di- e triglicerídeos provenientes da reação incompleta entre os glicerídeos e o álcool [24]. Os glicerídeos remanescentes da reação de transesterificação incompleta, em elevadas concentrações, aumentam a viscosidade do combustível, reduzindo a eficiência da combustão, danificando o filtro de combustível e gerando depósitos no sistema de distribuição de combustível (pistões, válvulas e bicos injetores) [29]. A determinação de glicerol total em biodiesel serve para avaliar a eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel [24].

De acordo com a resolução nº 42/2004 da ANP, os limites máximos permitidos de glicerol livre e total são 0,02 e 0,25% em massa de biodiesel, respectivamente [19], iguais aos limites adotados pelas legislações Europeia [37] e Norte Americana [38].

2.2.1. Determinação de glicerol em biodiesel

O glicerol (1,2,3-propano-triol) é um líquido inodoro e incolor, com elevada solubilidade em água [36]. A ANP recomenda os métodos EN 14106 [37] e ASTM D 6584 [38], baseados em cromatografia gasosa, para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel. Este procedimento envolve uma etapa de derivação química com o reagente N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) em meio de piridina. Este método não é recomendado para a determinação em biodiesel proveniente de mamona, devido às interferências causadas pela incompleta silanização dos grupos hidroxila livres dos diglicerídeos, além de não apresentar repetibilidade e reprodutibilidade necessárias [19]. Além disso, para algumas amostras, traços de produtos voláteis (solventes usados como carregador para aditivos ou hidrocarbonetos presentes na amostra) causam interferências nas determinações de glicerol livre e total. Um método alternativo para a determinação de glicerol total recomendado pela ANP é baseado na determinação de glicerol em óleos [39]. O procedimento explora a saponificação para a liberação do glicerol na forma de glicerídeos, seguida de etapas de extração líquido-líquido e oxidação do glicerol com ácido periódico, cujo excesso é quantificado por iodometria [19].

Na literatura, são encontrados diversos métodos alternativos para a determinação de glicerol em biodiesel, em geral empregando técnicas de separação como HPLC e CG, sendo esta última a mais utilizada [40]. O primeiro método proposto para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel [41] envolvia uma reação de saponificação com excesso de hidróxido de sódio em meio de dietilenoglicol, em temperaturas superiores a 130°C, seguida de extração em fase-sólida em coluna empacotada com sílica funcionalizada C-8 para separação do analito. Bondioli e colaboradores propuseram um procedimento para a determinação de glicerol em biodiesel por CG com detector por ionização em chama, eliminando a etapa de derivatização da amostra [40]. O inconveniente deste procedimento é

que o limite de detecção foi superior a 0,02% [40]. Glicerol livre foi determinado por CG-MS [42], que também apresenta o inconveniente da etapa de derivação química, além de utilizar equipamento com custo elevado. Uma alternativa para a determinação de glicerol livre em biodiesel foi apresentada por Gonçalves e Mike[43]. Após a extração do analito com água, glicerol foi oxidado por metaperiodato e o iodato formado na reação foi monitorado por eletroforese capilar.

Métodos espectrofotométricos para a determinação de glicerol em geral envolvem reatores em fase sólida contendo a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase imobilizada [44-46]. Outra possibilidade é a determinação indireta de glicerol, após sua oxidação, que resulta na formação de formaldeído, que pode ser quantificado empregando ácido cromotrópico [47]. Entretanto, este procedimento exige elevadas concentrações de reagentes, elevadas temperaturas e uso de reagentes tóxicos. Formaldeído também pode ser quantificado após a reação com 3-metil-2-benzetiazolinona hidrazona (MBTH) formando um composto com máximo de absorção em 628 nm [48], no entanto, este procedimento não apresenta seletividade adequada, sendo indicado para a determinação de aldeídos em geral [49].

Alternativamente, formaldeído pode ser determinado com acetilacetona (2,4-pentadiona) em presença de amônia (reação de Hantzsch), formando um produto de coloração amarela, o 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL)[50,51]. A reação é seletiva para formaldeído, que pode ser quantificado por espectrofotometria [52] ou fluorimetria [53]. A reação é lenta e, em alguns casos, é necessário aquecimento para aumentar a sensibilidade [54]. A determinação de formaldeído em álcool combustível explorando a reação do analito com acetilacetona em sistemas de análises em fluxo foi proposta por Teixeira e colaboradores [55]. O produto formado foi retido na cela de fluxos preenchida com sílica funcionalizada C-18, e medidas por espectrofotometria em fase sólida foram realizadas em 412 nm. O limite de detecção foi estimado em $30 \mu\text{g L}^{-1}$ com frequência de amostragem de 20 amostras h^{-1} [55].

Baseado na reação de Hantzsch, Bondioli e Della Bella[56] desenvolveram um procedimento espectrofotométrico para a determinação de glicerol livre em biodiesel, após a oxidação do glicerol por periodato, produzindo formaldeído, seguida da reação com acetilacetona em presença de acetato de amônio. O produto da reação foi monitorado por espectrofotometria em 410 nm [56]. Este procedimento envolve uma etapa de aquecimento e a temperatura e o tempo de incubação são fatores importantes para obtenção de resultados confiáveis.

Pinzi *et al.*[57] propuseram um método para extração e determinação em linha de glicerol livre e total em biodiesel em um sistema de análises em fluxo com detecção espectrofotométrica, baseado no procedimento em batelada [56]. Os limites de detecção foram estimados em 0,0028 e 0,0310% (m/v) para glicerol livre e total, respectivamente, com frequência de amostragem de 9 amostras h⁻¹ [57]. A etapa de aquecimento utilizada no procedimento em batelada foi substituída por tratamento com ultrassom por 5 minutos.

Métodos volumétricos para a determinação de glicerol total também são apresentados na literatura [19,58] Em ambos os trabalhos, glicerol total é determinado após saponificação do glicerol ligado remanescente no biodiesel, seguido da extração de glicerol livre com água. Após esta etapa de preparo da amostra, glicerol é oxidado por periodato em meio ácido gerando formaldeído e ácido fórmico. No método preconizado pela ANP [19], o ácido periódico remanescente é determinado por iodometria, enquanto no outro método [58] o ácido fórmico gerado pela oxidação do glicerol é titulado por hidróxido de sódio. Estes procedimentos apresentam a desvantagem de requerer elevadas quantidades de reagentes, especialmente solventes tóxicos, durante a extração de glicerol total.

1.3. Manganês

Manganês é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, micronutriente essencial para os organismos vivos, que se torna tóxico em elevadas concentrações [59]. Em adultos, o acúmulo deste elemento na membrana basal pode afetar o sistema nervoso, causando uma doença chamada de síndrome do manganismo ou Parkinson Manganico, com sintomas semelhantes ao do mal de Parkinson [60]. Este metal pode ser acumulado em organismos aquáticos que fazem parte da dieta humana, tais como peixes e mexilhões [61]. Desta forma, a determinação de manganês é de extrema importância em águas naturais, efluentes domésticos, alimentos e em análises clínicas. A presença de manganês em solos e lençóis freáticos é resultante da erosão química da crosta terrestre. A quantidade máxima tolerada de manganês total em águas doces de classe 1 é $100 \mu\text{g L}^{-1}$, de acordo com a Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente [62].

A dificuldade para a determinação de traços de manganês em amostras ambientais deve-se à baixa concentração deste elemento nestas amostras e a efeitos de matriz [63]. Os métodos encontrados na literatura para a determinação de manganês empregam diversas técnicas analíticas como espectrofotometria, voltametria de redissolução anódica, polarografia e quimiluminescência [64]. A espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), extensamente empregada para a determinação de íons metálicos, não apresenta sensibilidade adequada para a quantificação direta de manganês em águas naturais [65]. Técnicas como ETAAS, ICP OES e ICP-MS apresentam elevada sensibilidade, porém, os custos dos equipamentos e operacionais são elevados.

O método espectrofotométrico mais conhecido para a determinação de manganês envolve a oxidação do manganês(II) a permanganato, seguida da determinação por espectrofotometria [66]. Este método apresenta sensibilidade e seletividade inadequadas para

a determinação de manganês em baixas concentrações. Além disso, a oxidação geralmente requer aquecimento e longo tempo de reação.

Manganês(II) reage com formaldoxina em meio alcalino, formando um complexo incolor que se oxida instantaneamente na presença de oxigênio dissolvido, formando um complexo de manganês (IV) de coloração vermelha (máximo de absorção em 460 nm). Entretanto, este método é menos sensível que o método do permanganato, além de apresentar baixa reprodutibilidade e seletividade inadequada [67]. Azo reagentes formam complexos coloridos com manganês, porém, assim como a formaldoxina, esses complexantes apresentam baixa seletividade [67].

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um dos reagentes complexantes mais utilizados em química analítica, especialmente em titulações para a determinação quantitativa de metais. Praticamente todos os elementos da tabela periódica podem ser determinados direta ou indiretamente [68]. O EDTA apresenta seis prótons dissociáveis, quatro relacionados aos grupos carboxílicos e outros dois prótons aos grupos amínicos.

Dependendo da acidez do meio, manganês(III) forma complexos com EDTA com máximos de absorção em regiões muito próximas, 450 nm ($\text{pH} > 5,3$) e 488 nm ($\text{pH} < 5,3$), correspondentes aos complexos MnEDTA^- e MnHEDTA , respectivamente [69]. A absorvidade molar do complexo MnHEDTA ($K_f = 7,1 \times 10^{24}$ em $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato) [70] foi estimada em $468 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 500nm [69].

Mn(III) pode ser gerado a partir de Mn(II) em presença de um complexante [71], como o EDTA. Aplicações analíticas dessa reação em procedimentos em batelada são dificultadas devido à instabilidade do complexo MnHEDTA [72]. Dependendo das condições da reação, o íon permanganato pode ser formado a partir de Mn(II) usando PbO_2 como

oxidante [71]. No entanto, condições de reação adequadas podem ser implementadas em sistemas de análises em fluxo.

Sistemas de análises em fluxo são úteis na medida de produtos instáveis. O controle preciso do tempo e o processamento da amostra em condições reprodutíveis proporciona a estes sistemas a possibilidade de monitorar intermediários de reação [73] ou produtos instáveis [74].

1.4. Espectrofotometria com longo caminho óptico

Considerando a lei de Lambert-Beer, algumas estratégias podem ser empregadas para aumento de sensibilidade em espectrofotometria, tais como aumento de caminho óptico, formação de produtos com maiores absorvidades molares e procedimentos de pré-concentração [75]. O aumento do caminho óptico deve resultar no aumento proporcional da absorbância. [76]. No entanto, com materiais convencionais, esta estratégia é limitada a células de *ca.* 10 cm de caminho óptico devido à atenuação do feixe de radiação e aumento do volume interno da célula.

Um guia de ondas é um dispositivo capaz de transportar radiação eletromagnética por longas distâncias. Para tanto, o núcleo do dispositivo deve apresentar índice de refração maior que seu revestimento [77]. Nessas condições, a radiação se propaga pelo núcleo do guia, com reflexão total da radiação, de acordo com a Lei de Snell:

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r$$

onde n_1 é o índice de refração do núcleo, n_2 é o índice de refração do tubo, θ_i é o ângulo de incidência da radiação e θ_r é o ângulo de refração.

A família do Teflon AF[®] consiste de fluoropolímeros amorfos que possuem índices de refração entre 1,29 e 1,31, menores que o da água (1,33). Esse material tem sido utilizado para a construção de celas ou para recobrir a superfície de celas de sílica fundida para medidas espectrofotométricas com dimensões capilares. Aumento de sensibilidade de até duas ordens de grandeza foi observado [78,79]. Outras características desejáveis do Teflon AF[®] incluem sua flexibilidade, permitindo a construção de celas na forma de espirais e tornando os equipamentos mais compactos; permeabilidade a gases; transparência para radiações na faixa de 200 e 2000 nm e a facilidade de seu acoplamento em sistemas de análise em fluxo, devido à geometria tubular.

Alguns aspectos devem ser considerados no uso de celas com guia de ondas, entre eles a magnitude do sinal do branco, que aumentará proporcionalmente com o caminho óptico no caso de ser causado por espécies absorventes. Isso pode limitar a concentração dos reagentes empregados e a faixa de resposta linear do procedimento [80]. Uma alternativa para contornar esse problema é o uso de reagentes imobilizados [78]. Bonifácio e colaboradores [81] desenvolveram um procedimento em sistemas de análises em fluxo com multicomutação para a determinação de sulfato em águas empregando um reator em fase sólida. Neste procedimento, uma minicoluna foi preenchida com cloranilato de bário ($\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$) imobilizado em resina de poliéster. Íons sulfato ficavam retidos na minicoluna devido à formação de $\text{BaSO}_{4(s)}$, liberando os íons cloranilato ($\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4^{2-}$), monitorados em 533 nm.

Perturbações pelas diferenças de índice de refração na zona de amostra (efeito Schlieren) podem alterar a precisão e a exatidão dos resultados. Infante e Rocha [82] avaliaram o efeito de soluções concentradas de espécies não absorventes em uma cela de 100 cm de caminho óptico. O perfil e a intensidade dos sinais analíticos foram afetados com a cela com longo caminho óptico. Entretanto, a magnitude da perturbação por efeito Schlieren não aumentou proporcionalmente ao caminho óptico. As perturbações foram reduzidas com a

interrupção do fluxo e compensadas por medidas em dois comprimentos de onda, o que resultou em redução na magnitude dos sinais espúrios de até 96%, com a vantagem de não alterar o tempo de análise ou requerer modificação no sistema empregado. Bolhas de ar e sólidos em suspensão no interior do guia de ondas podem afetar a transmissão de radiação [82].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver procedimentos analíticos em fluxo com multicomutação empregando minibombas solenoide para a determinação de glicerol em biodiesel e manganês em águas.

2.2. Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- (i) Minimizar o consumo de reagentes e a geração de resíduos, melhorar a precisão e aumentar a frequência de amostragem pelo emprego de sistemas de análises em fluxo com minibombas solenoide;
- (ii) Desenvolver procedimentos em fluxo para determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel, com detecção espectrofotométrica e espectrofluorimétrica;
- (iii) Eliminar solventes orgânicos e simplificar a extração de glicerol livre em amostras de biodiesel. Simplificar o procedimento para a saponificação de glicerol ligado;
- (iv) Desenvolver um procedimento em fluxo para a determinação de manganês em amostras de águas, explorando a formação do complexo Mn(III)/EDTA;
- (v) Empregar espectrofotometria com longo caminho óptico para aumento de sensibilidade e oxidantes imobilizados para minimizar a geração de resíduos e a magnitude dos sinais de branco.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos e acessórios

Os módulos de análises para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel e manganês em águas foram constituídos por minibombas solenoide (Biochem valve, 090SP), válvula solenoide (NResearch, 161T031), tubos de Teflon (0,81 mm d.i.) e confluências de acrílico. Para o acionamento dos dispositivos ativos do módulo de análises, foi utilizada a porta paralela do microcomputador (Intel Pentium 4, com 1 Gb de memória RAM) acoplada a um circuito de potência para alimentação dos solenoide, baseado em um circuito integrado ULN2803 [83]. Para o controle do módulo de análises, foi desenvolvido um software em linguagem Visual Basic 6.0 (Microsoft).

Medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um sistema de detecção multicanal baseado em um arranjo de CCD (Ocean Optics, USB 2000), conectado ao microcomputador através de uma porta USB. A aquisição de dados foi feita pelo software fornecido pelo fabricante do sistema de detecção. Uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, LS-1) foi empregada como fonte de radiação. Uma cela de quartzo com 1,00 cm de caminho ótico (Hellma) foi empregada nas medidas em fluxo para determinação de glicerol livre e total em biodiesel e durante a otimização do procedimento para determinação de manganês. Uma cela de fluxo (Ocean Optics) baseada em um guia de ondas de sílica fundida recoberta por Teflon AF1600 com 100 cm de comprimento, 0,5 mm de diâmetro interno e volume de 250 μ L, foi empregada para as medidas por espectrofotometria de longo caminho óptico. Medidas de glicerol livre e total foram realizadas em um espectrofluorímetro (Perkin Elmer, LS 50) e uma cela de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico (Hellma). A aquisição dos dados foi feita utilizando o software fornecido pelo fabricante.

Um espectrômetro de absorção atômica com atomização em forno de grafite (Analytikjena AG, modelo ZEEnit 60), equipado com lâmpada de catodo oco, tubo de grafite com aquecimento transversal e corretor de radiação de fundo baseado em efeito Zeeman

variável foi empregado no procedimento de referência para quantificar manganês nas amostras de águas [84].

Agitadores *vortex* (Quimis, Q220 ou Vortex Classic, VELP Scientifica) e uma mesa agitadora (Tecnal, TE-140) foram empregados para a extração de glicerol. Para acelerar o processo de separação de fases foi utilizada uma centrífuga para tubos (Quimis, Q222T). Banho ultrassônico (J.P. Selecta) foi empregado durante a etapa de preparo de amostra para a determinação de glicerol total. Medidas de pH foram realizadas empregando um pHmetro (Metrohm, 654) equipado com eletrodo de vidro combinado.

3.2. Reagentes e soluções

Para o preparo das soluções foram utilizados reagentes de grau analítico e água deionizada.

3.2.1. Determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel

Tampão acetato de amônio (Sigma-Aldrich) $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparado dissolvendo quantidades apropriadas do sal em água e ajustando o pH a 4,5 com ácido clorídrico. Soluções de acetilacetona $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ (Across Organics) e de metaperiodato de potássio 15 mmol L^{-1} (Fluka) foram preparadas em tampão acetato de amônio $0,8 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de acetilacetona foi utilizada pelo menos 2 h após preparo, tempo necessário para a formação do Fluoral P, um precursor da reação de Hantzsch [55,85], e utilizadas por no máximo dois dias. A estabilidade deste reagente foi avaliada por medidas do branco e de soluções de referência de glicerol. Solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de glicerol foi preparada por dissolução de quantidades apropriadas de glicerol (Sigma-Aldrich, pureza 99%) em água deionizada. As soluções de referência de glicerol foram preparadas por diluições sucessivas da solução estoque.

3.2.2. Determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel

Solução estoque de acetato de amônio (Scharlau) 3 mol L^{-1} foi preparada dissolvendo quantidades apropriadas do sal em água e ajustando o pH a 5,0 com ácido clorídrico. Soluções de acetilacetona $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Across Organics) e de metaperiodato de potássio 10 mmol L^{-1} (Fluka) foram preparadas em tampão acetato de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de acetilacetona foi utilizada 2 h após seu preparo e utilizadas por no máximo dois dias. A estabilidade deste reagente foi avaliada por medidas do branco e de soluções de referência de glicerol. Solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de glicerol foi preparada diluindo quantidades apropriadas de glicerol (Sigma-Aldrich, pureza 99%) em água deionizada e as soluções de referência de glicerol foram preparadas por diluições sucessivas da solução estoque.

3.2.3. Determinação de manganês em águas

Soluções de Mn(II) foram preparadas por diluições sucessivas da solução estoque 1000 mg L^{-1} (Titrisol, Merck, Alemanha). Tampão ácido acético/acetato $1,25 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparado por diluição de ácido acético (Merck, Alemanha) em água e ajustando o pH a 4,5 com hidróxido de sódio. Soluções de EDTA $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo quantidades apropriadas do sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético (Acros Organics) em tampão acetato $0,125 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Sistemas de análises em fluxo

Para a otimização dos sistemas de análises em fluxo propostos foi utilizado o método univariado e os sinais analíticos foram baseados em altura dos picos. As medidas foram sempre realizadas em triplicata. Os efeitos das concentrações dos reagentes foram avaliados

mantendo constantes os volumes de amostra e reagentes. As minibombas solenoide foram aferidas após pesagem do volume de água dispensado em 100 pulsos.

3.3.1. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel

O diagrama de fluxos do módulo de análises para a determinação de glicerol livre em biodiesel é apresentado na Figura 3 e a rotina de acionamento das minibombas solenoide é apresentada na Tabela 1. Os volumes dispensados em cada pulso das minibombas foram 20 μL (P_1); 10 μL (P_2 e P_3) e 5 μL (P_4) com frequência de operação de 5 Hz.

Para a determinação de glicerol livre, as minibombas P_3 , P_2 e P_4 foram acionadas sequencialmente (amostragem binária), para inserir 1 pulso da solução de periodato de potássio, 3 pulsos de amostra e 2 pulsos da solução de acetilacetona. As soluções começam a se misturar durante a etapa de amostragem, devido ao fluxo pulsado inerente às minibombas solenoide. Esta etapa foi repetida 10 vezes (10 ciclos de amostragem) e, posteriormente, o fluxo foi interrompido por 60 s. A zona de amostra foi então conduzida pelo transportador para a cela de medida, empregando 150 pulsos da minibomba P_1 . Uma válvula solenoide de três vias (V) foi empregada para auxiliar a troca das soluções, evitando a passagem desnecessária por todo o percurso analítico, economizando tempo e minimizando riscos de contaminação.

Figura 3 - Sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide para a determinação de glicerol livre em biodiesel. P₁ a P₄ – Minibombas solenoide; V – Válvula solenoide; B – Reator (120 cm). D – Detecção espectrofotométrica em 419 nm, com cela de fluxo de 1 cm; W – Descarte; x –ponto de confluência; A – Amostra; C – H₂O, R₁ – metaperiodato de potássio 15 mol L⁻¹, R₂ – acetilacetona 1,5 mol L⁻¹. Os reagentes foram preparados em meio tampão acetato de amônio 0,8 mol L⁻¹, pH 4,5.

Tabela 1 – Rotina de acionamento das minibombas solenoide para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel^a.

Etapa	Descrição	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	V	Pulsos
1	Inserção do R ₁	0	0	1	0	0	1
2	Inserção da amostra	0	1	0	0	0	3
3	Inserção do R ₂ ^b	0	0	0	1	0	2
4	Parada de fluxo (60 s)	0	0	0	0	0	0
5	Transporte da zona de amostra, medida e limpeza	1	0	0	0	0	150
6	Substituição da amostra	0	1	0	0	1	20
		1	0	0	0	1	20

^a1: minibomba ou válvula acionada; 0: minibomba ou válvula desativada

^b 10 ciclos de amostragem

3.3.2. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel

O diagrama de fluxos do módulo de análises e a rotina de acionamento das minibombas solenoide para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel são apresentados na Figura 4 e na Tabela 2, respectivamente. O sistema também emprega 4 minibombas solenoide com volumes de 20 μL (P_1), 5 μL (P_2 e P_4), 10 μL (P_3).

Figura 4 - Sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel. P_1 a P_4 – minibombas solenoide; V – Válvula solenoide; B_1 e B_2 – Reatores de 100 e 150 cm, respectivamente. Detecção espectrofluorimétrica com excitação em 410 nm e emissão em 512 nm com cela de fluxo de 1 cm; W – Descarte; x_1 , x_2 – pontos de confluência; A – Amostra; C – H_2O , R_1 – metaperiodato de potássio 10 mmol L^{-1} , R_2 – acetilacetona $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Os reagentes foram preparados em meio tampão acetato de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0. Para a determinação de glicerol livre, o reator B_1 foi removido.

Tabela 2 – Rotina de acionamento das minibombas solenoide para a determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel^a.

Etapa	Descrição	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	V	Pulsos
Glicerol total							
1	Diluição da amostra ^b	0	0	1	0	0	1
		0	1	0	0	0	2
2	Inserção do R ₁	1	0	0	0	0	1
3	Inserção da amostra	0	0	1	0	0	5
4	Inserção do R ₂ ^c	0	0	0	1	0	1
5	Parada de fluxo (60 s)	0	0	0	0	0	0
6	Transporte da zona de amostra, medida e limpeza	0	1	0	0	0	150
7	Substituição da amostra	0	0	1	0	1	20
		0	1	0	0	1	20
Glicerol livre							
1	Inserção do R ₁	1	0	0	0	0	1
2	Inserção da amostra	0	0	1	0	0	5
3	Inserção do R ₂ ^c	0	0	0	1	0	1
4	Parada de fluxo (60 s)	0	0	0	0	0	0
5	Transporte da zona de amostra, medida e limpeza	0	1	0	0		150
6	Substituição da amostra	0	0	1	0	1	20
		0	1	0	0	1	20

^a1: minibomba ou válvula acionada; 0: minibomba ou válvula desativada

^b 6 ciclos de amostragem; ^c10 ciclos de amostragem

Para a determinação de glicerol total uma etapa de diluição em linha foi implementada, acionando sequencialmente as minibombas P₂ e P₃, para inserir 2 pulsos de transportador e 1 pulso de amostra; esta etapa foi repetida 6 vezes (etapa 1). Em seguida, as minibombas P₁, P₂ e P₄ foram acionadas sequencialmente, para inserir 1 pulso da solução de periodato de potássio, 5 pulsos de amostra e 1 pulso da solução de acetilacetona (etapa 2). Esta etapa foi repetida 10 vezes (10 ciclos de amostragem) e, posteriormente, o fluxo foi interrompido por 60 s (etapa 3). A zona de amostra foi então conduzida pelo transportador para a cela de medida, empregando 150 pulsos da minibomba P₂ (etapa 4). Uma válvula solenoide de três vias (V) foi empregada para auxiliar na substituição das soluções, evitando a

passagem desnecessária por todo o percurso analítico. O sistema de análises em fluxo para a determinação de glicerol livre é similar ao empregado para a determinação de glicerol total, exceto pela etapa de diluição em linha (etapa 1). Como esta etapa não foi necessária na determinação deste parâmetro, o reator B_1 foi removido.

3.3.3. Sistemas de análises em fluxo para a determinação de manganês em águas

O diagrama de fluxos do módulo de análises para a determinação de manganês em águas é apresentado na Figura 5. Os volumes dispensados em cada pulso das minibombas foram 15 μL (P_1) ou 10 μL (P_2 e P_3), com frequência de operação de 5 Hz (P_1) ou 2,5 Hz (P_2 e P_3), resultando em vazões de 4,5 e 1,5 mL min^{-1} , respectivamente.

Figura 5 - Sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide para a determinação de manganês em águas.

P_1 a P_3 – Minibombas solenoide; V – Válvula solenoide; C_R – reator em fase sólida (13 cm de comprimento e 2 mm d.i, com 400 mg de PbO_2 imobilizado), LCW – cela de fluxos com guia de ondas (100 cm) acoplada ao espectrofotômetro, W – recipiente de descarte; x – ponto de confluência; A – Amostra; C – H_2O , R_1 – EDTA 0,025 mol L^{-1} em tampão acetato 0,125 mol L^{-1} , pH 4,5, F – lâmpada de tungstênio.

Para a determinação de manganês, foi explorada a amostragem binária, sendo as minibombas P_2 e P_3 acionadas sequencialmente para inserir 7 pulsos de amostra e 1 pulso da solução de EDTA. Esta etapa foi repetida 7 vezes (7 ciclos de amostragem). As soluções começam a se misturar durante a etapa de amostragem, ocorrendo a complexação do $Mn(II)$ com EDTA, e durante a passagem da zona de amostra pela minicoluna contendo PbO_2 imobilizado, o complexo foi oxidado. A zona de amostra foi então conduzida pelo transportador para a cela de detecção por 120 pulsos da minibomba P_1 . Uma válvula solenoide de três vias (V) foi empregada para auxiliar na troca das soluções, evitando a passagem desnecessária por todo o percurso analítico, economizando tempo e minimizando riscos de contaminação. Medidas em dois comprimentos de onda (490 e 750 nm) foram empregadas para compensar os sinais espúrios causados por efeito Schlieren.

3.3.3.1. Minicoluna em fase sólida para a oxidação em linha de manganês

A imobilização do oxidante foi baseada em um procedimento descrito na literatura [86]. Cerca de 250 mg de acetato de celulose foi dissolvido em 0,5 mL de formamida (Merck) e 1,5 mL de acetona (Labsynth). Após completa homogeneização, foi adicionado *ca.* 5,0 g de dióxido de chumbo (Merck) e os reagentes foram misturados até um perceptível aumento de viscosidade no meio, quando a mistura foi transferida para um vidro de relógio (Figura 6A). Depois de dez minutos em repouso, a mistura foi lavada com água deionizada e seca ao ar em temperatura ambiente. Em seguida, o poliéster formado foi cortado em pequenos pedaços (Figuras 6B e 6C, à direita), empregados para preencher a minicoluna (tubo de Tygon® com 13 cm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno), sendo empregado cerca de 400 mg do sólido. Para comparação, a Figura 6C mostra à esquerda as partículas de PbO_2 antes da imobilização. Pedacos de algodão foram colocados em ambas as extremidades para evitar a saída do material sólido da minicoluna durante a passagem das soluções (Figura 6D). Com as quantidades descritas neste procedimento, é possível construir 14 minicolunas de oxidação.

Figura 6 – Etapas no preparo da minicoluna para oxidação de manganês. (A) polímero obtido após a mistura e a secagem dos reagentes; (B) polímero cortado em pequenas tiras. (C) PbO₂ à esquerda e partículas do polímero cortados à direita e (D) minicoluna contendo o oxidante.

3.4. Preparo de amostras

3.4.1. Determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel

O procedimento de extração proposto consistiu em pesar cerca de 1,0 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra em tubos de polietileno de 15 mL e, em seguida, adicionar 4 mL de água deionizada. Os tubos foram posicionados horizontalmente em relação à mesa agitadora proporcionando maior contato entre as duas fases. Após agitação por 15 minutos, as amostras foram submetidas ao procedimento proposto.

3.4.2. Determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel

O procedimento de extração de glicerol livre em biodiesel adotado foi idêntico ao procedimento empregado para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre [87], exceto pela substituição da mesa agitadora pela agitação por *vortex*. Cerca de 1,0 g ($\pm 0,1$ mg) de biodiesel foi pesado em tubos de polietileno de 15 mL, aos quais foram adicionados 4 mL de água deionizada. Após agitação em *vortex* por 15 minutos, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm (1328 g) por 10 minutos para facilitar a separação das fases. Depois da remoção do biodiesel (fase superior) o extrato aquoso foi empregado para as medidas no sistema de análises em fluxo.

Glicerol total foi extraído da amostra após reação de saponificação entre glicerol ligado (remanescente da incompleta reação de transesterificação) e NaOH em meio alcoólico. Cerca de 0,5 g ($\pm 0,1$ mg) de biodiesel foi pesado em tubos de polietileno de 15 mL e, em seguida, foram adicionados 2,5 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ e 2,0 mL de etanol. Após a adição dos reagentes, os tubos foram submetidos a banho ultrassônico por 30 minutos. O hidróxido remanescente foi neutralizado com 2,0 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ e o volume foi ajustado para 10 mL com água deionizada, seguido de agitação em *vortex* por 15 minutos. Para acelerar a

separação das fases, as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm (1328 g).

As amostras de biodiesel obtidas a partir de óleos de soja, algodão e mamona foram gentilmente cedidas pelos Profs. Leonardo S. G. Teixeira (UFBA) e Maria F. Pimentel (UFPE). Estas amostras foram utilizadas nas determinações espectrofotométrica e espectrofluorimétrica de glicerol livre e espectrofluorimétrica de glicerol total.

3.4.3. Determinação de manganês em águas

Amostras de águas foram coletadas em frascos de polietileno, filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 μm e mantidas sob refrigeração até a medida analítica. A matéria orgânica das amostras de águas foi removida por tratamento com carvão ativado. Cerca de 500 mg do adsorvente foram adicionados a 10 mL de amostra em tubos de polietileno e a mistura foi agitada em uma plataforma orbital durante 5 min. Após filtração em papel de filtro comum, as soluções foram analisadas pelo procedimento desenvolvido e pelo método de referência.

3.5. Procedimentos de referência

3.5.1. Determinação de glicerol livre em batelada

O procedimento adotado para comparar os resultados obtidos na determinação de glicerol livre tanto para determinação espectrofotométrica quanto para a determinação por fluorimetria foi baseado no procedimento em batelada proposto por Bondioli e Della Bella [56]. Este método consiste na oxidação do glicerol por periodato, levando à formação de

formaldeído, que reage com acetilacetona, formando o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina .

Cerca de 1,0 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra foram pesados em tubos de 15 mL e submetidos a extração líquido-líquido utilizando como fase apolar 4 mL de hexano e como fase polar 4 mL de uma mistura 1:1 (v/v) etanol:água. As amostras foram agitadas em *vortex* por 5 minutos e centrifugadas a 3000 rpm (1328 g) por 15 minutos. Após a remoção da fase superior contendo o biodiesel e hexano, 0,5 mL da fase polar foi removido e foram adicionados 1,5 mL da mistura etanol/água 1:1 (v/v). Curvas de calibração no intervalo de 4,5 – 18 mg L⁻¹ foram preparadas por diluições sucessivas da solução estoque de glicerol (36 mg L⁻¹) preparada em água. Em tubos de 15 mL, foram adicionados 2 mL de cada solução padrão ou da amostra, seguido da adição de 1,2 mL de acetilacetona (0,2 mol L⁻¹) e 1,2 mL de periodato de potássio (10 mmol L⁻¹). Os tubos foram agitados manualmente e a mistura foi aquecida a 70 ° C por 1 minuto. A seguir as soluções foram resfriadas em um béquer contendo água à temperatura ambiente (entre 20 - 25 °C) seguido por medidas espectrofotométricas em 412 nm, em cubeta de 1 cm.

3.5.2. Método volumétrico para a determinação de glicerol total

Glicerol total foi determinado por iodometria, de acordo com o procedimento preconizado pela ANP para biodiesel proveniente do óleo de mamona [19]. Esse procedimento é dividido em duas etapas: reação de saponificação para liberação do glicerol ligado (mono-, di- e triacilglicerídeos) e a oxidação do glicerol extraído com excesso de ácido periódico (Figura 7a); o ácido remanescente (Figura 7b) e o ácido iódico formado (Figura 7c) reagem com iodeto formando triiodeto, que foi titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio (Figura 7d), usando amido como indicador.

Figura 7 – Reações envolvidas na determinação volumétrica de glicerol total em biodiesel.

Os volumes de todas as soluções, assim como a massa da amostra pesada foram reduzidos pela metade em relação ao procedimento descrito na literatura [19], para minimizar o consumo de reagentes e amostras e a quantidade de resíduos gerados. Foram pesados *ca.* 5,0 g ($\pm$ 0,1 mg) de biodiesel diretamente em um balão de fundo redondo, ao qual foram adicionados 50 mL de KOH 0,7 mol L⁻¹ e a solução foi aquecida em manta de aquecimento por 30 minutos sob refluxo. Após o resfriamento da solução, o condensador foi lavado e a água de lavagem foi recolhida no próprio balão de fundo redondo contendo a amostra. A mistura foi então transferida para um balão volumétrico de 500 mL e foram adicionados 45 mL de clorofórmio, 12,5 mL de ácido acético glacial e 250 mL de água deionizada, agitando a solução vigorosamente durante 60 segundos, para promover a extração do glicerol. Em seguida o volume da mistura foi completado para 500 mL com água deionizada, deixando o balão em repouso para separação das fases aquosa e de clorofórmio (*ca.* 10 min). Em um erlenmeyer de 200 mL foram transferidos 25 mL da fase aquosa e adicionado 12,4 mL de ácido periódico (3,5 mmol L⁻¹), misturando as soluções para homogeneização e deixando em repouso por 30 minutos. A seguir foram adicionados 10 mL de uma solução de iodeto de potássio (0,9 mol L⁻¹), com agitação lenta por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados *ca.* 200 mL de água deionizada e a solução foi titulada com solução padrão de tiosulfato de

sódio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) até que a cor do titulado ficasse amarelo claro; a seguir foram adicionados 2 mL da solução de amido, prosseguindo a titulação até o desaparecimento da cor azul. Um branco foi preparado e submetido ao mesmo procedimento da titulação, substituindo os 25 mL da amostra por água deionizada.

3.5.3. Determinação de manganês por GF AAS

Medidas por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite [84] foram realizadas para comparar os resultados obtidos na determinação de manganês com os obtidos pelo procedimento proposto empregando minibomba solenoide. Todas as medidas foram realizadas em triplicata utilizando valores de absorbância integrada (área do pico). Os parâmetros instrumentais de operação e o programa de aquecimento estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Parâmetros instrumentais para a determinação de Mn por GFAAS.

Parâmetros	Mn
Corrente da lâmpada (mA)	4,0
Comprimento de onda (nm)	279,5
Resolução espectral (nm)	0,2
Volume de amostra (μL)	20

Tabela 4 – Programa de aquecimento para a determinação de Mn em águas por GF AAS.

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (°C s⁻¹)	Patamar (s)	Vazão de argônio (L min⁻¹)
Secagem I	100	10	10	1,0
Secagem II	120	10	10	1,0
Pirólise	600	50	20	1,0
Auto zero	600	0	4	0
Atomização	2400	2600	3	0
Limpeza	2600	1400	3	1,0

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel

4.1.1. Aspectos gerais

A oxidação de glicerol por periodato é empregada há bastante tempo nos métodos oficiais para a determinação deste analito em sabão, detergentes e similares [89]. Durante a oxidação deste álcool ocorre a clivagem oxidativa das ligações C-C da molécula de glicerol, produzindo formaldeído e ácido fórmico (Figura 8). A oxidação por periodato ocorre espontaneamente em temperatura ambiente e se completar em aproximadamente 3 minutos em soluções contendo 5 mmol L^{-1} de glicerol (a 20° C , com periodato em excesso de 15%) [90,91]. Com base nesta reação, glicerol pode ser indiretamente determinado por volumetria, potenciometria ou espectrofotometria, monitorando o consumo de oxidante [92].

Figura 8 -Esquema da reação de oxidação do glicerol por periodato.

Uma alternativa para a quantificação indireta de glicerol após oxidação com periodato é a determinação do aldeído gerado [89,91]. Concentrações na ordem de microgramas por litro de formaldeído podem ser determinadas empregando reação com acetilacetona, formando o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, DDL (Figura 9) [55].

Figura 9 - Reação entre formaldeído e acetilacetona em presença de amônia levando à formação do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina.

Baseado no procedimento em batelada proposto por Bondioli e Della Bella [56] foi desenvolvido um procedimento para a determinação espectrofotométrica de glicerol em biodiesel em sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide, após extração do analito [87]. No procedimento em batelada uma etapa de aquecimento é requerida para acelerar a formação do produto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina [56]. Desta forma, este procedimento requer controle preciso de temperatura e do tempo de aquecimento [56], parâmetros que podem ser alcançados em sistemas de análises em fluxo. Além disso, minibombas solenoide proporcionam melhoria nas condições de mistura entre reagentes e amostras, devido ao inerente fluxo pulsado [12]. No procedimento em batelada, glicerol foi extraído em 4 mL de solução etanol/água 1:1. Visando evitar perturbações por efeito

Schlieren nas medidas em fluxo, foi avaliada a possibilidade da extração de glicerol com água.

O espectro de absorção do composto medido, apresentado na Figura 10, foi obtido a partir da oxidação de uma solução de glicerol, usando como referência uma solução contendo as mesmas quantidades de reagentes. A absorvidade molar do DDL (em etanol) é $8,0 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [53]. O comprimento de onda de máxima absorção observado neste espectro corresponde a 419 nm, valor próximo ao relatado na literatura [53,56].

Figura 10 - Espectro de absorção do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (em água). Glicerol 15 mg L^{-1} , pH 5,5.

4.1.2. Otimização

Diversos parâmetros químicos e físicos foram otimizados para o desenvolvimento do procedimento analítico. Primeiramente, foi realizado um estudo cinético, para a avaliação do

tempo necessário para que a reação de formação do composto atingisse o equilíbrio. Os reagentes e a amostra foram diretamente misturados em uma cubeta de quartzo, que foi em seguida posicionada no espectrofotômetro, sendo a variação da absorbância monitorada em função do tempo (Figura 11).

Figura 11 - Variação da absorbância em função do tempo na reação de formação do composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina. Glicerol 15 mg L⁻¹, pH 5,5, λ = 419nm.

Nas condições avaliadas, é possível observar que a condição de estado estacionário é alcançada em aproximadamente 7 minutos à temperatura ambiente. Entretanto, nos 5 minutos iniciais, a absorbância aumenta consideravelmente, tornando difícil obter resultados reprodutíveis no procedimento em batelada (o procedimento em batelada [56] emprega aquecimento a 70 °C por 1 min, seguido de rápido resfriamento). Em sistemas de análises em fluxo, aquecimento a temperaturas superiores a 40 °C pode levar à formação de bolhas,

alterando a dispersão da amostra e gerando sinais espúrios, especialmente em medidas espectrofotométricas. Desta forma, optou-se por realizar as medidas em fluxo em temperatura ambiente.

Antes de se realizar um estudo detalhado sobre o efeito do tempo de residência sobre o sinal analítico, foi adicionada uma etapa de parada de fluxo por 60 segundos, após a mistura de amostra e reagentes. As concentrações de reagentes empregadas inicialmente foram baseadas nas utilizadas no procedimento em batelada [56], desconsiderando os efeitos de diluição e dispersão durante o transporte da zona de amostra até a cela de detecção. A concentração da solução tampão foi reduzida na ordem de 5 vezes visando eliminar possíveis perturbações por diferenças de índice de refração (efeito Schlieren). As concentrações dos reagentes foram otimizadas através do método univariado, mantendo constantes os volumes de amostra e reagentes. Foram utilizados 10 ciclos de amostragem, com amostra e reagentes inseridos simultaneamente (*merging zones*), formando uma zona de amostra com volume total de 500 μL . Os resultados obtidos para a variação da concentração de KIO_4 estão apresentados na Figura 12.

É possível observar que em concentrações superiores a 15 mmol L^{-1} KIO_4 , o sinal analítico permanece praticamente constante e concentrações maiores acarretariam consumo desnecessário de reagente. O sinal referente à solução branco praticamente não sofre alterações, sendo assim, a concentração de 15 mmol L^{-1} foi adotada para estudos posteriores. Nestas condições, de acordo com a estequiometria apresentada na Figura 8, o periodato de potássio está em excesso de 1,7 vezes em comparação ao glicerol, na concentração de 400 mg L^{-1} .

Figura 12- Efeito da concentração de metaperiodato de potássio sobre os sinais analítico - glicerol 400 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de acetilacetona 0,2 mol L⁻¹ (preparada em meio tampão acetato de amônio 0,4 mol L⁻¹, pH 5,5). Alíquotas de amostra e reagentes introduzidas simultaneamente.

O efeito da concentração de acetilacetona foi avaliado até 1,5 mol L⁻¹ (Figura 13), concentração próxima à solubilidade máxima deste reagente em meio aquoso a 25 °C (13,9 g/100 mL de água [93]). O maior sinal analítico foi obtido para a máxima concentração avaliada, com tendência à estabilização. O sinal referente ao branco apresentou variação pouco significativa e, desta forma, a concentração de 1,5 mol L⁻¹ acetilacetona foi adotada para estudos posteriores. Este reagente está em excesso de 172 vezes em comparação à concentração de formaldeído que pode ser gerada a partir de 400 mg L⁻¹ glicerol. No procedimento em batelada [56], a concentração de acetilacetona empregada foi 7,2 vezes menor que a adotada neste trabalho. A quantidade elevada deste reagente pode ser justificada

pela lenta reação de formação de DDL e pela remoção da etapa de aquecimento presente no procedimento proposto por Bondioli e Della Bella [56] e por Pinzi *et al.* [57] para determinação de glicerol.

Figura 13 - Efeito da concentração de acetilacetona sobre o sinal analítico - glicerol 400 mg L⁻¹(■) e branco (●). Concentração de metaperiodato de potássio 15 mmol L⁻¹ (preparada em meio tampão acetato de amônio 0,4 mol L⁻¹, pH 5,5). Aliquotas de amostra e reagentes introduzidas simultaneamente.

Foi avaliado o efeito da acidez da solução de acetato de amônio sobre o sinal analítico, considerando as reações de oxidação do glicerol e de formaldeído com acetilacetona. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico -glicerol 200 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de reagentes: metaperiodato de potássio 15 mmol L⁻¹, acetilacetona 1,5 mol L⁻¹ (preparados em meio acetato de amônio 0,4 mol L⁻¹). Aliquotas de amostra e reagentes introduzidas simultaneamente.

Observa-se que o sinal analítico é máximo entre pH 4,5 e 5,0. Li *et al.* [52] desenvolveram um procedimento espectrofotométrico em sistemas de análises em fluxo para a determinação de formaldeído em águas. A influência do pH na reação do formaldeído com acetilacetona avaliada entre 5,0 - 8,0, utilizando tampão acetato de amônio. Maior sinal analítico foi observado entre pH 6,5 e 7,5, sendo adotado pH 7,5. Vale ressaltar que este procedimento foi desenvolvido para a determinação formaldeído (e não glicerol) e que o pH da solução tampão afeta também a oxidação do glicerol para a formação de formaldeído. Desta forma, foi avaliado o efeito da variação do sinal analítico em função do pH, empregando uma solução de formaldeído 3×10^{-3} mol L⁻¹. Considerando a oxidação

quantitativa de glicerol, essa concentração equivale a 140 mg L^{-1} do analito. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico para formaldeído 3 mmol L^{-1} : (■) e branco (●). Concentração de reagentes: metaperiodato de potássio 15 mmol L^{-1} , acetilacetona $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ (preparados em meio de acetato de amônio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Aliquotas de amostra e reagentes introduzidas simultaneamente.

Diferenças pouco significativas foram observadas entre pH 5,5 e 8,0, faixa de trabalho semelhante à observada por Li e colaboradores [52] na determinação de formaldeído, o que indica que o pH ótimo é definido pela reação de oxidação do glicerol, que é favorecida em meio levemente ácido [90]. Sendo assim, baseado nos resultados apresentados nas Figuras 14 e 15, foi adotado pH 4,5 para os demais experimentos.

Com soluções preparadas em pH 4,5, foi avaliado o efeito da concentração de acetato de amônio, assim como a necessidade de se preparar os dois reagentes (periodato e acetilacetona) em meio tamponado. Na Tabela 5, são apresentados os valores médios obtidos em três diferentes situações: (A) ambos os reagentes preparados em tampão acetato de amônio; (B) apenas a solução de metaperiodato de potássio preparada em meio tamponado (solução de acetilacetona preparada em água) e (C) solução de acetilacetona preparada em meio tamponado e solução de metaperiodato de potássio preparada em água. Maior sinal analítico foi obtido quando os dois reagentes foram preparados em meio tamponado e esta condição foi mantida nos estudos posteriores. A Figura 16 apresenta a variação da absorbância em função da concentração de acetato de amônio presente em ambos os reagentes para uma solução de glicerol 200 mg L^{-1} .

Tabela 5 – Valores médios de absorbância e desvios ($n=3$) obtidos em três diferentes situações de preparo dos reagentes

Adição de tampão	Absorbância
(A) Periodato + acetilacetona	$0,197 \pm 0,012$
(B) Periodato	$0,027 \pm 0,006$
(C) Acetilacetona	$0,124 \pm 0,008$

Figura 16 - Variação do sinal analítico com a concentração de acetato de amônio: glicerol 200 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de reagentes metaperiodato de potássio 15 mmol L⁻¹ e acetilacetona 1,5 mol L⁻¹, ambos preparados em acetato de amônio, pH 4,5). Alíquotas de amostra e reagentes introduzidas simultaneamente.

Observando a Figura 16, verifica-se que o sinal analítico aumenta com a concentração de tampão devido ao aumento da concentração de amônia livre (*ca.* $3,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para as concentrações 0,2 e 0,8 mol L⁻¹ de acetato de amônio). A necessidade de adição de quantidades elevadas de tampão em ambos os reagentes deve-se à baixa concentração de amônia livre em solução com pH 4,5, escolhido pelo compromisso entre as reações de oxidação e de formação do DDL. Em menor intensidade, também aumenta o sinal referente ao branco, devido principalmente a efeito Schlieren [94]. Como uma condição de compromisso, para os estudos posteriores, foi adotada a concentração de tampão

de $0,8 \text{ mol L}^{-1}$. A estratégia de medida em dois comprimentos de onda foi adotada para compensar esse efeito, pela diferença das medidas de absorbância no comprimento de onda de máxima absorção (412 nm) e de referência (780 nm), no qual a espécie medida não absorve radiação.

Durante a etapa de otimização da concentração dos reagentes, foi adotada a estratégia de amostragem simultânea (zonas coalescentes), na qual amostras e reagentes foram inseridos simultaneamente no percurso analítico. Outra possibilidade é empregar a amostragem binária [3], que consiste em intercalar alíquotas de amostras e reagentes, permitindo a variação da fração volumétrica dos reagentes. Diferentes estratégias de amostragem foram avaliadas visando maximizar a sensibilidade para a determinação de glicerol, sendo os valores de absorbância comparados com os obtidos por zonas coalescentes. Neste experimento, 10 ciclos de amostragem foram fixados para cada estratégia avaliada. No caso da amostragem binária, primeiramente foi otimizado o número de pulsos de acetilacetona (com 1 pulso de amostra e 1 pulso de metaperiodato), considerando os sinais analítico e do branco; seguido da otimização dos pulsos de metaperiodato potássio (com 1 pulso de amostra e 2 pulsos de acetilacetona) e amostra (com 1 pulso de metaperiodato e 2 pulsos de acetilacetona). A Figura 17 apresenta os valores de absorbância, descontados os valores do branco, obtidos em cada uma das estratégias avaliadas empregando amostragem binária.

Figura 17 – Influência do número de pulsos de (▲) amostra, (■) acetilacetona e (●) periodato sobre o sinal analítico. Glicerol 100 mg L^{-1} , metaperiodato de potássio 15 mmol L^{-1} e acetilacetona $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ (preparados em meio de acetato de amônio $0,8 \text{ mol L}^{-1}$).

Considerando a resposta analítica e o consumo de reagentes, os melhores resultados foram obtidos com amostragem binária com 3 pulsos de amostra, 1 pulso de periodato e 2 pulsos de acetilacetona. O sinal analítico aumenta com o número de pulsos de acetilacetona, o que pode ser justificado pelo fato da concentração deste reagente ser limitada pela solubilidade em água. Comparando os sinais obtidos para 2 e 3 pulsos deste reagente, o sinal analítico aumentou 43%, entretanto, o sinal analítico para o branco aumentou 68% ($0,32 \pm 0,02$). O aumento no número de pulsos de periodato resulta em uma diminuição do sinal analítico, ocasionado pela diluição da amostra. Quando as concentrações dos reagentes foram otimizadas, a concentração de glicerol era 400 mg L^{-1} ; essa concentração foi reduzida a 100

mg L⁻¹ neste experimento, dado o ganho de sinal analítico obtido com a otimização das concentrações. O aumento no número de pulsos da amostra também resultou em aumento de sinal analítico e melhor condição foi encontrada com 3 pulsos. Empregando amostragem binária com 3 pulsos de amostra, 1 pulso de periodato e 2 pulsos de acetilacetona obteve-se um sinal analítico cerca de 3 vezes superior ao obtido com a introdução simultânea das soluções ($A = 0,28 \pm 0,03$, glicerol 100 mg L⁻¹). Nas condições otimizadas, a concentração de periodato na zona de amostra foi similar à utilizada no procedimento em batelada (considerando as diluições) [56], contudo, a concentração de acetilacetona foi *ca.* 5,5 vezes superior. A cinética de reação entre formaldeído e acetilacetona é lenta, e as medidas foram realizadas antes da reação alcançar o estado estacionário. O excesso de reagente na zona de amostra favorece a formação do produto.

A variação do tamanho do reator visa melhorar a homogeneização entre os reagentes e amostras e aumentar o tempo de residência, possibilitando melhor desempenho analítico. Entretanto, também aumenta a dispersão da zona de amostra. Neste experimento, o número de ciclos de amostragem foi aumentado proporcionalmente, a fim de se manter a proporção entre o volume do reator e da zona de amostra e compensar, ao menos parcialmente, o efeito da dispersão. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Influência do tamanho do reator sobre o sinal analítico - glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de metaperiodato de potássio 15 mmol L⁻¹ e acetilacetona 1,5 mol L⁻¹ preparados em meio de acetato de amônio 0,8 mol L⁻¹ (pH 4,5). Amostragem binária com 3 pulsos de amostra, 1 pulso de R₁ e 2 pulsos de R₂ com 10 ciclos de amostragem. Parada de fluxo por 60 s.

Uma característica de sistemas de análises em fluxo com minibombas solenoide é que o fluxo pulsado proporciona uma mistura mais efetiva entre as soluções de reagentes e amostras, por isso os reatores empregados nesses sistemas tendem a ser menores que em sistemas de análises em fluxo convencionais [95]. O aumento do comprimento do reator também faz com que o tempo de residência da amostra seja maior, resultando em aumento de sinal analítico em situações em que a reação de formação do produto mensurável apresente uma etapa lenta [8], como é o caso da reação envolvida. Embora melhores resultados tenham sido obtidos quando o reator foi igual ou superior a 170 cm, para os experimentos seguintes

foi escolhido reator de 120 cm (sinal 15% menor que obtido com o reator de 170 cm), visando reduzir o consumo de reagentes e o tempo de análise.

Após a otimização das concentrações de reagentes e do tamanho do reator, foi avaliado o efeito do número de ciclos de amostragem (Figura 19). Melhores resultados foram obtidos com 15 ciclos de amostragem, entretanto com 10 ciclos de amostragem é possível obter resposta analítica satisfatória (*ca.* 18% inferior à obtida com 15 ciclos de amostragem), sem comprometer a frequência de amostragem e o consumo de reagentes. Desta forma, este valor foi escolhido para os estudos subsequentes. Nestas condições o volume da zona de amostra foi de 500 μL (reator de 600 μL).

Figura 19 - Efeito do número de ciclos de amostragem no sinal analítico - glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●).

Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 3.

O efeito do tempo de residência da amostra foi avaliado nas condições anteriormente otimizadas, com uma etapa de parada de fluxo após a inserção dos reagentes e da amostra no percurso analítico. A Figura 20 apresenta os resultados obtidos. É possível observar que após 60 s de parada de fluxo o sinal analítico começa a diminuir, devido à dispersão. Com a interrupção de fluxo, é eliminado o efeito de convecção, entretanto ainda ocorre dispersão por difusão, diminuindo o sinal analítico.

Figura 20 - Influência do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico - glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 3.

A Tabela 6 apresenta um resumo dos parâmetros otimizados para a determinação de glicerol em sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide e amostragem binária para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel.

Tabela 6 – Parâmetros otimizados para a determinação de glicerol em biodiesel em sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide.

Parâmetros	Intervalo avaliado	Valor ótimo
KIO ₄ (mmol L ⁻¹)	2-20	15
Acetilacetona (mol L ⁻¹)	0,01-1,5	1,5
NH ₄ CH ₃ COOH (mol L ⁻¹)	0,2-1,0	0,8
pH	4-9	4,5
Ciclos de amostragem	5-15	10
Tempo de parada de fluxo (s)	0-300	60
Tamanho do reator (cm)	70-220	120

4.1.3. Preparo da amostra

Nos procedimentos descritos na literatura [43,56], antes da determinação de glicerol, em geral é utilizada extração líquido-líquido do analito para uma fase polar. Usualmente, hexano é utilizado para formar a fase apolar, enquanto uma mistura 1:1 (v/v) de água e etanol forma a fase polar [96]. Hájek e colaboradores [97] desenvolveram um aparato, no qual 4 - 20 g de amostra eram misturados com 4,5 mL de água deionizada em um compartimento de vidro, com orifícios na parte superior. Em um dos orifícios, um tubo de vidro era colocado e uma das suas extremidades entrava em contato com a amostra. Com auxílio de uma bomba de vácuo, ar era borbulhado na mistura, promovendo a extração. O tempo total para a extração do glicerol nas amostras foi de 2 horas.

Foi avaliada a possibilidade de extrair glicerol de biodiesel, sem utilizar solventes orgânicos. Em substituição à mistura etanol:água, foi avaliada a extração com água deionizada, visando evitar perturbações por efeito Schlieren nas medidas em fluxo e o aumento da geração de bolhas de gás, devido à diminuição da solubilidade de gases. Uma amostra foi empregada para avaliar o procedimento de extração proposto, que consistiu em

pesar cerca de 1 g de amostra em tubos de polietileno de 15 mL e, em seguida, adicionar 4 mL de água deionizada. Agitação em *vortex* e em mesa agitadora foram avaliadas para promover a extração para uma mesma amostra de biodiesel, sendo que, neste último, os tubos eram posicionados horizontalmente em relação à mesa, proporcionando maior contato entre as duas fases. Após a extração, as amostras foram submetidas ao procedimento em batelada [56], reagindo glicerol com periodato e acetilacetona, seguidas das medidas espectrofotométricas. Os resultados foram comparados com os obtidos com hexano + água:etanol e agitação por *vortex* por 5 minutos (Tabela 7). Em todos os casos, após o procedimento de extração, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (1328 g) por 5 minutos para acelerar o processo de separação de fases.

Tabela 7- Valores de absorbância obtidos em diferentes procedimentos de extração.

Extrator	Procedimento de agitação	Tempo de agitação (min)	Absorbância
Hexano + água:etanol (1:1)	<i>Vortex</i>	5	0,470
Hexano + água:etanol (1:1)	Mesa agitadora	60	0,482
Água	<i>Vortex</i>	5	0,321
Água	Mesa agitadora	60	0,319
Água	Mesa agitadora	30	0,322

Na Tabela 7 é possível observar diferenças pouco significativas (menores que 2,5%) entre os valores de absorbância obtidos no procedimento de extração utilizando *vortex* e mesa agitadora, apesar das diferenças nos tempo de agitação. A mesa agitadora possibilita a

extração de cerca de 30 amostras simultaneamente, o que torna mais viável a extração em casos em que se têm muitas amostras a serem analisadas (*e.g.* controle de qualidade de usinas produtoras de biodiesel). Foi também avaliada a extração usando apenas água, comparando também os dois métodos de extração. Indícios de que a extração com água foi quantitativa são a variação não significativa da concentração do analito em função do tempo de extração e a maior solubilidade do glicerol em água em comparação ao meio etanólico [36]. Uma hipótese a ser considerada para justificar as diferenças de resposta analítica (*ca.* 45%) é a alteração da absorvidade molar do produto na presença do solvente orgânico. Para avaliar este efeito, curvas de calibração foram obtidas em batelada para soluções de referência de glicerol em meio etanol:água 50% (v/v) e água deionizada (Figura 21).

Figura 21 – Curvas de calibração construídas em diferentes meios: etanol:água 50% (v/v) (■) e meio aquoso (●).

Comparando as curvas de calibração apresentadas na Figura 21 para soluções em glicerol preparadas em meio aquoso ($A = 0,0203C + 0,0192$) e em meio contendo 50 % (v/v) de etanol ($A = 0,0284C + 0,0196$) é possível observar que o coeficiente angular da curva contendo etanol é 40% maior, justificando a diferença entre os sinais obtidos para a amostra de biodiesel com os diferentes extratores.

4.1.4. Características analíticas e aplicação

Embora a influência do tempo de parada de fluxo tenha sido avaliada anteriormente, as características analíticas em três diferentes tempos de parada de fluxo (30, 45 e 60 s) foram estimadas. O objetivo deste experimento foi avaliar a sensibilidade e frequência de amostragem nas três situações, visando selecionar a melhor condição de compromisso para a determinação de glicerol em biodiesel. Os parâmetros analíticos avaliados em cada situação são apresentados na Tabela 8, curvas de calibração obtidas nos diferentes tempos de parada de fluxo são apresentadas na Figura 22.

Tabela 8 – Parâmetros analíticos estimados em diferentes tempos de parada de fluxo.

Tempo de parada de fluxo (s)	Coeficiente angular ($L\ mg^{-1}$)	Coeficiente linear	r	Frequência de amostragem (amostras/h)
30	0,0062	0,074	0,999	47
45	0,0090	0,053	0,998	39
60	0,0100	0,070	0,999	34

Figura 22 - Curvas analíticas obtidas em diferentes tempos de parada de fluxo: (▲) 60 s; (●) 45 s e (■) 30 s.

Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 3.

Para os três tempos de parada de fluxo avaliados, a faixa linear corresponde ao intervalo entre 5 e 50 mg L⁻¹ de glicerol. Pelos coeficientes angulares das curvas de calibração apresentados na Tabela 8 é possível observar uma pequena diferença no coeficiente angular entre as curvas obtidas com parada de fluxo de 45 e 60 s, esta diferença é mais significativa em relação à parada de fluxo por 30 s. Para os experimentos seguintes, visando aumento de sensibilidade, foi empregado 60 s de parada de fluxo.

Nas condições otimizadas, o limite de detecção foi estimado em 1 mgL⁻¹ (99,7% de confiança), equivalente a 0,0004% em massa de biodiesel, valor 50 vezes menor que o limite estabelecido pela legislação [19]. O coeficiente de variação foi estimado em 1,5% (n=10) e a frequência de amostragem foi estimada em 34 amostras h⁻¹. A eficiência de oxidação do

glicerol foi estimada por medidas de uma solução de formaldeído e de acordo com os resultados obtidos, *ca.* 46% do glicerol é oxidado nas condições empregadas. O consumo de reagentes foi estimado em 15 μg de acetilacetona e 340 μg KIO_4 , gerando 3,5 mL de resíduo por determinação. Sinais transientes para soluções de glicerol são apresentado na Figura 23.

Figura 23 - Sinais transientes para soluções de glicerol. Os números indicam a concentração de glicerol em mg L^{-1} e a figura inserida corresponde à curva de calibração. Demais condições são descritas na Figura 3.

Para avaliar a eficiência do procedimento proposto, após a extração do glicerol com água deionizada, cinco diferentes amostras de biodiesel foram analisadas pelo procedimento proposto e pelo método em batelada. Para o procedimento de referência, também foi realizada a determinação com extração do glicerol em 4 mL de água (neste caso a curva de calibração também foi preparada em meio aquoso) e por extração com 4 mL da mistura etanol:água 50 % (v/v). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Determinação de glicerol livre em biodiesel (n=3).

Amostra	Concentração de glicerol (mg kg ⁻¹)		
	Procedimento proposto*	Batelada *	Batelada**
Algodão	17,9 ± 0,2	18,5 ± 1,0	18,2 ± 0,5
Soja (I)	106,5 ± 0,4	98,9 ± 0,7	97,5 ± 1,4
Soja (II)	56,1 ± 1,8	52,1 ± 1,2	51,0 ± 2,3
Soja (III)	47,9 ± 0,2	49 ± 13	47,4 ± 4,8
Soja (IV)	13,8 ± 1,3	12,0 ± 0,7	-

* extração de glicerol com 4 mL de água deionizada.

** extração de glicerol com 4 mL de etanol:água 1:1 (v/v) e 4 mL de hexano.

Os resultados obtidos para todas as amostras analisadas estão em concordância com o método em batelada no nível de confiança de 95%. Comparando os resultados obtidos para o método em batelada com os dois extratores, é possível afirmar que a extração com 4 mL de água foi eficiente para determinação de glicerol em biodiesel.

A reação entre o formaldeído e acetilacetona, explorada no procedimento proposto, exibe excelente seletividade e a maioria dos aldeídos, acetona e metanol não interferem mesmo em concentrações relativamente altas [54]. Horstokotte e colaboradores avaliaram que espécies inorgânicas (Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Na⁺, K⁺, H₃BO₃, I⁻, SO₄²⁻, MoO₄²⁻ e PO₄³⁻) e orgânicas (metanol, etanol, ácido acético, ácido fórmico, acetona, acetaldeído, gliceraldeído e glicoxal) não interferem na determinação de formaldeído. Interferências foram observadas na presença de Fe(II) e Fe(III) em concentrações superiores a 1,9 mmol L⁻¹, pois estas espécies formam complexos amarelos com acetilacetona. Entretanto, esta concentração é

cerca de 1400 vezes superior à concentração esperada deste elemento nos extratos de biodiesel, após o procedimento de extração, considerando que a concentração de ferro em biodiesel é da ordem de $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ [98].

Algumas importantes características analíticas obtidas devem ser destacadas no procedimento desenvolvido, como a redução do consumo de reagentes relação ao procedimento em batelada [56] ($15 \mu\text{g}$ de acetilacetona e $340 \mu\text{g}$ KIO_4 por determinação), com eficiência de oxidação estimada em 46%. A eliminação da etapa de aquecimento e a possibilidade de se realizar extrações simultâneas de diferentes amostras quando empregada mesa agitadora são também úteis para análises de rotina. No procedimento em FIA [57], o consumo de reagentes foi de 40 mg de acetilacetona e $3,2 \text{ mg}$ de metaperiodato de potássio, muito superior ao observado neste trabalho; o limite de detecção foi estimado em 0,0028% de glicerol em massa de biodiesel, sete vezes superior ao obtido no presente trabalho. No procedimento em batelada proposto por Bondioli [56], o consumo de reagentes foi de $2,8 \text{ mg}$ de KIO_4 e 24 mg de acetilacetona e, neste trabalho, não foi apresentado o limite de detecção.

4.2. Sistemas de análises em fluxo para a determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel

4.2.1. Aspectos gerais

Uma alternativa à determinação de formaldeído explorando a reação de Hantzsch [51] é a medida por fluorimetria, após a reação entre o formaldeído gerado pela oxidação do glicerol e acetilacetona, formando o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL). Na literatura são encontrados alguns trabalhos que empregam essa reação para detecção fluorimétrica de formaldeído em ar [99,100] e águas [52]. Explorando esta reação, foi desenvolvido um procedimento para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel [101]. Glicerol livre foi quantificado após sua extração com água e glicerol total foi quantificado após a hidrólise de mono-, di- e triglicerídeos remanescentes no biodiesel devido à incompleta conversão dos ésteres na reação de transesterificação. Para adequar a faixa linear do procedimento proposto, devido à concentração de glicerol total ser maior que a de glicerol livre nas amostras de biodiesel, uma etapa de diluição em linha foi implementada. Espectros do produto reacional foram obtidos nas condições de trabalho e os comprimentos de onda máximos de excitação (410 nm) e emissão (512 nm) foram coincidentes com os relatados na literatura [54]. Os experimentos foram desenvolvidos durante o estágio doutorado sanduíche realizado no Departamento de Química Analítica da Universidade de Valencia, Espanha.

4.2.2. Otimização

Para o desenvolvimento do procedimento analítico, os efeitos de diversos parâmetros químicos e físicos foram avaliados, tomando como base as condições otimizadas para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre. Inicialmente, o efeito da concentração de acetilacetona foi avaliado, mantendo os demais parâmetros fixos; os resultados obtidos estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Efeito da concentração de acetilacetona sobre o sinal analítico - glicerol 200 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de metaperiodato de potássio 10 mmol L⁻¹ (preparada em meio de tampão acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹, pH 4,5). Amostra e reagentes inseridos simultaneamente (15 ciclos), parada de fluxo por 60 s. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

O aumento da concentração de acetilacetona resulta no aumento do sinal para a amostra e para o branco, estabilizando em concentrações superiores a 0,8 mol L⁻¹. Para estudos posteriores concentração deste reagente foi de 1,0 mol L⁻¹, valor inferior ao empregado no procedimento com detecção espectrofotométrica, no qual a concentração de acetilacetona foi de 1,5 mol L⁻¹. Entretanto, é importante ressaltar que a concentração de glicerol empregada neste experimento para detecção fluorimétrica é 2 vezes inferior à concentração de glicerol utilizada para avaliar o efeito da concentração de acetilacetona com detecção espectrofotométrica [87]. Nestas condições, este reagente está em excesso de *ca.* 230

vezes em relação à quantidade de formaldeído que pode ser gerada pela oxidação de 200 mg L⁻¹; a concentração é 5 vezes maior que a empregada no procedimento em batelada [56] e FIA [57]. Assim como no procedimento para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel, a etapa de aquecimento utilizada no procedimento em batelada [56] foi removida. O grande excesso de reagente é justificado pela lenta reação de formação de DDL.

O efeito da concentração de metaperiodato de potássio (Figura 25) foi avaliado com concentração de glicerol reduzida em 4 vezes em relação ao experimento anterior, devido ganho de sensibilidade observado com a otimização da concentração de acetilacetona.

Figura 25 - Efeito da concentração de metaperiodato sobre o sinal analítico- glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de acetilacetona 1,0 mol L⁻¹ (preparada em meio de tampão acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹, pH 4,5). Amostra e reagentes inseridos simultaneamente (15 ciclos). Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

Observando a Figura 25 é possível observar que em concentrações superiores a 10 mmol L⁻¹ o sinal analítico é máximo, com tendência à estabilização. Essa concentração é idêntica à utilizada nos procedimentos em batelada [56] e FIA [57] e o periodato apresenta excesso estequiométrico superior a 9 vezes em relação ao glicerol, na concentração de 50 mg L⁻¹.

Durante a otimização do procedimento para a determinação de glicerol livre com detecção por espectrofotometria, foi observado que existe uma relação de compromisso entre o pH ideal para oxidação do glicerol e o pH mais adequado para reação entre o formaldeído e acetilacetona. A influência da acidez da solução de acetato de amônio foi avaliada no intervalo de 4 – 10 e os resultados estão apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico - glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de reagentes: metaperiodato de potássio 10 mmol L⁻¹ e acetilacetona 1,0 mol L⁻¹ (preparados em meio de acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹). Amostra e reagentes inseridos simultaneamente (15 ciclos). Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

O sinal analítico foi máximo em pH 5,0, pois a oxidação de glicerol é favorecida em meio ácido [89] e abaixo deste valor a formação de DDL é desfavorecida [52]. Este valor é próximo ao utilizado no procedimento em batelada [56] e por multicomutação [87], ambos com detecção espectrofotométrica. Desta forma, pH 5,0 foi adotado para estudos posteriores.

Acetato de amônio exerce duas funções importantes nos procedimentos para a determinação de glicerol: ajuste de pH e fornecimento de amônia livre, necessária para que ocorra a formação do produto fluorescente. O efeito da concentração da solução tampão acetato de amônio em que os reagentes as soluções de metaperiodato de potássio e acetilacetona foram preparadas foi avaliado no intervalo de 0,1 – 2,0 mol L⁻¹ (Figura 27).

Figura 27 - Variação do sinal analítico com a concentração de acetato de amônio - glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Concentração de reagentes: metaperiodato de potássio 10 mmol L⁻¹ e acetilacetona 1,0 mol L⁻¹ (pH=5,0). Amostra e reagentes inseridos simultaneamente (15 ciclos). Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

Conforme observado na Figura 27, melhores resultados foram obtidos em concentrações acima de $0,75 \text{ mol L}^{-1}$. Como a diferença no sinal analítico foi pouco significativa para concentrações superiores a $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, esta foi selecionada para estudos posteriores. A concentração elevada é necessária porque a quantidade de amônia livre em pH 5,0 é muito baixa (*ca.* $8,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Durante a etapa de otimização das concentrações dos reagentes e da acidez, foi adotada a estratégia de amostragem por zonas coalescentes, na qual as minibombas eram acionadas simultaneamente para inserir alíquotas de reagentes e amostras. Outra estratégia avaliada foi a amostragem binária [102], na qual a amostra foi inserida entre alíquotas dos reagentes R_1 e R_2 . Mantendo fixo o número de ciclos, foi avaliado individualmente o efeito do número de pulsos dos reagentes e amostra e os resultados são apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Influência do número de pulsos de (▲) amostra, (■) acetilacetona e (●) periodato sobre o sinal analítico, descontados os valores de branco. Glicerol 50 mg L^{-1} , metaperiodato de potássio 10 mmol L^{-1} , acetilacetona $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (preparados em meio acetato de amônio $1,5 \text{ mol L}^{-1}$).

O aumento do número de pulsos dos reagentes R_1 e R_2 resultou na diminuição do sinal analítico, por diluição da amostra, indicando que os reagentes encontram-se em excesso, efeito confirmado com o aumento no sinal analítico com o volume de amostra. Melhores resultados foram obtidos com 5 pulsos de amostra e 1 pulso de cada reagente, com sinais *ca.* de 3 vezes maiores que os obtidos quando foi adotada a amostragem por zonas coalescentes ($S = 295 \pm 20$). A estratégia de amostragem binária foi então adotada nos estudos posteriores.

O efeito do tamanho do reator B_2 foi avaliado no intervalo de 50 – 250 cm e o número dos ciclos de amostragem foi variado proporcionalmente para compensar o efeito da dispersão. O sinal analítico aumentou com o tamanho do reator, devido à lenta reação entre formaldeído e acetilacetona. Melhores resultados foram obtidos com reatores maiores que 200 cm, entretanto, o reator selecionado foi de 150 cm para reduzir o consumo de reagentes e melhorar a frequência de amostragem do procedimento. O sinal analítico obtido com este reator foi 19% menor que o obtido com o reator de 250 cm.

O maior tempo de residência no percurso analítico compensa o efeito da dispersão quando se emprega reatores maiores, conforme observado no experimento anterior. A influência do tempo de residência no sinal analítico foi avaliada interrompendo o fluxo após a inserção dos reagentes e amostras no percurso analítico e monitorando o sinal analítico em função do tempo (Figura 29). Como observado durante a otimização do procedimento para a determinação espectrofotométrica de glicerol livre em biodiesel [87], a reação entre acetilacetona e formaldeído é lenta, com aumento significativo do sinal analítico com o tempo de residência. O mesmo ocorreu durante a otimização para determinação fluorimétrica, sendo que o sinal analítico aumentou linearmente com o tempo de interrupção fluxo. Como um compromisso entre sensibilidade e frequência de amostragem, para estudos posteriores foi adotado 60 s de parada de fluxo.

Figura 29 – Influência do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico - glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

O efeito da variação dos ciclos de amostragem foi avaliado e os resultados estão apresentados na Figura 30. Com o aumento do número de ciclos foi observado um aumento no sinal analítico, devido à diminuição da dispersão da zona de amostra. Considerando o compromisso entre sinal analítico, consumo de reagentes e frequência de amostragem, 10 ciclos foram selecionados para os demais estudos.

Figura 30 - Efeito do número de ciclos de amostragem - glicerol 50 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

A Tabela 10 apresenta um resumo dos parâmetros otimizados para a determinação espectrofluorimétrica de glicerol livre e total em biodiesel.

Tabela 10 - Parâmetros otimizados para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel em sistema de análise em fluxo com minibombas solenoide e detecção espectrofluorimétrica.

Parâmetro	Intervalo avaliado	Valor selecionado
Acetilacetona (mol L ⁻¹)	0,1 – 1,3	1,0
KIO ₄ (mmol L ⁻¹)	0,1 – 20	10
pH	4,5 – 10,0	5,0
Acetato de amônio(mol L ⁻¹)	0,1 – 2	1,5
Reator (cm)	50 – 250	150
Números de ciclos de amostragem	2 – 12	10
Parada de fluxo (s)	0 – 90	60

4.2.3. Preparo da amostra

Para a extração do glicerol livre, o procedimento de preparo de amostra adotado foi semelhante ao empregado na determinação por espectrofotometria [87], porém, substituindo a mesa agitadora por um agitador tipo *vortex* que permitia o processamento simultâneo de até 30 amostras.

Para a determinação de glicerol total em biodiesel, foi incluída uma etapa de hidrólise de mono-, di- e triacilglicerídeos através da reação de saponificação entre os ésteres remanescentes no biodiesel e etanol. Essa reação pode ser catalisada por ácidos ou bases, sendo que hidróxido de sódio ou potássio são os catalisadores mais utilizados [103]. Pinzi e colaboradores [57] propuseram um procedimento para a conversão em linha de glicerol ligado gerando glicerol livre, seguido de sua determinação explorando a reação com acetilacetona. Entretanto, a instrumentação empregada neste procedimento é relativamente complexa e a frequência de amostragem é relativamente baixa ($9 \text{ amostras h}^{-1}$) [57]. Além disso, uma etapa de limpeza de 120 segundos com etanol após cada experimento é necessária.

Um procedimento para hidrólise em batelada utilizando banho ultrassônico foi então proposto. Os efeitos das concentrações de NaOH e etanol foram avaliados com o objetivo de se obter máxima eficiência da reação. O ultrassom promove melhor interação entre as fases orgânica e aquosa [104] e, conseqüentemente, a hidrólise de glicerol ligado. Uma amostra de biodiesel foi utilizada para avaliação das quantidades de álcool e do catalisador. Cerca de 0,5 g ($\pm 0,1 \text{ mg}$) da amostra foi pesada em tubos de 15 mL e a quantidade de cada reagente foi avaliada independentemente. Após a adição dos reagentes, a amostra foi submetida ao banho ultrassônico por 30 minutos e o ácido remanescente foi neutralizado com HCl; em seguida a amostra foi submetida ao procedimento de extração (agitação por *vortex*) e centrifugação. A fase aquosa foi então analisada pelo procedimento proposto com diluição em linha. Inicialmente foi avaliado o efeito da concentração de NaOH (em 2,0 mL de etanol) e o

resultado é apresentado na Figura 31. Melhores resultados foram obtidos em concentrações de catalisador superiores a $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,250 \text{ mol L}^{-1}$ foi a concentração selecionada para garantir o excesso de reagente.

Figura 31 – Efeito da concentração de NaOH na reação de saponificação: amostra (■) e branco (●). Volume de etanol de 2,0 mL. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

Na Figura 32 são apresentados os resultados referentes ao volume de etanol. O sinal analítico aumenta com o volume de etanol, indicando total conversão do glicerol ligado a glicerol livre, e 2,0 mL de etanol foi selecionado para estudos posteriores.

Figura 32 – Efeito da variação do volume de etanol na reação de saponificação - amostra (■) e branco (●). Concentração de NaOH de $0,250 \text{ mol L}^{-1}$. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

O efeito do tempo em que as amostras foram submetidas ao banho ultrassônico foi avaliado. Como não foram observadas diferenças significativas em relação a 60 min, sonicação por 30 minutos foi selecionada devido à melhor frequência analítica.

4.2.4. Características analíticas e aplicação

Para glicerol livre, nas condições otimizadas, resposta linear foi observada de 5 a 70 mg L^{-1} , descrita pela equação $S = (64,2 \pm 0,4) + (12,6 \pm 0,1)C$, $r = 0,999$, onde S representa o sinal analítico medido na altura do pico e C a concentração de glicerol em mg L^{-1} . Uma curva de calibração para determinação de glicerol livre é apresentada na Figura 33. O limite de

detecção foi estimado em $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (99,7% de confiança), de acordo com as recomendações da IUPAC [105]. Esse limite é equivalente a 0,0002% (m/m) de biodiesel, sendo 100 vezes menor que o valor máximo permitido pelas normas Brasileira [19], Norte americana [38] e Europeia [37]. O coeficiente de variação foi menor que 1,0 % para 20 medidas independentes de uma solução contendo 20 mg L^{-1} de glicerol.

Figura 33 – Curva de calibração para a determinação fluorimétrica de glicerol livre em biodiesel. Parâmetros instrumentais descritos na legenda da Figura 4.

Para glicerol total, resposta linear foi observada no intervalo $25\text{-}300 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 34) e o limite de detecção foi estimado em $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. O coeficiente de variação ($n=20$) foi estimado em 1,4%. As frequências de amostragem foram calculadas em 35 e 30 amostras h^{-1}

para glicerol livre e total, respectivamente. Estes valores são reduzidos para 15 e 25 amostras h^{-1} considerando o tempo para preparo de amostra, no qual 30 amostras podem ser processadas simultaneamente. No entanto, com a mecanização do procedimento para determinação dos analitos, o tratamento da amostra pode ser realizado em paralelo com a operação do sistema de análises em fluxo (*e.g.* calibração e medidas após o tratamento prévio das amostras). As características analíticas para o procedimento proposto com detecção fluorimétrica e de procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Hantzsch para determinação de glicerol livre e total em biodiesel são apresentados na Tabela 11.

Figura 34 - Curva de calibração para a determinação fluorimétrica de glicerol total em biodiesel. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 4.

Tabela 11 – Características analíticas de procedimentos baseados na reação de Hantzsch para a determinação de glicerol livre e total em biodiesel.

Procedimento	Preparo de amostra	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	LOD ^a (mg kg ⁻¹)	CV ^b (%)	Frequência de amostragem (h ⁻¹)	Referência
<i>Glicerol livre</i>						
Multicomutação-fluorimetria	Extração (4 mL de água)	5-75	2	1.0	35	Procedimento proposto
Batelada	Extração (4 mL EtOH/H ₂ O 1:1) + 4 mL de hexano	25-150	–	–	–	[56]
FIA-espectrofotometria	Extração em linha com água	–	28	–	7	[57]
Multicomutação-espectrofotometria	Extração (4 mL de água)	5-50	4	1.5	34	[87]
<i>Glicerol total</i>						
Multicomutação-fluorimetria	Reação de saponificação em batelada	25-300	6	1.4	30	Procedimento proposto
FIA-espectrofotometria	Reação de saponificação em linha	–	310	–	7	[57]

^a LOD – limite de detecção^b CV – coeficiente de variação

A faixa linear, coeficiente de variação e frequência de amostragem foram similares nos procedimentos com detecção fluorimétrica [101] e espectrofotométrica [87] para determinação de glicerol livre. No entanto, o procedimento com detecção por fluorimetria permite a determinação de glicerol total após simples reconfiguração do sistema via software, após saponificação da amostra com etilato de sódio. No procedimento com detecção fluorimétrica, os limites de detecção foram 14 e 52 vezes menores para glicerol livre e total, respectivamente, que os obtidos pelo procedimento por FIA [57]. O consumo de reagentes foi estimado em 190 μg de KIO_4 e 13 mg de acetilacetona, cerca de 16 e 3 vezes menores que o consumo estimado por FIA [57].

O procedimento proposto para determinação de glicerol livre e total foi aplicado à cinco amostras de biodiesel obtidas de diferentes fontes (soja, algodão e mamona) e os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12– Determinação de glicerol livre e total em biodiesel. Concentrações em mg kg^{-1} ($n=3$). $F_{\text{crítico}} = 19$ (95 % de confiança).

Amostras	Glicerol livre			Glicerol total		
	Proposto	Referência	F	Proposto	Referência	F
Soja I	318 ± 7	310 ± 21	9	460 ± 13	510 ± 150	133
Soja II	85 ± 2	77 ± 12	36	1280 ± 74	1460 ± 140	3,6
Soja III	45 ± 1	46 ± 4	16	1100 ± 33	—	
Algodão	11 ± 1	10 ± 2	4	1100 ± 64	1425 ± 140	4,8
Mamona	11 ± 1	10 ± 1	4	3223 ± 86	3770 ± 140	2,6

Os resultados obtidos para todas as amostras analisadas estão em concordância com o método em batelada no nível de confiança de 95% (teste t pareado), com boa correlação entre o procedimento proposto (y) e os de referência (x), $y = (1,02 \pm 0,01)x + (2 \pm 2)$ ($r=0,999$) e $y = (0,83 \pm 0,02)x + (30 \pm 15)$ ($r=0,998$), para glicerol livre e total, respectivamente. O teste F indica que as variâncias entre o procedimento proposto e os métodos de referência são comparáveis, exceto para a amostra de Soja I (glicerol total) e soja II (glicerol livre). Estas discrepâncias foram causadas pelos resultados imprecisos obtidos pelos métodos de referência. Na determinação de glicerol total o método volumétrico de referência apresenta várias etapas de preparo de amostra, o que pode ocasionar a perda de analito e a contaminação da amostra. No procedimento de referência para a determinação de glicerol livre a imprecisão pode estar relacionada com medidas fora da condição de equilíbrio.

4.3. Sistemas de análises em fluxo para determinação de manganês em águas

4.3.1. Aspectos gerais

Manganês(III) é um oxidante forte utilizado em diversas aplicações analíticas [106,107]. Pode ser formado pela oxidação de Mn(II) na presença de um ligante (*e.g.* EDTA), que estabiliza os íons Mn(III) ($K_f=7,1 \times 10^{24}$ em meio de perclorato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$), Figura 35 [108]. Os complexos formados apresentam máximo de absorção próximo a 450 (pH>5,3) ou 488 nm (pH<5,3), que correspondem aos complexos MnEDTA^- e MnHEDTA , respectivamente [69]. A absorvidade molar do complexo MnHEDTA foi estimada em $468 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 500 nm [69].

Figura 35 – Formação do complexo $[\text{MnHEDTA}]$ após oxidação de Mn(II) por PbO_2 .

A aplicação analítica desta reação é dificultada em procedimentos em batelada devido ao curto tempo de vida com complexo MnHEDTA . Dependendo das condições reacionais, a oxidação do Mn(II) por PbO_2 pode gerar o íon permanganato [71]. Entretanto, condições adequadas podem ser alcançadas em sistemas de análises em fluxo. Uma minicoluna contendo PbO_2 foi investigada para a oxidação em linha do Mn(II) a Mn(III) em presença de EDTA. O sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide proporciona uma melhor interação entre a zona de amostra e as partículas sólidas no reator devido ao fluxo pulsado [13]. Colunas preenchidas com material sólido apresentam algumas vantagens frente aos procedimentos com reagentes em solução, tais como economia de reagentes, diminuição do sinal analítico do branco e possibilidade de aumento na frequência de amostragem [109].

Por outro lado, dependendo da quantidade e do tamanho das partículas do material sólido empregado, pode ser observado um aumento da impedância hidrodinâmica. Este aspecto torna-se mais crítico devido ao baixo torque das minibombas solenoide, diminuindo a vazão das soluções, ou até mesmo ocasionando vazamento nas conexões. Este inconveniente foi observado na tentativa de utilizar somente PbO_2 para preenchimento do reator. Além disso, devido ao tamanho das partículas, o reagente foi removido do interior da minicoluna com o fluxo das soluções. Visando superar estas dificuldades, o oxidante foi imobilizado em acetato de poliéster, resultando em partículas sólidas de tamanho adequado a esta aplicação.

Na Figura 36 é apresentado um espectro de absorção do complexo MnHEDTA. O comprimento de onda de máximo absorção observado de 490 nm, valor próximo ao encontrado na literatura para o complexo MnHEDTA [69].

Figura 36 - Espectro de absorção do complexo MnHEDTA obtido após oxidação em linha de 1 mg L^{-1} de Mn(II). Concentração de EDTA de $0,025 \text{ mol L}^{-1}$. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 5.

Inicialmente, a cela de fluxo de 1 cm foi empregada por motivos de precaução, pois o PbO_2 impregnado poderia se desprender da coluna de oxidação. Este material poderia causar entupimento de celas com dimensões capilares, como a utilizada neste trabalho. Como este problema não foi observado, a cela de longo caminho óptico foi empregada nos estudos posteriores para aumento de sensibilidade.

Dois aspectos foram considerados para o emprego da cela de fluxos com guia de ondas de 100 cm: o aumento do sinal do branco e perturbações por efeito Schlieren, que podem ser maximizados com o aumento do caminho óptico [82]. O primeiro aspecto não foi crítico, pois os reagentes (complexante e tampão) não absorvem radiação no comprimento de onda de medida. O oxidante imobilizado também contribuiu para minimizar o valor do branco. As perturbações causadas por efeito Schlieren foram minimizadas subtraindo os valores de absorbância em 490 nm (comprimento de onda de máxima absorção do complexo) e 750 nm (comprimento de onda de referência).

4.3.2. Otimização

A variação do sinal analítico em função da acidez foi avaliada para a determinação de manganês pelo procedimento proposto, considerando o compromisso entre a eficiência de oxidação do Mn(II) (favorecida em meio ácido) [69] e a formação do complexo, que é favorecida em pH mais elevado. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 37.

Figura 37 - Efeito da acidez da solução tampão sobre o sinal analítico – Mn(II) 100 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Cella de fluxo com 1 cm de caminho óptico. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 5.

Observa-se que o sinal analítico sofre variações pouco significativas entre pH 3,0 e 5,5 (Figura 37). Além do efeito sobre a oxidação do Mn(II), a diminuição da resposta analítica para valores de pH superiores a 5,5 se deve à decomposição do complexo de Mn(III)/EDTA, favorecida entre pH 5 – 6 [110] e também à formação do complexo MnEDTA ($\lambda_{\text{max}} = 450$ nm), predominante em valores de pH superiores a 5,3 [69]. A partir destes resultados, foi adotado pH 4,5 para estudos posteriores, devido à capacidade tamponante do sistema tampão acetato ($\text{pK}_a = 4,76$) [111].

O reator recheado com partículas sólidas, responsável pela oxidação do Mn(II), melhora a homogeneização da zona de amostra, favorecendo a dispersão radial [81]. Mantendo-se fixo o comprimento do reator em 13 cm, a quantidade de PbO₂ imobilizado em poliéster foi avaliada visando maximizar a eficiência de oxidação do analito. Após o preenchimento da coluna com o poliéster contendo o oxidante, pedaços de algodão foram colocados em cada extremidade da coluna, preenchendo os espaços vazios no interior da mesma. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 38.

Figura 38 - Efeito da massa de PbO₂ imobilizado em poliéster sobre o sinal analítico –Mn(II) 100 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Cella de fluxo com 1 cm de caminho óptico. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 5.

O sinal analítico aumentou com a massa de oxidante sólido entre 200 - 400 mg (Figura 38) devido ao aumento na eficiência de oxidação (maior tempo de residência da zona de amostra em contato com o oxidante). Entretanto, a resposta obtida com 500 mg deste

material foi 2,8 vezes menor, devido ao aumento da impedância hidrodinâmica causado pela grande quantidade de material sólido, ocasionando diminuição no volume dispensado pelas minibombas de até três vezes. Isso foi verificado por aferição das minibombas nas situações avaliadas. Sendo assim, a coluna preenchida com 400 mg do oxidante sólido impregnado foi escolhida para estudos posteriores.

Foi também avaliado o efeito da inserção de uma bobina de reação entre a válvula solenoide (V) e o reator em fase sólida (C_R) (Figura 39). Esta alteração visava melhorar a mistura entre a amostra e o reagente antes que a zona de amostra passasse pela coluna. Os resultados obtidos devem-se à maior dispersão da zona de amostra. Isto comprova que o fluxo pulsado gerado pelas minibombas solenoide oferece condições de mistura bastante efetivas [8,112], tornando desnecessário o uso do reator helicoidal. Além disso, é um indício da rápida formação do complexo de Mn(II) com EDTA.

Figura 39 - Influência do tamanho do reator sobre o sinal analítico – Mn(II) 100 mg L⁻¹ (■) e branco (●). Cella de fluxo com 1 cm de caminho óptico. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 5.

As frações volumétricas da amostra e reagente, a parada de fluxo para aumento do tempo de residência e o efeito do número de ciclos de amostragem foram avaliados para uma solução de Mn(II) 100 mg L^{-1} . Maior sinal analítico foi obtido com o aumento no número de pulsos da amostra (48% comparando as respostas obtidas com 5 e 7 pulsos), indicando que o complexante encontra-se em excesso em relação à amostra. Fixando-se 7 pulsos de amostra, foi avaliado o efeito da fração volumétrica do reagente, que resultou em diminuição do sinal devido à diluição, comprovando que o EDTA encontrava-se em excesso (2 vezes em relação à máxima concentração de Mn(II) empregada no procedimento proposto).

O efeito do número de ciclos de amostragem foi avaliado e melhores resultados foram obtidos com 7 ciclos. Nestas condições, as medidas foram realizadas próximo à situação de volume infinito (volume da zona de amostra de $490 \text{ }\mu\text{L}$, com cela de fluxo de $250 \text{ }\mu\text{L}$).

Com uma etapa de parada de fluxo por 60 segundos após a formação da zona de amostra, foi observada diminuição de absorvância de aproximadamente 3%, indicando que a formação do complexo MnHEDTA é rápida e a espécie é estável em período de tempo superior ao requerido para a medida em sistema de análises em fluxo.

Com a diminuição da frequência de acionamento das minibombas da amostra e do reagente, foi observado um aumento de 78% no sinal analítico, devido ao maior tempo de residência da zona de amostra na minicoluna de oxidação. Entretanto, essa variação é pouco significativa quando empregadas frequências de acionamento menores que $2,5 \text{ Hz}$. O sinal analítico também não foi significativamente alterado variando-se a vazão da solução transportadora. Sendo assim, foram empregadas frequências de acionamento de $2,5 \text{ Hz}$ (P_2 e P_3) e 5 Hz (P_1), gerando vazões de $1,5$ e $4,5 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente. Nessas condições, o

tempo de residência da amostra na minicoluna de oxidação foi de 7 s, confirmando que as reações de oxidação e complexação são relativamente rápidas.

A porcentagem de oxidação do Mn(II) no procedimento proposto foi estimada em 46%, comparando a absorvidade molar do complexo MnHEDTA [69], com o valor aparente, obtido do coeficiente angular da curva de calibração para a cela de 1 cm. Nessa estimativa, foi considerado o coeficiente de dispersão, estimado com solução colorida (permanganato de potássio).

O efeito da concentração de EDTA foi avaliado no intervalo de 2 - 75 mmol L⁻¹, sendo os resultados apresentados na Figura 40.

Figura 40 - Efeito da concentração de EDTA sobre o sinal analítico – Mn(II) 1 mgL⁻¹ (■) e branco (●). Cella de fluxo com 100 cm de caminho óptico. Demais parâmetros descritos na legenda da Figura 5.

No intervalo avaliado, o sinal analítico não sofreu variação significativa. O ácido etilenodiaminotetracético é um reagente de baixo custo com amplas aplicações em análises químicas, principalmente em volumetria de complexação, por formar complexo com vários íons. Levando em consideração que estes íons estão presentes em águas (*e.g.* Ca, Mg e Fe), 0,025 mol L⁻¹ de complexante foi selecionado para garantir excesso de reagente. Essa concentração de EDTA foi efetiva mesmo utilizando 100 mg L⁻¹ de manganês (medida com cela de 1 cm de caminho óptico). Concentrações mais elevadas de EDTA foram evitadas devido à maior lixiviação do dióxido de chumbo imobilizado na minicoluna de oxidação, que se torna mais crítica em maiores concentrações do ligante. Quando empregado EDTA 0,25 mol L⁻¹, após 5 medidas, o sinal analítico para uma solução de Mn(II) 0,5 mg L⁻¹ foi igual ao do branco. Outro fenômeno que pode ocorrer é a redução de Mn(III) na presença de excesso de EDTA [113], porém esse processo é minimizado devido ao curto tempo de residência da amostra.

A Tabela 13 apresenta um resumo dos parâmetros otimizados no procedimento proposto para a determinação de manganês.

Tabela 13 - Parâmetros otimizados para a determinação de manganês em águas em sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide.

Parâmetros	Faixa avaliada	Valor selecionado
pH	3,0 – 6,5	4,5
Massa do polímero contendo PbO ₂ impregnado (mg)	100 – 500	400
Concentração de EDTA (mmol L ⁻¹)	2 – 75	25
Tamanho do reator (cm)	0 – 100	0
Pulsos de amostra	4 – 8	7
Pulsos de reagente	1 e 2	1
Número de ciclos de amostragem	5 – 8	7

4.3.2. Características analíticas

As características analíticas do procedimento proposto foram estimadas nas condições otimizadas. Resposta linear foi observada no intervalo 25 - 1500 µg L⁻¹, com limite de detecção estimado em 6 µg L⁻¹ (99,7% de confiança). Esse valor foi similar ao obtido por GF AAS (2 µg L⁻¹), sendo compatível com a determinação do analito em águas de acordo com a legislação ambiental Brasileira e Norte americana [62,114]. A frequência de amostragem e o coeficiente de variação foram de 36 determinações por hora e 2,6% (500 µg L⁻¹, n = 10), respectivamente.

O consumo de reagente e a geração de resíduos foram estimados em 500 µg de EDTA e 3 mL por determinação. A quantidade de chumbo no resíduo foi determinada por espectrometria de absorção atômica com chama e corresponde a 250 µg por determinação.

Apenas considerando esse valor, seria possível realizar até 1600 determinações com um reator em fase sólida contendo 400 mg de PbO_2 imobilizado.

Com o sistema de análises em fluxo com minibombas solenoide e detecção por espectrofotometria com longo caminho óptico a sensibilidade obtida foi 120 vezes superior à obtida com uma cela de fluxo convencional com 1 cm de caminho óptico. O valor 20% maior do que o teórico deve-se provavelmente à maior eficiência de oxidação em soluções mais diluídas de manganês. A Tabela 14 apresenta as características analíticas estimadas para o procedimento proposto, com celas de fluxo de 1 e 100 cm de caminho óptico. Sinais transientes obtidos para soluções de referência de manganês estão apresentados na Figura 41.

Tabela 14 – Características analíticas para o procedimento desenvolvido. Melhorar a separação entre as 2 colunas da direita

Característica analítica	Cela de 1 cm	Cela de 100 cm
Equação da reta	$A = 2,7 \times 10^{-5} C_{\text{Mn}} + 0,0075$	$A = 0,3231 C_{\text{Mn}} + 0,0100$
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2500 – 15000	25 - 1500
Coefficiente de variação (%)	4,3	2,6
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	600	6
Limite de quantificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2000	20
Frequência de amostragem (amostras h^{-1})	50	36

Figura 41 - Sinais transientes e curva analítica para a determinação de manganês. Cella de fluxo com 100 cm de caminho óptico. Números indicam concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$. Demais condições semelhantes às descritas na Figura 5.

No procedimento proposto, interferências negativas são esperadas para íons metálicos presentes em concentrações da ordem de miligrama por litro (ou superiores) e que formam complexos estáveis com EDTA, competindo com o manganês pelo complexante. Na Tabela 15 estão apresentadas as constantes de formação para alguns complexos metálicos com EDTA. Por outro lado, interferências positivas podem ser causadas por íons metálicos que formam complexos coloridos com o ligante, que absorvem na mesma região de medida do complexo MnHEDTA. Somado a esses fatores, algumas espécies presentes nas amostras podem sofrer oxidação na minicoluna, comprometendo a oxidação do Mn(II) e o tempo de vida da minicoluna de oxidação.

Tabela 15– Constantes de formação de íons complexos com EDTA[36].

Cátion	K _f	Cátion	K _f
Al(III)	1,3 x 10 ¹⁶	Mg(II)	4,9 x 10 ⁸
Ba(II)	5,8 x 10 ⁷	Mn(II)	6,2 x 10 ¹³
Ca(II)	5,0 x 10 ¹⁰	Mn(III)	7,1 x 10 ²⁴
Co(II)	2,0 x 10 ¹⁶	Ni(II)	4,2 x 10 ¹⁸
Cu(II)	6,3 x 10 ¹⁸	Sr(II)	4,3 x 10 ⁸
Fe(II)	2,1 x 10 ¹⁴	Zn(II)	3,2 x 10 ¹⁶
Fe(III)	1,3 x 10 ²⁵		

A influência de diversos concomitantes presentes em águas de mar e água doce foi avaliada. As concentrações foram baseadas nas quantidades usuais destas espécies [88]: 20 g L⁻¹ de Cl⁻; 10 g L⁻¹ de Na⁺; 3 g L⁻¹ de SO₄²⁻; 1 g L⁻¹ de Mg²⁺; 0,5 g L⁻¹ de Ca²⁺, K⁺, HCO₃⁻, Br⁻, Sr²⁺ ou H₃BO₃; 50 mg L⁻¹ de Li⁺ ou PO₄³⁻; 5 mg L⁻¹ de Ba²⁺, Mo(VI) (MoO₄²⁻), Zn²⁺, As(V) (AsO₄³⁻), Al³⁺, U(VI) (UO₂²⁺) ou Fe²⁺; 0,5 mg L⁻¹ Fe³⁺; 100 µg L⁻¹ de Ni²⁺ ou Cu²⁺ e 50 µg L⁻¹ de Co²⁺ ou V(IV) (VO²⁺). O efeito de uma espécie foi considerado interferência quando a variação do sinal foi superior a 5% em relação à resposta obtida para 500 µg L⁻¹ de manganês. Apenas Ca²⁺ (excesso de 1000 vezes) apresentou interferência (80%, negativa). Apesar da constante de formação do complexo Ca²⁺ ser inferior à constante de formação para o Mn(II), Tabela 15, esta espécie é encontrada em elevadas concentrações nas amostras, o que justifica a interferência. Somente para a complexação de cálcio, seria necessário que a concentração de EDTA fosse de 0,0875 mol L⁻¹ (considerando a fração volumétrica da amostra 7 vezes superior à do reagente). Foi avaliado o aumento da

concentração de EDTA para $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, visando eliminar a interferência negativa causada pela presença de Ca^{2+} . No entanto, com o aumento da concentração do reagente, a repetibilidade do procedimento foi comprometida, pois o sinal analítico diminuiu consideravelmente após cada medida, devido à maior solubilização do PbO_2 impregnado na coluna de oxidação. Vale lembrar que a concentração de cálcio avaliada só é esperada em água do mar. O limite de tolerância da concentração de cálcio sem que fossem observadas interferências superiores a 5% foi de 50 mg L^{-1} .

4.3.3. Determinação de manganês em águas

Apesar da possibilidade de interferência de Ca^{2+} , a recuperação de manganês foi avaliada em uma amostra de água do mar. A adição do analito foi necessária devido à baixa concentração desta espécie em água do mar, na ordem de ng L^{-1} [88]. Quando $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ do analito foi adicionado à amostra, analisada pelo procedimento proposto com $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ de EDTA, as recuperações foram muito baixas. Diferentes valores de pH (2, 3 e 4,5) da solução tampão em que foi preparado o complexante também foram avaliados. A lixiviação do PbO_2 e a complexação de Ca^{2+} são desfavorecidas em meio mais ácido [115]. Entretanto, os sinais analíticos obtidos nessas três diferentes condições de acidez foram semelhantes ao sinal obtido para o branco, ou seja, a recuperação do analito foi próxima de zero, devido ao elevado consumo de complexante pelo cálcio na amostra.

Embora o limite máximo de manganês em águas de classe 1 (incluindo águas salobras), estabelecido pela legislação do CONAMA seja de $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [62], a concentração usual desta espécie em água do mar é cerca de 1000 vezes inferior [88] e cerca de 60 vezes inferior ao limite de detecção do procedimento proposto. Este fator e a interferência causada por cálcio inviabilizam a aplicação do procedimento desenvolvido para análises de água do mar.

O procedimento proposto foi aplicado para a determinação de manganês em águas doces, nas quais a concentração de cálcio é bastante inferior à encontrada em água do mar (*ca.* 40 mg L⁻¹) [88] íons metálicos potencialmente interferentes são tolerados em concentrações superiores às esperadas nestas amostras [88].

Oito amostras de água doce foram analisadas pelos procedimentos proposto e de referência (GF AAS). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Determinação de manganês em águas.

Amostras	Manganês (µg L ⁻¹)	
	Procedimento proposto	GFAAS
Mina 1	403 ± 11	396 ± 13
Mina 2	< LD	< LD
Rio 1	277 ± 7	88,0 ± 0,1
Rio 2	267 ± 9	< LD
Rio 3	484 ± 12	505 ± 5
Rio 4	1170 ± 37	1148 ± 55
Lago	403 ± 1	8,8 ± 0,3
Água mineral	< LD	< LD

Severas interferências positivas foram observadas para as amostras de Rio 1 e 2 e de Lago, quando comparados com os resultados obtidos pelo procedimento de referência. Um

espectro de absorção foi obtido com a cela de 100 cm para a amostra de Rio 1 (Figura 42a) e foi observada elevada absorção de radiação pela amostra na região de 410 nm, um indicativo que essas interferências foram causadas pela matéria orgânica da amostra. Além da interferência espectral, mais significativa devido ao caminho óptico de 100 cm, estas espécies podem afetar a eficiência da oxidação no reator em fase sólida. Após a passagem da amostra pela coluna contendo PbO_2 imobilizado, um novo espectro foi obtido (Figura 42c). Conforme demonstrado na Tabela 17, a absorção de radiação pela amostra mudou após a passagem pelo reator em fase sólida, devido à oxidação da matéria orgânica. Portanto, a interferência espectral não poderia ser corrigida subtraindo-se o sinal da amostra sem passagem pela coluna do sinal analítico obtido para o complexo.

Figura 42 - Espectros de absorção para a amostra de Rio1, com e sem pré-tratamento. (a) espectro da amostra sem passar pela coluna de oxidação; (b) após tratamento com sílica funcionalizada C18; (c) após a passagem pela coluna de oxidação e (d) após tratamento com carvão ativado.

Duas estratégias foram avaliadas para a remoção da matéria orgânica das amostras de águas. A primeira alternativa consistiu no emprego de cartuchos de extração em fase sólida preenchidos por sílica funcionalizada C18 (Sep-Pak Cartridges, USA). Cerca de 5 mL de amostra foram inseridos por uma seringa no cartucho contendo a fase sólida e um espectro de absorção da amostra foi obtido (Figura 42b). Esse espectro para a amostra de Rio 1 permite concluir que a estratégia não foi eficiente para completa remoção da matéria orgânica da amostra. Outra estratégia foi a remoção da matéria orgânica pela adição de carvão ativado na amostra (Figura 42d). Os espectros de absorção obtidos com e sem pré-tratamento da amostra estão também apresentados na Figura 42.

Tabela 17 – Efeito da separação da matéria orgânica com carvão ativado.

Amostra	Absorbância (410 nm)		
	A ₁	A ₂	A ₃
Rio 1	0,749	0,460	0,000
Rio 2	0,549	0,405	0,010
Lago	1,18	0,757	0,007

A₁. Absorbância da amostra sem pré-tratamento

A₂. Absorbância da amostra após atravessar reator de oxidação;

A₃. Absorbância após separação da matéria orgânica com carvão ativado

A interferência causada pela matéria orgânica foi contornada através da remoção destas espécies por adsorção no carvão ativado. Esse pré-tratamento foi realizado em batelada, permitindo o processamento de pelo menos 30 amostras simultaneamente. Conforme demonstrado na Tabela 17, esta estratégia foi adequada para remoção completa da matéria orgânica das três amostras que apresentaram interferência.

Após a remoção da matéria orgânica das amostras Rio 1 e 2 e Lago, o procedimento proposto foi aplicado para a determinação de manganês. Os resultados obtidos após pré-tratamento e por GF AAS estão apresentados na Tabela 18. Os resultados foram concordantes com 95% de confiança, demonstrando a eficiência do processo de separação das substâncias interferentes.

Tabela 18 - Determinação de manganês em amostras de águas após pré-tratamento.

Amostras	Manganês ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Procedimento proposto	GFAAS
Mina 1	403 ± 11	396 ± 13
Mina 2	< LD	< LD
Rio 1	86 ± 1	$88 \pm 0,1$
Rio 2	< LD	< LD
Rio 3	484 ± 12	505 ± 5
Rio 4	1170 ± 37	1148 ± 55
Lago	$8,1 \pm 1,9$	$8,8 \pm 0,3$
Água mineral	< LD	< LD

Ensaio de recuperação foram realizados para as amostras de água de Mina 2 e Água mineral. As recuperações para as duas amostras após a adição de 50 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Mn(II), foram de 92 e 100% (Mina 2), respectivamente, e para a amostra de água mineral a recuperação foi de *ca.*100%, indicando a ausência de efeitos de matriz na determinação de manganês. Esses resultados também indicam que Mn(II) não forma complexos com a matéria orgânica da amostra ou forma complexos lábeis.

A Tabela 19 apresenta algumas características analíticas de procedimentos em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de manganês [71,113,116-121]. Van Staden e Kluever [71] desenvolveram um procedimento em sistema de análises em fluxo para a determinação de manganês em águas naturais, após oxidação em linha de Mn(II) por dióxido de chumbo, a coluna de oxidação contendo PbO₂ foi preparada suspendendo este reagente em sílica gel, segundo os autores, é possível realizar entre 500–700 medidas com este reator. Aquecimento a 60°C, foi empregado levando à formação de MnO₄⁻, determinado por espectrofotometria em 526 nm. A resposta foi linear entre 1000-5000 µg L⁻¹, com limite de detecção de 560 µg L⁻¹ de manganês, cerca de 100 vezes superior ao obtido pelo procedimento proposto neste trabalho.

Saint’Pierre e colaboradores [113] propuseram um sistema de análises em fluxo para a determinação espectrofotométrica de manganês em ligas metálicas. O efeito catalítico de íons Ag(I) na oxidação em linha de Mn(II) gerando permanganato, foi a estratégia adotada para a determinação de manganês. Faixa linear foi observada no intervalo de 5 -150 mg L⁻¹, muito superior à concentração de manganês esperada em amostras de águas.

Baseado na oxidação de Mn(II) a permanganato, Kargosha e Noroozifar [116] propuseram um procedimento de determinação de manganês em águas após a oxidação em linha do analito. Uma minicoluna de oxidação preenchida com bismutato de sódio sólido, suspenso em sílica gel, foi empregada para oxidação de Mn(II), com limite de detecção de 380 µg L⁻¹, em torno de 60 superior ao obtido pelo procedimento proposto. Cerca de 150 medidas podem ser realizadas com esse reator.

O efeito catalítico da presença de íons Mn(II) na oxidação de defenilcarbazona foi a estratégia adotada Maniasso e Zagatto [117] para a determinação de manganês em digeridos

de plantas, com limite de detecção de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ e intervalo de resposta linear entre $50 - 800 \mu\text{g L}^{-1}$. Interferências positivas foram observadas na presença de Fe(III) e Ni(II).

Outro trabalho foi apresentado por Nakano *et al.* [118], explorando o efeito catalítico do Mn(II) na oxidação do reagente N,N'-bis(2-hidroxi-3-sulfopropil)toluidina (HSPT) por periodato, com limite de detecção de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ e intervalo de resposta linear entre $0,02 - 3 \mu\text{g L}^{-1}$. Segundo os autores, um controle rígido de temperatura é necessário (15°C). Interferências foram observadas na presença de Fe(III), As(III), Ce(III), Ce(IV), Cr(III), Ni(II) e Fe(II), sendo contornadas após a adição de 2,2 – iminodietanol como mascarante para Fe(III). Para eliminação da interferência causada por As(III), foi borbulhado ozônio por 5 minutos para oxidação a As(V). Alta sensibilidade e baixa seletividade são comuns a métodos catalíticos.

Um procedimento em fluxo com multicomutação com detecção espectrofotométrica para determinação de manganês em digeridos de soja foi proposto por Smirderle *et al.* [120], baseado na oxidação em linha de Mn(II) por periodato, levando à formação de permanganato, este procedimento envolve uma etapa de aquecimento (47°C). O limite de detecção foi estimado em $1,2 \text{ mg L}^{-1}$, 200 vezes superior ao obtido no procedimento proposto.

A formação do complexo de Mn(II) com meso-tetraquis(4-carbometoxifenil)porfirina foi apresentado por Chen e colaboradores [121] com detecção espectrofotométrica em 472 nm, com limite de detecção estimado em $2,38 \mu\text{g L}^{-1}$, muito inferior ao limite esperado em procedimentos com detecção espectrofotométrica.

Tabela 19 - Características analíticas de procedimentos em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de manganês.

Procedimento	Amostra	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV ^b (%)	Frequência de amostragem (h ⁻¹)	Referência
Medida de MnHEDTA/oxidação em linha com PbO ₂	águas	25-1500	6	2,6	36	Procedimento proposto
Medida de MnO ₄ ⁻ /reator em fase sólida com PbO ₂ empregando aquecimento	efluentes	1000-5000	560	1,8	30	[71]
Medida de MnO ₄ ⁻ /oxidação eletroquímica com eletrodo de Pt	aço	5000-150000	-	2,12	20	[113]
Medida de MnO ₄ ⁻ /reator em fase (bismutato de sódio sólido)	efluentes	1000-20000	380	<1,35	-	[116]
Efeito catalítico da oxidação aerial da difenilcarbazona	materiais vegetais	100-800	30	2,0	70	[117]
Oxidação do HSPT por periodato	águas	0,02-3,0	0,01	1,6	20	[118]
Medida de MnO ₄ ⁻ /oxidação por NaIO ₄ com aquecimento	soja	2500-40000	1200	0,27	50	[120]
Complexo de Mn(II) com meso-tetraquis(4-carbometoxifenil)porfirina	águas	10-1750	2,38	-	90	[121]

^a LOD – limite de detecção^b CV – coeficiente de variação

5. CONCLUSÕES

De uma maneira geral, todos os procedimentos desenvolvidos foram caracterizados pela redução do consumo de reagentes e amostra, diminuindo a geração de resíduos, além de melhorar a frequência analítica quando comparado aos procedimentos em batelada. Para os três procedimentos propostos, os limites de detecção obtidos foram adequados aos limites estabelecidos pelas legislações vigentes para controle e/ou monitoramento das espécies avaliadas.

Para a determinação de glicerol livre, após extração em batelada do analito, algumas vantagens frente ao procedimento em batelada foram apresentadas, como: remoção da etapa de aquecimento para acelerar a formação do produto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina; e a redução do consumo de reagentes e amostras. O uso de minibombas solenoide permitiu variar a fração volumétrica dos reagentes e amostra (amostragem binária), possibilitando o aumento da quantidade de acetilacetona presente na zona de amostra, pois o uso de concentrações mais elevadas deste reagente é limitado por sua baixa solubilidade em água. A extração de glicerol em amostras de biodiesel foi realizada utilizando água deionizada como extrator, eliminando o uso de solventes orgânicos. O limite de detecção obtido foi 50 vezes menor que o estabelecido pela legislação [19].

O sistema de análises em fluxo com multicomutação com detecção fluorimétrica é uma boa alternativa para determinação de glicerol livre e total em biodiesel, inclusive para a determinação de glicerol total em biodiesel proveniente de óleo de mamona, no qual não é possível utilizar o procedimento de referência por CG. Algumas características deste procedimento podem ser destacadas como a possibilidade de determinação de ambos analitos no mesmo sistema, baixos valores de limite de detecção, adequados às normas Brasileira [19], Europeia [37] e Norte Americana [38]. Os procedimentos de preparo de amostras foram simplificados, eliminando o uso de solventes tóxicos durante a etapa de extração do glicerol.

O procedimento desenvolvido para determinação de manganês explorando a oxidação em linha de Mn(II), seguida da complexação com EDTA, apresenta algumas vantagens como o emprego de um reagente de baixo custo, comum em laboratórios de química analítica. A imobilização do PbO₂ foi eficiente para minimizar o aumento de impedância hidrodinâmica. O valor do branco analítico, um aspecto relevante em procedimentos com detecção espectrofotométrica com longo caminho óptico, foi minimizado pelo emprego de ligante incolor e um oxidante imobilizado em fase sólida. O limite de detecção obtido é comparável com o obtido por GF AAS, sendo adequado para a determinação de manganês em águas, atendendo aos limites estabelecidos pelas legislações ambientais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. REIS, B.F., GINÉ, M.F., KRONKA, E.A.M., A análise química por injeção em fluxo contínuo. *Química Nova*, 1989. 12: p. 82-91.
- [2]. REIS, B.F., Análise por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Química Nova*, 1996. 19: p. 51-58.
- [3]. REIS, B.F., GINÉ, M.F., ZAGATTO, E.A.G., LIMA, J.L.F.C., LAPA, R.A., Multicommution in flow-analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta*, 1994. 293(1-2): p. 129-138.
- [4]. ROCHA, F.R.P., REIS, B.F., ZAGATTO, E.A.G., LIMA, J., LAPA, R.A.S., SANTOS, J.L.M., Multicommution in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, 2002. 468(1): p. 119-131.
- [5]. KRONKA, E.A.M., REIS, B.F., KORN, M., BERGAMIN-FILHO, H., Multicommution in flow analysis.5. Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. *Analytica Chimica Acta*, 1996. 334(3): p. 287-293.
- [6]. ICARDO, M.C., MATEO, J.V.G., CALATAYUD, J.M., Multicommution as a powerful new analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*, 2002. 21(5): p. 366-378.
- [7]. BIOCHEM-FLUIDICS, disponível em: <https://www.biochemfluidics.com>. Acesso em 19/07/2011.
- [8]. 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. *Analytica Chimica Acta*, 2007. 600(1-2): p. 21-28.
- [9]. LAPA, R.A.S., LIMA, J.L.F.C., REIS, B.F., SANTOS, J.L.M., ZAGATTO, E.A.G., Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Analytica Chimica Acta*, 2002. 466(1): p. 125-132.
- [10]. WEEKS, D.A., JOHNSON, K.S., Solenoid Pumps for Flow Injection Analysis. *Analytical Chemistry*, 1996. 68(15): p. 2717-2719.

- [11]. FORTES, P.R., FERES, M.A., SASAKI, M.K., ALVES, E.R., ZAGATTO, E.A.G., PRIOR, J.A.V., SANTOS, J.L.M., LIMA, J.L.F.C., Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems. *Talanta*, 2009. 79(4): p. 978-983.
- [12]. ALVES, E.R., FERES, M.A., ZAGATTO, E.A., LIMA, J.L.F.C., Exploiting pulsed flows for heating improvement: Application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices. *Current Analytical Chemistry*, 2009. 5(1): p. 65-69.
- [13]. DIAS, A.C.B., SANTOS, J.L.M., LIMA, J.L.F.C., QUINTELLA, C., LIMA, A., ZAGATTO, E.A.G., A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. 388(5): p. 1303-1310.
- [14]. RIBEIRO, M., DIAS, A., SANTOS, J.O., LIMA, J., ZAGATTO, E., Fluidized beds in flow analysis: use with ion-exchange separation for spectrophotometric determination of zinc in plant digests. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. 384(4): p. 1019-1024.
- [15]. KRONKA, E.A.M., REIS, B.F., VIEIRA, J.A., BLANCO, T., GERVASIO, A.P.G., Multicommutation and binary sampling in chemical flow analysis. Spectrophotometric determination of phosphate in natural waters. *Química Nova*, 1997. 20(4): p. 372-376.
- [16]. KNOTHE, G., Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 2005. 86(10): p. 1059-1070.
- [17]. PINZI, S., GARCIA, I.L., LOPEZ-GIMENEZ, F.J., LUQUE DE CASTRO, M.D., DORADO, G., DORADO, M.P., The Ideal Vegetable Oil-based Biodiesel Composition: A Review of Social, Economical and Technical Implications. *Energy & Fuels*, 2009. 23(5): p. 2325-2341.
- [18]. MEHER, L.C., VIDYA SAGAR, D., NAIK, S.N., Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2006. 10(3): p. 248-268.
- [19]. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e B combustíveis ANP, Resolução nº. 42, de 16-12-2009, Retificada DOU 14-1-2010, disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2009/dezembro/ranp%2042%20-%202009.xml>. Acesso em 12/08/2011.

- [20]. Boletim mensal da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e biocombustíveis, disponível em: <<http://rotaenergia.wordpress.com/2011/02/16/anp-boletim-do-biodiesel>>. Acesso em 12/08/2011.
- [21]. Portal do biodiesel, disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/>>. Acesso em 12/08/2011.
- [22]. SHAHID, E.M., JAMAL, Y., A review of biodiesel as vehicular fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2008. 12(9): p. 2484-2494.
- [23]. LEUNG, D.Y.C., WU, X., LEUNG, M.K.H., A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*. 2009. 87(4): p. 1083-1095.
- [24]. LÔBO, I.P., FERREIRA, S.L.C., CRUZ, R.S., Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, 2009. 32: p. 1596-1608.
- [25]. WU, X., LEUNG, D.Y.C., Optimization of biodiesel production from camelina oil using orthogonal experiment. *Applied Energy*. 88(11): p. 3615-3624.
- [26]. MA, F., HANNA, M.A., Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 1999. 70(1): p. 1-15.
- [27]. SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R.R.M., Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 1998. 9: p. 199-210.
- [28]. CHENG, J.J., TIMILSINA, G.R., Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*. 2011.36(12): p. 3541-3549.
- [29]. PINTO, A.C., GUARIEIRO, L.L.N., REZENDE, M.J.C., RIBEIRO, N.B.M., TORRES, E.A., LOPES, W.A., PEREIRA, P.A.D.P., ANDRADE, J.B.D., Biodiesel: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005. 16: p. 1313-1330.
- [30]. SHAHLA, S., CHENG, N., YUSOFF, R., An overview on transesterification of natural oils and fats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2010. 15(6): p. 891-904.
- [31]. VYAS, A.P., VERMA, J.L., SUBRAHMANYAM, N., A review on FAME production processes. *Fuel*. 2009. 89(1): p. 1-9.

- [32]. ATADASHI, I.M., AROUA, M.K., AZIZ, A.A., Biodiesel separation and purification: A review. *Renewable Energy*, 2010. 36(2): p. 437-443.
- [33]. PETERSON, C.L., Vegetable oil as a diesel fuel: status and research priorities. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 1986. 29(5): p. 1413-1422.
- [34]. LAPUERTA, M.N., ARMAS, O., GARCÍA-CONTRERAS, R., Effect of ethanol on blending stability and diesel engine emissions. *Energy & Fuels*, 2009. 23(9): p. 4343-4354.
- [35]. TORRES-JIMENEZ, E., SVOLJAK-JERMAN, M., GREGORC, A., LISEC, I., DORADO, M.P., KEGL, B., Physical and chemical properties of ethanol biodiesel blends for diesel engines. *Energy & Fuels*, 2009. 24(3): p. 2002-2009.
- [36]. LIDE, R.D., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press. Califórnia, 2005. p.234.
- [37]. European Committee for Standardization, EN 14214.
- [38]. ASTM D 6751. Test method for determination of free and total glycerine in B 100 biodiesel methyl esters by gas chromatography. ASTM International.
- [39]. FIRESTONE, D., *Official methods and recommended practices of the AOCS: Fats, Oils and lipid related analytical methods*. AOCS ed. Vol. 6 ed. 2009, Chicago.
- [40]. MONTEIRO, M.R., AMBROZIN, A.R.P., LIAO, L.M., FERREIRA, A.G., Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*, 2008. 77(2): p. 593-605.
- [41]. BAILER, J., HUEBER, K., Determination of saponifiable glycerol in "Bio-Diesel". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1991. 340(3): p. 186-186.
- [42]. MITTELBAACH, M., ROTH, G., BERGMANN, A., Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel. *Chromatographia*, 1996. 42(7): p. 431-434.
- [43]. GONÇALVES, L.C., MICKE, G.A., Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1154(1-2): p. 477-480.

- [44]. FERNANDES, E.N., MOURA, M.N.C., LIMA, J.L.F.C., REIS, B.F., Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry. *Microchemical Journal*, 2004. 77(2): p. 107-112.
- [45]. RANGEL, A.O.S.S., TÓTH, I.V., Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection. *Analytica Chimica Acta*, 2000. 416(2): p. 205-210.
- [46]. SEGUNDO, M.A., RANGEL, A.O.S.S., Sequential injection flow system with improved sample throughput: determination of glycerol and ethanol in wines. *Analytica Chimica Acta*, 2002. 458(1): p. 131-138.
- [47]. STURGEON, R.J., DEAMER, R.L., HARBISON, H.A., Improved spectrophotometric determination of glycerol and its comparison with an enzymatic method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1979. 68(8): p. 1064-1066.
- [48]. CHAN, W.H., SHUANG, S., CHOI, M.M.F., Determination of airborne formaldehyde by active sampling on 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride-coated glass fibre filters. *Analyst*, 2001. 126(5): p. 720-723.
- [49]. OLIVEIRA, F.S.D., LEITE, B.R.C.L.O., ANDRADE, M.V.A.S.D., KORN, M., Determination of total aldehydes in fuel ethanol by MBTH method: sequential injection analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005. 16: p. 87-92.
- [50]. CINTI, D.L., THAL, S.E., Determination of formaldehyde by the Hantzsch reaction: Interference by naturally occurring compounds. *Analytical Biochemistry*, 1977. 83(1): p. 91-98.
- [51]. NASH, T., The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemical Journal*, 1953. 55(3): p. 416-417.
- [52]. LI, Q., SRITHARATHIKHUN, P., MOTOMIZU, S., Development of novel reagent for Hantzsch reaction for the determination of formaldehyde by spectrophotometry and fluorometry. *Analytical Sciences*, 2007. 23(4): p. 413-417.
- [53]. BELMAN, S., The fluorimetric determination of formaldehyde. *Analytica Chimica Acta*, 1963. 29: p. 120-126.

- [54]. DONG, S., DASGUPTA, P.K., Fast fluorometric flow injection analysis of formaldehyde in atmospheric water. *Environmental Science & Technology*, 1987. 21(6): p. 581-588.
- [55]. 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 flow-injection solid phase spectrophotometry. *Talanta*, 2004. 64(3): p. 711-715.
- [56]. BONDIOLI, P., DELLA BELLA, L., An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2005. 107(3): p. 153-157.
- [57]. PINZI, S., CAPOTE, F.P., JIMENEZ, J.R., DORADO, M.P., CASTRO, M.D.L., Flow injection analysis-based methodology for automatic on-line monitoring and quality control for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2009. 100(1): p. 421-427.
- [58]. PISARELLO, M.L., DALLA COSTA, B.O., VEIZAGA, N.S., QUERINI, C.A., Volumetric Method for Free and Total Glycerin Determination in Biodiesel. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010. 49(19): p. 8935-8941.
- [59]. SCHÄFER, U., Manganese, in *Elements and Their Compounds in the Environment*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p. 901-930.
- [60]. SOLDIN, O.P., ASCHNER, M., Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: Potential links. *Neurotoxicology*, 2007. 28(5): p. 951-956.
- [61]. GÜMGÜM, B., ÜNLÜ, E., TEZ, Z., GÜLSÜN, Z., Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris River in Turkey. *Chemosphere*, 1994. 29(1): p. 111-116.
- [62]. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução no 357/2005, disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>, acesso em 20/08/2011.
- [63]. LIANG, P., SANG, H., SUN, Z., Cloud point extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry determination of manganese(II) and iron(III) in water samples. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006. 304(2): p. 486-490.

- [64]. VAN STADEN, J.F., MULAUDZI, L.V., STEFAN, R.I., Speciation of Mn(II) and Mn(VII) by on-line spectrophotometric sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2003. 499(1-2): p. 129-137.
- [65]. BAYTAK, S., TÜRKER, A.R., The use of *Agrobacterium tumefaciens* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent for the column preconcentration of iron(III), cobalt(II), manganese(II) and chromium(III). *Talanta*, 2005. 65(4): p. 938-945.
- [66]. MARCZENKO, Z., BALCERZAK, M., Separation, preconcentration, and spectrophotometry in inorganic analysis. Elsevier, Amsterdam, 2001. p. 253.
- [67]. CHISWELL, B., RAUCHLE, G., PASCOE, M., Spectrophotometric methods for the determination of manganese. *Talanta*, 1990. 37(2): p. 237-259.
- [68]. HARRIS, D.C., *Análise química quantitativa*, 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. p. 256:
- [69]. YOSHINO, Y., KOJIMA, M., TSUNODA, Y., OUCHI, A., Manganese (III) complexes with ethylenediaminetetraacetic acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 1962. 40(4): p. 775-783.
- [70]. BOONE, D.J., HUNT, J.P., HAMM, R.E., Stoichiometry and kinetics of electron-transfer reactions between vanadium(IV) and manganese(III) complexes of trans-1,2-diaminocyclohexanetetraacetic acid (CYDTA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in acid solution. *Inorganic Chemistry*, 1972. 11(5): p. 1060-1064.
- [71]. VAN STADEN, J.F., KLUEVER, L.G., Determination of manganese in natural water and effluent streams using a solid-phase lead(IV) dioxide reactor in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 1997. 350(1-2): p. 15-20.
- [72]. SCHROEDER, K.A., HAMM, R.E., Decomposition of the ethylenediaminetetraacetate complex of manganese(III). *Inorganic Chemistry*, 1964. 3(3): p. 391-395.
- [73]. RÍOS, A., DE CASTRO, M.D.L., VALCÁRCEL, M., Spectrophotometric determination of acidity-constants of unstable compounds by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1985. 171: p. 303-312.

- [74]. MELCHERT, W.R., ROCHA, F.R.P., An improved procedure for flow-based turbidimetric sulphate determination based on a liquid core waveguide and pulsed flows. *Analytica Chimica Acta*, 2008. 616(1): p. 56-62.
- [75]. ROCHA, F.R.P., TEIXEIRA, L.S.G., Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, 2004. 27: p. 807-812.
- [76]. WEI, L., FUJIWARA, K., FUWA, K., Determination of phosphorus in natural waters by long-capillary-cell absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1983. 55(6): p. 951-955.
- [77]. DALLAS, T., DASGUPTA, P.K., Light at the end of the tunnel: recent analytical applications of liquid-core waveguides. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004. 23(5): p. 385-392.
- [78]. GIMBERT, L.J., WORSFOLD, P.J., Environmental applications of liquid-waveguide-capillary cells coupled with spectroscopic detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007. 26(9): p. 914-930.
- [79]. WATERBURY, R.D., YAO, W., BYRNE, R.H., Long pathlength absorbance spectroscopy: trace analysis of Fe(II) using a 4.5m liquid core waveguide. *Analytica Chimica Acta*, 1997. 357(1): p. 99-102.
- [80]. BYRNE, R.H., YAO, W., KALTENBACHER, E., WATERBURY, R.D., Construction of a compact spectrofluorometer/spectrophotometer system using a flexible liquid core waveguide. *Talanta*, 2000. 50(6): p. 1307-1312.
- [81]. BONIFÁCIO, V.G., SALAMI, F.H., MARCOLINO-JUNIOR, L.H., FATIBELLO-FILHO, O., Use of Barium Chloranilate Solid-Phase Reactor for the Determination of Sulfate in Natural Water Samples Exploiting Long Pathlength Spectrophotometry and Multicommutation. *Analytical Letters*, 2011. 44(1-3): p. 298-309.
- [82]. INFANTE, C.M.C., ROCHA, F.R.P., A critical evaluation of a long pathlength cell for flow-based spectrophotometric measurements. *Microchemical Journal*, 2008. 90(1): p. 19-25.
- [83]. RODENAS-TORRALBA, E., ROCHA, F.R.P., REIS, B.F., MORALES-RUBIO, A., DE LA GUARDIA, M., Evaluation of a multicommutated flow system for photometric

environmental measurements. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*, 2006. p. 1-9.

[84]. CREED, J.T., MARTIN, T.D., O'DELL, J.W. Determination of trace of elements by stabilized temperature graphite furnace atomic absorption, U.S. Environmental Protection Agency, disponível em http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/reg_determine1.cfm, acesso em 22/08/2011.

[85]. PINHEIRO, H.L.C., ANDRADE, M.V., PEREIRA, P.A.P., ANDRADE, J.B., Spectrofluorimetric determination of formaldehyde in air after collection onto silica cartridges coated with Fluoral P. *Microchemical Journal*, 2004. 78(1): p. 15-20.

[86]. ZHANG, Z.Q., TANG, Y., Solid-phase reactor flow-injection on-line oxidizing spectrofluorimetry for determination and dissolution studies of folic acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005. 381(4): p. 932-936.

[87]. SILVA, S.G., ROCHA, F.R.P., A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel. *Talanta*, 2010. 83(2): p. 559-564.

[88]. HEM, J.D., Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water. University Press of the Pacific. 2005, p. 7-9.

[89]. BOBBITT, J.M., Periodate Oxidation of Carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. 1956. p. 1-41.

[90]. HARTMAN, L., Rapid determination of glycerol by the potassium periodate method. *Journal of Applied Chemistry*, 1953. 3(7): p. 308-311.

[91]. WHITE, D.A., MIYADA, D. S., NAKAMURA, R.M., Characterization of the Periodate Oxidation of Glycerol and Related Compounds, and Application toward Determination of Serum Triglyceride Concentrations. *Clinical Chemistry*, 1974. 20(6): p. 645-648.

[92]. ZAGATTO, E.A.G., MATTOS, I.L., JACINTHO, A.O., Determination of sucrose in sugar-cane juice and molasses by flow-injection spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 1988. 204: p. 259-270.

- [93]. STECHER, P.G., The Merck index, Merck& CO, New Jersey, 1960. p. 10.
- [94]. ROCHA, F.R.P., NÓBREGA, J.A., Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, 1996. 19: p. 636 - 640.
- [95]. SANTOS, J.L.M., RIBEIRO, M.F.T., LIMA, J.L.F.C., DIAS, A.C.B., ZAGATTO, E.A.G., Multipumping flow systems: an alternative approach to sample handling in spectroscopy measurements. *Spectroscopy Letters*, 2007. 40(1): p. 41-50.
- [96]. FOGLIA, T.A., JONES, K.C., NUNEZ, A., PHILLIPS, J.G., MITTELBAACH, M., Comparison of chromatographic methods for the determination of bound glycerol in biodiesel. *Chromatographia*, 2004. 60(5-6): p. 305-311.
- [97]. HAJEK, M., SKOPAL, F., MACHEK, J., Determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006. 108(8): p. 666-669.
- [98]. CHAVES, E.S., LEPRI, F.G., SILVA, J.S.A., QUADROS, D.P.C., SAINT'PIERRE, T.D., CURTIUS, A.J., Determination of Co, Cu, Fe, Mn, Ni and V in diesel and biodiesel samples by ETV-ICP-MS. *Journal of Environmental Monitoring*, 2008. 10(10): p. 1211-1216.
- [99]. SOUSA, E.T., OLIVEIRA, F.S.D., ALVES, A.C., ANDRADE, J.B.D., A semi-continuous analyzer for the fluorimetric determination of atmospheric formaldehyde. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2009. 20: p. 259-265.
- [100]. SRITHARATHIKHUN, P., OSHIMA, M., MOTOMIZU, S., On-line collection/concentration of trace amounts of formaldehyde in air with chromatomembrane cell and its sensitive determination by flow injection technique coupled with spectrophotometric and fluorometric detection. *Talanta*, 2005. 67(5): p. 1014-1022.
- [101]. 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011. 401(1): p. 365-371.
- [102]. MARTELLI, P.B., REIS, B.F., KRONKA, E.A.M., BERGAMIN-FILHO, H., KORN, M., ZAGATTO, E.A.G., LIMA, J.L.F.C., ARAUJO, A.N., Multicommutation in flow-analysis 2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys. *Analytica Chimica Acta*, 1995. 308(1-3): p. 397-405.

- [103]. FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H., Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001. 92(5): p. 405-416.
- [104]. RUIZ-JIMÉNEZ, J., LUQUE DE CASTRO, M.D., Flow injection manifolds for liquid-liquid extraction without phase separation assisted by ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, 2003. 489(1): p. 1-11.
- [105]. FASSEL, V.A., International Union of Pure and Applied Chemistry. Analytical Chemistry Division. Commission on Spectrochemical and Other Optical Procedures for Analysis. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis. II. Data interpretation. (Rules approved 1975). *Analytical Chemistry*, 1976. 48(14): p. 2294-2294.
- [106]. BROWN, A.J., FRANCIS, P.S., ADCOCK, J.L., LIM, K.F., BARNETT, N.W., Manganese(III) and manganese(IV) as chemiluminescence reagents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2008. 624(2): p. 175-183.
- [107]. SCHOTHORST, R.C., SCHMITZ, O.O., DEN BOEF, G., The application of strongly oxidizing agents in flow injection analysis : Part 2. Manganese(III). *Analytica Chimica Acta*, 1986. 179: p. 299-305.
- [108]. HAMM, R.E., SUWYN, M.A., Preparation and characterization of some aminopolycarboxylate complexes of manganese(III). *Inorganic Chemistry*, 1967. 6(1): p. 139-142.
- [109]. FERES, M.A., FORTES, P.R., ZAGATTO, E.A.G., SANTOS, J.L.M., LIMA, J.L.F.C., Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications. *Analytica Chimica Acta*, 2008. 618(1): p. 1-17.
- [110]. KLEWICKI, J.K., MORGAN, J.J., Kinetic behavior of Mn(III) complexes of pyrophosphate, EDTA, and citrate. *Environmental Science & Technology*, 1998. 32(19): p. 2916-2922.
- [111]. HARRIS, D.C., *Análise química quantitativa*, LTC, Rio de Janeiro, p.789. 2005.
- [112]. LIMA, J.L.F.C., SANTOS, J.L.M., DIAS, A.C.B., RIBEIRO, M.F.T., ZAGATTO, E.A.G., Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta*, 2004. 64(5): p. 1091-1098.

- [113]. SAINTPIERRE, T.D., DE QUEIROZ, R.R.U., DE SOUZA, I.G., NETO, J.A.G., Spectrophotometric determination of manganese in steels by on-line electrochemical oxidation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 1998. 9(2): p. 145-150.
- [114]. Environmental Protection Agency, disponível em: <<http://water.epa.gov>>, acesso em 24/08/2011.
- [115]. SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R., Fundamentos de Química Analítica. 2005, 5º ed. São Paulo: Thomson Learning. Tradutores: Caracelli, I; Isolani, P.C.; Santos, R.H.A.; Francisco, R.H.P.
- [116]. KARGOSHA, K., NOROOZIFAR, M., Solid-phase sodium bismuthate as an oxidant in flow-injection analysis: determination of manganese in effluent streams. *Analytica Chimica Acta*, 2000. 413(1-2): p. 57-61.
- [117]. MANIASSO, N., ZAGATTO, E.A.G., Flow-injection spectrophotometric catalytic determination of manganese in plants exploiting the aerial oxidation of diphenyl carbazone. *Analytica Chimica Acta*, 1998. 366(1-3): p. 87-92.
- [118]. NAKANO, S., MATUMOTO, Y., YOSHII, M., Flow-injection photometric determination of manganese(II) based on its catalysis of the periodate oxidation of N,N'-bis(2-hydroxy-3-sulfopropyl)tolidine. *Talanta*, 2005. 68(2): p. 312-317.
- [119]. SILVA, S.G., NÓBREGA, J.A., ROCHA, F.R.P., Exploiting Mn(III)/EDTA complex in a flow system with solenoid micro-pumps coupled to long pathlength spectrophotometry for fast manganese determination. *Microchemical Journal*, 2011. 98(1): p. 109-114.
- [120]. SMIDERLE, M., REIS, B.F., ROCHA, F.R.P., Monosegmented flow system exploiting multicommutation applied to spectrophotometric determination of manganese in soybean digests. *Analytica Chimica Acta*, 1999. 386(1-2): p. 129-135.
- [121]. CHEN, H., WEI, D.B., AN, T.C., FANG, Y.J., The determination of manganese(II) in water by reversed flow-injection spectrophotometry. *Analytical Letters*, 1999. 32(4): p. 787-797.