Felisberto Gonçalves Santos Junior

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA VERSÃO DO INJETOR COMUTADOR
AUTOMÁTICO: DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE ETANOL EM BEBIDAS
DESTILADAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

São Carlos
2012

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao
Usuário do SBI/IQSC*

Santos Junior, Felisberto Gonçalves

Desenvolvimento de uma nova versão do injetor comutador automático:
determinação fotométrica de etanol em bebidas destiladas. / Felisberto
Gonçalves Santos Junior. -- São Carlos, 2012.

75 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2012.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

1. Análise por injeção em fluxo. 2. Injetor comutador automático.
3. Etanol. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

“A vontade de se preparar precisa ser maior que a vontade de vencer.”

BOB KNIGHT

“Superação é ter a humildade de aprender com o passado, não se conformar com o presente e desafiar o futuro.”

HUGO BETHLEM

Dedico

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais, Maria Osmunda, mulher forte e guerreira que com todas as dificuldades sempre esteve a meu lado incentivando, agradeço pela força e por acreditar em mim. Meu pai Felisberto pelo apoio a tudo que eu embarco obrigado pela força e por acreditar em mim. Aos meus amados e queridos irmãos Jardel e Jadson meu muito obrigado pela força e apoio sempre.

Amo vocês!

Dedico

A Deus

TEMPO PARA TUDO

Tudo neste mundo tem seu tempo;

cada coisa tem sua ocasião.

Há um tempo de nascer e tempo de morrer;

tempo de plantar e tempo de arrancar;

tempo de matar e tempo de curar;

tempo de derrubar e tempo de construir;

Há tempo de ficar triste e tempo de se alegrar;

tempo de chorar e tempo de dançar;

tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las;

tempo de abraçar e tempo de afastar;

Há tempo de procurar e tempo de perder;

tempo de economizar e tempo de desperdiçar;

tempo de rasgar e tempo de remendar;

tempo de ficar calado e tempo de falar.

Há tempo de amar e tempo de odiar

tempo de guerra e tempo de paz.

Eclesiaste 3, 1-8

Agradecimentos

Agradeço ao professor Boaventura por ter se disponibilizado a me receber e orientar agradeço pelos ensinamentos não só acadêmicos mais também para vida. Seus ensinamentos são um exemplo para minha carreira. Meu muito obrigado.

À professora da iniciação científica Elizabeth querida Beth, pela amizade, força, por acreditar que eu poderia chegar mais longe, mais que uma orientadora, uma amiga, sempre ensinando, incentivando. Não tenho nem palavras para agradecer, meu muito obrigado.

A todos os meus familiares, primos, tios, tias, padrinho e madrinha. Obrigado pelas orações e força.

À minha queria avó Francisca (in memorian) sempre rezando por mim não pode ver até onde cheguei mais onde que esteja está sempre olhando por mim.

As minhas queridas cunhadas Fabiana e Railane.

A todos os amigos de Imperatriz que estão sempre na torcida.

As queridas Andréia, Tuanne e Alessandra, agradeço pela força que me deram na minha chegada a Piracicaba por ter me acolhido em sua casa. Meu eterno agradecimento. Ao Jeová pela força. Nosso convívio diário, nossas conversas desabafos angústias, desejos e momentos de descontração. Momentos que ficaram para sempre. Obrigado a todos!

A todos os colegas do grupo Gláucia, Carla, Mário Feres, Marcos Brasil. Pelos bons momentos de conversas científicas e descontração.

À técnica do laboratório Sheila Roberta pelo apoio, sempre disposta a ajudar, meu muito obrigado.

*Aos professores do Cena Fábio Rocha, Elias Zagatto, Francisco Krug, Maria
Fernanda, José Santista.*

*Aos amigos que aqui fiz durante esse período, Diogo, Alex, Milton “Japa”,
Claudinéia, Taciana, Ana Clara, Maria Amália, Rejane, Lidiane, Gabriel,
Marquinhos, Dário, Otávio, Andressa, Carina. Pelos bons momentos de
descontração no café.*

Aos técnicos do Cena (Fátima, Tatinha, Milão).

*Ao Cena, em especial ao Laboratório de Química Analítica Henrique Bergamin
Filho por ter disponibilizado toda infraestrutura e materiais indispensáveis para
realização desde trabalho.*

*Ao Geraldo por ter contribuído com a arte das figuras para realização deste
trabalho.*

*A toda a estrutura do Instituto de Química de São Carlos. Ao programa de Pós-
graduação em Química.*

*Ao pessoal da secretaria Silvia, Andrea e Gustavo pela atenção e por estarem
sempre prontos a ajudar.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela
concessão da bolsa.*

Muito obrigado a todos!

Resumo

Neste trabalho, apresentamos uma nova versão do injetor comutador, baseada na geometria retangular, mantendo a configuração de três peças, sendo a central móvel e as laterais fixas. Nesta condição, os parafusos de ajuste não funcionam como guia, tal como ocorre nos injetores da primeira geração. Este *design* facilita o deslocamento da parte móvel, contribuindo para a redução do atrito, o que permite o emprego de um pequeno motor de corrente contínua (12 V; 0,4 A), o qual foi usado para fazer o deslocamento da barra central da posição de amostragem para a de injeção e vice-versa. O funcionamento do injetor foi controlado pelo computador, usando apenas 2 bits de controle. A interface de controle projetada para esse fim, inclui a condição de reversão da direção de rotação do motor e lógica anti-duplicidade, então se os dois bits forem ativados ao mesmo tempo, a rotação do motor é mantida no sentido horário. Para testar a viabilidade deste injetor, o mesmo foi empregado para desenvolver um procedimento para determinação de etanol em bebidas destiladas. O procedimento fotométrico foi baseado na reação de etanol com dicromato de potássio. A detecção fotométrica foi realizada empregando um fotômetro de LED com máximo de emissão em 590 nm. O módulo de análise constituído pelo injetor e um conjunto de válvulas solenoide foi projetado para implementar o processo de reamostragem, adição intermitente de reagentes e transporte da zona de amostra com fluxo de ar. Após a definição das variáveis de controle, o sistema apresentou bom desempenho analítico, aliando vantagens tais como, boa velocidade, simplicidade de operação, versatilidade, proporcionando também um menor consumo de amostra e reagentes. Com relação às características analíticas, o sistema proposto apresentou faixa de resposta linear ($r = 0,9972$) para concentração etanol entre 10 – 50 % (v/v), limite de detecção de 2,0 % (v/v) etanol, desvio padrão relativo de 2,0 % ($n = 10$) para uma amostra de etanol com concentração 40 % (v/v), um consumo de dicromato de 0,012 g por determinação e uma frequência analítica de 34 determinações por hora.

Palavras chave: Análise por injeção em fluxo, injetor comutador automático, etanol.

Abstract

We present a new version of the commutator injector, based on the rectangular geometry, maintaining the three parts configuration with the central mobile and fixed side. In this condition, the adjusting screws do not function as a guide, as occurs in the injector of first generation. This design facilitates the displacement of the movable part and contributes in reducing the friction, thus allowing the use of a small direct current motor (12 V, 0.4 A), which was used to perform the displacement of the central bar from the sampling position to the injection and vice-versa. The injector operation was controlled by a computer, which was done using only two control bits. The control interface designed for this purpose includes the condition for reversing the direction of the motor rotation and anti-duplication logic, so that both bits were activated at the same time, the motor rotation was maintained at clockwise direction. To test the feasibility of the injector, it was used to develop a procedure for determination of ethanol in spirit beverage. The procedure was based on the photometric reaction of ethanol with potassium dichromate. The photometric detection was performed using a LED based photometer with maximum of emission at 590 nm. The analytical module comprising the injector and a set of solenoid valves, was designed to implement the zone sampling process and Intermittent addition of reagents and sample zone displacement using an air stream. After definition of control variables, the system shown good analytical performance, combining advantages such as speed, simplicity of operation, versatility and also providing lower consumption of sample and reagents. With respect to analytical characteristics, the proposed system presented linear response range ($r = 0.9972$) between ethanol concentration to 10 - 50% (v/v), a detection limit of 2.0% (v/v) ethanol, relative standard deviation of 2.0% ($n = 10$) for a sample with an ethanol concentration of 40% (w/v), a dichromate consumption of 0.012 g by determination and a sampling rate of 34 determination per hour.

Keywords: Flow injection analysis, automatic injector commutator, ethanol.

Lista de figuras

Figura 1 – Representação gráfica de um módulo de análise	15
Figura 2 – Vista do injetor para uso com seringa e agulha.....	16
Figura 3 – Vista em corte do injetor para uso de seringa sem agulha.....	17
Figura 4 – Diagrama de fluxo com um injetor <i>rotary valve</i> na posição de amostragem.....	18
Figura 5 – Injetor comutador de geometria retangular.....	19
Figura 6 – Vista do injetor de barra deslizante em três dimensões	20
Figura 7 – Injetor comutador de geometria circular.....	20
Figura 8 – Diagrama de fluxo de um sistema híbrido de injeção	22
Figura 9 – Representação da mudança de fluxo no momento do acionamento de uma válvula solenoide de três vias.....	24
Figura 10 – Representação do processo de multicomutação e amostragem binária.....	25
Figura 11 – Registro do sinal para reamostragem.....	28
Figura 12 – Diagrama de fluxo para implementação do processo de reamostragem.....	29
Figura 13 – Vista superior do injetor comutador proposto.....	41
Figura 14 – Diagrama da interface de controle.....	42
Figura 15 – Diagrama de controle do motor.....	43
Figura 16 – Diagrama do fotômetro e acoplamento à cela de fluxo.....	44
Figura 17 – Diagrama de fluxo do sistema proposto.....	46
Figura 18 – Efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (5, 8 e 10 s)	51

Figura 19 – Efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (12, 14, 15 e 16 s).....	52
Figura 20 – Influência do número de ciclos de reamostragem na zona da amostra.....	54
Figura 21 – Estudo da concentração da solução de dicromato de potássio (0,05 e 0,1 mol L ⁻¹).....	55
Figura 22 – Estudo da concentração da solução de dicromato de potássio (0,2 e 0,3 mol L ⁻¹).....	56
Figura 23 – Estudo da concentração da solução transportadora.....	57
Figura 24 – Sinais transientes obtidos variando-se o tempo de diluição da amostra com uma bobina de 20 cm.....	58
Figura 25 – Sinais transientes obtidos variando-se o tempo de diluição da amostra com uma bobina de 30 cm.....	59
Figura 26 – Sinais transientes obtidos variando-se o tempo de diluição da amostra com uma bobina de 40 cm.....	60
Figura 27 – Curvas analíticas do estudo da bobina de dispersão.....	61
Figura 28 – Curva analítica obtida com os parâmetros otimizados.....	62

Lista de tabelas

Tabela 1 – Teor alcoólico de algumas bebidas destiladas.....	31
Tabela 2 – Sequência de acionamento das válvulas solenoide.....	48
Tabela 3 – Características analíticas do efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (5, 8 e 10 s).....	51
Tabela 4 – Características analíticas do efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (12, 14, 15 e 16 s).....	53
Tabela 5 – Características analíticas da solução de dicromato de potássio (0,2 e 0,3 mol L ⁻¹).....	56
Tabela 6 – Características analíticas do estudo da concentração da solução transportadora.....	57
Tabela 7 – Características analíticas referentes ao estudo da bobina de dispersão.....	61
Tabela 8 – Valores experimentais obtidos após a otimização do sistema proposto.....	62
Tabela 9 – Características analíticas obtida com os parâmetros otimizados.....	63
Tabela 10 – Resultados obtidos na determinação de etanol em bebidas destiladas.....	64
Tabela 11 – Resultados obtidos na determinação de etanol em bebidas destiladas utilizando os valores declarados no rótulo.....	64
Tabela 12 – Comparação das características dos procedimentos.....	65

Sumário

1	Introdução.....	14
1.1	Sistema de análise por injeção em fluxo.....	14
1.2	Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise em fluxo.....	16
1.3	Sistemas híbridos em análise em fluxo.....	21
1.4	Multicomutação em análise em fluxo.....	23
1.5	Sistema para diluição em linha.....	27
1.6	Etanol.....	29
1.7	Bebidas destiladas.....	31
1.8	Métodos para determinação de etanol em bebidas destiladas.....	32
1.9	Determinação de etanol e análise em fluxo.....	33
1.10	LED e fotometria.....	34
1.11	Análise em fluxo e química verde.....	35
2	Objetivo.....	37
3	Parte experimental.....	39
3.1	Reagentes e soluções.....	39
3.2	Equipamentos e acessórios.....	39
3.3	Desenvolvimento de uma nova versão do injetor comutador automático.....	40
3.4	Descrição do funcionamento dos equipamentos desenvolvidos.....	41
3.5	Metodologia.....	45
3.6	Descrição do módulo de análise e desenvolvimento experimental.....	45
4	Resultados e discussão.....	50
4.1	Estudo do efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra.....	50
4.2	Estudo de ciclos de adição do reagente.....	53
4.3	Estudo da concentração do reagente.....	54
4.4	Estudo da solução transportadora.....	56
4.5	Estudo da bobina de dispersão na reamostragem.....	58
4.6	Determinação de etanol em bebidas destiladas.....	63
5	Conclusão.....	67
	Referências.....	69

Introdução

1 Introdução

1.1 Sistema de análise por injeção em fluxo

Os sistemas de análise por injeção em fluxo, *Flow Injection Analysis*, (FIA) têm sido utilizados para a mecanização/automação de procedimentos analíticos. Empregando esse processo, praticamente todas as etapas de uma análise química, incluindo amostragem, separação, diluições, pré-concentrações, adição de reagentes, etc, podem ser executadas. Os sistemas de análise por injeção em fluxo apresentam grande potencialidade para a determinação de parâmetros físico-químicos, tais como coeficientes de difusão, viscosidades, capacidade complexante de ligantes, parâmetros cinéticos e estequiometria de reações.¹

A utilização de sistemas de análise por injeção em fluxo teve início com trabalhos desenvolvidos por Ruzicka e Hansen em meados da década de setenta. Podendo ser definida como um processo de automatização, no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em um fluido transportador que a transporta em direção ao detector. Nesses sistemas, alíquotas de amostra e, eventualmente, de reagentes, são inseridas em uma solução que as transporta através do percurso analítico. No decorrer do transporte, a amostra sofre dispersão na solução transportadora, produzindo uma zona de amostra caracterizada pela existência de gradientes de concentração.²

Para a implementação do processo FIA, é necessário um dispositivo para propulsão dos fluídos, sendo mais frequentemente empregada bomba peristáltica, que permite a propulsão à vazão constante. A seleção e a inserção de alíquotas podem ser feitas empregando diversos dispositivos, entre os quais se destaca o injetor proporcional devido à simplicidade e versatilidade.¹

Diversos detectores têm sido empregados associados ao processo FIA e, geralmente, são necessárias apenas pequenas modificações nos equipamentos convencionais. Completam o sistema, tubos de pequeno diâmetro (em geral 0,5 a 0,8 mm), nos quais se processa a dispersão da amostra e as reações químicas. A Figura 1 representa o que se chama de módulo de análise, onde se apresentam todos os componentes para um sistema de análise em fluxo.

Figura 1 – Representação gráfica de um módulo de análise. Bp= bomba peristáltica; A= amostra; L= alça de amostragem; D= descarte dos fluidos; R= solução do reagente; I= injetor (as três barras retangulares); B= bobina de reação; Det= detector. As linhas tracejadas no injetor indicam passagens internas. Na configuração *a*, o injetor está na posição de amostragem e na configuração *b* está na posição de injeção.

Fonte: REIS, B. F. Análise química em fluxo: princípios e aplicações. Piracicaba: Laboratório de Química Analítica, CENA/USP, 1998. 117 p.

Nos sistemas de análise em fluxo, a detecção é realizada com a zona da amostra em movimento e, em geral, a reação não se completa previamente à detecção. A vazão, o comprimento do percurso analítico e o volume da amostra devem ser definidos considerando-se a dispersão e o tempo de residência necessário para a ocorrência da reação química. Durante o processamento de um lote de amostra, estes parâmetros são mantidos constantes, permitindo a obtenção de resultados que apresentam uma boa repetibilidade.¹⁻⁴

A análise por injeção em fluxo apresenta excelente capacidade analítica no que se refere à rapidez e a precisão, possibilitando maior taxa de determinação, isto é, maior frequência analítica, menor gasto de reagentes e diminuição de interferência. É importante salientar que o sistema FIA permite acoplar ao percurso

analítico, dispositivos para filtração, extração, separação de fase gasosa, diluição, etc., para atender aos requisitos dos procedimentos analíticos.²

1.2 Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise em fluxo

Desde a proposta inicial apresentada por Ruzicka e Hansen em 1975, o processo de análise química por injeção em fluxo sempre esteve relacionado ao meio empregado para introduzir a amostra no módulo de análise. Essa evolução está, em parte, ligada àquela dos dispositivos empregados para inserir a amostra no módulo de análise.

Nos primeiros trabalhos, uma alíquota da amostra a ser analisada era inserida no percurso analítico com uma seringa hipodérmica. O injetor para uso com seringa de agulha, Figura 2 era formado por duas placas de acrílico fixadas entre si com parafuso, um septo de borracha e um orifício para inserir a agulha, onde a amostra era inserida no percurso analítico. Esse injetor tinha uma vida útil muito curta, visto que após algumas injeções o septo de borracha desgastava-se e proporcionava vazamentos.⁵

Figura 2 – Vista do injetor para uso com seringa e agulha. À esquerda vista do injetor em três dimensões e à direita mostra o mesmo em corte. Cs= canal para inserção da agulha da seringa; Pa= placas de acrílico; Cn= canal por onde passa o fluido carregador; Sp= septo de borracha.

Fonte: REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. Química Nova, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.

Essa fragilidade foi superada com a invenção do injetor que dispensava o uso de agulha.⁵ Nesse novo dispositivo, o septo de borracha funcionava como uma válvula, que por pressão externa, cedia, liberando o canal que dava acesso ao percurso analítico, Figura 3. Com esse novo formato os sistemas FIA tornaram-se mais robustos, mas essa nova versão apresentava alguns inconvenientes. A

reprodutibilidade das medidas dependia da precisão e da constância do tempo de inserção das alíquotas da amostra no percurso analítico, o que exigia habilidade do operador.

Figura 3 – Vista em corte do injetor para uso de seringa sem agulha. Cs= encaixe da ponta de seringa; Sp=septo de borracha; Cv= cavidade; Cn= canal por onde passa o fluido carregador da amostra; Cm= canal da válvula pelo qual a amostra alcança o canal do carregador.

Fonte: REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. Química Nova, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.

Os problemas já citados foram superados com a invenção do injetor *rotary valve* por Ruzicka e Hansen,⁵ no qual o volume da alíquota de amostra era definido pelo furo transversal feito no rotor. Para variar o volume da alíquota, era necessário trocar o rotor do injetor, como se observa na Figura 4. As setas indicam a direção de bombeamento dos fluidos. As linhas tracejadas no rotor indicam a posição a ser ocupada pelo canal de amostragem durante a injeção. Durante a amostragem o fluido carregador da amostra Ca é desviado através de Bd, durante a injeção ele passa através do canal Cn. Para isso ocorrer, a impedância hidrodinâmica de Bd tem que ser muito maior do que a do canal Cn.

Figura 4 - Diagrama de fluxo com um injetor *rotary valve* na posição de amostragem. Es= estator; Ro= rotor; Cn= canal de amostragem; Ca= fluido carregador da amostra; A= amostra; R= reagente; D= descarte de fluidos; Bd= bobina de desvio; Br= bobina de reação; Det= detector; x e y= pontos de confluência.

Fonte: REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. Química Nova, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.

O injetor proporcional, também chamado injetor de barra deslizante, desenvolvido por Bergamin *et al*⁶, foi construído com três peças justapostas em forma de sanduíche, sendo que a parte central pode ser deslocada em relação às duas laterais, como mostra a Figura 5. Com o movimento da parte central, comutam-se solidariamente todas as seções de injetor, sendo a comutação feita sempre entre dois estados fixos, onde existe certa limitação na concepção dos diagramas de fluxo. O volume da alíquota de amostra era definido pelo comprimento e diâmetro interno da alça de amostragem. Portanto, para variar o volume de amostra variava-se o comprimento da alça de amostragem. Isso proporcionou grande flexibilidade ao processo, visto que, dependendo das características da amostra, diminuía-se o comprimento da alça de amostragem, sem causar nenhuma perturbação no processo de obtenção da medida.

Figura 5 – Injetor comutador de geometria retangular. a= pivô para alavanca; b= borracha de vedação; c= orifício para encaixe dos tubos e passagem das soluções; p= parafusos para fixação; F= barras fixas; M=parte móvel.

Fonte: TEIXEIRA, M. A. Desenvolvimento de instrumentação e procedimentos automáticos para determinação de arsênio e fluoreto em águas empregando multicomutação em fluxo e detecção fotométrica. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química na agricultura e no ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

O injetor de geometria retangular como mostra a Figura 6, é bastante usado, sendo essa configuração a mais utilizada para o desenvolvimento de procedimentos automáticos. O deslocamento da barra central tem sido feita empregando um par de solenoide ou motor de passo.^{7,5} Nessa configuração os parafusos atravessam a barra central através de canais com 1 cm de comprimento, permitindo que a mesma possa deslizar para frente ou para trás, acionando-se a alavanca.

Figura 6 - Vista do injetor de barra deslizante em três dimensões. Ba= base de apoio; Pl= placas retangulares com faces planas; B= borracha de silicone; M=molas; Pf= parafusos; F= furos para conectar os tubos; P= pivô; Al= alavanca; Pt= ponto de apoio da alavanca.

Fonte: REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. Química Nova, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.

Um injetor proporcional de geometria circular, desenvolvido por pesquisadores do CENA/USP, como mostra a Figura 7, consiste de três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma móvel. A peça central pode ser deslocada em relação às laterais, com movimento para frente e para trás. Com esse movimento o injetor coleta a amostra e a insere no percurso analítico.⁷

Figura 7 – Injetor comutador de geometria circular.

Fonte: REIS, B. F. Análise química em fluxo: princípios e aplicações. Piracicaba: Laboratório de Química Analítica, CENA/USP, 1998. 117 p.

O emprego do injetor *rotary valve* e do injetor proporcional, trouxe como vantagem, maior estabilidade aos sistemas FIA, pois a comutação da posição de amostragem para a posição de injeção e vice-versa, não criava transiente de pressão, outra vantagem observada foi quanto à reprodutibilidade das medidas, que não dependia da habilidade do operador, pois o volume de amostra a ser injetada era definido pelo comprimento da alça de amostragem.⁵

Com a crescente evolução do número de pesquisadores trabalhando com sistemas FIA, surgiram outros dispositivos para inserção da amostra no módulo de análise, sendo mais comuns as válvulas solenoide de três vias. Com a utilização do injetor tradicional a comutação é feita sempre entre dois estados fixos, existindo certa limitação na concepção do módulo de análise. Com as válvulas solenoide de três vias podem ser acionadas em tempos distintos proporcionando uma maior flexibilidade ao sistema. Entretanto, são necessárias três válvulas solenoide de três vias para formar um injetor com uma única seção de injeção, perdendo em densidade para o injetor de barra deslizante.^{3,4}

1.3 Sistemas híbridos em análise em fluxo

Nos primeiros injetores, a comutação era feita manualmente, mas deste que Bergamin *et al* propôs o injetor automático em 1980, a quantidade de trabalhos com o mesmo vem aumentando. A essa nova configuração associou-se as válvulas solenoide de três vias ao injetor automático do tipo barra deslizante, como se pode observar na Figura 8. As válvulas solenoide são dispositivos discretos para inserir amostra e reagente e podem ser acionadas em tempos distintos, podendo então proporcionar uma maior flexibilidade ao módulo de análise. Para implementar esse tipo de sistema é necessário dispor de computador com software para acionamento das válvulas solenoide e deslocamento da parte móvel do injetor.⁵

Figura 8 - Diagrama de fluxo de um sistema híbrido de injeção. V_1 e V_2 = válvulas solenoide de 3 vias; D_L = fluxo diluidor; B_1 , B_2 e B_3 = bobinas de reação. As linhas cheias em V_1 e V_2 indicam o caminho por onde escoam o fluido quando as mesmas não estão ativadas. As linhas tracejadas indicam o caminho seguido durante o acionamento das mesmas. Ca= solução transportadora; A= amostra; D= descarte; x= confluência; Det= detector.

Fonte: REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. Química Nova, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.

REIS e colaboradores empregaram pela primeira vez o injetor automático associado com válvulas solenoide, sendo que o módulo de análise projetado poderia executar os processos de reamostragem, zonas coalescentes e inserção intermitente, sem alterar a estrutura física do mesmo. Estas funções eram definidas por software selecionando as variáveis de controle quando o programa era colocado em funcionamento. A viabilidade do sistema proposto foi demonstrada, automatizando o processo a adição de padrão em espectrofotometria de emissão atômica com plasma induzido ICP OES. Neste caso, o controle do injetor já dispunha de recursos de informática empregando microprocessador e a comutação entre os dois estados de repouso do injetor era feito por um par de solenoide.^{8,9,10}

Martelli *et al* investigaram o emprego de persulfato de potássio imobilizado em resina aniônica AG1-X8, como agente oxidante, na determinação espectrofotométrica de níquel em ligas metálicas e na especiação de Fe (III)/Fe (II) em águas de rio. Utilizou injetor automático onde o movimento da barra central foi realizado por um par de solenoide. Para o controle das válvulas solenoide foi utilizado um software escrito na linguagem Quick basic 4.5.¹¹

Um analisador automático em fluxo monossegmentado foi desenvolvido por RAIMUNDO JUNIOR *et al*, para determinação de glicose, creatinina e uréia em plasma sanguíneo e soro. A barra central do injetor comutador para posição de amostragem e injeção foi ligada a um motor de passo (24 V, 1 A, 7,5° por passo).

Para o controle do motor de passo foi utilizado um software escrito em linguagem Quick basic 4.5.¹²

1.4 Multicomutação em análise em fluxo

O processo de multicomutação em análise em fluxo (MCFA) proposto no início dos anos 90, pode ser considerado uma evolução do processo FIA, pois apresenta características como alta taxa de amostragem, precisão, versatilidade, são mantidas. O módulo de análise é mais versátil, e requer um volume de solução de reagente muito menor. Além disso, mais de uma solução de reagente pode ser manipulada, usando apenas um canal de bombeamento.^{13,14}

A multicomutação apresenta como diferença em relação aos sistemas de análise por injeção em fluxo tradicional, a utilização, como dispositivos de injeção válvulas solenoide. O termo solenoide é associado a dispositivos eletromecânicos em que o deslocamento axial através do núcleo do dispositivo é causado pela ação do campo magnético gerado por uma bobina. Esta propriedade tem sido empregada na construção de muitos dispositivos, como é o caso das válvulas para controle de fluidos. Em particular, as válvulas para baixas vazões (da ordem de mililitros por minutos) e baixas pressões, têm sido amplamente aplicadas em equipamentos e montagens para uso em laboratórios clínicos e químicos.¹⁵

O princípio de acionamento para fechamento e abertura dos canais de fluídos depende do fabricante. Uma tensão de alguns volts é aplicada sobre um solenoide que faz com que um núcleo ferromagnético se desloque, causando a alteração no estado da válvula. O núcleo ferromagnético comprime uma mola que é a responsável por deslocar o núcleo para sua posição original quando a corrente elétrica é interrompida.¹⁵

A análise em fluxo por multicomutação foi proposta por REIS *et al*, podendo ser definido, como um sistema no qual comutadores independentes, controlados por computador, controlam os fluxos de amostra, reagentes e solventes através de tubos interconectados permitindo comutar (redirecionar) os fluxos. O termo comutação na análise em fluxo significa basicamente mudar a direção de um fluxo de solução, interromper por um instante, ou trocar por outra solução. Isso pode ser feito utilizando válvulas solenoide de 3 vias ou de estrangulamento duplo ou único. Com

uma única válvula é possível redirecionar o fluxo de saída ou entrada como se pode observar na Figura 9.^{13,16,17}

Figura 9 – Representação da mudança de fluxo no momento do acionamento de uma válvula solenoide de três vias. A = comutação para saída de fluxo; B= comutação para entrada de fluxo. As linhas pontilhadas indicam o fluxo após a comutação com o acionamento da válvula de três vias.

Fonte: ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, v. 468, p. 119-131, 2002.

As válvulas solenoide apresentam uma grande rapidez de comutação, isto é, tempo de resposta da ordem de 100 ms, o que lhes confere alguma vantagem sobre os demais dispositivos de injeção, tais como injetor comutador¹³ e válvula rotativa.¹³ O procedimento de inserção de amostra e reagente é controlado por um computador usando um software apropriado, deste modo as condições de funcionamento do módulo de análise podem ser alteradas sem mudar sua estrutura física. Com a utilização do processo de multicomutação, um novo conceito de inserção da amostra foi denominado de amostragem binária, que consiste na inserção alternada no percurso analítico de pequenas alíquotas (da ordem de microlitros) de amostra e de reagentes.

A inserção sequencial de uma alíquota de amostra e uma de reagente no percurso analítico é denominada de ciclo de amostragem, conforme ilustrado na Figura 10. Em um módulo de análise baseado no conceito de multicomutação e amostragem binária, têm-se um melhor aproveitamento do tempo, visto que o desenvolvimento da reação ocorre a partir do momento de inserção. A principal vantagem do processo de multicomutação e amostragem binária é a economia de reagente, pois o processo tem como característica a adição discreta da alíquota de cada solução no percurso analítico.^{13,18}

Figura 10 - Representação do processo de multicomutação e amostragem binária. Onde I, II e III representam o número de inserções sequenciais.

Fonte: ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, v. 468, p. 119-131, 2002.

REIS e colaboradores apresentaram na série sobre multicomutação e amostragem binária, o desenvolvimento e a versatilidade da multicomutação. Na parte um dessa série foi proposto um módulo de análise para investigar o processo de amostragem binária, utilizando duas válvulas solenoide de três vias, onde foi estudada a influência do volume na cela de fluxo e da alíquota da amostra e sua influência na magnitude do sinal gerado e o efeito do sistema na dispersão da amostra.

No mesmo trabalho, foi proposto um módulo de análise utilizando três válvulas solenoide de três vias, onde foi investigada a versatilidade e possibilidade da multicomutação para manipular pequenos volumes de soluções de amostra e de reagentes, e a redução no volume de efluente gerado. Explorando essas possibilidades, foi desenvolvido um procedimento para determinação de ferro em amostras vegetais. Os experimentos foram executados utilizando bomba peristáltica para propulsão dos fluidos e um software escrito em linguagem Quick basic para controle das válvulas, da bomba peristáltica e aquisição de dados.¹⁶

MARTELLI *et al*, propuseram a utilização da amostragem binária na determinação espectrofotométrica de níquel, ferro e crômio em ligas metálicas, na qual foram utilizadas quatro válvulas solenoide para determinação de níquel. Cinco válvulas solenoide foram utilizadas para determinação de crômio e ferro, tendo sido demonstrada a possibilidade de determinação sequencial de dois analitos. Ambos utilizaram bomba peristáltica para propulsão dos fluidos e um microcomputador para controle das válvulas.¹⁹

ARAÚJO *et al*, exploraram o processo de “sampling zones”, ou reamostragem, utilizando um único canal analítico e empregando a parada de fluxo (stopped-flow), para determinação espectrofotométrica de creatina em urina. Com a utilização da multicomutação para promover a reamostragem e a parada de fluxo, foi possível discriminar a cor natural das amostras (urina) e efetuar diluição em linha.²⁰

Empregando multicomutação, OLIVEIRA e colaboradores, propuseram um sistema para determinação simultânea de cobre e zinco em plantas, quando foi avaliada a cinética de reação de descomplexação dos íons metálicos. Foram utilizadas cinco válvulas solenoide de três vias que permitiram a divisão da zona de amostra em duas partes, seguindo por percursos analíticos distintos até o detector.²¹

A Multicomutação e análise em fluxo foi empregada por KRONKA *et al*, para determinação sequencial de amônio e ortofosfato em digeridos de plantas. O módulo de análise foi montado com válvulas solenoide de três vias, visando empregar amostragem binária para implementar a determinação sequencial dos analitos.²²

Na parte seis da série, VIEIRA *et al* propuseram um procedimento turbidimétrico para determinação de sulfato em digeridos de plantas, no qual foi utilizado um único canal de bombeamento para manipulação da amostra e das soluções de reagentes.²³ Empregando o processo usual de análise por injeção em fluxo (FIA), seria necessário o uso de 5 canais de bombeamento.²⁴

Essa série de publicações sobre as potencialidades da multicomutação e amostragem binária mostrou a viabilidade da mesma a qual desde então, vem sendo explorada nos mais variados procedimentos analíticos, utilizando diferentes técnicas de detecção. Em uma busca na base de dados ISI web of knowledge, feita em junho de 2012 usando como palavra chave “multicommutated flow analysis ou multicommutation in flow analysis” foi encontrada 201 publicações, ressaltando a viabilidade desta para o desenvolvimento de procedimentos analíticos.

1.5 Sistema para diluição em linha

A dispersão da amostra na solução transportadora é uma característica intrínseca em sistemas de análise por injeção em fluxo. A dispersão da amostra no fluido carregador depende das características físico-químicas das duas soluções, principalmente da viscosidade. O efeito da dispersão sobre a magnitude do sinal analítico depende de parâmetros intrínsecos do módulo de análise como diâmetro interno do percurso analítico, tubo de parede interna lisa ou rugosa; tubo reto ou enrolado em espiral e vazão do transportador. Dentre estes parâmetros, o que apresenta maior influência sobre a dispersão da amostra é a razão entre comprimento (volume) da alça de amostragem e do percurso analítico.^{7,25} Portanto, quando se pretende determinar um analito, cuja concentração é muito baixa, o comprimento da alça de amostragem deve ser igual ou maior que o percurso analítico. Quando as amostras são muito concentradas, deve-se diminuir a razão entre alça de amostragem e o percurso analítico, impondo à amostra uma grande dispersão.²⁵

Quando amostra é muito concentrada, diminui-se o comprimento da alça de amostragem, para situar a concentração da espécie de interesse na faixa operacional do instrumento. O comprimento da alça de amostragem não pode ser diminuído indefinidamente, sendo que nos injetores proporcionais, o menor volume que se consegue estabelecer situa-se em torno de 20 microlitros. Mesmo empregando esse procedimento, ainda sim, esse procedimento pode não ser suficiente para situar a leitura dentro da faixa de operação do instrumento.^{7,25}

Essas dificuldades foram superadas empregando o processo de reamostragem (Sampling Zones).²⁶ Esse processo tornou-se uma importante ferramenta para diluição em linha de amostras concentradas. Imagine-se a possibilidade de remover uma alíquota da zona da amostra antes que esta chegue ao detector, como por exemplo, a alíquota correspondente à faixa S_1 na Figura 11. Injetando essa nova alíquota em outro fluxo transportador haverá dispersão e um sinal com o mesmo perfil do anterior seria registrado.

Figura 11 – Registro do sinal para reamostragem. S_1 , S_2 e S_3 = alíquotas que seriam reamostradas variando o tempo de comutação do injetor; h = altura máxima; A = instante que o injetor é deslocado para posição de inserção.

Fonte: REIS, B. F. *Análise química em fluxo: princípios e aplicações*. Piracicaba: Laboratório de Química Analítica, CENA/USP, 1998. 117 p.

No processo de reamostragem, a espécie de interesse é injetada no fluxo transportador inicial, criando uma zona bem definida que sofre dispersão contínua. Em seguida, uma alíquota é reamostrada e introduzida em um segundo fluxo transportador, na qual se dispersa novamente enquanto é transportada ao detector.²⁷ Isso é equivalente a duas diluições sucessivas, feitas manualmente.⁴

Na Figura 12 é mostrado um módulo de análise para implementação do processo de reamostragem. Nesta configuração, o injetor está na posição de reamostragem e a solução da amostra está sendo transportada da alça de amostragem L_1 pelo primeiro fluido transportador no qual se dispersa enquanto é transportada através da bobina Bd e da alça de reamostragem L_2 . Quando o injetor é comutado para outra posição de repouso após um dado intervalo de tempo, a fração da amostra contida na alça L_2 é inserida no segundo fluido transportador onde se dispersa novamente, enquanto é transportada para o detector. A solução do reagente (R) é adicionada na zona da amostra na confluência x . Após essa confluência, o comportamento é idêntico ao sistema FIA usual. Variando-se o intervalo de tempo de permanência do injetor na posição de reamostragem, diferentes percentuais de diluição podem ser obtidos.

Figura 12 – Diagrama de fluxo para implementação do processo de reamostragem. L_1 = alça de amostragem; L_2 = alça de reamostragem; Bd = bobina de dispersão; B = bobina de reação; R = solução de reagente; X = ponto de confluência; Ca = fluido transportador; D = descarte de soluções; A = solução da amostra; Det= detector.

Fonte: REIS, B. F. Análise química em fluxo: princípios e aplicações. Piracicaba: Laboratório de Química Analítica, CENA/USP, 1998. 117 p.

1.6 Etanol

O etanol, conhecido também por álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), é um líquido incolor, inflamável e de odor característico, miscível em água e outros compostos orgânicos. Quanto às propriedades físicas, apresenta ponto de fusão $-117\text{ }^\circ\text{C}$, ponto de ebulição $78,3\text{ }^\circ\text{C}$ (1 atm), densidade $0,789\text{ g mL}^{-1}$, e totalmente miscível em água.

É o álcool majoritário de todas as bebidas alcoólicas. A síntese do etanol na forma de vinho, pela fermentação dos açúcares do suco de frutas, foi provavelmente a primeira realização no campo da síntese orgânica. Os açúcares obtidos de diversas fontes podem ser usados na preparação de bebidas alcoólicas que muitas vezes vêm de grãos e é essa origem que explica por que etanol é sinônimo de “álcool de grão”.

Normalmente, a fermentação ocorre pela adição de fermento à mistura de açúcares e água. O fermento contém enzimas que promovem uma longa série de

reações que finalmente convertem um açúcar em etanol e dióxido de carbono, como descrita na reação química representada na Equação 1.

A fermentação, por si só, não produz bebidas com um teor de etanol maior que 12-15%, pois em concentrações elevadas as enzimas do fermento são desativadas. Para produzir bebidas com maior teor alcoólico, a solução aquosa deve ser destilada. O conhaque, o uísque, a cachaça e a vodka são produzidos dessa maneira. Os sabores dos vários licores destilados resultam de outros compostos orgânicos que se destilam com álcool e a água.

O etanol é uma matéria industrial importante. A maior parte do álcool etílico usado industrialmente pode ser obtida pela hidratação do eteno, catalisada por ácidos, como exemplificado na reação representada pela Equação 2.

É usado como solvente para vernizes, tintas, perfumes, aromatizantes, solventes em reações químicas, recristalizações, material para linha de síntese, etc. O etanol é hipnótico (induz ao sono), pois diminui a atividade na parte superior do cérebro, apesar de dar a impressão de ser um estimulante. É também tóxico, porém menos tóxico que o metanol.^{27,28}

Os álcoois podem ser oxidados por vários agentes oxidantes. Entre eles se pode destacar o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e o permanganato de potássio (KMnO_4), na presença de ácido sulfúrico (H_2SO_4), formando aldeído acético, como mostra as reações representadas pelas Equações 3 e 4. As reações podem ser monitoradas pela mudança na coloração e pelo odor característico do aldeído formado. O dicromato de potássio é um agente oxidante poderoso. Em meio ácido é reduzido em temperatura ambiente, ao sal de cromo (III) de coloração verde.²⁹

1.7 Bebidas destiladas

Bebida é todo produto industrializado destinado à ingestão humana, em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica. As bebidas destiladas passam pelo o processo de destilação - que é o processo de volatilizar líquidos pelo aquecimento, condensando-os - objetivando especialmente a purificação ou formação de produtos novos por decomposição das frações.³⁰ As bebidas são classificadas em bebidas não alcoólicas e bebidas alcoólicas. Bebida não alcoólica é a bebida com graduação alcoólica até meio por cento em volume, a vinte graus Celsius. A bebida alcoólica é a bebida com graduação alcoólica acima de meio a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius. A graduação alcoólica da bebida é expressa em porcentagem de volume de álcool etílico, a temperatura de vinte graus Celsius como mostra a Tabela 1.^{31,32}

A legislação sobre bebidas é fundamentada em dois Decretos. O Decreto 99.066/90, que regulamenta a Lei 7678/88, dispõe sobre a produção, circulação, comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, ou seja, bebidas que têm como origem a uva ou o vinho em percentuais não inferiores a 50 %. O Decreto 2314/97, que regulamenta a Lei 8918/94, dispõe sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas em geral e as derivadas da uva e do vinho.^{31,32}

Tabela 1 – Teor alcoólico de algumas bebidas destiladas.

Bebidas	Teor alcoólico % (v/v)
Cachaça	38 – 48
Conhaque	38 – 54
Tequila	36 – 54
Uísque	38 – 54
Vodca	36 – 54

Fonte: GOMES, J. C. Legislação de alimentos e bebidas. Viçosa-MG: UFV, 2007. 635 p.

A determinação de etanol é uma das análises mais efetuadas em laboratórios de toxicologia, em análises clínica e forense, com o objetivo de analisar fluidos corporais como sangue, soro, saliva, entre outros; em alimentos e bebidas tanto fermentadas quando destiladas (vinho, cerveja, bebidas destiladas). Por outro lado, a quantificação rápida, precisa e exata de etanol em bebidas é um importante parâmetro para o processo e para o controle de qualidade na indústria alimentícia.

33,34

1.8 Métodos para determinação de etanol em bebidas destiladas

Existem vários métodos analíticos para determinação de etanol em bebidas, tais como: cromatografia a gás e líquida, refratometria, espectrometria e espectroscopia de infravermelho, colorimetria e métodos enzimáticos. O método oficial designado pela AOAC *Association of Official Analytical Chemists* compreende as principais metodologias disponíveis para determinação de álcool por volume em cervejas, vinhos e bebidas destiladas. Esse método consiste na utilização de um picnômetro, método mais comum para determinação de densidade e tem como vantagens a exatidão e a não requisição de padrão, porém, é uma metodologia trabalhosa que requer muito tempo para sua realização.^{36,37,38}

Além dos métodos citados, o método espectrofotométrico é um dos mais utilizado para determinação de etanol. Consiste na oxidação do etanol por dicromato de potássio, no qual a reação pode ser monitorada pela mudança na coloração devido à formação do sulfato de cromo (III). Este método oferece boa capacidade analítica, a análise é mais rápida e menos trabalhosa. Por outro lado, o dicromato de potássio é uma substância cancerígena, além de um poluidor do meio ambiente; devido a este inconveniente é de interesse reduzir a quantidade de dicromato lançado no meio ambiente.³⁹

Os sistemas de análise em fluxo apresentam-se como uma ferramenta para determinar compostos tóxicos, pois trabalha na escala de microlitros. As reações ocorrem em tubos fechados, a manipulação de amostras e reagentes é efetuada por um microcomputador, havendo uma mínima intervenção humana, e um menor volume de efluente a ser lançado no ambiente.

1.9 Determinação de etanol e análise em fluxo

O objetivo dessa busca é fornecer uma visão sobre os dispositivos de inserção da amostra para determinação de etanol em bebidas destiladas.

COMITRE *et al*, desenvolveram um procedimento em fluxo explorando a multicomutação e amostragem binária, com a utilização de quatro válvulas solenoide para inserção das amostras e reagentes. O método foi baseado na oxidação do álcool por dicromato de potássio com detecção espectrofotométrica. O procedimento foi utilizado para determinação de álcool em cana de açúcar, whisky e conhaque. Apresentou como resultado 40 determinações por hora, desvio padrão relativo de 1,6% (n=11), numa faixa linear de 10-42,1% (v/v) etanol, consumo de reagente de 5,4 mg de dicromato, gerando 3,3 mL de resíduo.⁴⁰

Um método foi proposto por TIPPARAT *et al*, utilizando como sistema de detecção a espectrofotometria de infravermelho próximo (NIR) na determinação de etanol em bebidas destiladas, onde utilizou-se uma válvula de injeção de seis vias para injeção de amostra e reagente. Apresentou uma faixa linear de 20- 50% (v/v) etanol, obtendo 240 injeções por hora. O procedimento foi validado por comparação usando cromatografia gasosa.⁴¹

CHOENGCHAN e colaboradores desenvolveram uma membrana de difusão a gás para determinação de etanol em destilados, utilizando uma válvula de injeção para inserir os padrões e espectrofotometria UV-Vis como sistema de detecção. Ao contrário das membranas de difusão convencional, essa permite a detecção seletiva de compostos voláteis sem a necessidade de uma membrana hidrofóbica. O procedimento foi baseado na reação de redução do dicromato de potássio com vapor de etanol. Os resultados mostraram que o método proposto foi adequado para amostras de licores, cervejas, vinhos e destilados. O procedimento proposto com essa membrana apresentou um limite de detecção menor se comparado a membranas convencionais.⁴²

VICENTE *et al*, propuseram a utilização de uma membrana tubular PTFE permeável a espécies gasosas, como estratégia de amostragem não invasiva, com aplicação na determinação de etanol em bebidas. Uma sonda com a membrana era imersa na amostra, onde o analito difundia através desta, sendo coletado por uma solução ácida de dicromato de potássio (fluxo aceptor), o qual era reduzido a Cr (III). O sistema apresentou linearidade até a concentração de 50% (v/v) de etanol,

apresentou uma frequência analítica de 30 determinações por hora. Os resultados foram concordantes com os obtidos empregando o método oficial da AOAC (1995).⁴³

Um sistema em fluxo foi desenvolvido para determinação de etanol em destilados e vinhos utilizando permeação através de uma membrana tubular de silicone. O tubo de silicone foi inserido no interior de um tubo de diâmetro maior, uma alíquota da amostra de 500 μL que foi injetada e transportada através do tubo externo em direção ao descarte. Durante a passagem da zona da amostra através do tubo externo, o etanol permeava através do tubo de silicone e o composto formado foi monitorado no comprimento de onda de 600 nm.⁴⁴

FLETCHER, *et al*, determinaram etanol em bebidas destiladas por espectrofotometria, empregando o processo de análise por injeção sequencial (SIA), utilizando uma solução de dicromato 0,20 mol L⁻¹ e uma solução transportadora de ácido sulfúrico 4 mol L⁻¹. O sistema apresentou resposta linear 1- 6% (v/v) etanol, limite de detecção 0,09% (v/v), com rendimento de 19 amostras por hora. Os resultados apresentaram concordância com os valores de etanol declarados no rotulado.⁴⁵

1.10 LED e fotometria

Diodos Emissores de Luz (LED), do inglês *light emitting diode*, são dispositivos que se tornaram disponíveis comercialmente a partir de 1960. Apresentam emissão nas regiões do espectro eletromagnético desde o violeta até o infravermelho próximo. A utilização de LED como fonte de radiação visível, dispensa o emprego de lâmpadas incandescentes (tungstênio), e dispositivos ópticos tais como filtros, lentes e prismas, permite construir fotômetros simples, baratos, duráveis e de pequeno porte.^{45,46}

A utilização de LEDs em fotometria foi proposta em 1978. Apresentam algumas vantagens, tais como simplicidade, robustez e baixo custo. A intensidade da luz emitida por um LED é cerca de 5 vezes maior do que a intensidade de um feixe de radiação após passar por um monocromador. O tempo de vida útil em trabalho contínuo é da ordem 100.000 horas, enquanto que para uma lâmpada de tungstênio varia entre 1000 e 2000 horas. O LED apresenta também baixo consumo de energia e alta estabilidade, o que dispensa a necessidade de circuitos eletrônicos

caros e especiais para controlar a fonte de radiação.^{45,46,47,48} Os fotômetros são usualmente empregados como detectores para cromatografia, eletroforese, imunoensaios ou análise em fluxo contínuo, apresentam alta emissão de energia radiante e, portanto, boa relação sinal ruído e usam circuitos eletrônicos relativamente simples e baratos.^{47,48}

Como detectores da radiação emitida pelos LEDs são comumente utilizados fotodiodos e fototransistores. Os fotodiodos são mais utilizados, pois apresentam menor tempo de resposta e maior faixa de resposta linear para a radiação incidente. Apresentam sensibilidade máxima na faixa de 750 – 900 nm e são, geralmente conectados a amplificadores de sinal, proporcionando um melhor desempenho do mesmo. Além disso, são baratos, compactos e comercialmente viáveis.⁴⁹⁻⁵² Fotômetros construídos com LEDs e fotodiodos tornaram-se equipamentos de uso frequente em laboratórios de Química Analítica, principalmente os que utilizam sistemas de análise em fluxo.

1.11 Análise em fluxo e química verde

A química tem uma grande participação nos dias atuais com os inúmeros produtos necessários à humanidade. A produção química também gera inúmeros inconvenientes, como a formação de produtos tóxicos. Neste cenário, a química apresenta influência decisiva.⁵⁴⁻⁵⁶

A fim de evitar ou minimizar a contaminação do ambiente e do próprio homem expostos a estes produtos em concentrações elevadas, pesquisadores têm buscado, cada vez mais, desenvolver métodos de análise mais limpos. Como por exemplo, elaborar novas sínteses, criar novas ferramentas, que reduzam ou eliminem componentes indesejáveis em uma análise química, como a produção de resíduos, uso de reagentes tóxicos, etc.⁵⁴⁻⁵⁶

A partir da década de 90, surgiu uma nova tendência com intuito de reduzir o impacto ambiental em análises químicas, o que gerou os conceitos denominados como química sustentável, química verde (*Green Chemistry*), química limpa ou química ambientalmente benigna. O conceito de química verde inclui 12 princípios básicos, pode ser definido como “A criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de

substâncias tóxicas”. A partir desse conceito, iniciaram-se pesquisas com o objetivo de desenvolver métodos ambientalmente seguros.⁵⁴⁻⁵⁶

No que se refere aos princípios estabelecidos, o primeiro estabelece que evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou limpá-lo após sua geração. Quanto ao segundo, estabelece que as metodologias analíticas devem ser desenvolvidas para permitirem o monitoramento do processo em tempo real, para controlar a formação de compostos tóxicos. No tocante à prevenção de acidentes, o princípio número 12 cita que as substâncias usadas nos processos químicos, deverão ser escolhidas para minimizar acidentes em potencial, tais como explosões e incêndios.^{56,57}

O processo de análise em fluxo tem potencial para atender os princípios preconizados pela química verde, pois permite a redução do consumo de reagente e menor geração de efluente, diminuindo o impacto ambiental. Além disso, com relação à prevenção de acidentes, na análise em fluxo as reações ocorrem em ambiente fechados, a manipulação pode ser totalmente automatizada, evitando possíveis acidentes.^{58,59}

2 Objetivo

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma nova versão do injetor comutador e desenvolver um procedimento analítico para determinação fotométrica de etanol em bebidas destiladas, visando demonstrar a viabilidade do mesmo. O trabalho tem também como foco, reduzir o consumo de reagentes e reduzir o volume de efluentes gerados.

Parte experimental

3 Parte experimental

3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada com condutividade elétrica menor que $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ e reagentes de grau analítico.

Solução $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de dicromato de potássio (P.A. Merck) ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), foi preparada em meio de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $4,0 \text{ mol L}^{-1}$, dissolvendo 5,8838 g do sólido em 22,0 mL do ácido concentrado. Após a dissolução, o volume foi completado para 100,0 mL com água.

Solução de ácido sulfúrico $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada como transportador foi preparada a partir da diluição da solução concentrada.

Soluções de referência de etanol 0,0 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 % (v/v) foram preparadas diariamente a partir da solução estoque de etanol absoluto 99,9 % (P.A. Merck) usando água como diluente.

As amostras de bebidas destiladas (conhaque, whisk, vodka e cachaça) foram obtidas no comércio local.

3.2 Equipamentos e acessórios

No desenvolvimento do injetor automático e do procedimento analítico para determinação de etanol foram empregados os equipamentos e os acessórios descritos a seguir: uma bomba peristáltica Ismatec IPC8, equipada com tubos de Tygon de diferentes diâmetros internos para bombeamento das soluções; um microcomputador equipado com uma interface eletrônica PCL711 (Advantech) para conversão de sinal analógico para digital e controle do módulo de análise (o software de controle e aquisição de dados foi escrito em linguagem Quick basic 4.5), tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm para construção das bobinas de reação e das linhas de transmissão; placas de acrílico com espessuras de 12 e 25 mm para construção do injetor comutador automático; quatro válvulas solenoide de três vias e uma de estrangulamento duplo; uma fonte de corrente contínua de 12 V estabilizada e capacidade de corrente de 2 A usada para alimentar as válvulas solenoide e o motor do injetor; uma fonte simétrica de -12 V e +12 V (0,5 A) usada para alimentar o fotômetro, construídas no laboratório empregando os reguladores de voltagem

LM317 (positivo) e LM337 (negativo); quatro relés de 12 V e corrente de contato de 10 A; duas chaves do tipo *push boton*; quatro transistores BC547; interface digital de potência baseada no circuito integrado ULN2803; três placas de circuito impresso em fibra de vidro, furação universal tipo ilha para Circuito Integrado; LED de alta intensidade com máximo de emissão em 590 nm; cela de fluxo moldada em vidro boro-silicato; motor de corrente contínua com redutor de velocidade, tensão de trabalho 12 V; intensidade de corrente de 0,4 A; rotação 15 voltas por minuto, torque de 10 N cm⁻¹; parafuso com rosca trapezoidal com passo de 2 mm, diâmetro de 15 mm e comprimento de 5 cm e luva em uma das extremidades para encaixar no eixo do motor; placa de alumínio com 8 cm de largura, 10 cm de altura, 2 cm de espessura e furo no centro com rosca (fêmea) com mesma dimensão de parafuso.

3.3 Desenvolvimento de uma nova versão do injetor comutador automático

Na versão manual, o injetor de geometria cilíndrica é o mais utilizado, enquanto que na versão automática a geometria retangular tem sido mais empregada. Em ambas as geometrias têm sido desenvolvidos injetores com duas ou mais secções de comutação. Em vista da versatilidade e robustez, no Brasil esse injetor é peça indispensável em laboratórios de química analítica dedicados ao desenvolvimento de procedimentos analíticos baseados no processo de análise química por injeção em fluxo (FIA).

Neste trabalho, apresenta-se uma nova versão do injetor comutador, o qual é mostrado na Figura 13. Observa-se que é baseado na geometria retangular, mantendo a configuração de três peças, sendo a central móvel e as laterais fixas. Na parte interna das peças laterais foram usinados canais de 3 mm de profundidade e 12 mm de largura, onde a peça central foi encaixada. Nesta condição, os parafusos de ajuste não funcionam como guia, tal como ocorre nos injetores da primeira geração. Este *design* facilita o deslocamento da parte móvel, contribuindo para a redução do atrito, o que permite o emprego de um pequeno motor de corrente contínua (12 V; 0,4 A), o qual foi usado para fazer o deslocamento da barra central da posição de amostragem para a de injeção e vice-versa.

Figura 13 – Vista superior do injetor comutador proposto. Bs = base de montagem, placa de policarbonato; I = injetor; ml = mola de ajuste de pressão; P = parafusos; a, b e c = tubos de polietileno para entrada e saída de soluções; ch₁ e ch₂ = chaves elétricas com barra deslizante; Pf = parafuso de tração usinado em latão com rosca toroidal e passo de 3 mm; Pt = peça de tração do injetor, usinada em placa com rosca toroidal; Cs = caixa de engrenagens de redução de velocidade; Mt = motor de corrente contínua, 12 V e 0.4 A; e Int = conector da fonte de alimentação.

O funcionamento do injetor foi controlado pelo computador, usando apenas 2 bits de controle. A interface de controle projetada para esse fim inclui a condição de reversão da direção de rotação do motor e lógica anti-duplicidade, que não permite o funcionamento do motor se os dois bits de controle forem ativados ao mesmo tempo. Visando demonstrar a viabilidade desta nova versão do injetor comutador, empregou-se um módulo de análise para desenvolver um procedimento analítico para determinação fotométrica de etanol em destilados (cachaça, conhaque e uísque).

3.4 Descrição do funcionamento dos equipamentos desenvolvidos

A interface do computador (PCL 711S) gera os sinais de controle no padrão TTL (Transistor Transistor Logic), portanto a diferença de potencial gerada para acionar uma válvula solenoide pode estar na faixa de 2,5 a 5 V, sendo que para desligar é menor do que 0,8 V, e, além disso, a intensidade de corrente é de alguns miliampères (mA). As válvulas solenoide usadas necessitam de uma diferença de

potencial de 12 V e intensidade de corrente em torno de 100 mA. Portanto, foi utilizada uma interface externa para fazer a compatibilização da diferença de potencial e intensidade de corrente. O diagrama da interface é mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Diagrama da interface de controle. Os números de 1 a 8 correspondem aos bits de d_0 a d_7 do conector da interface PCL 711S; GND = linha de ligação comum a todos componentes do circuito; $D_1, D_2, D_3, \dots$ e D_8 = diodos emissores de luz (LED); D_{10} e D_{11} = diodos retificadores para intensidade de corrente de 2 A; R_1 a R_8 = resistores de 2,2 k Ω ; ULN2807 = circuito integrado.

Fonte: Interface de controle construída no laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA/USP.

O circuito integrado ULN2807 tem 8 linhas de entrada ($d_0, d_1, \dots, d_7$) e 8 linhas de saída. As linhas de entrada são ativadas com sinal de nível TTL e saída correspondente pode controlar uma diferença de potencial superior a 12 V e uma intensidade de corrente de 0,4 A. Por exemplo, se o computador envia um sinal de controle (5 V) através do bit 0 (linha d_0), internamente o pino 18 é chaveado para terra, permitindo o fechamento do circuito de alimentação da válvula ligada a esse pino. O LED ligado em paralelo com as válvulas acende, permitindo uma visualização de qual válvula está acionada. O princípio de acionamento é o mesmo e aplicam-se as demais linhas de controle.

O injetor desenvolvido neste projeto emprega um motor de corrente contínua para deslocar a barra central da posição de amostragem para a posição de injeção e

vice-versa. O sentido de rotação do motor pode ser selecionado em função da polaridade da diferença de potencial aplicada.

Figura 15 – Diagrama de controle do motor. Mt = motor de corrente contínua; R₁, R₂, R₃ e R₄ = relés; Tr₁, Tr₂ e Tr₃ = transistor; ch₁ e ch₂ = chaves; d₆ e d₇ = diodos.

Fonte: Diagrama de controle do motor construído no laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do CENA/USP.

Na Figura 15 é mostrado o diagrama da interface desenvolvida para permitir a inversão do sentido da rotação, isto é, para a direita (horária) e para a esquerda (anti-horária). Nesta condição, quando o computador envia um sinal de controle através do bit d₆ da interface PCL711S em nível lógico alto ($2,5 < V \leq 5V$), o transistor Tr₂ é ativado, o qual fecha circuito elétrico constituído pelos relés R₁ e R₂. Desta forma o motor gira no sentido horário e desloca a parte central do injetor para a posição de amostragem. Quando o sinal de controle é enviado através do bit d₇, o transistor Tr₁ é ativado, e o circuito constituído pelos relés R₃ e R₄ é fechado. Nesta condição, a corrente elétrica circula através do motor em sentido oposto ao caso anterior, o motor gira no sentido anti-horário e desloca a parte central do injetor para

posição de injeção. O transistor Tr_3 foi instalado para evitar conflito de polaridade, pois o motor é alimentado com uma fonte de polaridade positiva, assim, se os bits d_6 e d_7 forem acidentalmente ativados com nível lógico alto ao mesmo tempo, a fonte de alimentação seria colocada em curto. Então, sempre que o bit d_6 estiver em nível lógico alto, o transistor Tr_3 desabilita o transistor Tr_2 . As chaves ch_1 e ch_2 foram posicionadas nos espaço de deslocamento da barra central do injetor e quando seu deslocamento chega à posição de amostragem, ela pressiona a chave ch_1 , a qual abre o circuito de alimentação do motor, interrompendo seu funcionamento. Quando o motor é ligado para deslocar o injetor para posição de injeção, a chave ch_2 tem função idêntica.

Como sistema para detecção, foi construído um fotômetro usando como fonte de radiação um LED com máximo de emissão em 590 nm e como detector fotodiodo OPT301, o qual contém no mesmo encapsulamento um sistema de amplificação. O sistema de detecção foi acondicionado em uma caixa de madeira para evitar a incidência de luz externa. A cela de fluxo e o fotômetro foram acoplados para formar uma unidade compacta. A Figura 16 é mostrada a montagem final.

Figura 16 - Diagrama do fotômetro e acoplamento à cela de fluxo. T3= transistor; LED = diodo emissor de luz, $\lambda_{max} = 590$ nm; Det= fotodetector OPT301; I_1 e I_2 = feixe de luz emitida pelo LED antes e depois de passar pela cela de fluxo, respectivamente; Tv = tubo de vidro; $d = 1,2$ mm de espessura; $x = 50$ mm de comprimento; Sv= cilindro de vidro; Sd= ponto de selagem; Si = sinal gerado em milivolt.

Fonte: Cella de fluxo construída no Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamin Filho" do CENA/USP.

O feixe de radiação I_1 emitido pelo LED é coletado pelo cilindro de vidro (Sv) e conduzido até a entrada da cela de fluxo. Propaga-se através da cela e emerge na outra extremidade, onde é coletado pelo outro cilindro de vidro (Sv), o qual está alinhado com a janela de observação do fotodetector (Det), permitindo que o feixe de radiação I_2 alcance a unidade de transdução de sinal. Quando há na cela de fluxo uma solução que absorve parte da radiação, a intensidade do feixe I_2 torna-se menor do que a intensidade de I_1 e o detector gera uma diferença de potencial proporcional à variação da intensidade do feixe de radiação. Essa variação de diferença de potencial é usada para calcular a absorbância, permitindo a determinação da concentração da espécie química de interesse.

3.5 Metodologia

Para o desenvolvimento do procedimento analítico para determinação fotométrica de etanol em bebidas destiladas foi selecionado o método baseado na reação do dicromato de potássio em meio ácido,³⁹ como mostra a Equação 3, que é largamente utilizado para determinação espectrofotometria de etanol em bebidas destiladas. A reação ocorre em meio ácido e o composto formado de coloração verde, apresenta máximo de absorção de radiação eletromagnética em torno de 590 nm. No procedimento proposto foi monitorado empregando como fonte de radiação, um LED como fonte de radiação com máximo de emissão em 590 nm.

(3)

3.6 Descrição do módulo de análise e desenvolvimento experimental

Considerando-se as especificidades do método fotométrico selecionado, o módulo de análise, mostrado na Figura 17, foi projetado para promover de forma automática as condições necessárias para o desenvolvimento da reação.

Figura 17 – Diagrama de fluxo do sistema proposto. V_1, V_3 e V_4 = válvulas solenoide de três vias que correspondem às soluções da amostra, solução de ácido sulfúrico e água destilada, respectivamente; V_2 = válvula de estrangulamento duplo corresponde à solução de dicromato de potássio; Pp = bomba peristáltica, I = injetor comutador automático; Br = bobina; Dc = bobina de dispersão; L_2 e L_1 = alça de amostragem e reamostragem respectivamente; Det = detector 590 nm; X = confluência; ar = fluxo de ar; Des₁ e Des₂ = descarte de resíduo; As setas indicam o sentido do fluxo. As linhas tracejadas indicam o sentido de fluxo quando as válvulas são acionadas. As linhas tracejadas no injetor indicam passagens internas.

Na configuração mostrada na Figura 17, o injetor se encontra na posição de amostragem, a válvula V_1 é acionada e a alça L_2 é preenchida com a solução da amostra. As demais válvulas permanecem desligadas e, desse modo, os demais fluídos, incluindo o fluxo de água, a solução do reagente cromogênico e a solução de ácido sulfúrico são direcionados para os respectivos recipientes. Uma vez preenchida a alça de amostragem L_2 , a barra central é movida para posição de injeção. A válvula V_4 é acionada e a amostra é inserida no primeiro transportador (água), no qual ela se dispersa enquanto é transportada através da bobina de dispersão Dc e da alça de reamostragem L_1 . Desse modo, variando-se o tempo de permanência do injetor nessa posição, podem-se conseguir vários níveis de atenuação da leitura. Após um intervalo de tempo previamente definido, o injetor é deslocado de volta para outra posição de repouso. Em seguida, a válvula V_3 é acionada e a alíquota da zona da amostra contida na alça de reamostragem L_1 é

inserida no segundo carregador (ácido sulfúrico), onde se dispersa novamente. Neste momento, a válvula V_2 é acionada e no ponto de confluência X, o reagente R é adicionado. A inserção da solução do reagente pode ser contínua durante um dado intervalo, ou pulsada de forma alternada com a solução de ácido sulfúrico. A inserção pulsada foi selecionada visando minimizar o consumo do reagente e permitir a inserção intercalada das alíquotas de reagente e ácido sulfúrico. Essa condição é fundamental para garantir a acidez do meio, necessária para que ocorra a formação do composto a ser detectado. Foram programados 6 ciclos de inserção do reagente, suficiente para preencher o percurso analítico e a cela de fluxo com a zona da amostra. Durante este evento, a válvula V_1 é acionada para encher a alça L_2 com amostra. Desse modo, quando termina a etapa de leitura, a alça está pronta para a determinação seguinte. Em seguida, todas as válvulas são desligadas onde é efetuada a leitura. A limpeza do percurso analítico é feita por um fluxo bombeado através da válvula V_2 . A sequência de acionamento das válvulas e do injetor encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de acionamento das válvulas solenoide. V_1 , V_2 , V_3 e V_4 = válvulas solenoide de três vias; I = Injetor comutador; Os números 0 e 1 indicam o estado de acionamento das válvulas em, desligada ou ligada, respectivamente.

Etapas	Ação a ser executada	V_1	V_2	V_3	V_4	I	Tempo (s)	Ciclos
1	Encher o canal do reagente	0	1	0	0	0	20	
2	Lavar com solução ácida	0	0	1	0	0	15	
3	Calibrar o fotômetro	0	0	0	0	0		
4	Injetor na posição de injeção S/N	0	0	0	0	0	5	
5	Colocar o branco	0	0	0	0	0		
6	Apagar o LED e pressionar tecla	0	0	0	0	0		
7	Ajustar a leitura para 2000 mV	0	0	0	0	0		
8	Ler sinal de espalhamento S/N	0	0	0	0	0		
9	Variar tempo de diluição S/N	0	0	0	0	0		
10	Variar número de ciclos S/N	0	0	0	0	0		
11	Lavar o canal da amostra	0	0	0	0	0		
12*	Injetor na posição de amostragem	0	0	0	0	1	5	
13	Trocar amostra S/N	0	0	0	0	0		
14	Colocar amostra	1	0	0	0	0	30	
15	Inserir amostra	1	0	0	1	0	10	
16	Injetor na posição de injeção	0	0	0	0	1	5	
17	Diluição da amostra	0	0	0	1	0	14	
18	Esvazar a cela fluxo	0	0	0	0	0	15	
19	Deslocar injetor para posição de amostragem	0	0	0	0	1	5	
20	Amostragem	1	1	1	0	0		6
21	Executar a leitura	0	0	0	0	0	20	
22	Deslocar injetor para posição de injeção	0	0	0	0	1	5	
23	Esvaziar a cela de fluxo	0	0	0	0	0	15	

Etapas 13,14,15,17 e 20 representam a sequência analítica. * Inicia novamente o ciclo.

Resultados e discussão

4 Resultados e discussão

4.1 Estudo do efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra

A concentração de etanol nas amostras de interesse situa-se na faixa de 38 a 45 % (v/v). Experimentos iniciais demonstraram que esta faixa de concentração, excedia a faixa de resposta linear do fotômetro, portanto seria necessário implementar uma etapa de diluição. Em sistemas de análise em fluxo, quando a amostra é muito concentrada, diminui-se o comprimento da alça de amostragem, tendo como efeito o aumento da dispersão da amostra no fluido transportador, e com esse recurso é possível situar a concentração da espécie de interesse na faixa operacional do instrumento. Então, foi estabelecida uma etapa de diluição em linha, utilizando o processo de reamostragem²⁶. Nesse processo, uma alíquota da amostra era inserida na bobina de dispersão e uma fração da amostra dispersa era coletada e inserida no percurso analítico, onde sofria nova dispersão. O efeito obtido equivale a duas diluições sucessivas feitas manualmente.

O módulo de análise proposto (Figura 17) e o software de controle foram projetados para implementar o processo de reamostragem, variando o tempo de permanência do injetor na posição de injeção. Nesta posição, a amostra era deslocada pelo fluxo de água através da bobina D_C e da alça de reamostragem L_1 . Variando o intervalo de tempo do injetor nessa posição, podem-se conseguir vários níveis de atenuação da leitura. Para efetivação desse processo, o injetor era comutado com amostra em movimento através da alça de amostragem L_2 . Em vista disso, a reprodutibilidade das medidas depende da precisão do controle do tempo de comutação e, para atender a essa condição, foi empregado um injetor automático com tempo de comutação controlado por software.

Diante do exposto, foi feito o estudo da diluição da amostra, onde a reamostragem foi realizada empregando vários intervalos de tempo até alcançar uma atenuação adequada do sinal. Os primeiros testes foram feitos estabelecendo os intervalos de tempo de 5,0; 8,0 e 10,0 s, os resultados são mostrados na Figura 18. Analisando estas curvas, observa-se que nos três casos há resposta linear até a concentração de 20 %, com atenuação de sinais, o efeito é pouco significativo e não alcança a faixa de concentração desejada.

Figura 18 – Efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (5, 8 e 10 s). Soluções de etanol 0,0; 10; 20; 30; 40 e 50 % (v/v). Tempo de amostragem =10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura= 20 s; número de ciclos de reamostragem = 6; bobina de diluição= 20 cm.

As características analíticas referentes a cada tempo de diluição mostrada na Figura 18 se encontram na Tabela 3, na qual se observa que o coeficiente de correlação linear melhorou com o aumento do tempo de reamostragem. O mesmo se observa para o limite de detecção, que mostra a necessidade de aumentar o tempo de diluição da amostra.

Tabela 3 – Características analíticas do efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (5, 8 e 10 s).

Tempo de diluição (s)	Curva analítica	R	LD %(v/v)
5	$A = 0,0251c + 0,3754$	0,8809	6,0
8	$A = 0,0248c + 0,3394$	0,8873	1,0
10	$A = 0,0274c + 0,1913$	0,9479	0,8

R= Coeficiente de correlação linear LD = Limite de detecção A=absorbância c=concentração de etanol

Em vista destes resultados, outra série de experimentos foi realizada, empregando os intervalos de tempo de reamostragem de 12,0; 14,0; 15,0 e 16,0 s obtendo os resultados mostrados na Figura 19. Os dados referentes à regressão linear são mostrados na Tabela 4. Considerando-se o coeficiente de regressão linear

como indicativo da diluição desejada, observa-se que melhores respostas foram obtidas com os intervalos de tempo de 14,0 e 15,0 s. Para dar prosseguimento aos estudos de otimização do sistema proposto, foi escolhido o intervalo de tempo de reamostragem de 14 s.

Figura 19 - Efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (12, 14, 15 e 16 s). Soluções de etanol 0,0; 10; 20; 30; 40 e 50 % (v/v). Tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; número de ciclos de reamostragem = 6; bobina de diluição = 20 cm.

Observa-se que o melhor coeficiente angular foi obtido com o tempo de reamostragem de 12 s, o qual está de acordo com o esperado, pois neste caso era selecionada uma alíquota da zona da amostra em região mais concentrada. Entretanto, este parâmetro não tinha importância neste trabalho, tendo em vista que o objetivo era ampliar a faixa de resposta linear. Uma zona de amostra mais concentrada poderia comprometer a linearidade por falta de reagente, ou por extrapolar a faixa de resposta dinâmica do detector. Considerando estes fatos, o intervalo de tempo de reamostragem de 14 s foi escolhido para dar prosseguimento aos estudos de otimização do sistema.

Tabela 4 – Características analíticas do efeito do tempo de reamostragem na diluição da amostra (12, 14, 15 e 16 s).

Tempo de diluição (s)	Curva analítica	R	LD %(v/v)
12	$A = 0,0246c - 0,0156$	0,9897	2,4
14	$A = 0,0185c - 0,0102$	0,9953	3,3
15	$A = 0,0179c - 0,0102$	0,9936	0,1
16	$A = 0,0167c - 0,0101$	0,9867	9,1

R= Coeficiente de correlação linear LD = Limite de detecção A=absorbância c=concentração de etanol

4.2 Estudo do efeito do número de ciclos de adição do reagente

O grau de dispersão da amostra depende, principalmente, dos comprimentos do percurso analítico e da alça de amostragem e isso se reflete na magnitude do sinal gerado pelo detector. No módulo de análise mostrado na Figura 17, o percurso analítico tinha um comprimento de 48 cm, portanto, o volume interno era de 240 μL . Para avaliar o efeito da dispersão da amostra, foi usado o padrão de 30 % (v/v) de etanol, e o número de ciclos de reamostragem aplicados foram variados 2 até 9, e os resultados obtidos são mostrados na Figura 20. Observa-se um aumento do sinal até 6 ciclos de amostragem, mantendo constante para valores maiores. As vazões de bombeamento do transportador (H_2SO_4) nesta etapa e da solução dicromato eram 33 e 17 $\mu\text{L s}^{-1}$, portanto a zona de amostragem tinha um volume de 300 μL . O volume total da cela de fluxo era em torno de 100 μL , portanto o volume do percurso analítico somado ao da cela de fluxo era menor do que o volume da zona da amostra, portanto pode-se dizer que o sistema estava trabalhando na condição de volume infinito. Isso explica porque com volumes maiores não houve ganho de sinal. Este efeito foi confirmado processando um conjunto de padrões de etanol com concentração na faixa de 10 a 50 % (v/v) empregando 5, 6 e 7 ciclos de amostragem. Os coeficientes de correlação linear foram praticamente iguais ($r = 0,997$), os coeficientes angulares obtidos com 5, 6 e 7 ciclos de amostragem foram 0,0166; 0,0188; e 0,0189, respectivamente. Portanto, para dar continuidade ao trabalho escolheu-se 6 ciclos de reamostragem.

Figura 20 – Influência do número de ciclos de reamostragem na zona da amostra. Foi utilizado uma solução de etanol 30 % (v/v). Tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; bobina de diluição = 20 cm.

4.3 Estudo do efeito da concentração do reagente

Para avaliar o efeito da concentração do dicromato de potássio no desenvolvimento da reação foram feitos testes com soluções de 0,05, 0,1, 0,2 e 0,3 mol L⁻¹, cujos resultados são mostrados na Figura 21. Com a concentração de 0,05 mol L⁻¹, não houve geração de sinal até 20 % de etanol, entretanto houve geração de sinal quando a concentração de dicromato foi 0,1 mol L⁻¹. Talvez, o intervalo de tempo de residência da zona da amostra até o detector não tenha sido suficiente.

Figura 21 – Estudo do efeito da concentração da solução de dicromato de potássio (0,05 e 0,1 mol L⁻¹). Soluções de etanol 0,0; 10; 20; 30; 40 e 50 % (v/v). Tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6; bobina de diluição = 20 cm.

Na Figura 22 são mostrados resultados obtidos usando as concentrações de dicromato de 0,2 mol L⁻¹ e 0,3 mol L⁻¹. Observa-se que nos dois casos, obteve-se resposta linear em toda faixa de concentração de etanol, entretanto, o emprego da concentração 0,3 mol L⁻¹ apresentou melhor sensibilidade como mostra a Tabela 5. Tendo em vista que a sensibilidade não era um parâmetro importante neste procedimento, optou-se pela concentração de 0,2 mol L⁻¹, visando minimizar o consumo de reagente. O uso de concentrações maiores que 0,2 mol L⁻¹, ocasionaria uma maior quantidade de resíduos de dicromato, portanto aumentaria a demanda do tratamento de resíduos.

Figura 22 – Estudo do efeito da concentração da solução de dicromato de potássio (0,2 e 0,3 mol L⁻¹). Soluções de etanol 0,0; 10; 20; 30; 40 e 50 % (v/v). Tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6; bobina de diluição = 20 cm.

Tabela 5 – Efeito concentração da solução de dicromato de potássio (0,2 e 0,3 mol L⁻¹).

Concentração do reagente mol L ⁻¹	Curva analítica	R	LD % (v/v)
0,2	$A = 0,0209c + 0,0113$	0,9977	0,3
0,3	$A = 0,0279c + 0,015$	0,9938	0,7

R= Coeficiente de correlação linear LD = Limite de detecção A=absorbância c=concentração de etanol

4.4 Estudo do efeito da concentração da solução transportadora

O etanol é oxidado pelo dicromato na presença de ácido sulfúrico. Com o objetivo de verificar o efeito da acidez do meio no desenvolvimento da reação, foi feito experimentos usando as concentrações de 2, 3, 4 e 5 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico. Os dados mostrados na Tabela 6 indicam que houve um ganho na sensibilidade com o aumento da acidez no meio. Como mostra a Figura 23, com a solução 5 mol L⁻¹, houve um ganho na sensibilidade, mostrando que a reação depende da acidez, mas, por outro lado, ocorreu perda de linearidade. Com a concentração de 4 mol L⁻¹ houve uma pequena perda na sensibilidade, mantendo praticamente a mesma linearidade como mostrado na Tabela 6. Portanto, para continuação da otimização do sistema proposto, optou-se pela concentração de 4 mol L⁻¹. Nessa concentração

foi também preparada à solução de dicromato de potássio, com o objetivo de evitar alguma diferença entre acidez do transportador e do reagente.

Figura 23 – Estudo do efeito da concentração da solução transportadora. Soluções de etanol 0,0; 10; 20; 30; 40 e 50 % (v/v). Tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6; bobina de diluição = 20 cm.

Tabela 6 – Características analíticas do estudo da solução transportadora.

Transportador H ₂ SO ₄ mol L ⁻¹	Curva analítica	A*	B	R
2	A = 0,0098c + 0,1292	0,1292	0,0098	0,9837
3	A = 0,0162c + 0,0427	0,0427	0,0162	0,9919
4	A = 0,0206c - 0,0300	0,0300	0,0206	0,9949
5	A = 0,0367c - 0,0291	0,0291	0,0367	0,9945

R= Coeficiente de correlação linear A= Coeficiente linear B=Coeficiente angular A=absorbância
c=concentração de etanol

4.5 Efeito do comprimento da bobina de dispersão na reamostragem

O estudo do efeito do intervalo de tempo na reamostragem foi realizado variando o tempo de repouso do injetor na posição de injeção de 1 a 25 s, e usando um padrão de etanol com concentração de 30 % (v/v). Inicialmente este estudo foi feito com a bobina dispersão (D_C , Fig. 17) de 20 cm, e volume interno de 100 μL . Os volumes das alças de amostragem e de reamostragem (L_1 e L_2 , Fig. 17) foram mantidos em 50 μL . Os registros dos sinais gerados são mostrados na Figura 24, onde se observa que a absorbância variou de zero a dois e retornando lentamente para zero com o alongamento do tempo de reamostragem.

Figura 24 – Sinais transientes obtidos variando-se o tempo de diluição da amostra com uma bobina de 20 cm. Variação de tempo de 1 a 25 s; da esquerda para direita, todas as medições foram feitas em triplicata; solução de etanol 30 % (v/v); tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6 e bobina de dispersão = 20 cm.

Esta resposta está de acordo com o esperado em um sistema de análise em fluxo com reamostragem.²⁶ Observa-se que os resultados referentes à reamostragem na região de gradiente de concentração ascendente, não apresenta boa precisão. Essa região da amostra dispersa é caracterizada por um alto gradiente de concentração e como a reamostragem foi efetuada sem interrupção do fluxo do transportador, esse efeito poderia ser esperado. Observa-se que na parte descendente a partir do intervalo de tempo de reamostragem de 9 s, a precisão das

medidas é boa tendo como causa favorável justamente a diminuição do gradiente de concentração.

Experimentos similares foram realizados empregando bobinas de dispersão de 30 e 40 cm, e os resultados são mostrados nas Figuras 25 e 26, nas quais se observa que os perfis de distribuição das zonas da amostra nos dois casos são semelhantes ao da Figura 24, entretanto apresentam redução de magnitude dos registros de concentração máxima, e melhora na precisão dos registros referentes à reamostragem efetuadas na parte ascendente. Quanto à precisão dos resultados referentes à reamostragem na parte descendente, observa-se que são similares aos da figura anterior.

Figura 25 – Sinais transientes obtidos variando-se o tempo de diluição da amostra com uma bobina de 30 cm. Variação de tempo de 1 a 25 s; da esquerda para direita, todas as medições foram feitas em triplicata; solução de etanol 30 % (v/v); tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6 e bobina de dispersão = 30 cm.

Figura 26 – Sinais transientes obtidos variando-se o tempo de diluição da amostra com uma bobina de 40 cm. Variação de tempo de 1 a 25 s; da esquerda para direita, todas as medições foram feitas em triplicata; solução de etanol 30 % (v/v); tempo de amostragem = 20 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6 e bobina de dispersão = 40 cm.

Considerando os resultados apresentados nas Figuras 24-26, um conjunto de soluções de referência de etanol foram processadas empregando as três bobinas de dispersão, mantendo o intervalo de tempo de reamostragem de 14 s. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 27.

Figura 27 - Curvas analíticas do estudo da bobina de dispersão. Soluções de etanol 0,0; 10; 20; 30; 40 e 50 % (v/v). Tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6.

Os parâmetros referentes à estas curvas são mostrados na Tabela 7, na qual se observa tendência idêntica na linearidade das curvas, entretanto o coeficiente angular aumentou com o comprimento da bobina de dispersão. Em primeira vista, este efeito parece discordar do esperado, que é a diminuição do sinal com o aumento da dispersão causada pelo alongamento da bobina. Analisando os registros das três figuras, observa-se que a reamostragem no mesmo intervalo de tempo, coletava uma fração distinta da zona da amostra dispersa, pois o aumento da bobina de dispersão causava um atraso na chegada da zona dispersa da amostra na alça de reamostragem.

Tabela 7 – Características analíticas referentes ao estudo da bobina de dispersão

Bobina (cm)	Curva analítica	R	LD % (v/v)
20	$A = 0,0297c - 0,0534$	0,997	2,0
30	$A = 0,0325c + 0,0087$	0,994	0,005
40	$A = 0,0415c - 0,0891$	0,996	0,6

R= Coeficiente de correlação linear LD = Limite de detecção A=absorbância c=concentração de etanol

Considerando os resultados discutidos, selecionou-se o conjunto de parâmetros experimentais mostrados na Tabela 8, os quais foram empregados para processar as amostra.

Tabela 8 – Valores experimentais obtidos após a otimização do sistema proposto

Parâmetros	Valores estabelecidos
Tempo de amostragem (s)	10
N° de ciclos de reamostragem	6
Tempo de inserção de dicromato (s)	2
Tempo de leitura (s)	20
Tempo de diluição da amostra (s)	14
Bobina de dispersão (cm)	20

Empregando-se as variáveis experimentais com os valores apresentados na Tabela 8, processou-se um conjunto de padrões. Os resultados são mostrados na Figura 28, e os parâmetros relacionados à regressão linear são mostrados na Tabela 9.

Figura 28 – Curva analítica obtida com os parâmetros otimizados. Soluções de etanol 0,0; 10; 20; 30; 40 e 50 % (v/v). Tempo de amostragem = 10 s; tempo de inserção do dicromato = 2 s; tempo de leitura = 20 s; tempo de diluição = 14 s; número de ciclos de reamostragem = 6; bobina de dispersão = 20 cm.

Tabela 9 – Características analíticas obtidas com os parâmetros otimizados

Faixa linear % (v/v)	10 – 50
Curva analítica	$Y = 0,0297x - 0,0534$
Coeficiente de correlação linear (R)	0,9972
Coeficiente angular (Sensibilidade)	0,0297
Limite de detecção % (v/v)	2,0
Limite de quantificação % (v/v)	6,7
Desvio padrão relativo % (DPR)	2,0
Consumo de dicromato (g)*	0,012
Volume de efluente com dicromato (mL)*	0,6
Volume de efluente verde (água + etanol) mL*	0,333
Frequência analítica (Det h ⁻¹)	34

*Valores encontrados por determinação

4.6 Determinação de etanol em bebidas destiladas

Empregando as condições experimentais selecionadas, foram processadas cinco amostras de bebidas destiladas, cujos resultados são mostrados na Tabela 10. Visando comprovar a exatidão dos resultados, as amostras foram também analisadas empregando o método de referência da AOAC, que é baseado na medida da densidade.³⁶ Aplicando o teste-*t* pareado para o nível de confiança de 95 % de probabilidade, o valor encontrado foi $t_{\text{cal}} = 2,55$, enquanto que o valor tabelado é $t_{\text{tab}} = 2,78$, portanto para o nível de confiança de 95 %, não há diferença significativa entre os métodos. Os resultados obtidos com o sistema proposto apresentaram boa repetibilidade, com um coeficiente de variação de 2% ($n = 10$) para uma amostra de bebida destilada com teor alcoólico de 40 %.

Tabela 10 – Resultados obtidos na determinação de etanol em bebidas destiladas

Bebidas	Sistema proposto % (v/v)	Referência % (v/v)
Cachaça 1	34,18 ± 0,01	34,40
Whisky 2	36,93 ± 0,03	39,67
Whisky 3	36,47 ± 0,03	39,78
Vodka 4	36,15 ± 0,01	39,94
Cachaça 5	42,27 ± 0,01	42,29

n = 4

Posteriormente, foi efetuada a determinação de etanol em um lote de amostras de bebidas destiladas adquiridas no mercado local, gerando os resultados mostrados na Tabela 11. Tomando-se como referência o valor designado no rótulo das bebidas, e aplicando o teste-*t* pareado para 95 % de probabilidade, encontrou-se o valor de $t_{\text{cal}} = 1,98$. Para esse nível de confiança, o valor tabelado é $t_{\text{tab}} = 2,78$, portanto, para este nível de confiança, não há diferença significativa entre os resultados.

Tabela 11 – Resultados obtidos na determinação de etanol em bebidas destiladas utilizando os valores declarados no rótulo.

Bebidas	Sistema proposto % (v/v)	Percentual rotulado % (v/v)
Cachaça 1	36,31 ± 0,04	39,78
Cachaça 2	37,02 ± 0,01	39,67
Cachaça 3	39,87 ± 0,02	40,00
Cachaça 4	39,24 ± 0,01	40,00
Whisky	40,09 ± 0,01	40,00

n = 4

Adicionalmente, foi feito um comparativo com o método de referência, apresentado na Tabela 12. O sistema proposto apresentou desempenho equivalente, porém, agregou como vantagem o descarte seletivo do volume de efluente gerado, o que possibilitou selecionar esse descarte, que é constituído com ou sem dicromato de potássio.

Tabela 12 - Comparação das características dos procedimentos

Parâmetros	Sistema proposto	Sistema de referência*
Faixa linear % (v/v)	10 - 50	10 - 42,1
Desvio padrão relativo % (DPR)	2	1,6
Consumo de dicromato (mg)**	12	5,4
Geração de efluente mL **	0,6	3,3
Frequência analítica (det h ⁻¹)**	34	40

* COMITRE *et al*, 2000. ** Valores encontrados por determinação.

Conclusão

5 Conclusão

Os resultados obtidos revelaram que o injetor proposto pode ser utilizado como alternativa ao injetor convencional. Os resultados demonstram que o mesmo é robusto, pois trabalhou durante 6 meses sem necessidade de reparo. O *design* proposto é uma inovação se comparado com o modelo antigo, pois tendo uma menor área de fricção, diminui o atrito no deslocamento. Esta característica permitiu o emprego de um pequeno motor de corrente contínua (12 V; 0,4 A), o qual foi usado para fazer o deslocamento da barra central da posição de amostragem para a de injeção e vice-versa. O funcionamento do injetor pode ser totalmente controlado pelo computador, usando apenas 2 bits de controle.

Visando demonstrar a viabilidade do injetor, o mesmo foi empregado para desenvolver um procedimento para determinação de etanol em bebidas destiladas, usando a reação com dicromato de potássio. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade e a robustez do dispositivo. Além disso, o módulo de análise proposto, associando o injetor automático a um conjunto de válvulas solenoide, agregou vantagens relacionadas ao baixo consumo de reagentes, baixa geração de efluentes, permitindo inclusive, a geração seletiva de efluentes contendo ou não dicromato como resíduo. Portanto, pode-se concluir que o sistema proposto, como um todo, agrega vantagens que o torna superior ao procedimento proposto anteriormente, principalmente em relação à geração de efluentes.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p.119-120, 2000.
- 2 RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. Theory, techniques and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 99, p. 37-76, 1978.
- 3 SANTOS JUNIOR, F. G. **Sistema em fluxo para avaliação da resposta analítica da enzima urease obtida de diferentes leguminosas**. 2008. 33 f. Monografia (Licenciatura em Ciências – Habilitação em Química) – Centro de Estudos superiores de Imperatriz, Universidade Estadual do Maranhão, Imperatriz, 2008.
- 4 REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.
- 5 REIS, B. F.; BERGAMIN FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.
- 6 TEIXEIRA, M. A. **Desenvolvimento de instrumentação e procedimentos automáticos para determinação de arsênio e fluoreto em águas empregando multicomutação em fluxo e detecção fotométrica**. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química na agricultura e no ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- 7 REIS, B. F. **Análise química em fluxo: princípios e aplicações**. Piracicaba: Laboratório de Química Analítica, CENA/USP, 1998. 117 p.
- 8 REIS, B. F.; GINE, M. F.; KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H. Multipurpose flow-injection system 1. Programmable dilutions and standard additions for plant digests analysis by inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 7, p. 865-868, 1992.

9 REIS, B. F.; MARTELLI, P. B.; MENEGÁRIO, A. A.; GINÉ, M. F. Sistema de análise química por injeção em fluxo controlado por microcomputador para diluição automática em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 109 – 112, 1993.

10 REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. Um microcomputador de baixo custo para controle e aquisição de dados em análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 15, n. 3, p. 231-236, 1992.

11 MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KORN, M.; RUFINI, I. A. The use of ion exchange resin for reagent immobilization and concentration in flow systems. Determination of nickel in steel alloys and iron speciation in waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 5, p. 479-485, 1997.

12 RAIMUNDO JUNIOR, I. M.; PASQUINI, C. Automated monosegmented flow analyser. Determination of glucose, creatinine and urea. **The Analyst**, v. 122, p. 1039 – 1044, 1997.

13 ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A.G.; LIMA, J. L.F.C.; LAPA, R.A.A. J. SANTOS, L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, p. 119-131, 2002.

14 ROCHA, F. R. P., MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. A multicommutation-based flow system for multi-element analysis in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v. 55, p. 861-869, 2001.

15 SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L. Módulo eletrônico de controle para válvulas solenoides. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 842-843, 2002.

16 REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, p. 129-138, 1994.

17 SILVA, M. B. **Desenvolvimento de um fotômetro portátil usando LED como fotodetector e de procedimentos analíticos automáticos empregando multicomutação em fluxo**. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

18 REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M.; VIEIRA, J. A.; BLANCO, T.; GERVASIO, A. P. G. Multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 372-376, 1997.

19 MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M.; BERGAMIN FILHO, H.; KORN, M.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; ARAÚJO, A. N. Multicommutation in flow analysis. Part 2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, p. 397-405, 1995.

20 ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 310, p. 447-452, 1995.

21 OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; Multicommutation in flow analysis. Part 4. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 332, p. 173 - 178, 1996.

22 KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; KORN, M.; BERGAMIN FILHO, H. Multicommutation in flow analysis. Part 5: Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 334, p. 287 - 293, 1996.

23 VIEIRA, J. A.; REIS, B. F.; KRONKA, E. A. M.; PAIM, A. P. S.; GINÉ, M. F. Multicommutation in flow analysis. Part 6. Binary sampling for wide concentration range turbidimetric determination of sulphate in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 251 - 255, 1998.

24 KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; BAHIA FILHO, O.; JACINTHO, A. O. Turbidimetric determination of sulphate in plant digests and natural waters by flow injection analysis with alternating streams. **Analytica Chimica Acta**, v.145, p.179-187, 1983.

25 REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51 – 58, 1996.

26 REIS, B. F.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J. KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN FILHO, H.; PESSENDA, L. C. R. Zone-sampling processes in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 123, p. 221 - 228, 1981.

27 REIS, B. F.; MARTELLI, P. B.; MENEGÁRIO, A. A.; GINÉ, M. F. Sistema de análise química por injeção em fluxo controlado por microcomputador para diluição automática em espectrometria de absorção atômica. **Química Nova**. v. 16, n. 2, p. 109 – 112, 1993.

28 SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica 1**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 645 p.

29 CARDOSO, M. G. **Química orgânica: curso de pós-graduação lato sensu** (Especialização) a Distância. Lavras: Faepe, 2006. 282 p.

30 VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.

31 VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard blucher, 2005. 550 p.

32 GOMES, J. C. **Legislação de alimentos e bebidas**. Viçosa-MG: UFV, 2007. 635 p.

33 VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora Blucher, 2010. 461 p.

34 PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 744 -754, 1998.

35 AZEVEDO, A. M.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, p. 235 – 247.

36 CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16^a ed. Arlington-Virginia: AOAC international, 1995. v. 2, cap. 26, 18 p.

37 REIS, J. P. Z. **Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

38 SILVA, M. O. **Desenvolvimento e caracterização de eletrodos com base no níquel para determinação de etanol**. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

39 PINYOU, P.; YOUNGVISES, N.; JAKMUNEE, J. Flow injection colorimetric method using acidic ceric nitrate as reagent for determination of ethanol. **Talanta**, v. 84, p. 745 – 551, 2011.

40 COMITRE, A. L. D.; REIS, B. F. Automatic multicommutated flow system for ethanol determination in alcoholic beverages by spectrophotometry. **Laboratory Robotics and Automation**, v. 12, p. 31-36, 2000.

41 TIPPARAT, P.; LAPANANTNOPPAKHUN, S.; JAKMUNEE, J.; GRUDPAN, K. Determination of ethanol in liquor by near-infrared spectrophotometry with flow injection. **Talanta**, v. 53, p. 1199-1204, 2001.

42 CHOENGCHAN, N.; MANTIMA, T.; WILAIRAT, P.; DASGUPTA, P. K.; MOTOMIZU, S.; NACAPRICHA, D. A membraneless gas diffusion unit: design and its application to determination of ethanol in liquors by spectrophotometric flow injection. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, p. 33-37, 2006.

43 VICENTE, S.; ZAGATTO, E. A. G. PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, M. L. M.E.S.; LIMA, J. L. F. C.; BORGES, E. P. Exploiting gas diffusion for non-invasive sampling in flow analysis: determination of ethanol in alcoholic beverages. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 23-29, 2006.

44 MATTOS, I. L.; SARTIN, R. P.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; GINÉ, M. F. Spectrophotometric flow injection determination of ethanol in distilled spirits and wines involving permeation through a silicon tubular membrane. **Analytical Sciences**, v. 14, p. 1005-1008, 1998.

45 FLETCHER, P. J.; STADEN, J. F. Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p. 123-128, 2003.

46 ARAÚJO, M. C. U.; SANTOS, S. R. B.; SILVA, E. A.; VÉRAS, G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Um fotômetro de fluxo para análises clínicas a base de um diodo emissor de luz bicolor. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 137-145, 1997.

47 TORRALBA, E. R.; ROCHA, F. R. P.; BOAVENTURA, F. R.; RUBIO, A. M.; GUARDIA, M. Evaluation of a multicommutated flow system for photometric environmental measurements. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, v. 2006, p. 1-9, 2006.

48 BETTERIDGE, D.; DAGLESS, E. L.; FIELDS, B.; GRAVES, N. F. Highly sensitive flow-through phototransducer for unsegmented continuous-flow analysis demonstrating high-speed spectrophotometry at parts per 10⁹ level and a new method of refractometric determinations. **The Analyst**, v. 103, n. 1230, p. 897-908, 1978.

49 SKOOG, D. A. **Fundamentos de química analítica**. 8^a ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007. 999 p.

50 SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

51 DASGUPTA, P. K.; BELLAMY, H. S.; LIU, H.; LOPEZ, J. L.; LOREE, E. L.; MORRIS, K.; PETERSEN, K.; MIR, K. A.; Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors. **Talanta**, v. 40, n. 1, p. 53-74, 1993.

52 TROJANOWICZ, M.; WORSFOLD, P. J.; CLINCH, J. R. Solid-state photometric detectors for flow injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 7, n. 8, p. 30-305, 1988.

53 LAVORANTE, A. F. **Desenvolvimento de instrumentação e procedimentos analíticos automáticos para a determinação espectrofotométrica em tensoativos em águas**. 2006. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Química Analítica) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

54 ROCHA, F. R. P. **Determinações sequenciais em sistemas de injeção em fluxo empregando multicomutação e multidetecção**. 2000. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

55 LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; BATISTA, A. C. F.; DABDOUB, M. J.; SILVEIRA, C. C. Green chemistry : Os princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

56 PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

57 RODRIGUES, G. D.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1370-1378, 2010.

58 ROCHA, F. R. P.; NOBREGA, J. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow Analysis strategies to greener. **Green chemistry**, v. 3, p. 216, 2001.

59 MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8-19, 2012.