

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Evandro Roberto Alves

Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multi-impulsão, interface única ou quimiometria

PIRACICABA – SP
2009

EVANDRO ROBERTO ALVES

Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multi-impulsão, interface única ou quimiometria

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto

PIRACICABA – SP

2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Alves, Evandro Roberto

Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multi-impulsão, interface única ou quimiometria / Evandro Roberto Alves; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - Piracicaba, 2009.

145 f.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Açúcar redutor 2. Análise por injeção em fluxo 3. Análise por injeção sequencial 4. Cana-de-açúcar 5. Espectrofotometria I. Título

CDU 543.422.3:633.61

*“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho:

*“A Deus pela graça da vida sem a qual, nada
teria sido possível”*

*“Aos meus pais Luiz e Maria Luiza, que sempre
me apoiaram em todos os momentos, mesmo sem
entenderem o significado deste trabalho”*

*“Aos meus amados irmãos Rosane e Agnaldo,
pelo apoio incondicional, cumplicidade e
incentivo”*

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo, pelas instalações e facilidades oferecidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa e auxílio financeiro.

Ao Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto, pelo apoio, orientação e amizade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica do CENA, Prof. Boaventura, Prof. Francisco Krug, Profa. Maria Fernanda e Prof. Zé Santista pela amizade e colaborações.

Aos amigos e pesquisadores da Universidade do Porto, Prof. José Luiz F.C. Lima e Prof. João L.M. Santos pelo apoio logístico, orientação e amizade.

A Profa. Maria Teresa M.R. Borges da Universidade Federal de São Carlos pelo incentivo.

Ao amigo Dr. Mário Almir Feres pelas discussões científicas.

A amiga Lidiane Nunes pela ajuda e amizade.

Aos técnicos do laboratório de Química Analítica do CENA, Fátima, Yolanda e Mi pelo auxílio e, em especial à Sheila pela dedicação e amizade.

Aos amigos do laboratório, Alexsandra, Ana Cristi, Andréia, Alfredo, Carla, Dário, Flávio, Gláucia, Jeová, Janete, Marquinhos, Milton, Paula Fortes, Paula Packer, Quienly, Sílvia, Tuane e Vivi pelo companheirismo, disposição e alegria compartilhados.

Às bibliotecárias do CENA, em especial à Marília pela eficiente ajuda e amizade.

Ao Geraldo da informática pelo auxílio e amizade.

Aos amigos portugueses André, Cristina, Eunice, Leonel, Mafalda e Sofia; apesar da distância uma grande amizade se mantém.

Aos meus pais e irmãos em especial, pelos conselhos, incentivo e por acreditarem em meus sonhos. Ao Cássio, Magali, Cassinho, Luiza Helena e Letícia.

Aos amigos Luizinho e Ferri, por terem me acompanhado no decorrer deste trabalho sempre me encorajando e compreendendo nos bons e maus momentos.

Aos diretores e coordenadores do Instituto Nossa Senhora Auxiliadora (INSA) pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho, muito obrigado.

*“Nenhuma história humana é
escrita sem a presença de uma
ou duas mãos amigas, que se
estendem em nossa direção”*

(Albert Einstein)

RESUMO

ALVES, E.R. **Sistemas de análises químicas em fluxo explorando multi-impulsão, interface única ou quimiometria. 2009.** 145f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Os sistemas de análises em fluxo com multi-impulsão (MPFS) têm como característica principal o emprego de bombas solenóide como unidade propulsora de fluidos, as quais proporcionam fluxo pulsado. Este regime de fluxo foi avaliado em função das condições de mistura entre as soluções envolvidas, transferência de calor e difusão gasosa.

A associação dos métodos quimiométricos de análises e dos sistemas MPFS foi demonstrada em relação à determinação espectrofotométrica de glicose, frutose e glicerol em vinhos fermentescíveis e caldos de cana-de-açúcar. O método se fundamentou na reação dos carboidratos com metaperiodato de sódio e posterior oxidação de iodeto pelo metaperiodato remanescente com monitoramento de $[I_3^-]$ produzido. O tratamento dos dados envolveu calibração multivariada, empregando o algoritmo PLS e os resultados são concordantes com aqueles obtidos por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção por amperometria pulsada. O sistema proposto é simples e robusto, capaz de analisar 120 amostras por hora.

O fluxo pulsado proporcionou melhoria no desenvolvimento reacional no que diz respeito à transferência de calor e difusão gasosa. Esse aspecto se deve principalmente ao aumento do transporte de massas no sentido radial. Estes fatos foram constatados na determinação espectrofotométrica de açúcares redutores totais (ART) e etanol. O sistema MPFS proposto para a determinação de ART envolveu hidrólise ácida da sacarose e degradação alcalina dos carboidratos. A natureza do fluxo pulsado possibilitou o uso de menores temperaturas de um banho termostaticado durante as etapas de hidrólise e degradação, bem como a diminuição da alcalinidade.

Para a mecanização da determinação espectrofotométrica de etanol envolvendo a redução de Cr(VI) a Cr(III) sob condições ácidas, foi desenvolvido um sistema MPFS, o qual se demonstrou eficiente e adequado para procedimentos que envolvem difusão gasosa. Após otimização dos principais parâmetros envolvidos, os mesmos

foram comparados empregando o sistema de multi-comutação, cujo fluxo é laminar. Melhores resultados analíticos foram obtidos no sistema proposto, que resultou em boa sensibilidade.

Em relação aos sistemas de análises em fluxo que exploram interface reacional única (SIFA), foram demonstradas suas potencialidades através da implementação de procedimentos que envolvem determinações simultâneas, sem a necessidade de reconfigurações no módulo de análises. Ainda, a simplificação da etapa de otimização foi espectrofotometricamente avaliada através da determinação de alumínio, ferro total e P-PO₄. O sistema proposto é de configuração simples e capaz de analisar 130, 140 e 90 amostras de alumínio, ferro total e fósforo por hora, respectivamente.

Palavras-chave: Multi-impulsão. Análise em fluxo. Mínimos quadrados parciais. Interface única. Quimiometria. Espectrofotometria.

ABSTRACT

ALVES, E.R. **Flow systems exploiting multi-pumping, single interface or chemometry.** 145f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Multi-pumping flow systems (MPFS) present as an unique feature the use of solenoid pumps as fluid propelling devices, which deliver pulsed flows. This flow regime was evaluated in order to improve mixing conditions between the involved solutions, heating transfer and gas diffusion.

The association of the chemometric methods of analysis and MPFS systems was demonstrated in the spectrophotometric determination of glucose, fructose and glycerol in musts and sugar cane juices. The method involved metaperiodate oxidation of carbohydrates and further oxidation of remainder metaperiodate iodide yield in the $[I_3^-]$ complex that was spectrophotometrically monitored. Data treatment involved multivariate calibration relying on the PLS algorithm and results were in agreement with liquid anion chromatography with pulsed amperometric detection. The proposed system is simple and rugged, allowing 120 samples to be run per hour.

The pulsed flow led to an enhanced heating transfer and gas diffusion, in view of the enhanced radial mass transport. These aspects were verified in the spectrophotometric determination of total reducing sugars (TRS) and ethanol. The proposed MPFS system for TRS determination involved in-line hydrolysis of sucrose and alkaline degradation of the carbohydrates. The intrinsic characteristic of pulsed flow allowed the use of lower temperatures in bath thermostatisation during hydrolysis and degradation steps, as well as a lower alkalinity.

The MPFS for spectrophotometric determination of ethanol involving diffusion towards an acceptor stream, reduction of Cr(VI) to Cr(III) under acidic condition, and Cr³⁺(III) monitoring proved to be efficient and amenable to analytical procedures involving gas diffusion. After optimization of the main parameters, the system was compared with a multicommutated flow system (MCFA) that exploits a laminar flow. Better analytical results were obtained with the proposed system which demonstrated fair sensitivity.

Regarding flow systems exploiting a single reaction interface (SIFA), their potentialities were demonstrated by implementing analytical procedures for simultaneous determination without requiring reconfigurations in the flow manifold. In this proposed system the simplification of the optimization step was attained, and the approach was evaluated in relation to spectrophotometrically determination of aluminum, total iron and phosphate. The system exhibits simple configuration and allows 130, 140 and 90 samples of aluminum, total iron and phosphate to be run per hour, respectively.

Key-words: Multi-pumping. Flow analysis. Partial least squares. Single interface. Chemometry. Spectrophotometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de fluxos do sistema FIA.....	28
Figura 2. Representação dos fenômenos de convecção, difusão axial e radial em sistemas FIA.....	29
Figura 3. Diagrama de fluxos do sistema SIA	31
Figura 4. Diagrama de fluxos do sistema MCFA	32
Figura 5. Representação da estratégia de amostragem binária	34
Figura 6. Representação de uma multi-seringa.....	35
Figura 7. Diagrama de fluxos do sistema Lab-on-valve (LOV)	36
Figura 8. Diagrama de fluxos do sistema MPFS	38
Figura 9. Perfis de sinais analíticos obtidos utilizando bombas solenóide de volumes de 8 μ L e 25 μ L.....	39
Figura 10. Diagrama de fluxos do sistema SIFA	45
Figura 11. Representação da evolução do sinal analítico em sistemas SIFA.....	45
Figura 12. Matriz de dados X.....	49
Figura 13. Matriz de dados Y	49
Figura 14. Decomposição das matrizes de dados X e Y	50
Figura 15. Sistema de aquecimento sob refluxo e desborbulhador de vidro	64
Figura 16. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para a determinação de glicose, frutose e glicerol	74
Figura 17. Diagrama de fluxos do sistema para AR	81
Figura 18. Diagrama de fluxos do sistema para a determinação de ART.....	83
Figura 19. Diagrama de fluxos do sistema MCFA para AR	84
Figura 20. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para AR	85
Figura 21. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para determinação de ART.....	87
Figura 22. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para a determinação de etanol	88
Figura 23. Diagrama de fluxos do sistema MCFA para a determinação de etanol	90
Figura 24. Diagrama de fluxos do sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO ₄)	91

Figura 25. Gráfico de pareto do planejamento fatorial completo para a determinação de glicose, frutose e glicerol	99
Figura 26. Valores previstos e reais obtidos para seleção de volume de amostra	101
Figura 27. Valores previstos e reais obtidos para seleção da concentração hidrogeniônica	103
Figura 28. Valores previstos e reais de amostras de validação	105
Figura 29. Espectros de absorção dos produtos da degradação alcalina de glicose e frutose em UV e UVvis	107
Figura 30. Sinais analíticos referentes aos produtos da degradação alcalina da glicose e frutose.	108
Figura 31. Influência da temperatura na determinação de ART	109
Figura 32. Influência da frequência de pulsação na determinação de glicose e frutose.	110
Figura 33. Influência da alcalinidade	111
Figura 34. Influência da vazão na determinação de etanol	113
Figura 35. Influência da concentração de $K_2Cr_2O_7$	114
Figura 36. Influência da temperatura na determinação de etanol.....	115
Figura 37. Influência da concentração de Cromazurol S.....	118
Figura 38. Influência da concentração hidrogeniônica no reagente Cromazurol S	118
Figura 39. Influência do comprimento do reator na etapa de formação da interface única.....	121
Figura 40. Influência da concentração de 1,10-fenantrolina.....	122
Figura 41. Influência da concentração hidrogeniônica no reagente 1,10-fenantrolina	122
Figura 42. Influência da vazão na determinação de P- PO_4	124
Figura 43. Influência do comprimento do reator na reação de formação de azul de molibdênio	125
Figura 44. Influência da concentração hidrogeniônica na determinação de P- PO_4	126
Figura 45. Influência da concentração de ácido ascórbico.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações e características analíticas dos sistemas MPFS.....	41
Tabela 2. Aplicações e características analíticas de métodos empregados para determinações simultâneas envolvendo ferro e alumínio.....	57
Tabela 3. Aplicações e características analíticas de sistemas de fluxo para determinações simultâneas envolvendo fosfato (P-PO ₄).....	61
Tabela 4. Procedimento para a determinação de glicose, frutose e glicerol.....	75
Tabela 5. Planejamento fatorial completo para 6 variáveis.....	76
Tabela 6. Concentrações de glicose, frutose e glicerol nas soluções-padrão utilizadas para a calibração e validação do modelo.....	78
Tabela 7. Concentrações de glicose, frutose e glicerol nas soluções-padrão utilizadas para a calibração e validação do modelo empregado em amostras de caldo de cana-de-açúcar e vinho.....	80
Tabela 8. Procedimento para a determinação de ART.....	86
Tabela 9. Procedimento para a determinação de etanol.....	89
Tabela 10. Procedimento para a determinação de alumínio no sistema de interface única (SIFA).....	92
Tabela 11. Procedimento para a determinação de ferro no sistema de interface única (SIFA).....	94
Tabela 12. Procedimento para a determinação de fosfato (P-PO ₄) no sistema de interface única (SIFA).....	96
Tabela 13. Resultados comparativos obtidos na determinação de glicose, frutose e glicerol em amostras de caldo de cana-de-açúcar.....	105
Tabela 14. Resultados comparativos obtidos na determinação de glicose, frutose e glicerol em amostras de vinho.....	106
Tabela 15. Aditividade de glicose e frutose.....	111
Tabela 16. Estabilidade do sistema.....	112
Tabela 17. Resultados obtidos na determinação de ART.....	112
Tabela 18. Resultados obtidos na determinação de etanol.....	116

Tabela 19. Resultados obtidos na determinação de alumínio no sistema de interface única (SIFA).....	119
Tabela 20. Resultados obtidos na determinação de ferro no sistema de interface única (SIFA).....	123
Tabela 21. Resultados obtidos na determinação de fosfato (P-PO ₄) no sistema de interface única (SIFA).....	128

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1. Métodos de análises em fluxo segmentado e não segmentado	27
2.1.1. Análise por Injeção em Fluxo (FIA)	28
2.1.2. Análise por Injeção Seqüencial (SIA).....	30
2.1.3. Sistemas de análises em fluxo explorando Multicomutação (MCFA).....	31
2.1.4. Sistemas de análises em fluxo explorando Multi-seringa (MSFIA)	34
2.1.5. Lab-on-valve (LOV)	36
2.1.6. Sistemas de análises em fluxo explorando multi-impulsão (MPFS)	37
2.1.7. Sistemas de análises em fluxo explorando Interface Única (SIFA)	44
2.2. Aplicações	46
2.2.1. MPFS para a determinação espectrofotométrica de glicose, frutose e glicerol envolvendo calibração multivariada.....	47
2.2.2. MPFS para a determinação de açúcares redutores totais (ART) explorando degradação alcalina	52
2.2.3. MPFS para a determinação de etanol.....	54
2.2.4. Sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro total e fosfato (P-PO ₄)	54
3.MATERIAIS	63
3.1. Equipamentos e acessórios	63
3.2. Amostras	64
3.2.1. Determinação de glicose, frutose e glicerol	64
3.2.2. Determinação de açúcares redutores totais (ART).....	64
3.2.3. Determinação de etanol.....	65
3.2.4. Determinação de alumínio, ferro total e fosfato (P-PO ₄).....	65
3.2.4.1. Determinação de alumínio	65
3.2.4.2. Determinação de ferro	65
3.2.4.3. Determinação de fosfato (P-PO ₄)	66
3.3. Reagentes e soluções.....	66
3.3.1. Soluções empregadas na determinação de glicose, frutose e glicerol.....	66

3.3.2. Soluções empregadas na determinação de açúcares redutores totais.....	67
3.3.3. Soluções empregadas na determinação de etanol.....	68
3.3.4. Soluções empregadas na determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO ₄).....	69
.....	69
3.3.4.1. Determinação de alumínio	69
3.3.4.2. Determinação de ferro	70
3.3.4.3. Determinação de fosfato (P-PO ₄)	71
3.3.4.4. Demais soluções	72
4. MÉTODOS	73
4.1. Determinação de glicose, frutose e glicerol.....	73
4.2. Determinação de açúcares redutores totais.....	81
4.2.1. Análise por injeção em fluxo para açúcares redutores (AR)	81
4.2.2. Análise por injeção em fluxo para açúcares redutores totais (ART)	83
4.3. Determinação de etanol.....	87
4.4. Sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO ₄)	91
4.4.1. Determinação de alumínio	91
4.4.2. Determinação de ferro	93
4.4.3. Determinação de P-PO ₄	95
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
5.1. Determinação de glicose, frutose e glicerol.....	98
5.2. Determinação de açúcares redutores totais.....	106
5.2.1. Análises por injeção em fluxo para açúcares redutores (AR)	106
5.2.2. Análises por injeção em fluxo para açúcares redutores totais (ART)	109
5.3. Determinação de etanol.....	112
5.4. Sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO ₄)	116
5.4.1. Determinação de alumínio	116
5.4.2. Determinação de ferro	120
5.4.3. Determinação de fosfato (P-PO ₄)	123
6. CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS	131

1. INTRODUÇÃO

A automação da análise química incluindo a etapa de preparo de amostra, o gerenciamento de soluções e o monitoramento do sinal analítico, é realizada eficientemente em sistemas de análises em fluxo. A crescente busca por aumentar a confiabilidade dos resultados analíticos tem levado ao aperfeiçoamento e desenvolvimento destes sistemas. A aplicabilidade dos sistemas de análises em fluxo aumentou consideravelmente nos últimos anos devido à sua simplicidade de operação, versatilidade na implementação de diferentes metodologias que atendam a necessidades analíticas diversas, além do eficiente controle temporal e minimização da manipulação de reagentes e amostras. Notadamente, estes sistemas são considerados como uma das principais ferramentas analíticas em laboratórios de análises clínicas (AGUERSSIF et al., 2007), farmacêuticas (LIMA et al., 2003) e industriais (SAFAVI et al., 2006). Em função principalmente da alta versatilidade e do compromisso com a frequência analítica e economia de reagentes, aliados à pequena quantidade de resíduos químicos gerados nas determinações, um número crescente de propostas de analisadores cada vez mais compatíveis com as necessidades analíticas têm sido verificado (VICENTE, 2004). Dentre as diversas modalidades de analisadores em fluxo pode-se mencionar os sistemas que exploram injeção seqüencial (RUZICKA; MARSHALL, 1990), o sistema de multi-comutação (REIS et al., 1994), o sistema lab-on-valve (RUZICKA, 2000), o sistema de multi-impulsão (LAPA et al., 2002), o sistema de interface única (RIBEIRO et al., 2005), etc.

Estes analisadores uniram os fundamentos do sistema de análises por injeção em fluxo com as técnicas computadorizadas, resultando em uma automação analítica mais robusta e versátil.

A computação tornou viável a adaptação de acessórios comutadores, os quais realizam diversas tarefas quando acoplados aos sistemas de análises em fluxo, tais como a inserção da amostra no percurso analítico e homogeneização das soluções com eficácia, facilitando as etapas do procedimento analítico.

Diversas unidades propulsoras foram desenvolvidas para esse fim, sendo manufaturadas a partir de bombas pistão, não comercialmente disponíveis (KORENAGA et al., 1994; CARLSSON et al., 1997). Recentemente têm sido empregadas bombas solenóide como unidade propulsora de fluidos para obtenção

de fluxo pulsado (LAPA et al., 2002). Essas unidades de propulsão tornam os sistemas de análises em fluxo mais versáteis e de configuração simples, além de excelentes gerenciadores-comutadores-homogeneizadores de soluções.

O fluxo pulsado advindo das bombas solenóide é resultante da parada de fluxo por um determinado tempo fixo entre cada pulso gerado. Melhores condições de mistura, necessitando de quantidades mínimas de reagentes e amostra para a obtenção de uma sensibilidade analítica adequada. Outros benefícios do fluxo pulsado inerentes aos sistemas de multi-impulsão (MPFS do inglês “Multi-pumping Flow System”), tais como a melhoria na transferência de calor entre os elementos de fluido e os processos de difusão gasosa são explorados neste trabalho, visando melhoria em seletividade, sensibilidade analítica e simplicidade operacional.

Recentemente, foi proposto o sistema de interface única (SIFA do inglês “Single Interface Flow Analysis”), que se assemelha aos sistemas de análises por injeção em fluxo e análise por injeção seqüencial no que se refere à sobreposição de zonas de amostra, entretanto apresenta algumas vantagens adicionais (SILVESTRE et al., 2008).

Os sistemas SIFA são caracterizados pela sobreposição mútua de zonas de amostra e reagente numa interface única de reação, onde as soluções de amostra e reagente se encontram antes da detecção. Nestes sistemas, a sobreposição das zonas nunca é total, uma vez que elas não têm limites definidos (RIBEIRO et al., 2005). Assim, o desenvolvimento da reação depende da extensão da sobreposição das mesmas e da temporização, tornando-se desnecessária a etapa de otimização de volumes. Este aspecto possibilita a configuração de módulos de análises com maior simplicidade e versatilidade operacional (SILVESTRE et al., 2009).

Como já mencionado, a utilização desta nova estratégia enfatiza a simplicidade e torna versátil o módulo de análises. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi demonstrar algumas aplicações em sistemas MPFS, enfatizando a implementação de métodos que envolvem aquecimento e difusão gasosa, bem como a determinação simultânea de alumínio, ferro e P-PO₄ em sistema SIFA. Assim, serão também avaliadas as características fluídicas e as principais figuras de mérito na implementação dos métodos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão aborda a definição dos métodos de análises em fluxo segmentado e não segmentado e os regimes de fluidos correspondentes ao fluxo não segmentado, bem como abrange a evolução dos sistemas de análises em fluxo. Os aspectos mais importantes envolvidos nas diferentes formas de impulsão são interpretados considerando algumas aplicações analíticas. Uma revisão mais detalhada sobre fluxo pulsado (MPFS, do inglês “Multi-pumping flow system”) e sistemas de fluxo de interface única (SIFA, do inglês “Single Interface Flow Analysis”) com suas aplicações é também apresentada.

2.1. Métodos de análises em fluxo segmentado e não segmentado

Os métodos de fluxo segmentado foram propostos por Skeggs em 1957 e estavam associados aos sistemas fabricados pela Technicon[®]. Estes sistemas eram caracterizados pela aspiração seqüencial de amostras em direção a um percurso analítico, onde era introduzido um fluxo de ar entre as mesmas, através de confluência (SKEGGS, 1957). A zona de amostra sofria pouca dispersão, uma vez que era controlada pelas bolhas de ar, pela vazão do fluxo transportador e pela geometria do percurso analítico. Os reagentes eram também introduzidos no percurso analítico por confluências e a zona de amostra era conduzida ao reator. O fluxo de ar inserido era eliminado antes de atingir o detector.

Com relação aos métodos de análises em fluxo não segmentado, a zona de amostra inserida no percurso analítico não eram intercaladas pelo fluxo de ar. Deve-se aqui salientar que as potencialidades dos métodos de análises em fluxo não segmentado foram evidenciadas primeiramente pela análise por injeção em fluxo (RUZICKA; HANSEN, 1975). Outras estratégias, tais como a análise por injeção seqüencial (RUZICKA; MARSHALL, 1990), a multicomutação (REIS et al., 1994), a análise por injeção em fluxo incluindo multi-seringa (CERDA et al., 1999) e, mais recentemente, a análise em fluxo por multi-impulsão (LAPA et al., 2002) e análise em fluxo em sistemas de interface única (RIBEIRO et al., 2005) enfatizaram também esse regime de fluxo.

2.1.1. Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Os sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) foram propostas em 1975 por Ruzicka e Hansen como uma alternativa aos métodos de fluxo segmentado (RUZICKA; HANSEN, 1975). Esses sistemas são reconhecidos como excelentes “gerenciadores de soluções” (KRUG et al., 1986) e os procedimentos são baseados na inserção de um volume fixo de amostra em um fluxo transportador não segmentado, o qual a transporta ao detector (RUZICKA; HANSEN, 1988).

A solução transportadora apresenta regime de fluxo laminar e movimento contínuo (VALCÁRCEL; LUQUE DE CASTRO, 1987; RUZICKA; HANSEN, 1988) e tem a função de transportar a zona de amostra em direção ao detector. Durante o processo de transporte, a zona de amostra pode reagir com o fluxo transportador, ou simplesmente dispersar-se nele, podendo ainda ser diluída se outros fluidos forem adicionados no percurso analítico x (Figura 1).

O volume de amostra é definido pelas dimensões de alças de amostragem ou pelo tempo e vazão de amostragem (VALCÁRCEL; LUQUE DE CASTRO, 1987).

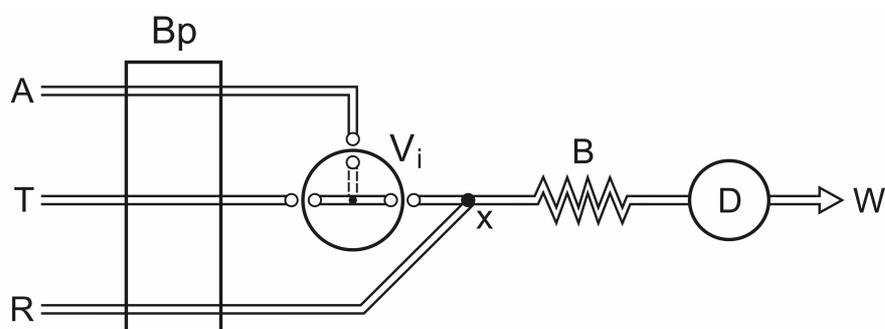


Figura 1. Diagrama de fluxos do sistema FIA. A = amostra; T = solução transportadora; R = reagente; B_p = bomba peristáltica; V_i = válvula de injeção; B = bobina de reação; D = detector; x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte. (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

Na medida em que a zona de amostra se movimenta ao longo do percurso analítico são gerados gradientes de concentração motivados pela ocorrência de reações químicas ou simplesmente pela dispersão. A dispersão depende do volume de amostra, do comprimento do reator, do tempo de residência, (intervalo de tempo

em que a amostra se mantém no percurso analítico), do local da confluência, do coeficiente de difusão, da temperatura (RUZICKA; HANSEN, 1988), nas mesmas condições temporais e espaciais. O processo de dispersão da zona de amostra ocorre pelos mecanismos de transporte por convecção e difusão radial e axial (Figura 2) (VALCÁRCEL; LUQUE DE CASTRO, 1987).

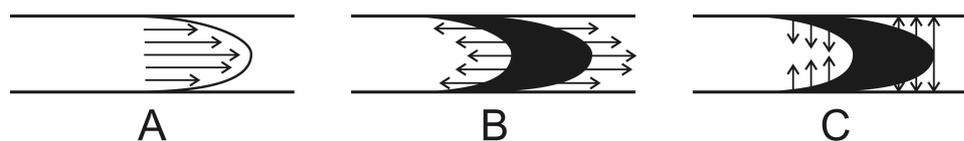


Figura 2. Representação dos fenômenos de convecção (A), difusão axial (B) e radial (C) em sistemas FIA. (Adaptado de RIBEIRO, 2008).

O formato do sinal analítico em sistemas FIA é uma consequência dos fenômenos de difusão e convecção, e depende da distância percorrida pela zona de amostra desde sua injeção até a detecção, bem como das reações. Assim, o sinal analítico apresenta um valor constante enquanto a solução transportadora atravessa o detector e transiente na forma de uma curva gaussiana, quando ocorre a passagem da espécie a ser monitorada (RUZICKA; HANSEN, 1988).

No que diz respeito aos componentes desses sistemas na sua versão mais simples, é necessário um dispositivo de propulsão (geralmente uma bomba peristáltica multi-canal, a qual impulsiona o fluxo transportador e os reagentes), e um outro para efetuar a injeção de amostras (predominantemente uma válvula cromatográfica para a inserção de alíquota definida). Para a formação do gradiente de concentração é necessário um reator, onde a zona de amostra se dispersa formando as espécies químicas a serem monitoradas, um detector para efetuar o monitoramento e um dispositivo responsável pelo registro do sinal analítico transiente.

Dentre as principais características destes sistemas, tais como a possibilidade de automação e miniaturização, estes se destacam pela simplicidade na configuração, versatilidade e flexibilidade no que diz respeito à adaptação de métodos que atinjam objetivos analíticos específicos.

2.1.2. Análise por Injeção Sequencial (SIA)

O crescente avanço tecnológico, aliado à tendência de reduzir as dimensões dos sistemas de análises em fluxo, desencadeou o desenvolvimento dos sistemas de análises por injeção seqüencial (SIA). Introduzido em 1990 por Ruzicka e Marshall, a análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Seqüencial Injection Analysis”) teve como principal objetivo a implementação de sistemas mais versáteis, robustos e de baixo custo de manutenção. Pelas suas características favoráveis, tais como a flexibilidade na implementação de diferentes métodos analíticos sem necessidade de reconfigurações, estes sistemas se destacavam pela viabilidade na implementação de um ou mais procedimentos analíticos (GOMEZ et al., 1995) e determinações multiparamétricas (DIAS et al., 2004). Nestes sistemas, ocorre o acionamento de uma válvula seletora multi-posição que opera sob controle temporizado, promovendo a aspiração seqüencial da amostra e reagentes em direção a uma bobina retentora. A formação da zona de amostra ocorre por inversão do sentido do fluxo, resultando na sobreposição mútua dos segmentos das diferentes soluções inseridas no percurso analítico (Figura 3). A seguir, a zona de amostra é bombeada em direção ao sistema de detecção.

Um aspecto importante a ser salientado é o fato de a inversão do sentido do fluxo permitir a obtenção de diferentes graus de mistura entre as zonas envolvidas (RUZICKA; GUBELI, 1991).

Enquanto que nos sistemas FIA o tempo de residência é fixado pelo comprimento do reator e pela vazão, nos sistemas SIA a configuração é sempre mantida e o intervalo de tempo reacional é controlado por alterações efetuadas no programa computacional. O programa executa diferentes funções, tais como fixar o escoamento do fluxo num dado sentido, promover inversões sucessivas e efetuar a parada de fluxo (RUZICKA; GUBELI, 1991).

Os principais componentes de um módulo de análises do sistema SIA (Figura 3), são: válvula seletora multiposição, dispositivo de propulsão (geralmente constituído por uma bomba peristáltica ou seringa, a qual é posicionada no canal central da válvula seletora com acesso à amostra, reagentes, reatores e detector.

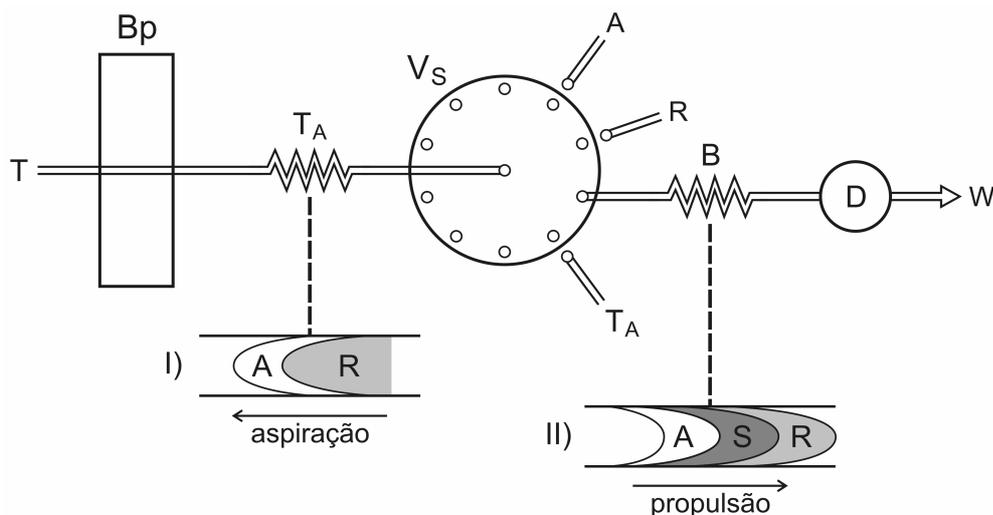


Figura 3. Diagrama de fluxos do sistema SIA. A = amostra; T = solução transportadora; R = reagente; B_p = bomba peristáltica; T_A = bobina retentora; V_s = válvula seletora; B = bobina de reação; D = detector; W = frasco para coleta e descarte; I) = aspiração de A e R a partir de V_s; II) = sobreposição de zonas dirigidas ao detector; S = zona de sobreposição. (Adaptado de RIBEIRO, 2008).

Os sistemas SIA incluem ainda um microcomputador que possibilita o controle sincronizado do dispositivo de propulsão e da válvula seletora que define parâmetros, tais como, o volume, o sentido e a velocidade de escoamento das diferentes soluções.

De um modo geral, esses sistemas possibilitam a utilização de um diversos reagentes nas determinações, e um mínimo consumo dos mesmos produzindo, conseqüentemente um volume inferior de efluentes (CERDA et al., 2001).

2.1.3. Sistemas de análises em fluxo explorando Multicomutação (MCFA)

A automação das análises químicas aliada a chegada dos computadores nos laboratórios de análises associados à versatilidade, proporcionou o desenvolvimento dos sistemas envolvendo multicomutação (ZAGATTO et al., 1999). A multicomutação foi descrita pela primeira vez em 1994 por Reis et al. e é caracterizada pela utilização de dispositivos de comutação utilizados como injetores, direcionadores de fluxos, etc. Estes dispositivos são constituídos em geral por válvulas solenóide que são acionadas individualmente, e utilizadas para o direcionamento das soluções (válvulas eletromecânicas ativadas por um solenóide).

Potencialidades, limitações e aplicações envolvendo sistemas de multicomutação foram recentemente revistas (FERES et al., 2008).

As soluções de amostra e reagentes são propulsionadas por uma seringa, bomba peristáltica ou solenóide em direção às válvulas solenóide, as quais podem ser acionadas em diferentes estágios para a introdução de uma alíquota da solução em direção ao percurso analítico, a partir do intervalo de tempo de abertura da válvula e da vazão de bombeamento das soluções. Durante o transporte da zona de amostra em direção ao detector ocorre a dispersão mútua nas interfaces das soluções, possibilitando a obtenção de uma mistura homogênea.

Após a inserção da zona de amostra, a mistura é encaminhada ao detector.

Uma das principais vantagens do uso da multicomutação é a economia de reagentes e amostra em função da adição de um volume discreto de cada solução no percurso analítico. Além disso, é possível utilizar apenas um canal de bombeamento para inserir e transportar diferentes soluções no percurso analítico.

Com relação às vantagens do emprego das válvulas solenóide, pode-se inferir que a inserção de reagentes e amostra se processa com rapidez devido à agilidade na etapa de comutação. Nestes sistemas, o módulo de análises inclui um conjunto de válvulas solenóide dispostas estrategicamente, de modo a possibilitar a constituição de diferentes percursos analíticos (Figura 4). As diversas formas de comutação das válvulas solenóide permitem maior versatilidade ao sistema.

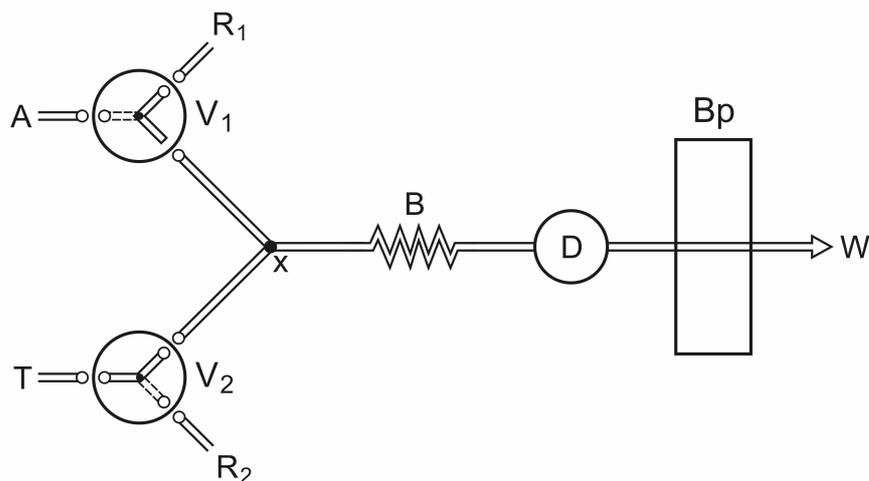


Figura 4. Diagrama de fluxos do sistema MCFA. A = amostra; T = solução transportadora; R₁ e R₂ = reagentes; V_i = válvulas solenóide; B_p = bomba peristáltica; B = bobina de reação; D = detector; x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte. (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

A introdução das alíquotas de reagentes e amostra no percurso analítico pode ser efetuada por aspiração para um único canal, colocando o sistema de propulsão após o sistema de detecção e seleccionando as posições das respectivas válvulas. Pode-se ainda introduzir as soluções posicionando o módulo de propulsão antes das válvulas de comutação (OLIVEIRA et al., 1996).

O conceito de multicomutação tem sido explorado nas mais diversas aplicações (ICARDO et al., 2002), e sua condição de inserção de alíquotas definidas de amostra e reagentes resultaram em estratégias como a amostragem binária (Figura 5) (REIS et al., 1994). Segundo este conceito, por comutação da válvula solenóide, segmentos de amostra com volumes em μL são intercalados com volumes definidos de reagente, facilitando a homogeneização da zona de amostra com menor dispersão. Um aspecto a ser salientado é que os segmentos de amostra e reagente quando inseridos no percurso analítico podem ter ou não o mesmo volume, dependendo da vazão e da velocidade de comutação da válvula solenóide. Por outro lado, o desenvolvimento mais rápido da reação está associado a este tipo de amostragem, considerando que a mistura das soluções tem início durante a etapa de amostragem (ROCHA et al., 2002). Existem outras estratégias de inserção de amostra e reagente tais como, zonas coalescentes (BERGAMIN et al., 1978), diluição em linha (LUCA; REIS, 2004), amostragem binária (OLIVEIRA et al., 1996), aprisionamento da amostra (KRUG et al., 1983), parada de fluxos (FERNANDES; REIS, 2002), etc.

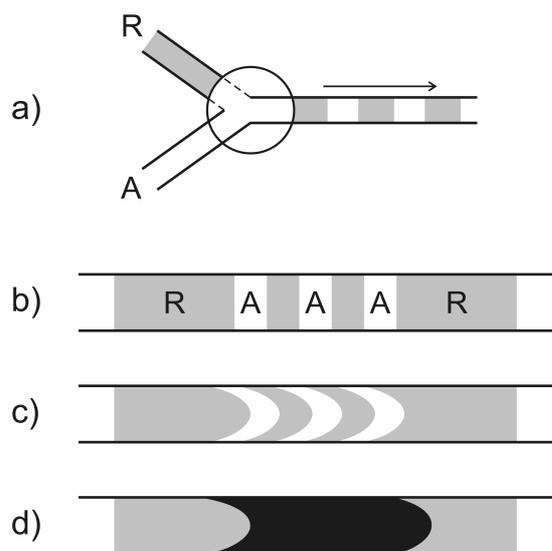


Figura 5. Representação da estratégia de amostragem binária. a) válvula solenóide; b) segmentos de amostra e reagente intercalados; c) transporte das soluções; d) homogeneização da zona de amostra, R: reagente; A: amostra. (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

2.1.4. Sistemas de análises em fluxo explorando Multi-seringa (MSFIA)

A análise por injeção em fluxo que inclui multi-seringa no módulo de análises (MSFIA, do inglês “Multisyringe Flow Injection Analysis”) foi descrita em 1999, por Cerdà et al. (Apud ALBERTUS et al., 1999), e é caracterizada pela utilização de um conjunto de seringas empregadas como dispositivo de propulsão. Os sistemas MSFIA apresentam como componente elementar as multi-seringas (Figura 6), o que permite o movimento simultâneo de quatro seringas de diferentes capacidades. Estas são ligadas em bloco a um único motor de uma bureta automática convencional, que é controlada por um computador. Deste modo, o movimento do motor propulsiona simultaneamente os êmbolos das seringas, operando em modo multi-canal, de forma semelhante às bombas peristálticas dos sistemas FIA (HORSTKOTTE et al., 2005).

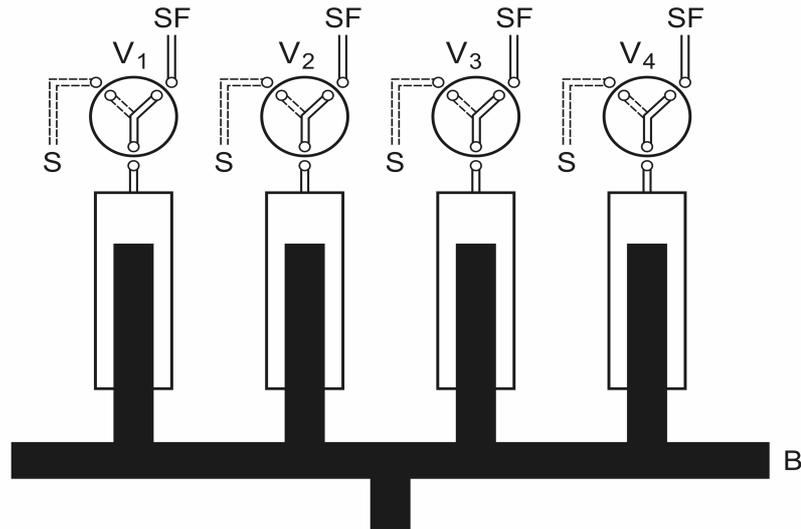


Figura 6. Representação de uma multi-seringa. B = barra condutora de êmbolos; S = reservatório de soluções; SF = sistema de fluxo; V_i = válvulas solenóide. (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

A utilização de seringas com diferentes volumes associados ao número de ciclos do motor da bureta permite que estas apresentem diferentes vazões, uma vez que as mesmas são acionadas simultaneamente com a mesma velocidade (HORSTKOTTE et al., 2005). No sistema da Figura 6, cada seringa está acoplada a uma válvula solenóide de três vias e na extremidade oposta posiciona-se o êmbolo responsável pelo enchimento ou esvaziamento da seringa.

As válvulas solenóide permitem a ligação das seringas ao sistema, ou ao reservatório das soluções (Figura 6).

A introdução da amostra é efetuada por dispositivos adicionais como válvulas de injeção (ALBERTÚS et al., 1999), válvulas seletoras (ALBERTÚS et al., 2001) ou válvulas solenóide (SEGUNDO et al., 2000).

Os sistemas MSFIA combinam um modo de operação multi-canal, como nos sistemas FIA, com a possibilidade de seleção de volumes exatos de amostra e de reagentes necessários para a análise, como nos sistemas SIA, além da possibilidade de multicomutação.

A válvula solenóide acoplada à extremidade de cada seringa possibilita a redução no consumo de reagentes, uma vez que estes são introduzidos no sistema apenas quando necessários (MIRO et al., 2002; HORSTKOTTE et al., 2005). De fato, a presença da válvula permite o retorno das soluções aos seus devidos

reservatórios viabilizando a reciclagem dos mesmos. Apesar das vantagens mencionadas, o funcionamento da multi-seringa requer que as mesmas sejam preenchidas periodicamente com as soluções requeridas, comprometendo a frequência analítica.

2.1.5. Lab-on-valve (LOV)

A evolução dos analisadores em fluxo caminha para a miniaturização objetivando o desenvolvimento sistemas portáteis, simples, de baixo custo e com mínimo custo de manutenção. Neste sentido, foi proposta a estratégia LOV por Ruzicka (RUZICKA, 2000). Os módulos de análises “Lab-on-valve” (LOV), são baseados no mesmo princípio de funcionamento dos sistemas SIA (Figura 7).

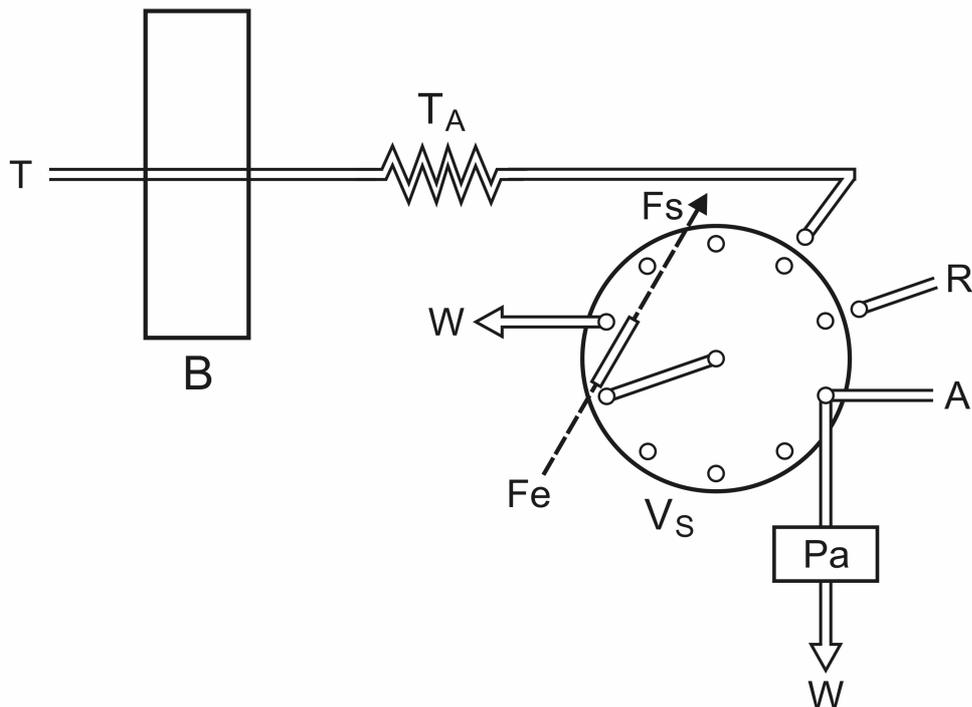


Figura 7. Diagrama de fluxos do sistema Lab-on-valve (LOV). A = amostra; T = solução transportadora; T_A = bobina retentora; F_e = Feixe de entrada de radiação; F_s = Feixe de saída de radiação; V_s = válvula seletora multiposição; P_a = dispositivo de propulsão auxiliar; R = reagente; B_p = bomba peristáltica ou seringa; W = frasco para coleta e descarte. (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

A unidade principal destes módulos é a válvula seletora multi-posição que é controlada por um computador e contém uma porta central ligada a bureta automática, através de uma bobina retentora. A bureta automática é responsável pelo transporte das soluções à bobina retentora, pela mistura das mesmas e pelo transporte da zona de amostra ao detector. Ainda, esta unidade integra uma porta de injeção de amostra, canais de acesso aos reagentes e uma cela de fluxo, que possibilita o acoplamento de diversos sistemas de detecção. Os canais de acesso e a cela de fluxo são fabricados como uma estrutura monolítica montada sobre uma válvula seletora. Apesar de apresentar-se com dimensões reduzidas, os módulos de análise LOV possibilitam diferentes manipulações das soluções, tais como diluição, adição de reagentes, mistura, incubação, separação e detecção, em qualquer seqüência, em função do regime de fluxo.

Dentre as principais vantagens destaca-se a redução no consumo de amostra e reagentes, facilidade de operação e a compactação dos equipamentos, além do controle informatizado das etapas do procedimento experimental e a integração de todos os componentes do sistema numa estrutura rígida, que permite melhora em repetibilidade (RUZICKA, 2000). Entretanto, os módulos de análise LOV apresentam como desvantagem a baixa freqüência analítica em função do intervalo de tempo necessário para que a válvula seletora faça a comutação.

2.1.6. Sistemas de análises em fluxo explorando Multi-impulsão (MPFS)

Em sistemas de análises por injeção em fluxo, usualmente, as unidades propulsoras de fluidos são bombas peristálticas ou seringas, que fornecem fluxos de característica laminar (LAVORANTE, 2006). Esse tipo de fluxo apresenta como desvantagem a baixa homogeneização das soluções de amostra e de reagente. Uma nova estratégia de bombeamento, injeção, homogeneização e comutação foi proposta por Lapa et al. (2002) com objetivo de tornar mais eficiente a etapa de mistura de soluções empregando pequenos volumes de soluções. Os sistemas de análises em fluxo explorando esta estratégia foram denominados sistemas de multi-impulsão, MPFS (do inglês "Multi-Pumping Flow Systems"). Uma bomba solenóide é empregada para o bombeamento individual de cada solução envolvida, permitindo a exploração das capacidades propulsoras e comutadoras, bem como a facilidade de re-direcionamento das soluções (Figura 8). As bombas solenóide possibilitam a

implementação de sistemas de configuração muito simples, reduzindo o número de componentes e, com isso, minimizando a probabilidade de ocorrência de falhas nos equipamentos e erros durante a execução do procedimento analítico.

A atuação das bombas solenóide origina fluxos pulsados (causados pelo deslocamento repentino do diafragma das mesmas), que são caracterizados por um volume (volume de pulso) e uma frequência (frequência de pulso) que, em combinação estabelecem a vazão individual de cada solução. O volume de solução inserido no sistema é definido pelo volume de pulso da bomba solenóide e pelo número de pulsos selecionados pelo operador, de acordo com a necessidade analítica. Deste modo, é possível um controle efetivo de volumes de amostra e reagentes inseridos, bem como da posição da zona de amostra no percurso analítico. O uso de bombas solenóide permite também a parada de fluxos evidenciando a vantagem na implementação de métodos cinéticos e/ou outras estratégias de análise (LIMA et al., 2004).

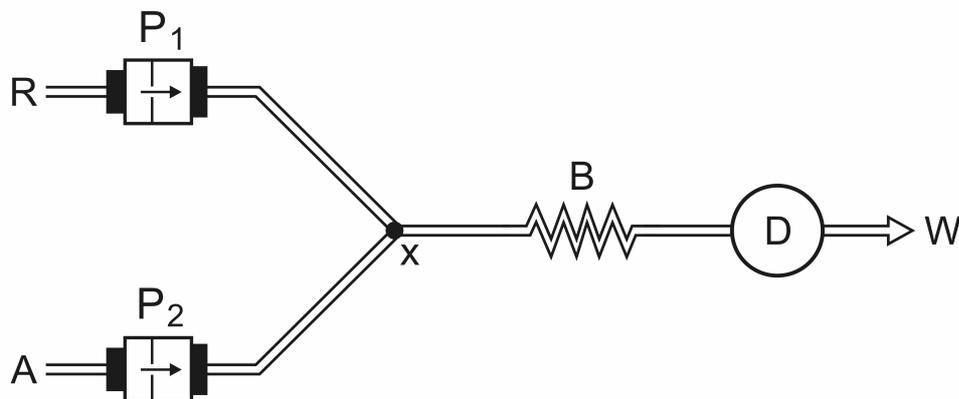


Figura 8. Diagrama de fluxos do sistema MPFS. A = amostra; R = reagente; P_i = bombas solenóide; B = bobina de reação; D = detector; x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte. (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

Um aspecto relevante dos sistemas MPFS é então o fluxo pulsado, que pode ser visto como uma cadeia contínua de segmentos muito pequenos, em que cada um desses segmentos corresponde a um determinado volume de solução (LAPA et al., 2002). O fluxo pulsado apresenta um movimento desordenado dos elementos do fluido, possibilitando que a mistura entre amostra e reagente seja mais rápida e eficaz quando comparada àquela obtida em condições de fluxo laminar, típicas dos

procedimentos que empregam fluxo laminar. Isso se deve ao fato de que nos sistemas com fluxo estritamente laminar, a sobreposição das soluções de amostra e reagente depende exclusivamente de fenômenos de difusão e convecção (LIMA et al., 2004). Deste modo, em situações de fluxo pulsado obtêm-se sinais analíticos cuja magnitude é superior à dos obtidos em condições de fluxo laminar, com volumes de amostra idênticos e nas mesmas condições temporais (LAPA et al., 2002; LIMA et al., 2004).

O grau de mistura depende também do volume de pulso. Para maiores volumes de pulsos, a interação completa entre segmentos de amostra e reagente é dificultada quando comparada a um volume de pulso menor, no qual a interação ocorre num menor intervalo de tempo, não necessitando o emprego de reatores maiores (LIMA et al., 2004). O volume de pulso desempenha um papel decisivo no desenvolvimento da reação, influenciando no formato do sinal analítico obtido durante as medidas (Figura 9). Importante salientar que a natureza pulsada do fluxo pode ser perceptível no registro do sinal analítico (formato do tipo escada), o qual depende do volume e da frequência de pulso, do comprimento e diâmetro interno do reator e também do volume interno da cela de fluxo do detector.

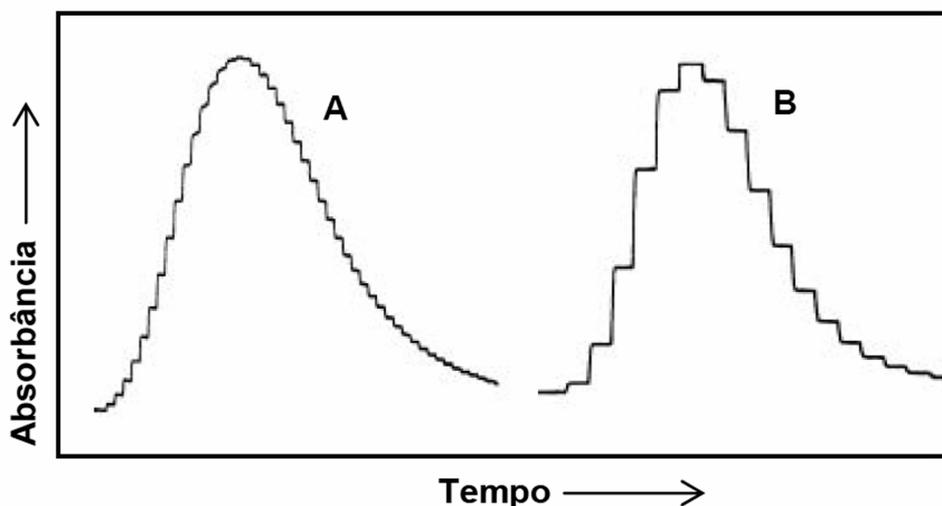


Figura 9. Perfis de sinais analíticos obtidos utilizando bombas solenóide de volumes de 8 μ L (A) e 25 μ L (B). (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

O fluxo pulsado resultante da atuação das bombas solenóide em combinação com o seu controle individual tornam a estratégia de multi-impulsão muito atrativa no que diz respeito à implementação de procedimentos analíticos automatizados. De

fato, a combinação do fluxo pulsado com a simplicidade das configurações dos módulos de análises e controle automatizado e individual das bombas, confere à multi-impulsão os meios necessários para a implementação de metodologias analíticas caracterizadas por um desenvolvimento rápido da reação, um baixo consumo de amostra e reagentes e conseqüentemente uma baixa produção de efluentes.

As vantagens dessa nova estratégia de propulsão de fluidos resultou em um número significativo de publicações (Tabela 1).

Tabela 1. Aplicações e características analíticas dos sistemas MPFS.

Analito	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteção	Velocidade analítica (h ⁻¹)	Ref.
Cr(VI)	Águas naturais	1,5-difenilcarbazida	-	UV-vis	80	Lapa et al., 2002
Ácido fítico	Extrato de plantas	Salicilato de ferro (III)	1,0 mg L ⁻¹	UV-vis	150	Carneiro et al., 2002
Dipirona	Preparações farmacêuticas	p-dimetilaminobenzaldeído	1,0 mg L ⁻¹	UV-vis	50	Lima et al., 2003
Bromexina	Preparações farmacêuticas	MBTH/Ce(IV)	2,0 mg L ⁻¹	UV-vis	45	Dias et al., 2003
Ambroxol	Preparações farmacêuticas	p-dimetilaminobenzaldeído	-	UV-vis	80	Santos et al., 2005
Indometacin	Preparações farmacêuticas	CTAB/NaOH	1,6 x 10 ⁻⁸	Fluorimetria	30	Pinto et al., 2005
Ácido ascórbico, Trolox, Resveratrol	Preparações farmacêuticas	Luminol/H ₂ O ₂	-	CL	160	Meneses et al., 2005
		Lucigenina/ H ₂ O ₂			70	
Carvedilol	Preparações farmacêuticas	Luminol/NaClO	8,7 x 10 ⁻⁹	CL	65	Pires et al., 2005
Metformina	Preparações farmacêuticas	Luminol/H ₂ O ₂ /Cu(II)	0,94 mg L ⁻¹	CL	95	Marques et al., 2005

LOD, limite de detecção; UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível; CL, quimioluminométrica; MBTH, 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona; CTAB, brometo de hexadeciltrimetilamônio.

Analito	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteção	Velocidade analítica (h ⁻¹)	Ref.
H ₂ O ₂	-	Luminol/K ₃ [Fe(CN) ₆]	4,0 x 10 ⁻⁷	UV/vis	120	Rocha et al., 2005
Amônio	-	Luminol/NaClO	6,0 x 10 ⁻⁸			
Tensoativos aniônicos	Águas de lavagem	MO/CPC	0,035 mg L ⁻¹	UV/vis	60	Lavorante et al., 2005
Fe e V	Ligas metálicas	Iodeto de potássio/Cr(VI)	-	UV/vis	50	Fortes et al., 2006
Zn	Extratos de plantas	Zincon	0,10 mg L ⁻¹	UV/vis	30	Ribeiro et al., 2006
Fluoxetina	Formulações farmacêuticas	Luminol/ NaClO	0,31 mg L ⁻¹		136	Marques et al., 2007
Peroxinitrito	Ácido lipóico, ácido dihidrolipóico, glutationa oxidada e glutationa reduzida, Sulindac e Sulindac sulfona	Luminol/NaOH	-	CL	200	Ribeiro et al., 2007
N-NH ₄	Águas naturais	Luminol/NaClO ₂	0,02 mg L ⁻¹	CL	50	Marques et al., 2007

LOD, limite de detecção; UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível; CL, quimioluminométrica; MO, alaranjado de metila; CPC, cloreto de hexadecilpiridina.

Analito	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteção	Velocidade analítica (h ⁻¹)	Ref.
Gabapentina	Preparações farmacêuticas	NQS	11 mg L ⁻¹	UV/vis	28	Ribeiro et al., 2007
Paraquat	Águas naturais	Ácido desidroascórbico	22 µg L ⁻¹	UV/vis	63	Infante et al., 2008
Sulfato, cloreto	Águas naturais	AgNO ₃ , BaNO ₃	1,30 mg L ⁻¹ , 0,70 mg L ⁻¹	UV/vis (Turbidimetria)	10	Fortes et al., 2008
Nitrito, nitrato	Águas	Reagente de Griess	0,013 mg L ⁻¹ , 0,039 mg L ⁻¹	UV/vis	27	Pons et al., 2008
Levodopa, benzerazida	Formulações farmacêuticas	Luminol/Na ₂ CO ₃	0,05 mg L ⁻¹	CL	28	Marques et al., 2008
Sacarose	Caldos de cana-de-açúcar e melações	NaOH/tartarato duplo de sódio e potássio	0,018 % (m/v)	UV/vis	65	Alves et al., 2009
Gabapentina	Formulações farmacêuticas	Luminol/NaClO	40 µmol L ⁻¹	CL	41	Manera et al., 2009

LOD, limite de deteção; UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível; CL, quimioluminométrica; NQS, 1,2-naftoquinona-4-sulfonato.

2.1.7. Sistemas de análises em fluxo explorando Interface Única (SIFA)

Os sistemas de análises que exploram interface única (SIFA, do inglês “Single Interface Flow Analysis”), foram propostos em 2005, e contituem um dos desenvolvimentos mais recentes em termos de flexibilidade na configuração dos módulos de análises e formas de impulsão das soluções (RIBEIRO et al., 2005). Estes sistemas são caracterizados pela sobreposição mútua de zonas de amostra e reagente numa interface única de reação, onde as soluções de amostra e reagente se encontram antes da detecção. O conceito de sobreposição de zonas foi inicialmente proposto por Ruzicka e Hansen (RUZICKA; HANSEN, 1988) para explicar a formação de uma zona composta quando, em duas zonas adjacentes em movimento contínuo, a primeira sofre uma sobreposição da segunda, como consequência da velocidade superior do fluxo no centro do tubo, em relação à velocidade média do fluxo.

Nos sistemas SIFA, a dispersão controlada e a formação da zona de amostra não são influenciadas pelos volumes de amostra e reagente, passando a ser determinados exclusivamente pela extensão da sobreposição de zonas adjacentes de amostra e reagentes, pelo percurso analítico, tempo, temperatura, viscosidade, etc. Embora semelhantes aos sistemas SIA no que se refere à sobreposição de zonas de amostra, nos sistemas SIFA a sobreposição das mesmas nunca é total, uma vez que elas não têm limites definidos. O recurso a múltiplas inversões do sentido do fluxo e a eventual utilização de um fluxo pulsado são fatores que contribuem para melhorar a sobreposição das zonas envolvidas.

Na Figura 10 está representada a configuração básica de um sistema SIFA (configurações mais complexas podem também ser utilizadas), dependendo das necessidades analíticas. O módulo de análises de um sistema SIFA compreende dispositivos para inserção e propulsão das soluções, representado na figura por bombas solenóide e válvulas solenóide para o direcionamento do fluxo. As bombas e válvulas solenóide podem ou não estar posicionadas simetricamente ao redor do detector.

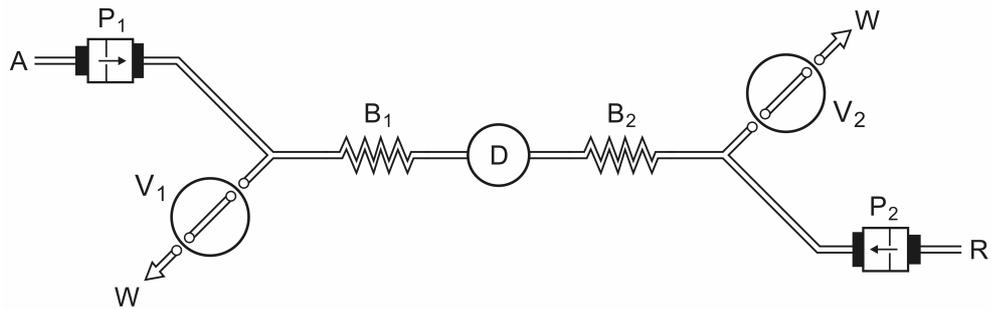


Figura 10. Diagrama de fluxos do sistema SIFA. A = amostra; R = reagente; P₁ e P₂ = bombas solenóide; B₁ e B₂ = bobinas de reação; V₁ e V₂ = válvulas solenóide; D = detector; W = ponto de confluência; (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

A configuração do módulo de análises compreende ainda dois reatores posicionados em cada lado do detector, o que possibilita algumas intervenções na interface de reação, tais como, multi-deteções da zona de amostra através da realização de múltiplas inversões do sentido do fluxo (Figura 11). Os sistemas SIFA podem ou não ter o detector posicionado no centro do módulo de análises.

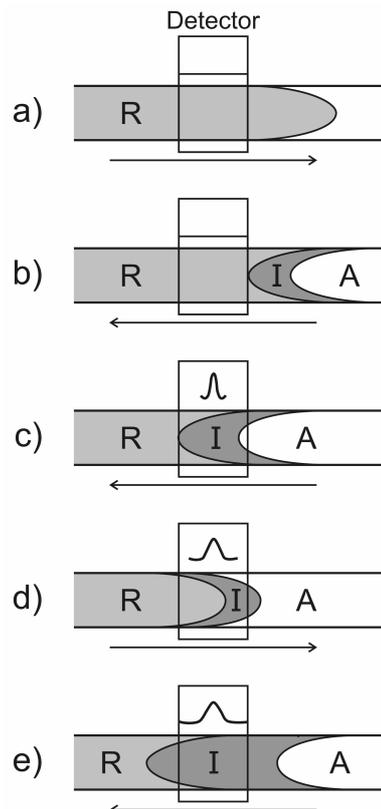


Figura 11. Representação da evolução do sinal analítico em sistema SIFA. A = amostra; R = reagente; I = interface única de reação; a) estabelecimento da linha base por introdução do reagente; b) inserção de amostra na extremidade oposta do fluxo de reagente e estabelecimento da interface única; c) primeira detecção; d) e e) múltiplas inversões do sentido de fluxo. As setas indicam o sentido do fluxo. (Adaptado de RIBEIRO, 2008)

Em fase inicial de desenvolvimento, existem ainda poucas aplicações envolvendo sistemas SIFA, cujos métodos contemplam a detecção espectrofotométrica e quimioluminométrica. O primeiro método envolvia a reação entre Fe(III) e ácido salicílico, e a determinação de fosfato pela formação de azul de molibdênio. Os produtos das reações eram medidos espectrofotometricamente. Na configuração destes sistemas, o detector era localizado na posição central permitindo múltiplas detecções. Neste trabalho foram ainda mencionadas as principais características dos sistemas SIFA, tais como a possibilidade do emprego de diferentes módulos de propulsão de soluções, formato do sinal analítico, uso de reatores, posicionamento do detector, melhoria nas condições de mistura e repetibilidade das medidas proporcionadas pela reversão de fluxos (RIBEIRO et al., 2005). As principais figuras de mérito foram discutidas enfatizando as potencialidades desses sistemas.

A determinação quimioluminométrica de manitol em formulações farmacêuticas e urina humana foi explorada pela medida da inibição da quimiluminescência produzida pela reação entre mioglobina e luminol, na ausência de peróxido de hidrogênio (SILVESTRE et al., 2008). O método proposto permitia a detecção de 25,0 mmol L⁻¹ de manitol com boa precisão (r.s.d.< 4,7 %, n=3), e analisava 60 amostras por hora.

Silvestre et al. (2009) desenvolveram um sistema de análises explorando a interface única utilizando ácido cloranílico e 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona, para a determinação espectro-fotométrica dos hormônios da tireóide liotiroxina (T3) e levotiroxina (T4) em formulações farmacêuticas (SILVESTRE et al., 2009). Neste sistema, eram utilizadas duas buretas automáticas como módulos de impulsão. Os complexos reacionais T3-DDQ e T4-CLA eram medidos espectrofotometricamente em 460 e 538 nm.

2.2. Aplicações

Neste item é apresentada uma breve revisão da literatura referente aos métodos selecionados para implementação nos sistemas MPFS e SIFA.

2.2.1. MPFS para a determinação espectrofotométrica de glicose, frutose e glicerol envolvendo calibração multivariada

A determinação de açúcares redutores e de glicerol se reveste de grande importância na agroindústria sucro-alcooleira para avaliação dos processos de produção e fermentativo. Assim, os métodos de análises utilizados para avaliar esses analitos devem ser conduzidos de forma a permitir um melhor aproveitamento da matéria-prima.

Freqüentemente nota-se a busca por métodos que forneçam resultados rápidos e precisos. Dentre os mais utilizados, podem ser citados aqueles conduzidos manualmente, os quais se baseiam na oxidação de Cu(II) (LANE; EYNON, 1934; ARAÚJO et al., 2000), hexacianoferrato (OLIVEIRA; FATIBELLO, 1999), metaperiodato (ZAGATTO et al., 1988; 1992). Entretanto, a aplicabilidade desses métodos pode ser limitada pela cinética reacional, sensibilidade, robustez ou por se tratar de métodos não automatizados. Sendo assim, os métodos automatizados conduzidos em sistemas de análises em fluxo devem ser enfatizados (OLIVEIRA e FATIBELLO, 1999; ULASOVA et al., 2003; CARNEIRO et al., 2005).

A versatilidade inerente aos sistemas de análises em fluxo permite que os módulos de análises simples e robustos sejam projetados para determinações simultâneas (VALCÁRCEL; LUQUE DE CASTRO, 1987; WHITMAN et al., 1991). Esses sistemas associados às técnicas quimiométricas demonstram suas potencialidades, uma vez que se torna possível a quantificação de analitos que apresentam cinética reacional semelhante na mesma mistura. Além disso, a adaptação dessa nova estratégia tem o importante papel de resolver problemas analíticos e não mais o de desenvolver novas metodologias (BRERETON, 2000). O uso de técnicas quimiométricas associado aos sistemas de análises em fluxo com detecção espectrofotométrica é uma estratégia eficiente (NI et al., 2003) para a determinação de açúcares redutores e glicerol, em virtude destes apresentarem cinética reacional semelhante.

A calibração multivariada utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para aquisição e tratamento de informações relevantes, obtidas em procedimentos analíticos otimizados (CORREIA; FERREIRA, 2007). A possibilidade de minimização e/ou eliminação de espécies químicas potencialmente interferentes, a quantificação de analitos similares numa mistura, a melhoria em seletividade, o reconhecimento de

padrões e a possibilidade de compensação de ruídos, são consideradas as principais aplicações da calibração multivariada (FERREIRA et al., 1999).

Os procedimentos de calibração multivariada são baseados nas relações entre os sinais analíticos e as concentrações dos analitos. Os principais modelos de calibração são a regressão linear múltipla (MLR, do inglês “Multiple Linear Regression”), a regressão por componentes principais (PCR, do inglês “Principal Component Regression”) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês “Partial Least Squares”). A principal diferença entre estes procedimentos está na forma como os coeficientes de regressão são obtidos.

PLS extrai informações relevantes do conjunto de dados espectrais e faz a relação das mesmas com a variável de interesse (POPPI, 1993). Este se destaca dos outros métodos de calibração pela simplicidade do algoritmo, excelente poder de previsão e robustez, principalmente no que se refere à inclusão de novas amostras no conjunto de calibração sem alterar os parâmetros do modelo resultante (ZAMORA et al., 1997). Entretanto, a inclusão de um grande número de variáveis leva à incorporação de ruídos estatísticos (“overfitting”). Por outro lado, um número reduzido de parâmetros resulta em um modelo não ajustado (“underfitting”), inadequado para a previsão de novas amostras.

A modelagem no PLS consiste na manipulação de um conjunto de dados que representam as propriedades do sistema em estudo. Estas propriedades estão representadas por diversas variáveis, as quais são reduzidas através de combinações lineares, originando um novo conjunto de variáveis, denominados vetores ou variáveis latentes, que são capazes de representar as amostras em poucas dimensões. O número de variáveis latentes utilizado para a construção do modelo de calibração deve proporcionar o menor erro possível de previsão; sendo assim, a diferença entre os valores de referência e os previstos deve ser a menor possível.

Um modelo de calibração é uma função matemática que relaciona os grupos de variáveis X (independentes) e Y (dependentes). A construção do modelo é dividida nas etapas de calibração e validação. A calibração é definida como uma série de operações, que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente. A matriz $X_{(n,m)}$ é composta por espectros ou registros de sinais analíticos, onde cada linha (n)

representa uma amostra e cada coluna (m) corresponde a uma medida ao longo do progresso da análise (Figura 12).

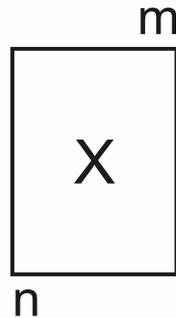


Figura 12. Matriz de dados X.

Na matriz $Y_{(n,p)}$, o conjunto de dados constituídos (p) correspondem às concentrações dos analitos e as linhas (n) à combinação entre elas (Figura 13).

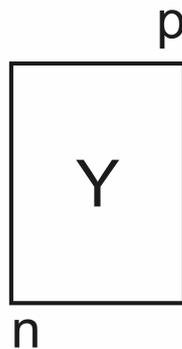


Figura 13. Matriz de dados Y.

As matrizes X e Y são decompostas em vetores de “scores” e “loadings”, e em uma outra matriz de resíduos de dados não modelados (ruídos estatísticos) (MORGANO, 2005). Os “scores” são as coordenadas das amostras num sistema de eixos. Os gráficos de “scores” permitem a identificação destas, bem como a análise de semelhanças, agrupamentos e “outliers”. Os “loadings” se referem as variáveis presentes nos conjuntos de dados e, através da análise gráfica é possível a identificação das variáveis importantes, a classificação e a seleção das mesmas (Figura 14).

$$\begin{array}{c} m \\ \boxed{X} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} \boxed{T} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{P} \end{array} + \begin{array}{c} m \\ \boxed{F} \\ n \end{array}$$

$$\begin{array}{c} p \\ \boxed{Y} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} \boxed{U} \\ n \end{array} \begin{array}{c} p \\ \boxed{Q} \end{array} + \begin{array}{c} p \\ \boxed{E} \\ n \end{array}$$

Figura 14. Decomposição das matrizes de dados X e Y em “scores” (T e U), “loadings” (P e Q) e erro estatístico (E e F)

A relação entre X e Y é otimizada pelo PLS de forma a produzir fatores em direções ortogonais. Assim, as variáveis latentes são construídas de forma que a primeira variável latente de X descreva a direção vetorial associada à máxima de variância que também se correlaciona com Y. As demais se apresentam nas direções ortogonais subsequentes até que toda a informação relevante seja extraída. A seleção do número de variáveis latentes a serem incluídas no modelo de regressão é muito importante. Deve-se selecionar um número de variáveis latentes com informações suficientes para modelar o sistema de forma que o mesmo não seja superajustado e não modele ruído. Assim, o número adequado de variáveis latentes deve permitir a criação de um modelo com boa capacidade de previsão para amostras externas.

A validação consiste na etapa de avaliação da habilidade preditiva do modelo construído e na otimização da relação que descreve as espécies de interesse. A validação cruzada (do inglês “cross validation”) do tipo “leave one out” é bastante empregada, principalmente quando não se dispõe de um número razoável de

amostras para compor ambos os conjuntos (MARTENS; NAES, 1989; FERREITA et al., 1999). Este procedimento se baseia na previsão de um modelo construído por parte de um conjunto de dados, onde uma das amostras é deixada de fora de uma série de n amostras, assim, $n-1$ amostras são usadas na calibração e é feita a previsão da concentração da amostra que não foi usada na calibração. O procedimento se repete até que todas as amostras sejam excluídas. Ao final, compara-se a concentração de cada amostra prevista pelo modelo com o valor de referência e determina-se o erro médio (erro de previsão) que é avaliado através do somatório dos quadrados dos erros de previsão de todas as amostras (PRESS, do inglês “prediction residual sum of squares”) (MARTENS; NAES, 1989; LINDGREN et al., 1994).

$$PRESS = \sum_{i=1}^m (Y_i - \hat{Y}_i)^2$$

Onde, Y_i é o valor conhecido e \hat{Y}_i é o valor previsto pelo modelo.

O erro padrão das previsões (RMSEP, do inglês “root mean standard error of prediction”) é calculado por (THOMAS, 1994):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{m}}$$

Onde m é o número de amostras. RMSEP pode ser utilizado como uma estimativa do desvio padrão relativo das previsões.

A qualidade do conjunto de amostras selecionadas para a construção do modelo matemático é avaliada pela detecção de amostras anômalas ou “outliers” (MARTENS; NAES, 1989). Estas são construídas num conjunto homogêneo e, depois de serem avaliadas pelas grandezas: resíduos de “student” e “leverage” podem ser removidas por se apresentarem acima dos limites estabelecidos. A medida da “leverage” indica a influência de uma determinada amostra no conjunto de regressão quando comparada as demais (MASSART et al., 1988). Valores baixos de “leverage” representam amostras com pouca influência no modelo e valores altos indicam bastante influência, ou seja, freqüentemente inapropriada, uma vez que podem se constituir em um “outlier”. O resíduo “student” indica o quanto da informação é mantido após o cálculo das variáveis latentes para uma amostra assumindo que a mesma não tenha sido usada na construção do modelo

(FERREIRA et al., 1999). O valor de “student” indica que a amostra se diferencia das demais.

Após a conclusão das etapas de desenvolvimento e avaliação do modelo matemático construído, este pode ser empregado para o monitoramento espectrofotométrico dos analitos na amostra.

O número de publicações referentes aos procedimentos de calibração multivariada, principalmente PLS, aplicadas aos métodos espectrofotométricos tem aumentado consideravelmente (ZAMORA et al., 1997). A aplicação destes procedimentos se justifica pela resolução de problemas analíticos e não mais pelo desenvolvimento de novos métodos.

2.2.2. MPFS para a determinação de açúcares redutores totais (ART) explorando degradação alcalina

O monitoramento de açúcares redutores totais (ART) é importante para o controle da fabricação do açúcar e do álcool, principalmente para se fazer os pagamentos de cana-de-açúcar em função do teor de sacarose, para análise dos estados de maturação da cana, e para se avaliar a eficiência do processo industrial (MATTOS et al., 1988). Nas usinas brasileiras, esta determinação é realizada por titulação visual ou por espectrofotometria UV-Vis, ambas envolvendo a redução de Cu(II) pelos monossacarídeos após a hidrólise ácida da sacarose.

O método proposto neste trabalho de tese se fundamenta na degradação alcalina de carboidratos sob altas temperaturas (BELITZ; GROSCH, 1986; AJANDOUZ et al., 2001). Nestas condições, uma mistura de compostos é produzida e dentre esses, ânions denominados enedióis desempenham importante papel como precursores dos polímeros marrons responsáveis pela coloração mensurada espectrofotometricamente (WIT et al., 1979; BRUIJN et al, 1986; STRAYER, 1987; BAISIER; LABUZA, 1992; VOET; VOET, 1995).

Sob condições alcalinas e altas temperaturas os carboidratos sofrem reações de ionização, mutarotação e enolização, resultando na formação de carboidratos neutros e ionizados, espécies hemiacetais cíclicas e carboidratos interconvertíveis, em equilíbrio (BRANDS; BOEKEL, 2001). Durante a etapa de enolização são também originados ácidos carboxílicos de cadeia curta. Essa etapa é conhecida

como transformação de Lobry de Bruyn-Alberda van Erkenstein (DYKE, 1960; LEDERKREMER; VARELA, 1988).

Outras espécies químicas, tais como furfural e hidroximetilfurfural também são produzidos, as quais podem originar polímeros escuros, denominados melanoidinas, após reações de condensação e polimerização (GODSHALL et al., 2002; COCA et al., 2004). A formação de melanoidinas está associada às reações não-enzimáticas de escurecimento denominadas reação de Maillard e de caramelização (AJANDOUZ et al., 2001). O desenvolvimento destas reações depende da combinação de alguns parâmetros, tais como temperatura, intervalo de tempo disponível, pH do ambiente reacional e reatividade característica do carboidrato (PHONGKANPAI et al., 2005).

A degradação alcalina de carboidratos em sistemas de análises por injeção em fluxo se constitui em uma importante potencialidade para a determinação de açúcares redutores (AR) e de açúcares redutores totais (ART) por permitirem monitorar produtos reacionais instáveis (ALVES et al., 2006).

A hidrólise da sacarose também é de relevância para o processo industrial de produção do açúcar e do álcool porque o caldo de cana-de-açúcar e o xarope perdem parte da sacarose quando não são mantidas as condições adequadas de pH e temperatura (HONIG, 1969; MEADE; CHEN, 1977). O termo *inversão da sacarose* ainda é muito utilizado em substituição à *hidrólise*, em virtude de seus produtos causarem mudança na atividade ótica de dextrorrotatória para levorrotatória. A hidrólise da sacarose pode ser tanto enzimática, como ocorrer na presença de íons hidrogênio, resultando em uma mistura tautomérica de ciclos alfa e beta das formas alifáticas da D-glicose e D-frutose (MEADE; CHEN, 1977).

Essa mistura contém quantidades equimolares dos monossacarídeos glicose e frutose (HONIG, 1969). Outro aspecto importante a ser destacado é que o aumento da temperatura favorece o processo de hidrólise (MEADE; CHEN, 1977). Assim, a implementação da hidrólise e degradação alcalina de carboidratos é viável em sistemas MPFS. Nestes sistemas, a mistura entre reagente e amostra é eficiente em função das características inerentes ao fluxo pulsado (LIMA et al., 2004), o qual promove melhor interação entre ambos, proporcionando melhor distribuição de calor durante a passagem da amostra através do reator (ALVES et al., 2009).

2.2.3. MPFS para a determinação de etanol

A produção de bebidas alcoólicas desempenha atualmente um relevante papel na indústria de alimentos (LVOVA et al., 2006). De acordo com World Drink Trends, nos últimos anos o consumo de bebidas alcoólicas tem aumentado consideravelmente (WDT, 2005), bem como a demanda por eficiente controle de qualidade, com objetivo de garantir a segurança desse produto, seja para consumo interno como para exportação (LAKINS et al., 2004). A determinação de etanol em vinhos fermentescíveis é de importância para o controle de eficiência dos processos de fermentação (MATTOS et al., 1988). Métodos para a determinação de etanol têm sido freqüentemente propostos buscando o fornecimento de resultados rápidos e confiáveis e que empreguem instrumentação analítica de baixo custo (CHOENGCHAN et al., 2006). Vários métodos têm sido propostos (BORGES et al., 2006), entretanto não satisfazem às condições acima mencionadas. Aproximadamente um pouco mais que duas centenas de publicações envolvendo os sistemas de análises em fluxo e membranas de difusão gasosa são descritas na literatura (Vicente, 2004), e as mais recentes são mencionadas a seguir (BRYCE et al., 1997; RANGEL; TÓTH, 2000; VICENTE et al., 2006; BORGES et al., 2006). Estes sistemas são considerados como bons gerenciadores de soluções em laboratórios de Química Analítica, pois permitem automação de análises químicas, são eficientes no controle temporal e apresentam simplicidade e versatilidade na implementação de diferentes metodologias. O detalhamento do método empregado para a determinação de etanol está descrito no item 4.3.

2.2.4. Sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO₄)

Alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre e está presente nas formas insolúveis e atóxicas de aluminossilicatos ou óxidos. Entretanto, solos com valores baixos de pH solubilizam e disponibilizam as formas fitotóxicas do elemento, nomeadamente o íon Al(III) na forma hexahidratada de $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ (KOCHIAN, 1995). A disponibilidade de alumínio solúvel em solos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos em razão da acidificação, da aplicação de

fertilizantes e das atividades industriais (HOWELER, 1991). Além das plantas, o efeito tóxico causado pelo Al(III) também é observado em muitos organismos tais como, bactérias, fungos, algas e leveduras (BAKER; SCHOFIELD, 1982; YOSHINO et al., 1992; ZEL et al., 1993), sendo considerado um fator limitante da produtividade de muitas culturas.

Embora não existam informações científicas definitivas sobre o mecanismo de ação tóxica do íon Al(III) em sistemas biológicos, este é considerado um inibidor das hexoquinases em leveduras (WOMACK; COLOWICK, 1979) e da desidrogenase da glucose-6-fosfato em leveduras de panificação, reduzindo a utilização da energia química pelas mesmas (CHO; JOSHI, 1989).

Relativamente ao efeito tóxico do Al(III) sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada em destilarias para o processo fermentativo, foram observados efeitos depressivos durante o crescimento e viabilidade celular (BASSO et al., 1989).

Os caldos de cana-de-açúcar utilizados no preparo dos mostos podem conter quantidades expressivas de Al(III) por serem provenientes de plantas cultivadas em solos ácidos (BASSO, 1990). Os teores de alumínio em mostos e melaços industriais empregados na produção de etanol combustível variam entre 8,0 e 40,0 mg L⁻¹, podendo atingir 130,0 mg L⁻¹ (BASSO; AMORIM, 1997). Outras maneiras de adição de alumínio aos processos fermentativos é o uso de água tratada com alúmen de potássio ou sulfato de alumínio pelas indústrias e a reutilização da levedura, podendo levar ao efeito cumulativo de Al(III) (ARANHA, 2002).

Com relação a ferro, pode se inferir que é um elemento de origem mineral classificado como o quarto mais abundante da crosta terrestre, podendo ser encontrado como íons bivalentes ou trivalentes na composição de diversos alimentos e materiais (MARCZENKO, 1976). Ferro é um nutriente essencial aos seres vivos por atuar principalmente na síntese da hemoglobina e no transporte do oxigênio para as células (PHILIP et al., 2009). Dentre as diversas aplicações destaca-se a fabricação do aço, do cimento e das ferramentas, bem como no desenvolvimento de plantas (NEDJADA et al., 2009; VIGANI et al., 2009). Relativamente ao setor sucro-alcooleiro, o ferro participa na composição de algumas de suas matérias-primas, tais como caldos de cana-de-açúcar, mostos e melaços (JÖRGENSEN et al., 1939). A quantidade de ferro encontrada em caldos e mostos depende da sua concentração disponível nos solos, que é consequência da acidez dos mesmos (AMERINE; OUGH, 1980).

Ferro, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e fósforo são minerais essenciais à nutrição e desenvolvimento das leveduras utilizadas no processo fermentativo (JÖRGENSEN et al., 1939; AMERINE; OUGH, 1980). A concentração limite de 3,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ferro é considerada adequada e requerida ao bom desempenho da função heme-enzima participante do processo de crescimento das colônias de leveduras (JONES; GREENFIELD, 1984). Concentrações acima do valor mencionado podem causar inibição do crescimento das leveduras (AMERINE; OUGH, 1980; BLUMER, 2002). Deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais podem provocar alterações metabólicas, prejudicando os referidos processos (BASSO et al., 1996).

Dentre os diversos métodos espectrofotométricos para a determinação de ferro, o procedimento que envolve a reação entre Fe(II) e 1,10-fenantrolina é bastante empregado nas indústrias de alimentos por ser um método oficial (MARCZENKO, 1976, AMERINE; OUGH, 1980). A reação ocorre numa ampla faixa de pH (entre 2,0 e 9,0), a cinética é relativamente rápida e o complexo medido espectrofotometricamente tem a proporção 1:3 (MARCZENKO, 1976). A seguir, estão citadas algumas aplicações de métodos implementados em sistemas de fluxo e outros, ambos multi-elementares empregados na determinação de alumínio e ferro utilizando diferentes formas de detecção (Tabela 2).

Tabela 2. Aplicações e características analíticas de métodos empregados para determinações simultâneas envolvendo ferro e alumínio.

Analito(s)	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteção	Ref.
Al, Fe total	Solos	- 1,10-fenantrolina	$8,0 \times 10^{-3}$, $1,20 \times 10^{-4}$	Potenciometria, UV/vis	Miyazawa et al., 1992
Cu, Al, Fe, Mn	Fígado bovino	(Eluente -Acetonitrilo/5- cloro-8-quinolinol, perclorato de tetrabuliamônio, sulfato de amônio)	$3,10 \text{ ng mL}^{-1}$, $4,80 \text{ ng mL}^{-1}$, $2,70 \text{ ng mL}^{-1}$, $3,30 \text{ ng mL}^{-1}$,	Separação cromatográfica e coluna ODS	Nagaosa e Sakata, 1998
Al, Fe	Digeridos de plantas	-	$29,0 \text{ mg Kg}^{-1}$, $70,0 \text{ mg Kg}^{-1}$	ICP-AES	Coscione et al., 2002
Al, Fe	Fluidos de hemodiálises e fluidos peritoniais	Violeta Solocromo RS, Negro de Palatino cromo 6BN, Cromazurol S, Negro de Eriocromo	$10,0 \mu\text{g L}^{-1}$	Voltametria por pulso diferencial adsortivo	Locatelli, 2003

LOD, limite de detecção; UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível; coluna cromatográfica ODS Tosoh TSKGEL (5 μm , 4.6 X 150mm); ICP-AES, espectrometria de emissão ótica com acoplamento de plasma induzido.

Analito(s)	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteção	Ref.
Li, Al, Fe	Refrigerantes, bebidas alcoólicas	-	1,40 ng L ⁻¹ , 159 ng L ⁻¹ , 425 ng L ⁻¹ .	ICP-MS	Bianchi et al., 2003
Fe, Ti, Al	Ligas Metálicas	3,5,7,2',4'- pentahidroxi flavona	0,03 µg mL ⁻¹ , 0,04 µg mL ⁻¹ , 0,02 µg mL ⁻¹	UV/vis	Safavi et al., 2003
Al, Ca, Fe	Compostos de carbono e silicones	-	0,60 µg g ⁻¹ , 0,15 µg g ⁻¹ , 2,50 µg g ⁻¹	GF-AAS	Minami et al., 2004
Al, Fe	Fluidos de hemodiálises	Violeta de pirocatecol	0,044 mg L ⁻¹ , 0,052 mg L ⁻¹	UV/vis	Nascimento et al., 2006
Fe, Al, Cu	Ligas metálicas	Vermelho de alizarina S	450,0 ng L ⁻¹ , 140,0 ng L ⁻¹ , 450,0 ng L ⁻¹	UV/vis	Safavi et al., 2006
Al, Fe	Água potável	Cromazurol S	4,9 µg L ⁻¹ , 5,6 µg L ⁻¹ ,	UV/vis	Vanloot et al., 2007

LOD, limite de detecção; ICP-MS, espectrometria de massas acoplado a plasma induzido; UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível; GF-AAS, espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

Analito(s)	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteccção	Ref.
Al, Fe	Plantas e águas	Hematoxilina	0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$	UV/vis	Niazi et al., 2007
Fe, Al	Fluidos de hemodiálise	Cromazurol S	0,056 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0,044 $\mu\text{g L}^{-1}$,	UV/vis	Aguerssif, et al., 2007
Fe, Al	Águas de lagos e rios, chás	Xileno cianol	8,38 $\times 10^{-4}$ mg L^{-1} , 1,64 $\times 10^{-3}$ mg L^{-1}	UV/vis	Cal e Xu, 2008
Fe, Al, V	Águas	3,5,7,20,40-pentahidroxiflavona	15,0 ng L^{-1} , 23,0 ng L^{-1} , 40,0 ng L^{-1}	UV/vis	Ghavami et al., 2008
Al, Fe	Fluidos de hemodiálises	Violeta de solocromo	1,40 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,80 $\mu\text{g L}^{-1}$	ET-AAS	Nascimento et al., 2008

LOD, limite de deteção; UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível; ET-AAS, espectrometria de absorção atômica eletrotérmica.

O elemento fósforo comumente encontrado em plantas, sedimentos e águas naturais na forma de fosfato (MAHADEVIAH et al., 2007) é considerado um macronutriente essencial à nutrição e ao crescimento de plantas por participar de processos fisiológicos e bioquímicos (ALMEIDA et al., 2005). Existe uma variedade de trabalhos encontrados na literatura referentes à determinação de fosfato abrangendo diversas áreas, tais como, agricultura, metalurgia, medicina e ciências ambientais (MARCZENKO; LOBINSKI, 1992; ROBARDS et al., 1994; KRONKA et al., 1996; NOVAIS; SMYTH, 1999; MOTOMIZU et al., 2005). Recentemente, os níveis de fósforo foram quantificados em amostras de bebidas, detergentes, fertilizantes, mostos, melaços e caldos de cana-de-açúcar (MAHADEVIAH et al., 2007).

No setor sucro-alcooleiro, o fosfato participa da etapa de clarificação do caldo utilizado durante a fabricação do açúcar quando a concentração natural não atinge a faixa entre 300 e 350 mg L⁻¹; valores estes considerados adequados ao bom rendimento do processo (MAHADEVIAH et al., 2007). As formas orgânica e inorgânica de fosfato podem também estar presentes em mostos e melaços em concentrações que variam de 50,0 a 900 mg L⁻¹. A tabela 3 exemplifica alguns métodos em fluxo e aplicações para a determinação simultânea de fosfato e outros analitos.

Tabela 3. Aplicações e características analíticas de sistemas de fluxo para determinações simultâneas envolvendo fosfato.

Analito(s)	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteção	Velocidade analítica (h ⁻¹)	Ref.
Fosfato, silício	Águas residuais	Molibdato de amônio, Rodamina B	0,05 mg L ⁻¹ , 0,80 mg L ⁻¹	UV/vis	20	Mas et al., 1991
Amônio, creatinina, fosfato	Amostras sintéticas	Molibdato de amônio/ácido ascórbico	-	UV/vis	50, 67, 114	Georgiou e koupparis, 1991
Amônio, fosfato	Extratos de plantas	Molibdato de amônio/ácido ascórbico	73,1 mg L ⁻¹ , 8,30 mg L ⁻¹	UV/vis	80	Kronka et al., 1996
Fósforo, nitrogênio	Águas	Molibdato de amônio, Verde de malaquita	1,0 µg L ⁻¹	UV/vis	-	Motomizu et al., 1997
Fosfato, silicato	Águas residuais	Molibdato de amônio, vanadato de amônio	0,162 mmol L ⁻¹ , 1,424 mmol L ⁻¹	UV/vis	30	Mas-Torres et al., 2000
Amônio, fosfato	Efluentes de águas marinhas	Molibdato de amônio	19,8 µg L ⁻¹ , 3,60 µg L ⁻¹	UV/vis	-	Tovar et al., 2001

LOD, limite de detecção; UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível.

Analito(s)	Amostra	Reagente principal	LOD	Deteção	Velocidade analítica (h ⁻¹)	Ref.
Amônio, fosfato	Águas naturais	Molibdato de amônio, ácido ascórbico, Hipoclorito de sódio, ácido salicílico	7,0 µg L ⁻¹ , 17,0 µg L ⁻¹	UV/vis	112	Fernandes e Reis, 2002
Fosfato, arsenato	Águas ambientais	Molibdato de amônio	0,70 nmol L ⁻¹ , 0,60 nmol L ⁻¹	UV/vis	-	Yuchi et al., 2003
Fosfato, zinco	Extratos de solos	Molibdato de amônio/ácido ascórbico, Rodamina 6G/tiocianato de amônio	-	UV/vis	30	Grassi et al., 2004
Fosfato, nitrito, nitrato	Águas naturais, águas residuais	Molibdato de amônio/ácido ascórbico	0,15 mg L ⁻¹ , 0,17 mg L ⁻¹ , 0,09 mg L ⁻¹	UV/vis	15	Tsoufanidis et al., 2008

LOD, limite de detecção; espectrofotometria no UV/vis, espectrofotometria no ultravioleta visível.

3. MATERIAIS

Os equipamentos, reagentes e acessórios empregados na execução deste trabalho, foram disponibilizados pelo Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho” do Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

3.1. Equipamentos e acessórios

Os sistemas de análise em fluxo explorando multi-impulsão e interface única eram constituídos por:

- Bombas solenóide BIO-CHEM Valve Inc., modelos 090SP12-8 e 120SP1210-4TE com volumes de pulso de 6 e 20 μL , respectivamente;
- Válvulas solenóide de três vias, NResearch, modelo 161T031;
- Bomba peristáltica de rotação variável Ismatec, modelo IPC-08, com tubos de Tygon de diversos diâmetros internos para bombeamento de soluções;
- Injetor-comutador confeccionado em acrílico operado manualmente (ZAGATTO et al., 1981);
- Espectrofotômetro Femto modelo 700 plus (para operação em UV), equipado com célula de fluxo Hellma, modelo 178 OS, com passo óptico de 10 mm e volume interno de 80 μL ;
- Espectrofotômetro Ocean Optics USB-4000, equipado com célula de fluxo Hellma, modelo 178 OS, com passo óptico de 10 mm e volume interno de 80 μL ;
- Registrador potenciométrico Kipp & Zonen, modelo 111;
- Membrana de difusão gasosa PTFE (50% porosidade, 0.8 μm);
- Microcomputador provido de interface PCL-711 Advantech e operado por meio de programa desenvolvido em Quick Basic 4.5;
- Balança analítica Mettler modelo BB204;
- Sistema de aquecimento com água fervente sob refluxo (a) e desborbulhador de vidro (b) (Figura 15).

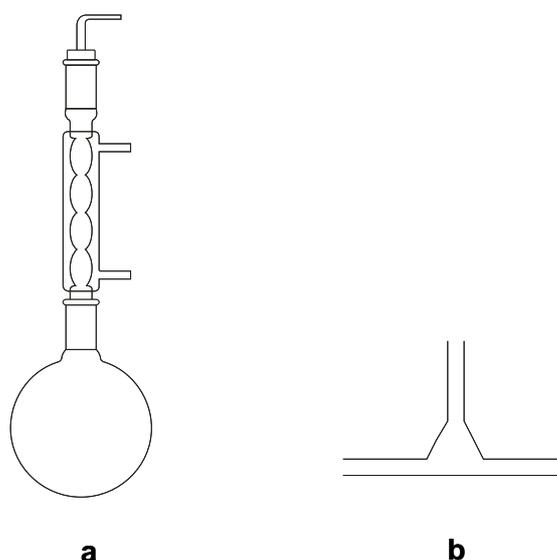


Figura 15. Sistema de aquecimento sob refluxo (a) e desborbulhador de vidro (b).

- Banho termostaticado Fanem modelo 100;
- Reatores e linhas de transmissão de polietileno (0,8 mm d.i.), confluências de acrílico e conectores;
- Outros materiais de uso rotineiro em laboratórios de Química Analítica, tais como capela, destiladores, agitadores magnéticos, medidores de pH, filtros e vidrarias, etc.

3.2. Amostras

3.2.1. Determinação de glicose, frutose e glicerol

As amostras de caldo de cana-de-açúcar e vinhos fermentescíveis foram obtidas junto a usinas de açúcar e álcool locais. As mesmas foram diluídas imediatamente antes das análises, com água na proporção de 1:50 (v/v).

3.2.2. Determinação de açúcares redutores totais

As amostras de caldo de cana-de-açúcar e de melaços foram diluídas imediatamente antes das análises, com água na proporção de 1:20 (v/v) e 1:100 (m/v) para caldo e melaço, respectivamente.

3.2.3. Determinação de etanol

As amostras de cervejas das marcas Super Bock, Sagres, Cergal branca, Cergal preta e Bohemia foram adquiridas em lojas de bebidas. As amostras foram injetadas no sistema sem serem diluídas.

As amostras de vinhos fermentescíveis foram coletadas em usinas locais e analisadas. Estas foram injetadas no sistema sem serem diluídas.

3.2.4. Determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO₄)

Amostras de mostos e melaços foram coletadas em Usinas locais e armazenadas em frascos de polietileno de 500 mL. Ambas foram submetidas à ação de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (KRUG et al., 2008).

O volume de 1,00 mL de cada amostra de mosto foi colocado em um Erlenmeyer e, após a adição de 6,0 mL HNO₃ 20,0 % (v/v) e 2,0 mL H₂O₂ 30,0 % (v/v), as mesmas foram aquecidas à temperatura de 230 °C durante 15 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram transferidas para um balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com água (KRUG et al., 2008).

3.2.4.1. Determinação de alumínio

Antes de serem analisadas, as amostras de mostos e melaços foram ainda diluídas na proporção 1:100 (v/v e m/v), sendo que a adição de aproximadamente 1,50 mL de solução 1,0.10⁻² mol L⁻¹ NaOH permitiu a obtenção de pH 5,0 ajustado potenciométricamente.

3.2.4.2. Determinação de ferro

As amostras de mostos e melaços foram diluídas na proporção 1:100 (v/v e m/v). Ambas tiveram o pH 5,0 ajustado potenciométricamente com solução 1,0.10⁻² mol L⁻¹ NaOH.

3.2.4.3. Determinação de fosfato (P-PO₄)

Relativamente a preparo da amostras de mostos e melaços para a determinação de P-PO₄, as mesmas foram diluídas na proporção 1:100 (v/v e m/v) até atingirem o pH 3,0, obtido potenciométricamente.

3.3. Reagentes e soluções

Para o desenvolvimento dos diversos procedimentos analíticos descritos neste trabalho, as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água destilada/desionizada.

3.3.1. Soluções empregadas na determinação de glicose, frutose e glicerol

- Soluções-padrão estoque 10,0 % (m/v) de glicose e frutose. As mesmas eram mantidas sob refrigeração sendo equilibrada termicamente com o ambiente imediatamente antes de seu uso.
- Soluções-padrão 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 % (m/v) de glicose e frutose de mesmas concentrações. Preparadas por diluições da solução-padrão estoque acima em água.
- Solução-padrão estoque 10,0 % (v/v) de glicerol. Preparada medindo-se 10,0 mL de glicerol, transferindo-se para um balão volumétrico de 100 mL e, após dissolução em aproximadamente 50 mL de água, completando-se o volume com água.
- Soluções-padrão 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 % (v/v) de glicerol. Preparadas por diluições da solução-padrão estoque acima.
- Soluções 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 % (m/v) metaperiodato de sódio. Preparadas dissolvendo-se 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 g NaIO₄ em 50 mL de solução tampão pH 4,3; 6,8 e 9,0. As soluções eram transferidas separadamente para balões volumétricos de 100 mL e o volume era completado com a solução tampão desejada.

- Soluções 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 % (m/v) iodeto de potássio. Preparadas diariamente dissolvendo-se 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 g KI em 50 mL das soluções-tampão pH 4,3; 6,8 e 9,0 (descritas no item 3.3.4.4.). As soluções eram transferidas separadamente para balões volumétricos de 100 mL e o volume era completado com a solução tampão desejada.
- Soluções-padrão mistas de concentrações expressas em % (m/v) para glicose e frutose e % (v/v) para glicerol. Estas soluções foram definidas segundo um planejamento fatorial completo com 2 níveis de concentração para glicose, frutose e glicerol (Tabela 4).
- O conjunto de calibração e validação compreendeu as soluções especificadas na Tabela 5.

3.3.2. Soluções empregadas na determinação de açúcares redutores totais

Para a implementação da hidrólise em linha da sacarose, foram preparadas as seguintes soluções:

- Soluções 1,00 mol L⁻¹ HCl e 10,0 mol L⁻¹ NaOH. Soluções 0,05; 0,10; 0,25 e 0,50 mol L⁻¹ HCl e NaOH de mesmas concentrações foram preparadas por diluições das soluções acima com água.
- Solução 0,10 mol L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio. Preparada dissolvendo-se 5,60 g de KNaC₄H₄O₆·4H₂O em 200 mL de água desionizada.
- Soluções-padrão estoque 2,00 % (m/v) de glicose e frutose. As mesmas eram mantidas sob refrigeração sendo equilibrada termicamente com o ambiente imediatamente antes de seu uso.
- Soluções-padrão 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 % (m/v) de glicose e frutose de mesmas concentrações. Preparadas por diluições das soluções-padrão estoque acima.
- Solução-padrão estoque 1,00 % (m/v) de açúcar invertido. Preparada conforme procedimento similar ao proposto por Honig (1969) pesando-se 9,50 g de sacarose, transferindo-se para um balão volumétrico de 1000 mL contendo aproximadamente 100 mL de água. Após dissolução, foram adicionados 25 mL de solução 0,75 mol L⁻¹ HCl. A solução foi

aquecida a 65 °C durante 60 min e, posteriormente, resfriada à temperatura ambiente. Em seguida aproximadamente 25 mL de solução 0,75 mol L⁻¹ NaOH foram adicionados, até obtenção de pH 3,0 ajustado potencio-metricamente. O volume do balão volumétrico foi completado com água e a solução foi mantida sob refrigeração.

- Soluções-padrão de trabalho 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 % (m/v) de açúcar invertido. Preparadas por diluições da solução-padrão estoque em água.

Soluções empregadas para melhoria em seletividade:

- Soluções 1,00 % (m/v) em ácido láctico e rafinose. Preparadas nas mesmas condições das soluções-padrão e amostras. Soluções 0,01; 0,03; 0,05; 0,10 e 0,20 % (m/v) dessas espécies químicas foram preparadas por diluições das soluções acima.
- Soluções 1,00 % (v/v) de etanol e glicerol. Preparadas medindo-se 1,00 mL de etanol e glicerol, transferindo-se para um balão volumétrico de 100 mL e, após dissolução em aproximadamente 50 mL de água, completando-se o volume com água. Soluções 0,05; 0,07; 0,10 e 0,40 % (v/v) de etanol e glicerol foram preparadas por diluições da solução acima.
- Soluções com íons inorgânicos potencialmente interferentes, 1,00 % (m/v) Al(III), Mg(II), Fe(III), Cu(II), P-PO₄ e sulfato preparadas nas mesmas condições das soluções-padrão e amostras. Soluções 0,02; 0,05; 0,07; 0,10; 0,20 e 0,40 % (m/v) dessas espécies químicas foram preparadas por diluições das soluções acima.

3.3.3. Soluções empregadas na determinação de etanol

- Solução-padrão de trabalho 0,01; 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 % (v/v) etanol. Preparadas a partir da diluição de etanol (ca 96 % v/v) em água, com aplicação de correção a 100 % (v/v).

- Soluções 0,01; 0,05; 0,10; 0,15 mol L⁻¹ dicromato de potássio. Preparadas pesando-se 0,73; 3,60; 7,35; 11,0 g K₂Cr₂O₇, transferindo-se para um balão volumétrico de 250 mL. As mesmas eram dissolvidas separadamente em soluções de ácido sulfúrico de concentrações que variaram de 0,10 a 2,00 mol L⁻¹.

3.3.4. Soluções empregadas na determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO₄)

3.3.4.1. Determinação de alumínio

- Solução-padrão estoque 0,50 mg L⁻¹ cromazurol S (C₂₃H₁₃ClO₉SN₃). Preparada dissolvendo-se 0,50 mg cromazurol S em 1000 mL de água.
- Soluções 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,10 mg L⁻¹ (C₂₃H₁₃ClO₉SN₃) cromazurol S. Preparadas por diluições da solução estoque em 10 mL de solução 0,10 mol L⁻¹ HNO₃.
- Solução-padrão estoque 1000 mg L⁻¹ Al(III) (Titrisol). Preparada dissolvendo-se 1000 mg de nitrato de alumínio [Al(NO₃)₃] em solução 0,50 mol L⁻¹ HNO₃. O volume de 1000 mL era completado com água.
- Soluções 0,10; 0,30; 0,50; 0,70; 0,90; 1,00 mg L⁻¹ Al(III). Preparadas por diluições da solução estoque acima em solução 1,0.10⁻⁵ mol L⁻¹ HNO₃.
- Solução 2,00 % (m/v) de hexamina. Preparada dissolvendo-se 2,00 g hexamina ((CH₂)₆N₄) em 100 mL de água.
- Soluções contendo espécies químicas potencialmente interferentes: preparadas a partir de soluções-padrão estoque 1000 mg L⁻¹ Ca(II), Mg(II) e Fe(III). Estas soluções foram diluídas para 0,005; 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 1,00 mg L⁻¹ Ca(II), 0,001; 0,002; 0,005; 0,01 mg L⁻¹ Mg(II) e 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 mg L⁻¹ Fe(III).

Soluções empregadas para melhoria em seletividade:

- Solução em ácido ascórbico (descrita no item 3.3.4.4.)
- Solução-padrão estoque 1,00 % (m/v) em citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Preparada dissolvendo-se 1,0g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água.
- Soluções 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 (m/v) $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Preparadas por diluições da solução estoque acima.
- Solução 1,00 % (m/v) em glicose. Preparada dissolvendo-se 1,00 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ em 100 mL de água.

3.3.4.2. Determinação de ferro

- Solução-padrão estoque 0,50 % (m/v) 1,10-fenantrolina. Preparada dissolvendo-se 0,50 g 1,10-fenantrolina em 100 mL de água.
- Soluções 0,01; 0,02; 0,05; 0,10 % (m/v) 1,10-fenantrolina. Preparadas por diluições da solução estoque em 100 mL de solução 0,10 mol L⁻¹ HNO_3 .
- Solução-padrão estoque 1000 mg L⁻¹ Fe(III). Soluções 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,0; 12,5; 15,0; 20,0; 25,0 mg L⁻¹ Fe(III). Preparadas por diluições da solução estoque acima em solução 1.10⁻⁴ mol L⁻¹ HNO_3 .
- Soluções contendo espécies químicas potencialmente interferentes: preparadas a partir de soluções-padrão estoque 1000 mg L⁻¹ Ca(II), K(I) e Al(III). Estas soluções foram diluídas para 5,00; 7,50; 10,0 mg L⁻¹ Ca(II), 5,00; 10,0; 20,0; 40,0 mg L⁻¹ K(I) e 3,00; 5,00; 7,00; 10,0 mg L⁻¹ Al(III).
- Solução em ácido ascórbico (descrita no item 3.3.4.4.)

Soluções empregadas para melhoria em seletividade:

- Solução-padrão estoque 2,00 % (m/v) ácido etilenodiaminotetracético ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Preparada dissolvendo-se 2,00 g $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água.

- Soluções 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 (m/v) $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$. Preparadas por diluições da solução estoque acima.
- Solução-padrão estoque 5,0 % (m/v) tetrafenilborato de sódio ($C_{24}H_{20}BNa$). Preparada dissolvendo-se 5,00 g $C_{24}H_{20}BNa$ em 100 mL de água.
- Soluções 0,50; 1,50; 3,00; 5,0 % (m/v) $C_{24}H_{20}BNa$. Preparadas por diluições da solução estoque acima.

3.3.4.3. Determinação de fosfato (P- PO_4)

- Solução-padrão estoque 1000 mg L^{-1} P- PO_4 . Preparada dissolvendo-se 4,39 g KH_2PO_4 em 100 mL de água e, após dissolução, completando-se o volume até 1000 mL de água. Esta solução foi mantida sob refrigeração.
- Soluções 2,50; 5,00; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 60,0 % (m/v) P- PO_4 . Preparadas por diluições da solução estoque em 100 mL de solução 0,10 mol L^{-1} HNO_3 .
- Solução estoque reagente 1,00 % (m/v) $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$. Preparada dissolvendo-se 1,00 g $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ heptamolibdato de amônio em 100 mL de solução 0,10 mol L^{-1} HNO_3 .
- Soluções 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 % (m/v) $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ heptamolibdato de amônio. Preparadas por diluições da solução estoque em 100 mL de solução 0,10 mol L^{-1} HNO_3 .
- Solução 2,00 mol L^{-1} HNO_3 . Preparada diluindo-se 22,3 mL HNO_3 (18 % v/v) em 200 mL de água. As soluções 0,05; 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 mol L^{-1} HNO_3 foram preparadas por diluições da solução acima com água.
- Solução em ácido ascórbico (descrita no item 3.3.4.4.)

- Solução contendo espécie química potencialmente interferente: preparada a partir de solução-padrão estoque $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}$. Esta solução foi diluída para $0,10$; $0,50$; $0,70$; $0,90$; $1,20 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}$.

Solução empregada para melhoria em seletividade:

- Solução $0,50 \%$ (m/v) em oxalato de potássio ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$). Preparada dissolvendo-se $0,50 \text{ g}$ ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$) em 100 mL de água.

3.3.4.4. Demais soluções

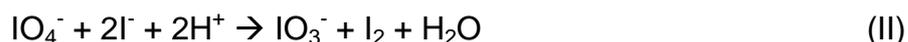
- Solução-tampão acetato pH 4,3. Preparada misturando-se $25,5 \text{ mL}$ de solução $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ácido acético (H_3CCOOH), $24,5 \text{ mL}$ de solução $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ acetato de sódio (H_3CCOONa) diluídos em 100 mL de água (PERRIN; DEMPSEY, 1974).
- Solução-tampão fosfato pH 6,8. Preparada misturando-se $24,5 \text{ mL}$ de solução $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), $25,5 \text{ mL}$ de solução fosfato monobásico de sódio dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) diluídos em 100 mL de água (PERRIN; DEMPSEY, 1974).
- Solução-tampão borato pH 9,0. Preparada misturando-se 50 mL de solução $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), $4,60 \text{ mL}$ $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ HCl diluídos para 100 mL de água (PERRIN; DEMPSEY, 1974).
- Solução $4,0 \%$ (m/v) em ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Preparada diariamente dissolvendo-se $8,00 \text{ g}$ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ em 200 mL de água. Esta solução era mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração sendo equilibrada termicamente com o ambiente imediatamente antes de seu uso.
- Soluções $0,05$; $0,125$; $0,25$; $0,50$; $1,00$; $2,00 \%$ (m/v) ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Preparadas por diluições da solução estoque acima.

4. MÉTODOS

A seguir, são descritos os procedimentos analíticos empregados para a determinação de glicose, frutose e glicerol, açúcares redutores totais e etanol em sistemas de multi-impulsão (MPFS) e a determinação de alumínio, ferro e fosfato em sistemas de interface única (SIFA).

4.1. Determinação de glicose, frutose e glicerol

O método espectrofotométrico selecionado para a determinação de glicose, frutose e glicerol é baseado na oxidação dos açúcares redutores e glicerol por metaperiodato. Após a adição de solução de KI, o periodato remanescente em condições neutras, oxida iodeto a iodo e, em função da alta solubilidade deste em solução aquosa de iodeto de potássio, ocorre formação de íons triiodeto $[I_3^-]$, espectrofotometricamente monitorados. As equações das reações envolvidas são apresentadas como: (HERNANDEZ-MENDEZ et al., 1986).



Como o iodato não oxida iodeto em meio neutro, este meio deve ser mantido empregando-se solução-tampão. Sob condições onde a reação (I) se processa estequiometricamente, a quantidade de iodeto consumido é equivalente ao periodato não reduzido. Considerando-se que o consumo de iodeto é facilmente avaliado pela subtração da quantidade de iodeto remanescente inicial, é possível a determinação de IO_4^- .

Neste trabalho, foi explorada a diferença em taxas de oxidação de glicose, frutose e glicerol. Assim, um sistema MPFS foi projetado de forma que a discriminação entre os analitos fosse investigada (Figura 16), no qual os principais parâmetros reacionais foram avaliados com o intuito de se obter um procedimento

analítico adequado, que representasse uma contribuição significativa para as determinações multicomponentes. Este sistema compreendia três bombas solenóide com volumes de 6 μL por pulso, as quais eram acionadas de forma a direcionar as soluções correspondentes para um único ponto de confluência.

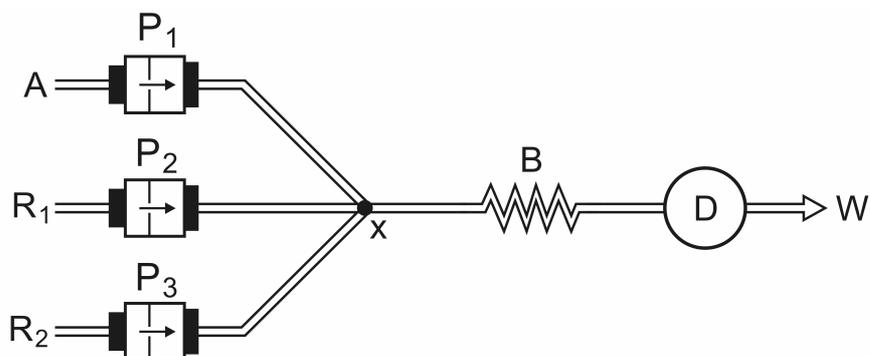


Figura 16. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para glicose, frutose e glicerol. A: amostra; R₁: 0,10 % (m/v) NaIO₄; R₂: 0,05 % (m/v) KI; P_i = bombas solenóide; B: bobina de reação (25 cm); D: detector (450 nm); x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte

Antes de se iniciar o procedimento, todas as bombas solenóide eram acionadas para preenchimento de seu interior e das linhas de transmissão até o ponto de confluência. Após preenchimento, P₃ era acionada e R₂ (iodeto de potássio) era inserido no percurso analítico (30 pulsos, 0.15 s) até a estabilização da linha base. Em seguida, P₂ e P₁, responsáveis pela inserção simultânea de R₁ (metaperiodato de sódio) e amostra, eram acionadas (5 pulsos, 0.15 s) para a etapa de oxidação. Logo em seguida, P₃ era novamente acionada (10 pulsos, 0.15 s) para o transporte da zona de amostra em direção ao detector passando pelo reator. Os procedimentos operacionais do sistema estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Procedimento para a determinação de glicose, frutose e glicerol.

Operação	Bomba solenóide (volume/pulso)	Pulsos (n)	Frequência (s)
1. Inserção do reagente	P ₃ (230 µL)	30	0.15
2. Inserção da zona de amostra	P ₁ (38 µL) + P ₂ (38 µL)	5	0.15
3. Transporte ao detector e limpeza do percurso analítico	P ₃ (75 µL)	10	0.15

Durante o transporte ocorre a dispersão da amostra, formando gradientes de concentração de R₁ ao longo desta. A formação do produto reacional colorido predominava no início e fim da zona de amostra em função da menor concentração de R₁ no centro da mesma, não havendo sobreposição total destas duas zonas. Assim, a cada fração da zona de amostra correspondia um intervalo de tempo para o desenvolvimento da reação indicadora, concentrações específicas e um diferente grau de dispersão. Desta forma, era permitida a diferenciação entre os analitos. A passagem da zona de amostra pelo detector resultava em um aumento na absorbância monitorada registrado sob forma de pico, cuja altura refletia as concentrações dos analitos.

Estudos preliminares para a obtenção dos espectros de cada analito em três valores de pH, com objetivo de selecionar o comprimento de onda de trabalho foram conduzidos. Nestes estudos, foram inseridas no sistema (Figura 16) soluções 0,10 % (m/v) de glicose, frutose e glicerol.

Outros parâmetros, tais como a acidez, comprimento de reator, concentração dos reagentes, vazão total, intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento reacional foram também avaliados. Nestes estudos, um planejamento fatorial foi necessário. Para a avaliação dos parâmetros mencionados, foram compostas soluções-padrão mistas em glicose, frutose e glicerol, cujas concentrações foram discriminadas considerando as respectivas faixas de linearidade de cada analito. Soluções-padrão monoanalito de glicose, frutose e glicerol de concentrações variando entre 0,10 e 4,0 % (m/v) foram inseridas no sistema (Figura 16) para o estudo da linearidade.

O planejamento fatorial completo (2^6) foi conduzido explorando-se os níveis máximo (+) e mínimo (-) de cada parâmetro reacional, com objetivo de se verificar a importância de cada um e suas possíveis interações. Desta forma, foram realizados 64 experimentos com três replicatas cada. Os níveis (+) e (-) adotados em cada experimento (Tabela 5) foram selecionados levando-se em conta estudos preliminares conduzidos pelo método univariado.

Tabela 5. Planejamento fatorial completo para 6 variáveis avaliadas no sistema da Figura 16. Dados em mL min⁻¹, pulsos, cm e %(m/v) para vazão, volume de amostra e concentrações de NaIO₄ e KI, respectivamente

Amostra	Vazão	Volume de amostra	Reator	NaIO ₄	KI	pH	
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	
4	1	1	-1	-1	-1	-1	
5	-1	-1	1	-1	-1	-1	
6	1	-1	1	-1	-1	-1	
7	-1	1	1	-1	-1	-1	
8	1	1	1	-1	-1	-1	
9	-1	-1	-1	1	-1	-1	
10	1	-1	-1	1	-1	-1	
11	-1	1	-1	1	-1	-1	
12	1	1	-1	1	-1	-1	
13	-1	-1	1	1	-1	-1	
14	1	-1	1	1	-1	-1	
15	-1	1	1	1	-1	-1	
16	1	1	1	1	-1	-1	
17	-1	-1	-1	-1	1	-1	
18	1	-1	-1	-1	1	-1	
19	-1	1	-1	-1	1	-1	
20	1	1	-1	-1	1	-1	
21	-1	-1	1	-1	1	-1	
22	1	-1	1	-1	1	-1	
23	-1	1	1	-1	1	-1	
24	1	1	1	-1	1	-1	
25	-1	-1	-1	1	1	-1	
26	1	-1	-1	1	1	-1	
27	-1	1	-1	1	1	-1	
28	1	1	-1	1	1	-1	
29	-1	-1	1	1	1	-1	
30	1	-1	1	1	1	-1	
31	-1	1	1	1	1	-1	
32	1	1	1	1	1	-1	
Legenda	-1*	0,15	3	10	0,05	0,05	4,3
	1*	0,25	10	50	0,1	0,1	9,0

*Os números -1 e 1 se referem aos valores menores e maiores dos parâmetros avaliados.

Amostra	Vazão	Volume de amostra	Reator	NaIO ₄	KI	pH	
33	-1	-1	-1	-1	-1	1	
34	1	-1	-1	-1	-1	1	
35	-1	1	-1	-1	-1	1	
36	1	1	-1	-1	-1	1	
37	-1	-1	1	-1	-1	1	
38	1	-1	1	-1	-1	1	
39	-1	1	1	-1	-1	1	
40	1	1	1	-1	-1	1	
41	-1	-1	-1	1	-1	1	
42	1	-1	-1	1	-1	1	
43	-1	1	-1	1	-1	1	
44	1	1	-1	1	-1	1	
45	-1	-1	1	1	-1	1	
46	1	-1	1	1	-1	1	
47	-1	1	1	1	-1	1	
48	1	1	1	1	-1	1	
49	-1	-1	-1	-1	1	1	
50	1	-1	-1	-1	1	1	
51	-1	1	-1	-1	1	1	
52	1	1	-1	-1	1	1	
53	-1	-1	1	-1	1	1	
54	1	-1	1	-1	1	1	
55	-1	1	1	-1	1	1	
56	1	1	1	-1	1	1	
57	-1	-1	-1	1	1	1	
58	1	-1	-1	1	1	1	
59	-1	1	-1	1	1	1	
60	1	1	-1	1	1	1	
61	-1	-1	1	1	1	1	
62	1	-1	1	1	1	1	
63	-1	1	1	1	1	1	
64	1	1	1	1	1	1	
Legenda	-1*	0,15	3	10	0,05	0,05	4,3
	1*	0,25	10	50	0,1	0,1	9,0

*Os números -1 e 1 se referem aos valores menores e maiores dos parâmetros avaliados

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial, o método univariado foi conduzido com o objetivo de selecionar o volume de amostra e concentração hidrogeniônica que melhor condicionasse os gradientes de concentração e resultasse num modelo de calibração com boa capacidade preditiva. Os modelos matemáticos foram construídos e avaliados.

Para tanto, avaliaram-se os volumes de 25 a 60 μ L e as concentrações cujos valores de pH correspondiam a 4,3 e 9,0 empregados em ambos R₁ e R₂. Nestes estudos, foram utilizadas 27 soluções-padrão mistas contendo os analitos em diferentes concentrações (Tabela 6). Para a construção dos modelos de validação e

calibração, foram utilizadas 9 e 18 soluções-padrão mistas, respectivamente. As amostras de validação foram selecionadas aleatoriamente.

Tabela 6. Concentrações de glicose, frutose e glicerol nas soluções-padrão utilizadas para a calibração e validação do modelo. Dados em % (m/v). As soluções marcadas por * foram empregadas na etapa de validação do modelo

Amostra	Glicose	Frutose	Glicerol
1	0,1	0,1	0,1
2*	0,25	0,1	0,1
3	0,5	0,1	0,1
4	0,1	0,25	0,1
5	0,25	0,25	0,1
6	0,5	0,25	0,1
7*	0,1	0,5	0,1
8*	0,25	0,5	0,1
9	0,5	0,5	0,1
10*	0,1	0,1	0,25
11*	0,25	0,1	0,25
12	0,5	0,1	0,25
13*	0,1	0,25	0,25
14	0,25	0,25	0,25
15	0,5	0,25	0,25
16	0,1	0,5	0,25
17*	0,25	0,5	0,25
18	0,5	0,5	0,25
19*	0,1	0,1	0,5
20	0,25	0,1	0,5
21	0,5	0,1	0,5
22	0,1	0,25	0,5
23	0,25	0,25	0,5
24*	0,5	0,25	0,5
25	0,1	0,5	0,5
26	0,25	0,5	0,5
27	0,5	0,5	0,5

Esta etapa da otimização foi realizada utilizando-se PLS. Antes de se construir o modelo, as matrizes X e Y eram centradas na média e avaliadas segundo validação cruzada com o intuito de verificar a habilidade, para posteriores previsões (MARTENS; NAES, 1989). O número de variáveis latentes a ser incluído no modelo matemático era selecionado considerando-se a porcentagem de variância (informação retida em cada variável associada ao RMSEP). Os modelos foram

construídos utilizando-se de 2 a 4 variáveis latentes empregando-se valores de concentrações e parâmetros físicos da Tabela 5, afim de definir a condição adequada que resultasse em melhor precisão.

O critério utilizado para o dimensionamento do sistema foi o modelo matemático resultante associado à otimização dos parâmetros envolvidas. Este deveria apresentar ou capacidade preditiva que resultasse em erros menores que 5 %.

Após a otimização dos parâmetros envolvidos, o sistema MPFS proposto foi aplicado à análise de caldos de cana-de-açúcar e vinhos fermentescíveis, a capacidade de previsão dos modelos de calibração foi comparada com curvas de correlação entre os valores previstos pelo método proposto e aqueles obtidos por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD). Para este estudo, construiu-se um modelo com 28 amostras de calibração e 9 de validação (Tabela 7). As amostras de validação foram processadas em triplicata.

Tabela 7. Concentrações de glicose, frutose e glicerol nas soluções-padrão utilizadas para a calibração e validação do modelo empregado em amostras de caldo de cana-de-açúcar e vinho. Dados em % (m/v). As soluções marcadas por * foram empregadas na etapa de validação do modelo

Amostra	Glicose	Frutose	Glicerol
1	0,1	0,1	0,1
2	0,25	0,1	0,1
3	0,5	0,1	0,1
4	0,1	0,25	0,1
5	0,25	0,25	0,1
6	0,5	0,25	0,1
7	0,1	0,5	0,1
8	0,25	0,5	0,1
9	0,5	0,5	0,1
10	0,1	0,1	0,25
11	0,25	0,1	0,25
12	0,5	0,1	0,25
13	0,1	0,25	0,25
14	0,25	0,25	0,25
15	0,5	0,25	0,25
16	0,1	0,5	0,25
17	0,25	0,5	0,25
18	0,5	0,5	0,25
19	0,1	0,1	0,5
20	0,25	0,1	0,5
21	0,5	0,1	0,5
22	0,1	0,25	0,5
23	0,25	0,25	0,5
24	0,5	0,25	0,5
25*	0,1	0,5	0,5
26*	0,25	0,5	0,5
27*	0,5	0,5	0,5
28	0,4	0,30	0,30
29*	0,6	0,30	0,30
30	0,4	0,60	0,30
31*	0,6	0,60	0,30
32*	0,4	0,30	0,30
33*	0,6	0,30	0,60
34*	0,4	0,60	0,60
35	0,6	0,60	0,60
36*	0,4	0,30	0,60
37	0,6	0,30	0,60

4.2. Determinação de açúcares redutores totais

4.2.1. Análises por injeção em fluxo para Açúcares Redutores (AR)

O sistema de análises por injeção em fluxo cujo diagrama de fluxos é apresentado na Figura 17 foi projetado para se investigar os principais parâmetros relacionados às características da degradação alcalina e à determinação espectrofotométrica de AR. As soluções-padrão de sacarose foram hidrolisadas previamente de maneira tradicional (HONIG, 1969).

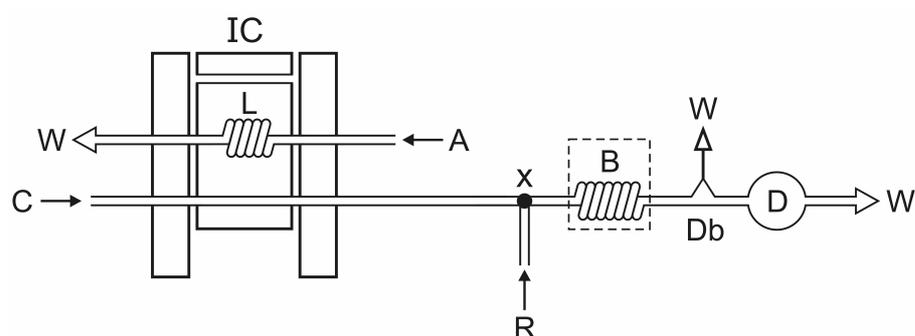


Figura 17. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de AR. A: amostra (0,00 – 2,00 % m/v glicose, frutose e sacarose invertida); C: água ($0,8 \text{ mL min}^{-1}$); R: $2,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ($0,8 \text{ mL min}^{-1}$); IC = injetor-comutador; B: bobina de reação (400 cm) imersa em água fervente sob refluxo; L = alça de amostragem ($500 \mu\text{L}$); Db: desborbulhador; D: detector (420 nm); x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte

A amostra era inserida em um fluxo transportador (água) pelo injetor-comutador, originando uma zona de amostra, a qual confluiu com o reagente no ponto x. Desta forma, ocorria a alcalinização da zona de amostra e a degradação dos açúcares redutores, a qual prosseguia na bobina de reação imersa em banho termostaticado contendo água em ebulição a $98 \text{ }^\circ\text{C}$ (determinada termo-metricamente), onde ocorria a formação dos produtos coloridos da degradação alcalina (YANG; MONTGOMERY, 2003). A amostra processada fluía então através do desborbulhador e, após remoção das bolhas de ar resultantes do aquecimento, passava pelo detector. Isto resultava em uma variação transitória da absorbância, a qual era quantificada e registrada em forma de pico, cuja magnitude era proporcional ao teor de AR. Em seguida, a amostra era dirigida ao frasco de coleta e descarte.

Os principais parâmetros investigados empregando-se o sistema da Figura 17 foram: comprimento de onda, tempo de parada de fluxo, comprimento do reator e volume de amostra.

Os espectros de absorção referentes às espécies envolvidas no ambiente reacional foram obtidos para se definir o comprimento de onda de trabalho. Para isto, foi realizada uma varredura espectral na faixa de 260 a 440 nm, a fim de se comparar os coeficientes de absorção dos produtos da degradação alcalina da glicose e da frutose. Neste estudo, soluções-padrão 0,05 % (m/v) em glicose ou em frutose foram injetadas em triplicata.

Com objetivo de confirmar a existência de várias espécies químicas como produtos da degradação alcalina, uma análise espectral mais detalhada foi conduzida. O mesmo sistema foi empregado, e os espectros se restringiram à faixa de 405 a 435 nm. Nestes experimentos, soluções-padrão 0,10 % (m/v) de glicose e frutose eram injetadas em situação de “volume infinito” (KRUG et al., 1981), e a vazão total do sistema foi variada entre 4,5 e 13,5 mL min⁻¹.

Para avaliação da influência do tempo disponível para degradação alcalina, foram realizados experimentos utilizando a estratégia “sample stopping” (RUZICKA; HANSEN, 1979). Inicialmente, soluções-padrão de glicose e frutose 0,50 % (m/v) eram injetadas no sistema sem interrupção do funcionamento da bomba peristáltica. Em seguida, a amostra era novamente injetada e, no instante de maior absorbância (máximo sinal analítico, ca 50 s após a injeção) a bomba peristáltica era desligada por 10, 30 e 60s interrompendo o fluxo das soluções.

Alternativamente, o tempo de residência da amostra no sistema, proporcional ao intervalo de tempo disponível para interação amostra / reagente, foi avaliado variando-se a vazão total entre 4,5 e 13,5 mL min⁻¹.

O comprimento do reator está também relacionado com o intervalo de tempo disponível para a degradação alcalina e com a dispersão. Para avaliação da influência desse parâmetro, o comprimento do reator foi variado entre 100 e 500 cm, o que corresponde a volumes internos de reatores de aproximadamente 500 e 2500 µL.

Para se investigar a influência do volume de amostra os comprimentos das alças de amostragem foram variados entre 40 e 80 cm (200 e 400 µL).

4.2.2. Análises por injeção em fluxo para açúcares redutores totais (ART)

Como a determinação de ART requer hidrólise da sacarose, foi projetado um sistema incluindo hidrólise em linha da sacarose (Figura 18), sendo o mesmo empregado para se investigar os principais parâmetros envolvidos.

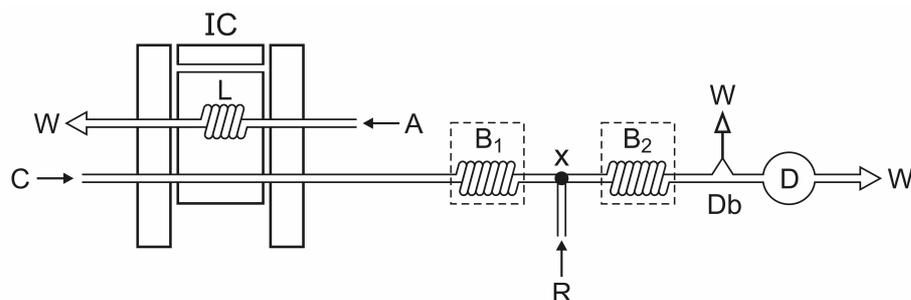


Figura 18. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de ART. A: amostra; C: $0,50 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ ($0,8 \text{ mL min}^{-1}$); R: $2,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ($0,8 \text{ mL min}^{-1}$); IC = injetador-comutador; B₁ e B₂: bobinas de hidrólise e de degradação alcalina (250 e 400 cm) imersas em água fervente sob refluxo; L = alça de amostragem ($500 \mu\text{L}$); Db: desborbulhador; D: detector (420 nm); x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte

A alíquota da solução de sacarose selecionada pela alça de amostragem era inserida no fluxo transportador. A mistura passava através de B₁, mergulhada em um elemento aquecedor contendo água em ebulição, onde ocorria a hidrólise ácida parcial e reprodutível da sacarose. A seguir, a amostra atingia o ponto de confluência x sendo alcalinizada e participando das etapas já mencionadas no item 4.2.1.

Neste sistema, foram avaliadas as principais figuras de mérito analítico, tais como precisão, consumo de reagente, linearidade da curva analítica e velocidade analítica.

Com objetivo de se avaliar a influência do regime de escoamento no método a ser proposto, foram comparados os desempenhos do sistema de análises por injeção em fluxo da Figura 19 com um sistema similar explorando multi-impulsão (Figura 20).

Estes sistemas diferiam entre si apenas quanto à unidade propulsora de fluidos, sendo que os demais parâmetros foram mantidos. Eles eram caracterizados por fluxo constante ou pulsado, e por regime de escoamento laminar ou tendendo a

turbulento (FORTES et al., 2009). Ambos os sistemas permitiam a implementação de amostragem binária (REIS et al., 1994).

No sistema da Figura 19, a bomba peristáltica permanecia ligada, bombeando continuamente as soluções reagente e amostra, as quais eram recicladas quando as válvulas solenóide permaneciam desligadas. Estas eram acionadas individual e/ou simultaneamente, através de uma interface PCL-711 Advantech. A programação era realizada em linguagem Quick Basic 4.5, que selecionava cada válvula pelo seu respectivo “bit”, e a acionava durante um intervalo de tempo fixo de 150 ms.

Segmentos de amostra e de reagente ($25 \mu\text{L}$; $1,74 \text{ mL min}^{-1}$) eram inseridos por amostragem binária no reator B. Quando a zona de amostra passava por B, sob aquecimento, ocorria interação eficiente entre os segmentos, resultando em alcalinização da amostra e degradação dos carboidratos. Posteriormente, a amostra era processada conforme descrito no ítem 4.2.1. Com esta estratégia, foi possível reduzir o consumo de reagente.

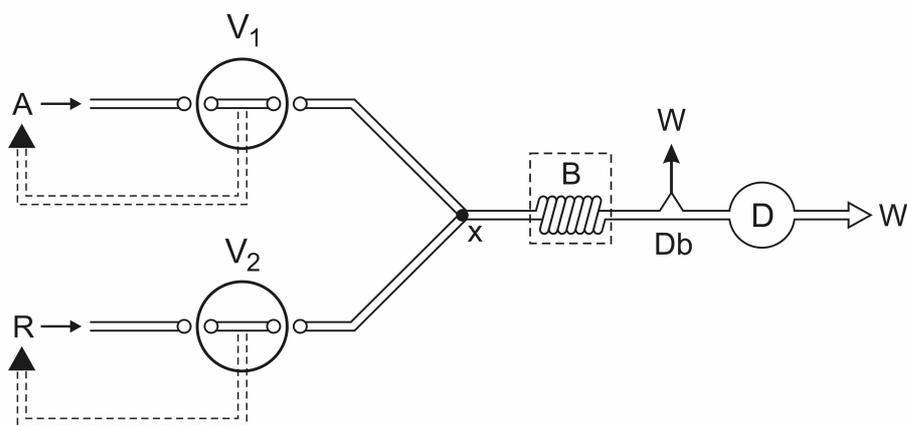


Figura 19. Diagrama de fluxos do sistema MCFA para AR. A: amostra (0,00 – 2,00 % m/v glicose ou frutose, $2,4 \text{ mL min}^{-1}$); R: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ($2,4 \text{ mL min}^{-1}$); V_1 e V_2 = válvulas solenóide; B: bobina de reação (400 cm) imersa em água fervente sob refluxo; Db: desborbulhador; D: detector (420 nm); x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte

No sistema da Figura 20, sucessivos plugues de amostra e de reagente ($1,74 \text{ mL min}^{-1}$) eram inseridos no reator principal por amostragem binária empregando-se bombas solenóide. Os demais processos envolvidos eram essencialmente os mesmos referentes ao sistema da Figura 19.

As bombas solenóide utilizadas nesse estudo apresentavam volumes fixos de pulso de 20 μL , correspondendo à vazão de 4,10 mL min^{-1} (0.4 s). É importante salientar que a mistura entre reagente e amostra era melhorada em função do fluxo pulsado (LIMA et al., 2004; FORTES et al., 2009), o qual promovia melhor interação entre ambos proporcionando melhor distribuição de calor durante a passagem da zona de amostra através do reator.

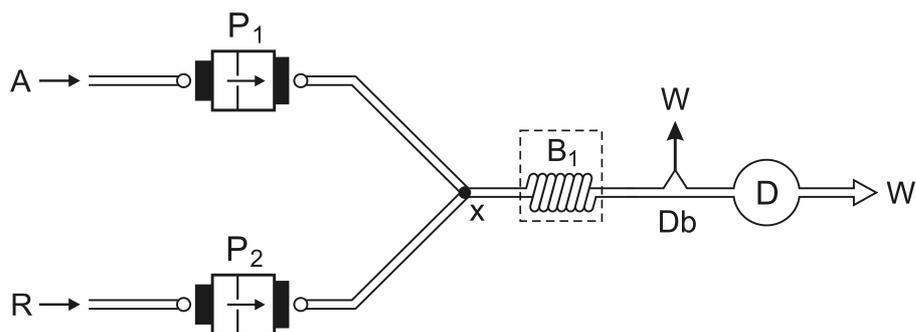


Figura 20. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para AR. A: amostra (0,00 – 2,00 % m/v glicose ou frutose, 2.4 mL min^{-1}); R: 0,1 mol L^{-1} NaOH + 0,1 mol L^{-1} NaKC₄H₄O₆ (2.4 mL min^{-1}); P_i = bombas solenóide; B: bobina de reação (400 cm) imersa em água fervente sob refluxo; Db: desborbulhador; D: detector (420 nm); x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte

Antes de iniciar o procedimento, as bombas eram acionadas inserindo água para preenchimento de seu interior e das linhas de transmissão. Em seguida, P_2 , responsável pela inserção do reagente era acionada (100 pulsos) até estabilização da linha base.

O procedimento analítico se iniciava com a inserção simultânea de 30 pulsos de amostra + reagente acionando-se P_1 e P_2 .

Outras estratégias de amostragem foram avaliadas, tais como a inserção de uma única alíquota de amostra no fluxo transportador / reagente, estabelecendo-se a seqüência reagente / amostra / reagente. Independentemente do número de pulsos de amostra e de reagente (Tabela 8), essa estratégia resultou em uma ineficiente interação amostra / reagente ocasionando a formação de picos duplos, mesmo quando o reator de 400 cm era empregado. A sensibilidade analítica foi inadequada em comparação com o sistema MCFA.

Tabela 8. Procedimento para a determinação de ART

Operação	Bomba solenóide (volume/pulso)	Pulsos (n)	Frequência (s)
1. Inserção do reagente	P ₂ (8 µL)	100	0,4
2. Inserção da zona de amostra	P ₁ (8 µL) + P ₂ (8 µL)*	30	0,4
3. Transporte ao detector e limpeza do percurso analítico	P ₂ (8 µL)	100	0,4

* admissão amostra / reagente em sequência.

O efeito da temperatura foi investigado substituindo-se o sistema com água fervente sob refluxo por um banho termostatizado contendo glicerina. Para avaliação deste parâmetro foram utilizadas soluções-padrão de glicose e frutose nas concentrações de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50 e 1,00 % (m/v). A temperatura do banho termostatizado na qual o reator era imerso foi investigada entre 70 e 98 °C. Após cada modificação na temperatura, era necessário um intervalo de 5 min para que o equilíbrio térmico fosse atingido.

A vazão foi selecionada visando se obter o melhor compromisso entre frequência de amostragem, sensibilidade analítica e consumo de reagentes. Como a mesma é proporcional a frequência de operação da bomba solenóide, frequências variando entre 0.1 e 0.7 s foram empregadas. Nestes experimentos, soluções-padrão 0,10 % (m/v) de glicose ou frutose foram utilizadas.

Para se investigar a influência da concentração dos reagentes, concentrações de NaOH variando entre 0,01 e 2,50 mol L⁻¹ foram avaliadas em R. Os demais parâmetros foram mantidos constantes.

Para a determinação de ART, é desejável que os sinais analíticos referentes à frutose e glicose sejam aditivos (MATTOS, et al., 1992). Desta forma, utilizou-se o sistema de análises em fluxo da Figura 20 utilizado para avaliar a aditividade com relação às soluções-padrão de glicose e frutose. Neste estudo, soluções-padrão de glicose e frutose, individuais ou mistas, e preparadas para cobrir a faixa entre 0,01 e 0,25 % (m/v) ART foram empregadas.

Um sistema MPFS (Figura 21) semelhante ao sistema MCFIA (Figura 19) foi proposto para a determinação de ART. Ambos diferiam quanto a unidade propulsora de fluidos. Neste sistema, soluções-padrão de sacarose 0,05; 0,125; 0,25 e 0,50 % (m/v) foram utilizadas e processadas em triplicada durante períodos prolongados (6 h) de operação.

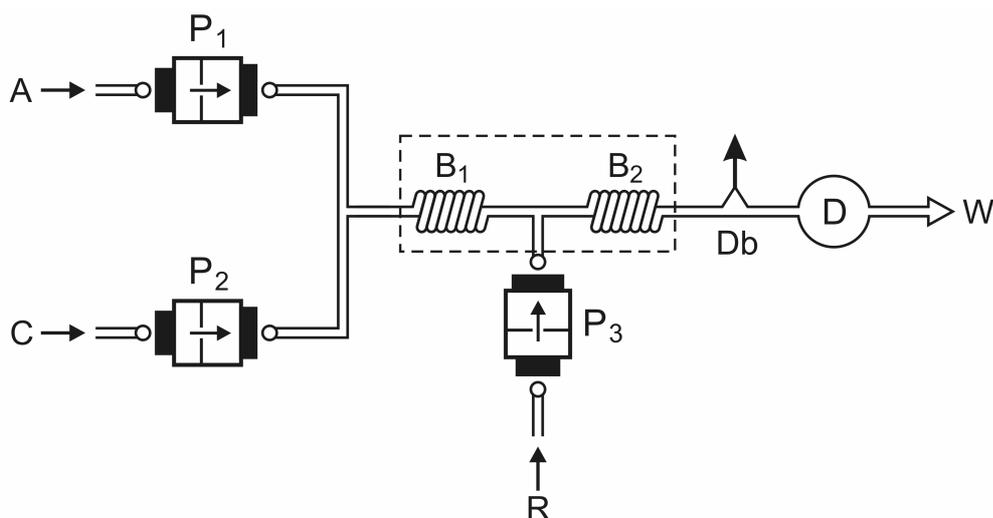
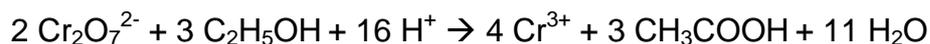


Figura 21. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para determinação de ART. A: amostra; C: HCl ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$; $3,8 \text{ mL min}^{-1}$; R: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$; $3,8 \text{ mL min}^{-1}$); P_1 , P_2 e P_3 : mini-bombas solenóide; B_1 : bobina de hidrólise (100 cm); B_2 : bobina de degradação (250 cm) imersa em água fervente sob refluxo; Db: desborbulhador; D: detector (420 nm); x = ponto de confluência; W = frasco para coleta e descarte

Após o dimensionamento, o sistema proposto (Figura 21) foi aplicado a amostras de caldo de cana-de-açúcar e melaços provenientes do processo de produção de açúcar e álcool.

4.3. Determinação de etanol

O método para a determinação de etanol em cervejas e vinhos fermentescíveis foi selecionado para a avaliação da difusão gasosa em sistemas MPFS. A reação, sob condições ácidas, envolve a redução dos íons Cr(VI) por etanol difundido através da membrana a íons Cr(III), quantificados espectrofotometricamente. A equação da reação química é (MATTOS et al., 1998):



Os principais parâmetros reacionais foram avaliados empregando-se o sistema MPFS da Figura 22. O mesmo foi projetado objetivando simplicidade em automação analítica e manuseio, permitindo um controle eficiente das etapas de amostragem e detecção. Este sistema era constituído por duas bombas solenóide com volumes fixos de 6 µL por pulso, as quais eram acionadas de forma a impulsionar as soluções de reagente e amostra em direção à câmara de difusão gasosa. Após a etapa de difusão gasosa, a bomba solenóide responsável pela impulsão do reagente era acionada e direcionava a zona de amostra ao detector. O volume de pulso inerente às bombas solenóide e as suas posições no módulo de análises foram selecionadas em função do compromisso entre simplicidade, seletividade, sensibilidade e repetibilidade. O sistema permitiu avaliar a influência da acidez do ambiente reacional, a concentração do reagente, a temperatura e o tempo de residência da zona de amostra no percurso analítico.

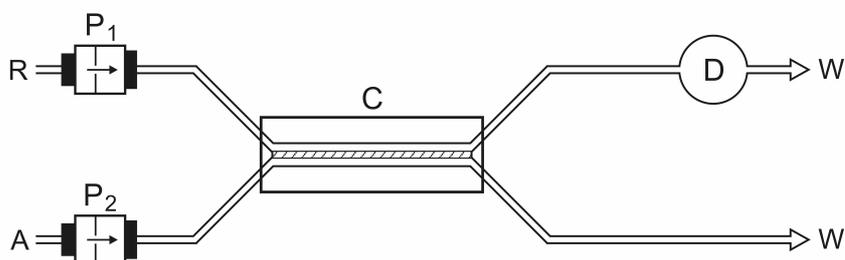


Figura 22. Diagrama de fluxos do sistema MPFS para a determinação de etanol. A = amostra (0,0 – 20,0 % (v/v) etanol); R = 0,15 mol L⁻¹ K₂Cr₂O₇ + 2,00 mol L⁻¹ H₂SO₄; P_i = bombas solenóide; C = câmara de difusão gasosa com membrana de PTFE; D = detector (600 nm); W = frasco de coleta e descarte

Inicialmente, testes em “batch” para avaliar a cinética da reação e obtenção dos espectros do produto reacional foram conduzidos.

As bombas solenóide eram acionadas para preenchimento de seu interior, linhas de transmissão, câmara de difusão gasosa e detector. Após o preenchimento, o procedimento analítico se iniciava com o acionamento de P₁ (20 pulsos, a uma frequência de pulsação de 0.15 s) para a inserção de R, com objetivo de

estabilização da linha base (etapa 1). Em seguida, P_1 era acionada simultaneamente com P_2 (5 pulsos, 3.0 s) para a inserção de A + R (etapa 2). Para o envio da zona de amostra ao detector e reestabilização da linha base, P_1 era novamente acionada (10 pulsos, 0.15 s) (etapa 3). Os procedimentos operacionais do sistema estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Procedimento para a determinação de etanol

Operação	Bomba	solenóide	Pulsos	Freqüência
	(volume/pulso)		(n)	(s)
1. Obtenção e estabilização da linha base	P_1 (160 μ L)		20	0.15
2. Inserção da zona de amostra	P_1 (40 μ L) + P_2 (40 μ L)		5	3.0
3. Transporte ao detector e aquisição do sinal analítico	P_1 (80 μ L)		10	0.15

A estratégia de amostragem binária (REIS et al., 1994), onde pulsos de amostra e reagente eram inseridos alternativamente em direção ao detector foi avaliada.

O número de pulsos para a composição da zona de amostra foi avaliado entre 5 e 25 pulsos, bem como o número de pulsos de reagente para o envio da mesma ao detector. Objetivando melhoria no desenvolvimento reacional, o comprimento do reator foi avaliado de 10 a 100 cm. Para a avaliação do efeito da velocidade de propulsão dos fluídos no desenvolvimento reacional, freqüências de pulsação entre 0.1 e 4.0 s (correspondendo as vazões de 4,95 e 1,28 mL min⁻¹) foram estudadas. Visando obter melhor difusão gasosa a estratégia da mudança de sentido dos fluxos foi estudada de modo que a solução reagente cruzasse a amostra no interior da câmara de difusão. Este estudo foi conduzido mantendo-se as mesmas condições de vazão e números de pulsos de A e R do sistema inicial (Figura 22). A influência da concentração de dicromato de potássio foi estudada variando-se R de 0,01 a 0,2 mol L⁻¹. O estudo da acidez do ambiente reacional é um importante parâmetro a ser considerado, visto que a reação de redução do Cr(VI) ocorre em condição ácida (MATTOS et al., 1998). Assim, a concentração de ácido sulfúrico foi variada de 0,10

a $2,00 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Outro parâmetro relevante a ser avaliado é a temperatura, a qual pode influenciar tanto no transporte de massa do analito, como na reação de redução (VICENTE, 2004). Desta forma, a temperatura foi variada de 20 a 60 °C empregando-se um banho termostaticado, no qual o frasco do reagente era mantido imerso.

Para a verificação da melhoria do processo de difusão gasosa, o sistema MPFS foi comparado ao sistema MCFA que emprega fluxo laminar estabelecido pela bomba peristáltica. Assim, após otimização do procedimento analítico, o mesmo foi implementado em um sistema de análise em fluxo explorando multi-comutação (Figura 23). Neste sistema, as bombas solenóide foram substituídas por válvulas solenóide e bomba peristáltica na mesma configuração do sistema MPFS. Assim, apenas a unidade propulsora foi modificada e o procedimento analítico, estratégia de amostragem, vazão e número de pulsos foram mantidos. A bomba peristáltica permanecia ligada bombeando continuamente as soluções de reagente e amostra e, para melhor comparação, o reagente era inserido a “volume infinito” (KRUG et al., 1981). Com objetivo de igualar aos volumes de cada pulso das bombas solenóide na etapa de composição da zona de amostra, o volume dos “plugs” para as soluções de amostra e reagente direcionadas por V_1 e V_2 foi calculado para $40 \mu\text{L}$, fixando-se o tempo de acionamento das válvulas solenóide em 15 s com uma vazão de $0,16 \text{ mL min}^{-1}$. Desta forma, as válvulas solenóide V_1 e V_2 eram acionadas simultaneamente inserindo 5 pulsos de $40 \mu\text{L}$ de reagente e amostra e, era realizado um reciclo das mesmas quando as válvulas solenóide permaneciam desligadas. Desta forma, ambos os sistemas apresentaram as mesmas características físicas e temporais, com mudanças apenas na unidade propulsora de fluídos.

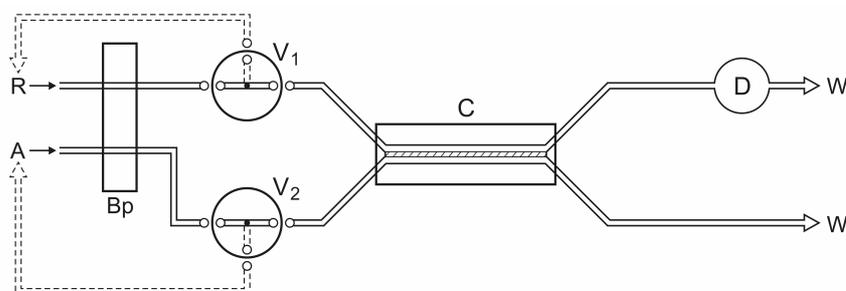


Figura 23. Diagrama de fluxos do sistema MCFA para a determinação de etanol. A = amostra (0,0 – 20,0 % (v/v) etanol); Bp = bomba peristáltica; R = $0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 2,00 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$; V_1 e V_2 = válvulas solenóide; C = câmara de difusão gasosa com membrana de PTFE; D = detector (600 nm); W = frasco de coleta e descarte

Após otimização das variáveis envolvidas, o sistema MPFS foi aplicado à análise de cervejas e vinhos fermentescíveis do setor sucro-alcooleiro.

4.4. Sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO₄)

4.4.1. Determinação de alumínio

O método empregado na determinação espectrofotométrica de alumínio em mostos e melaços se baseia na formação de complexo ternário entre cromazurol S e Al(III). A complexação entre Al(III) e cromazurol S é fortemente influenciada pelo pH, notando-se então variações pronunciadas em sensibilidade analítica quando pequenas alterações na acidez do meio reacional são efetuadas (MARCZENKO, 1976). O comprimento de onda foi selecionado como 570 nm onde se verificou maior intensidade de absorção.

Este método foi implementado no sistema SIFA (Figura 24) para a verificação da influência da interface única na melhoria em sensibilidade e repetibilidade analítica e menor consumo de reagente e amostra. O sistema de interface única era constituído por três bombas solenóide de 6 µL para A, R₁ e R₂, respectivamente. O procedimento analítico envolvido está descrito na Tabela 10. Antes do mesmo ser iniciado, todas as linhas de transmissão, bombas e válvulas solenóide eram preenchidas com as soluções de reagentes e amostra.

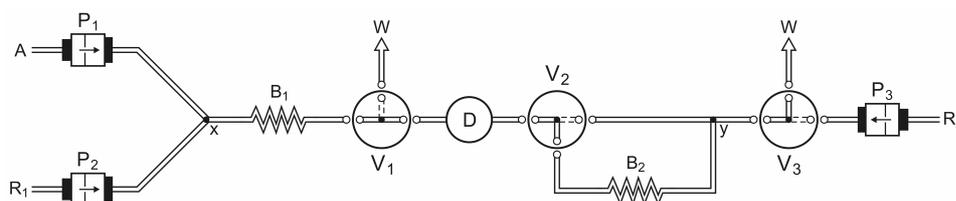


Figura 24. Diagrama de fluxos do sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro e fosfato. A = amostra; R₁ e R₂ = reagentes; P_i = bombas solenóide; V_i = válvulas solenóide; B_i = bobinas de reação; D = detector; W = frasco de coleta e descarte

Após, P₁ + P₂ (60 pulsos, 0.15 s) responsáveis pela inserção simultânea de amostra e R₁ e estabilização da linha base, eram acionadas e a zona de amostra era encaminhada em direção ao frasco de descarte conectado em V₃, sem passar por B₂

(etapa 1). Em seguida, as válvulas solenóide V_1 , V_2 e V_3 , juntamente com P_3 (20 pulsos, 0.15 s), responsável pela inserção de R_2 eram acionadas e a zona de amostra era transportada em direção ao descarte (conectado em V_1) passando pelo detector, sem passar por B_2 (etapa 2). Para a limpeza do percurso analítico e substituição da amostra, V_1 , V_2 , V_3 e P_3 eram desligadas e $P_1 + P_2$ (60 pulsos, 0.15 s) eram novamente acionadas (etapa 3).

Tabela 10. Procedimento para a determinação de alumínio no sistema SIFA (Figura 24)

Operação	Bomba (volume/pulso)	solenóide	Pulsos (n)	Frequência (s)
1. Obtenção e estabilização da linha base	P_1 (480 μ L) + P_2 (480 μ L)		60	0.15
2. Inserção da zona de amostra e Transporte ao detector	P_3 (160 μ L)		20	0.15
3. Limpeza do percurso analítico e substituição de amostra	P_1 (480 μ L) + P_2 (480 μ L)		60	0.15

Diferentes estratégias de amostragem, tais como zonas coalescentes, amostragem binária e volume único, cuja inserção era seqüencial, foram exploradas. Neste estudo, eram inseridos 10 pulsos de A e 10 pulsos R_1 . Como garantia da passagem da zona de amostra pelo detector, o volume da solução de cromazurol S foi avaliado em R_2 variando-se o número de pulsos de 10 a 50 pulsos (80 μ L a 400 μ L). Para a obtenção de melhores condições para o desenvolvimento reacional, a influência da vazão foi avaliada variando-se a frequência de pulsação de 0.10 a 0.70 s (4,95 mL min^{-1} e 0,67 mL min^{-1}). Visando confirmar a cinética da reação, foram conduzidos estudos injetando-se no sistema soluções-padrão de Al(III) e, no instante de maior absorvância (máximo de sinal analítico, ca 10 s após a injeção da amostra), P_3 era desligada interrompendo o fluxo das soluções. O tempo médio de residência da zona de amostra pode ser modificado em função das dimensões do

reator. Assim, foram estudados comprimentos de reatores referentes às duas etapas reacionais do método proposto, variando-se de 10 a 100 cm para a reação entre A e ácido ascórbico e, posteriormente os mesmos comprimentos foram avaliados para a avaliação da interface única (reação entre Al(III) e cromazurol S). O número de pulsos para a limpeza do percurso analítico foi variado entre 40 e 100 pulsos. A concentração de cromazurol S também foi avaliada, para tanto, soluções aquosas de concentrações variando entre 0,005 a 0,10 mg L⁻¹ foram inseridas em R₂. Em seguida, foi avaliada a acidez em R₂ dissolvendo-se inicialmente cromazurol S em água, hexamina e solução-tampão acetato em diferentes valores de pH que variaram entre 1,0 e 9,0, ajustados potenciométricamente. Diferentes concentrações de ácido ascórbico de 0,05 a 2,00 % (m/v) foram investigadas em R₁ com objetivo de minimizar o efeito interferente causado por ferro nas amostras. As espécies químicas interferentes em potencial Fe, Ca e Mg foram testadas, bem como a adição de agentes mascarantes. Após a otimização dos parâmetros no sistema SIFA, amostras de mostos e melaços foram analisadas e os resultados comparados aos obtidos em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

4.4.2. Determinação de ferro

O método para a determinação espectrofotométrica de ferro é fundamentado na reação entre Fe(II) e 1,10-fenantrolina (MARCZENKO, 1976). Esse método foi escolhido por ser tradicionalmente utilizado em laboratórios de análises de rotina. O comprimento de onda foi selecionado como 510 nm.

Os principais parâmetros referentes ao método proposto foram estudados visando sua implementação no sistema de interface única (SIFA) a ser proposto (Figura 24). Este sistema era constituído por três bombas solenóide de 6 µL de volume estrategicamente posicionadas para A, R₁ e R₂, respectivamente (Figura 24). Antes de iniciar o procedimento analítico descrito na Tabela 12, todas as linhas de transmissão, bombas e válvulas solenóide eram preenchidas com as respectivas soluções de reagentes e amostra. Inicialmente, P₁ + P₂ (20 pulsos, 0.15 s), responsáveis pela inserção simultânea de amostra e R₁ eram acionadas e a zona de amostra era encaminhada em direção ao descarte posicionado em V₃. Após a estabilização da linha base (etapa 1), P₁ e P₂ eram desligadas e todas as válvulas

solenóide eram acionadas juntamente com P_3 (15 pulsos, 0.15 s) responsável pela inserção de R_2 . A zona de amostra era então transportada em direção ao detector e ao frasco de descarte (etapa 2), sem passar por B_2 . A seguir, P_3 era desligada e $P_1 + P_2$ (20 pulsos, 0.15 s) eram novamente acionadas para a etapa de limpeza do percurso analítico e substituição da amostra (etapa 3).

Para a exploração da cinética reacional, foram injetadas no sistema solução-padrão de Fe(II) e, no instante de maior absorvância (máximo de sinal analítico, ca.10 s após a injeção da amostra) a bomba solenóide era desligada interrompendo o fluxo das soluções. A mesma permanecia desligada por 30s e, em seguida, era novamente ligada.

Tabela 11. Procedimento para determinação de ferro no sistema SIFA (Figura 24)

Operação	Bomba (volume/pulso)	solenóide	Pulsos (n)	Frequência (s)
1. Obtenção e estabilização da linha base	P_1 (160 μ L) + P_2 (160 μ L)		20	0.15
2. Inserção da zona de amostra e Transporte ao detector	P_3 (120 μ L)		15	0.15
3. Limpeza do percurso analítico e substituição de amostra	P_1 (160 μ L) + P_2 (160 μ L)		20	0.15

As estratégias de amostragem, tais como zonas coalescentes, amostragem binária e pulsos seqüenciais foram avaliadas objetivando melhoria em sensibilidade e repetibilidade. A influência do número de pulsos para a formação da zona de amostra foi estudada variando-se entre 10 e 25 pulsos (80 μ L a 200 μ L); bem como o número de pulsos correspondentes à limpeza do percurso analítico. O estudo do comprimento dos reatores foi conduzido variando-se entre 10 e 100 cm tanto para a etapa reacional entre A e R_1 , quanto para o melhor desenvolvimento da interface

única. Para avaliação da influência das concentrações de ácido ascórbico e 1,10-fenantrolina, os parâmetros físicos otimizados foram mantidos e as concentrações foram variadas entre 0,05 e 3,0 % (m/v) e 0,01 e 0,10 % (m/v), respectivamente. A influência do pH do reagente foi investigada preparando-se soluções de 1,10-fenantrolina de maneira a conferirem valores de pH na faixa de 4,6 a 9,0. Estudos referentes à seletividade analítica e adição de agentes mascarantes foram conduzidos. Após o dimensionamento do sistema, a curva analítica foi estabelecida e as amostras de mostos e melaços foram analisadas de forma a serem estimadas as principais figuras de mérito do procedimento proposto.

4.4.3. Determinação de fosfato (P-PO₄)

O método selecionado é baseado na reação em condição ácida entre fosfato e heptamolíbdate de amônio, resultando na formação do heteropolíacido fosfomolibdico (amarelo) que é reduzido pelo ácido ascórbico a azul de molibdênio (DICKMAN; BRAY, 1940; MURPHY, 1962; MARCKZENCO, 1976; SOMMER, 1989). A cinética da reação é relativamente lenta e a etapa de redução é determinante da velocidade. O comprimento de onda foi selecionado como 617 nm (MOTOMIZU; LI, 2005).

O sistema SIFA apresenta a mesma configuração daquele empregado na implementação dos métodos para a determinação de alumínio e ferro (Figura 24). Após as linhas de transmissão, bombas e válvulas solenóide serem preenchidas com soluções de reagentes e amostra, P₁ + P₂ (30 pulsos, 0.15 s), responsáveis pela inserção simultânea de amostra e R₁ eram acionadas para estabelecimento da linha base (etapa 1). Assim, a zona de amostra era encaminhada em direção ao frasco de coleta e descarte acoplado em V₃. Em seguida, as três válvulas solenóide e P₃ (15 pulsos, 0.15 s) responsável pela inserção de R₂ eram acionadas e a zona de amostra era transportada em direção ao detector e ao frasco de descarte (etapa 2), passando pela bobina de reação B₂. A seguir, P₃ era desligada e P₁ + P₂ (30 pulsos, 0.15 s) eram novamente acionadas para a etapa de limpeza do percurso analítico e substituição da amostra (etapa 3) (Tabela 12).

Tabela 12. Procedimento para determinação de fosfato (P-PO₄) no sistema SIFA (Figura 24)

Operação	Bomba	solenóide	Pulsos (n)	Frequência (s)
1. Obtenção e estabilização da linha base	P ₁ (240 µL) + P ₂ (240 µL)		30	0.15
2. Inserção da zona de amostra e Transporte ao detector	P ₃ (120 µL)		15	0.15
3. Limpeza do percurso analítico e substituição de amostra	P ₁ (240 µL) + P ₂ (240 µL)		30	0.15

O dimensionamento do sistema objetivou maximização da sensibilidade sem que houvesse perdas em repetibilidade. As estratégias de amostragem já mencionadas nos itens 4.4.1. e 4.4.2. foram também estudadas. O volume de solução de ácido ascórbico foi estudado variando-se o número de pulsos entre 10 e 30 (80 e 240 µL). A quantidade de pulsos para a limpeza do percurso analítico foi avaliada variando-se o número de pulsos entre 20 e 40 pulsos (160 e 320 µL). A vazão é proporcional à frequência de pulsação das bombas solenóide. Neste sentido, a influência da frequência de pulsação foi variada entre 0.15 e 0.50 s (correspondendo a vazões entre 3,20 mL min⁻¹ e 0,93 mL min⁻¹) objetivando-se melhor desenvolvimento reacional. Diferentes comprimentos de reatores referentes às etapas reacionais foram avaliados entre 10 e 100 cm. Relativamente à otimização dos parâmetros químicos do sistema, foram avaliadas concentrações entre 0,10 e 1,00 % (m/v) e 0,05 e 2,00 mol L⁻¹ para molibdato de amônio e ácido ascórbico, respectivamente. A acidez em R₁ foi avaliada empregando-se valores de concentrações entre 0,05 e 1,50 mol L⁻¹ em HNO₃. Para o estudo da seletividade analítica e adição de agentes mascarantes, as soluções descritas no item 3.2.4.3. foram empregadas. As espécies químicas possivelmente interferentes seriam Cu e Fe (MARCZENKO, 1976), sendo que Fe apresentava-se em alta concentração nas amostras (110 mg L⁻¹).

Assim, para esta confirmação foram conduzidos estudos variando-se a concentração de Fe de 50,0 a 250,0 mg L⁻¹ e cobre de 0,10 a 2,00 mg L⁻¹. Após

otimização dos parâmetros envolvidos no dimensionamento do sistema de interface única, as amostras de mostos e melaços foram analisadas e comparadas com os resultados obtidos em ICP-OES e as principais figuras de mérito foram obtidas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de glicose, frutose e glicerol

Os resultados reprodutíveis demonstraram que o método foi eficientemente implementado no sistema MPFS. Derivas de linha base não foram observadas.

Com relação aos espectros de absorção do produto reacional (ânion complexo $[I_3]^-$), estes são idênticos entre si para as três condições de pH estudadas, sendo assim, a construção de um modelo baseado nas diferenças espectrais foi descartada. Os espectros não apresentaram resolução bem definida e são caracterizados por uma faixa de absorção de 350 a 500 nm, de forma que a melhor razão sinal analítico/ruído foi obtida em 450 nm, ficando este valor selecionado para os demais estudos. Foi necessário utilizar calibração multivariada para a discriminação das concentrações de cada componente da mistura.

O planejamento fatorial 2^6 (Tabela 5) foi realizado e os valores de absorbância foram avaliados. A análise do mesmo indicou que os parâmetros apresentaram efeito significativo a um nível de confiança de 95%, definidos pela linha vertical tracejada (Figura 25). Observou-se que o volume de amostra, concentrações hidrogeniônicas e de $NaIO_4$ apresentaram efeitos significativos nas alturas dos sinais analíticos. Ainda, o volume de amostra e a concentração de $NaIO_4$ apresentaram efeitos positivos indicando que o aumento dos mesmos resultaria em melhoria na magnitude dos sinais analíticos. O efeito significativo, porém negativo relativamente à concentração hidrogeniônica, indicou que a diminuição do pH resultaria em maiores sinais analíticos. Efeitos de interação significativos foram verificados entre as concentrações de KI e hidrogeniônica. Os demais parâmetros não apresentaram efeitos de interação indicando a possibilidade da utilização do método univariado de maneira eficaz.

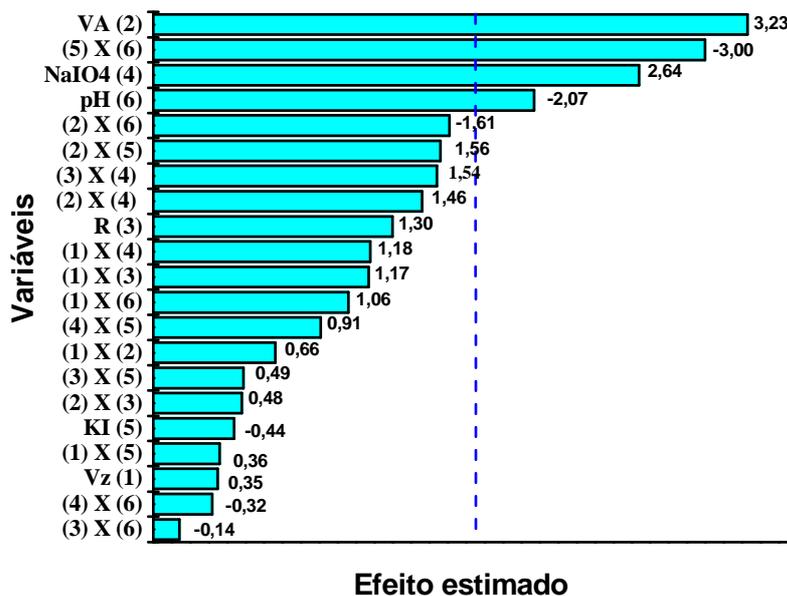
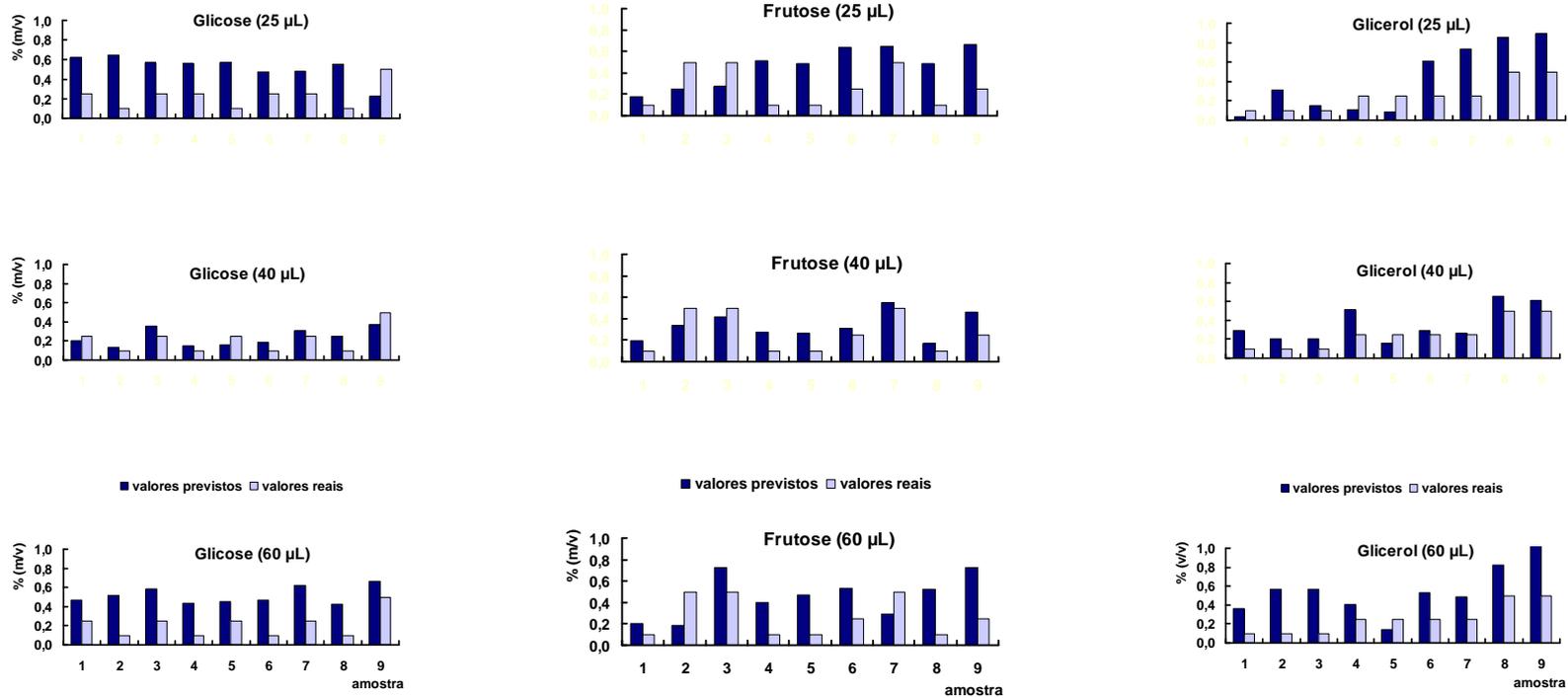


Figura 25. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo para a determinação de glicose, frutose e glicerol

Embora o comprimento de reator não tenha apresentado efeito significativo, o mesmo foi avaliado. Sinais analíticos não reproduzíveis foram verificados com o reator de 10 cm, constatando-se que as condições de mistura eram inadequadas e que o tempo médio de residência era insuficiente para a formação do complexo colorido em quantidades adequadas para o monitoramento. Boa dispersão entre amostra e reagente foi observada com emprego do reator de 50 cm, entretanto, os sinais analíticos eram menores. Comprimentos maiores resultaram em tempo médio de residência da zona de amostra elevado, minimizando ainda mais os sinais analíticos. O reator de 25 cm de comprimento foi selecionado considerando a boa reprodutibilidade e magnitude dos sinais analíticos. A concentração em R_2 e a vazão foram fixadas em 0,05 % (m/v) e 3,2 mL min⁻¹, respectivamente. Estes valores foram selecionados levando-se em conta o baixo consumo de reagente e boa frequência analítica. Relativamente à concentração em R_1 , foi observado um efeito significativo e positivo, entretanto, este parâmetro foi fixado em 0,10 % (m/v) NaIO₄ visando a diminuição do consumo de reagente.

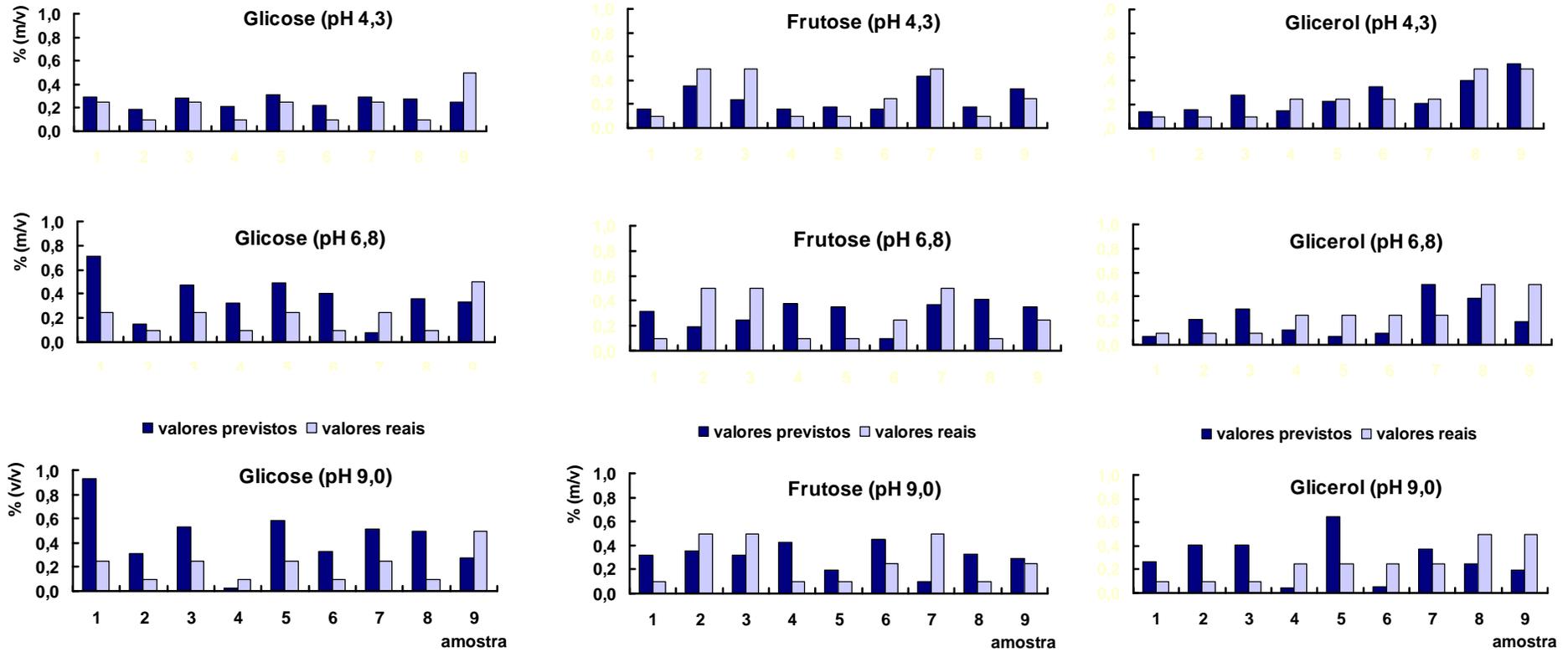
A influência da variação de volume de amostra foi avaliada entre 25 e 60 μL . Para os volumes de 25 e 40 μL , a magnitude dos sinais analíticos era aumentada (ca 6,5 %) quando ocorria a inserção de volumes maiores. O volume de amostra correspondente a 60 μL resultou em pico duplo, demonstrando a ausência de R_2 nas porções centrais da zona de amostra, originando duas interfaces independentes (Ribeiro et al., 2005). A inserção deste volume era inviável para a constituição do modelo por não conter informações relevantes. O volume de 40 μL foi selecionado para os demais estudos por resultar em valores previstos mais próximos dos reais (Figura 26).

Figura 26. Valores previstos (preto) e reais (cinza) obtidos para seleção de volume de amostra



A acidez do ambiente reacional mostrou ser um parâmetro que influencia significativamente a reação, sendo que sua diminuição resultou em aumento em sensibilidade e reprodutibilidade. Observou-se que o emprego da solução tampão pH 4,3 resultou em sinais analíticos reprodutíveis, além de que a absorvância em relação à linha base não se alterou. Nestas condições, as taxas de oxidação foram satisfatórias. Por outro lado, o efeito Schlieren foi constatado com o uso da solução tampão pH 6,8. O mesmo se intensificou limitando a medida de absorvância quando a solução tampão pH 9,0 era inserida. Ficou selecionada a solução tampão pH 4,3 para ambos R_1 e R_2 (Figura 27).

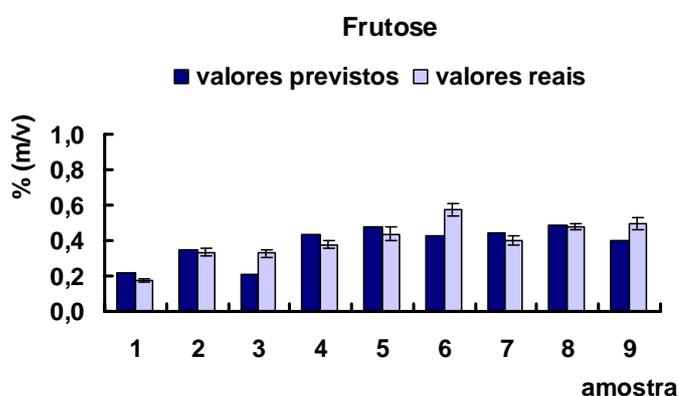
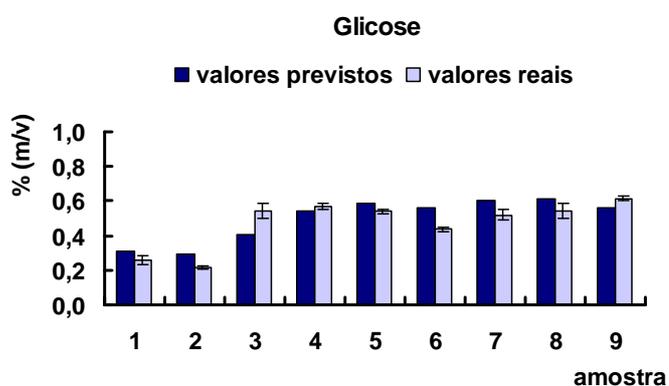
Figura 27. Valores previstos (preto) e reais (cinza) obtidos para seleção da concentração hidrogeniônica



O critério de escolha do número de variáveis latentes foi baseado no menor valor de RMSECV. O modelo matemático desenvolvido para avaliação do volume de amostra demonstrou que 5, 2 e 5 variáveis latentes para glicose, frutose e glicerol, respectivamente, eram capazes de descrever *ca* 94,31 a 97,56 % da variância total. Relativamente ao pH, o número de variáveis latentes foi selecionado como 3, 4 e 5 para os mesmos analitos, tendo sido descrito *ca* 94,95 a 98,45 % da variância total.

Após a otimização dos principais parâmetros envolvidos, o modelo foi construído com 5, 3 e 5 variáveis latentes para glicose, frutose e glicerol, respectivamente, descrevendo a variância total entre 94,6 e 98,7 %.

A construção do modelo foi realizada de forma que o compromisso entre a calibração e a capacidade preditiva fosse cumprido. Para isto, o procedimento de validação externa foi utilizado. Os resultados para as amostras de validação constam na Figura 28 e para as amostras de caldo de cana-de-açúcar (Tabela 13) e vinhos fermentiscíveis (Tabela 14).



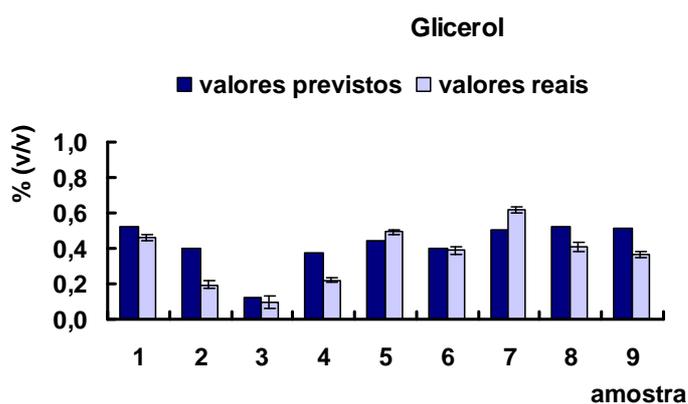


Figura 28. Valores previstos e reais de amostras de validação

Os valores de RMSEP e de desvio confirmaram a boa capacidade preditiva do mesmo.

Os resultados obtidos apresentaram concordância ao nível de 95 % de confiança com os obtidos por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção por amperometria pulsada. As amostras de caldos de cana-de-açúcar não apresentaram teores de glicerol quando analisadas por HPAEC-PAD, desta forma, constam na Tabela 13 os resultados referentes aos teores de glicose e frutose.

Tabela 13. Resultados comparativos obtidos na determinação de glicose e frutose em caldos de cana-de-açúcar. Os dados, em % (m/v) para glicose e frutose foram valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 16) e por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD)

Amostra Caldo de cana-de-açúcar	Glicose		Frutose	
	% (m/v)	% (m/v)	% (m/v)	% (m/v)
	MPFS	HPAEC-PAD	MPFS	HPAEC-PAD
1	0,45 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,39 ± 0,01
2	0,47 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,48 ± 0,02
3	0,45 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,01
4	0,50 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,49 ± 0,01
5	0,52 ± 0,04	0,54 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,03
6	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,02

Tabela 14. Resultados comparativos obtidos na determinação de glicose, frutose e glicerol em vinho. Os dados, em % (m/v) para glicose e frutose e % (v/v) para glicerol são valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 16) e por cromatografia líquida de troca aniônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD).

Amostra Vinho	Glicose		Frutose		Glicerol	
	% (m/v)		% (m/v)		% (v/v)	
	MPFS	HPAEC-PAD	MPFS	HPAEC-PAD	MPFS	HPAEC-PAD
1	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,01
2	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,01
3	0,33 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,49 ± 0,02
4	0,18 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,46 ± 0,01
5	0,33 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,01
6	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,43 ± 0,01	0,44 ± 0,01

Figuras de mérito

O sistema MPFS é de configuração simples e robusto, fornecendo resultados repetitivos (d.p.r. < 5 %). Derivas de linha base não foram observadas para o valor de pH selecionado. O sistema permite a determinação de 120 amostras por hora, e o consumo de 0,15 mg de iodeto de potássio e 0,3 mg de periodato de sódio por determinação.

5.2. Determinação de açúcares redutores totais

5.2.1. Análises por injeção em fluxo para Açúcares Redutores (AR)

Com relação à definição do comprimento de onda, verificou-se que os coeficientes de absorvidade molar dos produtos da degradação alcalina da glicose e da frutose são similares e um máximo de absorbância foi verificado entre 270 e 310 nm para a região UV e 420 nm para a região espectral Vis (Figura 29).

Sinais analíticos referentes às soluções-padrão 0,01 - 0,06 % (m/v) em glicose e frutose foram detectados na região UV, mas não foram observados em 420 nm. Conclui-se, portanto que melhor sensibilidade analítica poderia ser obtida explorando-se absorção na região UV, entretanto, foi notada intensa oscilação na

linha base quando esta região espectral foi explorada. Isto levou a comprometimento do limite de detecção e precisão analítica.

Como a sensibilidade não se constituiu em fator limitante, o comprimento de onda foi selecionado como 420 nm, o que resultou em significativa melhoria na estabilidade da linha base, em que pese a redução em sensibilidade.

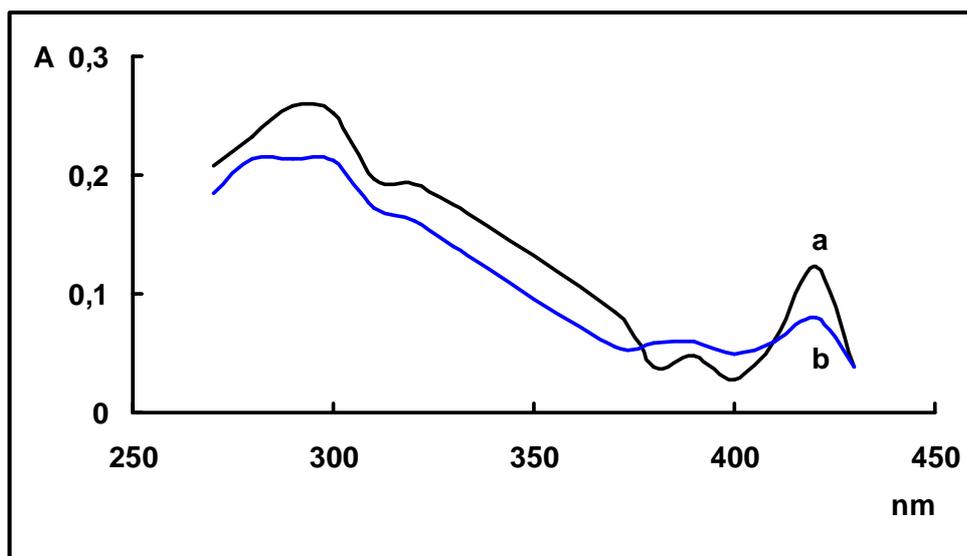


Figura 29. Espectros de absorção em UV-UVvis dos produtos da degradação alcalina da glicose e frutose. As curvas se referem a soluções-padrão 0,05 % (m/v) de frutose (a) e de glicose (b) processadas no sistema da Figura 17

O estudo detalhado dos espectros de absorção referentes aos produtos de degradação destes carboidratos evidenciou a presença de diversas espécies químicas instáveis componentes da mistura produzida.

Este aspecto foi salientado nos experimentos envolvendo parada da zona de amostra. Os resultados (Figura 30) mostraram que os espectros referentes à glicose e à frutose são semelhantes e confirmaram a instabilidade dos produtos da mistura provenientes da degradação alcalina tornando inviável a condição manual desse procedimento.

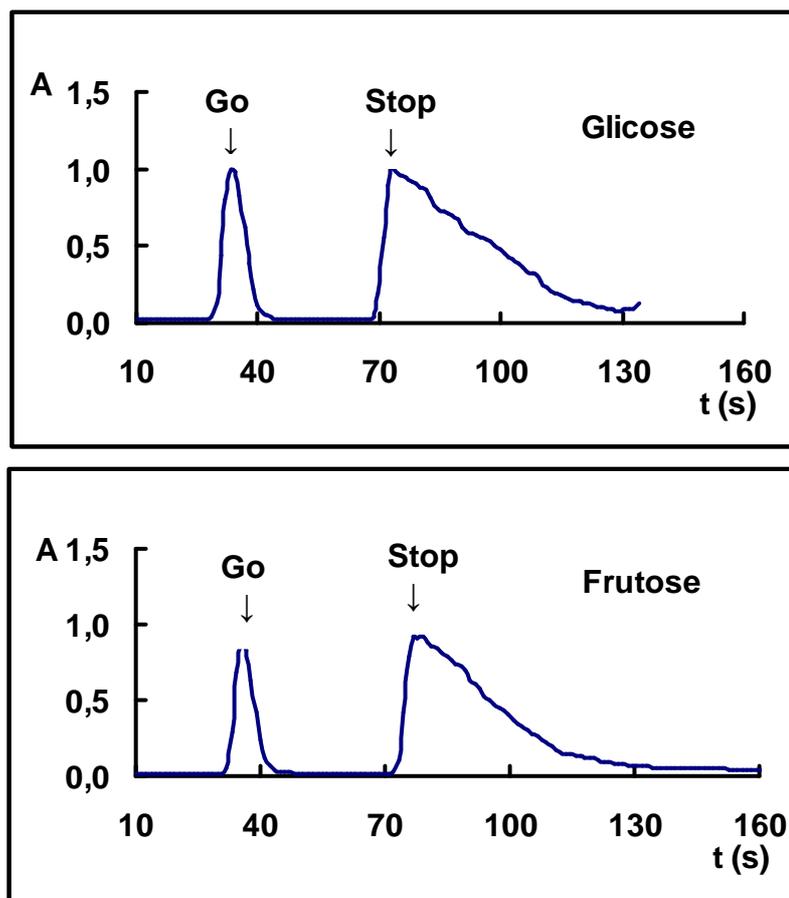


Figura 30. Sinais analíticos referentes aos produtos da degradação alcalina da glicose e frutose

Com relação à influência do intervalo de tempo disponível para as reações químicas, foi verificado que a redução da vazão total e conseqüente aumento deste intervalo de tempo levou a uma redução em sensibilidade. Isto se explica em função da instabilidade dos produtos de degradação. Neste sentido, quando a vazão foi reduzida de 8,90 para 6,70 mL min⁻¹, a sensibilidade foi reduzida em ca 25 %. Entretanto a melhor repetibilidade das medidas foi observada para vazão de 11,2 mL min⁻¹. Exploração de vazões acima deste valor prejudicaram a repetibilidade das medidas, provavelmente em função de limitações na etapa de aquecimento e/ou estabelecimento de excessiva pressão hidrodinâmica. Foi então selecionada a vazão de 11,2 mL min⁻¹.

O comprimento do reator se mostrou um parâmetro importante no projeto do sistema, sendo fixado em 400 cm. Para reatores menores, diferentes sinais analíticos eram produzidos processando-se soluções-padrão 0,10 % (m/v) de glicose, frutose ou sacarose invertida. Sinais equivalentes foram obtidos para

comprimentos de reator entre 400 a 500 cm; ainda, boa repetibilidade das medidas (d.p.r. < 0,0006 %) e estabilidade na linha base (< 0,03 A por hora) foram observadas. O emprego de reatores maiores (500 – 800 cm) levou a piora em sensibilidade, devido à instabilidade dos produtos monitorados.

Com relação à seleção do volume de amostra injetada foram empregadas soluções-padrão 1,00 % (m/v) em glicose, frutose e sacarose. A melhor relação entre sensibilidade e faixa de resposta linear foi obtida com alça de amostragem de 70 cm (350 μ L).

5.2.2. Análises por injeção em fluxo para açúcares redutores totais (ART)

Os resultados a seguir se referem ao sistema da Figura 18.

Alterações na temperatura enfatizaram a diferença entre as taxas de oxidação dos carboidratos provocando variações significativas em sensibilidade (Figura 31), o que demonstra a relevância desse parâmetro. Sinais analíticos foram observados apenas para $T > 70$ °C. O sistema se mostrou sempre estável apesar das variações em temperatura, o que demonstra sua robustez. Foi então selecionada a temperatura de 98 °C.

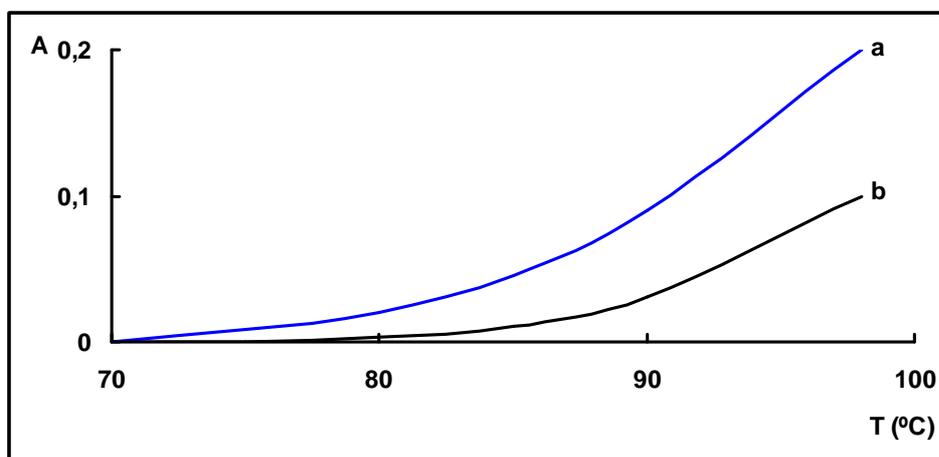


Figura 31. Influência da temperatura. A figura se refere à solução 0,25 % (m/v) de glicose processada no sistema da Figura 18. As curvas a e b se referem à impulsão dos fluidos por bombas solenóide e bomba peristáltica

A frequência de pulsação 0,4 s resultou em sinais analíticos equivalentes para as soluções-padrão de glicose e frutose (Figura 32). Valores menores do que 0,4 s reduziram o tempo de injeção entre cada amostra resultando em ineficiente limpeza do percurso analítico. Frequências de pulsação acima de 0,4 s ocasionaram

diminuição na magnitude dos sinais analíticos além de serem inviáveis em função da diminuição da taxa de amostragem. Desta forma, a frequência de 0.4 s foi selecionada.

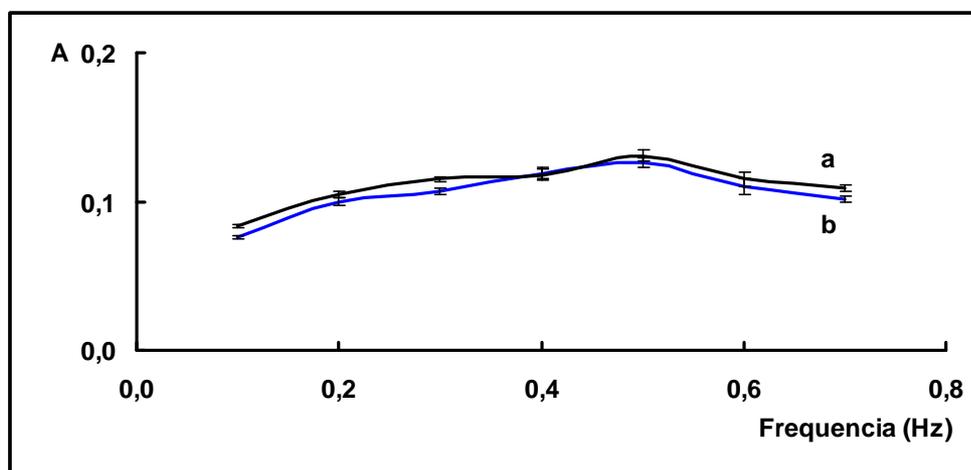


Figura 32. Influência da frequência de pulsação. As curvas a e b se referem a soluções-padrão 0,10 % (m/v) de frutose e glicose, respectivamente, processadas no sistema da Figura 18 (inserção de 30 pulsos de A + R)

Relativamente à influência da alcalinidade, melhor sensibilidade e equivalência nas alturas dos sinais analíticos referentes às soluções 0,05 % (m/v) de glicose foi verificada quando a concentração era de 0,10 mol L⁻¹ NaOH (Figura 33). Resultados análogos foram obtidos relativamente à frutose e sacarose. Para maiores concentrações de NaOH, observou-se aumento nos sinais analíticos referentes à glicose, porém diminuição daqueles referentes à frutose.

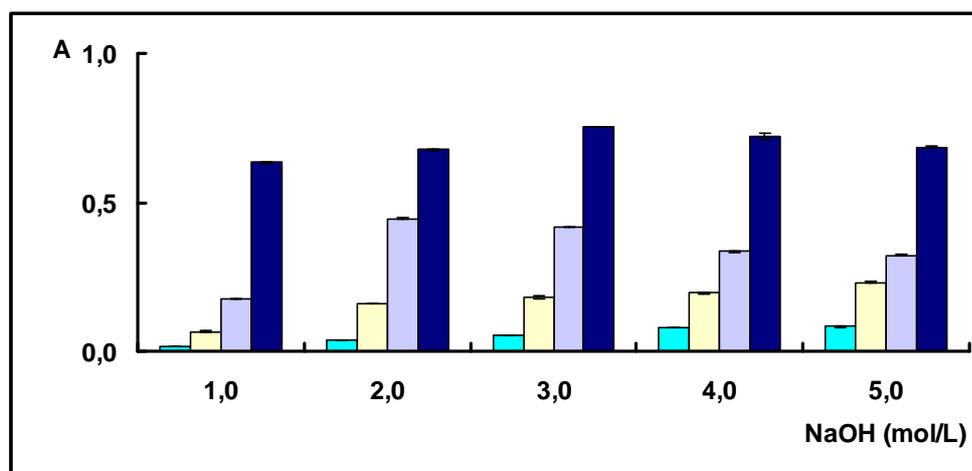


Figura 33. Influência da alcalinidade. A figura se refere a soluções-padrão de glicose (0,05; 0,10; 0,20 e 0,40 % m/v) processadas no sistema da Figura 18 sob diferentes alcalinidades

Boa aditividade de sinais analíticos referentes à glicose e frutose foi sempre observada, conforme se depreende da Tabela 15. Desta forma, o procedimento pode ser aplicado à determinação de ART sem a necessidade do emprego de fatores de correção ou de algoritmos para análise multivariada.

Tabela 15. Aditividade de glicose e frutose

Solução-padrão % (m/v)	Glicose*	Frutose*	Padrão composto*	Aditividade (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	100,0
0,05	0,093	0,092	0,180	102,0
0,10	0,103	0,111	0,208	98,5
0,25	0,212	0,209	0,442	99,6

* valores expressos em absorbância

O sistema proposto se mostrou bastante estável, variações em linha base menores do que 0,02 A sendo observados após períodos prolongados (6 h) de operação. A curva analítica se mostrou linear (Tabela 16) e o coeficiente de correlação linear apresentou pouca variação no intervalo de tempo mencionado.

Tabela 16. Estabilidade do sistema

Curva analítica	Intervalo de tempo (h)	Equação*	r ²
1	0	y = 0,9897x-0,0154	0,9487
2	2	y = 0,9806x-0,0172	0,9548
3	4	y = 0,9810x-0,0181	0,9543
4	6	y = 0,9887x-0,0178	0,9559

* y = altura de pico; x = concentração do carboidrato

Após avaliação dos parâmetros no sistema da Figura 18, as principais figuras de mérito referentes ao sistema proposto (Figura 21) foram avaliadas. Neste sistema, foram inseridas amostras de caldos de cana-de-açúcar e melaços (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados obtidos na determinação de ART. Os dados, em % (v/v e m/v) para caldos de cana-de-açúcar e melaços, são valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 21)

Amostra	Caldo MPFS (mg L ⁻¹)	Caldo Cromatografia iônica (mg L ⁻¹)	Melaço MPFS (mg L ⁻¹)	Melaço Cromatografia iônica (mg L ⁻¹)
1	21,06 ± 0,01	21,09 ± 0,01	56,02 ± 0,02	56,05 ± 0,01
2	20,04 ± 0,02	20,10 ± 0,03	54,08 ± 0,04	54,10 ± 0,02
3	21,01 ± 0,03	21,05 ± 0,02	55,02 ± 0,05	55,08 ± 0,01
4	22,04 ± 0,01	22,08 ± 0,03	53,01 ± 0,04	53,06 ± 0,01
5	21,05 ± 0,02	21,07 ± 0,01	56,05 ± 0,01	56,07 ± 0,02

Pode-se comprovar que o sistema apresenta resposta linear entre 0,05 e 0,50 % (m/v) ART, freqüência analítica de 65 determinações por hora e consumo de 10 mg NaOH e 76 mg NaKC₄H₄O₆.4H₂O por determinação. Os resultados são precisos (d.p.r. < 0,006) e a exatidão foi comprovada empregando-se como técnica alternativa a cromatografia de íons com detecção por amperometria pulsada (MONTERO et al., 2005).

5.3. Determinação de etanol

Relativamente aos testes em “batch” foi verificado que o tempo para se completar a reação de redução de Cr(VI) foi de 5 min e o comprimento de onda correspondente à máxima absorção foi o de 600 nm. Para as estratégias de

amostragem avaliadas, o número de pulsos de A e R foram variados de 30 a 150 μL (5 a 25 pulsos) durante a passagem pela câmara de difusão gasosa. A estratégia de amostragem onde A e R eram inseridos simultaneamente a um número de pulsos igual a 5, resultou em maiores sinais analíticos. O número de pulsos para o envio da zona de amostra ao detector foi variado de 5 a 40 (30 a 240 μL), ficando selecionado 30 pulsos em função da melhor limpeza do percurso analítico. Com relação ao comprimento de reatores, não foram observadas diferenças nas alturas dos sinais analíticos quando estes foram variados. Optou-se pelo não emprego de reator, mantendo-se então o compromisso com a frequência analítica. A diminuição da vazão total do sistema ocasionava um aumento em sensibilidade analítica (Figura 34). Foi selecionada a frequência de pulsação 3.0 s (correspondente a vazão de $0,28 \text{ mL min}^{-1}$), sendo que valores maiores não foram testados por comprometerem a frequência analítica.

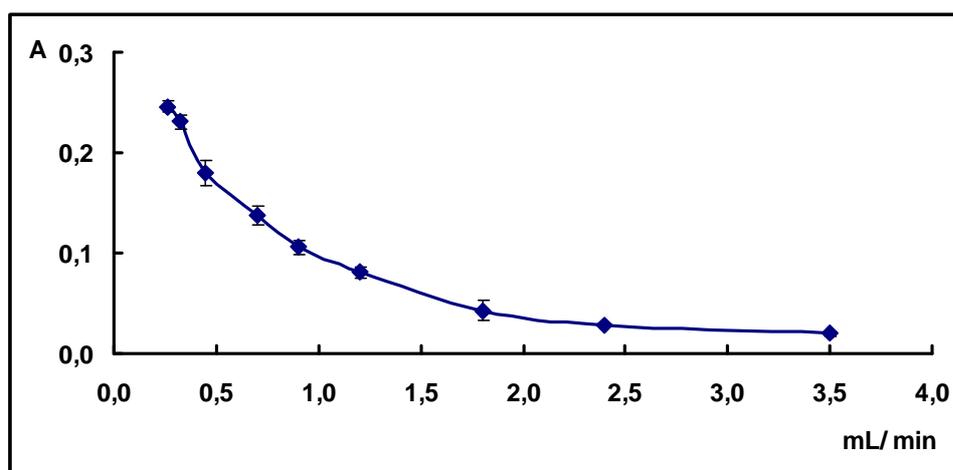


Figura 34. Influência da vazão na determinação de etanol. A figura se refere à solução 7,0 % (v/v) de etanol processada no sistema da Figura 22

A estratégia da mudança de sentido de fluxo das soluções de reagente e de amostra durante o processo de difusão gasosa foi estudada, mantendo-se as condições descritas anteriormente. Essa alteração não resultou em melhora significativa em sensibilidade, portanto, optou-se pela forma de inserção de amostra anteriormente explorada.

Para a avaliação da concentração de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em R, foi mantido o valor de $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Foram observadas variações significativas na magnitude dos sinais analíticos conforme a concentração de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ era aumentada, sendo que

concentrações maiores que $0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ resultaram em valores de absorvância que ultrapassavam a 1,0 A, ficando então selecionada a concentração de $0,15 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ para os demais estudos (Figura 35). Quanto à acidez do ambiente reacional, a concentração de $2,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ foi selecionada, sendo que concentrações menores ocasionavam diminuição nos sinais analíticos. Valores maiores que $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ eram inviáveis pelo aumento da viscosidade da solução e intenso efeito Schlieren (ZAGATTO et al., 1990).

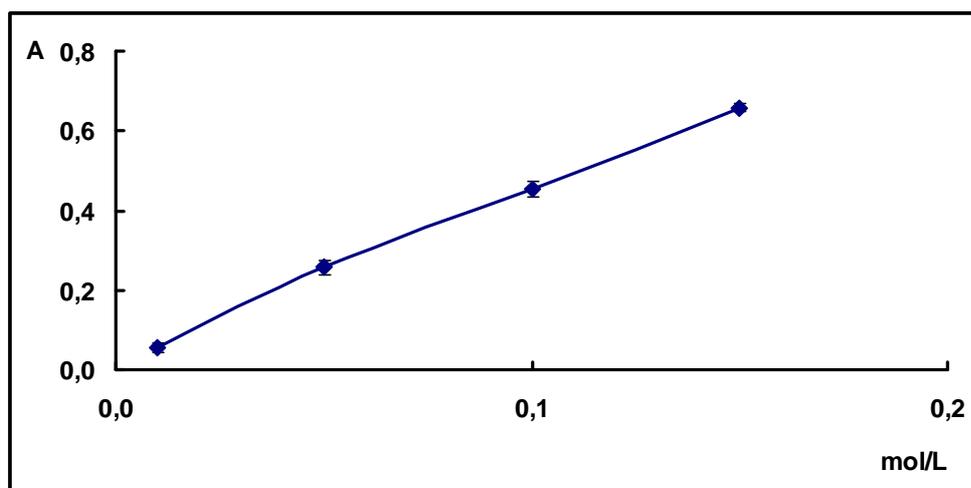


Figura 35. Influência da concentração de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. A figura se refere à solução-padrão de etanol 7,0 % (v/v) processada no sistema da Figura 22

Relativamente à temperatura, verificou-se diminuição em sensibilidade quando valores acima de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foram experimentados (Figura 36). Para temperaturas acima de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, foi observada freqüente instabilidade na linha base e aparecimento de bolhas de ar, dificultando o monitoramento. Deste modo, foi selecionada a temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ pela facilidade de operação e boa sensibilidade analítica.

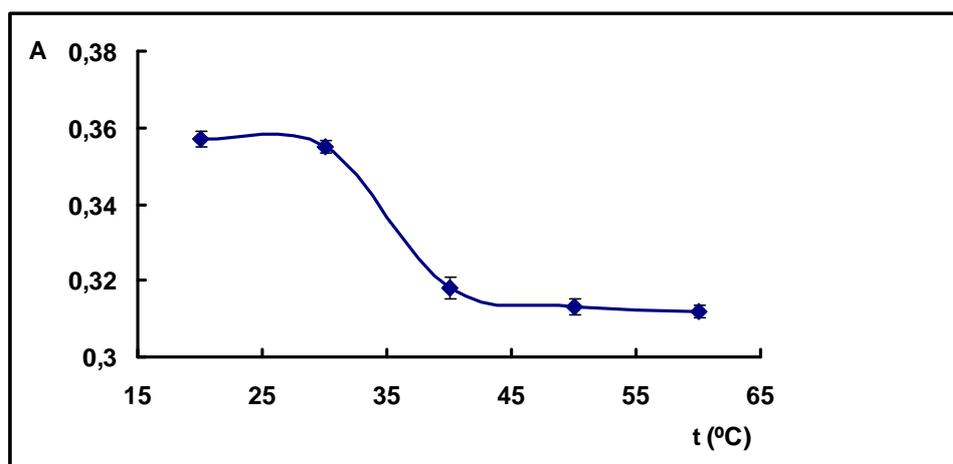


Figura 36. Influência da temperatura na determinação de etanol. A figura se refere à solução 7,0 % (v/v) de etanol processada no sistema da Figura 22

Após a otimização de todos os parâmetros do sistema MPFS, o fluxo pulsado foi então comparado ao sistema que emprega fluxo laminar (Figura 23). A arquitetura do sistema MPFS foi mantida e os melhores resultados obtidos referentes aos parâmetros físicos e temporais foram implementados no sistema MCFS, sendo que somente a unidade propulsora foi modificada. Assim, curvas analíticas empregando soluções-padrão de etanol (0,5 – 5,0 % v/v) foram obtidas para ambos os sistemas nas mesmas condições, observando-se piora em sensibilidade analítica para o sistema multi-comutação (Figura 23). A agitação proporcionada pelo fluxo pulsado resulta em melhores condições de dispersão radial dos elementos do fluido, favorecendo desta forma o processo de difusão gasosa.

Dimensionados os principais parâmetros envolvidos na determinação espectrofotométrica de etanol, as amostras de cervejas e vinhos fermentescíveis foram processadas no sistema MPFS. Os resultados das análises e as estimativas de desvios-padrão baseadas em três repetições constam na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados obtidos na determinação de etanol. Os dados, em % (v/v) para cervejas e vinhos fermenticíveis, são valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 22) e por método comparativo (AOAC, 1995; SILVA et al., 2003)

Amostra	Cerveja	Cerveja	Vinho	Vinho
	MPFS	AOAC	fermenticível MPFS	fermenticível AOAC
1	3,33 ± 0,01	3,37 ± 0,02	8,76 ± 0,03	8,73 ± 0,05
2	4,68 ± 0,01	4,70 ± 0,01	8,70 ± 0,04	8,69 ± 0,02
3	9,70 ± 0,05	9,73 ± 0,01	8,75 ± 0,03	8,78 ± 0,04
4	4,45 ± 0,02	4,46 ± 0,03	8,73 ± 0,02	8,76 ± 0,03
5	4,65 ± 0,01	4,67 ± 0,02	8,76 ± 0,01	8,76 ± 0,03

A sensibilidade analítica do método proposto foi estimada e a curva analítica se apresentou linear, sendo representada por:

$y = 0,0552x + 0,2223$ para cervejas e vinhos fermenticíveis, onde:

y = altura de pico expressa em absorbância, x = concentração de etanol (v/v), $r = 0,9998$, $n = 5$ até 20,0 % (v/v) de etanol.

O limite de quantificação do método proposto foi estimado em 5,0 % (v/v) e a freqüência analítica foi de 28 determinações por hora.

5.4. Sistema SIFA polimodal para a determinação de alumínio, ferro e fosfato (P-PO₄)

5.4.1. Determinação de alumínio

O método espectrofotométrico no qual é formado um complexo de coloração azul como produto da reação entre cromazurol S e Al(III) foi implementado no sistema polimodal de interface única descrito na Figura 24.

A implementação deste método teve início com a aplicação de diferentes estratégias de amostragem, das quais amostragem binária e zonas coalescentes

apresentaram boa capacidade de homogeneização em relação à estratégia de volume único. Entretanto, maiores sinais analíticos foram observados empregando-se a estratégia de zonas coalescentes em relação à amostragem binária (ca 10%), sendo então adotada para os estudos posteriores.

Quanto à variação do volume de amostra inserido no sistema, foi verificado que a inserção de 20 pulsos (120 μL) resultava em sinais analíticos 15 % maiores do que a inserção de 10 pulsos. Assim, o volume de amostra foi selecionado como 120 μL . A vazão total do sistema foi estudada objetivando as melhores condições para o desenvolvimento reacional. O aumento da mesma de 3,25 mL min^{-1} para 4,0 mL min^{-1} ocasionava uma discreta variação em sensibilidade (ca 8%), resultando em maiores sinais analíticos. A vazão total 4,0 mL min^{-1} (0.15 s) foi então selecionada. Com relação ao estudo da cinética reacional observou-se sinal analítico constante quando o módulo de impulsão das soluções era desligado. Isso se deve ao fato de o produto reacional ter sido formado rapidamente, confirmando então que a cinética da reação é relativamente rápida.

O comprimento dos reatores B_1 e B_2 referentes às etapas de mistura entre amostra e ácido ascórbico e a de formação da interface de reação única foram avaliados de 10 a 100 cm. Para a mistura entre amostra e ácido ascórbico observou-se um aumento significativo nos sinais analíticos quando o mesmo foi variado de 10 para 25 cm. O reator de 25 cm foi selecionado para os demais estudos por resultar em sinais analíticos maiores e com melhor repetibilidade. Reatores maiores ocasionaram decréscimo nos sinais analíticos. Para a etapa reacional entre Al(III) e cromazurol S não foram observadas alterações nas alturas dos sinais analíticos com a variação dos comprimentos dos mesmos. De fato, a cinética da reação entre Al(III) e cromazurol S é rápida (MARCZENKO, 1976) não necessitando de otimização temporal. Foi então selecionado o reator de 10 cm.

A etapa de limpeza do percurso analítico foi estudada variando-se o número de pulsos de 40 e 100 pulsos. Eficiente limpeza do percurso analítico foi constatada quando 60 pulsos (360 μL) eram inseridos.

Relativamente à concentração em R_2 , esta foi variada entre 0,005 e 0,10 mg L^{-1} , verificando-se que os sinais analíticos aumentavam significativamente (ca 50 %) quando a mesma era aumentada de 0,005 para 0,02 mg L^{-1} (Figura 37). Valores maiores ocasionavam decréscimo nos sinais analíticos, ficando selecionado o valor de 0,02 mg L^{-1} cromazurol S.

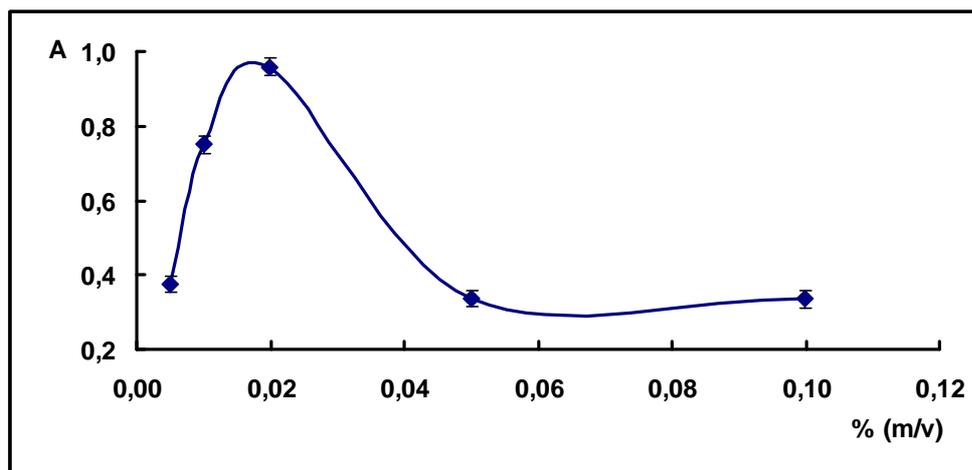


Figura 37. Influência da concentração de cromazurol S. A figura se refere à solução-padrão de Al(III) $1,50 \text{ mg L}^{-1} + 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, processada no sistema da Figura 24

Quanto à concentração hidrogeniônica (pH) em R_2 , esta foi avaliada dissolvendo-se cromazurol S em água, hexamina ou solução tampão acetato em valores de pH que variaram entre 1,0 e 9,0 para hexamina. Com relação à variação do pH avaliado na presença de hexamina, foi verificado que o pH 5,0 resultou em maiores sinais analíticos, embora a repetibilidade analítica fosse comprometida.

Sinais analíticos maiores e com melhor repetibilidade foram observados quando da utilização de cromazurol S dissolvido em água e em solução-tampão acetato em valores de pH acima de 3,5. Para assegurar as melhores condições reacionais, optou-se pelo preparo de R_2 em solução tampão acetato pH 5,0 (Figura 38).

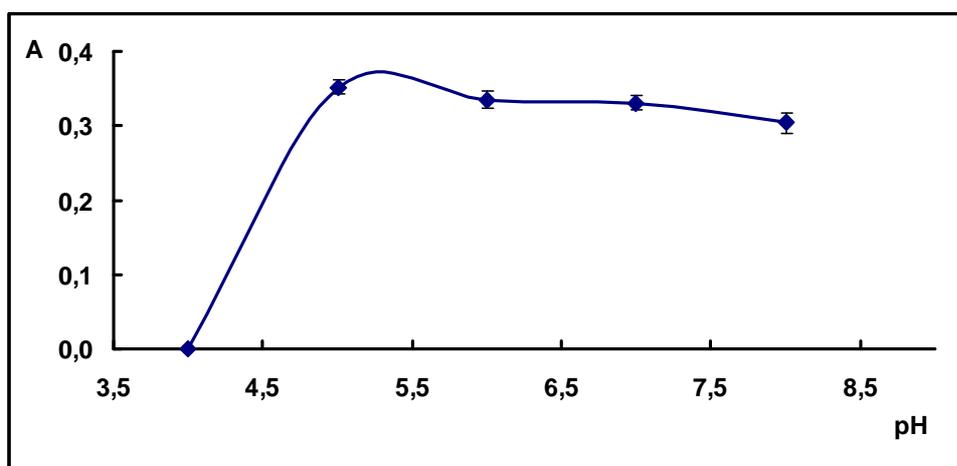


Figura 38. Influência da concentração hidrogeniônica no reagente cromazurol S. A figura se refere à solução-padrão de Al(III) $1,50 \text{ mg L}^{-1} + 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ processada no sistema da Figura 24

Soluções contendo espécies químicas interferentes em potencial foram inseridas no sistema. Para tanto, soluções de Fe(II) de concentrações que variaram de 10,0 a 70,0 mg L⁻¹ foram avaliadas. Outras espécies interferentes, tais como Ca(II) e Mg(II) foram também estudadas. Neste estudo, foi verificada interferência positiva de ferro (25,8 %) a partir da concentração 40,0 mg L⁻¹. Cálcio e magnésio interferiram negativamente a partir de concentrações 0,05 mg L⁻¹ (0,8 %) e 0,01 mg L⁻¹ (2,5 %), respectivamente. Foi então constatada a necessidade de mascaramento dos mesmos. Avaliou-se então, o efeito do emprego de solução 1,00 % (m/v) glicose como agente mascarante para o cálcio, solução 0,25 % (m/v) citrato de sódio e 0,125 % (m/v) ácido ascórbico para manganês e ferro, respectivamente (MARCZENKO, 1976). Antes das amostras de mostos e melaços serem inseridas no sistema, foi realizado ainda o estudo do mascaramento de fósforo, nitrogênio e potássio para a confirmação do possível efeito interferente dos mesmos, em virtude da alta concentração destes concomitantes presentes nas amostras (em geral na faixa de 450,0 mg L⁻¹). Foi verificado que essas espécies químicas não interferiram no método proposto por não formarem complexos coloridos com cromazuol S (MARCZENKO, 1976).

Após a otimização de todos os parâmetros do sistema SIFA na determinação espectrofotométrica de alumínio, as amostras de mostos e melaços foram processadas. Os resultados das análises e as estimativas de desvios-padrão baseadas em três repetições constam na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados obtidos na determinação de alumínio em sistemas de interface única. Os dados, em %(v/v) para mostos e %(m/v) para melaços, são valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 24)

Amostra	Mosto SIFA (mg L ⁻¹)	Mosto ICP-OES (mg L ⁻¹)	Melaço SIFA (mg L ⁻¹)	Melaço ICP-OES (mg L ⁻¹)
1	27,62 ± 0,04	27,65 ± 0,01	20,75 ± 0,02	21,12 ± 0,01
2	27,60 ± 0,02	27,68 ± 0,03	23,65 ± 0,01	23,72 ± 0,02
3	16,30 ± 0,02	16,37 ± 0,02	29,12 ± 0,02	29,70 ± 0,01
4	21,58 ± 0,01	21,43 ± 0,03	22,80 ± 0,03	22,23 ± 0,01
5	17,51 ± 0,02	17,54 ± 0,01	25,24 ± 0,01	25,28 ± 0,03

A sensibilidade analítica do método proposto foi estimada e a curva analítica se apresentou linear, sendo representada por:

$y = 0,7865x + 0,0093$ para mostos e melaços, onde:

y = altura de pico expressa em absorvância, x = concentração de alumínio (mg L^{-1}), $r = 0,997$, $n = 3$ até $0,70 \text{ mg L}^{-1}$ de Al(III) .

O limite de quantificação do método proposto foi estimado em $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (m/v) e a freqüência analítica foi de 130 determinações por hora.

5.4.2. Determinação de ferro

Experimentos para o dimensionamento dos principais parâmetros envolvidos no desenvolvimento da reação, tais como, comprimento de reatores, concentração, natureza e constituição do sistema tampão, pH e vazão foram realizados. Maiores sinais analíticos foram observados quando as estratégias de amostragem binária e zonas coalescentes foram exploradas, no entanto, esta última resultou em melhoria em sensibilidade e repetibilidade, sendo então adotada para continuidade dos estudos.

Os resultados obtidos variando-se o número de pulsos para a composição da zona de amostra demonstraram aumento em sensibilidade analítica conforme o volume era aumentado. A inserção de 25 pulsos de amostra resultou em picos duplos indicando ineficiente interação entre amostra e reagente. Este parâmetro foi então fixado em 20 pulsos ($120 \mu\text{L}$). A quantidade de pulsos para a completa limpeza do percurso analítico foi selecionada como 30 pulsos ($180 \mu\text{L}$).

Quando o comprimento do reator referente à etapa de redução de Fe(III) a Fe(II) foi aumentado de 10 para 25 cm, verificou-se um aumento nos sinais analíticos (ca 17,5 %). O reator de 25 cm foi escolhido para esta etapa do procedimento analítico. Quanto ao reator para a etapa de formação da interface única entre Fe(II) e R_2 , o comprimento de 10 cm foi selecionado em virtude da cinética de formação do complexo colorido ser relativamente rápida (Figura 39).

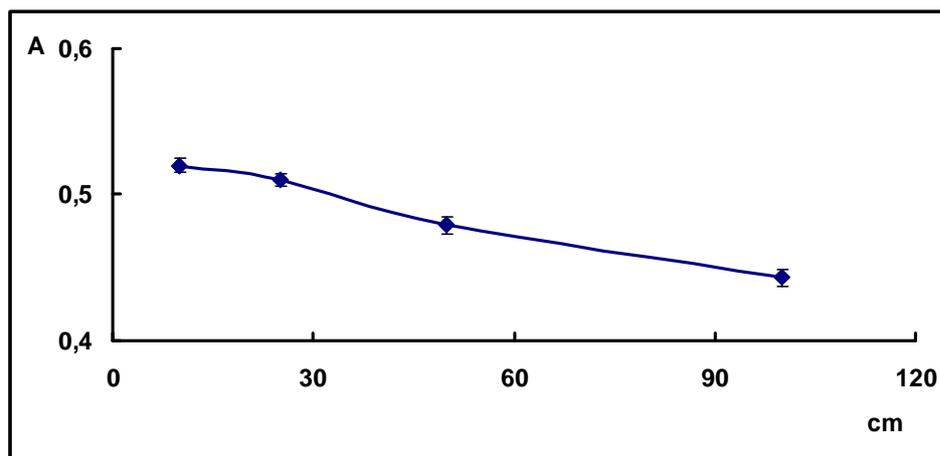


Figura 39. Influência do comprimento do reator na etapa de formação de interface única. A Figura se refere à inserção de 15 pulsos de $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe(II)}$ + $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ no sistema da Figura 24

Relativamente aos experimentos envolvendo variações da concentração de ácido ascórbico, verificou-se que este parâmetro se mostrou bastante influente no método proposto. O aumento na concentração em R_1 resultava no aumento dos sinais analíticos. Verificou-se, entretanto que as concentrações de 0,50 e 1,00 % (m/v) resultaram em sinais analíticos de alturas similares. Tendo em vista a redução do consumo de reagentes e a geração de resíduos, a concentração de 0,50 % (m/v) foi selecionada. Valores maiores implicaram em freqüente oscilação na linha base e maior dificuldade para a limpeza do percurso analítico. O efeito da concentração de 1,10-fenantrolina também se mostrou relevante para a implementação do método (Figura 40). Quando a mesma era aumentada de 0,01 para 0,05 % (m/v) a sensibilidade aumentava significativamente (ca 25 %). A concentração de 0,05 % (m/v) 1,10-fenantrolina foi então selecionada como solução de trabalho.

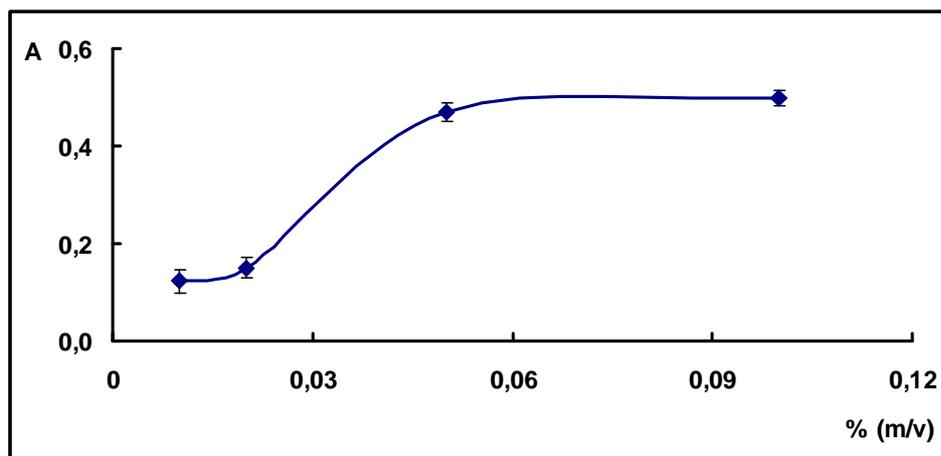


Figura 40. Influência da concentração de 1,10-fenantrolina. A figura se refere à solução-padrão de Fe(III) $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ + $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ HNO₃ processada no sistema da Figura 24

Com relação aos experimentos para a avaliação da influência da variação de pH em R₂, pode-se constatar que a formação do complexo colorido é influenciada pela variação do mesmo (Figura 41), uma vez que este teve um melhor desenvolvimento em condição ácida (pH ca 4,6).

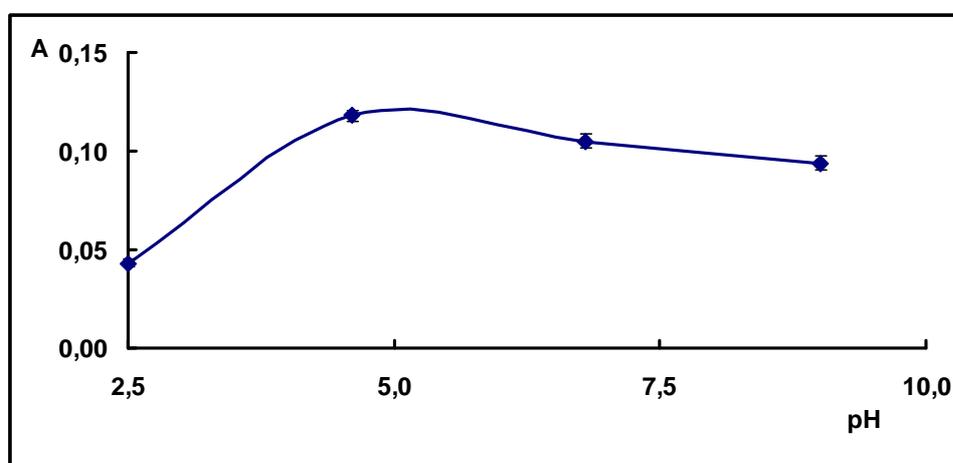


Figura 41. Influência da concentração hidrogeniônica no reagente 1,10-fenantrolina. A figura se refere à solução-padrão de Fe(III) $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ + $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ HNO₃ processada no sistema da Figura 24

A seletividade analítica foi investigada empregando-se soluções de alumínio, cálcio e potássio nas concentrações que variaram entre 0,25 e 4,50; 5,00 e 20,0 e 5,00 e 40,0 mg L^{-1} , respectivamente.

Observou-se que as concentrações de cálcio e potássio interferem positivamente a partir de 10,0 mg L^{-1} e 5,00 mg L^{-1} , e que a concentração de

alumínio interfere negativamente a partir de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$. Com o intuito de se minimizar o efeito interferente causado por estas espécies, soluções de EDTA e tetrafenilborato de sódio foram utilizadas. As concentrações de 2,00 % (m/v) EDTA e 1,50 % (m/v) tetrafenilborato de sódio foram suficientes para suprimir o efeito interferente de cálcio e potássio nas amostras. Visto que as espécies interferentes tiveram seu efeito minimizado, as amostras de mostos e melaços foram processadas e as principais características analíticas foram avaliadas. Os resultados encontram-se na Tabela 20, a qual fornece também as estimativas de desvios-padrão dos resultados baseadas em três repetições.

Tabela 20. Resultados obtidos na determinação de ferro. Os dados, em mg L^{-1} para mostos e melaços, são valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 24)

Amostra	Mosto SIFA (mg L^{-1})	Mosto ICP-OES (mg L^{-1})	Melaço SIFA (mg L^{-1})	Melaço ICP-OES (mg L^{-1})
1	$547,5 \pm 0,01$	$547,9 \pm 0,01$	$461,0 \pm 0,02$	$462,2 \pm 0,01$
2	$556,5 \pm 0,02$	$558,4 \pm 0,03$	$453,5 \pm 0,04$	$454,1 \pm 0,02$
3	$638,2 \pm 0,03$	$638,5 \pm 0,02$	$537,5 \pm 0,05$	$540,2 \pm 0,01$
4	$578,4 \pm 0,01$	$580,1 \pm 0,03$	$523,8 \pm 0,04$	$524,1 \pm 0,01$
5	$645,2 \pm 0,02$	$645,8 \pm 0,01$	$546,2 \pm 0,01$	$546,7 \pm 0,03$

Estimou-se a sensibilidade analítica do método proposto. Para tanto, uma curva analítica foi obtida, sendo esta representada como:

$$y = 0,0126x + 0,0022$$

onde: y = altura de pico expressa em absorvância, x = concentração de fósforo (m/v) em mostos e melaços, $r = 0,9975$, $n = 3$ até $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ferro.

O limite de quantificação do método proposto foi estimado em $2,50 \text{ mg L}^{-1}$ e a frequência analítica foi de 140 determinações por hora.

5.4.3. Determinação de fosfato (P-PO₄)

A avaliação do sistema SIFA na determinação de P-PO₄ teve início com a arquitetura do sistema que possibilitasse a formação de uma única interface entre amostra e reagente (Figura 24).

Diferentes estratégias de amostragem foram avaliadas, tais como amostragem binária, zonas coalescentes e volume único, sempre objetivando compromisso com sensibilidade analítica, boas condições de mistura e repetibilidade analítica. Assim, a estratégia de zonas coalescentes resultou em sinais analíticos de maior magnitude e boa repetibilidade. Nesta estratégia, 20 pulsos de amostra e R_1 eram inseridos simultaneamente, resultando em uma porção de zona de amostra, a qual era encaminhada em direção a R_2 para formação da interface única. Este parâmetro foi avaliado variando-se de 10 a 30 pulsos de $A + R_1$, resultando em zonas de amostra de 60 a 180 μL . Não foram observados sinais analíticos com a inserção de 10 pulsos de $A + R_1$, entretanto, melhoria em sensibilidade analítica (12,3 %) foi notada pela inserção de 20 pulsos. Valores maiores resultaram em sinais analíticos de mesma magnitude (ca 1,34 %). Para a limpeza do percurso analítico, foram variados os números de pulsos entre 20 e 40 (120 μL e 240 μL), ficando selecionado o valor de 30 pulsos para esta etapa. A vazão total do sistema foi avaliada e, para tanto, a frequência de pulsação foi variada entre 0.15 e 0.5 s (4,0 e 2,5 mL min^{-1}) (Figura 42). Como a segunda etapa reacional é relativamente lenta, ficou selecionada a vazão de 2,5 mL min^{-1} (0.5 s).

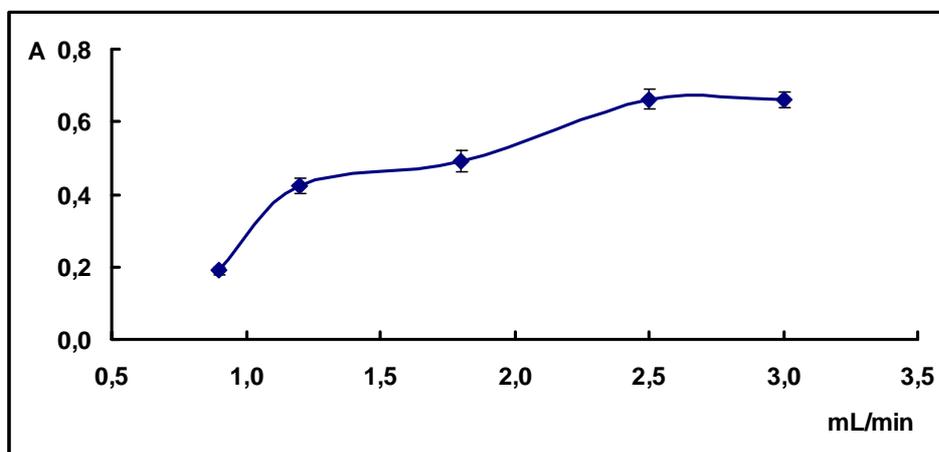


Figura 42. Influência da vazão na determinação de P- PO_4 . A figura se refere à solução 20,0 mg L⁻¹ P- PO_4 + 0,01 mol L⁻¹ HNO₃ processada no sistema da Figura 24

Quanto ao comprimento do reator na primeira etapa reacional, não foram verificadas diferenças significativas nos sinais analíticos para valores investigados, ficando selecionado e fixado o reator de 25 cm para os estudos posteriores. Reatores maiores não resultaram em alterações na magnitude dos sinais analíticos,

ficando selecionado o reator de 25 cm. Com relação à segunda etapa reacional, reatores maiores que 40 cm promoviam aumento dos sinais analíticos em ca 15 % (Figura 43). De fato, a reação de formação do azul de molibdênio é relativamente lenta, o que explica o fato de comprimentos maiores serem requeridos. Cabe ressaltar que reatores maiores que 50 cm deterioram muito a frequência analítica. Ficou selecionado o reator de 40 cm para a consecução da metodologia proposta.

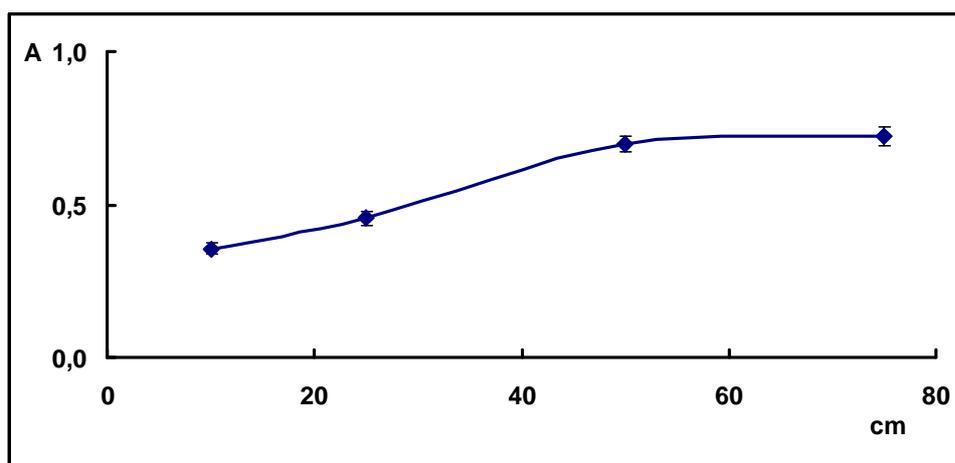


Figura 43. Influência do comprimento do reator na reação de formação de azul de molibdênio. A Figura se refere à inserção de 18 pulsos de solução-padrão $20,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4 + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ processada no sistema da Figura 24

Quanto à influência da concentração de HNO_3 em R_1 , este parâmetro se mostrou ser importante para o desenvolvimento reacional. Na medida em que se aumentava a concentração, a sensibilidade analítica era melhorada e os sinais analíticos se tornavam mais repetitivos (Figura 44). A concentração $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ foi escolhida para os demais estudos.

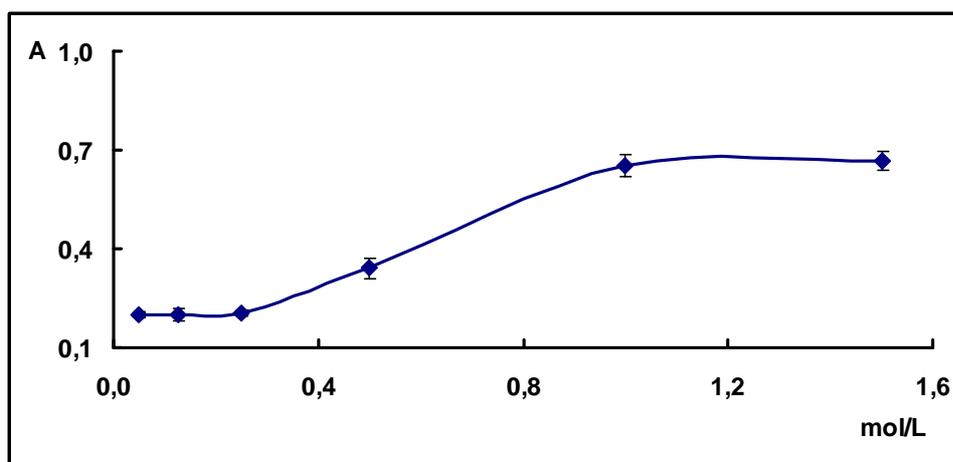


Figura 44. Influência da concentração hidrogeniônica na determinação de P-PO₄. A Figura se refere à inserção de 18 pulsos de solução-padrão 20,0 mg L⁻¹ P-PO₄ + 0,01 mol L⁻¹ HNO₃ processada no sistema da Figura 24

Com relação ao efeito da variação da concentração em R₂, foi verificada uma variação significativa na magnitude dos sinais analíticos (ca 35 %) quando a mesma era aumentada de 0,25 a 0,50 % (m/v). Para valores de concentração maiores que 0,50 % (m/v), não foram observadas variações significativas em sensibilidade. Verificou-se que a concentração em R₂ é um parâmetro de extrema importância no desenvolvimento reacional (Figura 45). Melhor sensibilidade analítica foi observada à medida que a concentração do agente redutor era aumentada de 0,25 e 1,00 % (m/v). No entanto, o efeito Schlieren foi observado causando então alterações no perfil dos sinais analíticos quando a concentração 1,00 % (m/v) era utilizada. Isso se deve provavelmente, ao fato do ácido ascórbico aderir às paredes dos tubos e conectores do sistema. A concentração de 0,50 % (m/v) foi escolhida como concentração de trabalho.

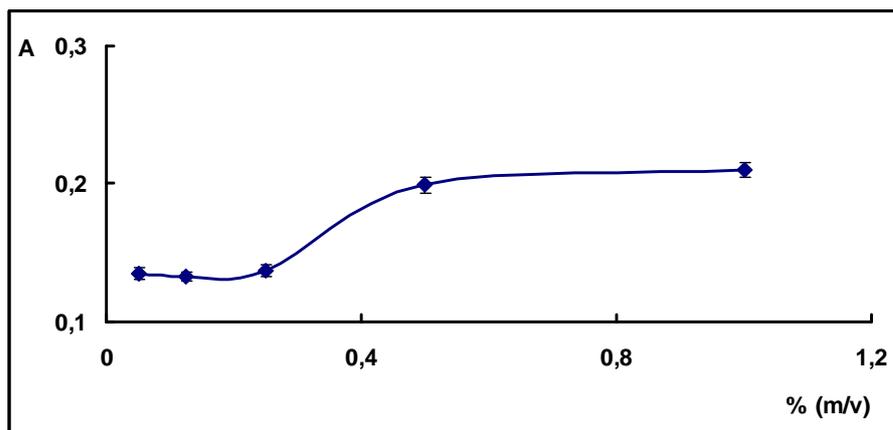


Figura 45. Influência da concentração de ácido ascórbico. A figura se refere à solução-padrão $20,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ P-PO}_4 + 1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ processada no sistema da Figura 24

Relativamente à seletividade analítica, os elementos cobre e ferro foram avaliados como as principais espécies químicas interferentes em potencial. Como a concentração de cobre nas amostras de mostos e melaços é inferior a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, concentração na qual este elemento começa a interferir na determinação de fosfato (DIAS, 2006), não houve a necessidade da utilização de agente mascarante. Avaliou-se o emprego de $0,50 \text{ \% (m/v)}$ de oxalato de potássio como agente mascarante para o ferro, sendo adicionado à solução de molibdato de amônio (R_2). Verificou-se que a solução oxalato de potássio $0,50 \text{ \% (m/v)}$ foi suficiente para inibir a interferência de ferro presente nas amostras.

Após o estudo da seletividade analítica e seleção do agente mascarante, estimou-se a sensibilidade analítica do método proposto. Para tanto, uma curva analítica foi obtida, sendo esta representada como:

$$y = 0,0125x + 0,1436$$

onde: y = altura de pico expressa em absorvância, x = concentração de fósforo (mg L^{-1}) em mostos e melaços, $r = 0,9987$, $n = 3$ até $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ de P-PO_4 .

O limite de quantificação do método proposto foi estimado em $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ e a frequência analítica foi de 90 determinações por hora.

Os resultados referentes às amostras processadas encontram-se na Tabela 21, a qual fornece as estimativas de desvios-padrão dos resultados baseadas em três repetições.

Tabela 21. Resultados obtidos na determinação de P-PO₄. Os dados, em mg L⁻¹ para mostos e melaços, são valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 24)

Amostra	Mosto SIFA (mg L⁻¹)	Mosto ICP-OES (mg L⁻¹)	Melaço SIFA (mg L⁻¹)	Melaço ICP-OES (mg L⁻¹)
1	64,28 ± 0,06	65,40 ± 0,01	71,64 ± 0,01	73,20 ± 0,02
2	35,30 ± 0,04	35,72 ± 0,02	80,71 ± 0,05	81,22 ± 0,01
3	82,30 ± 0,02	81,50 ± 0,03	37,21 ± 0,01	37,79 ± 0,01
4	63,56 ± 0,03	64,21 ± 0,03	47,20 ± 0,03	47,34 ± 0,02
5	64,56 ± 0,04	64,92 ± 0,04	46,38 ± 0,04	46,42 ± 0,03

6. CONCLUSÕES

A associação da estratégia de calibração multivariada aos sistemas de análise em fluxo para determinação de analitos que apresentam comportamento cinético similar na mesma amostra foi demonstrada. As vantagens e limitações da estratégia de associação foram avaliadas e boas figuras de mérito foram obtidas permitindo-se concluir que o método é recomendável a análises químicas rotineiras.

Embora a otimização multivariada tivesse sido inicialmente objetivada, a avaliação dos resultados demonstrou não haver interação significativa entre as principais variáveis envolvidas. Por outro lado, os resultados apresentados pela otimização univariada se mostraram mais adequados para as determinações simultâneas. Cabe ressaltar que as variáveis mais significativas foram o volume de amostra e a concentração hidrogeniônica, através das quais foram constatados valores previstos pelo modelo próximo dos reais.

Uma das desvantagens foi a necessidade do preparo de um grande número de amostras para a construção do modelo matemático. Finalmente deve-se ressaltar que o método proposto se constitui em importante alternativa para análise de mistura de açúcares e glicerol.

Relativamente às determinações de ART e etanol, os procedimentos automatizados se mostraram viáveis. As características do fluxo pulsado referentes à transferência de calor e difusão gasosa foram demonstradas. Os procedimentos propostos apresentaram as figuras de mérito superiores àqueles envolvendo fluxo laminar e suas potencialidades e limitações foram ressaltadas. Deve ainda ser mencionado que um dos principais atrativos do método proposto para a determinação espectrofotométrica de etanol é a boa seletividade. Assim, os sistemas MPFS desenvolvidos para a determinação espectrofotométrica de ART e etanol se mostraram eficazes e podem ser recomendados a análises rotineiras na indústria sucro-alcooleira.

Dentre os parâmetros estudados, a temperatura foi o mais importante para comprovar esses sistemas são eficientes com relação à impulsão de fluidos em procedimentos que envolvem aquecimento. O emprego de fluxos pulsados desempenha um papel mais relevante em aquecimento de bobinas de reação, relativamente a fluxos laminares. Esse fato se deve a transferência de calor entre os elementos de fluido e o superior transporte radial de massas foram constatados.

Além de facilidade de implementação e operação, robustez e versatilidade, foi possível reduzir os volumes de reagentes e de amostras (menos efluentes gerados), resultando em menor custo por determinação.

O sistema SIFA desenvolvido para a determinação espectrofotométrica de alumínio, ferro e P-PO₄ se mostrou eficaz apresentando robustez e flexibilidade, além de proporcionar a expansão de aplicabilidade analítica. A utilização de bombas solenóide como módulo de impulsão resultou em boa repetibilidade dos sinais analíticos.

O desenvolvimento de um módulo de análises simples sem a necessidade de reconfiguração permitiu condicionar diferentes estratégias adequadas à determinação de cada analito confirmando a viabilidade do sistema polimodal para determinações simultâneas.

A baixa dispersão da zona de amostra e a simplicidade na etapa de otimização em função da não necessidade da avaliação de volumes evidenciaram as características inerentes aos sistemas SIFA.

É importante destacar que o uso de bombas solenóide como unidades propulsoras de fluidos resulta em métodos com boas características analíticas e figuras de mérito, tais como, versatilidade, sensibilidade analítica e baixo consumo de reagentes. Isso se deve as melhores condições de mistura devido ao superior transporte radial dos elementos de fluido, comparativamente aos sistemas com fluxo laminar. Entretanto, algumas limitações referentes ao tempo de uso e volumes de pulsos provocam aquecimento das mesmas, prejudicando a precisão e exatidão volumétrica, em função destas exigirem uma corrente elétrica mais intensa.

Estudos posteriores focalizando outros aspectos são recomendados.

REFERÊNCIAS

AGUERSSIF, N.; BENAMOR, M.; KACHBI, M.; DRAA, M.T. Simultaneous determination of Fe(III) and Al(III) by first-derivative spectrophotometry and partial least-squares (PLS-2) method - Application to post-haemodialysis fluids. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Jena, v.22, p.175–182, 2008.

AJANDOUZ, E.H.; TCHIAKPE, L.S.; ORE, F.D.; PUIGSERVER, A. Effects of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics in Fructose-Lysine Model Systems. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v.66, p.926-931, 2001.

ALBERTÚS, F.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; CERDÁ, V. A robust multi-syringe system for process flow analysis - Part 3. Time based injection applied to the spectrophotometric determination of nickel(II) and iron speciation. **The Analyst**, Cambridge, v.126, p.903-910, 2001.

ALBERTÚS, F.; HORSTKOTTE, B.; CLADERA, A.; CERDÁ, V. A robust multisyringe system for process flow analysis. Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **The Analyst**, Cambridge, v.124, p.1373-1381, 1999.

ALMEIDA, M.I.G.S.; SEGUNDO, M.A.; LIMA, J.L.F.C.; RANGEL, A.O.S.S. Multi-syringe flow injection system for the determination of available phosphorus in soil samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Abingdon, v.85, p.51-62, 2005.

ALVES, E.R.; FERES, M.A.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C. Exploiting pulsed flows for heating improvement: application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices. **Current Analytical Chemistry**, Dordrecht, v.5, p.65-69, 2009.

ALVES, E.R.; FORTES, P.R.; BORGES, E.P.; ZAGATTO, E.A.G. Spectrophotometric flow-injection determination of total reducing sugars exploiting their alkaline degradation. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.564, p.231-235, 2006.

AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Methods for Analysis of Musts and Wines**. Nova Iorque: Wiley, 1980. 341p.

ANDREWS, L.S.; GODSHALL, M.A.; MOORE, S., Sucrose degradation under model processing conditions, **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v.67, p.1621-1624, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Method 945.09. Arlington: AOAC International, 1995. cap. 27, p.4-5.

ARANHA, D.A.D. **Efeitos do alumínio sobre a fermentação alcoólica**. 2002. 86 f. Tese (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

ARAÚJO, A.N.; LIMA, J.L.F.C.; RANGEL, A.O.S.S.; SEGUNDO, M.A. Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. **Talanta**, Amsterdam, v.52, p.59-66, 2000.

BAISIER, W.M.; LABUZA, T.P. Maillard browning kinetics in a liquid model system, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v.40, p.707-713, 1992.

BAKER, J.P.; SCHOFIELD, C.L. Aluminum toxicity to fish in acidic waters. **Water Air Soil Pollut**, Dordrecht, v.18, p.289-309, 1982.

BASSO, L.C. **Efeitos do alumínio no crescimento do fermento**. In: REUNIÃO ANUAL FERMENTEC, 1990, Piracicaba: FEALQ/ESALQ/USP, 1990.

BASSO, L.C. **Efeitos tóxicos do alumínio na fermentação alcoólica**. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL, 2., 1989, Piracicaba. Anais. Piracicaba: SBFV/ESALQ, 1989.P.243.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. **Processos de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ, 1996. 103p.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Toxic action of aluminum toward yeast fermentation. In: **Euroconference**, 1997, Sesimbra.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food Chemistry**, Berlin: Springer-Verlag, 1986.774p.

BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; REIS, B.F. Merging zones in flow injection analysis.1. Double proportional injector and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.101, p.17-23, 1978b.

BIANCHI, F.; CARERI, M.; MAFFINI, M.; MANGIA, A.; MUCCHINO, C. Use of experimental design for optimisation of the cold plasma ICP-MS determination of lithium, aluminum and iron in soft drinks and alcoholic beverages. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v.17, p.251-256, 2003.

BLUMER, S.A.G. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. 53 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

BORGES, S.S.; FRIZZARIN, R.M.; REIS, B.F. An automatic flow injection analysis procedure for photometric determination of ethanol in red wine without using a chromogenic reagent. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.385, p.197-202, 2006.

BRANDS, C.M.J.; BOEKEL, M.A.J.S. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems: building of a reaction network model, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Amsterdam, v.49, p.4667-4675, 2001.

BRERETON, R.G. Introduction to a multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, Cambridge, v.125, p.2125-2154, 2000.

BRUIJN, J.M.; KIEBOOM, A.P.G.; BEKKUM, H. Reactions of monosacharides in aqueous alkaline solutions, **Sugar Technology Reviews**, Amsterdam, v.13, p.21-52, 1986.

BRYCE, D.W.; IZQUIERDO, A.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Continuous microwave assisted pervaporation/atomic fluorescence detection: na approach for speciation in solid samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.324, p.69-75, 1996.

CAL, L.; XU, C. Simultaneous determination of trace iron and aluminum by catalytic spectrophotometry based on a novel oxidation reaction of xylene cyanol FF. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.24, p.775-778, 2008.

CARLSSON, K.; JACOBSEN, H.S.; JENSEN, A.L.; STENSTROM, T.; KARLBERG, B. Micro-continuous flow system for wet chemical analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.354, p.35-42, 1997.

CARNEIRO, J.M.T.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. An improved sampling approach in multi-pumping flow systems applied to the spectrophotometric determination of glucose and fructose in syrups. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.531, p.279-284, 2005.

CARNEIRO, J.M.T.; ZAGATTO, E.A.G.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.474, p.161-166, 2002.

CERDÁ, V.; CERDÁ, A.; CLADERA, A.; OMS, M.T.; MAS, F.; GOMEZ, E.; BAUZA, F.; MIRÓ, M.; FORTEZA, R.; ESTELA, J.M. Monitoring of environmental parameters by sequential injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.20, p.407-418, 2001.

CERDÁ, V.; ESTELA, J.M.; FORTEZA, R.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; ALTIMIRA, P.; SITJAR, P. Flow techniques in water analysis, **Talanta**, Amsterdam, v.50, p.695-705, 1999.

CHO, S.W.; JOSHI, J.G. Inactivation of bakers-yeast glucose-6-phosphate-dehydrogenase by aluminum. **Biochemistry**, Washington, v.28, p.3613-3618, 1989.

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**, Amsterdam, v.579, p.33-37, 2006.

COCA, M.; GARCÍA, M.T.; GONZÁLEZ, G.; PEÑA, M.; GARCÍA, J.A. Study of coloured components formed in sugar beet processing, **Food Chemistry**, Amsterdam, v.86, p.421-433, 2004.

CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v.30, p.481-487, 2007.

COSCIONE, A.R.; ANDRADE, J.C.; POPPI, R.J. PLS regression using real sample calibration for aluminum and iron determination in plant extracts. **The Analyst**, Cambridge, v.127, p.135-139, 2002.

DIAS, A.C.B.; CARNEIRO, J.M.T.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E.A.G. High-sensitivity methods for sequential injection determination of the main constituents of alloys. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.514, p.253-257, 2004.

DIAS, A.C.B.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; QUINTELLA, C.M.; LIMA, A.M.V.; ZAGATTO, E.A.G. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.388, p.1303-1310, 2007.

DIAS, A.C.B.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of bromhexine. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.499, p.107-113, 2003.

DICKMAN, S.R.; BRAY, R.H. Colorimetric determination of phosphate. **Analytical Chemistry**, Washington, v.15, p.665-668, 1940.

DYKE, S.F. **The chemistry of natural products**, Interscience Pub., Nova Iorque, 1960. v.5, 232p.

FERES, M.A.; FORTES, P.R.; ZAGATTO, E.A.G.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.618, p.1-17, 2008.

FERNANDES, R.N.; REIS, B.F. Flow system exploiting multicommutation to increase sample residence time for improved sensitivity. Simultaneous determination of ammonium and ortho-phosphate in natural water. **Talanta**, Amsterdam, v.58, p.729-737, 2002.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v.22, p.724-731, 1999.

FORTES, P.R.; FERES, M.A.; SASAKI, M.K.; ALVES, E.R.; ZAGATTO, E.A.G.; PRIOR, J.A.V.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems. **Talanta**, Amsterdam, v.79, p.978-983, 2009.

FORTES, P.R.; FERES, M.A.; ZAGATTO, E.A.G. An expert flow system involving in-line prior assay for turbidimetric determination of chloride and sulphate in natural waters. **Talanta**, Amsterdam, v.77, p.571-575, 2008.

FORTES, P.R.; MENESES, S.R.P.; ZAGATTO, E.A.G. A novel flow-based strategy for implementing differential kinetic analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.572, p.316-320, 2006.

GEORGIU, C.A.; KOUPPARIS, M.A. Construction and evaluation of an automated flow injection-stopped flow analyzer for multipoint reaction rate spectrophotometric methods. Determination of ammonia nitrogen, creatinine and phosphate. **Journal of Automatic Chemistry**, New York, vol.13, p.199-207, 1991.

GHAVAMI, R.; NAJAFIA, A.; HEMMATEENEJAD, B. Chemometrics-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination and complexation study of Fe(III), Al(III) and V(V) with morin in micellar media. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v.70, p.824-834, 2008.

GOMEZ, E.; TOMAS, C.; CLADERA, A.; ESTELA, J.M.; CERDÁ, V. Multicomponent techniques in sequential injection. **The Analyst**, Cambridge, v.20, p.1181-1188, 1995.

GRASSI, V.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G. Flow systems exploiting in-line prior assays. **Talanta**, Amsterdam, v.64, p.1114-1118, 2004.

HERNANDEZ-MENDEZ, J.; MATEOS, A.A.; PARRA, M.J.A.; GARCIA-MARIA, C. Spectrophotometric flow-injection determination of ascorbic acid by generation of triiodide. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.184, p.243-250, 1986.

HONIG, P. **Principios de tecnología azucarera**. México: Continental, 1969. 3v.

HORSTKOTTE, B.; ELSHOLZ, O.; CERDÁ, V. Review on automation using multisyringe flow injection analysis. **Journal of Flow Injection Analysis**, Tokyo, v.22, p.00-109, 2005.

HOWELER, R.H. Identifying plants adaptable to low pH conditions. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; MURRMANN, R.P. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.p.885-904.

ICARDO, M.C.; MATEO, J.V.G.; CALATAYUD, J.M. Multicommutation as a powerful new analytical tool. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.21, p.366-378, 2002.

INFANTE, C.M.C.; MORALES-RUBIO, A.; de LA GUARDIA, M.; ROCHA, F.R.P. A multicommutated flow system with solenoid micro-pumps for paraquat determination in natural waters. **Talanta**, Amsterdam, v.75, p.1376-1381, 2008.

INSTITUTE OF ALCOHOL STUDIES. **World Drink Trends 2005**. London: WARC, 2005. 184p.

JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation. **Process Biochemistry**, Barking, v.19, p.48-60, 1984.

JÖRGENSEN, A.; HANSEN, A.; LUND, A.; MITCHELL, C.A. **Micro-organisms and fermentation**. 6. ed. London, C. Griffin and Co., 1939. 416p.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology**, Stanford, v.46, p.237-260, 1995.

KORENAGA, T.; ZHOU, X.; MORIWAKE, T.; MURAKI, H.; NAITO, T.; SANUKI, S. Computer-controlled micropump suitable for precise microliter delivery and complete in-line mixing. **Analytical Chemistry**, Washington, v.66, p.73-78, 1994.

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**, Amsterdam, v.334, p.287-293, 1996.

KRUG, F.J. **Métodos de Preparo de Amostras**. 1. ed. Piracicaba, 2008. 340p.

KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. Commutation in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.179, p.103-118, 1986.

KRUG, F.J.; REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; FERREIRA, J.R.; JACINTHO, A.O. Zone trapping in flow-injection analysis. Spectrophotometric determination of low levels of ammonium ion in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.151, p.39-48, 1983.

LAKINS, N.E.; WILLIAMS, G.D.; YI, H. SMOTHERS, B.A. **Apparent per capita alcohol consumption: national, state, and regional trends, 1977-2002**. Bethesda: National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA), 2004. (Surveillance Report, 66).

LANE, J.H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator**. London: N.Rodger, 1934. 8p.

LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, B.F.; SANTOS, J.L.M.; ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.466, p.125-132, 2002.

LAVORANTE, A.F. **Desenvolvimento de instrumentação e procedimentos analíticos automáticos para a determinação espectrofotométrica de tensoativos em águas**. 2006. 171f. Tese (Doutorado em Ciências-Química na Agricultura e no Ambiente - Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LAVORANTE, A.F.; PIRES, C.K.; MORALES-RUBIO, A.; de la GUARDIA, M.; REIS, B.F. A spectrophotometric flow procedure for the determination of cationic surfactants in natural waters using a solenoid micro-pump for fluid propulsion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.381, p.1305-1309, 2005.

LEDERKREMER, R.M.; VARELA, O. **Hidratos de carbono**, Programa Regional de Desarrollo científico y Tecnológico. Washington, DC: OEA, 1998. 144p. (Monografía OEA, 32).

LIMA, J.L.F.C.; SÁ, S.M.O.; SANTOS, J.L.M.; ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.32, p.1011-1017, 2003.

LIMA, J.L.F.C.; SANTOS, J.L.M.; DIAS, A.C.B.; RIBEIRO, M.F.T.; ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta**, Amsterdam, v.64, p.1091-1098, 2004.

LINDGREN, F.; GELADI, P.; WOLD, S. Kernel-based PLS regression; Cross validation and applications to spectral data. **Journal of Chemometrics**, Chichester, v.8, p.377-389, 1994.

LOBINSKI, R., MARCZENKO, Z. Recent advances in ultraviolet-visible spectrophotometry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v.23, p.55-111, 1992.

LOCATELLI, C. Simultaneous determination of aluminum and iron in high salt content matrices by adsorptive stripping voltammetry. application to dialysis fluids. **Electroanalysis**, New York, v.15, p.1397-1402, 2003.

LOPES, C.M.P.V.; ALMEIDA, A.A.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Automatic flow system for the sequential determination of copper in serum and urine by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.555, p.370-376, 2006.

LUCA, G.C.; REIS, B.F. Simultaneous photometric determination of albumin and total protein in animal blood plasma employing a multicommutated flow system to carried out on line dilution and reagents solutions handling. **Spectrochimica Acta Part A – Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v.60, p.579-583, 2004.

LVOVA, L.; PAOLESSE, R.; NATALE, C.D.; D'AMICO, A. Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based electronic tongue. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v.118, p.439-447, 2006.

MAHADEVIAH, M.S.; YOGENDRA, K.; MANSOUR, S.A.G.; SURESHA, M.S.; SATHISH, M.A.; NAGENDRAPPA, G. A Simple spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juices, water and detergent samples. **E-Journal of Chemistry**, Tamil Nadu, India, v.4, p.467-473, 2007.

MANERA, M.; MIRÓ, M.; RIBEIRO, M.F.T.; ESTELA, J.M.; CERDÁ, V.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Rapid chemiluminometric determination of gabapentin in pharmaceutical formulations exploiting pulsed-flow analysis. **Luminescence**, Canada, v.24, p.10-14, 2009.

MARCZENKO, Z. **Spectrophotometric determination of elements**. John Wiley & Sons, 1976. 620p.

MARQUES, K.L.; PIRES, C.K.; SANTOS, J.L.M.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C. A multi-pumping flow system for chemiluminescent determination of ammonium in natural waters. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Abingdon, vol.87, p.77-85, 2007.

MARQUES, K.L.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. A catalytic multi-pumping flow system for the chemiluminometric determination of metformin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.382, p.452-457, 2005.

MARQUES, K.L.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Application of pulsed flow analysis for chemiluminescent screening of fluoxetine counterfeit pharmaceuticals. **Analytical Letters**, New York, v.40, p.2241–2251, 2007.

MARQUES, K.L.; SANTOS, J.L.M.; LOPES, J.A.; LIMA, J.L.F.C. Simultaneous chemiluminometric determination of levodopa and benserazide in a multi-pumping flow system with multivariate calibration. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.24, p.985-991, 2008.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. Chichester: John Wiley, 1989.

MAS, F.; ESTELA, J.M.; CERDÁ, V. Simultaneous spectrophotometric determination of silicate and phosphate by flow injection analysis. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, London, v.43, p.71-78, 1991.

MASSART, D.L.; VANDEGINSTE, B.G.M.; DEMING, S.N.; MICHOTE, Y.; KAUFMAN, L. **Chemometrics: a textbook**. Amsterdam: Elsevier, 1988.

MAS-TORRES, F.; MUNOZ, A.; ESTELA, J.M.; CERDÁ, V. Simultaneous spectrophotometric determination of phosphate and silicate by a stopped-flow sequential injection method. **International Journal Environmental**, London, v.77, p.185-202, 2000.

MATTOS, I.L.; SARTINI, R.P.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Spectrophotometric flow injection determination of ethanol in distilled spirits and wines involving permeation through a silicon tubular membrane. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.14, p.299-313, 1988.

MEADE, G.P.; CHEN, J.C.P. **Cane sugar handbook: A manual for cane sugar manufacturers and their chemists**. 10.ed. New York: John Wiley, 1977. 947p.

MENESES, S.R.P.; MARQUES, K.L.; PIRES, C.K.; SANTOS, J.L.M.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Evaluation of the total antioxidant capacity by using a multipumping flow system with chemiluminescent detection. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v.345, p.90-95, 2005.

MINAMI, H.; YADA, M.; YOSHIDA, T.; ZHANG, Q.; INOUE, S.; ATSUYA, I. Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.20, p.455-459, 2004.

MIRÓ, M.; CERDÁ, V.; ESTELA, J.M. Multisyringe flow injection analysis: Characterization and applications. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.21, p.199-210, 2002.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; CHIERICE, G.O. Determinação simultânea de alumínio por potenciometria e ferro por espectrofotometria em sistema FIA. **Química Nova**, São Paulo, v.15, p.193-198, 1992.

MORGANO, M.A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. 2005. 110f. Tese (Doutorado em Química Analítica – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2005.

MOTOMIZU, S.; LI, Z.H. Trace and ultratrace analysis methods for the determination of phosphorus by flow-injection techniques, **Talanta**, Amsterdam, v.66, p.332-340, 2005.

MOTOMIZU, S.; OSHIMA, M.; MA, L. On-site Analysis for phosphorus and nitrogen in environmental water samples by flow-injection spectrophotometric method. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.13, p.401-404, 1997.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.27, p.31-36, 1962.

NAGAOSA, Y.; SAKATA, K. Salting-out extraction technique for pretreatment in the liquid chromatographic determination of copper(II), aluminum(III), iron(III) and manganese(II) in biological samples. **Talanta**, Amsterdam, v.46, p.647-654, 1998.

NASCIMENTO, P.C.; FABRO, L.D.; BOHRER, D.; CARVALHO, L.M.; ROSA, M.B.; NOREMBERG, S.M. Al(III) and Fe(III) balance in hemodialysis treatment assessed via fluid analysis by adsorptive stripping voltammetry and UV sample digestion. **Electroanalysis**, New York, v.20, p.1078-1084, 2008.

NASCIMENTO, P.C.; JOST, C.L.; GUTERRES, M.V.; FABRO, L.D.; CARVALHO, L.M.; BOHRER, D. Simultaneous determination of Al(III) and Fe(III) in post-hemodialysis fluids by spectrophotometry and multivariate calibration. **Talanta**, Amsterdam, v.70, p.540-545, 2006.

NEDJADA, S.H.; AHMADABADI, M.N.; FURUHACAR, T. Annealing behavior of an ultrafine-grained Fe–Ni–Mn steel during isothermal aging. **Materials Science and Engineering A**, Lausanne, v.503, p.156-159, 2009.

NI, Y.; HUANG, C.; KOKOT, S. A kinetic spectrophotometric method for the determination of ternary mixtures of reducing sugars with the aid of artificial neural networks and multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.480, p.53-65, 2003.

NIAZI, A.; ZOLGHARNEIN, J.; DAVOODABADI, M.R.; Simultaneous determination of aluminum and iron with hematoxylin using spectrophotometric and orthogonal signal correction-partial least squares in plant and water. **Annali di Chimica**, Roma, v.97, p.1181-1190, 2007.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399p.

OLIVEIRA, A.F.; FATIBELLO FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of reducing sugars using a focalized coiled reactor in a domestic microwave oven. **Talanta**, Amsterdam, v.50. p.899-904, 1999.

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**, Amsterdam, v.332, p.173-178, 1996.

PERRIN, D.D.; DEMPSEY, B. **Buffers for pH and Metal Ion Control**. 1. ed. London, 1974. 170p.

PHONGKANPAI, V.; BENJAKUL, S.; TANAKA, M. Effect of pH on antioxidative activity and other characteristics of caramelization products, **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v.30, p.174-186, 2006.

PINTO, P.C.A.G.; SARAIVA, M.L.M.F.S.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. A pulsed sequential injection analysis flow system for the fluorimetric determination of indomethacin in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.539, p.173-179, 2005.

PIRES, C.K.; LAVORANTE, A.F.; MARCONI, L.M.T.; MENESES, S.R.P.; ZAGATTO, E.A.G. A multi-pumping flow system for chemiluminometric determination of ascorbic acid in powdered materials for preparation of fruit juices. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v.83, p.70-74, 2006.

PIRES, C.K.; MARQUES, K.L.; SANTOS, J.L.M.; LAPA, R.A.S.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system. **Talanta**, Amsterdam, v.68, p.239-244, 2005.

PONS, C.; FORTEZA, R.; CERDÁ, V. Multi-pumping flow system for the determination, solid-phase extraction and speciation analysis of iron. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.550, p.33-39, 2005.

PONS, C.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; FORTEZA, R.; CERDÁ, V. Multi-pumping flow system for the determination of nitrite and nitrate in water samples. **Microchimica Acta**, Netherlands, v.161, p.73–79, 2008.

PONS, C.; TÓTH, I.V.; RANGEL, A.O.S.S.; FORTEZA, R.; CERDÁ, V. Multi-pumping flow system for the determination of dissolved orthophosphate and dissolved organic phosphorus in wastewater samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.572, p.148-154, 2006.

POPPI, R.J. **Construção de um espectrofotômetro com transformada de Hadamard e sua aplicação na análise por injeção em fluxo**. 1993. 187f. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1993.

PRIOR, J.A.V.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Exploiting kinetic spectrophotometric determination of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, in a multi-pumping flow system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.600, p.183-187, 2007.

RANGEL, A.O.S.S.; TÓTH, I.V. Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.416, p.205-210, 2000.

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**, Amsterdam, v.293, p.129-138, 1994.

RIBEIRO, M.F.T. **Sistemas de fluxo contínuo baseados em novos conceitos de gestão de fluidos**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, 2008.

RIBEIRO, M.F.T., SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G. Fully Automated spectrophotometric method for the determination of buspirone in pharmaceutical preparations. **Analytical Letters**, New York, v.39, p.2243–2253, 2006.

RIBEIRO, M.F.T.; DIAS, A.C.B.; SANTOS, J.L.M.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. A Multipumping flow system for *in vitro* screening of peroxyxynitrite scavengers. **Journal of Biomolecular Screening**, Singapura, v.12, p.875-880, 2007.

RIBEIRO, M.F.T.; DIAS, A.C.B.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Fluidized beds in flow analysis: use with ion-exchange separation for spectrophotometric determination of zinc in plant digests. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.384, p.1019–1024, 2006.

RIBEIRO, M.F.T.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C. Piezoelectric pumping in flow analysis: Application to the spectrophotometric determination of gabapentin. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.600, p.14-20, 2007.

RIBEIRO, M.F.T.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; DIAS, A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G. Single interface in flow analysis. **Talanta**, Amsterdam, v.68, p.351-358, 2005.

ROBARDS, K.; McKELVIE, I.D.; BENSON, R.; WORSFOLD, P.J.; BLUNDELL, N.J.; CASEY, H. Determination of carbon, phosphorus, nitrogen and silicon species in waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.287, p.147-190, 1994.

ROCHA, F.R.P.; INFANTE, C.M.C.; MELCHERT, W.R. A Multi-purpose flow system based on multi-commutation. **Spectroscopy Letters**, London, v.39, p.651-668, 2006.

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. Concept, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.468, p.119-131, 2002.

ROCHA, F.R.P.; TORRALBA-RODENAS, E.; REIS, B.F.; MORALES-RUBIO, A.; de la GUARDIA, M. A portable and low cost equipment for flow injection chemiluminescence measurements. **Talanta**, Amsterdam, v.67, p.673-677, 2005.

RUZICKA J.; HANSEN, E.H. Stopped flow and merging zones. A new approach to enzymatic assay by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 106, p.207-224, 1979.

RUZICKA, J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. **The Analyst**, Cambridge, v.125, p.1053-1060, 2000.

RUZICKA, J.; GUBELI, T. Principles of stopped-flow sequential injection analysis and its application to the kinetic determination of traces of a proteolytic enzyme. **Analytical Chemistry**, Washington, v.63, p.1680-1685, 1991.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analyses 1. New concept of fast continuous flow analysis, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.78, p.145-157, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow injection analysis**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 498p.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.237, p.329-343, 1990.

SAFAVI, A.; ABDOLLAHI, H.; MIRZAJANI, R. Simultaneous spectrophotometric determination of Fe(III), Al(III) and Cu(II) by partial least squares calibration method. **Spectrochimica Acta Part A**, Oxford, v.63, p.196-199, 2006.

SAFAVI, A.; MIRZAEI, M.; ABDOLLAHI, H. Simultaneous spectrophotometric determination of iron, titanium, and aluminum by partial least-squares calibration method in micellar medium. **Analytical Letters**, New York, v.36, p.699-712, 2003.

SANTOS, J.L.M.; CLAUSSE, A.; LIMA, J.L.F.C.; SARAIVA, M.L.M.F.S.; RANGEL, A.O.S. Determination of ambroxol in an automated multi-pumping pulsed flow system. **Analytical Sciences**, Tokyo, v.21, p.461-464, 2005.

SEGUNDO, M.A.; RANGEL, A.O.S.S.; CLADERA, A.; CERDÁ, V. Multisyringe flow system: determination of sulfur dioxide in wines. **The Analyst**, Cambridge, v.125, p.1501-1505, 2000.

SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; RÉ, F.E.; FURTADO, C.H.F.F.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool**. 3. ed. Piracicaba: FERMENTEC/ESALQ, 2003. 85P.

SILVESTRE, C.I.C.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Single reaction interface flow system for chemiluminescent monitoring of mannitol based on its hydroxyl radical scavenger activity. **Talanta**, Amsterdam, v.77, p.518-521, 2008.

SILVESTRE, C.I.C.; SANTOS, J.L.M.; LIMA, J.L.F.C.; ZAGATTO, E.A.G. Exploiting π -acceptors for the determination of thyroid hormones (T3 and T4) using a single interface flow system. **Talanta**, Amsterdam, 2009. doi:10.1016/j.talanta.2009.01.043.

SKEGGS JUNIOR, L.T. An automatic method for colorimetric analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v.28, p.311-322, 1957.

SOMMER, L. **Analytical absorption spectrophotometry in the visible and ultraviolet**; the principles. Amsterdam: Elsevier, 1989, 310p.

STRAYER, L. **Biochemistry**, 3. ed. New York, 1988. 1089p.

THOMAS, E.V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, Washington, v.66, p.796A-804, 1994.

TOVAR, A.; MORENO, C.; VEZ, M.P.M.; VARGAS, M.G. Simultaneous determination of nutrients (ammonium and phosphate) in marine aquaculture effluents by flow analysis. **Química Analítica**, São Paulo, v.20, p.37-45, 2001.

TSOULFANIDIS, I.A.; TSOGAS, G.Z.; GIOKAS, D.L.; VLESSIDIS, A.G. Design of a field flow system for the on-line spectrophotometric determination of phosphate, nitrite and nitrate in natural water and wastewater. **Microchimica Acta**, Wien, v.160, p.461-469, 2008.

ULASOVA, E.A.; MICHELI, L.; VASIL, L.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; VDOVICHEV, S.V.; ZORIN, A.V.; KRUTOVERTSEV, S.A.; KARYAKINA, E.E.; KARYAKIN, A.A. Flow-injection analysis of residual glucose in wines using a semiautomatic analyzer equipped with a Prussian blue-based biosensor. **Electroanalysis**, New York, v.15, p.447-451, 2003.

VALCARCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M.D. **Flow injection analysis**. Principles and applications. Chichester: Ellis Horwood, 1987.

VANLOOT, P.; BRANGER, C.; MARGAILLAN, A.; PAPA, C.B.; BOUDENNE, J.L.; COULOMB, B. On-line solid-phase extraction and multisyringe flow injection analysis of Al(III) and Fe(III) in drinking water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.389, p.1595-1602, 2007.

VICENTE, S. **Uso de membranas de difusão gasosa para amostragem em sistemas de análises em fluxo**. 2004. 94 f. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura)-Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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**, Rio de Janeiro, v.78, p.23-29, 2006.

VIGANI, G.; MAFFI, D.; ZOCCHI, G. Iron availability affects the function of mitochondria in cucumber roots. **New Phytologist**, London, v.182, p.127-136, 2009.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**, 2. ed. Nova York, John Wiley & Sons, 1995. 1361p.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, London, v.182, p.49-84, 2009.

WHITMAN, D.A.; SEASHOLTZ, M.B.; CHRISTIAN, G.D.; RUZICKA, J.; KOWALSKI, B.R. Double-Injection flow injection analysis using multivariate calibration for multicomponent analysis, **Analytical Chemistry**, Washington, v.63, p.775-781, 1991.

WIT, G.; KIEBOOM, A.P.G.; BEKKUM, H. Enolisation and isomerisation of monosaccharides in aqueous, alkaline solution, **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.74, p.157-175, 1979.

WOMACK, F.C.; COLOWICK, S.P. Proton – dependent inhibition of yeast and brain hexokinases by aluminum in ATP preparations. **Proceedings of the National academy of Sciences of the USA**, Washington, v.76, p.5080-5084, 1979.

YOSHINO, M.; MURAKAMI, K.; KAWANO, K. Interaction of aluminum ion with ATP. Mechanism of the aluminum inhibition of glycerol kinase and its reversal by spermine. **Biomaterials**, v.11, p.63-67, 1998.

YUCHI, A.; OGISO, A.; MURANAKA, S.; NIWA, T. Preconcentration of phosphate and arsenate at sub-ng mL⁻¹ level with a chelating polymer-gel loaded with zirconium(IV). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.494, p.81-86, 2003.

ZAGATTO, E.A.G., BERGAMIN FILHO, H.; BRIENZA, S.M.B.; ARRUDA, M.A.Z., NOGUEIRA, A.R.A., LIMA, J.L.F.C. Multisite detection in flow-analysis. 1. relocation of spectrophotometric detector. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.261, p.59-65, 1992.

ZAGATTO, E.A.G.; ARRUDA, M.A.Z.; JACINTHO, A.O.; MATTOS, I.L. Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.234, p.153-160, 1990.

ZAGATTO, E.A.G.; JACINTHO, A.O.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; PESSEDA, L.C.R.; MORATTI, J.; GINÉ, M.F. **Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de análises de injeção em fluxo**, Piracicaba: CENA/USP, 1981.

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

ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; OLIVEIRA, C.C.; SARTINI, R.P.; ARRUDA, M.A.Z. Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 400, p.249-256, 1999.

ZAMORA, P.P.; PONCE, L.C.; NAGATA, N.; POPPI, R.J. Alternativas quimiométricas para a resolução de problemas analíticos clássicos. Determinação espectrofotométrica de misturas de zircônio e háfnio. **Química Nova**, São Paulo, v.20, p.469-474, 1997.

ZEL, J.; SVETEK, J.; CRNE, H. Effects of aluminum on membrane fluidity of the mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Physiology Plantarum**, Kobenhavn, v.89, p.172-176, 1993.