

Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Química  
Departamento de Química Analítica

# Determinação de acidez em etanol e óleos vegetais através de titulação em Análise por Injeção em Fluxo e detecção espectrofotométrica

Dissertação de Mestrado



**Viviane Emi Nakano**  
orientador: Prof. Dr. Célio Pasquini  
co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo Sabadini

Dez, 1996.

UNIDADE I Q  
 N.º CHAMADA: 17 UNICAMP  
M 145 d  
 V. 1 E. 1  
 TOMBO BC/ 30526  
 PROC. 281197  
 C  D   
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 23/05/97  
 N.º CPD C.N.00099457-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
 UNICAMP

N146d 145 Nakano, Viviane Emi  
 Determinação de acidez em etanol e óleos vegetais  
 através de titulação em análise por injeção em fluxo e  
 detecção espectrofotométrica. / Viviane Emi Nakano. --  
 Campinas, [SP : s.n.], 1996.

Orientador: Célio Pasquini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
 Campinas. Instituto de Química.

1. Análise por Injeção de Fluxo (FIA). 2. \*Alaranja-  
 do de acridina. I. Pasquini, Célio. II. Universidade  
 Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.



Viviane Emi Nakano

Orientador: Prof. Dr. Célio Pasquini

co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo Sabadini

*Aos meus pais, César e Sayoko,  
minha avó Teresa  
e minhas irmãs, Lizete, Simone e Denise,  
que compartilharam e vivenciaram mais esta etapa de minha vida.*

*Ao Clao,  
por tudo e mais um pouco...*

**E**xistem antigas catedrais que além do seu propósito sagrado, inspiram solenidade e temor. Mesmo o visitante curioso fala de coisas sérias, com voz silenciosa, e como cada suspiro ecoa através da nave abobadada, o eco que retorna parece carregar uma mensagem misteriosa. O trabalho de gerações de arquitetos e artesãos foi esquecido, o andaime erguido para esse árduo trabalho foi removido há muito tempo, os erros foram apagados ou escondidos pelo pó dos séculos. Vendo apenas a perfeição do todo completo, nós ficamos impressionados como que por uma atividade sobre-humana. Mas, às vezes, nós entramos em um edifício ainda parcialmente em construção e o som dos martelos, o cheiro do tabaco, as brincadeiras corriqueiras de trabalhador para trabalhador nos fazem perceber que essas grandes estruturas não são outra coisa senão o resultado de dar ao comum esforço humano uma direção e propósito.

*A ciência tem suas catedrais, construídas pelo esforço de poucos arquitetos e muitos trabalhadores.*

*Gilbert Newton Lewis  
Merle Randall*

*Berkeley, Califórnia, 1922*

## **Agradecimentos**

*À direção do Instituto de Química da Unicamp, pelas facilidades concedidas durante a execução deste trabalho;*

*À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos;*

*À Sucen, Superintendência de Controle de Endemias, pela oportunidade da realização deste trabalho;*

*À Replan (Petrobrás), ao Centro de Tecnologia Copersucar, ao Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos e à Aden Editora da Revista Óleos e Grãos, pelas valiosas informações, receptividade e carinho que me acolheram;*

*Aos funcionários do Instituto, em especial ao Sr. Mário Toma, Regina, Cláudia, Billy, Sr. Fontana, Bel, Toninho, Rose, Neusa, Claudete, Joyce, Divino e aos do Laboratório da Planta-Piloto, pela amizade, simpatia, apoio técnico, equipamentos e presteza de seus serviços;*

*À Kênia, pela contribuição experimental inestimável;*

*Aos companheiros do Grupo de Instrumentação e Automação em Química Analítica e aos do Laboratório de Química Ambiental, prof. Jarbas, prof. Ivo, prof. Ronei, prof. Wilson, Margarete, Henrique, Fernando, Neana, Eduardo, Saliba, Jefferson, Carminha, Cleidiane, Paulo, Renato, Sacha, Soraya, Cláudia, Pedro, Airton, Lillian, Dena, Belatto, Sfrain e aos do antigo laboratório B-200, pela amizade, alegria do convívio e apoio constante;*

*Aos amigos sempre presentes, Larisse, Nádia, Roseli, Silvana, Andréia, Carla, Alê, Silvia, Luzia, Bê, Rose, Cida, Helena, Cássia, Nívia, Luis Eduardo, Luís "Larguinho", Rodolpho, Massami, Leandro, Fernanda;*

*Aos membros da Comissão Examinadora deste trabalho, pelo carinho, compreensão e sugestões apresentadas;*

*A todos aqueles que estiveram envolvidos, direta ou indiretamente, neste percurso e que me levaram a conquistar este ideal...*

*Em especial,  
Ao Prof. Célio Pasquini e  
Ao Prof. Edvaldo Sabadini,  
Pela orientação, atenção, confiança e estímulo constante;  
Pela simpatia, amizade, compreensão e infinita paciência;  
Pelos momentos de "quebra-cabeça", sufoco, correria, alegrias e risadas;  
Pela grande experiência, que tanto admiro...*

# DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM ETANOL E ÓLEOS VEGETAIS ATRAVÉS DE TITULAÇÃO EM ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

## RESUMO

Foi desenvolvido um sistema de titulação em Análise por Injeção em Fluxo (FIA), empregando alaranjado de acridina (AO) como indicador, para a determinação de acidez em meios não-aquosos. Como sistema de detecção, foi construído um fotômetro a partir de dois LEDs (bicolor e azul) como fonte luminosa e sensores fotoelétricos (LDR).

O sistema foi aplicado para a determinação de acidez em etanol e óleos vegetais. O AO se mostrou útil para a determinação quantitativa do conteúdo de ácido devido a suas propriedades químicas e espectroscópicas. As absorções de luz das formas neutra (AO) e monoprotonada (AOH<sup>+</sup>) são bastante acentuadas, sendo suficientemente separadas ( $\Delta\lambda = 70$  nm) para possibilitar seu uso como indicador.

O sistema proposto é constituído de três linhas: da amostra, do indicador (AO em etanol absoluto) e do fluido transportador (etanol absoluto). Diferente do método clássico para FIA, o reagente (solução de NaOH alcoólico) é injetado no fluido transportador e a amostra permanece em linha. Os fluidos são bombeados para uma câmara de mistura e, em seguida, passam pela detecção fotométrica. O decréscimo na absorbância devido a interconversão do indicador, monitorada no comprimento de onda do LED azul ( $\lambda_{\text{máx.}} = 480$  nm), produz o sinal analítico, cuja largura à meia altura é proporcional ao logaritmo da concentração de ácido.

Os resultados obtidos apresentaram-se satisfatórios na faixa de concentração de  $3$  a  $8 \times 10^{-4}$  mol kg<sup>-1</sup> para amostras de etanol comercial e  $0,5$  a  $7$  % para amostras de óleos vegetais. A precisão e exatidão se comparam aos métodos padrões recomendados, sendo o erro relativo médio de  $3,0$  % para amostras de álcoois comerciais e  $1,9$  % para amostras de óleos brutos de soja, girassol e oliva. A velocidade para determinação de acidez pelo método proposto é, em média, de  $25$  amostras por hora.

# DETERMINATION OF THE DEGREE OF ACIDITY OF ETHANOL AND VEGETABLE OILS BY FLOW INJECTION TITRATION WITH SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION

## ABSTRACT

A flow injection titration system was developed, employing Acridine Orange (AO) as indicator, to determine the acidity in non-aqueous media. The detection system was constructed based on two LEDs (bicolor and blue) as light source and a LDR as sensor.

The system was applied to the determination of acidity of commercial ethanol and vegetable oils. The AO showed useful chemical and spectral properties to be used for total acidity determination in non-aqueous media. Intense light absorption for both the neutral (AO) and protonated form (AOH<sup>+</sup>) and a suitable shift of the wavelength of maximum absorption ( $\Delta\lambda = 70$  nm) contribute for its use as indicator.

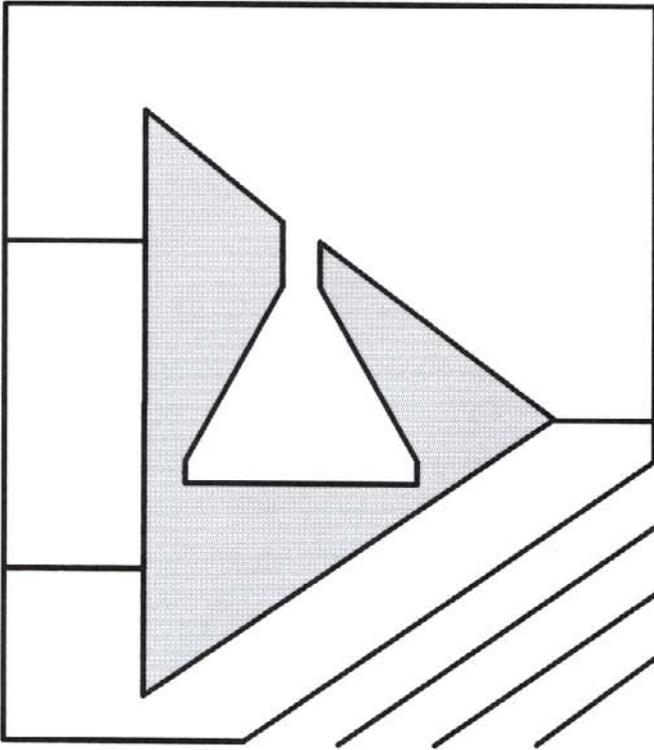
The proposed system employs three lines: the sample, the indicator (AO in absolute ethanol) and the carrier fluid (absolute ethanol). A distinct point of the system is that the reagent (NaOH in ethanol) is injected in the carrier while the sample is continuously pumped. The fluids are pumped to a mixing chamber and then to the detection point. The decrease of absorbance measured with a blue LED ( $\lambda_{\text{max.}} = 480$  nm), produces a signal whose width at the half height is proportional to the logarithm of the acid concentration.

The results were satisfactory for the concentration range  $3$  to  $8 \times 10^{-4}$  mol kg<sup>-1</sup> for commercial ethanol samples and  $0,5$  to  $7$  % for vegetable oils. The precision and accuracy do compare well with the standard methods with the relative error lower than  $3,0$  % for commercial ethanol and lower than  $1,9$  % for vegetable oils of soya, sunflower and olive. The sample throughput is, in average, 25 per hour.

# DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM ETANOL E ÓLEOS VEGETAIS ATRAVÉS DE TITULAÇÃO EM ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E DETECÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

<b>1. APRESENTAÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 ACIDEZ EM MEIOS NÃO AQUOSOS.....	3
1.2 INDICADORES E SOLVENTES NÃO-AQUOSOS.....	6
1.2.1 Alaranjado de Acridina.....	7
1.3 AUTOMAÇÃO E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	8
1.4 OBJETIVOS.....	13
<b>2. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM ETANOL</b>	<b>14</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b>	
2.1.1 O ETANOL.....	15
2.1.2 PROCESSAMENTO.....	17
2.1.2.1 Tratamento do caldo.....	17
2.1.2.2 Fermentação.....	18
2.1.2.3 Obtenção final do álcool.....	19
2.1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA PRODUÇÃO DO ETANOL.....	20
<b>2.2 PARTE EXPERIMENTAL</b>	
2.2.1 MÉTODO CONVENCIONAL.....	25
2.2.1.1 Reagentes e soluções.....	25
2.2.1.2 Instrumentação.....	25
2.2.1.3 Procedimento.....	26
2.2.2 MÉTODO FIA.....	26
2.2.2.1 Reagentes e soluções.....	26
2.2.2.2 Instrumentação.....	27
2.2.2.3 Fotômetro.....	28
2.2.2.4 Sistema FIA.....	30
2.2.3 AMOSTRAS.....	32
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
2.3.1 ESTUDO COMPARATIVO DE INDICADORES EM ETANOL.....	33
2.3.2 DESEMPENHO DO FOTÔMETRO CONSTRUÍDO.....	38
2.3.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	40
2.3.3.1 Etanol.....	42
2.3.3.2 Configuração do sistema.....	44

2.3.4. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM AMOSTRAS DE ETANOL.....	46
2.3.4.1 Acidez em álcoois comerciais.....	46
2.3.4.2 Acidez em álcool combustível.....	47
<b>3. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM ÓLEOS VEGETAIS</b>	<b>50</b>
<hr/>	
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b>	
3.1.1 ÓLEOS VEGETAIS.....	51
3.1.2 PRODUÇÃO.....	52
3.1.3 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS.....	53
3.1.3.1 Componentes glicerídicos.....	53
3.1.3.2 Componentes não glicerídicos.....	54
3.1.4 PROCESSAMENTO DE ÓLEOS VEGETAIS.....	55
3.1.5 CONTROLE DE QUALIDADE: ACIDEZ.....	58
<b>3.2 EXPERIMENTAL</b>	
3.2.1 MÉTODO CONVENCIONAL.....	64
3.2.1.1 Reagentes e soluções.....	64
3.2.1.2 Instrumentação.....	64
3.2.1.3 Procedimento.....	65
3.2.2 FIA.....	65
3.2.2.1 Reagentes e soluções.....	65
3.2.2.2 Sistema FIA.....	66
3.2.3 AMOSTRAS.....	66
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
3.3.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	67
3.3.2 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM AMOSTRAS DE ÓLEOS.....	69
3.3.2.1 Acidez em óleos vegetais brutos e de oliva.....	69
3.3.2.2 Acidez em óleos vegetais refinados.....	72
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<hr/>	
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>81</b>
<hr/>	



---

# Apresentação

# 1 APRESENTAÇÃO

---

A indústria de óleos vegetais, bem como a sucro-alcooleira, apresentaram nas últimas décadas um crescimento vertiginoso, principalmente quando comparadas a outros segmentos da agroindústria<sup>(1)</sup>. Contudo, esta alta capacidade produtiva está atualmente inserida em um mercado globalizado, que necessita de indicadores que assegurem padrões de qualidade. Estes indicadores devem ser abrangentes, de fácil execução e de validação simples, uma vez que a garantia da qualidade não pode significar acréscimo de custos e conseqüente perda de competitividade.

Para o álcool etílico e óleos vegetais, um importante indicador de qualidade é a determinação da acidez. Os métodos padrões nacionais e internacionais para determinação de ácidos totais nestas amostras são baseados nas técnicas de titulação ácido-base. Entretanto, por envolverem soluções não-aquosas, observa-se uma baixa freqüência de amostragem, constituindo um sério problema, já que é grande a quantidade de amostras provenientes das diferentes fontes. Desta forma, o interesse no desenvolvimento de métodos analíticos simples e automatizados, que permitem que um grande número de amostras seja analisado ao menor custo possível, tem aumentado<sup>(2,3,4)</sup>.

Um avanço do procedimento químico de automação, baseado no princípio de análise em fluxo, é a Análise por Injeção em Fluxo (ou FIA, do inglês "Flow Injection Analysis")<sup>(5)</sup>. A titulação em FIA representa uma técnica bastante conhecida e largamente usada. No entanto, sua aplicação para determinações na qual a natureza das amostras requerem o uso de solventes orgânicos tem sido bastante limitada<sup>(3)</sup>, já que determinações envolvendo parâmetros característicos de amostras não aquosas usualmente são difíceis de automatizar<sup>(3)</sup>. Os trabalhos envolvendo FIA em meios não-aquosos como benzeno/n-hexano/dicloroetano<sup>(6)</sup>, ciclohexano<sup>(7)</sup>, metanol<sup>(8,9)</sup> e acetona<sup>(10)</sup> praticamente têm sido limitados à determinação de traços de água. Mais especificamente no controle de acidez envolvendo automação, poucos estudos têm se referido a meios não-aquosos. Além disso, enquanto progresso considerável tem sido alcançado no desenvolvimento de método de injeção em fluxo para ácidos e bases fortes, ácidos e bases fracos têm sido praticamente

ignorados<sup>(4)</sup>. Desta forma, trabalhos que envolvem a determinação de acidez em solventes não-aquosos têm sido raramente encontrados na literatura.

## 1.1 ACIDEZ EM MEIOS NÃO-AQUOSOS

A maior parte das reações observadas na natureza assim como aquelas efetuadas pelos químicos em suas pesquisas e processos industriais ocorrem em solução. Os estudos, no entanto, se referem na grande maioria às soluções aquosas, cujas reações e propriedades físico-químicas têm sido largamente investigadas. A água é abundante, barata e é um excelente solvente para um grande número de substâncias orgânicas polares, sais inorgânicos, ácidos e bases<sup>(11)</sup>.

A influência do solvente no curso de uma reação química é grande. Quando se altera parcial ou inteiramente o solvente, ocorrem modificações importantes nas espécies dissolvidas. O próton em meio aquoso, por exemplo, se encontra solvatado, isto é, na forma de hidrônio,  $H_3O^+$ . Em meios não-aquosos, a natureza do próton é bem menos conhecida<sup>(12)</sup>.

Dependendo de suas propriedades, o meio não-aquoso pode acentuar ou reduzir as propriedades ácido-base de um analito, aumentar ou anular sua solubilidade e alterar a formação de complexos com íons metálicos<sup>(13)</sup>. No domínio das aplicações práticas, estes solventes têm expandido a faixa de forças ácidas e básicas que podem ser medidas e diferenciadas, uma vez que, em água, é possível titular somente uma faixa limitada de concentrações de ácidos e bases<sup>(11)</sup>. O meio não-aquoso aumenta a extensão em que as reações químicas ocorrem como um todo e afeta as titulações ácido-base em particular<sup>(13,14)</sup>.

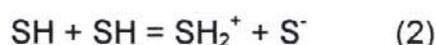
O grau com que se completa uma reação de titulação de neutralização depende diretamente da constante de ionização do soluto ácido ou básico sob titulação. Esta constante de ionização depende das propriedades ácidas ou básicas, da constante dielétrica e da constante de autoprotólise do solvente<sup>(12)</sup>.

A **constante de autoprotólise ou auto-ionização** é um processo que ocorre em todos os solventes anfipróticos, em que uma molécula atua como ácido e outra como base. O valor da constante de auto-ionização ou de

protólise,  $K_s$ , é dada pela expressão do equilíbrio químico, semelhante à expressão do produto iônico da água<sup>(12)</sup>.

$$K_s = (a_{SH_2^+}) (a_{S^-}) \quad (1)$$

em que  $SH_2^+$  é o próton solvatado (íon liônio) e  $S^-$  é o respectivo ânion (íon liato) do solvente anfiprótico representado por SH. A equação química seria então representada como:



A **constante dielétrica** do solvente está relacionada com o trabalho requerido para efetuar a separação (processo de dissociação) de duas partículas opostamente carregadas de um soluto, no solvente considerado. Portanto, dá uma idéia da facilidade com que, em um solvente particular, ocorre a ionização de um soluto<sup>(12)</sup>.

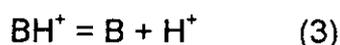
A maioria dos solventes orgânicos tem uma constante dielétrica mais baixa que a água e isto resulta em menor ionização e no aumento da associação de íons de cargas opostas, com formação de pares ou agregados mais complexos em muitos casos. Em água, o sal formado como resultado da titulação de uma base fraca com ácido forte ou vice-versa é altamente ionizado e afeta muito pouco o pH da solução no ponto de equivalência e em outros estágios da titulação. Por outro lado, em solventes orgânicos de baixa constante dielétrica, o ponto de equivalência da titulação pode ser fortemente afetado<sup>(15)</sup>. Uma vez que os sais são dissociados incompletamente, suas constantes de dissociação também são alteradas<sup>(16)</sup>. O equilíbrio em meio não-aquoso, portanto, não é tão simples como em água e para o cálculo da medida de constante de dissociação, equações simples de valores de pH do tipo de Henderson-Halsselbalch, por exemplo, frequentemente não são aplicáveis<sup>(17)</sup>.

Embora os conhecimentos atuais sobre o pH em soluções aquosas estejam em um nível bastante elevado, o mesmo não se pode afirmar a respeito das soluções não-aquosas. A bibliografia existente é bastante escassa e principalmente dirigida às áreas de pesquisas específicas. A faixa teórica de pH para o álcool absoluto, por exemplo, não apresenta extremo superior de 14,0 como para meios aquosos, mas 19,1. Para o álcool hidratado, a faixa de pH difere com o teor de água existente. A medida de pH em álcool hidratado, se

feita com eletrodos convencionais, sofre interferências típicas no meio alcoólico, fornecendo leituras variáveis em função da composição do álcool hidratado. Medições de pH que independem do meio são conseguidas com eletrodos de platina-hidrogênio, que fornecem o chamado “pH absoluto”. Entretanto, a determinação é bastante lenta e trabalhosa, o que impede sua aplicação em rotina<sup>(18)</sup>.

Hammett e Deyrup<sup>(19)</sup>, em 1932, foram os primeiros a determinar o grau de acidez em uma variedade de meios, incluindo soluções mais concentradas de ácido em água (em regiões de pH fora da escala convencional) e solventes não-aquosos, através de uma função baseada em mudanças espectrais de indicadores ácido-base.

Para o equilíbrio ácido-base de uma base fraca B, em meio ácido,



cuja constante de dissociação da espécie  $\text{BH}^+$  é dada por:

$$K_{\text{BH}^+} = a_{\text{H}^+} \cdot (a_{\text{B}}/a_{\text{BH}^+}) = a_{\text{H}^+} \cdot (c_{\text{B}}/c_{\text{BH}^+}) \cdot (f_{\text{B}}/f_{\text{BH}^+}) \quad (4)$$

sendo:  $a$  = atividade,  $c$  = concentração molar e  $f$  = coeficiente de atividade, a função de acidez foi definida por Hammett e Deyrup como:

$$H_0 = -\log [a_{\text{H}^+} \cdot (f_{\text{B}}/f_{\text{BH}^+})] = -\log K_{\text{BH}^+} + \log (c_{\text{B}}/c_{\text{BH}^+}) \quad (5)$$

que pode ser expressa como:

$$H_0 = \text{p}K_{\text{BH}^+} - \log (c_{\text{BH}^+}/c_{\text{B}}) \quad (6)$$

Para determinação de  $H_0$  em um meio ácido, seria utilizado um indicador com um  $\text{p}K$  adequado, sendo as concentrações relativas de  $\text{BH}^+$  e B medidas por métodos espectroscópicos (absorção no ultra-violeta ou visível, ressonância magnética nuclear)<sup>(20)</sup>.

## 1.2 INDICADORES E SOLVENTES NÃO-AQUOSOS

A titulação, realizada com um indicador visual para encontrar-se o ponto de equivalência, é um procedimento analítico que embora tenha sido proposto há mais de um século, ainda é largamente usado<sup>(21)</sup>. No entanto, a determinação do ponto final em titulações em meios não-aquosos através do uso de indicadores visuais não é tão simples quanto em meio aquoso<sup>(22)</sup>. À medida que os ácidos e bases são mais fracos e que as soluções dos mesmos se tornam cada vez mais diluídas, a determinação do ponto de equivalência vai se tornando cada vez mais difícil. A razão destas dificuldades se deve às pequenas inflexões que as mesmas apresentam nas proximidades do ponto de equivalência<sup>(23)</sup>.

Quase todos os indicadores conhecidos e empregados em meio aquoso têm sido usados em titulações em solventes não-aquosos, como os azo corantes, ftaleínas e sulfoneftaleínas, cuja variação da cor depende do solvente e da própria natureza do indicador<sup>(17)</sup>. Dos corantes, as ftaleínas são usadas muito freqüentemente em titulação com hidróxidos metálicos alcalinos e especialmente alcóxidos em etanol, cetonas, piridina, bem como benzeno e tolueno. Sua cor depende da razão de concentração das formas ácidas e básicas, que é determinada pela concentração do íon hidrogênio da solução. Em meio ácido são incolores, enquanto que em soluções alcalinas se tornam azul ou rosa, sendo seus intervalos de transição na faixa de pH alcalino<sup>(15,17)</sup>.

A fenolftaleína é um dos indicadores mais largamente usados para a determinação volumétrica de ácidos fracos, sendo também apropriada para titulações de ácidos orgânicos em soluções alcoólicas ou para determinação de acidez de álcoois e ésteres<sup>(15)</sup>.

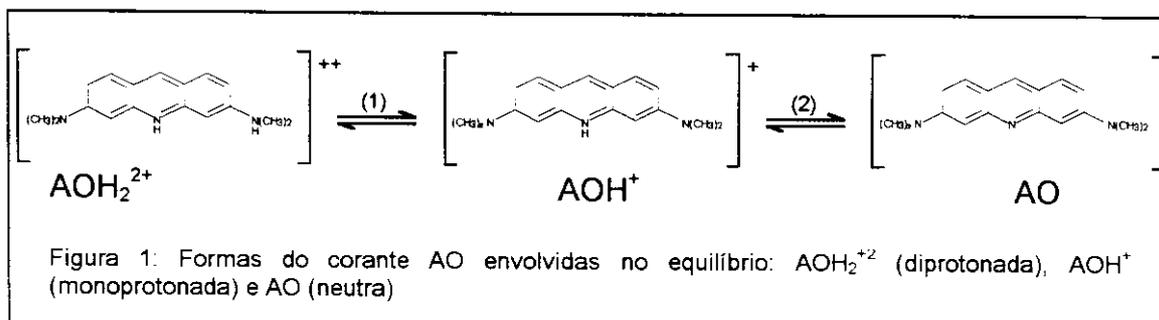
Outro indicador particularmente adaptado para ácidos fracos em soluções alcoólicas, que é empregado pelo procedimento regulamentado para titulações em etanol, é o  $\alpha$ -naftolftaleína<sup>(15)</sup>. Este indicador, num pH em torno de 8,3, muda de incolor para azul claro, mas esta mudança de coloração é pouco sensível ao olho humano<sup>(24)</sup>. Além de indicador ácido-base, o  $\alpha$ -naftolftaleína também foi proposto na determinação catalítica de ródio<sup>(25)</sup>, irídio<sup>(26)</sup>, rutênio<sup>(27)</sup> e ósmio<sup>(28)</sup> por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica.

### 1.2.1 ALARANJADO DE ACRIDINA

Um indicador com alta sensibilidade para determinação dos prótons presentes em função da auto-ionização do equilíbrio iônico da água é o alaranjado de acridina. Este corante, em 1994, foi proposto por Sabadini et al.<sup>(29)</sup> para a determinação do conteúdo de água através de um método espectrofotométrico em solventes não-aquosos, e, devido à sua propriedade diferenciada, é possível aproveitar sua potencialidade na determinação de ácidos fracos em meios não-aquosos.

O alaranjado de acridina (ou AO, do inglês Acridine Orange) é uma substância largamente utilizada como corante biológico<sup>(30)</sup>, uma vez que a molécula apresenta espectros eletrônicos de absorção e fluorescência bem conhecidos sem alterar as propriedades biológicas. O corante intercala fortemente com ácidos nucleicos<sup>(31,32)</sup>, apresentando o efeito de metacromasia, isto é, fluoresce na região do verde, quando intercalado entre pares de base do DNA, e na região do vermelho, quando intercalado em RNA<sup>(33)</sup>. Esta propriedade da fluorescência possibilita outras aplicações, como a caracterização histoquímica de plantas<sup>(34)</sup>, o estudo de propriedades micelares<sup>(35)</sup> e o coramento citoquímico, podendo diferenciar células normais de células cancerígenas<sup>(36)</sup>.

O AO apresenta um equilíbrio ácido-base em solução aquosa envolvendo as formas neutra (AO) e monoprotionada ( $\text{AOH}^+$ ), que exibem espectros eletrônicos com absorbância máxima em 425 nm e 495 nm, respectivamente<sup>(29)</sup>. Como as espécies AO e  $\text{AOH}^+$  apresentam bandas de absorção no espectro eletrônico suficientemente separadas, é possível acompanhar o deslocamento do equilíbrio químico por métodos espectrofotométricos. A Figura 1 mostra o equilíbrio químico entre essas formas, bem como a forma diprotionada,



onde a dissociação da espécie  $\text{AOH}^+$ ,



tem  $\text{pK} = 10,45$  à  $25\text{ }^\circ\text{C}$ <sup>(29)</sup>.

Soluções de AO preparadas com os solventes orgânicos, devem conter apenas a espécie neutra do corante. Com a adição de pequenas quantidades de ácido ao meio neutro, provoca-se a protonação e a interconversão do corante para a forma monoprotionada. Por outro lado, a forma  $\text{AOH}^+$  desse corante é susceptível à reação de desprotonação em soluções alcalinas resultando na forma neutra<sup>(33)</sup>. Desta forma, o corante pode ser utilizado como indicador para quantificar a acidez de diferentes meios, dependendo da intensidade das bandas de absorção na região do espectro visível atribuída às espécies, o que possibilitaria seu uso em titulações.

Ressalta-se que o uso do AO como indicador ácido-base em meios não aquosos não tem sido discutido na literatura. A faixa de comprimento de onda em que as transições de cor entre as espécies ácida e básica ocorrem, não pode ser distinguida sem o auxílio de espectrofotômetros. Contudo, em titulação onde o ponto final é indicado pela mudança de cor de um indicador ácido-base, o método visual pode ser substituído pela medida fotométrica, cujas construções simples e de baixo custo, viabilizam o AO como indicador.

### 1.3 AUTOMAÇÃO E ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

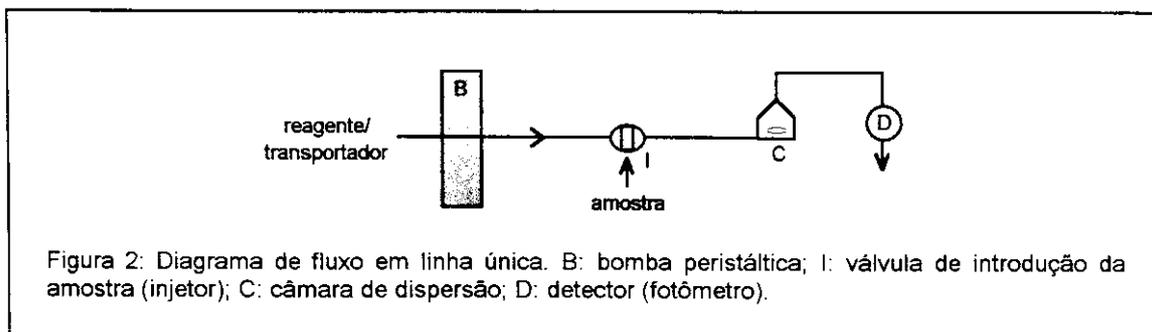
A necessidade de melhorar ou ampliar os métodos analíticos e adaptá-los às crescentes demandas da sociedade tem impulsionado o crescimento e desenvolvimento de muitos aspectos da química analítica. O uso de métodos automáticos vem ocupando um importante papel em laboratórios analíticos<sup>(37)</sup>.

Através da automação, a intervenção humana na análise é minimizada, aumentando-se a eficiência das operações de laboratório e a capacidade de análise de amostras. Assim, melhora-se a qualidade dos resultados, aumenta-se o potencial dos métodos analíticos, fornecendo resultados mais reprodutíveis por longos períodos de tempo<sup>(37,38)</sup>.

A Análise por Injeção em Fluxo (FIA) é uma importante procedimento químico de automação, que vem se estabelecendo em vários campos, como uma técnica adequada para determinação de muitas espécies químicas em solução. Tem sido bastante aplicada para solucionar problemas analíticos de rotina, no processo de monitoramento e controle em diversas áreas de interesse: clínica, farmacêutica, ambiental, alimentação e agricultura<sup>(5,39,40,41)</sup>.

A técnica FIA se caracteriza pela simplicidade, estabilidade, precisão, baixo custo operacional e extrema versatilidade, o que a distingue da maior parte das novas técnicas analíticas. Apresenta ainda muitas vantagens, como o baixo consumo de reagentes e economia de amostra. Devido a resposta rápida, tem-se alta frequência de amostragem e com isso, a velocidade analítica é aumentada. Além disso, é útil para situações onde a determinação manual é extremamente difícil e imprecisa. Por ser um sistema fechado, materiais tóxicos, corrosivos, altamente reativos ou instáveis ao ar ou à luz, podem ser manuseados ou gerados, diminuindo o contato entre o analista e os reagentes, tornando a técnica mais conveniente em relação a métodos manuais<sup>(5)</sup>.

FIA é um tipo de análise em fluxo, cujo sistema, composto de tubos transportadores, envolve basicamente três partes: 1) um dispositivo capaz de movimentar os fluidos a uma vazão constante e uniforme (normalmente uma bomba peristáltica); 2) um dispositivo para introdução de um volume reprodutível da amostra ou reagente no sistema de fluxo; 3) um sistema de detecção capaz de monitorar uma propriedade relacionada, direta ou indiretamente, com a concentração da espécie de interesse<sup>(5)</sup>. A Figura 2 mostra uma representação esquemática do sistema de fluxo mais simples.

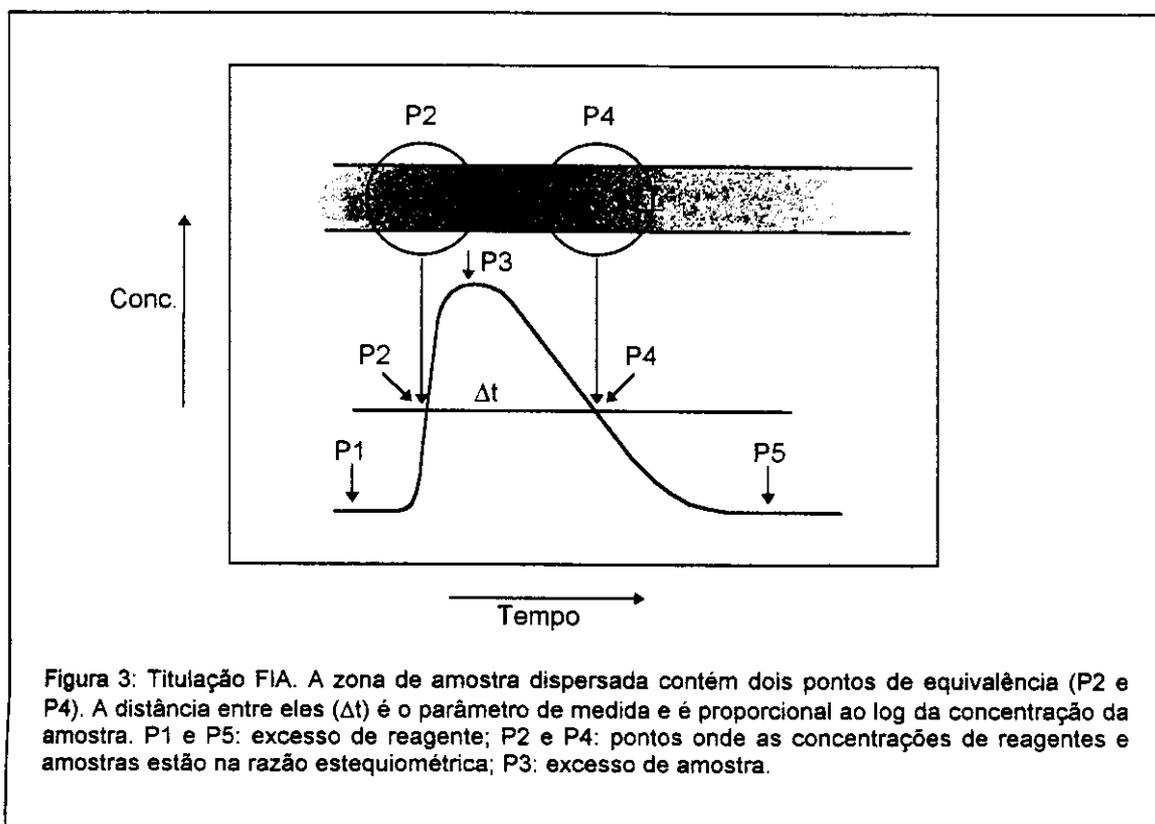


A técnica se baseia na criação de um gradiente de concentração adequado de uma amostra ou reagente, cujo volume discreto é introduzido

através do sistema em um fluido transportador (ou reagente), sem segmentos de bolhas de ar. Este volume se dispersa no fluido transportador durante sua passagem pelos vários componentes do analisador, sendo que as reações químicas e/ou processos físico-químicos de separação da amostra ocorrem nos próprios tubos de condução, embora câmaras de reação também tenham sido usadas<sup>(5)</sup>.

A titulação por FIA é a técnica de gradiente mais antiga. Em uma titulação clássica (manual), um volume definido de amostra, contendo, por exemplo, um ácido, é titulado por uma solução reagente de concentração conhecida denominada de titulante, por exemplo, uma base. O ponto final, que se espera detectar o mais próximo possível do ponto de equivalência da titulação, é obtido, por exemplo, através da mudança de cor de um indicador. Em um sistema FIA, o gradiente de concentração formado contém um número infinito de elementos de fluxo com diferentes razões de concentração da amostra ou reagente injetado e fluido transportador. Dentro destes elementos de fluxo, há pontos que são representativos da mesma condição de equivalência encontrada na titulação clássica. No ponto de equivalência da titulação, a quantidade de titulante e analito inicialmente presente é estequiometricamente igual. Além deste ponto, o titulante (ou amostra não titulada) está em excesso, enquanto antes do ponto de equivalência, há uma quantidade de analito não titulado (ou titulante). O indicador é escolhido para que a mudança de cor ocorra no ponto mais próximo possível do ponto de equivalência, sendo essa detecção efetuada pelo monitoramento contínuo do fluxo em uma cela a um comprimento de onda apropriado<sup>(5,39,42)</sup>.

Se um volume de uma amostra ácida (ou reagente básico) em uma titulação FIA, é injetada dentro do fluido transportador de vazão  $Q$  contendo o reagente básico (ou amostra ácida), a amostra (ou o reagente) dispersada será gradualmente neutralizada, penetrando através da interface com o fluido transportador nos limites do gradiente (frontal e caudal). Ao passar pelo detector, um sinal com duas transições é gerado, devido ao perfil formado pela dispersão da amostra (ou reagente) no caminho do injetor ao detector. A porção ascendente do sinal é obtida em um intervalo de tempo curto e, portanto, não é possível se observar a titulação neste intervalo. A informação analítica presente nesta porção, no entanto, é a mesma encontrada na porção caudal, cujo gradiente é bem reproduzível, suave e possível de ser medido<sup>(5)</sup>. A Figura 3 mostra esquematicamente a titulação por FIA.



O termo titulação em fluxo contínuo é adotado por causa das condições que são ajustadas, de forma que um ponto na ascendência e na descendência dos gráficos correspondam às concentrações da amostra e do reagente na equivalência estequiométrica. Estes dois pontos de "equivalência" formam um par (I e II) com mesmo valor de dispersão e sua distância física, expressa em unidade de tempo  $\Delta t$ , decorrida entre ambas transições é linearmente relacionada com a concentração da amostra pela equação:

$$\Delta t = (V_M/Q) \ln 10 \log [C_A^\circ / C_R^\circ] + (V_M/Q) \ln 10 \log (V_A / V_M) \quad (8)$$

onde  $C_A^\circ$  e  $C_R^\circ$ , representam as concentrações da amostra e do reagente;  $Q$ , a vazão constante,  $n$  o fator estequiométrico dos componentes da reação;  $V_A$ , o volume de amostra injetada e  $V_M$  o volume da câmara de mistura<sup>(5)</sup>. Caso o reagente seja injetado, inverte-se as posições, na equação, de  $C_A^\circ$  e  $C_R^\circ$ , e  $V_A$  se referirá ao volume do reagente injetado.

Como o último termo para um dado sistema FIA será constante, um gráfico de  $\Delta t$  em função de  $\log C^{\circ}_A$  (obtido por uma série de soluções padrões) irá fornecer uma linha reta com uma inclinação  $(V_M/Q) \ln 10$ . Portanto,  $\Delta t$  irá aumentar com o aumento da concentração da amostra injetada,  $C^{\circ}_A$ , e diminuir com o aumento da concentração do reagente titulante,  $C^{\circ}_R$ , contido no fluido transportador. No caso da injeção de reagente, o inverso é verdade, ou seja,  $\Delta t$  irá diminuir com o aumento da concentração da amostra<sup>(5)</sup>.

A técnica de titulação por FIA apresenta também como vantagem a possibilidade de efetuar as determinações sem que a reação atinja o seu estado de equilíbrio. Desta forma, as respostas serão reprodutíveis, uma vez que o grau de mistura para um mesmo volume de amostra (ou reagente), injetado sucessivamente no sistema, deve ser o mesmo em cada um dos diferentes pontos do sistema. Além disso, uma vez que a quantificação é baseada em medidas relativas obtidas por padrões conhecidos, o valor exato da concentração da solução do reagente titulante não precisa ser exatamente conhecido. Uma outra característica que distingue FIA de outros procedimentos químicos analíticos automáticos é que o método pode ser processado em condições controladas. As variáveis envolvidas como a vazão, comprimento do tubo e volume injetado podem ser alteradas em uma larga faixa de possíveis combinações permitindo a otimização do sistema<sup>(5)</sup>.

A Análise por Injeção em Fluxo tem sido utilizada em uma grande variedade de campos com um grande número de detectores. Simplificações envolvendo o processo de detecção fotométrica podem se basear na utilização de um LED (Light Emitting Diode) como fonte luminosa apropriada devido à sua resolução espectral e disponibilidade em praticamente toda a faixa da região do espectro visível<sup>(43)</sup>. Além de dispenderem menor energia para seu funcionamento, sua utilização representa uma alternativa barata, confiável, com tempo de vida longo, frente aos espectrofotômetros disponíveis comercialmente<sup>(44,45,46)</sup>. Esses dispositivos emitem radiação com alta intensidade de luz e baixo tempo de resposta. Por permitirem maior estabilidade, as determinações podem ser realizadas sem a necessidade de esperar por longos períodos de tempo para estabilização do instrumento<sup>(47,48)</sup>.

Os LEDs utilizados como fonte de luz são componentes eletroluminescentes que se tornaram comercialmente disponíveis no fim de 1960<sup>(48)</sup>. Um fotômetro baseado em LED foi proposto primeiramente por

Barnes<sup>(49)</sup> em 1970, mas os primeiros a descreverem o primeiro fotodetector baseado em LED para FIA foram Betteridge et al.<sup>(50)</sup>.

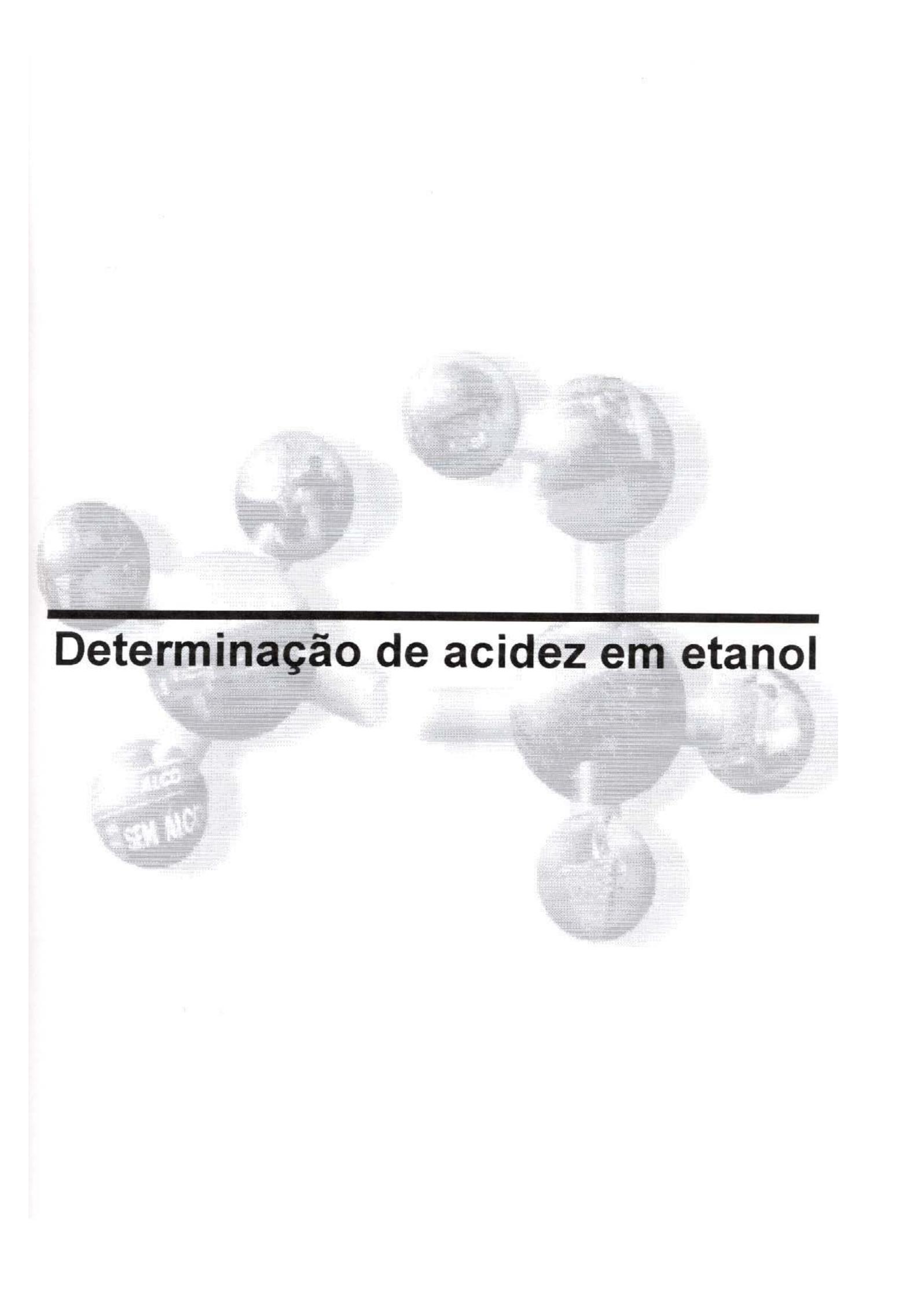
Sistemas baseados em LEDs verde (565 nm), amarelo (595 nm), laranja (605-620 nm), vermelho (630-660 nm) e infravermelho próximo (820 nm) têm sido largamente estudados. O LED azul (480 nm) foi originalmente introduzido no final de 1984 pela Panasonic Industrial Co. Porém, não é tão facilmente disponível como outras cores, já que os componentes normalmente usados na sua manufatura (arseneto de gálio ou fosfeto) não podem ser estendidos na produção de luz de menores comprimentos de onda<sup>(44)</sup>.

Quando comparado ao espectrofotômetro convencional, no entanto, o LED apresenta uma perda de sensibilidade, uma vez que a fonte de luz não é estritamente monocromática e, com isso, a medida do sinal contém contribuições de comprimento de onda com absortividades mais baixas. A perda de sensibilidade para o LED azul é mais acentuada porque sua banda de emissão (65-70 nm) é mais larga em comparação às outras. Mesmo assim, LEDs azuis podem ser usados com sucesso para determinações quantitativas em FIA<sup>(44)</sup>.

## 1.4 OBJETIVOS

Levando-se em conta o meio não-aquoso, bem como as limitações inerentes aos métodos regulamentados para a determinação de acidez em óleos vegetais e etanol, foi desenvolvido um sistema automatizado para determinação de acidez em meios não-aquosos usando alaranjado de acridina como indicador.

O método proposto, Análise por Injeção em Fluxo (FIA), se baseia em uma titulação ácido-base, com LED azul como fonte luminosa e detecção fotométrica. O fluido transportador não é aquoso e o analito, diferentemente dos procedimentos clássicos para FIA, permanece em linha e a solução alcalina é injetada.



# Determinação de acidez em etanol

# **2 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM ETANOL**

---

A tendência de automatização de métodos analíticos tem sido crescente. Um vasto número de amostras é, a cada dia, analisado por instrumentação automática com o intuito de atingir maior rapidez, reprodutibilidade e exatidão nos resultados. Nas áreas de fermentação e controle analítico para o acompanhamento do processo de produção do álcool, a técnica de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) já está sendo utilizada para estudar os parâmetros importantes para a fermentação<sup>(51,52,53,54)</sup>. A acidez no álcool produzido é uma das análises complementares mais importantes no estabelecimento de qualidade do etanol, cuja determinação, normatizada pelo Departamento Nacional de Combustíveis (DNC) através do Regulamento Técnico DNC-03/91<sup>(55)</sup>, tem empregado a titulação ácido-base clássica com  $\alpha$ -naftolftaleína como indicador.

## **2.1 INTRODUÇÃO**

---

### **2.1.1 O ETANOL**

As primeiras informações sobre o uso do álcool são de 6000 a.C.<sup>(56)</sup>, embora a palavra, oriunda do vocábulo árabe (*Al* = artigo + *kohol* = pó finíssimo e impalpável<sup>(57)</sup>), seja completamente dissociada das características do etanol, pois se referia a um derivado de sulfetos e antimoneto de chumbo, que era usado na antiguidade oriental, em mistura com água, para tingir sobrancelhas e cílios<sup>(58)</sup>.

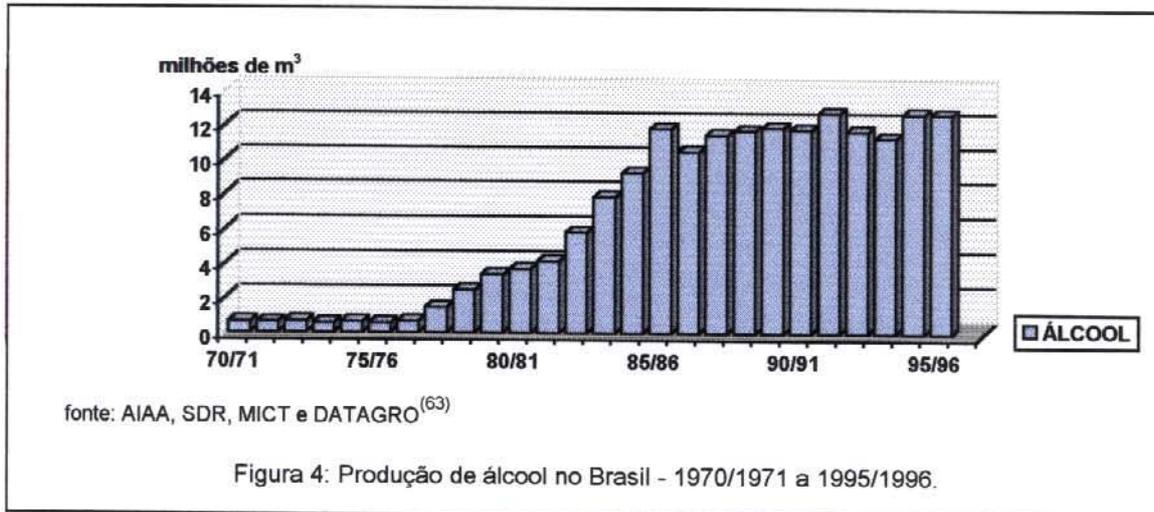
O etanol ou álcool etílico, de fórmula  $C_2H_5OH$ , é o representante mais importante da classe dos álcoois alifáticos. Pode ser obtido sinteticamente a partir do petróleo e do carvão mineral ou por via biológica, através da fermentação de matérias-primas açucaradas, amiláceas ou celulósicas<sup>(58,59,60)</sup>.

No Brasil, onde a irradiação solar é intensa, favorecendo os processos fotossintéticos que levam à produção de biomassa, a fermentação é ainda o processo mais importante. O álcool é produzido na quase totalidade a partir da cana-de-açúcar, que já era tradicionalmente plantada, principalmente para a produção de açúcar<sup>(61,62)</sup>.

O país é o maior produtor mundial de açúcar e álcool, contando hoje com 346 usinas. Dos 13 milhões de hectares de plantações de cana-de-açúcar no mundo, 4,5 milhões estão em território nacional, representando cerca de 8 % da área cultivada no país<sup>(61)</sup>.

A produção de álcool na safra 95/96 (posição acumulada de produção em 01.05.1996) foi de 12,67 bilhões de litros, dos quais 9,63 bilhões de litros de álcool hidratado e 3,04 bilhões de álcool anidro<sup>(63)</sup>. O número, no entanto, não é suficiente para atender o mercado interno, já que o consumo anual de álcool hidratado no país é de 10 bilhões de litros, enquanto que o consumo de álcool anidro é de 4,5 bilhões<sup>(61)</sup>, o que levou, em 1995, à importação de mais 1,1 bilhão de litros de etanol<sup>(63)</sup>.

A produção brasileira de álcool (Figura 4) começou a ser intensificada com as convulsões políticas no Oriente, levando às crises de petróleo de 1975 e 1979, e o advento do PROÁLCOOL (Programa Nacional do Álcool), que muito beneficiou o setor sucro-alcóoleiro. O PROÁLCOOL foi instituído em novembro de 1975, integrando a política energética brasileira de incentivo ao desenvolvimento de fontes alternativas de energia<sup>(60,64)</sup>. Sua implantação permitiu o desenvolvimento da indústria alcoolquímica (principalmente com a substituição dos produtos derivados de petróleo), a realização de pesquisas para o aproveitamento do vinhoto e do bagaço, a abertura de novas frentes de expansão para a indústria de máquinas e equipamentos, a economia de divisas pela redução de petróleo e pelas expansões de álcool e sua tecnologia e, principalmente, o uso da mistura álcool anidro/gasolina e a multiplicação de frotas de automóveis a álcool hidratado<sup>(65,66)</sup>. Atualmente, o número de veículos leves a álcool existentes no país é de 4,3 milhões, número esse que representa um terço do total do país<sup>(61,67)</sup>.



## 2.1.2 PROCESSAMENTO

A fermentação, conhecida desde os tempos pré-históricos, é ainda o processo mais importante para a obtenção de álcool. É um processo bioquímico catalisado pela ação enzimática de microrganismos que ocorre em duas etapas: a primeira envolvendo a conversão de polissacarídeos em monossacarídeos partindo de quaisquer fontes naturais e a segunda envolvendo a conversão do monossacarídeo obtido em álcool etílico<sup>(59)</sup>.

O processo industrial de fabricação de álcool, desde a cana-de-açúcar à obtenção do produto final, envolve uma série de operações divididas fundamentalmente nas seguintes etapas principais: recebimento da matéria-prima, lavagem, extração e tratamento do caldo, fermentação e finalmente destilação<sup>(69,69,70)</sup>.

### 2.1.2.1 TRATAMENTO DO CALDO

Após o corte na lavoura, os fardos de cana-de-açúcar são carregados em caminhões até a mesa alimentadora da usina, onde passam por uma lavagem em água corrente. A cana passa por um processo de picagem e desfibragem e depois é triturada pelas moendas para produzir o **caldo misto**.

O caldo misto, que resulta da moagem, é a matéria-prima para a fabricação do álcool, tanto hidratado quanto anidro. Apresenta uma série de impurezas, que podem ser solúveis ou insolúveis. As impurezas insolúveis (como areia, argila e bagacilho), cujos teores variam de 0,1 a 1 %, são eliminadas ao máximo através do **tratamento primário**. Os processos envolvidos neste tratamento utilizam basicamente equipamentos de peneiramento, sedimentadores e centrifugadores. Com isso, beneficia-se o processo e aumenta-se a eficiência e vida útil dos equipamentos instalados, contribuindo-se também para a obtenção de produtos finais de melhor qualidade<sup>(71)</sup>.

Após o tratamento primário, o caldo sofre o processo de pasteurização (aquecimento e resfriamento imediato), que fundamentalmente visa a desnaturação da proteína (para diminuir a ocorrência de espumas durante a fermentação), assim como a eliminação de microrganismos naturais, cuja presença pode comprometer os rendimentos da fermentação. Livre de impurezas e devidamente pasteurizado, o caldo está pronto para ser encaminhado ao processo fermentativo<sup>(68,69,70)</sup>.

### 2.1.2.2 FERMENTAÇÃO

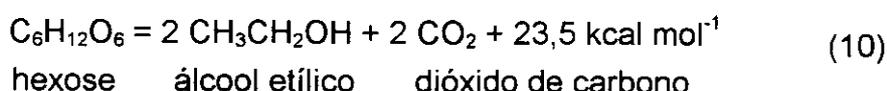
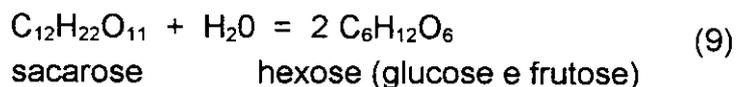
É nesta fase que os açúcares são transformados em álcool através dos agentes fermentativos (leveduras).

O processo de fermentação mais comumente utilizado nas destilarias do Brasil é o de Melle-Boinot, cuja característica principal é a recuperação de leveduras com baixa carga bacteriana (conhecida na prática com o nome de **pé-de-cuba**) para utilizações posteriores sucessivas. Este processo apresenta como vantagem a inibição parcial da multiplicação celular dos microrganismos fermentativos e, como consequência, há uma economia dos açúcares que seriam utilizados para alimentar essa multiplicação, aumentando assim o rendimento.

Na fermentação, as reações ocorrem em tanques, denominados dornas de fermentação, onde se misturam o pé-de-cuba e o **mosto** na proporção de 1:2, respectivamente. O mosto é constituído basicamente da mistura do caldo tratado e uma quantidade de nutrientes (como sais minerais, vitaminas, méis), com uma concentração de sólidos de aproximadamente 19° Brix. Nada mais é que uma solução de açúcar cuja concentração foi ajustada para melhorar a ação

dos microrganismos fermentativos. Caso haja necessidade, usa-se água para o ajuste do Brix.

A transformação de açúcares (sacarose) em álcool ocorre segundo a reação simplificada:



O tempo de fermentação varia de 4 a 12 horas. Durante a reação, ocorre intensa liberação de gás carbônico e elevação da temperatura do meio, podendo propiciar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Neste caso, alguns produtos secundários podem ser formados como álcoois superiores, ésteres, aldeídos, aminas, ácidos e bases. Ao término deste período praticamente todo o açúcar já foi consumido, com a conseqüente redução de liberação de gases e a mistura final recebe o nome de **vinho fermentado**.

Atualmente, este processo de fermentação é realizado de forma descontínua ou contínua, em dornas abertas ou fechadas. Nestas últimas, procede-se à lavagem dos gases de saída em uma torre de recheio para recuperação do álcool evaporado, que retorna ao processo.

Após a fermentação, o vinho é enviado às centrífugas, para a recuperação do fermento. A fase leve de centrifugação, ou **vinho delevedurado**, é enviado para as colunas de destilação e o concentrado do fermento recuperado, denominado **leite de levedura**, retorna às cubas para o tratamento<sup>(68,69,70,72,73)</sup>.

### 2.1.2.3 OBTENÇÃO FINAL DO ETANOL

O vinho que vem da fermentação possui, em sua composição, 7 a 10° GL (% em volume) de álcool, além de outros componentes de natureza líquida, sólida e gasosa. Dentro dos líquidos, além do álcool, encontra-se a água com teores de 89 a 93 %, glicerina, álcoois homólogos superiores, furfural, aldeído

acético, ácido succínico, ácido acético. Já os sólidos são representados por bagacilho, leveduras e bactérias, açúcares não fermentescíveis, sais minerais, matérias albuminóides e outros. Os gasosos, principalmente pelo  $\text{CO}_2$  e  $\text{SO}_2$ .

O álcool presente neste vinho é recuperado por destilação. A operação é realizada com auxílio de sete colunas distribuídas em quatro troncos: destilação propriamente dita, retificação, desidratação e debenzolagem.

Na destilação propriamente dita, através de três colunas superpostas (coluna de destilação de vinho, coluna de epuração de vinho e coluna concentradora de cabeça), o etanol é separado do vinho e sai com a flegma (vapores com 40 a 50° GL).

A flegma é concentrada e purificada em um tronco composto de duas colunas (colunas de retificação), a uma graduação de aproximadamente 96° GL. As impurezas presentes que a acompanham são os álcoois homólogos superiores, aldeídos, ésteres, aminas, ácidos e bases.

O álcool hidratado, produto final dos processos de epuração (destilação) e retificação, é uma mistura binária álcool-água que atinge um teor da ordem de 96° GL. Isto ocorre devido a formação de uma mistura azeotrópica. Este álcool hidratado pode ser comercializado desta forma ou pode sofrer um processo de desidratação. Neste caso é usada ainda uma coluna auxiliar para a recuperação do agente desidratante (coluna de debenzolagem). Para a desidratação, benzeno é adicionado no topo da coluna desidratadora. Este produto tem a capacidade de formar uma mistura azeotrópica ternária, benzeno-água-álcool, com ponto de ebulição inferior ao do álcool anidro, portanto o álcool é retirado no fundo da coluna com aproximadamente 99,7° GL<sup>(68,69,70,74)</sup>.

### **2.1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DA PRODUÇÃO DO ETANOL**

Com a crescente produção de etanol (anidro ou hidratado) e a grande elevação do seu consumo tanto como combustível como na indústria química, o controle químico desempenha um papel fundamental tanto no que diz respeito à garantia das especificações impostas ao produto quanto ao que se refere à quantificação das perdas na produção.

Os caminhos percorridos pelo álcool, desde a sua produção até a entrega ao consumidor, são longos e esbarram numa série de exames de controle de qualidade diretamente nas usinas e destilarias e nas empresas distribuidoras. Esses exames são realizados com base em legislação. Técnicos realizam a coleta de amostras nos tanques das destilarias e as enviam aos laboratórios. No laboratório, as amostras passam por minuciosos exames normatizados, que vão desde a massa específica e o teor alcoólico à análise espectrofotométrica. Os resultados dos ensaios químicos são computados e com isso, pode-se ter um perfil do desenvolvimento do processo e da qualidade do álcool fabricado diariamente nos parâmetros mínimos exigidos<sup>(75)</sup>.

Os eventuais contaminantes no produto final podem trazer sérios prejuízos, especialmente nos processos de transformação química. Dentre as implicações do uso do álcool fora das especificações reguladoras podem-se destacar a queda da eficiência das reações onde o álcool consta como reagente e a corrosão por acidez elevada. Como os solventes orgânicos são compostos com ligações covalentes e portanto não são considerados eletrólitos, os casos de corrosão originados por eles ficam mesmo relacionados com a presença de impurezas que podem existir nos mesmos. Além dos substratos de concreto, tais como pisos e canaletas de efluentes, que sofrem corrosão, normalmente o material utilizado nas usinas de produção de etanol é o aço carbono, altamente sensível. Este material também é normalmente utilizado nos tanques de estocagem da produção da destilaria, cujas capacidades deverão corresponder ao esquema de operação da usina e permitir o escoamento regular desta produção ao longo de 12 meses do ano<sup>(60,70,76)</sup> (Na refinaria da Petrobrás, por exemplo, é de aproximadamente 15 milhões de litros<sup>(77)</sup>).

No caso do emprego carburante do álcool, a elevada acidez livre tem ação corrosiva sobre os componentes metálicos do motor. Além do aço carbono utilizado nos motores e componentes de automóveis, alguns carburadores de carros são fabricados com liga zamak e componentes em cobre e zinco que corroem com ácido. O controle de qualidade do etanol se torna um fator de fundamental importância uma vez que o combustível deve ser pouco agressivo aos componentes de qualquer material do motor<sup>(57,78)</sup>.

O ponto crítico na formação de impurezas no álcool se dá na fase da fermentação, em cuja etapa normalmente têm lugar fermentações secundárias. Tais fermentações são oriundas das atividades de outros microrganismos que frequentemente aparecem no processo acompanhando a matéria-prima vinda

do campo. Devido a sua composição, o caldo de cana geralmente é um meio bastante favorável ao desenvolvimento de microrganismos. Portanto, cuidados de assepsia são necessários desde a moagem, para não haver contaminação de microrganismos indesejáveis à fermentação<sup>(60,69,73,79)</sup>.

Algumas vezes, dependendo das condições do meio de fermentação, higiene e controle (inclusive da temperatura, que se eleva em consequência das reações exotérmicas), há o surgimento de infecções que atuam sobre os açúcares ou sobre os próprios produtos da fermentação, prejudicando a qualidade do produto final. Dentre estas infecções, destaca-se a fermentação acética causada por bactérias do gênero *Acetobacter*, que afetam o processo fermentativo por transformar o álcool em ácido acético. A ocorrência de infecção acética, que normalmente é a primeira das infecções que surge, é indicada pelo cheiro de vinagre e também pela presença de mosca drosófila<sup>(69,73,79)</sup>.

A acidez é um dos parâmetros necessários para a comercialização do álcool e representa uma análise tradicional indispensável no controle de qualidade, desde que por lei é exigido um teor máximo de ácido acético, principal subproduto da fermentação e maior responsável pela acidez na mistura. Seu controle na fermentação se torna importante na medida em que pode-se avaliar o índice de infecção durante o processo, já que quanto maior o índice de acidez fixa nas dornas, maior o número de bactérias presentes, que leva à produção de maior porcentagem de subprodutos ácidos em detrimento do álcool e portanto, menor o rendimento alcoólico<sup>(62,78,79,80,81,82)</sup>.

A composição e as características físico-químicas do álcool etílico combustível anidro e hidratado, proveniente de unidades produtoras de álcool ou entregues por companhias distribuidoras de derivados de petróleo, Petróleo Brasileiro S.A. - Petrobrás e postos revendedores, está regulamentada pelo Departamento Nacional de Combustíveis (DNC) e deve obrigatoriamente atender às especificações do Regulamento Técnico DNC n.º 03/91, que acompanha a Portaria n.º 23, de 29 de outubro de 1991<sup>(55)</sup>.

Para a acidez total do álcool etílico combustível anidro e/ou hidratado, expressa em ácido acético, proveniente de destilarias anexas ou autônomas, ou entregues por companhias distribuidoras de derivados de petróleo, a especificação máxima é de 30 mg L<sup>-1</sup> (5 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>). A concentração de ácido total é expressa como o grau de acidez (porcentagem por peso de ácidos totais contidos na amostra) ou o índice de acidez (mg de NaOH requerido para neutralizar o ácido contido em 1 g de amostra). Para o álcool etílico destinado à

indústria alcoolquímica, segundo a ABNT, através da NBR 10896, jan. 1990, o ácido acético presente deve ser no máximo  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $3,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ )<sup>(83)</sup>.

Segundo a orientação do DNC<sup>(55)</sup> que emprega a determinação do método da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)<sup>(83)</sup> através da NBR 9866, a verificação da acidez total do álcool deve ser feita adotando-se a titulação com NaOH  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  da amostra diluída a 50 % v/v, usando como indicador  $\alpha$ -naftolftaleína a 0,1 % em etanol a 70 % v/v. A American Chemical Society (ACS)<sup>(84)</sup> também propõe, através da especificação CAS n.º 64-17-5, a titulação ácido-base clássica com hidróxido alcoólico (NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) da amostra diluída, mas utiliza fenolftaleína como indicador. O mesmo método de análise é ainda proposto pela Merck Standards<sup>(85)</sup> para a amostra também previamente diluída, com NaOH  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  como solução alcalina e azul de bromotimol como indicador. Com algumas modificações, no procedimento da ASTM 1980 (American Standards Tests Methods) utilizado por algumas distribuidoras<sup>(86)</sup>, a amostra é diluída em uma solução de etanol-toluol 1:1 v/v e é titulada com KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  alcoólico e fenolftaleína (1 % em etanol) como indicador. Em todos esses procedimentos, a solução utilizada para a diluição das amostras com o indicador foi previamente neutralizada com a solução alcalina.

Outros métodos para determinação de acidez em etanol não têm sido discutidos, uma vez que a quantificação é dificultada por se tratar de um meio não-aquoso. Em um trabalho de análise de contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes no álcool desenvolvido por Brüning e Malm<sup>(80)</sup>, usando cromatografia em fase gasosa, foi observado que o ácido acético é eluído antes do pico de acetato de etila. O pico cromatográfico apresentou-se deformado, impróprio para quantificação, apesar das precauções tomadas para a desativação das paredes metálicas da aparelhagem. Karim<sup>(87)</sup>, em um outro trabalho, propôs a determinação por potenciometria de traços de ácido acético em etanol, mas para ser aplicado na determinação de ácido acético em vinagre.

Peris et al.<sup>(52)</sup> aplicaram o sistema FIA para o monitoramento do processo de fermentação que inclui, entre outros parâmetros, a determinação de acidez total em álcool. Este parâmetro, determinado com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível diodo array, monitorado a 553 nm usando NaOH  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  como solução alcalina e fenolftaleína, foi considerado o mais difícil, principalmente devido às limitações na análise em batelada (método manual). Segundo os resultados obtidos por Peris et al., os dados FIA em

comparação com os resultados obtidos pelo método manual apresentaram entre si um coeficiente de correlação igual a 0,989.

O presente trabalho propõe a titulação ácido-base efetuada através de FIA com detecção fotométrica, como uma metodologia automatizada, alternativa à titulação clássica realizada pelas usinas produtoras de etanol.

## 2.2 EXPERIMENTAL

---

### 2.2.1 MÉTODO CONVENCIONAL

Utilizando o método padrão recomendado para determinação de acidez em etanol, que emprega a titulação clássica com o uso do indicador  $\alpha$ -naftolftaleína, verificou-se que o ponto final é de difícil visualização. Portanto, para se obter resultados mais confiáveis, já que a titulação clássica resulta numa viragem gradual do ponto final, foram realizadas titulações espectrofotométricas. Tem-se assim, uma maior precisão e exatidão para a localização do ponto de equivalência na curva da titulação, obtida dos diversos pontos relacionados a cada adição da solução alcalina, em comparação com o obtido de um único ponto na titulação clássica.

#### 2.2.1.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Solução aquosa de hidróxido de sódio  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  preparada a partir da diluição de uma solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , previamente padronizada com biftalato de potássio e fenolftaleína. Solução de  $\alpha$ -naftolftaleína ( $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{O}_4$ )  $0,1 \%$  ( $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em meio alcoólico a  $70 \%$  (v/v).

#### 2.2.1.2 INSTRUMENTAÇÃO

Espectrofotômetro UV-visível SPEKOL, Carl Zeiss, com detector de fototubo, equipado com cubeta de caminho óptico de  $2 \text{ cm}$ , agitação magnética e microbureta Gilmont,  $2000 \mu\text{L}$ .

### 2.2.1.3 PROCEDIMENTO

8,00 g da amostra de etanol foram diluídos em 10,00 g de água e titulados com solução de hidróxido de sódio com auxílio de uma microbureta (adições sucessivas de 10  $\mu\text{L}$ ), usando  $\alpha$ -naftolftaleína como indicador. O ponto final foi avaliado pela intersecção de duas retas em um gráfico dos dados das absorvâncias obtidas à 655 nm em função do volume de titulante (solução alcalina) adicionado.

## 2.2.2 MÉTODO FIA

### 2.2.2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a determinação de acidez em etanol pelo método FIA, etanol 92,8% (m/m), medido por picnometria, foi utilizado como fluido transportador e como solvente para a preparação de todas soluções (padrões, solução indicadora e alcalina). Uma vez que o etanol utilizado para titulação de neutralização como solvente deveria estar o máximo possível isento de ácido, foi utilizada como matriz, etanol absoluto 99% comercial, purificado segundo Perrin e Armarego<sup>(88)</sup> com óxido de cálcio. Foi constatado, em experimentos prévios, que mesmo com a purificação, ocorre a presença de acidez residual na faixa de  $8 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , a mesma observada no etanol grau PA (Synth e Quimex) sem tratamento prévio, sendo portanto indiferente o uso de qualquer desses solventes. Essa concentração de ácido presente no solvente, para evitar erros sistemáticos, foi considerada na preparação dos padrões para a curva de calibração em FIA, uma vez que a acidez residual é mantida constante.

Como reagente básico, foi utilizada solução etanólica de hidróxido de sódio na concentração aproximada de  $5 \times 10^{-3}$  mol  $\text{kg}^{-1}$ . Esta solução foi preparada imediatamente antes de se efetuar os experimentos, levando-se em consideração a gradual carbonatação pelo  $\text{CO}_2$  atmosférico, que constitui um sério problema na análise. Como solução indicadora, foi empregado alaranjado

de acridina<sup>\*</sup>  $3,7 \times 10^{-5}$  mol kg<sup>-1</sup> em etanol. As soluções padrões, para a construção da curva de calibração, foram preparadas na faixa de  $3$  a  $8 \times 10^{-4}$  mol kg<sup>-1</sup>, obtidas por diluição de uma solução estoque etanólica de ácido acético  $3,7 \times 10^{-3}$  mol kg<sup>-1</sup>, que, por sua vez, foi preparada a partir de uma solução  $1,4 \times 10^{-1}$  mol kg<sup>-1</sup> também em etanol. Essa faixa foi determinada levando-se em consideração a acidez esperada dos álcoois comerciais e combustíveis, mas é flexível, podendo ser estendida para outras concentrações. A determinação da acidez das amostras através da curva de calibração resulta numa redução substancial dos erros sistemáticos, que tem o mesmo efeito em todas as soluções. A concentração real dos padrões foi determinada segundo o método espectrofotométrico anteriormente descrito com  $\alpha$ -naftolftaleína como indicador.

Para a obtenção de resultados mais confiáveis, diferentemente do procedimento recomendado, as soluções não foram medidas por volume, mas por massa. Além de reduzir perdas por volatilidade da amostra, considerou-se o alto coeficiente de dilatação volumétrica em função da temperatura observado para o etanol.

### 2.2.2.2 INSTRUMENTAÇÃO

Para a construção do sistema de fluxo, foram utilizados tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno e para as amostras foi utilizado tubo de PTFE (politetrafluoretileno - Teflon), Cole Parmer. A propulsão dos fluidos, a uma vazão constante ( $1,2$  mL min<sup>-1</sup> para a amostra e transportador,  $0,74$  mL min<sup>-1</sup> para o indicador), foi realizada por uma bomba peristáltica, modelo MP13GJ-4 de fabricação Ismatec, equipada com 13 canais de bombeamento. A bomba peristáltica, por seu baixo custo relativo e segurança, tem sido escolhida em muitos sistemas para o deslocamento de fluidos numa vazão controlada e reprodutível. Para a amostra, fluido transportador e solução alcalina, foram utilizados tubos de Viton (Cole Parmer) de diâmetro interno 0,045 mm e para o indicador, tubo de diâmetro interno de 0,035 mm. O dispositivo de injeção, construído de PTFE grafitado, com uma alça de volume de 190  $\mu$ L para a

---

\* Alaranjado de acridina (3,6 - bis (dimetil amino) acridina)

O corante utilizado, da marca British Drug House, foi o purificado por Sabadini<sup>(33)</sup>. Recebido na forma de hidrocloreto (alaranjado de acridina +HCl +1/2 ZnCl<sub>2</sub>), a purificação do corante (em sua forma livre) foi feita a partir da dissolução em uma mistura de água e etanol (1:1 v/v) e precipitado pela adição de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,01 mol L<sup>-1</sup>. O sólido formado foi lavado com água destilada, seco a 70 °C e armazenado sob vácuo protegido da luz.

solução alcalina, é o injetor proporcional descrito por Tubino e Barros<sup>(89)</sup>, similar àquele previamente descrito por Bergamin Filho et al.<sup>(90)</sup>. Para mistura dos fluidos foi utilizado um conector 4 vias de PTFE. O sistema FIA incluiu também uma câmara de dispersão do mesmo material, com volume interno de 2 mL, provida de uma barra de agitação magnética, revestida também de PTFE. Como detector, foi construído um fotômetro para esse sistema (Seção 2.2.2.3) equipado com LEDs (Ligth Emmitting Diodes) bicolor e azul, LDRs (Ligth Dependent Resistors) e cela de fluxo constituída de tubo de vidro de caminho óptico de 2 mm. A saída do circuito de detecção foi apresentada a um registrador potenciométrico de fundo de escala 200 a 500 mV, modelo RB201 de fabricação ECB (Equipamentos Científicos do Brasil).

Foi utilizado também, para o tratamento das soluções, um banho de ultrassom de alta potência Thornton, modelo T-14.

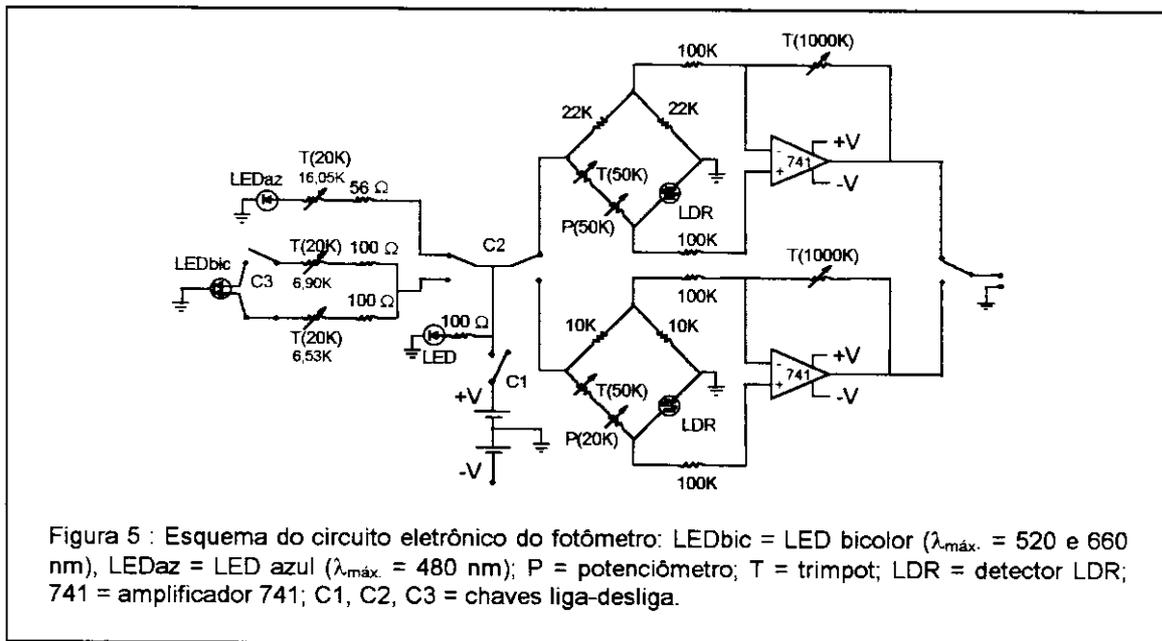
### 2.2.2.3 FOTÔMETRO

O detector espectrofotométrico construído para o sistema FIA foi baseado no apresentado por Pasquini e Raimundo Jr<sup>(43)</sup>. O fotômetro foi desenvolvido a partir de dois LEDs e detectores fotorresistores LDR (ordem n.º 338-54C679, fornecido pela Mouser Eletronics - USA) dispostos perpendicularmente sobre a cela de fluxo. Além do LED bicolor (verde-vermelho) proposto naquele, o fotômetro apresenta um LED azul, de  $\lambda_{\text{máx.}} = 480 \text{ nm}$  (catálogo n.º 101 CR-ND, fornecido pela Digi-Key - USA). O diagrama do fotômetro é apresentado na Figura 5.

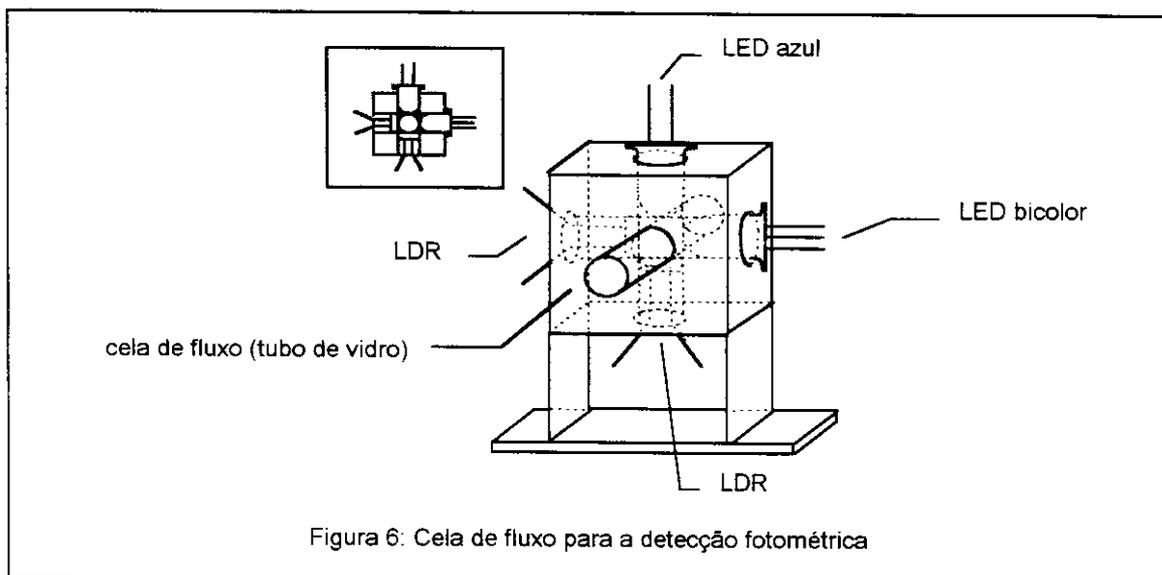
Cada LDR é conectada a uma das duas Pontes de Wheatstone, que são acionadas conforme a seleção da radiação emitida pelos LEDs. Além do LDR (fotorresistor) de sulfosseleneto de cádmio, cada Ponte de Wheatstone é formada de duas resistências fixas e de dois potenciômetros. Os potenciômetros permitem anular a saída da Ponte colocando-a na condição dita balanceada, antes das medidas. Quando a absorvância é alterada em função da reação da solução alcalina com o soluto e o indicador, provoca um desbalanceamento da Ponte de Wheatstone, gerando uma tensão que é amplificada pelo operacional 741 e que é registrada.

O circuito é alimentado por duas baterias de 9 V, responsáveis também pela alimentação dos LEDs empregados como fonte de luz. A seleção da radiação emitida pelos LEDs é feita por uma chave que aciona cada um dos

LEDs (azul,  $\lambda_{\text{máx.}} = 480$  nm ou bicolor) e por uma segunda chave que seleciona os comprimentos de onda do LED bicolor, na região do verde ( $\lambda_{\text{máx.}} = 560$  nm) ou vermelho ( $\lambda_{\text{máx.}} = 660$  nm).



A cela de fluxo para a detecção fotométrica se constitui em um tubo de vidro de diâmetro interno de 2 mm e volume total de  $94,3 \mu\text{L}$ . O suporte, fixado em uma placa de acrílico, foi construído a partir de um bloco (também de acrílico) e pintado de preto fosco para proteção contra luz externa. O esquema da cela de fluxo está representado na Figura 6.



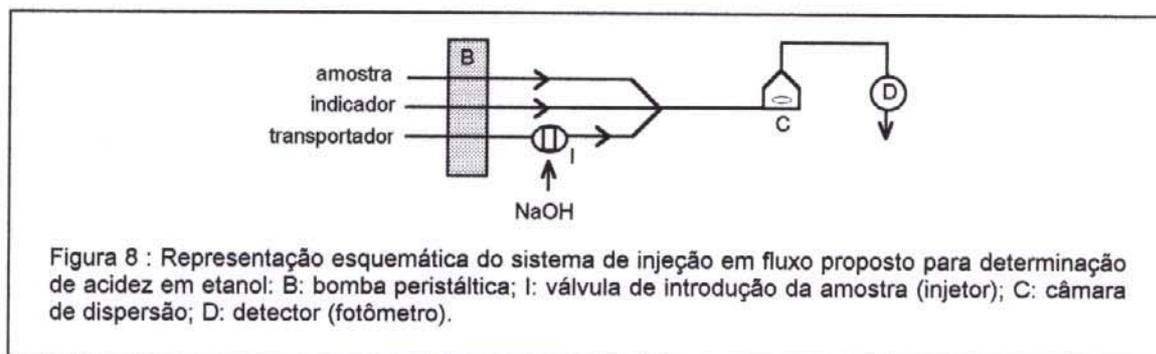
O conjunto foi colocado em uma caixa metálica (para assegurar a proteção da luz externa), com dois orifícios laterais para a passagem dos tubos de condução dos fluidos. Na parte posterior, foram montados os circuitos de detecção da fonte, dispostos em uma caixa também metálica. O fotômetro construído é ilustrado na Figura 7.



Figura 7: Fotômetro construído para o sistema

#### 2.2.2.4 SISTEMA FIA

A Figura 8 mostra esquematicamente o sistema de fluxo empregado. A amostra de etanol, continuamente bombeada, é confluída com a linha do indicador e a do transportador contendo a solução de hidróxido de sódio injetada. Em seguida, são bombeadas para uma câmara de dispersão onde são submetidas à agitação magnética, passando então pela detecção fotométrica. O decréscimo na absorbância resultado da interconversão do alaranjado de acridina (de  $\text{AOH}^+$  para o AO) é monitorada no comprimento de onda do LED azul ( $\lambda_{\text{máx.}} = 480 \text{ nm}$ ).



Neste sistema, quando o volume fixado da solução de NaOH injetada entra em contato com o fluido da amostra ácida, uma mistura é formada, convertendo parcialmente o alaranjado de acridina, presente inicialmente na forma monoprotonada ( $\text{AOH}^+$ ) laranja, para a forma neutra (AO) amarelo esverdeado. Pelo bombeamento contínuo do fluido da amostra, a solução alcalina será continuamente neutralizada. Quando sua concentração diminuir ao nível do fluido transportador, a cor irá mudar para laranja de novo. A mudança de cor, detectada pelo contínuo monitoramento do fluido que passa pela cela de vidro, irá indicar o ponto de equivalência. O tempo decorrido entre as duas transições de cor,  $\Delta t$ , irá fornecer uma medida de concentração do ácido. O sistema por injeção em fluxo proposto para a determinação de acidez em etanol pode ser visualizado na Figura 9.



Figura 9: Sistema de injeção em fluxo proposto para a determinação de acidez em etanol

### **2.2.3 AMOSTRAS**

Foram utilizadas 10 amostras de marcas e procedências diferentes de álcool etílico comercial hidratado 96 % e 3 amostras de álcool combustível, estocadas à temperatura ambiente, sem tratamento prévio.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

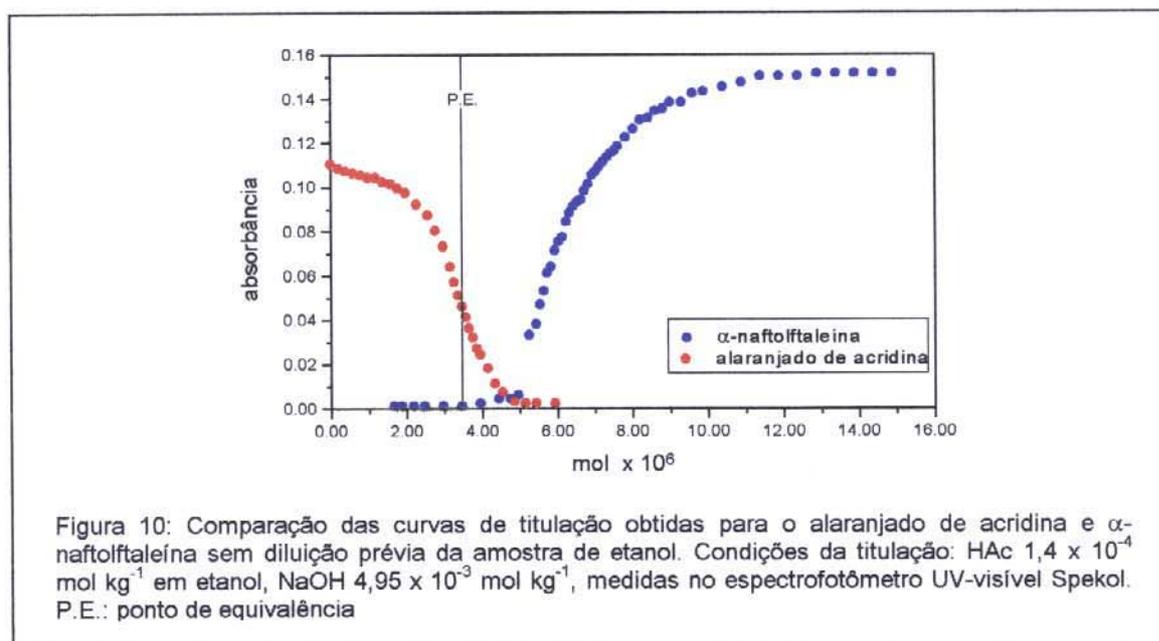
---

### 2.3.1 ESTUDO COMPARATIVO DE INDICADORES EM ETANOL

Apesar do  $\alpha$ -naftolftaleína ser adequado para a determinação de acidez em etanol, por se tratar de um indicador particularmente adaptado para ácidos fracos em soluções alcoólicas<sup>(91)</sup>, foi observado que o alaranjado de acridina (AO) apresenta um desempenho superior para este tipo de determinação.

Como já citado na Seção 2.1.3, o procedimento padrão para a determinação de acidez em etanol, regulamentado pelo DNC e baseado nas normas da ABNT, propõe a titulação ácido-base com  $\alpha$ -naftolftaleína como indicador para amostras previamente submetidas à diluição a 50% v/v com água. Em contrapartida, para soluções etanólicas puras, verificou-se que o AO apresenta melhores resultados quando comparado ao indicador regulamentado.

Em uma titulação empregando uma amostra de solução etanólica com concentração de ácido acético de  $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$ , sem a prévia diluição, e NaOH de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$  como titulante, observou-se que, usando-se o AO como indicador, o ponto de equivalência esperado ocorre no intermédio das transições das formas ácida e básica do AO. Para o  $\alpha$ -naftolftaleína, nestas condições, o ponto final obtido ocorre numa região acima do ponto de equivalência esperado, necessitando para isso, maior consumo de reagente titulante. A Figura 10 mostra as curvas de titulação obtidas para ambos os indicadores.



Esse resultado pode ser explicado pelo fato da relação de equilíbrio entre as formas ácidas e básicas dos indicadores (HInd e Ind<sup>-</sup>) serem diferentes quando se altera o meio. Em virtude da baixa constante dielétrica do etanol, os indicadores são menos ionizados e apresentam extensões de dissociação diferentes. Conseqüentemente seus pKas são alterados, levando a mudança de coloração em etanol puro em faixas de atividades de íon hidrogênio muito diferentes das correspondentes em etanol com diluição prévia<sup>(16)</sup>.

Com isso, verificou-se que quando a diluição prévia da amostra não é efetuada, usando-se o  $\alpha$ -naftolftaleína, há um erro de 40 % entre o ponto final obtido e o ponto de equivalência esperado. Nas mesmas condições, no entanto, a curva obtida pelo AO apresentou um comportamento bastante diferente, com o ponto final de titulação próximo ao ponto de inflexão da curva (ponto de viragem =  $3,47 \times 10^6$  mol em relação a  $3,50 \times 10^6$  mol esperado).

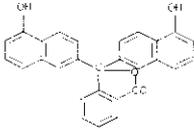
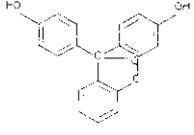
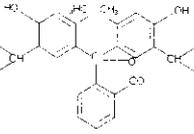
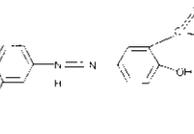
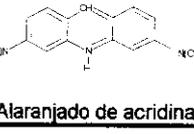
Usando-se o AO, tem-se a vantagem das amostras serem analisadas sem nenhum tratamento prévio, evitando erros inerentes a essa etapa. Além de possibilitar a redução do tempo de análise, pode-se obter resultados mais confiáveis, uma vez que a alcalinidade ou a acidez da água de diluição (normalmente com pH variando entre 5,0 e 8,5) pode somar-se à acidez original da amostra. Além disso, em se tratando de FIA, considerando a baixa solubilidade do etanol para gases quando misturado em água, pode ocorrer a formação de bolhas no sistema prejudicando a detecção. Mesmo a própria água usada para a diluição pode conter quantidade de ar ou gases dissolvidos que

podem liberar microbolhas no sistema durante a determinação. Embora uma bolha de ar resulte num sinal prontamente detectável, a sua presença retarda a análise e influencia a dispersão da amostra ou do reagente injetado no fluxo.

Como indicador ácido-base, o AO foi testado no sistema FIA para a determinação de acidez em etanol. Foram utilizados padrões na faixa de acidez esperada para as amostras de álcool ( $5 \times 10^{-5}$  a  $5 \times 10^{-3}$  mol kg<sup>-1</sup>), monitorando-se no comprimento de onda da forma ácida do indicador (495 nm). As mudanças de cor indicadas durante o ciclo de titulação das cores ácida-básica-ácida, apresentaram sinais com transições bem definidas, fáceis de quantificar, levando à maior exatidão.

No mesmo sistema, outros indicadores além do  $\alpha$ -naftolftaleína, que em água apresentam pKa próximos ao AO, como fenolftaleína, timolftaleína e amarelo de alizarina foram testados. As propriedades destes indicadores estão mostradas no Quadro 1.

Quadro 1 : Indicadores testados para a determinação de acidez em etanol<sup>(15,33,92,93,94)</sup>

INDICADOR	mm (u)	$\lambda_{m\acute{a}x.}$ (nm) monitorado	pKa (H <sub>2</sub> O)	INTERVALO DE TRANSIÇÃO
 $\alpha$ -Naftolftaleína	418,4	648 (370)	não disponível	pH 7,3 (esverdeado) para pH 8,7 (azul)
 Fenolftaleína	318,3	522(374)	9.4	pH 8,0 (incolor) para 10,0 (rosa)
 Timolftaleína	430,5	592 (396)	10.0	pH 8,8 (incolor) para pH 10,5 (azul)
 Amarelo de alizarina	287,2	385	11.1	pH 10,1 (amarelo) para pH 12,0 (vermelho)
 Alaranjado de acridina	265,3	495(425)	10.45	pH 8,4 (laranja) para pH 10,4 (amarelo esverdeado)

Como detector, foi utilizado um espectrofotômetro UV-visível (Micronal), cujas absorvâncias foram monitoradas nos comprimentos de onda da forma básica dos indicadores  $\alpha$ -naftolftaleína, fenolftaleína e timolftaleína, e forma ácida dos indicadores AO e amarelo de alizarina. A concentração empregada dos indicadores foi a mesma para as devidas comparações,  $3,7 \times 10^{-5} \text{ mol kg}^{-1}$ , levando em consideração que, a partir de uma certa concentração, o AO em solução pode formar oligômeros (dímeros, trímeros etc.).

Em etanol, foi verificado experimentalmente que na concentração de  $10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$  não há presença de dímeros. Através do espectro de absorção (Figura 11) obtido do AO ( $10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$ ) em solução de ácido acético ( $4 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$ ) em etanol após adições sucessivas, entre 7 a 347  $\mu\text{L}$ , de NaOH ( $5 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$ ), foi observada a presença de um ponto isobéptico. O ponto isobéptico (ponto de igual absorvância) observada em 445 nm indica a presença de um único equilíbrio de ionização entre as duas formas do AO. Além disso, a presença de dímeros do AO seria detectada pela forte absorção na região de 465 nm do espectro, que se sobrepõe às bandas vibrônicas presentes no espectro da forma monoprotonada<sup>(33)</sup>.

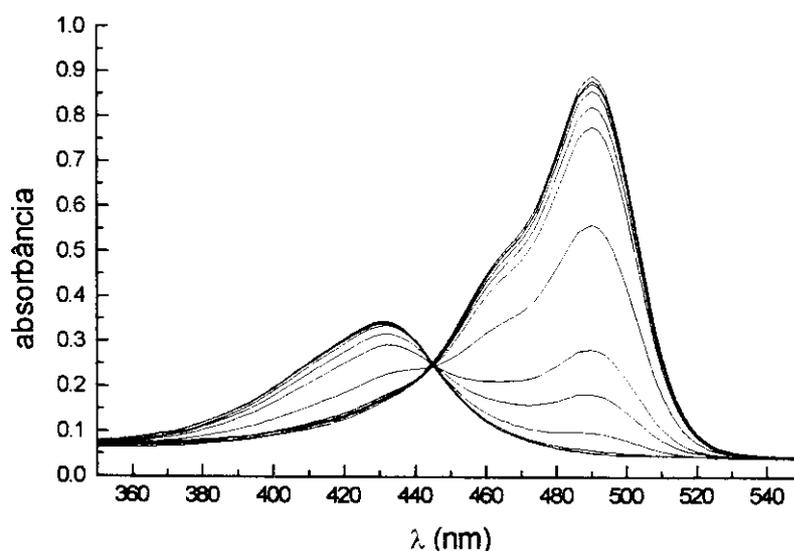
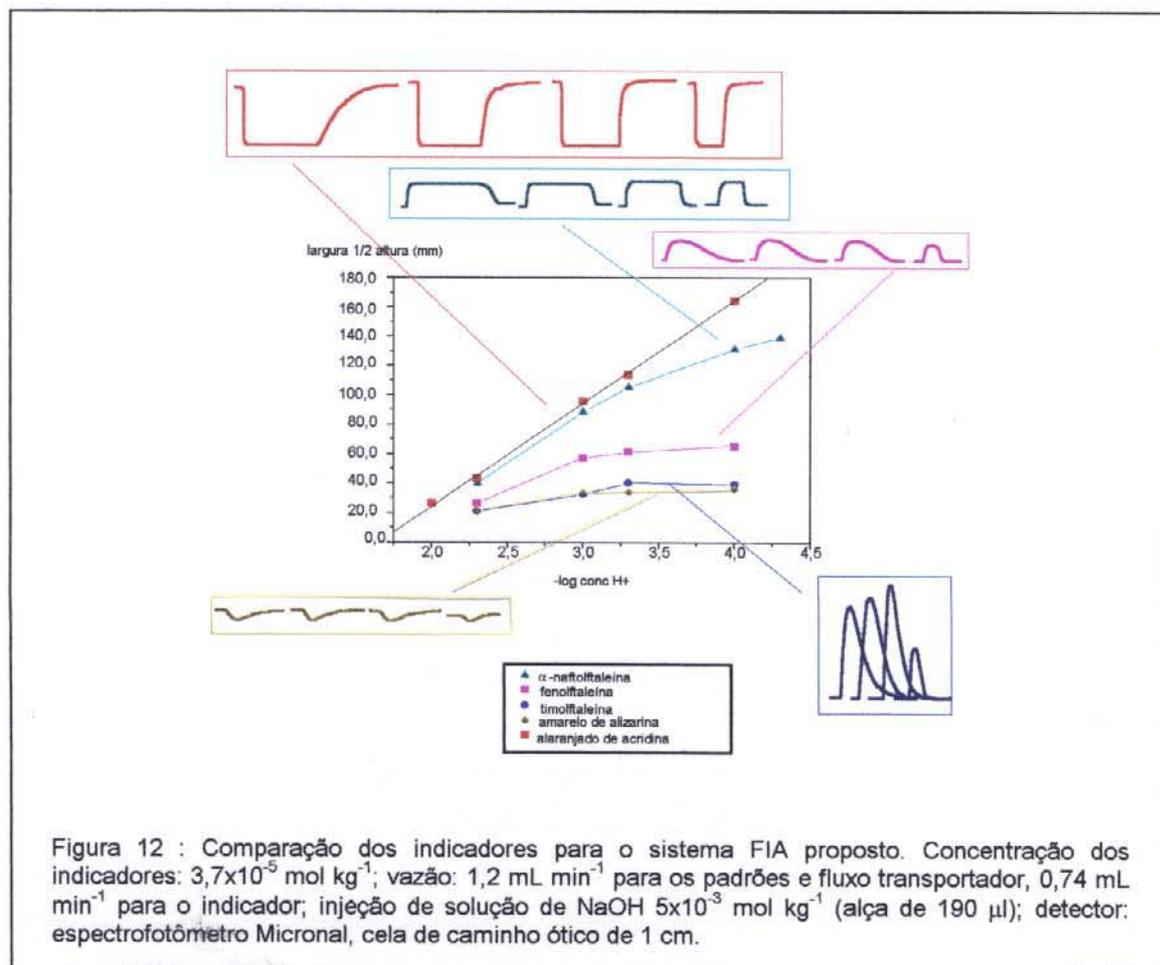


Figura 11: Espectro eletrônico de absorção do alaranjado de acridina ( $10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$ ) em solução de ácido acético em etanol ( $4 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$ ), após adições sucessivas, entre 7 a 347  $\mu\text{L}$ , de NaOH de concentração igual a  $5 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$ .

As curvas de calibração obtidas em função da largura a meia altura dos sinais para todos os indicadores são mostradas na Figura 12.

Pôde-se observar, que, nas mesmas condições, a curva de calibração obtida das larguras à meia altura dos sinais analíticos em função das diversas concentrações dos padrões com o uso do AO é linear, o que não acontece com os outros indicadores. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato deste corante somente sofrer a interconversão no ponto de equivalência, conforme discutido anteriormente. Desta forma, a proporcionalidade é mantida constante, o que não é observado para os outros indicadores.

Apresentando curvas analíticas com inclinações menos acentuadas, os outros indicadores são menos sensíveis e necessitam maior quantidade de solução alcalina para a interconversão. Desta forma, para padrões de concentrações mais altas, torna-se mais difícil diferenciar os sinais em relações àqueles de concentrações subseqüentes devido às alterações pouco significativas.



Uma vez apresentando resultados satisfatórios, o AO pode ser utilizado como um substituto ao indicador recomendado, quer pela sua natureza e pelas suas propriedades, possibilitando seu uso em meios não-aquosos sem diluição, quer pelo seu custo em comparação ao indicador  $\alpha$ -naftolftaleína.

Em comparação ao indicador recomendado  $\alpha$ -naftolftaleína, o AO utilizado (sal duplo de  $ZnCl_2$ ) é relativamente barato, na faixa de US\$ 2,94/g, enquanto o custo do outro é bem mais alto, US\$ 30,25/g<sup>(92)</sup>. Ressalta-se, ainda, que o uso do AO como indicador ácido-base é inédito na literatura.

### 2.3.2 DESEMPENHO DO FOTÔMETRO CONSTRUÍDO

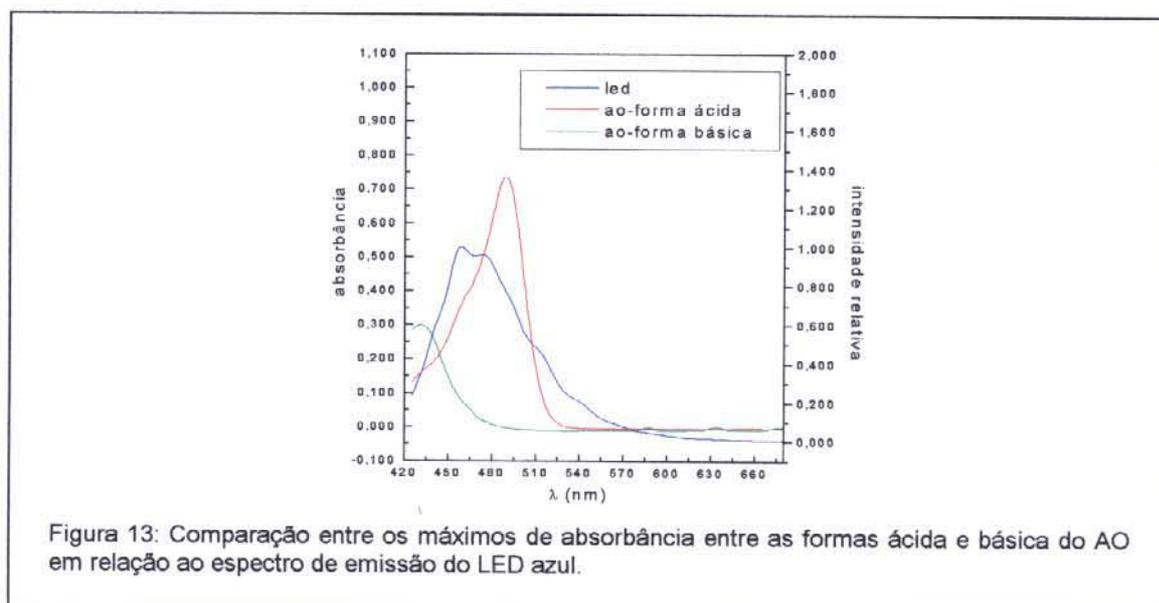
Levando em consideração o custo de um espectrofotômetro, bem como sua disponibilidade, foi construído um fotômetro para o sistema FIA. O acompanhamento da mudança de coloração das amostras pelo fotômetro apresentou grandes vantagens já que este é portátil, de boa sensibilidade, construção simples, com componentes eletrônicos de fácil aquisição no mercado nacional, sem partes óticas sofisticadas (como lentes e espelhos e monocromadores), com fonte de energia de baixa potência e, portanto, de baixo custo (menor que US\$ 100,00). Além disso, permite trabalhar em três regiões de comprimento de onda sem modificações no instrumento.

Devido a geometria tubular da cela de fluxo, a dispersão é minimizada, produzindo o menor distúrbio possível no fluido transportador do sistema. A possibilidade de retenção de bolhas de ar no caminho do feixe óptico, que afeta drasticamente nas medidas analíticas, também é eliminada uma vez que o próprio fluxo se encarrega de arrastá-las. Além disso, não há problemas com relação a volume morto, que prejudicam a velocidade de determinação, como em celas apresentadas na literatura<sup>(95)</sup>. Uma vez que a cela na qual se efetua a detecção se encontra fixa, pode-se assegurar, sobre este aspecto, a precisão das medidas no fotômetro utilizado.

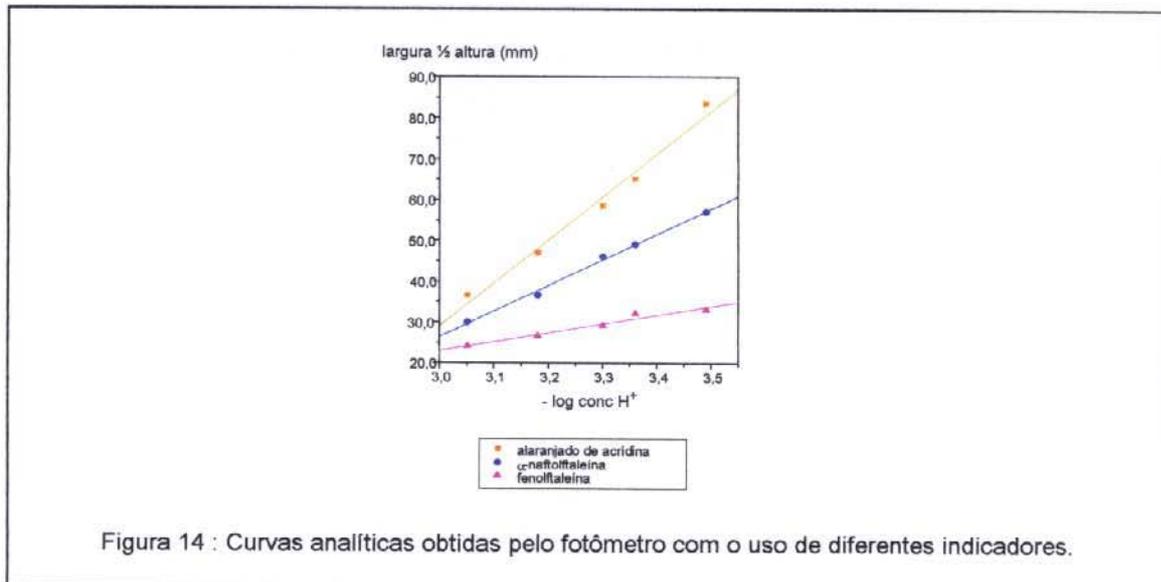
O detector fotométrico construído é constituído de um fotorresistor LDR (Light Dependent Resistor), que é um sensor fotoelétrico. Instrumentos normalmente utilizam fototransistores como detector. O fototransistor exige tratamento eletrônico mais complexo do sinal, obtido originalmente na forma de

uma corrente proporcional à intensidade de luz nele incidente, necessitando posteriormente ser convertido em variações de potencial que será apresentado a um registrador potenciométrico. A sensibilidade do fotorresistor (definida como a variação da sua resistência com a intensidade luminosa que atinge sua superfície) é função do comprimento de onda da luz que incide sobre ele<sup>(43)</sup>.

O circuito do fotômetro utilizado foi ajustado usando-se soluções dos indicadores fenolftaleína para o LED verde, AO para o LED azul e  $\alpha$ -naftolftaleína para o LED vermelho. Mais especificamente para o LED azul, verificou-se que o perfil de emissão deste LED se sobrepõe aos máximos de absorbância das formas ácida e básica do AO, como pode ser observado na Figura 13. Com isso, o LED azul pode ser empregado no sistema FIA de titulação, pois a absorvidade molar da forma básica é menor que a forma ácida e, mesmo com a sobreposição da luz emitida pelo LED na região de absorção das duas formas, a variação observada da absorbância é significativa.



Utilizando-se o fotômetro no sistema FIA proposto, foram feitas curvas analíticas na faixa de acidez esperada para amostra de álcoois comerciais,  $3 \times 10^{-4}$  a  $8,8 \times 10^{-4}$  mol kg<sup>-1</sup>. A inclinação mais pronunciada observada na Figura 14 para a curva analítica obtida com o AO comprovou a maior eficiência deste indicador. O fotômetro empregado no monitoramento destes sinais mostrou também bom desempenho.



### 2.3.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Para a implementação do sistema FIA de titulação, foram feitos previamente estudos de otimização de forma a se obter um perfil de sinal adequado para as medidas de largura (tomadas com régua). Sabe-se que o perfil do sinal é controlado pelos parâmetros do sistema como vazão, dimensões dos tubos de bombeamento, volume de amostra ou reagente injetado, concentração do reagente titulante, arraste do papel. O sinal não deveria ser muito estreito para permitir a observação de variações significativas nas diversas concentrações, nem excessivamente largo que levasse a uma determinação mais lenta. Portanto, a variação do sinal irá não só mudar a precisão absoluta do procedimento de titulação, mas também servir como meio conveniente de ajuste do tempo de titulação para uma série de amostras que irão cair dentro de uma faixa de concentração escolhida.

Para a determinação das concentrações iniciais do indicador e reagente titulante, foi preciso levar em consideração que FIA é uma técnica de diluição. Os reagentes sofrem diluições de outras linhas com as quais confluem, até passar pelo detector de fluxo. A concentração na faixa de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$  da solução de NaOH empregada foi adequada de forma que seu excesso pudesse

ser monitorado. Considerando que esta solução sofre diluição desde o momento de sua injeção, a concentração é maior que a da amostra para permitir a obtenção de sinais significativos resultantes da alteração da forma do indicador. Quanto ao indicador, a concentração ( $3,7 \times 10^{-5} \text{ mol kg}^{-1}$ ) foi adequada para que fosse bem menor que a da amostra ácida para manter sua forma monoprotônica em linha.

O volume da alça de amostragem (190  $\mu\text{L}$ ) foi ajustado levando em consideração que aumentos demasiados de volume injetado podem levar a um efeito de saturação, isto é a dispersão tornar-se invariável por limitação do comprimento do percurso analítico. A razão entre os comprimentos da alça de amostragem e do percurso analítico é o parâmetro que apresenta efeito mais acentuado sobre a magnitude do sinal. Se a concentração da solução alcalina é muito baixa, o comprimento da alça de amostragem deve ser maior. No outro extremo, quando a solução alcalina é muito concentrada, a razão do tamanho da alça de amostragem e o percurso analítico pode ser diminuído, impondo à solução uma grande dispersão. Pequenos volumes (menor que 10  $\mu\text{L}$ ) geralmente não podem ser injetados por limitação de concentração dos dispositivos de injeção e também pela falta de repetibilidade dos sinais FIA obtidos para estes volumes<sup>(21,96)</sup>.

As conexões entre a válvula de injeção, a câmara de mistura e o detector, foram mantidas as mais curtas possíveis para que a reação fosse comandada pela dispersão da câmara. Além de aumentar a dispersão e promover a mistura do reagente e da amostra, levando a resultados mais reprodutíveis, a função da câmara de mistura é aumentar a intensidade de mistura radial. Com isto reduz-se o perfil de velocidade parabólica na direção axial, que é formada quando a zona de amostra é injetada dentro de um fluxo laminar<sup>(5,97)</sup>.

A vazão foi estabelecida pela alteração dos diâmetros dos tubos e a velocidade de rotação da bomba peristáltica levando em conta o consumo de amostra e titulante e o limite de detecção. Quando a razão entre os volumes da alíquota de amostra e do percurso analítico é inadequada, o reagente pode não alcançar o centro da amostra em quantidade suficiente para satisfazer as condições para o desenvolvimento das reações químicas envolvidas. A vazão não tem efeito na altura do sinal, mas seu aumento influencia no decréscimo de  $\Delta t$ , no consumo dos reagentes e amostras e piora a detecção. Este limite irá piorar na medida em que a homogeneização da amostra não for suficiente. Para

vazões menores, os sinais podem se apresentar distorcidos indicando condições de mistura insuficientes<sup>(5,21)</sup>.

Uma vez que as amostras a serem analisadas eram de álcool hidratado, as soluções padrão etanólicas foram diluídas para conter o teor típico de etanol nesta matriz (92,8 % m/m). Testes foram feitos para avaliar a influência da água na determinação de acidez em etanol, levando em consideração a faixa de hidratação dos álcoois comerciais. Verificou-se que variando-se as porcentagens de 85 a 99 %, na mesma concentração de ácido, o desvio padrão obtido para as larguras à 1/2 altura é de  $\pm 0,3$  cm. A Tabela 1 apresenta os dados obtidos de largura a 1/2 altura para cada porcentagem de água testada.

Tabela 1: Influência da porcentagem de água na determinação de acidez do etanol no sistema proposto. Concentração de ácido acético:  $1,6 \times 10^{-4}$  mol kg<sup>-1</sup>; NaOH =  $5 \times 10^{-3}$  mol kg<sup>-1</sup>.

ÁGUA (%)	LARGURA A 1/2 ALTURA (MM)	MÉDIA
99	73,0	
96	70,0	
93	67,0	68,0 $\pm$ 3,0
90	67,0	
85	65,0	

Pode-se observar um pequeno decréscimo na largura à meia altura com o aumento da porcentagem de água, mas para o propósito do trabalho, esta variação não é significativa, uma vez que é corrigido na preparação dos padrões usando o teor de água esperado para o álcool hidratado.

### 2.3.3.1 ETANOL

Diferente dos procedimentos clássicos em FIA, o fluido transportador (solvente) utilizado para esse propósito não é aquoso. Foi utilizado o próprio etanol, livre de ácido. Desta forma, evita-se distorções do sinal quanto às diferenças de viscosidade e índice de refração, bem como a formação de bolhas no sistema. Quando se alteram as características físicas das amostras e fluido transportador, principalmente a viscosidade, a dispersão da amostra no fluido

transportador é influenciada e portanto pode afetar a magnitude do sinal analítico<sup>(21)</sup>.

Ressalta-se aqui que o uso da Análise por Injeção em Fluxo (FIA) para titulações ácido-base em meio não-aquoso pelo método fotométrico em FIA, bem como a análise dos parâmetros característicos do etanol não têm sido discutidos na literatura.

Por se necessitar bombear o etanol no sistema, alguns parâmetros do sistema foram modificados em relação aos procedimentos clássicos envolvendo FIA, que empregam soluções aquosas. Para procedimentos FIA, executados exclusivamente em meios não-aquosos, materiais compatíveis têm que ser escolhidos cuidadosamente.

A câmara de dispersão e a válvula de introdução da amostra usadas foram construídas de PTFE (Teflon), que além de ser isolante, é um material inerte quimicamente, resistente ao ataque de reagentes. Válvulas introdutoras de amostras, normalmente construídas de acrílico (polimetil metacrilato<sup>(98)</sup>) e com borrachas de vedação, são problemáticas para uso de solventes orgânicos, já que o material polimérico é atacado por vários produtos, entre eles o etanol<sup>(89)</sup>.

Uma vez que os fluidos são movimentados através da bomba peristáltica pela ação de compressão de um carrossel de rolos sobre o tubo, a escolha do material do tubo é de grande importância. A fadiga do material pode causar uma deformação permanente no tubo, resultando numa diminuição da vazão<sup>(99)</sup>. Em substituição aos tubos de Tygon normalmente utilizados nas bombas peristálticas, foram utilizados tubos de Viton (poli (vinilideno fluoreto-co-hexafluoro propileno<sup>(98)</sup>). O tubo de Tygon, cujo material é do tipo de PVC transparente, não é apropriado, pois não é resistente a solventes orgânicos, que causam sua rápida deterioração<sup>(39)</sup>. Os tubos de Viton, por outro lado, são elastômeros fluorocarbonados frequentemente usados nas aplicações que requerem largas faixas de temperatura e contatos com substâncias químicas, corrosivas, solventes, óleos e combustíveis<sup>(98,99)</sup>. Em se tratando de etanol, o tubo de Viton, segundo classificação da Cole Parmer<sup>(100)</sup>, é de categoria A, não apresentando alteração na presença de solução etanólica. Para as amostras, os tubos de bombeamento de Teflon foram selecionados pela sua natureza rígida e maior compatibilidade com soluções não-aquosas.

### 2.3.3.2 CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA

A configuração do sistema proposto em linha tripla foi escolhida a partir de experimentos prévios que foram realizados de forma a encontrar a mais favorável. Os resultados foram avaliados considerando-se como os parâmetros estudados influenciaram a sensibilidade, comportamento e definição do sinal.

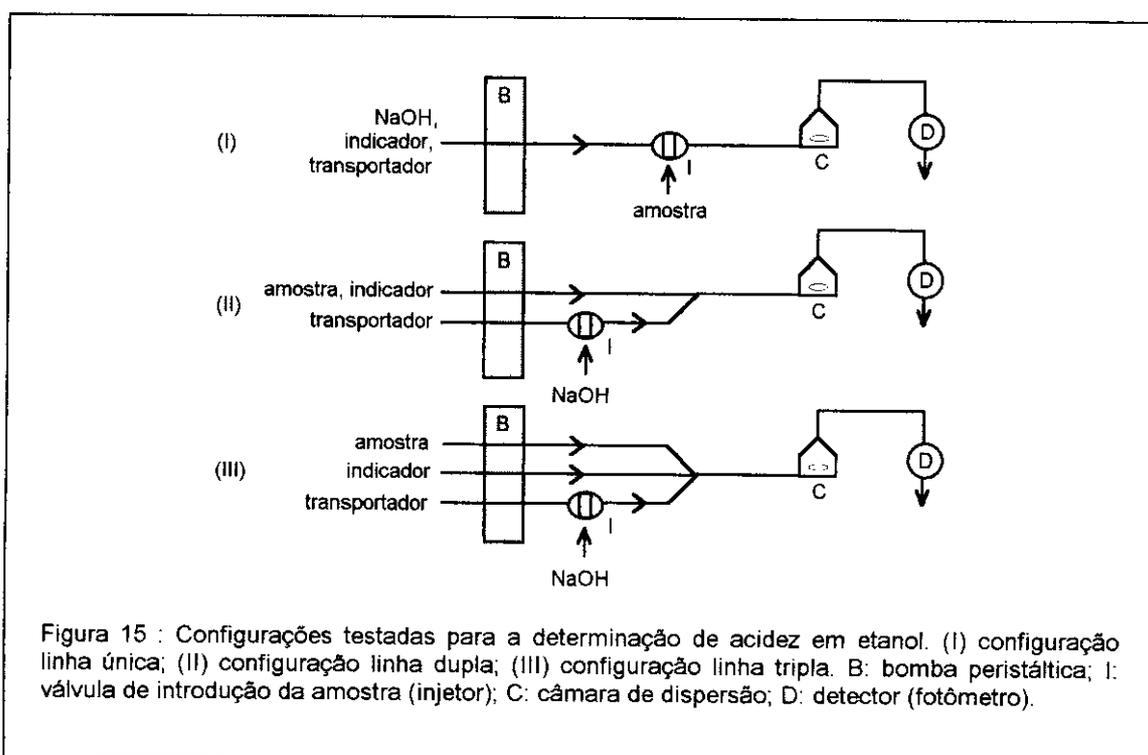
A configuração de linha única que é a versão mais simples do sistema de injeção em fluxo foi testada. Nesse sistema, o fluido transportador era o próprio reagente, onde a amostra ácida foi injetada com volume definido e reproduzível, sendo depois misturados na câmara de dispersão e enfim levados ao detector. Devido ao bombeamento constante da solução alcalina e indicadora, a amostra é continuamente titulada até a concentração de ácido diminuir ao nível do fluido transportador. No entanto, uma vez que a amostra apresenta concentração baixa de ácido, além de sofrer diluições no sistema, para que se pudesse detectar algum sinal representativo, a solução alcalina deveria ser preparada em concentração extremamente baixa. Alternativamente, a alça do volume a ser injetado poderia ser aumentada, mas levaria a uma maior lentidão da análise. Nestas condições, os resultados obtidos para este tipo de configuração demonstraram menor sensibilidade principalmente a concentrações mais baixas, que permanecem fora da faixa de linearidade na curva de calibração. Mesmo para um corante mais ácido que o AO como a fenolftaleína em etanol, não foi possível observar variações significativas em concentrações mais baixas nos resultados de titulação.

Na inversão de adição dos reagentes, ou seja, na injeção do reagente básico em substituição da amostra no fluido transportador, o problema com a preparação de solução alcalina mais diluída foi minimizado. No entanto, verificou-se que os resultados obtidos não foram satisfatórios e que a concentração da solução alcalina ainda não foi suficiente para obter sinais com diferenças significativas em relação às variações de concentração da amostra ácida.

Foi testada então a configuração de linha dupla. A solução alcalina foi injetada no fluido transportador, que por sua vez conflui com o fluido contendo a amostra e indicador, passando depois pela câmara de dispersão e em seguida pelo detector. Uma vez que a solução de hidróxido sofre uma diluição pelo fluido do transportador antes da confluência com a linha do indicador e reagente básico, obtém-se maior sensibilidade. Entretanto, os sistemas de linha única e dupla, não são muito vantajosos, pois necessitam da preparação constante de

amostras (adição do indicador) induzindo a erros e demandando maior tempo para determinação.

Levando-se em consideração a diluição sofrida pela solução alcalina e a não preparação da amostra, foi adotada uma configuração na qual o reagente básico é injetado no fluido transportador (ocorrendo a redução do consumo de reagente). A amostra e o indicador, continuamente bombeados, permanecem em linha separadamente. As amostras, assim, podem ser analisadas diretamente sem nenhuma preparação. Além disso, uma vez que o indicador é adicionado por confluência, cada fração da amostra recebe a mesma quantidade de AO e, portanto, não se formam gradientes de concentração de indicador dentro do percurso analítico. O sinal obtido representa o excesso de reagente básico em relação ao ácido, resultando num patamar. Com isso, esse sistema se destaca quanto à sensibilidade permitindo determinações de ácido a concentrações mais baixas. As configurações testadas estão apresentadas na Figura 15.



## 2.3.4 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM AMOSTRAS DE ETANOL

### 2.3.4.1 ACIDEZ EM ÁLCOOIS COMERCIAIS

O método foi aplicado para 13 amostras de álcool comercial e combustível de diferentes marcas e procedências e comparado com o método recomendado que utiliza  $\alpha$ -naftolftaleína como indicador.

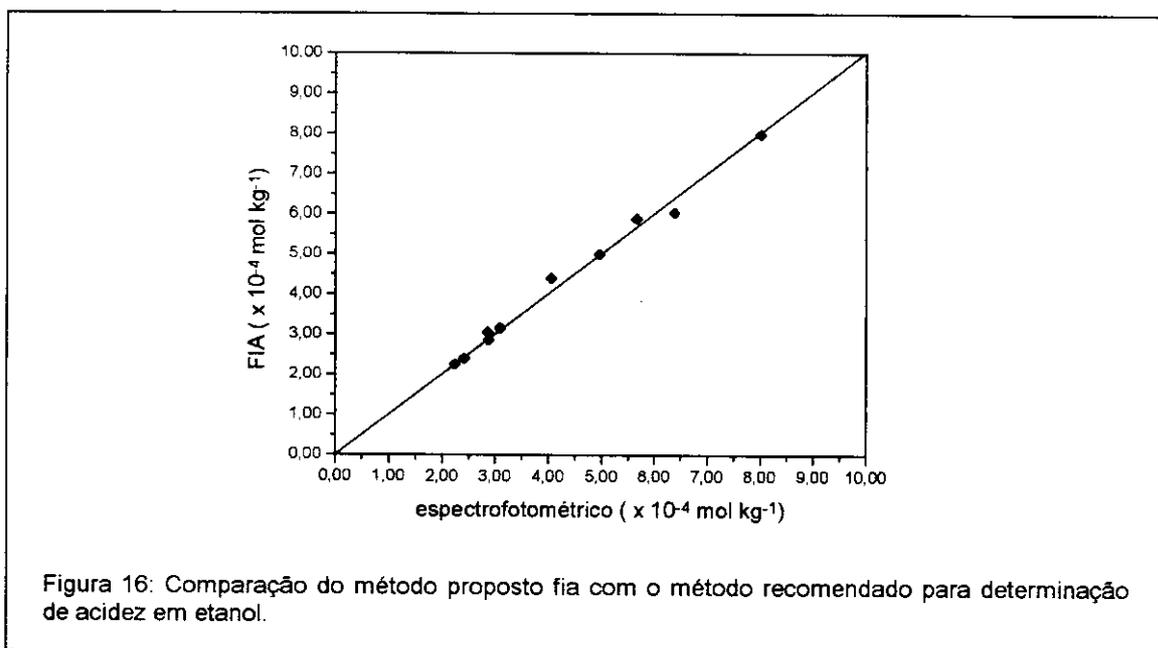
Os resultados obtidos para amostras de álcool comercial estão apresentados na Tabela 2. Observou-se que o erro relativo médio obtido das determinações foi de 3,0 %.

Tabela 2: Concentrações de ácido das amostras de álcool comercial obtidas pelo sistema FIA proposto em comparação com o método padrão. M. DIFERENÇAS = média das diferenças absolutas entre duplicatas

AMOSTRA DE ÁLCOOL	ESPECTROFOTOMÉTRICO ( x 10 <sup>4</sup> mol kg <sup>-1</sup> )	FIA ( x 10 <sup>4</sup> mol kg <sup>-1</sup> )	ERRO RELATIVO (%)
R	2,25	2,25	0,0
Ca	2,42	2,39	- 1,2
Ak	2,86	3,05	+ 6,6
P	2,88	2,86	- 0,7
I	3,09	3,16	+ 2,3
Z	4,06	4,40	+ 8,4
Ad	5,66	5,89	+ 4,1
Co	4,97	5,00	+ 0,6
D	6,38	6,03	- 5,5
T	8,01	7,98	- 0,4
<b>M. DIFERENÇAS</b>	0,10	0,15	
<b>ERRO RELATIVO MÉDIO</b>			<b>3,0</b>

Um gráfico dos resultados obtidos por FIA para titulação de dez amostras de álcool hidratado, em função daqueles obtidos por titulação espectrofotométrica convencional, está apresentado na Figura 16. Os resultados são melhores quanto mais próximo de 1 for o coeficiente angular da reta obtida. A reta obtida, de coeficiente angular de 0,975 e coeficiente de correlação = 0,995, indicou que os resultados apresentaram uma concordância

entre os dois métodos, principalmente se levarmos em consideração que a determinação envolve concentrações baixas na ordem de  $10^{-4}$  mol  $\text{kg}^{-1}$ .



#### 2.3.4.2 ACIDEZ EM ÁLCOOL COMBUSTÍVEL

As amostras de álcool combustível, no entanto, ao serem diluídas a 50% v/v, conforme requerido pelo método regulamentado, apresentaram forte turbidez (provavelmente causada pelos aditivos, que são utilizados para melhorar o poder de auto-ignição do etanol, bem como durabilidade de motores<sup>(78,101,102)</sup>), dificultando a detecção pelo espectrofotômetro. Com isso, estas amostras não puderam ser comparadas com o método convencional. Por outro lado, no sistema FIA usando AO, que não necessita diluir a amostra, a acidez pôde ser determinada sem maiores problemas. Os valores obtidos de acidez são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações de ácido das amostras de álcool combustível obtidas pelo sistema FIA proposto. M. DIFERENÇAS = média das diferenças absolutas entre duplicatas

AMOSTRA COMBUSTÍVEL	CONCENTRAÇÃO ( x 10 <sup>4</sup> mol kg <sup>-1</sup> )
Tx	1,68
At	1,77
Sh	1,84
<b>M. DIFERENÇAS</b>	<b>0,10</b>

Em estudos realizados por Mancilha e Silva<sup>(24)</sup>, foi observado que para a técnica analítica oficial, para amostras com acidez esperada na ordem de 30,0 mg L<sup>-1</sup> (aproximadamente 6 x 10<sup>-4</sup> mol kg<sup>-1</sup>) foram obtidos resultados variando de 16,0 - 30,4 (aproximadamente 3 x 10<sup>-4</sup> a 6 x 10<sup>-4</sup> mol kg<sup>-1</sup>) para álcool combustível (não aditivado) e 6,0 - 30,2 (aproximadamente 1 x 10<sup>-4</sup> a 5 x 10<sup>-4</sup> mol kg<sup>-1</sup>) para álcool não carburante. Com isso, foi obtido um valor de repetibilidade (precisão do método intralaboratorial) de 10 mg L<sup>-1</sup> (2 x 10<sup>-4</sup> mol kg<sup>-1</sup>) e de reprodutibilidade (precisão do método interlaboratorial) de 40 mg L<sup>-1</sup> (8 x 10<sup>-4</sup> mol kg<sup>-1</sup>) indicando que, apesar de se usar a mesma técnica de análise, ocorrem erros de operação tanto intra como interlaboratorial. Com base nestes resultados previamente obtidos, pode-se inferir que provavelmente os resultados obtidos por FIA para as amostras de álcool combustível são coerentes.

O sistema desenvolvido apresenta algumas vantagens, como a dispensa do uso de vidrarias e outros materiais para a análise. Já que o procedimento não envolve leituras em buretas para avaliar o ponto final, não há erros pessoais. Além disso, por ser um sistema fechado e uma vez introduzida a alíquota da solução alcalina no percurso analítico, as reações químicas ocorrem sem nenhum contato externo. Os riscos de contaminação são menores, já que a manipulação das soluções é diminuída e o teor final de acidez do álcool é menos influenciado por fatores como luz, aeração e agitação. Com isso, a variação sobre a acidez também é diminuída, uma vez que não ocorre interferência do CO<sub>2</sub> do ambiente<sup>(24)</sup>. Considerando que a determinação envolve baixas concentrações de ácido (da ordem de 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) os resultados serão mais confiáveis se obtidos na ausência de contato da amostra com a atmosfera.

Com relação à solução alcalina empregada, nos procedimentos manuais, o NaOH necessita ser previamente padronizado, e, devido às baixas

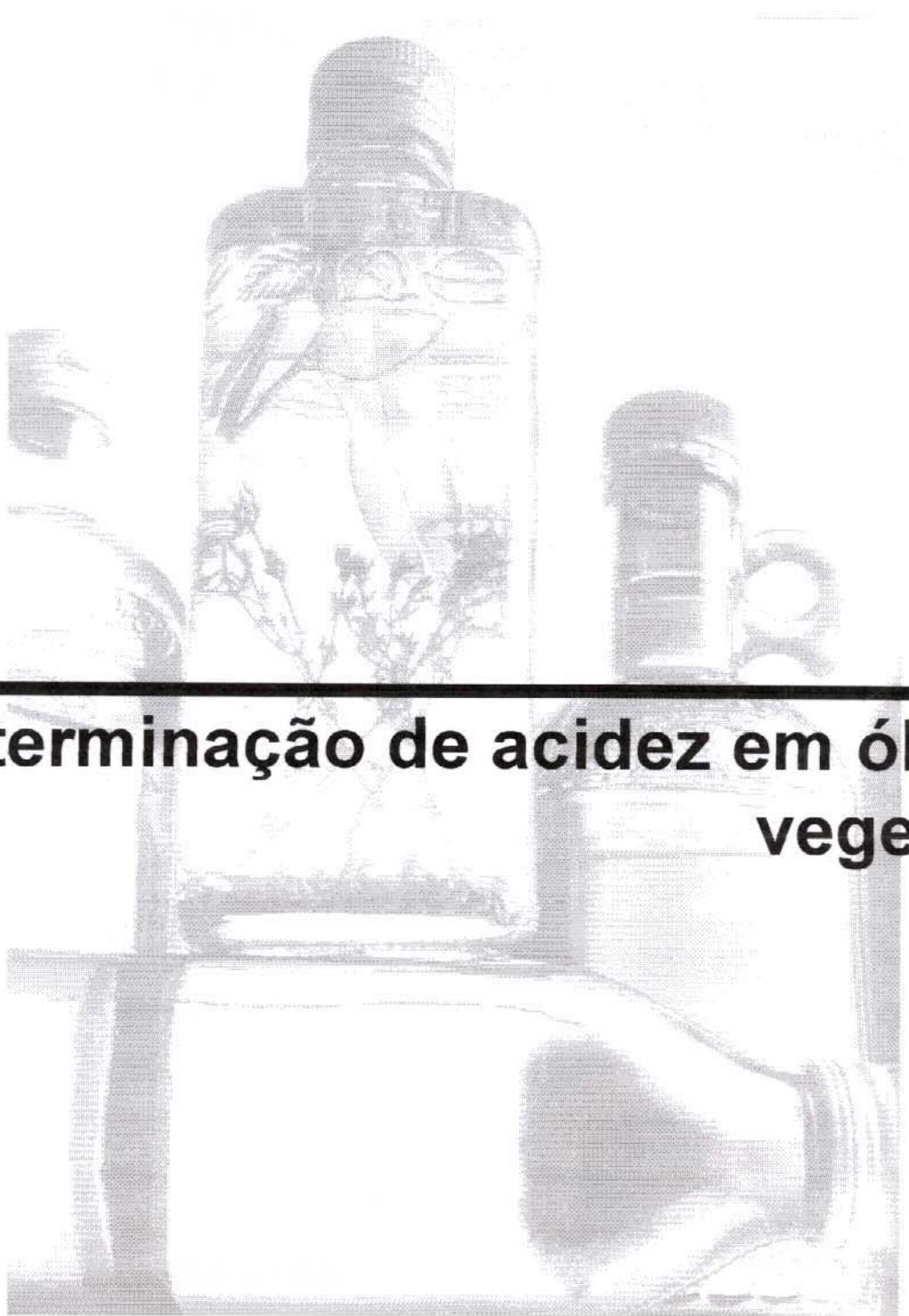
concentrações de ácido, se o procedimento recomendado for seguido (Seção 2.1.3), volumes bastantes reduzidos são gastos para a titulação (não mais que 1 mL de hidróxido). No sistema FIA, o valor absoluto da solução alcalina não precisa ser exatamente conhecido uma vez que a quantificação da acidez é baseada em medida relativa de padrões ácidos conhecidos (curva de calibração). Isso de fato se torna uma grande vantagem, já que a concentração de hidróxido é bastante afetada pela absorção do  $\text{CO}_2$ <sup>(15,24)</sup>, limitando sua vida útil e levando a valores não confiáveis. Além disso, o volume empregado não precisa ser quantificado, já que, dependendo da configuração do sistema, este é reproduzido em cada determinação, através da alça no sistema de injeção, ou é bombeado continuamente.

Como principal desvantagem desta técnica, deve-se apontar a necessidade de preparação de padrões de soluções alcoólicas contendo teores conhecidos de ácido. Neste caso, a dificuldade se encontra na obtenção de etanol livre de acidez residual.

O método automático proposto para a determinação de acidez total em etanol, com o intuito de efetuar seu controle de qualidade, tanto na produção como na comercialização do álcool combustível permitiu uma rápida caracterização deste parâmetro em comparação com o método convencional (30 amostras por hora versus 8 amostras por hora no método manual).

Os resultados obtidos para amostras de álcool comercial hidratado, cujo teor de acidez está na faixa de  $2$  a  $8 \times 10^{-4}$  mol  $\text{kg}^{-1}$ , indicaram erro relativo de 3 % entre a metodologia FIA proposta e o método convencional que utiliza  $\alpha$ -naftolftaleína como indicador e coeficiente angular de 0,975 num gráfico que relaciona os métodos.

Verificou-se que o  $\alpha$ -naftolftaleína, no entanto, por necessitar de diluição prévia da amostra a 50 % v/v com água, torna impossível a determinação de acidez em álcool combustível. Uma vez que no método proposto o AO apresentou resultados mais exatos para a determinação de acidez da amostra sem tratamento, foi possível determinar a acidez de amostras de álcool combustível.



---

# Determinação de acidez em óleos vegetais

# **3 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM ÓLEOS VEGETAIS**

---

Óleos e gorduras de uma vasta variedade de fontes são importantes para a indústria alimentícia e outros setores industriais. Em quase todas as situações, a caracterização geral dos óleos e o monitoramento das modificações que eles podem sofrer durante o processamento são de grande importância para sua qualidade e valor econômico<sup>(103)</sup>.

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia analítica para determinação de acidez para ser utilizada como indicador de qualidade, tanto na produção como na comercialização de óleos vegetais. O método se baseia na titulação ácido-base efetuada através da Análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção fotométrica.

A acidez é um parâmetro largamente utilizado na indústria química de óleos, que proporciona evidências para pureza de óleos comerciais. Desde que a qualidade aromática e o valor econômico dos produtos dependem fortemente da concentração de ácidos graxos livres, é desejável medir com exatidão sua concentração<sup>(104)</sup>.

## **3.1 INTRODUÇÃO**

---

### **3.1.1 ÓLEOS VEGETAIS**

Extraídos de uma vasta variedade de fontes de sementes e frutos oleaginosos, os óleos vegetais têm sido utilizados convenientemente como meio de aquecimento e frequentemente na preservação (atuando como antioxidantes) e preparação de alimentos (realçando o sabor). Sua propriedade reversível de

transição de fase sólido-líquido permite sua grande aplicabilidade na fabricação de gorduras pastosas (margarinas)<sup>(105,106)</sup>.

Em matéria de substâncias graxas, há uns dois séculos atrás, o homem dispunha, para preparação de alimentos, somente do azeite de oliva e das gorduras animais. Hoje há uma enorme variedade de óleos comestíveis, que suprem todas as necessidades da cozinha e da mesa. Com a produção de óleos comestíveis vegetais cresceu em semelhante proporção a dos óleos industriais, cujas aplicações também se diversificaram<sup>(107)</sup>.

No Brasil, a indústria de óleos vegetais data do século XIX. A princípio, esses óleos eram empregados na iluminação, na medicina e um pouco na alimentação. No século XX, com o desenvolvimento das pesquisas e da técnica de fabricação, suas finalidades foram diversificadas. Em vista da sua larga utilização na indústria, como sabões, lubrificantes, combustível, na siderurgia e na composição de tintas e vernizes, muitos óleos vegetais tiveram seu consumo rapidamente expandido. Em se tratando de alimentação, por seu poder calórico, sua estabilidade e por outras propriedades naturais, os óleos de soja, de girassol, de milho, de algodão e de amendoim em curto período de tempo dominaram os mercados da maioria dos países, conquistando a preferência dos consumidores como substitutos das gorduras animais<sup>(107)</sup>.

### 3.1.2 PRODUÇÃO

A indústria brasileira de óleos vegetais é considerada uma das mais modernas do mundo, com equipamentos e tecnologia de primeiro mundo<sup>(1)</sup>.

A produção mundial de matérias-primas oleaginosas aproxima-se de 260 milhões de toneladas e de óleos vegetais 65 milhões de toneladas<sup>(108)</sup>. Mais especificamente no setor de óleos vegetais comestíveis, em 1995, a produção mundial foi de 19 milhões de toneladas, enquanto no Brasil foi de 3,4 milhões de toneladas<sup>(109)</sup>. O mercado de óleos comestíveis brasileiro movimenta cerca de US\$ 2,3 bilhões por ano, sendo 85 % do consumo total detido pelo óleo de soja<sup>(109)</sup>. As famosas e exclusivas empresas de óleos da "Era do óleo de algodão" da primeira metade do século XX e da "Era do óleo de amendoim" iniciada no começo dos anos 50, ficaram quase sem expressão, quando

comparadas com as novas indústrias que surgiram nas últimas décadas com a "Era do óleo de soja"<sup>(1)</sup>.

### 3.1.3 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

#### 3.1.3.1 COMPONENTES GLICERÍDICOS

Com propriedades únicas como a hidrofobicidade e imiscibilidade com água, os óleos vegetais consistem predominantemente de ésteres formados a partir de ácidos graxos superiores e glicerol, frequentemente chamados triglicerídeos ou triacilgliceróis<sup>(103,105)</sup>.

Os ácidos graxos, que em geral possuem uma longa cadeia hidrocarbônica e um grupo carboxila terminal, contribuem com 94 a 96 % da massa total da molécula. A massa molecular da porção glicerídica (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>) de uma molécula de triacilglicerol é 41, mas a massa molecular combinada dos radicais de ácidos graxos (RCOO-) que compõe o resto da molécula deve variar entre valores 650 a 970. Por causa da sua preponderância em peso numa molécula de triacilglicerol e também por serem a parte reativa destas moléculas, os ácidos graxos têm uma grande influência no caráter dos triacilgliceróis. Consequentemente, a química dos óleos vegetais é em grande parte a química dos seus ácidos graxos constituintes. De fato, propriedades físicas e químicas e nutricionais de um óleo, como ponto de fusão, lipofilicidade e potencial de oxidação, são principalmente governados pela natureza e o comprimento da cadeia, grau de insaturação destes ácidos graxos e posições dos grupos acila presentes nas moléculas de triacilgliceróis<sup>(103,105,110)</sup>.

As cadeias de ácidos graxos mais comumente encontradas em óleos variam de 4 a 22 átomos de carbono. Tanto a composição química como o grau de insaturação desses compostos variam conforme a espécie oleaginosa. Os mais importantes, obtidos por hidrólise de gorduras e óleos, são os ácido láurico, palmítico e esteárico e os ácidos insaturados são os ácidos em C18 de 0 a 3 ligações duplas: oléico, linoléico e linolênico<sup>(59,105)</sup>.

### 3.1.3.2 COMPONENTES NÃO GLICERÍDICOS

Todas as gorduras contêm pequenas quantidades de componentes não glicerídicos. Nos óleos vegetais brutos, esses componentes não glicerídicos representam menos que 5 % da sua composição e nos óleos vegetais refinados, menos que 2 %<sup>(103)</sup>.

Nos óleos vegetais brutos alguns componentes são indesejáveis do ponto de vista de gosto, aparência etc. Sua composição vai variar de acordo com uma série de condições: origem do óleo, clima, solo, manuseio e classificação da semente, temperatura, filtragem, estocagem. Por isso, o óleo é processado, com o objetivo não só da remoção desses componentes, mas também da mudança de suas propriedades físicas convertendo-o a um óleo com largas faixas de fusão e melhorando sua resistência à oxidação<sup>(105,111,112)</sup>.

Além de partículas maiores como as de sementes, os principais componentes extraídos na fase do refino são:

- ácidos graxos livres, resultantes da decomposição dos glicerídeos
- fosfatídeos hidratados e não hidratados
- pigmentos, como carotenóides, clorofilas, terpenos e lecitinas
- materiais insaponificáveis: esteróis, hidrocarbonetos, tocoferóis
- acilgliceróis parciais
- açúcares livres e glicolipídeos
- lipídeos oxidados e peróxidos
- resíduos de pesticidas e de solventes (normalmente hexano)
- compostos contendo traços de elementos, por exemplo: ferro, cobre, cálcio, magnésio, enxofre<sup>(111)</sup>.

Particularmente, metais como cobre e ferro, quando presentes, atuam como catalisadores do processo de oxidação, diminuindo a estabilidade do óleo. Já os compostos orgânicos sulfurosos e também os que contêm fósforo e nitrogênio, podem reduzir a atividade catalítica do níquel usado nas etapas posteriores de hidrogenação. A presença de pigmentos no óleo produzem colorações não desejáveis e portanto devem ser eliminados para permitir a obtenção de um óleo de cor clara e melhor aceitação<sup>(112)</sup>.

Entretanto, nem todas as impurezas são indesejáveis. Os esteróis são incolores, relativamente termoestáveis e, para todos os efeitos, inertes. Portanto, passam despercebidos por todas as etapas de refino, a menos que estejam presentes em grandes quantidades. Os tocoferóis são antioxidantes de

ocorrência natural e portanto sua presença é altamente desejável em todos os óleos e gorduras<sup>(103)</sup>.

### 3.1.4 PROCESSAMENTO DE ÓLEOS VEGETAIS

As fases de processamento do óleo consistem em operações independentes e basicamente são definidas como:

- recebimento
- limpeza / secagem
- armazenamento de sementes
- extração
- refinação<sup>(112)</sup>

Após a pesagem e amostragem, na qual a amostra homogeneizada é avaliada, classificada e separada, os grãos são descarregados nas unidades de **recebimento** e então enviados às unidades de limpeza para a **estocagem**.

A operação de **limpeza** é de grande importância uma vez que são removidas impurezas como pedras, vagens, detritos, grãos chochos e enrugados e cascas de sementes. A presença de partículas estranhas em sementes inconvenientemente limpas causam aumento no conteúdo de ácidos graxos livres, na coloração verde e no índice de peróxido no óleo bruto. Quando a umidade é alta (maior que 12 %), as sementes são levadas a **secadores**, onde passam por um contra fluxo de ar quente e logo são resfriadas. Se houver descontrole na umidade do grão (acima de 16 %) pode ocorrer o aparecimento de grãos ardidos. Estes grãos contêm um óleo escuro no seu interior, com elevado índice de oxidação e acidez. Além disso, o teor de umidade acima do limite recomendado, combinado com alta temperatura e presença de oxigênio causam degradação microbiológica que afeta seriamente a qualidade do óleo, que se tornará impróprio para o consumo humano.

Para a **extração**, processo no qual os óleos das sementes ou frutos dos vegetais são obtidos, a semente deve previamente sofrer alguns tratamentos para que possa gerar produtos de boa qualidade. A matéria-prima oleaginosa deverá passar pela etapa da **laminação** (moagem), que consiste no rompimento

das células para permitir que a porção lipídica no interior das sementes oleaginosas, coloidalmente dispersa e circundada por paredes e membranas celulares, migre para a parte externa da semente. O material moído é em seguida submetido a um cozimento, para levar ao máximo de rendimento em óleo. O **cozimento** é a etapa mais importante de preparação da semente para a extração e consiste no aquecimento das lâminas e sementes quebradas, inativando a ação de enzimas que agem e deterioram a qualidade do óleo obtido. Para a extração propriamente dita, existem basicamente três alternativas comerciais: prensagem total, pré-prensagem (expeller) seguida de extração com solvente e extração direta com solvente. A escolha do método ideal de extração depende de vários fatores, entre eles, o conteúdo de óleo e características estruturais (como tamanho e dureza da semente). Em geral, a extração direta com solvente é utilizada com sementes contendo até 20 % de óleo. Acima desse nível, como é o caso da colza/canola, é usual realizar uma pré-prensagem, seguida da extração com solvente.

Após a extração, o óleo passa pelas etapas de refinação. A **refinação** é o termo genérico para as etapas de purificação dos óleos vegetais brutos, que têm por objetivo melhorar a qualidade dos óleos vegetais. Normalmente reduz-se ou elimina-se alguns componentes indesejáveis que afetam o aroma, o gosto, a cor ou outros caracteres especiais, sem afetar a concentração dos constituintes desejáveis como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados e sem perda significativa dos maiores componentes glicéricos. Os maiores componentes removidos durante o refino, além de todo o material estranho, são os ácidos graxos livres e fosfatídeos. A conveniência ou necessidade da refinação depende tanto do estudo do material como dos fins a que se destina<sup>(111,113)</sup>.

O procedimento clássico de refino, o refino químico, envolve operações que podem ser agrupadas em: degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização. A etapa da **degomagem** é um processo de tratamento cujo objetivo principal é a remoção de fosfatídeos, utilizando-se agente de floculação (água/ácido). Assim, cria-se condições para que haja a precipitação das gomas, arrastando consigo compostos metálicos e coloridos, por intermédio de centrifuga separadora.

A **neutralização** é uma das etapas de maior importância no processo, eliminando principalmente os ácidos graxos livres a níveis aceitáveis (que é o fator mais depreciativo para a qualidade de um óleo) e os fosfatídeos, com o

menor prejuízo possível dos tocoferóis (antioxidantes naturais) e do óleo neutro. A neutralização se fundamenta principalmente no acondicionamento do óleo para abastecimento da centrífuga separadora. O óleo passa por um pré-tratamento com ácido (para remoção dos fosfatídeos e metais pró-oxidantes) e em seguida, é colocado em contato com uma solução de NaOH para a neutralização dos ácidos graxos livres. Após a etapa de centrifugação, na qual a borra (sabão produzido no processo de neutralização) é separada, o óleo passa pela etapa da lavagem. Esta etapa objetiva o afastamento de resíduos de álcali e sabão, que podem provocar alteração no produto final.

A etapa seguinte, o **branqueamento** de óleos, consiste em modificar a coloração original dos óleos brutos, de maneira a torná-los aptos para certos fins industriais (como vernizes incolores e tintas claras) ou mais apetecíveis ao consumo na alimentação. O branqueamento pode ser obtido por diversos meios físicos e químicos, mas emprega-se exclusivamente o processo de adsorção, cujos materiais polares que estão dissolvidos ou em suspensão no óleo em baixas concentrações, são adsorvidos na superfície de partículas sólidas de um material adsorvente (carvão animal, terras descorantes). As principais substâncias observadas neste processo e que merecem atenção especial são: carotenos, clorofila, compostos/oxidação, sabões, ácidos, fósforo.

A **desodorização** constitui a última etapa no processamento de óleos comestíveis, sendo responsável pela remoção de compostos indesejáveis ainda presentes ou que foram introduzidos durante as outras etapas do processamento, que comunicam a matéria graxa algum gosto e odor indesejáveis como ácidos graxos livres (se o refino for incompleto), pigmentos termo-sensíveis, compostos sulfurosos de baixa volatilidade, vários aldeídos e cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e uma miscelânea de compostos derivados da decomposição de peróxidos. É uma etapa indispensável na produção da maior parte de óleos comestíveis, assim como para óleos destinados às indústrias de cosméticos e produtos farmacêuticos entre outros. Óleos não desodorizados deverão ter menos que 1 % de ácidos graxos livres. Ao final da desodorização não deverão ter mais que 0,05 %<sup>(105,111)</sup>.

O refino químico no entanto, para óleos com acidez elevada, não é econômico, devido às perdas causadas pela saponificação do óleo neutro e ao arraste mecânico do óleo neutro nas emulsões<sup>(114)</sup>. Um processo que tem ganhado grande importância como alternativa ao procedimento clássico de refino é o refino físico<sup>(112)</sup>. O refino físico deve remover os ácidos graxos livres,

assim como os insaponificáveis e outras impurezas, através de destilação por arraste a vapor, eliminando a produção de borra e diminuindo em muito a perda de óleo neutro. Além da destilação, é necessária geralmente uma etapa de degomagem e outra de pré-tratamento, para se eliminar impurezas que causam escurecimento ou depreciem a qualidade do óleo quando aquecido à temperatura da unidade de desodorização. Entretanto, este processo envolve alto custo energético operacional e elevado investimento em equipamento, além de ser inviável para determinados óleos.

A extração líquido-líquido é outra alternativa para a desacidificação de óleos brutos que apresentam alto conteúdo de ácidos graxos livres, que causam perda significativa de óleo neutro no refino químico. Além disso, tem se mostrado bastante útil para casos em que teores de fósforo são inadequados para o refino físico ou quando temperaturas requeridas para a evaporação dos ácidos graxos (220-270 °C) geram produtos de decomposição indesejáveis. No entanto, estudos ainda estão sendo feitos para o uso de modelos termodinâmicos para a predição do equilíbrio de fases para os sistemas de interesse para a escolha do solvente mais apropriado<sup>(113)</sup>.

### 3.1.5 CONTROLE DE QUALIDADE: ACIDEZ

Para obter óleos comestíveis de boa qualidade é preciso, durante seu processamento, tomar todos os cuidados para menor exposição do produto a condições que possam alterar sua composição. O controle químico na indústria se faz importante sob o aspecto básico de qualidade do produto final, enquadrado nas exigências de comercialização.

Especificações para os óleos e gorduras refinados e óleos brutos semi refinados normalmente englobam as seguintes análises: valor de iodo (grau de insaturação), n.º de saponificação (massa molecular média), conteúdo de umidade, razão cis-trans, valor de peróxido, n.º de ácido tiobarbitúrico, valor de anisidina e ácidos graxos livres<sup>(115)</sup>.

A proporção dos ácidos graxos livres é um dos melhores índices de qualidade para as gorduras naturais e, conforme a sua magnitude, tem um efeito bastante negativo<sup>(3,103,104,105,110,116)</sup>. Sendo um fator de degradação, se relaciona, portanto, aos produtos secundários produzidos pela indústria,

refletindo a extensão da hidrólise, que é relacionada com a quebra da molécula de triglicerídeo<sup>(103,117)</sup>.

Como é o fator que tem maior efeito no rendimento final do óleo refinado, sua determinação é de importância primordial. Para o controle do processo de refino, a porcentagem de ácidos graxos livres dá uma indicação instantânea da perda esperada sobre o refino do óleo e é um parâmetro facilmente entendido pelos operadores de processo para monitorar o progresso e eficiência da operação<sup>(103,111)</sup>.

Os ácidos graxos livres têm propriedades corantes ou apresentam aroma e sabor, entre outros fatores, que em concentrações adequadas, contribuem significativamente para a qualidade organoléptica dos óleos<sup>(104)</sup>. Mas às altas concentrações prejudicam a obtenção de um produto de boa qualidade tornando-o impróprio para a alimentação humana ou mesmo para fins carburantes<sup>(117)</sup>. Além disso, a pronunciada acidez dos óleos pode afetar etapas posteriores de processamento, catalisar reações intermoleculares dos glicerídeos e ocasionar desde formação de espuma e fumaça durante o processamento de óleo, até a precipitação de materiais sólidos durante operações de aquecimento<sup>(118,119)</sup>.

Os ácidos graxos livres refletem o grau de atividade das lipases que são responsáveis pelas mudanças que ocorrem na composição dos lipídeos. As atividades destas enzimas são altamente estimuladas quando sementes são estocadas sob condições desfavoráveis (alta temperatura e umidade) e, portanto, são indicadores de frescura, tempo de estocagem e estabilidade de muitos alimentos ricos em gordura. A presença de ácidos graxos livres tem um efeito considerável na estabilidade destes produtos, reduzindo o ponto de fumaça<sup>(104,105,119,120)</sup>.

A acidez depende da qualidade das matérias-primas, das operações de extração e refinação, inclusive no branqueamento com a decomposição dos sabões, assim como da conservação do produto final. Sua composição varia com o menor grau dependendo de como a hidrólise do glicerídeo ocorre. A deterioração de grãos e produtos moídos é acompanhada do aumento da acidez. Os ácidos formados incluem ácidos graxos livres, ácidos fosfatados e aminoácidos<sup>(105,121,122)</sup>.

A acidez orgânica dos óleos e gorduras pode ser expressa de várias formas. O **valor da acidez** ou acidez titulável corresponde à concentração total de ácidos tituláveis em uma amostra. O **conteúdo de ácido graxo livre** é

expresso como a porcentagem de massa de um ácido graxo especificado (ácido oléico, para a maioria dos óleos e gorduras), ou massa molecular média de um ácido graxo especificado apropriado para a natureza do óleo ou gordura analisada<sup>(103,105,111,122)</sup>.

Os números da composição básica para os óleos bruto e desodorizado, podem variar de acordo com uma série de condições ao longo do processamento. A Legislação Brasileira através do decreto-lei n.º 986 de 21/10/1969 regulamenta que os óleos vegetais comestíveis refinados a serem colocados no mercado, devem apresentar um teor de ácidos graxos livres inferior a 0,3 % (m/m), expresso como ácido oléico<sup>(113)</sup>. Para o óleo de oliva, um conteúdo de ácidos graxos livres de até 3 % é ainda aceitável para o consumo direto<sup>(117)</sup>. Este óleo apresenta alto conteúdo de ácido oléico (65-85 %), sendo uma das melhores fontes desse composto. Sua acidez também será refletida de acordo com o seu processo de extração. Normalmente, a pasta triturada é primeiro submetida à pressão leve por prensas mecânicas e hidráulicas, fornecendo um azeite de qualidade especial (azeite *extra virgem*), contendo no máximo 1 % de acidez. A seguir, é remoída e prensada fortemente, repetidas vezes, fornecendo o azeite *virgem*, cuja acidez varia de 1,5 a 4 %. O azeite refinado, resultante do tratamento feito à base de solventes nos resíduos das várias prensagens é denominado *puro*. O azeite de menor qualidade é o *fino*, cujo óleo é extraído de todo resíduo de polpa com auxílio de água quente. O óleo é separado das águas de vegetação por decantação ou por meio de centrífugas, filtração e, caso necessário, cuidadosamente refinado<sup>(123)</sup>.

Muitos métodos têm sido descritos para a determinação de ácidos graxos livres em óleos vegetais. Segundo métodos oficiais da American Oil Chemists' Society (AOCS)<sup>(124)</sup>, British Standard Methods<sup>(125)</sup> e The American Society for Testing and Materials (ASTM)<sup>(126)</sup>, através dos AOCS Ca5a-40 (reaprovado em 1993), BS 684, Seção 2.10, Método 1 e ASTM D1980 respectivamente, a amostra é dissolvida em um solvente previamente neutralizado e titulada à quente, sob agitação vigorosa, com solução alcalina padronizada (KOH alcoólico ou aquoso ou NaOH aquoso) na presença de fenolftaleína.

Originalmente etanol 95 % v/v era usado como solvente, embora a AOCS também se refira ao álcool isopropílico. A titulação com esses solventes no entanto, necessita ser realizada à temperatura de 60-65 °C ou até próximo ao ponto de ebulição do solvente, devido a pouca solubilidade de muitos óleos e gorduras em álcoois puros. No entanto, nessas condições, alguns

inconvenientes podem ocorrer, como a saponificação de mono e di-glicérides e a volatilização de alguns ácidos graxos<sup>(103,122)</sup>.

Em função disso, algumas metodologias padronizadas, como o método ISO729-1988 (659-1979)<sup>(127)</sup>, Dutch and German Standards Authorities<sup>(111)</sup> ou mesmo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)<sup>(128)</sup>, através da IUPAC 2.201, propõem o uso de uma mistura neutralizada de solventes (etanol 95 % v/v e éter dietílico, 1:1), que torna possível a realização da titulação à temperatura ambiente. O padrão ISO sugere ainda, para a temperatura ambiente, um número de composições alternativas como tolueno/etanol 95 % v/v (1:1), éter dietílico/2-propanol (1:1), tolueno/2-propanol (1:1). Entretanto, embora o dióxido de carbono seja menos solúvel no tolueno<sup>(129)</sup>, o uso deste solvente apresenta a desvantagem com relação ao descarte<sup>(130)</sup>. O método da Canadian Grain Commission<sup>(111)</sup> também propõe a titulação do óleo pela diluição com uma mistura de solventes (etanol:clorofórmio:2-propanol, razão 1:2:2), usando NaOH aquoso e álcali blue 6B, indicador este também citado pelo método ISO para óleos de colorações mais acentuadas.

Outros indicadores também foram propostos por alguns autores como Daood e Al-Ani<sup>(120)</sup> que determinaram acidez em amostras de óleo extraídos de sementes germinadas por titulação com solução alcalina usando  $\alpha$ -naftolftaleína como indicador.

Embora simples, os procedimentos de referência são trabalhosos, requerem tempo substancial, vidraria precisa para preparação dos reagentes e a detecção é muito subjetiva<sup>(129,131)</sup>. Muitos pesquisadores têm investigado a possibilidade de determinação do valor de ácido por métodos que não envolvam titulação.

Métodos cromatográficos incluindo cromatografia gasosa, líquida, gás-líquida, de alta eficiência e outros para a determinação de ácidos graxos são descritos por Berezin et al.<sup>(2)</sup>, Puchades et al.<sup>(104)</sup>, Daood & AL-Ani<sup>(120)</sup>, Ackman<sup>(132)</sup>, Ballesteros et al.<sup>(133)</sup>. A IUPAC desenvolveu um método e estudos de colaboração para determinação de triglicerídeos em óleos vegetais por cromatografia líquida. Três estudos de colaboradores foram feitos de 85 para 87. Refinamentos foram feitos no método e os resultados se apresentaram aceitáveis. O método foi aplicado para todos os óleos vegetais contendo somente triglicerídeos de cadeia longa de ácidos graxos, contendo ácido oléico como ácido graxo predominante.

Muitos métodos espectroscópicos também foram desenvolvidos para o conteúdo de ácido em óleos e gorduras. Levina e Litvinova<sup>(134)</sup> usaram espectroscopia infra vermelho. Como uma técnica rápida direta e indireta que foi aplicada com sucesso, o infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy) foi empregado para a determinação de ácidos graxos livres em óleos e gorduras por Ismail et al.<sup>(131)</sup> na faixa de 0,2-8 %. Esses métodos instrumentais têm a vantagem de minimizar os desvios ambientais associados ao uso de solventes orgânicos e reagentes perigosos. Um método similar, embora menos simples, foi estudado por Lanser et al.<sup>(135)</sup> que descrevem a determinação por FTIR do conteúdo de ácido graxo em óleo de soja.

Sadeghi-Jorabch et al.<sup>(136)</sup> usaram espectroscopia Raman com Transformada de Fourier para determinação de ácidos graxos em óleos, margarinas e manteigas. Recomendaram este método para a indústria alimentícia como sendo mais rápido para determinação de ácidos graxos em comparação com métodos convencionais.

Um método para a determinação de ácidos graxos em gorduras e óleos especificado como direto, rápido e não destrutivo, que não usa reagentes químicos é a espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS, Near Infrared Reflectance Spectroscopy) e foi descrito por Boot & Speek<sup>(129)</sup>, Sato et al.<sup>(137)</sup> e Frankel et al.<sup>(138)</sup>. A principal desvantagem deste método é que uma pequena variação de matriz pode causar erros consideráveis.

Liu et al.<sup>(139)</sup> sugeriram o uso de espectrometria de absorção atômica para determinação de ácidos graxos livres em amostras biológicas. O método é baseado na extração de ácido com ajuda de uma mistura de solventes na presença de íon cobre.

Esses métodos instrumentais, no entanto, tem alto custo, o que é uma grande desvantagem. Blumenthal et al.<sup>(140)</sup> sugeriram a determinação de ácidos graxos em óleos baseada na mudança de cor de um indicador em um gel líquido. Walde<sup>(141)</sup> trabalhou com método colorimétrico utilizando vermelho de fenol em isoctano para determinação de ácidos graxos livres em óleos.

Uma vez que determinações quantitativas de ácidos graxos livres são realizadas comumente na química dos lipídeos, é de interesse automatizá-las<sup>(142)</sup>. A necessidade de maior velocidade analítica e maior precisão e sensibilidade nas determinações tem levado ao desenvolvimento de procedimentos automáticos baseados em técnicas de injeção em fluxo. As

principais vantagens que podem ser citadas além da alta capacidade analítica, é a relativa simplicidade no manuseio que pode ser facilmente implantado como método de rotina. Comparando com métodos manuais, proporciona medidas com muito mais frequência e que necessitam de menor investimento de tempo do operador, enquanto melhora a reprodutibilidade.

Schooner et al.<sup>(143)</sup> estudaram métodos isotópicos, enzimáticos, imunológicos que utilizam injeção em fluxo. Outro método, baseado no uso de microrganismos imobilizados, que também envolve FIA foi descrito por Ukeda et al.<sup>(144)</sup>.

Métodos automatizados colorimétricos baseados na formação de complexos de cobre e ácidos graxos livres e extração orgânica, foram investigados por muitos autores. Puchades<sup>(104)</sup>, Zhi et al.<sup>(117)</sup> e Ekström<sup>(142)</sup> propuseram um método colorimétrico envolvendo injeção em fluxo para determinação de ácidos graxos livres em óleos vegetais, cujas metodologias basearam nas de Lowry & Tinsley<sup>(145)</sup>, Bains et al.<sup>(146)</sup> e Baker<sup>(147)</sup>.

Outros métodos colorimétricos automáticos que implementam o método padrão AOCS são descritos por Linares et al.<sup>(3)</sup> e Cheney<sup>(116)</sup>, sendo que este último propõe um método baseado na análise por injeção em fluxo usando os mesmos reagentes e diluentes do método padrão da ISO e IUPAC.

## 3.2 EXPERIMENTAL

---

### 3.2.1 MÉTODO CONVENCIONAL

A quantidade de ácidos graxos foi determinada segundo procedimento adotado por Monnerat<sup>(113)</sup>, que se baseia no método oficial da AOCS Ca. 5a-40<sup>(124)</sup>, no qual o ponto final foi determinado por titulação potenciométrica. O método potenciométrico é baseado em medidas do potencial de um sistema eletródico sensível à concentração do próton solvatado no solvente envolvido.

#### 3.2.1.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram empregados etanol 95 % grau PA (Merck) para a diluição das amostras, solução de hidróxido de sódio 0,02 mol L<sup>-1</sup> diluída a partir de uma solução padronizada 0,01 mol L<sup>-1</sup> com biftalato de potássio e fenolftaleína aquosa 0,1 %.

#### 3.2.1.2 INSTRUMENTAÇÃO

Potenciômetro Cole Parmer, modelo 5968-50 equipado com eletrodo de vidro e um termômetro (-30/+50 °C) Inconterm, precisão 0,1 °C. Como a grande aplicação da titulação em meio não-aquoso está na volumetria de neutralização, o eletrodo indicador utilizado foi o eletrodo de vidro, que responde de forma satisfatória em praticamente todos os solventes orgânicos. Para a adição da solução alcalina, foi usada microbureta automática Metrohm, modelo Dosimat 715 ( $\pm 0,001$  mL). O aquecimento e a agitação foram mantidos com auxílio de uma agitador magnético com aquecimento, marca Fisatom, modelo 152 A.

### 3.2.1.3 PROCEDIMENTO

1,0000 g de amostra é dissolvida em 100 mL de álcool etílico 95 % previamente neutralizado e titulado à quente com agitação vigorosa, com solução padronizada de hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador. O valor do potencial foi anotado a cada adição de solução alcalina, até a viragem do indicador. A determinação do ponto de equivalência das titulações potenciométricas foi obtida por métodos gráficos através de curvas de 1ª e 2ª derivada a partir da curva da força eletromotriz (em mV) em função do volume de solução titulante. Essas curvas apresentam um ponto de inflexão que corresponde ao ponto de viragem da titulação ou ponto final. Com isso, o ponto final pode ser determinado com grande precisão, já que corresponde ao zero entre o ponto máximo (positivo) e o mínimo (negativo) da curva que representa a segunda derivada da força eletromotriz, em relação ao volume do reagente titulante<sup>(113)</sup>. A partir do volume de titulante básico obtido no ponto final da titulação, a porcentagem de ácidos graxos livres foi calculada. Os resultados são dados em termos de ácido oléico, já que este se destaca como um dos ácidos mais amplamente distribuídos na natureza<sup>(110)</sup>.

## 3.2.2 FIA

### 3.2.2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Como fonte de triacilgliceróis, foi utilizado primeiramente óleo de canola comercial refinado, e, numa segunda etapa, tricaprilina ( $C_{27}H_{50}O_6$ ) de pureza 97-98 % da Sigma Chemical. Para a preparação dos padrões para a determinação da curva de calibração, foram utilizados ácidos oléicos ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) da Sigma Chemical (99 %) e da Riedel-deHaën. Como fluido transportador e como solvente para a preparação de todas as soluções, etanol PA absoluto (Synth) de mesmo lote. Para a preparação das amostras, foi utilizado juntamente com o etanol absoluto, éter etílico PA anidro (Nuclear) na proporção 50 % v/v. Assim como no método proposto para determinação de acidez em etanol, a solução de hidróxido de sódio, utilizada como reagente titulante na concentração aproximada de  $0,02 \text{ mol kg}^{-1}$ , foi preparada na hora para evitar interferência do

CO<sub>2</sub> atmosférico. Isso porque mudanças na concentração da solução alcalina da mistura resulta em diferentes larguras de sinal. A utilização de hidróxido de sódio, em substituição ao hidróxido de potássio, como a AOCS e British Standards especifica, foi devido ao menor custo. Como solução indicadora, foi empregado alaranjado de acridina em etanol absoluto  $3,7 \times 10^{-5} \text{ mol kg}^{-1}$ . As soluções padrão para a construção da curva de calibração foram preparadas na faixa de 0 a 7,0 % para os óleos brutos e 0 a 0,25 % para as amostras de óleos refinados.

Para a determinação de acidez, 3,5000 g de amostra foram dissolvidas em 20,0000 g de solvente etanol/éter, submetidas ao rápido ultra-som e medidas na hora.

### 3.2.2.2 SISTEMA FIA

A partir do mesmo sistema utilizado para a determinação de acidez em etanol (Seção 2.2.2), a amostra de óleo, previamente diluída em etanol/éter 1:1, é continuamente bombeada (vazão  $1,55 \text{ mL min}^{-1}$ , medida na saída da bomba) e confluída com a linha do indicador (AO em etanol absoluto, vazão  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ ) e com o fluido transportador (etanol absoluto, vazão  $1,55 \text{ mL min}^{-1}$ ), onde a solução alcalina (NaOH  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  em etanol) é injetada. Em seguida, são bombeadas para uma câmara de mistura, passando então pela detecção fotométrica. O decréscimo na absorvância, devido às interconversões do indicador, monitorado no comprimento de onda do LED azul ( $\lambda_{\text{máx.}} = 480 \text{ nm}$ ), produz o sinal analítico. A sensibilidade do registrador (ECB, modelo RB 201) foi de 500 mV e a velocidade do papel  $5 \text{ cm h}^{-1}$ . Como o fluido transportador era colorido, a linha da base para os sinais fotométricos foi estabelecida previamente com solução de etanol/éter etílico.

### 3.2.3 AMOSTRAS

Foram analisadas três amostras de óleos brutos de soja, milho e girassol, bem como dez amostras de marcas e procedências diferentes de óleos refinados de canola, milho, soja, girassol, oliva e uma amostra composta de milho e oliva.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 3.3.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O sistema de Análise por Injeção em Fluxo, com detecção fotométrica e AO como indicador, foi avaliado para amostras de óleos vegetais. Com algumas modificações, o sistema, para estas amostras, se baseou no procedimento automatizado de Linares et al.<sup>(3)</sup>, que foi proposto a partir dos métodos de referência da ISO<sup>(124)</sup> e da IUPAC<sup>(128)</sup>.

Uma vez que o etanol, quando solvente único, não é miscível em óleos vegetais à temperatura ambiente, as amostras foram previamente dissolvidas em uma mistura neutralizada de éter etílico e etanol. Devido à solubilidade mútua do sistema ser diretamente proporcional à temperatura, a titulação convencional necessita ser efetuada à quente, próximo do ponto de ebulição do solvente, com agitação vigorosa. Nesta circunstância, o ponto final pode ser influenciado pela absorção de CO<sub>2</sub> atmosférico, além da possibilidade de saponificação, particularmente de mono e diglicerídeos, e a volatilização de ácidos graxos. O sistema pode requerer um reaquecimento da solução, levando a um primeiro ponto final aparente<sup>(103,130)</sup>.

Em geral, a solubilidade de gorduras e derivados graxos em solventes orgânicos é proporcional ao número de ligações duplas e inversamente proporcional ao tamanho da cadeia<sup>(103)</sup>. Apesar de várias composições de solventes para a solubilidade mútua em óleo vegetal terem sido propostas (Seção 3.1.5), a utilização da mistura éter/etanol no sistema torna-se mais vantajosa devido a disponibilidade e custo. Além da análise poder ser realizada à temperatura ambiente, a mistura proporciona alta solubilidade, evitando assim, distorções no sinal devido à alta viscosidade do óleo.

Outros solventes de cadeia curta, propanol, isopropanol e 1-butanol, também foram testados, usando a mesma concentração de ácido oléico. Os sinais obtidos se apresentaram satisfatórios, mas a utilização destes não é vantajosa devido ao custo.

Uma vez que a fonte de triacilgliceróis para a determinação da curva de calibração deveria estar isenta o máximo possível de ácidos, inicialmente foi utilizado óleo de canola refinado comestível comercial. De acordo com os dados coletados e análises feitas, o óleo de canola, devido ao alto teor de trioleína, linodioleína, oleildilinoleína, tem um comportamento bastante semelhante a esses reagentes puros, contendo baixo teor de gorduras saturadas e apresenta baixo custo<sup>(113)</sup>. Foi constatado, no entanto, que a acidez do óleo de canola puro encontrada é mais alta em relação aos óleos refinados analisados (acidez residual de 0,06 % em termos de ácido oléico<sup>(113)</sup>). Utilizou-se então, numa segunda etapa, tricaprilina com pureza mínima de 97-98 %, da marca Sigma Chemical como fonte de triacilgliceróis e os resultados apresentaram-se satisfatórios. Os ácidos graxos utilizados foram o ácido oléico comercial da marca Riedel-deHaën, que na verdade é uma mistura de ácidos graxos rica em ácido oléico, e o ácido oléico da marca Sigma, com pureza mínima de 99 %. O ácido oléico com 99 % de pureza (Sigma) tem um custo de importação igual a U\$ 3,77/g e o trioleína da mesma marca e grau de pureza, igual a U\$ 6,16/g<sup>(113)</sup>.

Uma série de experimentos foi feita com amostras de óleo de acidez conhecida para estabelecer as condições ótimas usando método univariado (concentração de NaOH e de AO, relação amostra:solvente, vazão, teste de limpeza e outros).

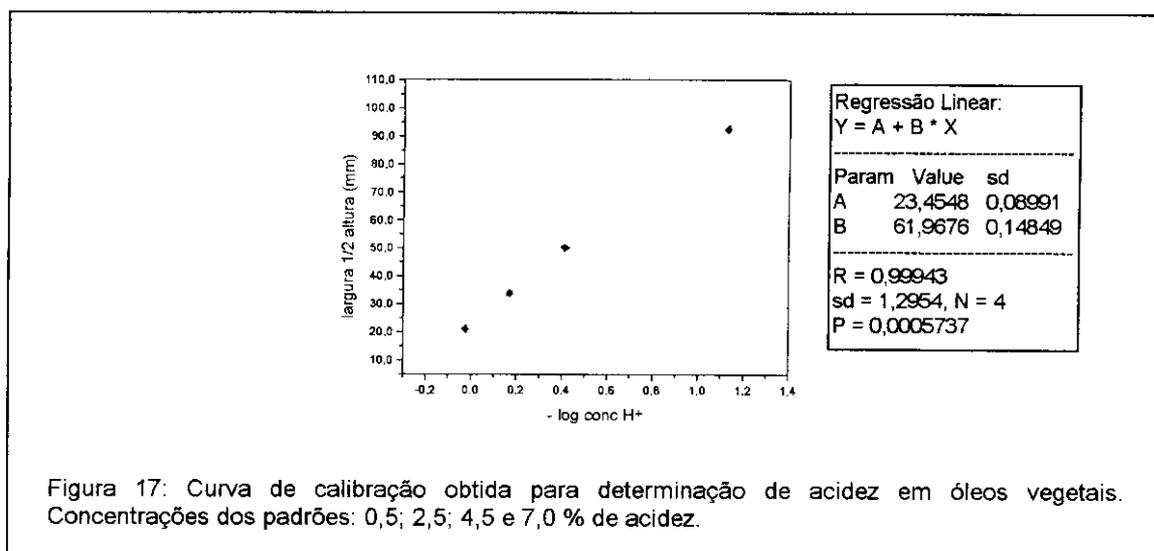
A partir do sistema proposto anteriormente para a determinação de acidez em etanol e do procedimento de Linares et al., as concentrações de solução alcalina e indicador foram adequadas. As vazões ( $1,6 \text{ mL min}^{-1}$  para a amostra e fluido transportador e  $0,9 \text{ mL min}^{-1}$  para o indicador) também foram escolhidas como um compromisso entre sensibilidade, frequência da amostragem e limpeza do sistema. A frequência de amostragem obtida foi de 20 amostras  $\text{h}^{-1}$ . Nestas condições, testes quanto à limpeza do sistema foram feitos para padrões de alta e baixa concentração, que foram injetados alternadamente. Nenhum efeito significativo foi observado.

Para a relação amostra:solvente (etanol/éter) foram realizados testes em diferentes proporções a fim de se obter a maior proporção possível de amostra sem interferência no sinal. A razão de diluição mínima da amostra no diluente obtida foi de 1:5,4.

### 3.3.2 DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM AMOSTRAS DE ÓLEOS

#### 3.3.2.1 ACIDEZ EM ÓLEOS VEGETAIS BRUTOS E DE OLIVA

O método FIA desenvolvido foi aplicado para determinação de ácidos graxos livres em várias amostras de óleos vegetais: amostras de óleo bruto de soja, girassol e azeite, bem como para os testes de recuperação. Para esta determinação, uma curva analítica linear (largura à 1/2 altura em função da concentração de ácidos graxos livres), com coeficiente de correlação de 0,999, foi obtida para concentrações de ácido oléico na faixa entre 0,5 e 7,0 %, como pode ser observada na Figura 17.



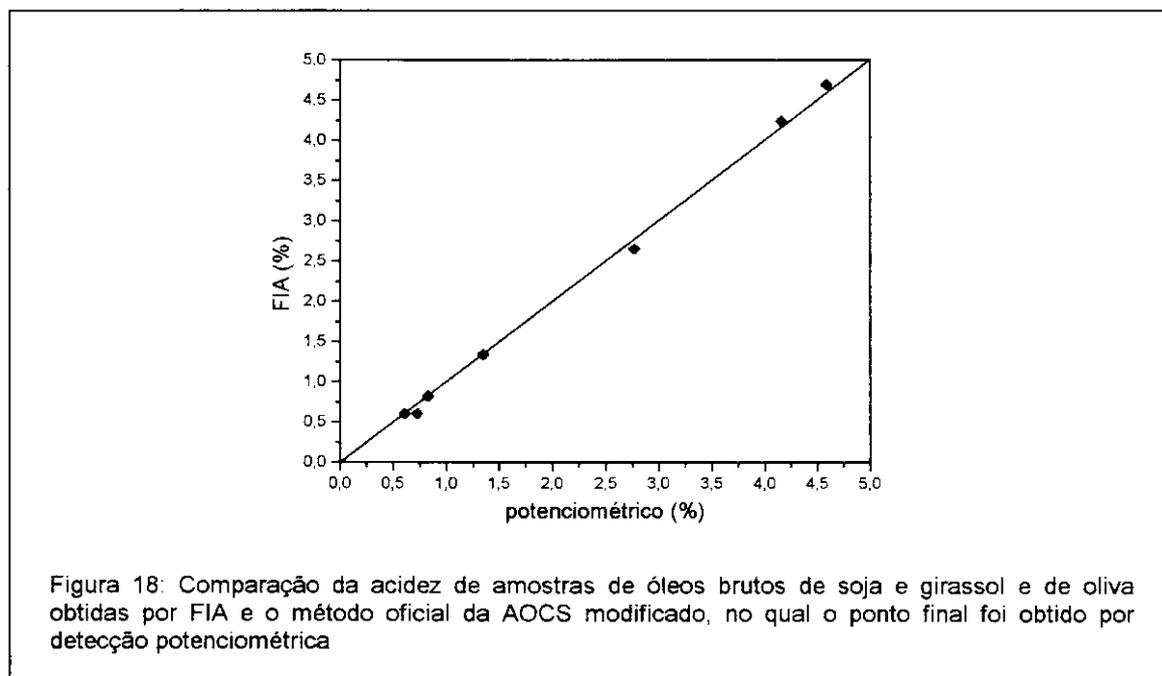
Os resultados de acidez, obtidos pela técnica de injeção em fluxo para as amostras citadas, foram comparados aos obtidos pelo método oficial da AOCS Ca 5a-40 modificado, no qual o ponto final da titulação foi determinado por titulação potenciométrica e estão indicados na Tabela 4. O erro relativo médio obtido foi de 1,9 %.

Tabela 4: Resultados de acidez obtidos para amostras de óleos refinados de oliva, soja e girassol bruto e testes de recuperação. Comparação dos métodos potenciométrico e FIA. M. DIFERENÇAS = média das diferenças absolutas entre duplicatas. Desvio para FIA de injeções em triplicata.

AMOSTRA	POTENCIOMÉTRICO (%)	FIA (%)	ERRO RELATIVO (%)
OLIVA (B)	0,83	0,82 ± 0,01	- 1,2
SOJA BRUTO	0,61	0,60 ± 0,02	- 1,6
GIRASSOL BRUTO	1,35	1,34 ± 0,04	- 0,7
OLIVA (B) 2%	2,77	2,65 ± 0,06	- 4,0
GIRASSOL BRUTO 3%	4,16	4,24 ± 0,08	+ 1,9
OLIVA (B) 4%	4,59	4,69 ± 0,09	+ 2,2
<b>M. DIFERENÇAS</b>	0,04		
		<b>ERRO RELATIVO MÉDIO</b>	1,9

A determinação de acidez pelo método convencional foi realizada com detecção potenciométrica, pelo fato da avaliação do ponto final pela titulação clássica com uso de indicadores ser muita subjetiva e se agravar à medida que as amostras se tornam coloridas. Apesar das gorduras puras e ácidos graxos serem incolores e essencialmente transparentes à luz visível, óleos frequentemente contêm pigmentos que absorvem luz. A maioria dos óleos têm cor específica devido ao tipo e quantidade de pigmentos naturais presentes como clorofila. Os óleos brutos são mais escuros em relação aos refinados uma vez que a maioria destes pigmentos são removidos por refino e processo de branqueamento<sup>(105)</sup>.

A comparação entre os valores obtidos por FIA e o método potenciométrico, através do gráfico representado na Figura 18, mostrou que os resultados apresentam alto coeficiente de correlação. O coeficiente angular foi 1,03 e o coeficiente de correlação 0,999, significando uma boa concordância entre os métodos.



Pequenas diferenças obtidas para os óleos brutos podem ser atribuídas à impurezas particuladas e fosfatídeos que tendem a ficar no fundo dos recipientes, levando à formação de sedimentos com altos níveis de ácidos graxos livres. Partículas de sementes e fragmentos celulares contêm enzimas que quebram as moléculas de gordura, que na presença de traços de umidade podem levar à hidrólise gradual de glicerídeos e corresponder a um aumento em ácidos graxos livres<sup>(111)</sup>.

O teste de recuperação é uma técnica bastante usada para verificar o efeito de matriz da amostra sobre resultados analíticos. As amostras de óleos, apesar de serem estáveis, dispensando até o envernizamento interno da embalagem, apresentam aditivos: aromatizantes, corantes e conservantes, cujas quantidades são autorizadas segundo os decretos do Ministério da Saúde, n.º 55871, de 26/03/65 e n.º 63526, de 04/04/68, que podem influenciar na análise<sup>(106)</sup>. Com isso, através deste teste, cada amostra é analisada antes e após as adições de solução padrão, o que corresponde a fazer uma calibração sobre a matriz. Com isso, pode-se minimizar interferências que vêm dos próprios analitos, cuja natureza normalmente é complexa e heterogênea, obtendo-se resultados mais precisos e exatos do que aqueles obtidos por procedimentos manuais. Os resultados obtidos pelo teste de recuperação são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Teste de recuperação para amostras de óleos de oliva e girassol bruto. Desvio de injeções em triplicata

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (%)				ERRO RELATIVO (%)
	INICIAL (FIA)	ADICIONADA	ESPERADA	OBTIDA (FIA)	
OLIVA (B)	0,82 ± 0,01	1,94	2,76	2,65 ± 0,06	4,0
GIRASSOL BRUTO	1,34 ± 0,04	2,81	4,15	4,24 ± 0,08	2,2
OLIVA (B)	0,82 ± 0,01	3,76	4,58	4,69 ± 0,09	2,4
<b>ERRO RELATIVO MÉDIO</b>					<b>2,9</b>

Os resultados obtidos pelo teste de recuperação, indicando erro médio de 2,9 %, comprovaram a viabilidade do método para determinação de acidez em óleos vegetais.

### 3.3.2.2 ACIDEZ EM ÓLEOS VEGETAIS REFINADOS

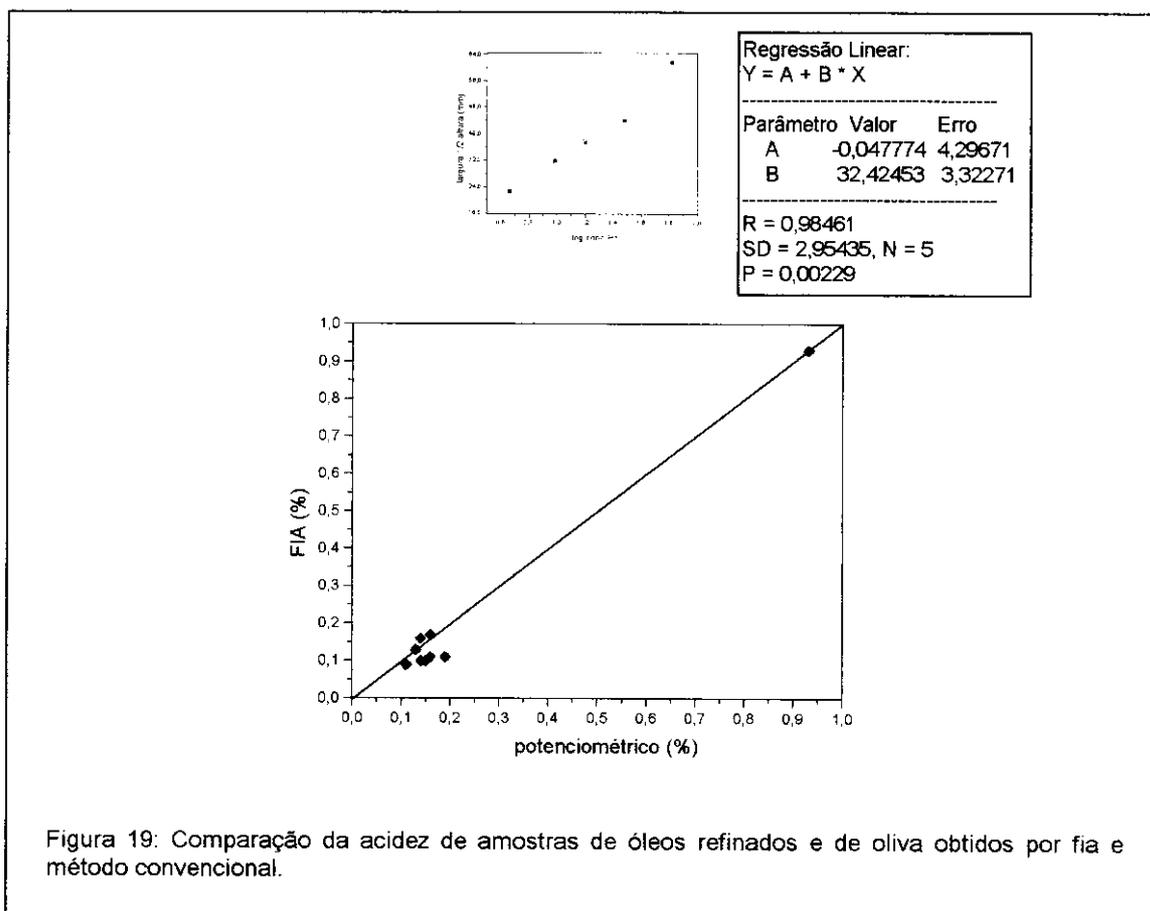
O método proposto também foi aplicado para amostras de óleos vegetais refinados, cuja concentração é praticamente dez vezes menor. A concentração dos padrões para a determinação da curva de calibração variou de 0 a 1,5 %. Diferentemente do procedimento de Linares et al.<sup>(3)</sup>, no qual os dados foram obtidos a partir da altura do pico para a faixa entre 0,15 e 0,81 %, os dados para o sistema proposto foram obtidos a partir da largura do sinal.

Na Tabela 6, são apresentados os resultados obtidos de acidez para as amostras de óleos vegetais refinados e para uma amostra de óleo de oliva, cuja acidez é mais alta, como parâmetro de comparação.

Tabela 6: Resultados de acidez obtidos para amostras de óleos refinados. Comparação dos métodos potenciométrico e FIA. M. DIFERENÇAS = média das diferenças absolutas entre duplicatas.

AMOSTRA	POTENCIOMÉTRICO (%)	FIA (%)	ERRO RELATIVO(%)
CANOLA	0,11	0,09	- 18,1
MILHO (M)	0,15	0,10	- 33,3
SOJA (L)	0,19	0,11	- 42,1
SOJA (S)	0,16	0,11	- 31,3
MILHO/OLIVA	0,16	0,17	+ 6,25
MILHO (C)	0,14	0,10	- 28,6
GIRASSOL (C)	0,14	0,16	+ 14,29
GIRASSOL (V)	0,13	0,13	0,0
OLIVA (B)	0,93	0,93	0,0
<b>M. DIFERENÇAS</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	
<b>ERRO RELATIVO MÉDIO</b>			<b>19,3</b>

Os resultados gráficos obtidos por ambos os métodos para a determinação de acidez é mostrado na Figura 19:



Fazendo-se uma comparação entre o método proposto e o método de titulação manual para a acidez obtida de amostras de óleos refinados de canola, milho, soja, girassol e oliva, pôde-se observar que os resultados obtidos apresentaram um erro relativo médio de 19,3 %. Verificou-se, através do gráfico, a validade do método, uma vez que o erro relativo encontrado para a concentração de óleo de oliva foi insignificante. Para os valores de óleos refinados, no entanto, cujas concentrações são muito baixas, os desvios encontrados são muito altos. Levando em conta que a curva de calibração deveria ser melhor adequada para a faixa de menor concentração, foi realizado outro teste com padrões na faixa de 0 a 0,25 %. Resultados obtidos para a acidez das amostras de óleos refinados de canola, milho, girassol e soja com a curva de calibração mais adequada, apresentaram erro relativo médio 20,4 %, como pode ser observado na Tabela 7 e na Figura 20.

Tabela 7: Resultados de acidez obtidos para amostras de óleos refinados de milho, soja e girassol refinado e testes de recuperação. Comparação dos métodos potenciométrico e FIA. M. DIFERENÇAS = média das diferenças absolutas entre duplicatas

AMOSTRA	POTENCIOMÉTRICO (%)	FIA (%)	ERRO RELATIVO (%)
MILHO (M)	0,10	0,08	- 20,0
MILHO (C)	0,16	0,10	- 37,5
MILHO/SOJA	0,16	0,16	0,0
SOJA (L)	0,16	0,11	- 31,3
SOJA (S)	0,16	0,11	- 31,3
GIRASSOL (C)	0,16	0,14	- 12,5
GIRASSOL (V)	0,13	0,11	- 15,4
SOJA (S) H+	0,27	0,21	- 21,0
GIRASSOL (C) H+	0,27	0,23	- 14,8
<b>M. DIFERENÇAS</b>	<b>0,003</b>	<b>0,03</b>	
<b>ERRO RELATIVO MÉDIO</b>			<b>20,4</b>

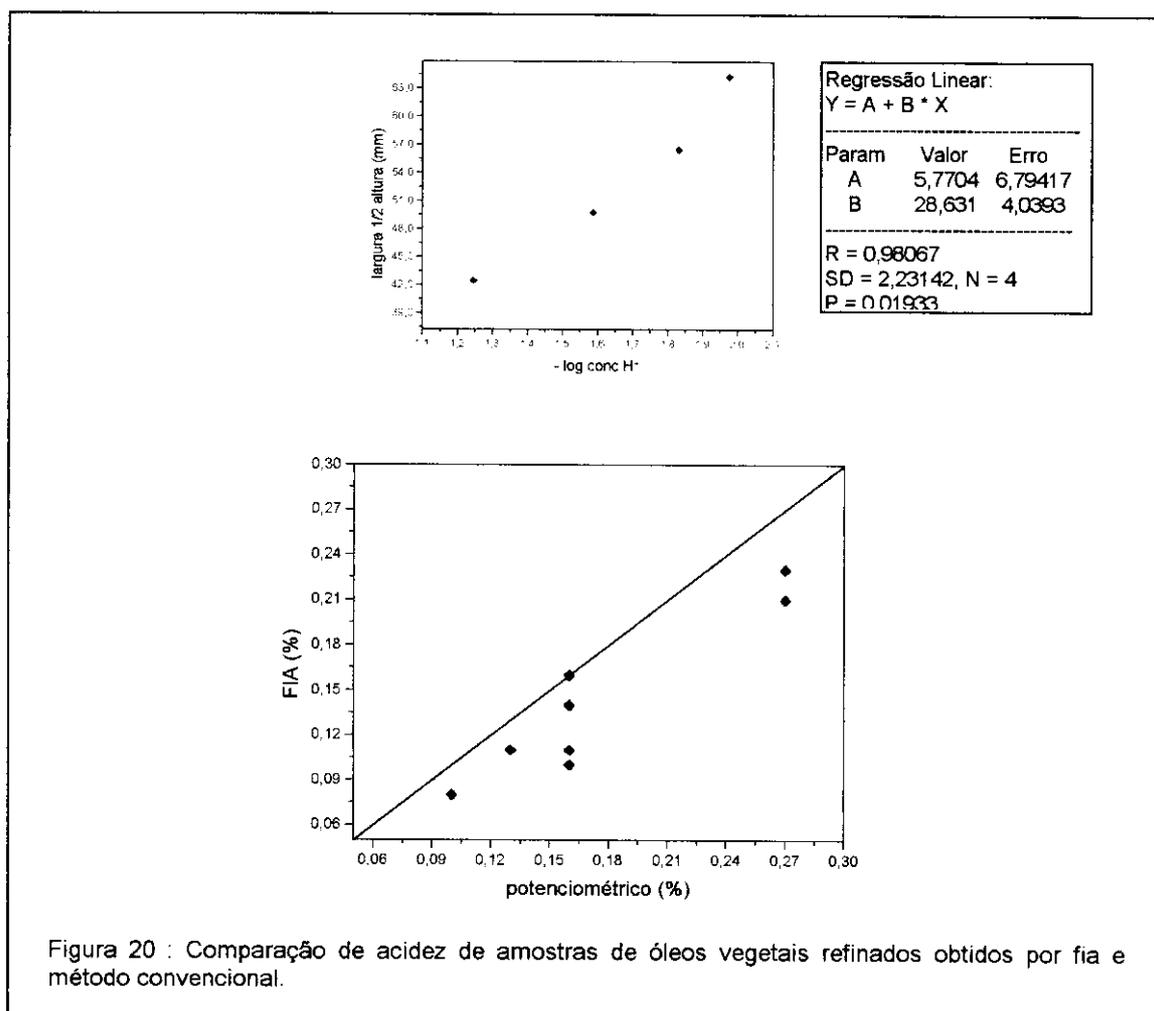


Figura 20 : Comparação de acidez de amostras de óleos vegetais refinados obtidos por fia e método convencional.

Os valores de exatidão podem ser encarados como uma somatória das imprecisões dos procedimentos, reagentes etc. Mesmo em laboratórios que utilizem rigorosamente a mesma técnica de análise, existem erros de operação, que são provenientes em parte da técnica analítica adotada e, em parte, decorrente da própria metodologia atualmente normatizada.

Kershaw<sup>(130)</sup>, em estudos para determinação do conteúdo de ácidos graxos em óleos, verificou que anomalias extremas dos resultados de análises ocorrem muito frequentemente. Para amostras de óleo de canola, por exemplo, foram analisadas 16 amostras pelos métodos BS 684 e ISO 660, e foram encontrados resultados na faixa entre 0,063-0,086, indicando erro relativo de 26,74 %. Portanto, pode-se observar que mesmo usando a mesma técnica de análise, podem ser verificados erros de operação.

A sensibilidade do método proposto empregado não se mostrou tão boa em relação ao método recomendado, mas o procedimento de referência apresenta ainda muitas fontes de erros que podem levar a resultados dúbios. Estudos mais detalhados ainda são necessários no sistema FIA e devem ser realizados para a determinação de acidez a concentrações mais baixas, mais especificamente para óleos refinados. Variáveis como solvente utilizado, triglicerídeo isento de ácido, desgaste dos tubos de bombeamento e metodologia convencional de comparação necessitam ser melhor investigados.

O tubo de bombeamento comum, Tygon, não pôde ser usado no sistema, uma vez que solventes orgânicos causam sua deterioração pela deformação, alterando a vazão. Foram, então, testados tubos de diferentes materiais. Segundo Ruzicka<sup>(5)</sup>, há vários materiais de tubos de bombas resistentes a solventes: Acidflex ou Viton, ou os tubos recentemente introduzidos de Marprene. Ekstrom<sup>(144)</sup>, em seu trabalho que determina ácidos graxos livres por método automatizado, também teve dificuldades quanto ao uso do tubo empregado. Utilizou tubos Acidflex (Technicon) para tolueno e constatou serem muito sensíveis a deformações, sendo necessárias padronizações a cada 20 injeções. Apesar de serem usados para ácidos fortes e alguns solventes orgânicos clorados, por exemplo, clorofórmio, estes tubos são relativamente caros e têm tempo de vida mais curtos que outros tubos<sup>(39)</sup>. Linares et al.<sup>(3)</sup> fizeram estudos com misturas etanol/éter e verificaram que Solvaflex (Technicon) foi o único material que não deteriorou depois de bombeamento por 6-8 dias de trabalho. Tubos Solvaflex, do inglês "solvent flexible", são de cor amarelo, apropriados para soluções alcoólicas e para alguns alcanos, por

exemplo, isooctano<sup>(39)</sup>. Esse material, porém, não era disponível. Considerando que o tubo de Viton é apropriado para etanol, foram feitos testes com este tipo de material. Verificou-se que o tubo de Viton não é muito compatível para éter, que limita sua meia vida e provoca ruptura após algumas horas de uso. Segundo dados da Cole Parmer<sup>(100)</sup>, ainda não há um tubo que não sofra efeito ao uso do éter.

Levando em consideração que o éter está na razão 50 % em solução, foram feitos testes também com tubo de silicone ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiO). Karlberg<sup>(39)</sup> verificou que tubos deste material apresentaram em muitos casos um excelente desempenho em bombas peristálticas. Testes de vazão foram realizados e não foram observadas alterações significativas que pudessem influenciar ao longo da análise, possibilitando seu uso na determinação de acidez em óleos (Tabela 8).

Tabela 8: Variações de vazão durante 2h30

TEMPO (seg.)	VAZÃO (mL min <sup>-1</sup> )	MÉDIA
0	1,87	
35	1,85	
60	1,87	1,84 ± 0,03
120	1,81	
145	1,82	

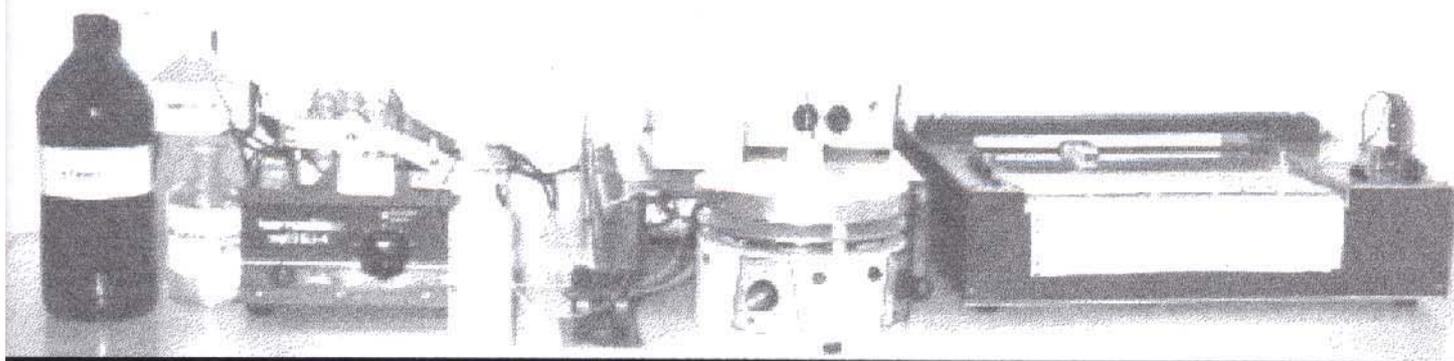
O sistema FIA, utilizando AO como indicador, mostrou-se particularmente importante para a determinação de acidez em óleos vegetais. Apresenta muitas vantagens, sendo um procedimento simples e reprodutível de larga faixa de determinação, alta sensibilidade, grande precisão, requerendo a mínima intervenção do operador. Com relação ao procedimento manual, o sistema FIA é mais rápido (20 versus 7-8 amostras/hora no método manual), utiliza menores quantidades de reagentes, e, devido a detecção fotométrica, a mudança de cor é mais perceptível contrastando com a mudança lenta e de difícil visualização dos métodos manuais. Pelo fato do módulo da análise ser um sistema fechado, o emprego de sistema FIA se torna mais vantajoso, implicando em mínimo contato do operador com os solventes orgânicos, principalmente o éter etílico que apresenta alta volatilidade. A pressão de vapor para o éter é muito baixa, e, portanto, o limite de segurança com FIA aumenta.

Além da acidez ser um parâmetro de qualidade muito importante, a matriz é de especial interesse, devido a sua imiscibilidade em água, que impede seu uso em aplicações de caracterizações tradicionais, normalmente realizadas em soluções aquosas.

O método descrito oferece um procedimento simples, rápido e reprodutível para a determinação de ácidos graxos livres como indicador de qualidade de óleos vegetais.

Os resultados obtidos por FIA para amostras de óleo bruto de soja, girassol e azeite, bem como os obtidos de testes de recuperação quando comparados ao método oficial da AOCS modificado, na qual o ponto final da titulação foi determinado por titulação potenciométrica, apresentaram-se satisfatórios com erro relativo médio de 1,9 %, e coeficiente angular de 1,03 num gráfico que relaciona os métodos. Esse resultados, portanto, evidenciaram a viabilidade da análise por injeção em fluxo na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleos vegetais brutos. A sensibilidade do método, no entanto, não se mostrou tão boa para amostras de óleos refinados com erro relativo médio de 20,4% e seriam necessários estudos mais detalhados. A velocidade para determinação de acidez das amostras pelo método proposto é de 20 amostras hora<sup>-1</sup>.

É possível afirmar que o método em estudo, apresentando as facilidades já comentadas, pode ser uma boa alternativa em detrimento dos processos que demandam mais tempo como a titulação. Acredita-se que o aprimoramento da metodologia de análise por injeção em fluxo seja de grande interesse em processos industriais contínuos de refino de óleos vegetais.



## Conclusões

# 4 CONCLUSÕES

---

A titulação em FIA desenvolvida para meios não aquosos, bem como o uso de alaranjado de acridina (AO) como indicador, com suas propriedades diferenciadas já citadas, se mostraram particularmente importantes para a determinação de acidez em etanol e óleos vegetais.

O AO, proposto pela primeira vez como indicador ácido-base, em substituição ao  $\alpha$ -naftolftaleína (recomendado para a determinação de acidez de etanol) e fenolftaleína (recomendado para a determinação de acidez de óleos vegetais), se mostrou útil para uma determinação quantitativa do conteúdo de ácido. Considerando a imiscibilidade do óleo em água e que usando-se o  $\alpha$ -naftolftaleína as amostras necessitam de diluição prévia da amostra a 50 % v/v com água, a proposta do AO é importante para matrizes isentas de água, já que apresenta melhores resultados em etanol puro.

A precisão do método é boa e os resultados são mais confiáveis se levarmos em conta a reduzida faixa de concentração de acidez em etanol e óleos vegetais das amostras analisadas. Os resultados obtidos apresentaram-se bastante satisfatórios na faixa de concentração de 3 a  $8 \times 10^{-4}$  mol kg<sup>-1</sup>, para amostras de etanol e 0,5 a 7 % para amostras de óleos vegetais, sendo o erro relativo médio 3,0 % para amostras de álcoois comerciais e 1,9 % para amostras de óleos brutos de soja, girassol e oliva.

Uma das principais vantagens do método está na alta capacidade analítica em contraposição aos procedimentos padrões que são mais trabalhosos e que envolvem maior consumo de tempo. A velocidade para determinação de acidez das amostras pelos métodos propostos é, em média, de 25 amostras hora<sup>-1</sup>. Além disso, a relativa simplicidade no manuseio permite que este seja facilmente implantado como método de rotina.

Geralmente, o custo de sistemas de análise é determinado pelo detector. O fotômetro construído é simples e mostrou boa sensibilidade. Em conexão ao sistema FIA, proporciona baixo custo, por ser construído de componentes disponíveis comercialmente, com um custo aproximado menor que US\$ 100,00. Ressalta-se aqui que fotômetros contendo LED azul como fonte luminosa não são comumente encontrados. Seu uso também poderá ser ampliado para outras determinações fotométricas em fluxo, principalmente se considerarmos que o

fotômetro permite trabalhar em três regiões de comprimento de onda sem modificações no instrumento.

Diferente do método clássico para FIA, o reagente é injetado e a amostra permanece em linha, podendo o sistema até ser implementado nas próprias tubulações da produção, fornecendo dados mais imediatos e exatos de controle de qualidade, eliminando erros inerentes à etapa de amostragem e preparação de amostras.

Análise por FIA em solventes não-aquosos tem sido pouco estudada. Particularmente para a determinação de acidez utilizando etanol como amostra e como fluido transportador, aplicações de FIA têm sido pouco descritas na literatura.

The image features a white background with several vertical bars of varying heights and widths, some of which are tilted. A thick black horizontal line crosses the middle of the page. The text 'Referências Bibliográficas' is centered on this line.

# Referências Bibliográficas

# 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- (1) ROHR, R. Mercado atual de óleos no Brasil. *Óleos & Grãos* (Aden Editora), 12 (1993), 22-25.
- (2) BEREZIN, O. Y. et al. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42 (1995), 507-517.
- (3) LINARES, P.; CASTRO, M. D. L.; VALCÁRCEL, M. Direct automatic determination of free acidity in oils by flow-injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 225 (1989), 431-436.
- (4) ISRAEL, Y. Theoretical and practical aspects of acid-base determinations by spectrophotometric flow-injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 206 (1988), 313-332.
- (5) RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. *Flow Injection Analysis*. 2. edn. New York, John Wiley and Sons, 1988.
- (6) RHEE, J. S.; DASGUPTA, P. K.; OLSON, D. C. Determination of trace water in non-polar organic solvents with a flow-injection system and tin tetrachloride or antimony pentachloride. *Anal. Chim. Acta*, 220 (1989), 55-63.
- (7) ISHII, M. Rapid and selective determination of water in nonaqueous solutions by flow injection method using quenching reaction of chemiluminescence between cyclohexane and methylsilicone solid polymer. *Anal. Sci.*, 7 (1991), 703-707.
- (8) LIANG, C.; VÁCHA, P.; van der LINDEN, W. E. Determination of water in organic solvents by flow-injection analysis with Karl Fisher reagent and a biamprometric detection system. *Talanta*, 35 (1988), 59-61.
- (9) NORDIN-ANDERSSON, I.; ASTRÖM, O.; CEDERGREN, A. Determination of water by flow injection analysis with the Karl Fisher reagent. *Anal. Chim. Acta*, 162 (1984), 9-18.
- (10) GUSMAN, M. et al. Spectrophotometric approaches to the determination of water in acetone by flow injection analysis. *Analyst*, 116 (1991), 1043-1049.
- (11) POPOVYCH, O.; TOMKINS, R. P. T. *Nonaqueous Solution Chemistry*. New York, John Wiley & Sons, 1981.

- (12) OHWEILER, O. A. *Química Analítica Quantitativa*. 4. ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1981. vol. 2, cap. 18.
- (13) BUDEVSKY, O. Effectivity of solvents - a new approach in non-aqueous acid-base titrimetry. *Talanta*, 36 (1989), 1209-1216.
- (14) RIDDICK, J. A. Acid-base titrations in nonaqueous solvents. *Anal. Chem.*, 26 (1954), 77-83.
- (15) BISHOP, E. *Indicators*. 1. edn. Oxford, Pergamon Press, 1972.
- (16) KOLTHOFF, I. M. The dissociation of acid-base indicators in ethyl alcohol with a discussion of the medium effect upon the indicator properties. *J. Phys. Chem.*, 35 (1931), 2732-2748.
- (17) SAFARIK, L.; STRANSKY, Z. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Titrimetric Analysis in Organic Solvents. New York, Elsevier Science, 1986. v. XXII.
- (18) MANCILHA, F. A. S.; SILVA JR., J. F.; SILVA, E. A condutividade elétrica e o pH do álcool etílico hidratado: repetividade e reprodutibilidade da determinação. *Boletim Técnico Copersucar* (edição especial). Piracicaba, SP, Copersucar - Cooperativa de produtores de cana, açúcar e álcool do Estado de São Paulo, ago. 1988. 9 p.
- (19) HAMMETT, L. P.; DEYRUP, A. J. A series of simple basic indicators. I. The acidity functions of mixtures of sulfuric and perchloric acids with water. *J. Am. Chem. Soc.*, 54 (1932), 2721-2739.
- (20) NODA, L. K. Superácidos: uma breve revisão. *Quim. Nova*, 19 (1996), 135-147.
- (21) BOAVENTURA, F. R. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Quim. Nova*, 19 (1996), 51-58.
- (22) KRATOCHVILL, B. Titrations in nonaqueous solvents. *Anal. Chem.*, 52 (1980), 151R-161R.
- (23) BACCAN, N. et al. *Química Analítica Quantitativa Elementar*. 2. ed. Campinas, SP, Edgard Blücher, 1985.
- (24) MANCILHA, F. A. S.; SILVA JR., J. F. Ensaio interlaboratoriais para determinação do teor alcoólico e de acidez do álcool. *Boletim Técnico Copersucar* (edição especial). Piracicaba, SP, Copersucar - Cooperativa de produtores de cana, açúcar e álcool do Estado de São Paulo, dez. 1985. p. 3-6.

- (25) CAI, Y. et al. Study on the flow-injection - catalytic photometric determination of rhodium. *Yejin-Fenxi*, 11 (1991), 34-36. In: *Analytical Abstracts 1/80-9/95*.
- (26) HE, X.; CAI, Y.; HU, Z. Studies on flow-injection analysis of platinum metals. VI. Iridium - potassium iodate - alpha-naphtholphthalein system. In: *Analytical Abstracts 1/80-9/95*.
- (27) CAI, Y. et al. Studies on flow-injection analysis of platinum metals. III. Ruthenium (III) - potassium periodate - alpha-naphtholphthalein system. *Fenxi-Huaxue*, 17 (1989), 213-216. In: *Analytical Abstracts 1/80-9/95*.
- (28) HE, X. et al. Catalytic determination of osmium by flow-injection analysis. *Huaxue-Tongbao*, 10 (1988), 41-42. In: *Analytical Abstracts 1/80-9/95*.
- (29) SABADINI, E. et al. Determinação do conteúdo de água em solventes orgânicos por método espectrofotométrico. *Quim. Nova*, 17 (1994), 27-30.
- (30) *J. HISTOCHEM. Cytochem.*, 22 (1974), 495. In: ALDRICH. *Catalog Handbook of Fine Chemicals*. Milwaukee, USA, Aldrich Chemical, 1994-1995.
- (31) *BIOCHEMISTRY*, 11 (1972), 1569. In: ALDRICH. *Catalog Handbook of Fine Chemicals*. Milwaukee, USA, Aldrich Chemical, 1994-1995.
- (32) LEGAZ, M. E. et al. High-performance liquid chromatographic determination of acridine orange in nucleic acids isolated from dye-treated *Himantormia lugubris* thalli. *J. Chromatogr.*, 607 (1992), 245-251.
- (33) SABADINI, E. *Estudo físico-químico de polietileno glicol com água e solventes aromáticos*. Campinas, 1993. 119 p. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- (34) *STAIN Technol*, 55 (1980), 195. In: ALDRICH. *Catalog Handbook of Fine Chemicals*. Milwaukee, USA, Aldrich Chemical, 1994-1995.
- (35) RUJIMETHABHAS, M.; WILAIRAT, P. Determination of a critical micelle concentration using acridine orange dye probe. *J. Chem. Educ.*, 55 (1978), 342.
- (36) *J. HISTOCHEM. Cytochem.*, 27 (1979), 522, 552. In: ALDRICH. *Catalog Handbook of Fine Chemicals*. Milwaukee, USA, Aldrich Chemical, 1994-1995.
- (37) STOCKWELL, P. B. The role of flow injection analysis within the framework of an automated laboratory. *J. Autom. Chem.*, 12 (1990), 95-103.

- (38) PASQUINI, C. *Instrumentação e metodologia para análise em fluxo contínuo, desenvolvimento de um entalpímetro de fluxo, de um sistema monosegmentado e construção de um circuito retentor de picos*. Campinas, 1984. 123 p. Tese de Doutorado - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- (39) KARLBERG, B.; PACEY, G. E. *Flow Injection Analysis. A Practical Guide: Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Amsterdam, Elsevier, 1989. C. 10.
- (40) FANG, Z.; SUN, L.; XU, S. The first decade of flow-injection analysis in China. *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992), 557-576.
- (41) PUCHADES, R. et al. State of the art in on-line techniques coupled to flow injection analysis FIA/on-line - a critical review. *J. Autom. Chem.*, 12 (1990), 163-173.
- (42) TYSON, J. F. The principles of flow injection titrations. *Anal. Proc.*, 24 (1987), 362-364.
- (43) PASQUINI, C.; RAIMUNDO Jr., I. M. Um fotômetro simples para análise por injeção em fluxo. *Quim. Nova*, 7 (1984), 24-25.
- (44) HAUSER, P. C.; CHIANG, D. W. L. A photometric detector based on a blue light-emitting diode. *Talanta*, 40 (1993), 1193-1200.
- (45) KUBÁN, V. Simultaneous determination of several components by flow injection analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 23 (1992), 15-53.
- (46) RANDHAWA, S. S. et al. Evaluation of the performance of a microprocessor-based colorimeter. *J. Autom. Chem.*, 14 (1992), 185-188.
- (47) HUANG, J. et al. A dual-wavelength light-emitting diode based detector for flow-injection analysis process analysers. *Talanta*, 39 (1992), 589-592.
- (48) DASGUPTA, P. K. et al. Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors. *Talanta*, 40 (1993), 53-74.
- (49) FLASCHKA, H.; McKEITHAN, C.; BARNES, R. M. *Anal. Lett.*, 6 (1973), 585. In: DASGUPTA, P. K. et al. Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors. *Talanta*, 40 (1993), 53-74.
- (50) BETTERIDGE, D. et al. *Analyst*, 103 (1978), 897; BETTERIDGE, D. *Anal. Chem.*, 50 (1978), 832A In: DASGUPTA, P. K. et al. Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors. *Talanta*, 40 (1993), 53-74.

- (51) PERIS, M. et al. An expert system as a tool for the specification and intelligent control of a flow injection analysis system. *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 21 (1993), 243-247.
- (52) PERIS-TORTAJADA, M. et al. Computer-assisted automation of chemical analysis using flow injection. Application to a fermentation process. *Analisis*, 19 (1991), 266-270.
- (53) VALERO, F. et al. On-line fermentation monitoring using flow injection analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 36 (1990), 647-651.
- (54) GASOLINA X Álcool. De volta a velha questão. *Meios & Métodos* (Jornal de tecnologia e ciência publicado pela Micronal), 65 (1990), 6-9.
- (55) BRASIL. Portaria n.º 23, de 29 de outubro de 1991. Estabelece para o Álcool Etílico Anidro Combustível - AEAC e Álcool Etílico Hidratado C Combustível - AEHC, o Regulamento Técnico n.º 03/91. *Diário Oficial da União*, Brasília, Departamento Nacional de Combustíveis, DNC, 13 nov. 1991. Seção I, p. 25628.
- (56) ÁLCOOL: o seu filho passou dos limites? *Saúde!* (Editora Abril), 36 (1986), 32-38.
- (57) CORONADO, J. O impasse na exportação e na indústria química. *Química e Derivados*, 221 (1985), 12-18.
- (58) MORAES, J. R. *Manual do Álcool Carburante*. Brasília, Confederação Nacional da Indústria - CNI, Departamento de Assistência à média e pequena indústria, 1980. p. 11-13.
- (59) ALLINGER, N. L. et al. *Química Orgânica*; Trad. de ALENCASTRO, R. B. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1978.
- (60) INSTITUTO BRASILEIRO DE PETRÓLEO. Comissão de Álcool. *Manual do Álcool*. 1. ed. Rio de Janeiro, 1987.
- (61) FRANK, M. e DELBONI, C. Álcool, a molécula partida. *Super Interessante* (Ed. Abril), 7 (1996), 46-51.
- (62) CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. *Destilação*. 1. ed. Piracicaba, SP, Copersucar - Cooperativa de produtores de cana, açúcar e álcool do Estado de São Paulo, 1987.
- (63) AIAA (Assoc. das Ind. de Açúcar e de Álcool do Est. de SP), SIAESP (Sind. da Ind. do Açúcar no Est. de SP), SIFAESP (Sind. da Ind. da fabr. do alc. no Est. de SP). *Informativo DataAgro* (Informativo quinzenal sobre a indústria sucro-alcooleira). São Paulo, 1996, n.º 10.
- (64) CLETO, P. Álcool. *Química e Derivados*, 333 (1995), 33-42.

- (65) A PETROBRÁS e o álcool. Rio de Janeiro, Serviço de comunicação social da Petrobrás, out. 1983. 16p.
- (66) ANCIÃES, A. W. F. et al. *Avaliação Tecnológica do Álcool Etílico*. 3. ed. Brasília, Cnpq, 1981. p. 301-309.
- (67) GERAÇÃO de empregos será usada na defesa. *Folha de S. Paulo*, São Paulo, 25 fev. 1996, Caderno Brasil, p. 1-11.
- (68) CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. Fundamentos dos processos de fabricação de açúcar e álcool. *Caderno Copersucar*. 1. ed. Piracicaba, SP, Copersucar - Cooperativa de produtores de cana, açúcar e álcool do Estado de São Paulo, fev. 1988. Série Industrial n. 20, 12 p.
- (69) HOESCHT DO BRASIL. Manual da Fermentação. *Boletim informativo*. São Paulo, Hoescht do Brasil - Química e Farmacêutica. 20 p.
- (70) QUEIROZ, M. S. et al. Aumento do tempo de operação de uma usina de álcool de cana com a utilização de matéria-prima amilácea. *Rev. Bras. Eng. Quím.*, 3 (1982), 7-14.
- (71) MANUTENÇÃO na entressafra. *Química e Derivados*, 166 (1980), 28-31.
- (72) LOPES, C. H. Aspectos paramétricos e dimensionais da fermentação alcoólica. *Álcool e Açúcar*, 21 (1985), 34-35.
- (73) BOVI, R.; MARQUES, M. O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. *Álcool e Açúcar*, 9 (1983), 10-12.
- (74) KATO, E. R. R.; ATOLINI, L. F. R. Instrumentação e supervisão no setor sucro-alcooleiro. *Álcool e Açúcar*, 79 (1995), 22-25.
- (75) A QUALIDADE do álcool, da produção ao consumidor. *Revista do Álcool*, 27 (1985), 4-11.
- (76) SANDRI, M. A. Resinas éster-vinílicas resistem a todos os tipos de corrosão e reduzem custos. *Álcool e Açúcar*, 59 (1991), 28-30.
- (77) MORAIS, M. O estoque será repostado hoje. *Folha de S. Paulo*, São Paulo, 23 mar. 1996. Caderno Dinheiro, p. 2-5.
- (78) NOTHENBERG, M. Troca iônica propõe acabar com aditivo. *Química e Derivados*, 213 (1984), 34-36.
- (79) AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação como evitá-la. *Álcool e Açúcar*, 5 (1982), 12-13.
- (80) BRÜNING, I. M. R.; MALM, E. B. Identificação das impurezas presentes no etanol. In: RALDENES, E. (Coord.) *Alcoolquímica*. 1. ed. Brasília.

- Conselho Nacional do Petróleo, Coordenadoria de Petroquímica e Serviço de Relações Públicas, 1980. p. 67-83.
- (81) CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. *Fermentação*. 1. ed. Piracicaba, SP, Copersucar - Cooperativa de produtores de cana, açúcar e álcool do Estado de São Paulo, Divisão Industrial, 1987.
- (82) AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A. Técnica de controle podem melhorar o rendimento de destilarias. *Álcool e Açúcar*, 7 (1982), 46-49.
- (83) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 9866: Álcool etílico - Verificação da alcalinidade e determinação da acidez total - Método de ensaio*. Maio 1987.
- (84) AMERICAN CHEMICAL SOCIETY SPECIFICATIONS. *Reagent Chemicals*. 7. edn. USA, Washington DC, 1986. CAS n.º 64-17-5, p. 273-274.
- (85) MERCK Standards. Darmstadt, Merck, 1972. CAS n.º 64-17-5, p. 326-327.
- (86) BOAINAIN INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. Determinação de índice de acidez.- Método para ensaios, Código B-119. São Bernardo do Campo, SP, Informações via FAX (26/09/95), setor Laboratório.
- (87) KARIM, M. R. O. Determination of trace amounts of acetic acid in ethanol by fluoride isoconcentration using the method of standard additions. *Analyst*, 113 (1988), 1865-1867.
- (88) PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. 3. edn. Oxford, Pergamon Press, 1988.
- (89) TUBINO, M.; BARROS, F. G. Uma válvula introdutora de amostra para análise por injeção em fluxo. *Quim. Nova*, 14 (1991), 49-51.
- (90) BERGAMIN Filho, H. et al. Solvent extraction in continuous flow injection analysis. Determination of molybdenum in plant material. *Anal. Chim. Acta*, 101 (1978), 9-16.
- (91) THE MERCK Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 11. edn. Rahway, Merck, 1989.
- (92) ALDRICH - *Catalog Handbook of Fine Chemicals*. Milwaukee, USA, Aldrich Chemical, códigos 15,855-0; 31,833-7, 1995-1996.
- (93) DEAN, J. A. (Ed.) *Lange's Handbook of Chemistry*. 13. edn. New York, McGraw Hill, 1985.
- (94) LIDE, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*. A ready references book of chemical and physical data. 71. edn. Boca Raton, CRC Press, 1990-1991.

- (95) ARAÚJO, M. C. U. et al. Uma célula espectrofotométrica simples para sistemas de análise química em fluxo contínuo. *Quim. Nova*, 19 (1996), 86-87.
- (96) ARAÚJO, M. C. U. Um sistema simples de adições padrão em análise por injeção em fluxo. *Quim. Nova*, 16 (1993), 182-185.
- (97) TYSON, J. A simple lecture demonstration of flow injection analysis. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 329 (1988), 675-677.
- (98) KROSCWITZ, J. I. *Concise encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. New York, John Wiley & Sons, 1990.
- (99) PISULA JR., J. D. As the tubing goes, so goes the pump. *Research & Development*, jun. 1989, 78-83.
- (100) COLE PARMER International. Instruments for research, industry and education. Illinois, Cole Parmer, 1995-1996.
- (101) O ÁLCOOL entra no diesel. *Química e Derivados*, 190 (1982), 36-42.
- (102) BANDEL, W.; VENTURA, L. M. Problemas na adaptação do etanol aos requisitos do motor diesel. *Álcool e Açúcar*, 1 (1981), 54-61.
- (103) SWERN, D. et al. *Bailey's Industrial: Oil and Fats Products*. 4. edn. USA, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, 1982. v. 2.
- (104) PUCHADES, R.; SUESCUN, A.; MAQUIEIRA, A. Determination of free fatty acids in foods by flow injection. *J. Sci. Food Agric.*, 66 (1994), 473-478.
- (105) WAN, P. J. *Introduction to Fats and Oils Technology*. 2. edn. Illinois, USA, Champaign, American Oil Chemists' Society, 1992.
- (106) POR DENTRO dos enlatados *Saúde!* (Ed. Azul), 39 (1986), 44-60.
- (107) MIRADOR Internacional. São Paulo, Rio de Janeiro, Brasil, Encyclopaedia Britannica do Brasil, 1982. vol. 15, p. 8228-8229.
- (108) SOYATECH. '95-'96 *Soya Bluebook Plus: The annual directory of the world oilseed industry*. USA, Soyatech, 1996. p. 226-228.
- (109) ADEN EDITORA E COMUNICAÇÕES LTDA. Revista Óleos e Grãos, São Caetano do Sul, SP. Informações via FAX (04/12/1996), sr. Carlos Donizete Parra.
- (110) VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. *Quim. Nova*, 19 (1996), 400-407.
- (111) ROSSELL, J. B.; PRITCHARD, J. L. R. *Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods*. 1. edn. London, Elsevier Science, 1991.

- (112) MANZATTO, G. M. Processamento de óleos vegetais. *Apostila do Curso Controle de Qualidade de Óleos e Farelos Vegetais*. Campinas, SP, Centro Química de Alimentos e Nutrição Aplicada - ITAL, 28 de ago.-1 de set. de 1995. 12 p.
- (113) MONNERAT, S. M. *Desacidificação de óleos vegetais por meio de extração líquido-líquido: Determinação de dados de equilíbrio*. Campinas, 1995. 89 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- (114) HARTMAN, L. *Tecnologia Moderna da Indústria de Óleos Vegetais*. Campinas, SP, Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos, 1971. 330p.
- (115) OFFICIAL Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4. edn. American Oil Chemists' Society, Champaign, D. Firestone, 1989. In: ISMAIL, A. A. et al. Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70 (1993), 335-341.
- (116) CHENEY, C.; JEANNOTTE, A. C.; MENEGHELLI, B. On-line free fatty acid titration using colorimetric end-point detection. *Food Control*, 1 (1990), 105-110.
- (117) ZHI, Z. L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. An automated flow-reversal injection liquid-liquid extraction approach to the direct determination of total FFA in olive oils. *Anal. Chim. Acta*, 318 (1996), 187-194.
- (118) BRASIL. Ministério da Indústria e Comércio, Secretaria de Tecnologia Industrial. *Produção de Combustíveis Líquidos a partir de Óleos Vegetais*. Brasília, 1985. Série Documentos -16, p. 265-268.
- (119) HARTMAN, L. et al. The effect of free fatty acids on the taste, induction periods and smoke points of edible oils and fats. *Lebensm.-Wiss u. - Technol.*, 8 (1975), 114-118.
- (120) DAOOD, H.; AL-ANI, H. Detection of fatty acids and free fatty acid composition of safflower seeds during germination by gas-liquid chromatography (GLC). *Acta Aliment.*, 15 (1986), 319-328.
- (121) ENCICLOPÉDIA de Conhecimentos Práticos. São Paulo, Porto Alegre, Rio de Janeiro, Brasil, Globo, 1958. vol. II.
- (122) POMERANZ, Y.; MELOAN, C. E. *Food Analysis*. 3. edn. New York, USA, Chapman & Hall, 1994.

- (123) MERCATELLI, R. Mais azeite em sua vida. *Saúde!* (Ed. Azul), 150 (1996), 43-53.
- (124) AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 4. edn. USA, American Oil Chemists Society, Washington DC, 1993. Official Method Ca 5a-40: Free Fatty Acids.
- (125) BRITISH STANDARD. BS 684, Section 2.10: Analysis of fats and fatty oils. Determination of acidity, acid value and mineral acidity. 1983.
- (126) THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). D-1980-87: Standard test method for acid value of fatty acids and polymerized fatty acids.
- (127) ISO STANDARD 660. Animal and vegetable fats and oils. Determination of acid value and of acidity. 1983.
- (128) INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 7. edn. USA, Pergamon Press, 1979. Part 1 (Sections I and II). Method 2.201: Determination of the acid value (A. V.) and the acidity.
- (129) BOOT, A. J.; SPEEK, A. J. Determination of the sum of dimer and polymer triglycerides and of acid value of used frying fats and oils by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 77 (1994), 1184-1189.
- (130) KERSHAW, S. J. Comparison of two standard methods for determination of free fatty acids content in oils extracted from oilseeds and vegetable oils. *J. Sci. Food Agric.*, 37 (1986), 267-272.
- (131) ISMAIL, A. A. et al. Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70 (1993), 335-341.
- (132) ACKMAN, R. G. *Food. Sci. Technol.* (NY), 53 (1992), 47. In: BEREZIN, O. Y. et al. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42 (1995), 507-517.
- (133) BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M. Automatic method for on-line preparation of fatty acid methyl esters from olive oil and other types of oil prior to their gas chromatographic determination. *Anal. Chim. Acta*, 282 (1993), 581-588.
- (134) LEVINA, Z. V.; LITVINOVA, V. D. *Konservnaya i Ovoshchesushil' naya Promyshlennost'*, 1 (1979), 33-34. In: BOOT, A. J.; ANDRIES, J. S.

- Determination of the sum of dimer and polymer triglycerides and of acid value of used frying fats and oils by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Assoc. Oil Anal. Chem.*, 77 (1994), 1184-1189.
- (135) LANSER, A. C. et al. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (1991), 448. In: ISMAIL, A. A. et al. Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70 (1993), 335-341.
- (136) SADEGHI-JORABCH, H. et al. *Spectrochim. Acta*, 47A (1991), 1449. In: BEREZIN, O. Y. et al. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42 (1995), 507-517.
- (137) SATO, T.; KAWANO, S.; IWAMOTO, M. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68 (1991), 827. In: BEREZIN, O. Y. et al. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42 (1995), 507-517.
- (138) FRANKEL, E. N.; NASH, A. M.; SNYDER, J. M. T. I. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64 (1987), 987-992. In: BOOT, A. J.; ANDRIES, J. S. Determination of the sum of dimer and polymer triglycerides and of acid value of used frying fats and oils by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 77 (1994), 1184-1189.
- (139) LIU, Z. et al. *Fenxi Huaxue*, 21 (1993), 446. In: BEREZIN, O. Y. et al. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42 (1995), 507-517.
- (140) BLUMENTHAL, T. K. et al. American Oil Chemists' Society 84th Annual Meeting and Exposition, Anaheim, California, 28 April 1993. In: BEREZIN, O. Y. et al. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42 (1995), 507-517.
- (141) WALDE, P. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67 (1990), 110. In: BEREZIN, O. Y. et al. Alternative methods for titratable acidity determination. *Talanta*, 42 (1995), 507-517.
- (142) EKSTRÖM, L. G. An automatized method for determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58 (1981), 935-938.
- (143) SCHOONER, F.; SIMARD, R. E.; PANDIAN, S. Colorimetric assay for free fatty acids in butter using flow-injection and immobilized enzymes. *J. Food Sci.*, 56 (1991), 1229-1232. In: PUCHADES, R.; SUESCUN, A.; MAQUIEIRA, A. Determination of free fatty acids in foods by flow injection. *J. Sci. Food Agric.*, 66 (1994), 473-478.

- (144) UKEDA, H. et al. A microbial sensor for determination of short-chain fatty acids and its application to raw milk samples. *J. Flow Injection Anal.*, 9 (1992), 164-174. In: PUCHADES, R.; SUESCUN, A.; MAQUIEIRA, A. Determination of free fatty acids in foods by flow injection. *J. Sci. Food Agric.*, 66 (1994), 473-478.
- (145) LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53 (1976), 470. In: EKSTRÖM, L. G. An automatized method for determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58 (1981), 935-938.
- (146) BAINS, G. S.; RAO, S. V.; BHATIA, D. S. A colorimetric procedure for the estimation of fat acidity in peanuts and peanut meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41 (1964), 831-832.
- (147) BAKER, D. *Cereal Chem.*, 38 (1961), 47-50. In: BAINS, G. S.; RAO, S. V.; BHATIA, D. S. A colorimetric procedure for the estimation of fat acidity in peanuts and peanut meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41 (1964), 831-832.