

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA – UFU
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO
DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM AZEITES**

UBERLÂNDIA

2018

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA

**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO
DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM AZEITES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues Batista

UBERLÂNDIA

2018

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA

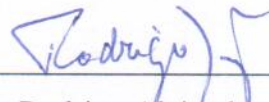
**MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM FLUXO PARA A DETERMINAÇÃO
DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS EM AZEITES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

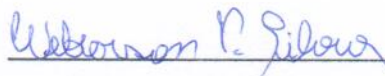
Uberlândia (MG), 14 dezembro de 2018



Prof. Dr. Alex Domingues Batista
(Orientador)



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Examinador)



Doutorando Weberson Pereira da Silva
(Examinador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

Aos meus pais, Marcos e Cristina, por sempre me apoiarem e independente da distância cuidarem de mim. Sem vocês eu não teria conseguido atingir meus objetivos, vocês são minha inspiração e força.

Ao meu irmão Jean e minha cunhada Camilla, por sempre me incentivarem e pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha avó Tereza, por ter me recebido ao longo da graduação em sua casa e sempre ter cuidado de mim com carinho.

Ao meu namorado, Oswaldo, por ter sido meu companheiro, principalmente, na fase final da graduação, me ajudando sempre que possível.

Ao meu orientador Alex, por ter me aceitado como aluna e por todo o suporte que me foi dado durante o decorrer desta jornada.

A todos alunos do laboratório LEA (atual GRISA) pelos bons momentos em grupo, principalmente, à minha amiga Nathália que foi minha maior parceira em todos os anos de graduação e também pelas discussões e contribuições nos experimentos de análise em fluxo.

A CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química (IQUFU) pela estrutura concedida e pela oportunidade de realização da pesquisa.

Aos membros da banca, Professor Dr. Rodrigo Muñoz e Doutorando Weberson Pereira, pelas contribuições. E pelo aceite do convite de participar da defesa.

Muito Obrigada!

RESUMO

A qualidade dos azeites depende da combinação de diferentes fatores, desde o tipo de solo até o armazenamento. Muitos parâmetros são empregados para indicar sua qualidade, como acidez e índice de peróxido. Os procedimentos oficiais utilizados para estas propostas baseiam-se em técnicas de titulação demoradas e empregam uma quantidade relativamente grande de solventes orgânicos. A análise em fluxo é uma alternativa adequada para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de qualidade do azeite, pois minimiza a geração de resíduos, o consumo de amostras e solventes e diminui os riscos de perdas e contaminações do analito. Este trabalho propõe um novo procedimento de microextração líquido-líquido em fluxo para determinação do índice de peróxido em azeites. Uma alíquota de solução aquosa contendo Fe^{2+} e SCN^- foi introduzida entre duas alíquotas de amostra e uma extração parcial reproduzível dos hidroperóxidos foi conduzida empregando o sistema de fluxo desenvolvido. Os hidroperóxidos extraídos na fase aquosa oxidam os íons Fe^{2+} a Fe^{3+} , que reagem com o SCN^- formando um complexo de cor laranja. A otimização dos parâmetros que possuem influência significativa no procedimento foi realizada de forma univariada. Os volumes das alíquotas de azeite e reagente foram otimizados para obter melhor eficiência de extração. Os valores ótimos foram 300 e 350 μL para as alíquotas de azeite e 100 μL para a alíquota do reagente contendo Fe^{2+} e SCN^- . Concentrações de Fe^{2+} e SCN^- foram fixadas em 0,0125 e 0,045 mol L^{-1} , respectivamente. A curva analítica mostrou linearidade de 2,0 à 6,0 $\text{meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$. O limite de detecção, o coeficiente de variação ($n = 20$) e a taxa de amostragem foram de 0,05 $\text{meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$, 0,60% e 36 h^{-1} , respectivamente. O uso de baixos volumes de amostra (650 μL), redução do volume de resíduos gerados (1,00 mL) e baixo consumo de reagentes (200 $\mu\text{g Fe}^{2+}$ e 300 $\mu\text{g SCN}^-$) por determinação são vantagens do procedimento proposto. O procedimento desenvolvido foi aplicado à análise de diferentes tipos de azeites, e todos os resultados foram concordantes com os obtidos pelo procedimento de referência de titulação. O procedimento proposto apresenta vantagens notáveis como citado acima, além do fato de ter sido realizado em um sistema fechado que diminui os riscos de contaminação e a instabilidade da solução de Fe^{2+} que pode ser afetada pelo oxigênio.

Palavras-chave: Azeite de oliva. Automação. FIA. Controle de qualidade. Microextração.

ABSTRACT

Olive oils quality depend on the combination of different factors, since the soil type to the storage. Many parameters are employed to indicate their quality, such as acidity and peroxide index. The official procedures used for these proposes are based on time-consuming titration techniques and employ a relatively large amount of organic solvents. Flow analysis is a suitable alternative for developments of new strategies for olive oil quality control, since it minimizes the residues generation, the consumption of sample and solvents and decrease the risks of analyte losses and contamination. This work proposes a new flow-based procedure employing liquid-liquid microextraction for determination of peroxide index in olive oils. An aliquot of aqueous solution containing Fe^{2+} and SCN^- was introduced between two sample aliquots and a reproducible partial extraction of the peroxides was conducted employing the developed flow system. The peroxides extracted into the aqueous phase oxidize the Fe^{2+} to Fe^{3+} ions, which react with SCN^- forming an orange complex. The optimization of parameters that have significant influence on the procedure was performed in a univariate manner. The volumes of the olive oil and reagent aliquots were optimized in order to obtain better extraction efficiency. The optimal values were 300 and 350 μL for the aliquots of olive oil and 100 μL for the aliquot of reagent. Concentrations of Fe^{2+} and SCN^- were fixed at 0.0125 and 0.045 mol L^{-1} , respectively. The analytical curve showed linearity up to 6.0 $\text{meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$. The limit of detection, coefficient of variation ($n = 20$) and sampling rate were 0.05 $\text{meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$, 0.60% and 36 h^{-1} , respectively. The use of low sample volumes (650 μL), reduced volume of generated waste (1.00 mL) and low reagent consumption (200 $\mu\text{g Fe}^{2+}$ and 300 $\mu\text{g SCN}^-$) by determination are advantages of the proposed procedure. The developed procedure was applied to the analysis of different kinds of olive oils, and all the results agreed with those achieved by the titration reference procedure. The proposed procedure presents remarkable advantages as cited above, additionally to the fact of been performed on a closed system which decrease the risks of contamination and the instability of Fe^{2+} solution that can be affect by the oxygen.

Keywords: Olive oil. Automation. FIA. Quality control. Microextraction.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Diagrama do sistema de análises com fluxo segmentado. A: injeção contínua de amostra, R: solução reagente, B: bobina reacional, d: desborbulhador, D: detector, W: descarte | 17 |
| Figura 2 - Representação do percurso de uma amostra (em verde) em um sistema de análises por injeção em fluxo. A: injeção de alíquota de amostra, T: solução transportadora, R: solução reagente, B: bobina reacional, D: detector, W: descarte | 18 |
| Figura 3 - Estágios do sistema por análise em fluxo | 19 |
| Figura 4 - Representação esquemática das unidades constituintes de um sistema em fluxo: R: reagente; C: carregador; I: injetor; S: solução de referência ou amostra; B: bobina reacional; D: detector e W: descarte..... | 20 |
| Figura 5 - Vista superior de uma representação de funcionamento de uma bomba peristáltica | 21 |
| Figura 6 - Representação esquemática de um sistema FIA com multicomutação. T: solução transportadora; A, R ₁ amostra e reagente; V ₁ , V ₂ , e V ₃ as unidades de comutação (válvulas solenoide); B: unidade de reação; DET: unidade de detecção e D: detecção..... | 22 |
| Figura 7 - Processos de transferência do analito entre duas fases líquidas imiscíveis dentro do tubo da bobina de extração dos sistemas de análises em fluxo. A: amostra aquosa, Org: solvente orgânico | 25 |
| Figura 8 - Esquema do arranjo eletrônico para ativação das válvulas solenoide | 29 |
| Figura 9 - Representação da linguagem C++ desenvolvida no software fornecido pelo fabricante da plataforma | 29 |
| Figura 10 - Fotografias do arranjo experimental utilizado para as medidas espectrofotométricas no procedimento para determinação de surfactantes aniônicos: (a) tudo de vidro (5 cm de comprimento e 4 mm d.i) usado como cela de medida; (b) adaptação do tubo no suporte da cubeta, alinhamento das fibras ópticas e conexão do tubo de vidro à bobina de extração de PTFE | 30 |
| Figura 11 - Sistema de análise por injeção em fluxo para determinação do índice de peróxido em azeite. I) A: azeite; R: solução de Fe ²⁺ / SCN ⁻ , C: água; T: confluência de Teflon; H: percurso analítico; FO: fibras ópticas; CF: célula de fluxo; LS: fonte de radiação; D: multicanal espectrofotômetro; W: saída de resíduos; II) Perfil do sinal da absorbância em função do tempo. a: azeite (1 ^a alíquota); b: azeite (2 ^a alíquota); c: reagente | 32 |

| | |
|---|----|
| Figura 12 - Perfil dos sinais obtidos na LLME de hidroperóxidos de azeites de oliva. a e b: alíquotas de azeite; c: alíquota de reagente | 34 |
| Figura 13 - Efeito dos volumes da: a) 1ª alíquota de azeite; b) 2ª alíquota de azeite; c) alíquota de reagente..... | 36 |
| Figura 14 - Influência das concentrações: a) da solução de Fe^{2+} ; b) da solução de SCN^- | 38 |
| Figura 15 - Efeito do comprimento da bobina reacional no sistema FIA | 40 |
| Figura 16 - Curva de calibração obtida através da diluição com octano de uma amostra com valor de IP conhecido | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Limites dos tolerância de parâmetros de qualidade do azeite de oliva..... | 14 |
| Tabela 2 - Massa de azeite a ser tomada em função do índice de peróxidos esperado no método titulométrico | 15 |
| Tabela 3 - Otimização dos volumes do sistema em fluxo para determinação do IP em azeites | 35 |
| Tabela 4 - Otimização da concentração de Fe^{2+} e SCN^- do sistema em fluxo para determinação de IP em azeite..... | 37 |
| Tabela 5 - Comparação dos resultados obtidos pelos procedimentos: proposto e oficial | 43 |
| Tabela 6 - Comparação entre os volumes gastos no FIA e no método titulométrico..... | 44 |
| Tabela 7 - Comparação dos volumes gastos de cada reagente nos métodos: FIA e Quimiluminescência | 45 |
| Tabela 8 - Comparação entre as características analíticas dos métodos: FIA e Quimiluminescência | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| FIA | Análise por Injeção em Fluxo do inglês, flow injection analysis |
| LLE | Extração líquido-líquido |
| LLME | Microextração líquido-líquido |
| IP | Índice de Peróxidos |
| DMA | (9,10-dimetiantraceno) |
| IMI | Imidazole |
| TCPO | Bis (2,4,6-triclorofenil) oxalato |
| SDME | Microextração em gota única |
| DLLME | Microextração líquido-líquido dispersiva |
| PTFE | Politetrafluoretileno |
| SCFA | Analisador de fluxo contínuo segmentado por ar |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 <i>Azeite de Oliva</i> | 12 |
| 1.2 <i>Parâmetros de Qualidade</i> | 13 |
| 1.2.1 Índice de peróxidos | 14 |
| 1.3 <i>Análise por injeção em fluxo (FIA)</i> | 16 |
| 1.4 <i>Microextração líquido-líquido</i> | 23 |
| 2 OBJETIVOS | 27 |
| 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 28 |
| 3.1 <i>Instrumentação</i> | 28 |
| 3.2 <i>Reagentes e soluções</i> | 30 |
| 3.3 <i>Metodologia</i> | 31 |
| 3.3.1 O sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)..... | 31 |
| 3.3.2 A microextração líquido-líquido | 33 |
| 3.3.3 Método de referência | 33 |
| 4 REULTADOS E DISCUSSÕES..... | 34 |
| 4.1 <i>Otimização do sistema FIA</i> | 34 |
| 4.1.1 Volume das alíquotas de azeite e da solução de Fe^{2+}/SCN^{-} | 35 |
| 4.1.2 Concentração de Fe^{2+} e SCN^{-} | 37 |
| 4.1.3 Comprimento da bobina reacional | 39 |
| 4.2 <i>Características Analíticas</i> | 40 |
| 4.2.1 Faixa linear..... | 40 |
| 4.2.2 Limite de detecção e quantificação | 41 |
| 4.2.3 Coeficiente de variação | 42 |
| 4.2.4 Frequência de amostragem..... | 42 |
| 4.2.5 Exatidão | 42 |
| 4.3 <i>Comparação do procedimento desenvolvido com outros métodos</i> | 43 |
| 4.3.1 Comparação entre titulação e FIA | 43 |
| 4.3.2 Comparação entre FIA e Quimiluminescência | 44 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| 5 CONCLUSÕES..... | 46 |
| REFERÊNCIAS | 47 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Azeite de Oliva

O azeite de oliva é um óleo vegetal proveniente dos frutos da *Olea europaea L.*, conhecida como Oliveira. Pode ser considerado um produto natural, uma vez que tratamentos ou manipulações que alterem a natureza química de seus componentes são evitados, tanto durante sua extração, exclusivamente mecânica, como no processo de armazenamento. Este é de alta qualidade quando obtido de frutos em perfeito estado de amadurecimento, proveniente de azeitonas saudáveis e frescas (KALUA *et al.*, 2007).

As azeitonas mais comuns possuem cerca de 75% de ácido oleico, 10% de ácido palmítico e 9% de ácido linoleico, o que confere ao azeite de oliva propriedades nutricionais desejáveis para a redução de incidência de doenças coronarianas quando comparado ao produtos compostos por gorduras saturadas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O uso do azeite é milenar, há mais de 5.000 anos a planta de Oliveira passou a ser cultivada no Mediterrâneo Oriental e Ásia Menor. A palavra “azeite” é originada do vocabulário árabe “Az-zait”, que significa sumo de azeitona. Os primeiros povos a consumi-lo foram os fenícios, sírios e armênios, chegando à Europa e o Ocidente por meio dos gregos e romanos. O azeite permaneceu restrito aos povos do mediterrâneo durante séculos, sendo introduzido pelos espanhóis no Peru, Chile e México no século XVI e, no século XVII, nos EUA (OLIVA, 2016).

No Brasil, a oliveira foi introduzida por meio dos imigrantes europeus por volta de 1820, chegando ao sul do Minas Gerais a partir de 1955 por produtos locais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Ao longo dos tempos, o azeite foi utilizado para diversos fins – alimentação, medicina, higiene e beleza. Os Mesopotâmicos, por exemplo, untavam o corpo com o óleo para se protegerem do frio, além de ser utilizado para alívio de dores e cura de feridas. No decorrer do Império Romano era aplicado sobre os cabelos e pele para amacia-los. Somado a isso, serviu como combustível para iluminação, lubrificante para as ferramentas e elemento essencial em ritos religiosos (OLIVA, 2016).

O grande destaque da utilização do azeite foi na medicina. Na Grécia antiga, os atletas utilizavam o azeite como bases para melhorar sua performance. Por volta do século XVI, época dos grandes descobrimentos, o azeite era obrigatório nos navios, pois era utilizado como base para o preparo de diversos medicamentos (OLIVA, 2016).

O azeite de oliva é uma gordura vegetal considerada a mais saudável, pois é composta principalmente por ácidos graxos monoinsaturados, os quais são facilmente digeríveis,

suficientemente estáveis e não promovem a formação de radicais livres. Além disso, o azeite é rico em polifenóis que auxiliam na proteção dos lipídios no sangue contra as oxidações indesejadas, bem como, rico em vitaminas (A, D, K e E). Para efeito benéfico indica-se uma dose diária de 20 mg de azeite de oliva (GALLO, 2015).

Somado a isso, o consumo do azeite em dose diária indicada possui outros benefícios como, por exemplo (OLIVA, 2016):

- Ajuda a evitar a osteoporose;
- Protege o coração;
- Auxilia no controle da diabetes e
- Possui efeito analgésico.

Segundo a Instrução Normativa 1/2012 conferida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o azeite de oliva pode ser classificado em grupos de acordo com a matéria-prima, processos de obtenção e procedimentos tecnológicos aplicados (BRASIL, 2012):

I - azeite de oliva virgem: o produto extraído do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, sob controle de temperatura adequada, mantendo-se a natureza original do produto; o azeite assim obtido pode, ainda, ser submetido aos tratamentos de lavagem, decantação, centrifugação e filtração, observados os valores dos parâmetros de qualidade previstos no Anexo I desta Instrução Normativa;

II - azeite de oliva: o produto constituído pela mistura de azeite de oliva refinado com azeite de oliva virgem ou com azeite de oliva extra virgem;

III - azeite de oliva refinado: o produto proveniente de azeite de oliva do grupo azeite de oliva virgem mediante técnicas de refino que não provoquem alteração na estrutura glicerídica inicial.

O azeite de oliva virgem ainda pode ser classificado em três tipos: extra virgem, virgem e lampante, de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos pela Instrução Normativa (BRASIL,2012).

1.2 Parâmetros de Qualidade

Nos últimos anos, as importações do azeite de oliva no Brasil têm crescido atingindo volumes consideráveis em termos mundiais (AUED-PIMENTEL *et al.*, 2008). Por ser um produto natural, o preço de sua comercialização é alto quando se compara aos demais óleos (OLIVEIRA *et al.*,2010). Com isso, o azeite tem sido alvo de adulterações durante sua fabricação. A adulteração mais comum deste produto consiste na adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial (MITSUTAKE *et al.*, 2015).

Somado a isso, a produção do fruto oliva não é compatível com a produção de azeite no mercado. Para cada 1 litro de azeite de oliva produzido são necessários cerca de 5 kg de azeitona, e cada oliveira produz de 15 a 50 kg por vez (GASTRO, 2018).

Além disso, as características físico-químicas do azeite de oliva podem variar de acordo com o solo, clima, práticas culturais, estado de maturação dos frutos, dentre outros. Assim, para que o azeite possa ser comercializado, é necessário que se apresente dentro dos padrões vigentes, por meio de análises físico-químicas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os principais parâmetros de qualidade do azeite de oliva são definidos em função do percentual de acidez livre, índice de peróxidos (IP) e da extinção específica do ultravioleta, conforme definido pela Instrução Normativa 1/2012. (BRASIL, 2012).

Tabela 1 - Limites de tolerância dos parâmetros de qualidade do azeite de oliva.

| Grupo | Azeite de Oliva Virgem | | | Azeite de Oliva | Azeite de Oliva Refinado | |
|--|------------------------|--------|----------|-----------------|--------------------------|--------|
| | Extra Virgem | Virgem | Lampante | Único | Único | |
| Acidez livre (%) | ≤ 0,80 | ≤ 2,00 | > 2,00 | ≤ 1,00 | ≤ 0,30 | |
| Índice de peróxidos (meq O₂ kg⁻¹) | ≤ 20,0 | | * | ≤ 15,0 | ≤ 5,00 | |
| Extinção específica no ultra-violeta | 270nm | ≤ 0,22 | ≤ 0,25 | * | ≤ 0,90 | ≤ 1,1 |
| | Delta K | ≤ 0,01 | | * | ≤ 0,15 | ≤ 0,16 |
| | 232nm | ≤ 2,50 | ≤ 2,60 | * | * | * |
| Índice de iodo (Wijs) | | | | 75 a 94 | | |

Fonte: Adaptado de Brasil (2012).

* Não se aplica.

1.2.1 Índice de peróxidos

A oxidação é uma das alterações mais decorrentes em azeites, podendo ocorrer durante o processamento e armazenamento do produto ou durante o uso do óleo em frituras. Os hidroperóxidos são os primeiros compostos formados com degradação lipídica devido oxidação dos ácidos graxos contidos no azeite. Os hidroperóxidos, por reações paralelas, se decompõem em produtos de baixo peso molecular, por exemplo, aldeídos, álcoois, cetonas e hidrocarbonetos que são os responsáveis pela coloração, sabor e odor característico de um óleo que se encontra oxidado (GRANATO; NUNES, 2016; RIOS; PEREIRA; ABREU, 2013).

Além de, alterar as qualidades organolépticas do azeite a oxidação também afeta a qualidade nutricional do produto. A oxidação pode ser favorecida por fatores internos e externos, como exposição a luz e calor, contato com oxigênio, armazenagem incorreta, entre outros (RIOS; PEREIRA; ABREU, 2013). Somado a isso, o teor de peróxidos pode aumentar quando as azeitonas utilizadas para a fabricação do azeite não estão sãs, íntegras e apresentam machucaduras (ROSSINI, 2014).

Ingerir óleos oxidados auxilia na predisposição de reações inflamatórias e todas as doenças que as envolve, além de, incentivar o envelhecimento precoce e a doenças degenerativas como o câncer (FELDMAN, 2018).

O índice de peróxido (IP) expressa, em mili-equivalentes de oxigênio ativo, a quantidade de hidroperóxidos em 1 quilograma de amostra de azeite (meq O₂/kg). Este, índice é muito útil na caracterização do estágio inicial da degradação lipídica, uma vez que, os hidroperóxidos são os produtos primários da oxidação (GRANATO; NUNES, 2016).

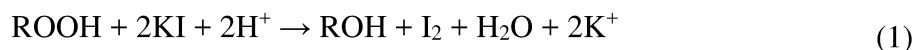
Para a determinação do índice de peróxido em azeites, toma-se uma massa, a qual depende dos índices esperados para aquela amostra, como disposto na Tabela 2. Em seguida dissolve-se a amostra em 10 mL de clorofórmio, acidifica-se a solução com 15 mL de ácido acético e adiciona-se 1 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após 5 minutos em ausência de luz, titula-se o iodo livre com solução 0,002 N ou 0,01 N de tiosulfato de sódio, utilizando solução de amido 10 g/L como indicador. (COMISSÃO EUROPEIA, 1991; STEPANYAN *et al.*, 2005).

Tabela 2. Massa de azeite a ser tomada em função do índice de peróxidos esperado no método titulométrico.

| Índice de peróxidos esperado (meq) | Peso da toma (g) |
|------------------------------------|------------------|
| 0 a 12 | 5,0 a 2,0 |
| 12 a 20 | 2,0 a 1,2 |
| 20 a 30 | 1,2 a 0,8 |
| 30 a 50 | 0,8 a 0,5 |
| 50 a 90 | 0,5 a 0,3 |

Fonte: Adaptado de Comissão Europeia (1991).

O método é baseado na ação oxidante dos hidroperóxidos, formados no início da degradação lípida do azeite, sobre o iodeto de potássio formando iodo (1) que será titulado com o tiosulfato de sódio (2). E quantidade formada de iodo é proporcional ao teor de hidroperóxidos.(GRANATO; NUNES, 2016).



O índice de peróxidos é dado pela fórmula (COMISSÃO EUROPEIA, 1991):

$$\text{I. P.} = \frac{V \times N \times 100}{m} \quad (3)$$

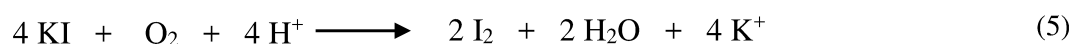
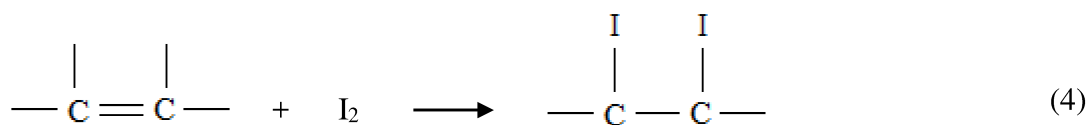
Onde:

V = é o número de mililitros de solução de tiosulfato de sódio gasto no ensaio, com a correção relativa ao ensaio em branco.

N = é a normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio utilizada.

m = é a massa, expressa em gramas, da toma de amostra em estudo.

Este é um método que necessita de grandes quantidades de solventes, sua precisão é dependente de vários parâmetros como tempo e proteção da mistura contra reações com o oxigênio atmosférico e luz (STEPANYAN *et al.*, 2005). O erro resultante de pequenas variações no tempo de reação ocorre, pois este é um método cinético de tempo fixo e a taxa em que o peróxido oxida o iodeto pode ser diferente em azeites com o mesmo teor de peróxido total (NOUROS; GEORGIU; POLISSIOU, 2000). O índice de peróxidos pode ser subestimado caso o iodo liberado se fixe nas duplas ligações dos ácidos graxos (4) e/ou quando o oxigênio contido no meio ocasiona a oxidação do iodeto de potássio a iodo (5). Para evitar a ocorrência dessas reações secundárias, deve-se deixar em repouso o meio reacional durante a reação do iodeto com os hidroperóxidos do azeite (GRANATO; NUNES, 2016).



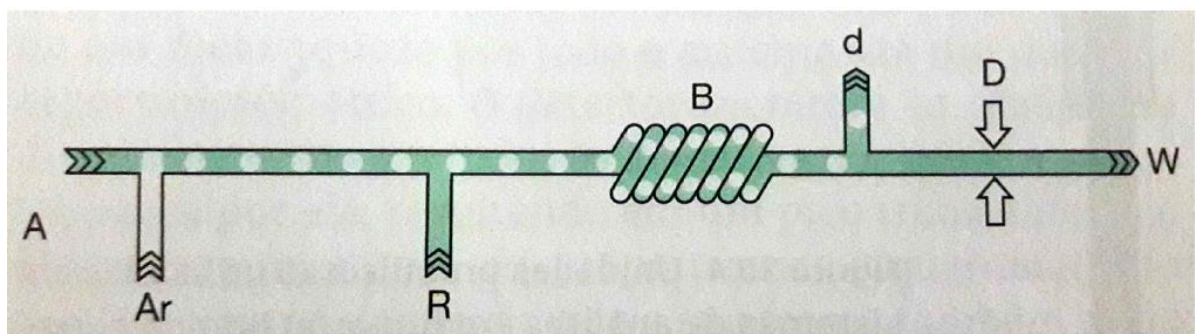
1.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

A análise de uma amostra pode envolver desde etapas mais simples, por exemplo, diluição, dissolução, secagem ou filtração até etapas mais complexas e morosas como extração, digestão e derivatização. Quando é preciso que os procedimentos complexos e morosos sejam realizados em batelada, ou seja, realizados manualmente propiciam a obtenção de resultados

menos confiáveis. Além disso, há grande consumo volume de amostra e reagentes, favorecer as contaminações externas, ocorrer a perda de amostra ou analito, ter tempo de análise longo e possuir elevado custo de análise. Assim, a necessidade de aumentar o número de análises, obter os resultados de modo mais rápido e eficaz, com menor dependência do analista e de menor custo operacional em rotina laboratorial contribui para a automação de muitos métodos analíticos. Dentre esses, vale destacar os métodos baseados em Análise por Injeção em Fluxo (do inglês, “*flow injection analysis*” - FIA) devido a sua simplicidade e baixo custo operacional (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015; FRANÇA, 2011; SILVA JUNIOR, 2011).

A primeira proposta para análise em fluxo ocorreu em 1957 por Skeggs, o qual trabalhou inicialmente com analisador de fluxo contínuo segmentado por ar (do inglês, “*segmented continuous flow analysis*” – SCFA). Neste, não havia injetor de volumes definidos de amostras, as quais eram transportadas infinitamente pelo percurso analítico até o recebimento de um fluxo de ar, conforme ilustra a Figura 1. Com a inserção do fluxo de ar formava-se segmentos contendo as alíquotas de amostras separadas por ele, o que permitia o controle da amostra (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

Figura 1 – Diagrama do sistema de análises com fluxo segmentado. A: injeção contínua de amostra, R: solução reagente, B: bobina reacional, d: desborbulhador, D: detector, W: descarte.

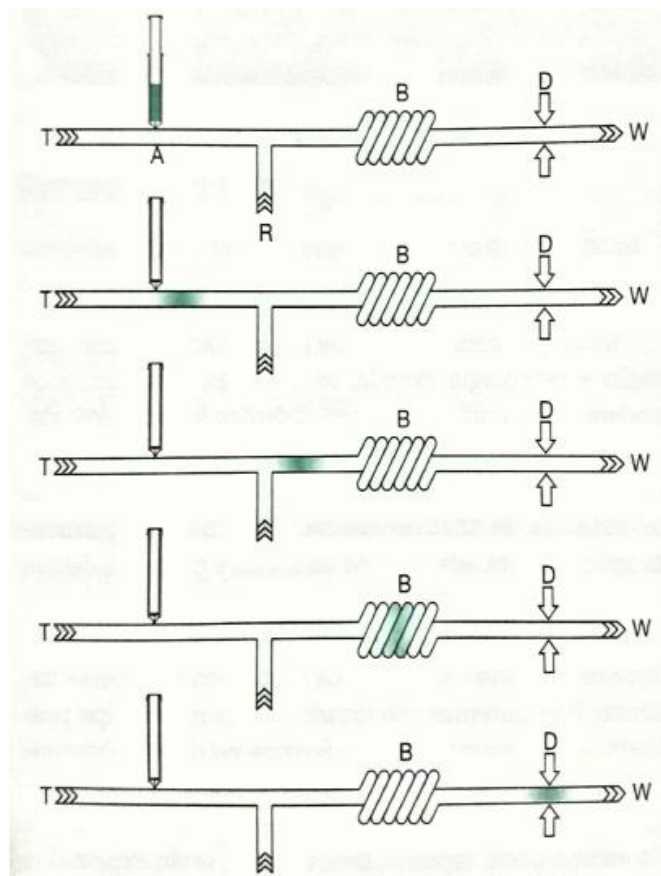


Fonte: Borges; Figueireido; Queiroz, (2015).

Em 1975, Ruzicka e Hansen desenvolveram o FIA, basearam o método numa injeção de uma amostra líquida em fluxo contínuo não-segmentado, esta após ser injetada no percurso analítico formando uma zona de amostragem, é encaminhada por um carregador adequado em direção a um detector que registra continuamente a absorvância ou qualquer outro parâmetro físico, à medida em que ocorre a passagem do material da amostra pela célula de fluxo (RUZICKA; HANSEN, 1988).

O princípio dos sistemas de análises em fluxo baseia-se na injeção de uma alíquota definida de amostra em um fluxo de movimento contínuo no interior de tubos de diâmetro interno reduzido, na escala de milímetros, nos quais ocorrem as reações pertinentes ao método analítico em estudo. Ainda no interior dos tubos as soluções da amostra e dos reagentes são encaminhadas por um fluxo transportador até uma bobina reacional e, por fim segue-se para o detector o qual gera o sinal analítico. (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

Figura 2 – Representação do percurso de uma amostra (em verde) em um sistema de análises por injeção em fluxo. A: injeção de alíquota de amostra, T: solução transportadora, R: solução reagente, B: bobina reacional, D: detector, W: descarte.



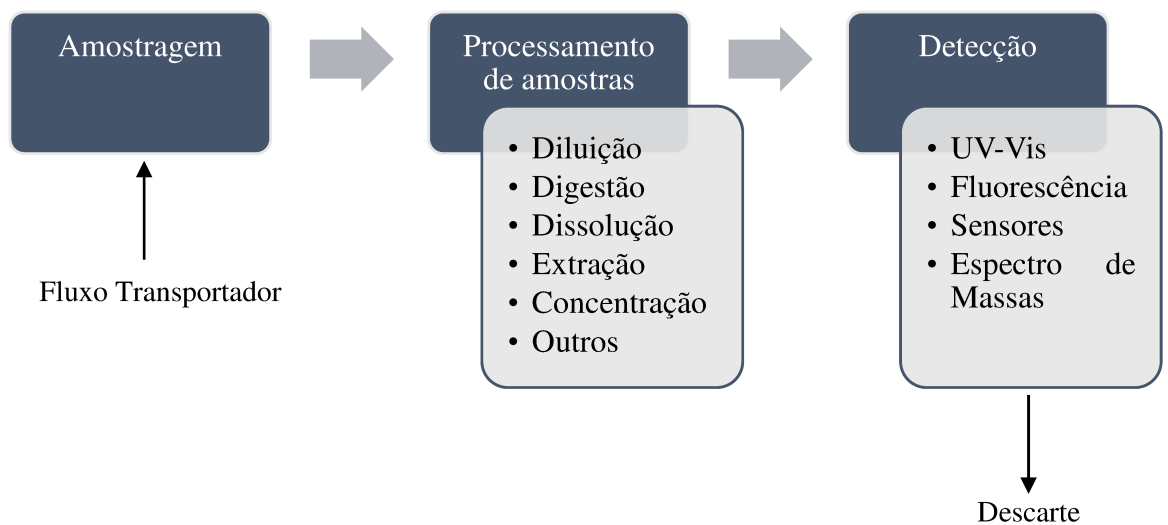
Fonte: Borges; Figueireido; Queiroz, (2015).

Este é um método amplamente utilizado em diversos campos de análises químicas, tais como controle de análises ambientais, de alimentos, material biológico e mineral, ensaios clínicos, indústria agrícola e monitoramento de resíduos e seus tratamentos. (KULKARNI; VAIDYA, 2015; RAMA; COSTA-GARCÍA; FERNÁNDEZ-ABEDUL, 2016; SILVA-JUNIOR, 2011).

O sistema FIA é um método analítico vantajoso na simplificação de ensaios químicos quando comparado às técnicas manuais convencionais, pois, além de ser um sistema de configuração simples, flexível e de baixo custo, gerar menor consumo de amostra e reagente, ocasionando menor geração de resíduos apresenta alta frequência de amostragem (100 – 300 amostras por hora), apresenta maior precisão pois, reduz os erros humanos, diminui suscetibilidade à contaminação, e não necessita que a amostra a ser quantificada pelo sistema tenha atingido o estado de equilíbrio químico (FRUGERI *et al.*, 2014; KULKARNI; VAIDYA, 2015; MARTINS *et al.*, 2013; RAMA; COSTA-GARCÍA; FERNÁNDEZ-ABEDUL, 2016; RODRÍGUEZ; PEZZA; PEZZA, 2016).

Este sistema pode ser agrupado em três estágios (PARIKH *et al.*, 2010):

Figura 3 – Estágios do sistema por análise em fluxo.

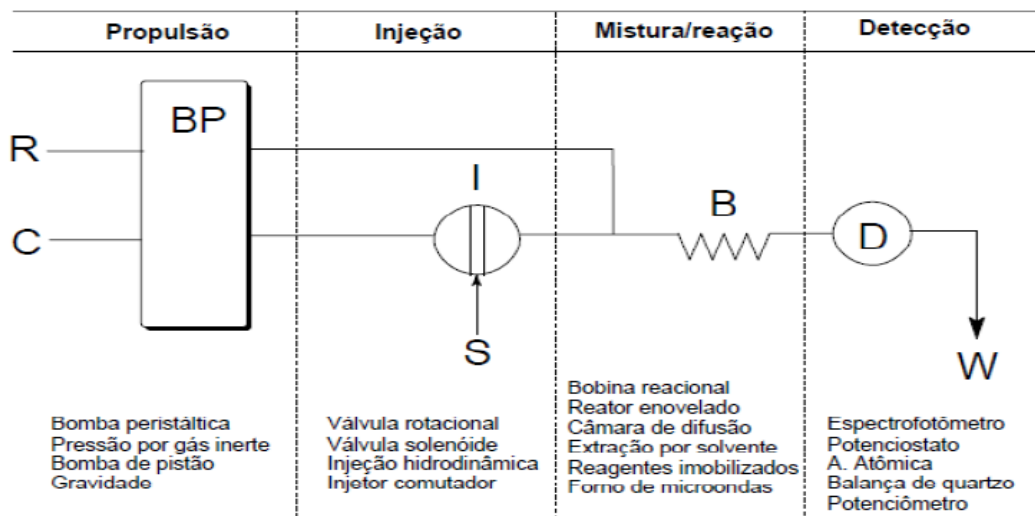


Fonte: Adaptado de Parikh *et al.*, (2010).

A amostragem consiste na injeção da amostra na corrente de transporte. Esta etapa geralmente é realizada com válvulas de injeção. No segundo estágio ocorre o processamento da amostra, tendo como objetivo transformar o analito numa espécie que pode ser medida pelo detector e variar sua concentração. O último estágio é a detecção do analito ou seu derivado. Outra vantagem do FIA é a sua capacidade de combinar com uma variedade de detectores favorecendo a criação de uma ampla gama de diferentes metodologias (PARIKH *et al.*, 2010).

Geralmente, os sistemas de FIA são basicamente constituídos por (Figura 4): uma bomba (BP), válvula de injeção (I), percurso analítico (B) e um detector (D) (KULKARNI; VAIDYA, 2015).

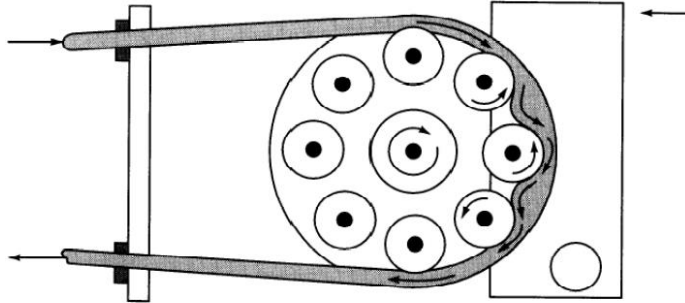
Figura 4 - Representação esquemática das unidades constituintes de um sistema em fluxo: R: reagente; C: carregador; I: injetor; S: solução de referência ou amostra; B: bobina reacional; D: detector e W: descarte.



Fonte: Bastos (2016).

O tipo de bomba a ser utilizado no sistema dependerá da aplicação e objetivo do sistema. Geralmente, a bomba peristáltica é a mais utilizada. É uma bomba multicanal responsável pela transferência dos fluidos a vazão. Na bomba peristáltica, a mangueira que deve estar devidamente posicionada e fixa no cabeçote, é pressionada por roletes que se encontram em volta de um rotor responsável pela realização dos movimentos circulares. Com o movimento, os roletes pressionam e fecham a mangueira, resultando num vácuo necessário para deslocar o fluido. E após a passagem do rolete, a mangueira retorna ao seu diâmetro original (Figura 5) (KULKARNI; VAIDYA, 2015; LABOR, 2018).

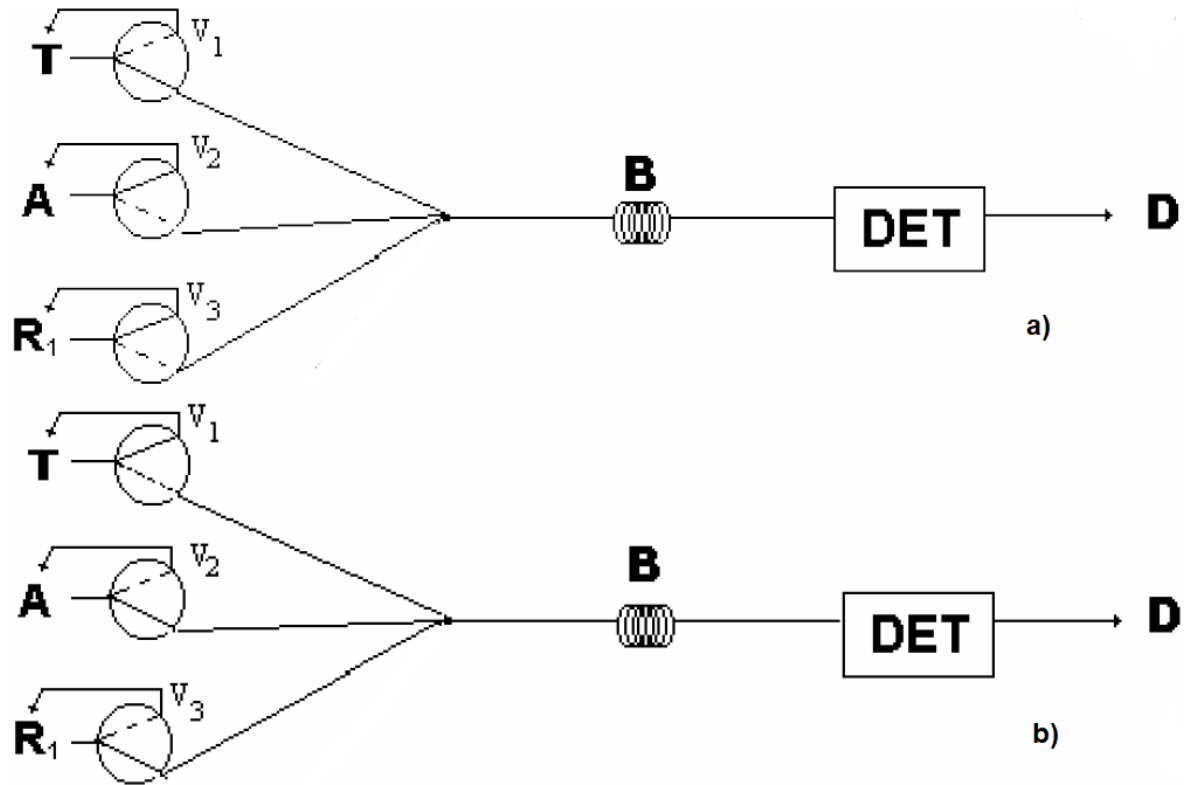
Figura 5 – Vista superior de uma representação de funcionamento de uma bomba peristáltica.



Fonte: Parikh *et al.*, (2010).

A válvula de injeção é responsável por introduzir a amostra no percurso analítico sem causar alterações no fluxo de transporte após a injeção (KULKARNI; VAIDYA, 2015). A utilização de dispositivos eletrônicos, como as válvulas solenoide e rotatórias em sistemas FIA, possibilita que as soluções sejam gerenciadas de forma eficiente, controlando o tempo e a sequência de adição. Válvulas solenoides de três vias são utilizadas em FIA para o direcionamento dos fluxos no sistema. Estas são constituídas de uma via de entrada comum e duas vias de saída independentes, sendo todas acionadas pelo acionamento elétrico do solenoide. Para a solução que se encontra na via comum fluir para uma das vias de saída, a válvula de entrada deve ser desligada, geralmente a solução flui para aquela que se encontra aberta. Acionada a solenoide a via que se encontrava aberta é fechada e o fluxo se desenvolve da via de entrada para a outra via, normalmente fechada. Além de, reduzir o consumo dos reagentes as válvulas solenoides possibilitam que as soluções que não estão sendo utilizadas retornem para o frasco de origem. O volume das soluções direcionadas é inserido de acordo com o tempo de abertura da válvula e pela vazão do fluxo. (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015; KAMOGAWA; MIRANDA, 2013; REIS, 1988).

Figura 6 - Representação esquemática de um sistema FIA com multicomutação. T: solução transportadora; A, R₁ amostra e reagente; V₁, V₂, e V₃ as unidades de comutação (válvulas solenoide); B: unidade de reação; DET: unidade de detecção e D: detecção.



Fonte: Adaptado de Bonifacio (2008).

Na representação acima, a linha contínua, representa a ocorrência do fluxo das soluções. Na válvula do transportador Figura 6.a), a introdução do carregador (T) se dá no sentido contrário ao fluxo de reagente (R₁) /amostra (A), de modo que, quando as válvulas não estão acionadas, apenas o carregador passa pelo detector, enquanto isso, as outras soluções retornam para os respectivos frascos de origem. E quando estas são acionadas (b), somente reagente e amostras estão sendo inseridos no percurso analítico (BONIFACIO, 2018).

O acionamento desses dispositivos em sistemas FIA é realizado por uma interface eletrônica que concilia o sinal digital enviado pelo computador e a fonte de corrente contínua que alimenta os dispositivos. Um exemplo de interface eletrônica é o Arduino, o qual é uma plataforma de hardware de código fonte aberta com comunicação serial, USB, de baixo custo, software livre e de fácil operação. Esta é uma plataforma indicada para usuários leigos em eletrônica, que possuem dificuldade na construção dos circuitos eletrônicos e desenvolvimento da programação de acionamento das válvulas (KAMOGAWA; MIRANDA, 2013).

Anterior ao percurso analítico a inclusão de confluência é uma ótima ferramenta para a inserção das soluções reagentes. Geralmente, utiliza-se confluência em forma de “T” pois, permite que os fluxos confluem em um único canal, de modo que a melhor configuração é dada pela entrada da fase orgânica, no caso deste trabalho, perpendicular ao fluxo principal (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

O percurso analítico, ou também, bobina reacional é onde ocorrem as reações químicas necessárias para a detecção da espécie de interesse durante a passagem do analito através da célula de fluxo. Para o dimensionamento do percurso é importante considerar o tempo de residência da amostra, de modo a evitar a diminuição da absorbância devido ao processo de diluição. Geralmente, as bobinas do percurso são obtidas a partir de tubos de polipropileno, polietileno ou teflon por serem matérias inertes ao meio e que não interferem no tempo de residência da amostra (KULKARNI; VAIDYA, 2015; REIS, B. F., GINÉ, M. F. & KRONKA, 1988).

Quanto aos detectores, o principal critério para um detector em sistema FIA é que seu tempo de resposta rápido. Como exemplo de detectores utilizados nos sistemas FIA tem-se: espectrofotômetros de absorção atômica, potenciômetros, UV-VIS, quimiluminescência, eletrodo de íon seletivo, etc (KULKARNI; VAIDYA, 2015).

1.4 Microextração Líquido-Líquido

A demanda por métodos analíticos que permitem rápida e precisa determinação vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Apesar dos avanços na instrumentação analítica, ainda há vários casos em que a amostra não pode ser analisada na sua forma original. Com isso, são empregados procedimentos de preparo de amostra para que o analito a ser analisado esteja em forma compatível com os equipamentos analíticos, possua o mínimo de espécies interferentes e a instrumentação disponibilizada apresente sensibilidade analítica suficiente para a determinação dos traços (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015; HASHEMI *et al.*, 2017).

A extração líquido-líquido (LLE) é um exemplo de técnica amplamente empregada no preparo de amostras líquidas ou solúveis. É considerada uma técnica clássica de preparo de amostras e vem sendo muito aplicada em análises de alimentos, pesticidas, fármacos e produtos naturais. Dentre as vantagens desta técnica, pode-se destacar sua simplicidade, possibilidade de utilizar uma variedade de solventes, fornecendo uma ampla faixa de solubilidade e seletividade

e possibilita a combinação de várias etapas de preparo de amostras em uma só. (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

A LLE baseia-se na transferência do analito em interesse de uma fase líquida para outra fase líquida na qual este apresente maior solubilidade ou afinidade. (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

No entanto, é uma técnica que necessita de elevadas quantidades de solventes orgânicos, em alguns casos tóxicos que não são miscíveis em amostras aquosas podendo acarretar em problemas ambientais, consome muito tempo de análise, exige intenso trabalho, e conseqüentemente, prolongada exposição do analista aos solventes. Somado a isso, o aumento de extrações realizadas sobre a amostra resulta em maior risco de perda de analitos ou contaminação da amostra (MIOR *et al.*, 2013; SPIETELUN *et al.*, 2014).

Neste contexto, técnicas de microextração vem sendo desenvolvidas com o objetivo de reduzir o volume de solventes orgânicos utilizados, número de etapas no preparo das amostras e os impactos ambientais e de saúde. Assim, dentre as modificações de configuração da LLE pode-se destacar, microextração líquido-líquido (do inglês, liquid-liquid microextraction - LLME), microextração com gota única (SDME) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (MIOR *et al.*, 2013).

A LLME possui o mesmo princípio que a LLE convencional. É uma técnica que possui vantagens tais como redução do volume de solventes utilizados, simplicidade de operação, baixo custo, menor exposição a solventes orgânicos tóxicos e menor consumo de tempo (FARAJZADEH *et al.*, 2009; MIOR *et al.*, 2013).

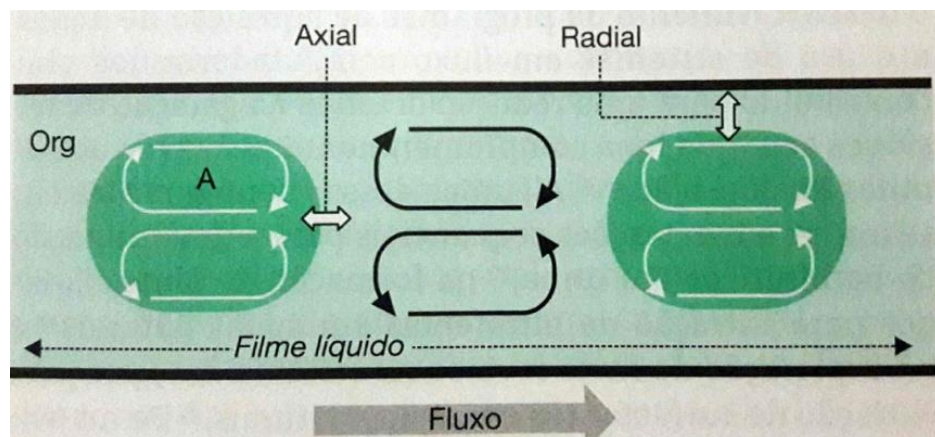
A automação de LLME em sistemas de análises em fluxo, além de, favorecer a redução dos volumes utilizados de solventes e gerar menos resíduos ambientais, permite a realização da extração em tubos fechados favorecendo a obtenção resultados com maior qualidade e precisão (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

No sistema FIA o solvente orgânico, de volume definido, é transportado pelo fluxo carregador até o segmentador de fases que também recebe um fluxo da fase aquosa. Neste, há uma formação de segmentos entre as fases aquosa e orgânica. Depois, o segmentos são encaminhados para a bobina de extração que fornecerá as condições necessárias para o processo de transferência do analito entre as fases (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

A eficiência da extração é afetada pela precisão do volume dos segmentos, pois pequenas variações dos volume da amostra aquosa e o solvente orgânico podem ocasionar num contato inadequado entre as fases reduzindo a eficiência da extração (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

Dentro da bobina de extração primeiramente é inserida uma alíquota do solvente orgânico em volume definido. Este, ao percorrer o comprimento do tubo forma um filme líquido de solvente orgânico, em seguida, é inserida uma alíquota de fase aquosa. Assim, forma-se interfaces entre os segmentos filme orgânico-fase aquosa, bem como, entre os segmentos de fase orgânica – aquosa. Para que ocorra grande interação entre as moléculas do solvente orgânico e os tubos de transmissão geralmente, utiliza-se tubos de politetrafluoretileno (PTFE) que possui características hidrofóbicas. Devido à formação desse filme orgânico, a transferência do analito pode ocorrer tanto no sentido radial quanto no axial, predominando interações entre segmento aquoso-filme líquido ou segmento aquoso-segmento orgânico, respectivamente (Figura 7) (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

Figura 7 – Processos de transferência do analito entre duas fases líquidas imiscíveis dentro do tubo da bobina de extração dos sistemas de análises em fluxo. A: amostra aquosa, Org: solvente orgânico.



Fonte: Borges; Figueireido; Queiroz, (2015).

Assim, a transferência do analito é influenciada pela vazão do fluxo transportador, pelo diâmetro interno do tubo, formato da bobina e pelo volume dos segmentos (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015).

A seleção do solvente orgânico também é um ponto fundamental para a eficiência da extração. Este deve apresentar algumas propriedades necessárias, dentre elas, baixa solubilidade ou insolubilidade em água, para que não ocorra dissolução entre as fases; baixa volatilidade, evitando a perda do solvente e afinidade pelos tubos de transmissão, para melhor formação do filme de solvente orgânico (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A extração do analito entre as fases líquidas é um processo de equilíbrio, no qual a transferência do analito aumenta com o tempo de extração. Porém, em um determinado tempo essa transferência atinge o ponto de equilíbrio e a distribuição do analito entre as fases permanece constante. Em alguns casos, o tempo necessário para que o ponto de equilíbrio seja atingido é excessivamente longo, assim, a extração pode ser feita em casos de não-equilíbrio, controlando-se o tempo de extração (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um procedimento analítico em fluxo rápido e que permita a extração e determinação do índice de peróxido em azeites utilizando menor volume possível do reagente ($\text{Fe}^{2+} / \text{SCN}^-$) e do azeite.

Objetivos específicos incluem: planejamento e construção do sistema FIA; otimização dos parâmetros que influenciam a eficiência de extração dos hidroperóxidos; obtenção das características analíticas; avaliação de exatidão e precisão do procedimento desenvolvido.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

As pesagens foram realizadas utilizando-se balança analítica Shimadzu modelo AUY 220 com precisão de $\pm 0,1$ mg. Procedimentos de centrifugação foram realizados em centrífuga Kindly modelo KC5 sob rotação de 250 rpm durante 3 minutos.

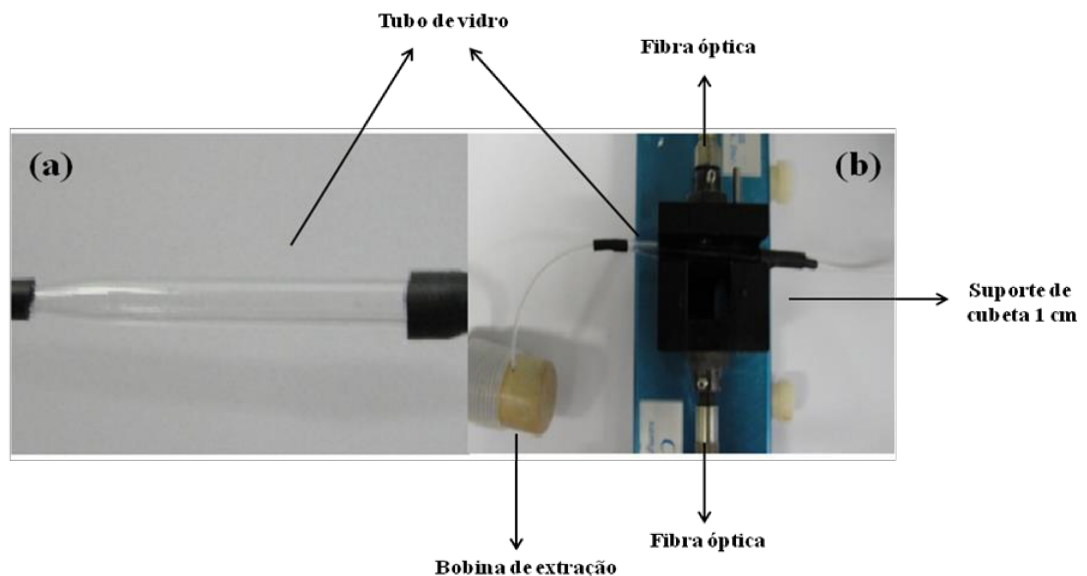
As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro multicanal com arranjo linear de 2048 fotodetectores do tipo CCD (Ocean Optics, USB 4000), uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, LS-1) e fibras ópticas para transporte da radiação.

Uma bomba peristáltica Minipuls TM 3 (Gilson, Villiers Le Bel, França) de oito canais e tubos Tygon® foram empregados para a propulsão das soluções de reagentes através do sistema. O sistema FIA com multicomutação foi desenvolvido empregando três válvulas solenoide de três vias (NResearch, West Caldwell, Nova Jérsei, Estado Unidos), tubos de polietileno (Ismatec, Alemanha, 0,7 milímetros), confluência de Teflon e uma bobina de reação de 110 cm (Ismatec, Alemanha, 0,7 milímetros) inicialmente.

Para controle das válvulas solenoide utilizou-se uma plataforma de hardware livre (Figura 8) e de placa única (Arduíno®), conectada à porta USB 2.0 de um microcomputador (processador Celeron 2.4 Ghz, 256 Mb de memória RAM). Um circuito integrado ULN2803 (Figura 8) foi utilizado para a compatibilização da diferença de potencial (12V) que é a corrente necessária para o acionamento das válvulas solenoide, utilizando-se um diodo regulador de tensão (Diodo Zener). As variáveis para a rotina da análise foram estabelecidas em linguagem C++ (com algumas modificações) no software fornecido pelo fabricante da plataforma (Figura 9).

O arranjo experimental utilizado para as medidas espectrofotométricas é mostrado na Figura 10. Um tubo de vidro (5 cm de comprimento e 4 mm d.i.) foi usado como cela de detecção. As fibras ópticas foram manualmente alinhadas para maximizar a incidência de radiação no sistema de detecção. A cela e as fibras ópticas foram fixadas em um suporte para cubeta de 1 cm fornecido pela Ocean Optics (CUV-UV holder).

Figura 10 - Fotografias do arranjo experimental utilizado para as medidas espectrofotométricas no procedimento para determinação de surfactantes aniônicos: (a) tubo de vidro (5 cm de comprimento e 4 mm d.i.) usado como cela de medida; (b) adaptação do tubo no suporte da cubeta, alinhamento das fibras ópticas e conexão do tubo de vidro à bobina de extração de PTFE.



Fonte: Autora.

3.2 Reagentes e Soluções

Para o preparo das soluções, utilizou-se água deionizada do sistema de purificação Gehaka modelo OS10 LZ, deste modo todas foram preparadas em grau analítico. A solução estoque de Fe^{2+} $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada misturando-se, em proporção 1:1, as soluções de cloreto de bário diidratado (Synth) e sulfato ferroso heptaidratado (Nuclear) em meio acidificado com 4,2 mL de ácido clorídrico (Dinâmica) Em seguida a solução de Fe^{2+} foi centrifugada, recolhendo-se o sobrenadante. Também preparou-se uma solução estoque de tiocianato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, com as soluções estoques preparadas transferiu-se uma

alíquota de cada na concentração desejada para um balão volumétrico de volume desejado obtendo-se a solução de $\text{Fe}^{2+}/\text{SCN}^-$. Esta foi mantida sob proteção da luz.

Para as análises no método titulométrico utilizou-se clorofórmio (SP Labor), ácido acético (Dinâmica), solução saturada de iodeto de potássio (Synth) e solução 0,002 N ou 0,01 N de tiosulfato de sódio (Synth). Além da solução de iodeto de potássio e tiosulfato de sódio preparou-se solução de amido 10 g/L. Para obtenção da curva analítica utilizou-se octano (Synth) para diluir as amostras de azeite em variadas proporções.

As diferentes amostras de azeite analisadas foram comercialmente obtidas de supermercados da região.

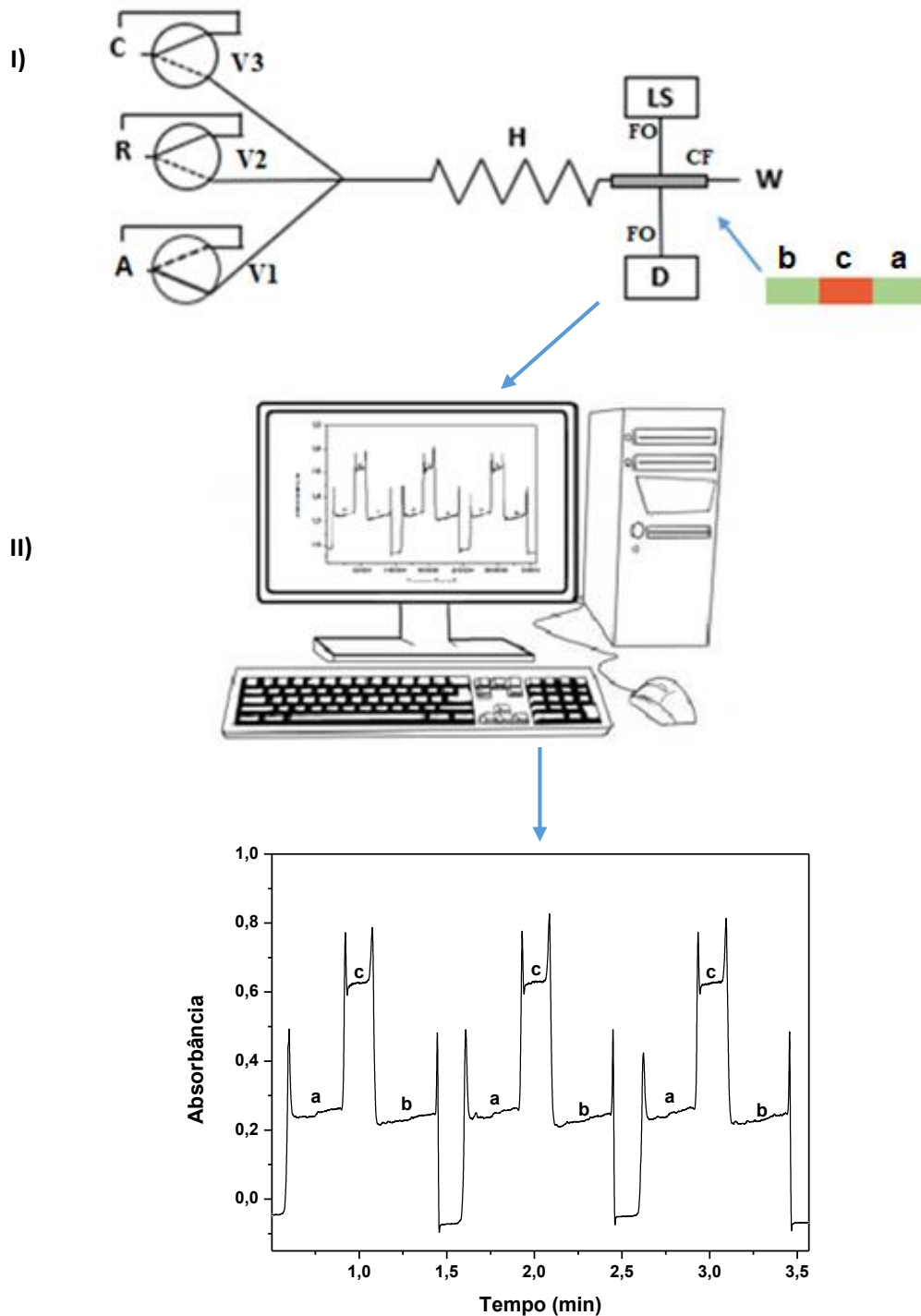
3.3 Metodologia

3.3.1 O sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)

O sistema FIA empregado no estudo encontra-se representado na Figura 11. Primeiramente, uma alíquota de azeite foi inserida no percurso analítico pela mudança de posição da válvula V1 para a posição de injeção, inserindo um volume estabelecido para a primeira alíquota de azeite. Em seguida V2 é acionado para inserção de um volume definido da solução reagente de $\text{Fe}^{2+}/\text{SCN}^-$. Aciona-se novamente V1 e insere-se uma segunda alíquota de azeite de volume definido. A zona de amostra formada por azeite-reagente-azeite foi transportada por um fluxo de água, inserido após acionada a V3, no percurso analítico até a cela de fluxo, onde a zona de reagente foi monitorada por um espectrofotometro em comprimento de onda de 470 nm. Durante o acionamento de uma válvula, as soluções bombeadas por outras válvulas retornavam para os respectivos frascos de origem.

Os sinais transientes de absorbância em 470 nm foram obtidos empregando-se o software OOIBase32. Antes de realizar cada análise efetuou-se uma medida na ausência de radiação (dark) e o sinal de referência (apenas a solução de $\text{Fe}^{2+}/\text{SCN}^-$ na cela). Os dados referentes a aquisição de sinal para cada variável em estudo foram devidamente salvos e posteriormente tratados por meio do programa gráfico OriginPro 8.lnk. Todos os estudos foram realizados em quatro replicatas.

Figura 11 - Sistema de análise por injeção em fluxo para determinação do índice de peróxido em azeite. I) A: azeite; R: solução de Fe^{2+} / SCN^- , C: água; H: percurso analítico; FO: fibras óticas; CF: célula de fluxo; LS: fonte de radiação; D: multicanal espectrofotômetro; W: saída de resíduos; II) Perfil do sinal da absorvância em função do tempo. a: azeite (1ª alíquota); b: azeite (2ª alíquota); c: reagente.



Fonte: Adaptado de Pereira; Rocha (2014).

* A linha contínua, representa a ocorrência do fluxo das soluções.

3.3.2 Microextração líquido-líquido

A LLME baseou-se na partição dos hidroperóxidos do azeite para a fase aquosa contendo Fe^{2+} e SCN^- . Desta forma, ocorreu interações através do filme formado nas paredes internas do reator, bem como nas interfaces fase aquosa/óleo. A determinação do índice de peróxido baseou-se na mudança de coloração da alíquota de Fe^{2+} e SCN^- ocasionada pela oxidação do Fe^{2+} em Fe^{3+} que forma com o SCN^- um complexo de coloração avermelhada, uma vez que a oxidação ocorreu devido os hidroperóxidos extraídos do azeite.

3.3.3 Método de referência

O método utilizado como referência para comparação com o procedimento proposto encontra-se disposto no Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão Europeia (Anexo III). O mesmo consiste na titulação do iodo formado a partir da oxidação do iodeto de potássio a iodo ocasionada por hidroperóxidos contidos no azeite.

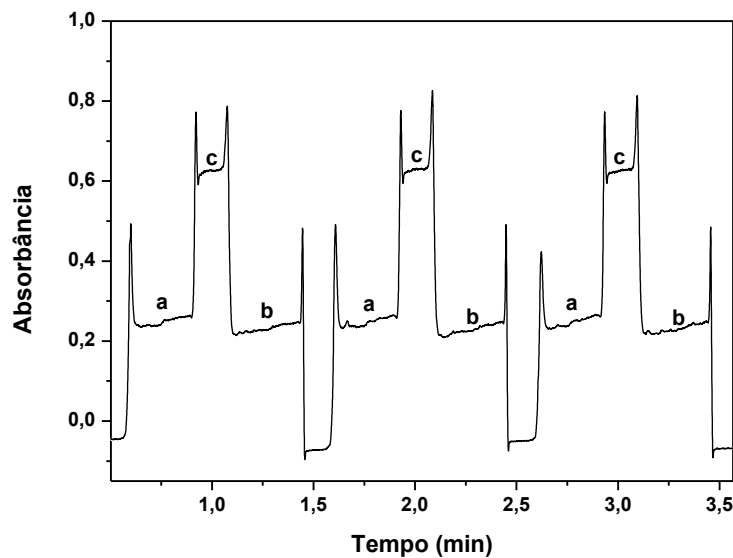
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do sistema FIA

Inicialmente, foram realizados estudos de otimização do sistema FIA de modo a identificar as melhores condições para a extração dos hidroperóxidos e ocorrência das reações entre Fe^{2+} /hidroperóxidos e $\text{Fe}^{3+}/\text{SCN}^-$. Os estudos foram realizados por meio do método univariado, o qual permite que cada variável seja analisada separadamente. Os perfis dos sinais obtidos estão apresentados na Figura 12.

Assim, primeiramente determinou-se a vazão dos tubos responsáveis pela transferência de cada fluido até sua respectiva válvula solenoide. Para o tubo responsável pelo transporte da água foi obtida uma vazão de $700 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ enquanto que, os tubos referentes ao azeite e o reagente (solução de $\text{Fe}^{2+}/\text{SCN}^-$) a vazão foi de $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. As condições iniciais empregadas foram as seguintes: percurso analítico de 110 cm, volume da segunda alíquota de azeite em $100 \mu\text{L}$, alíquota de reagente em $50 \mu\text{L}$ e as concentrações das soluções de Fe^{2+} e SCN^- em $17,0$ e $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente (MÉNDEZ; GÁLVEZ; MOSQUERA, 2001).

Figura 12 - Perfil dos sinais obtidos na LLME de hidroperóxidos de azeites de oliva. a e b: alíquotas de azeite; c: alíquota de reagente.



Fonte: A autora.

4.1.1 Volume das alíquotas de azeite e da solução $\text{Fe}^{2+}/\text{SCN}^-$

A otimização dos volumes das alíquotas de azeite e reagente foram realizadas visando alta eficiência de extração, bem como, minimizar o consumo de amostras, e conseqüentemente, a geração dos resíduos.

Os intervalos de volume que foram avaliados e os valores selecionados estão dispostos na Tabela 3. Estes foram selecionados considerando-se o comprimento do caminho reacional inicial, para que o volume total da injeção (azeite-reagente-azeite) coubesse no mesmo evitando implicações no desempenho analítico.

Tabela 3 - Otimização dos volumes do sistema em fluxo para determinação do índice de peróxidos em azeite.

| Variável | Intervalo Avaliado | Volume selecionado |
|---|--------------------|--------------------|
| 1ª alíquota de azeite (μL) | 50 - 350 | 300 |
| 2ª alíquota de azeite (μL) | 50 - 350 | 350 |
| Alíquota do reagente (μL) | 50 - 350 | 100 |

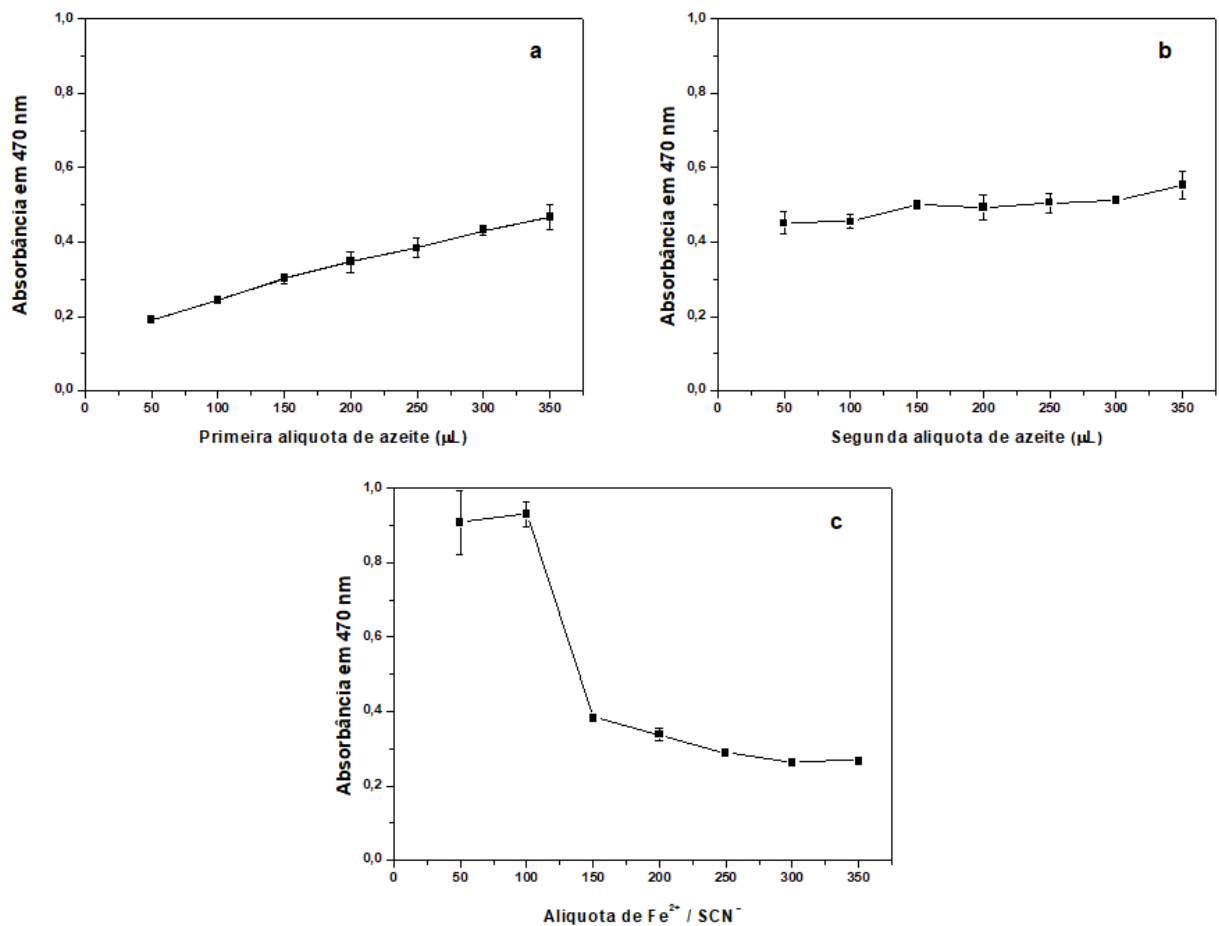
Fonte: A autora.

Analisando a Figura 13.a, observou-se que o sinal analítico aumentou com o volume de azeite para a primeira alíquota, cuja principal função é formar o filme de azeite nas paredes internas do tubo favorecendo maior transferência dos hidroperóxidos do azeite para o meio aquoso contendo Fe^{2+} e SCN^- , uma vez que, está poderá ocorrer tanto no sentido radial quanto no axial (BORGES; FIGUEIREIDO; QUEIROZ, 2015). E, somado a isso, quanto maior o volume da primeira alíquota mais espesso tende a ser o filme formado favorecendo a extração. Assim, escolheu-se trabalhar com o volume de 300 μL , pois, um dos objetivos é minimizar o consumo de amostras (e conseqüentemente, a geração de resíduos) sem prejudicar o desempenho analítico. Além disso, considerando o desvio obtido, o ganho de sinal analítico não foi significativo entre 300 – 350 μL para que fosse gasto maior volume de reagente (Figura 13.a).

Para segunda alíquota de azeite, observou-se por meio da Figura 13.b que o sinal analítico possuiu comportamento quase constante, pois, esta possui a função de recolhimento do filme anteriormente formado no tubo, como também, conter a dispersão do reagente (fase aquosa) no carregador (água). Logo, fixou-se o volume da segunda alíquota de azeite em 350 μL .

Em contrapartida, a medida que o volume da alíquota de reagente aumentou o sinal analítico reduziu significativamente conforme Figura 13.c. Acredita-se que as extrações são mais eficientes entre as interfaces azeite/reagente (sentido axial), do que nas interfaces filme de azeite/reagente (sentido radial). Pois, quanto maior o volume de azeite na interface maior a concentração de hidroperóxidos a serem extraídos. E neste caso, o volume de azeite na alíquota é maior que no filme formado. Assim, quando se aumenta o volume da alíquota de reagente maior será a diluição dos hidroperóxidos e, conseqüentemente, menor concentração destes na alíquota de reagente. Logo, um volume menor da alíquota o complexo formado após a extração dos hidroperóxidos encontra-se mais concentrado, conferindo, maior sinal analítico. Assim, fixou-se o volume da alíquota de reagente em 100 μL .

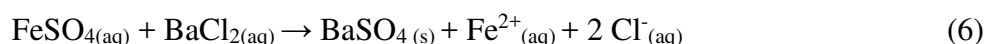
Figura 13 – Efeito dos volumes da a) 1ª alíquota de azeite; b) 2ª alíquota de azeite; c) alíquota de reagente.



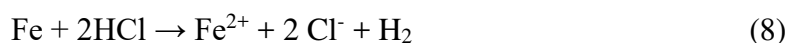
Fonte: A autora.

4.1.2 Concentração de Fe^{2+} e SCN^-

A presença de fosfatos, boratos, iodatos, sulfatos, acetatos, oxalatos, tartaratos e citratos interferem na formação do complexo tiocianato de ferro (III) pois, são ânions competidores por ferro.(SERON, 2013). Com isso, durante o preparo da solução de Fe^{2+} misturou-se o sulfato de ferro com cloreto de bário com o objetivo de eliminar a presença de sulfato no meio. O qual precipitou na forma de sulfato de bário (6).



A adição do ácido clorídrico ao meio teve como finalidade evitar a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} , somado a isso, minimizar a hidrólise do ferro que resulta na precipitação do mesmo na forma de hidróxido de ferro, reduzindo quantitativamente a presença de ferro no meio. O ácido clorídrico é conhecido como ácido não oxidante. Este, tipo de ácido oxida metais cujos E° (potencial padrão do eletrodo) são negativos e liberam gás hidrogênio. Assim, o ferro que é solúvel em ácido clorídrico diluído e concentrado, ao ser oxidado pelo ácido clorídrico forma sais de Fe^{2+} e libera gás hidrogênio.(MARTINS, 2002; SERON, 2013).



Com o volume da solução reagente fixado em 100 μL , investigou-se o efeito das concentrações de Fe^{2+} e SCN^- . Os intervalos de concentração que foram avaliados e os valores selecionados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Otimização da concentração de Fe^{2+} e SCN^- do sistema em fluxo para determinação de IP em azeite.

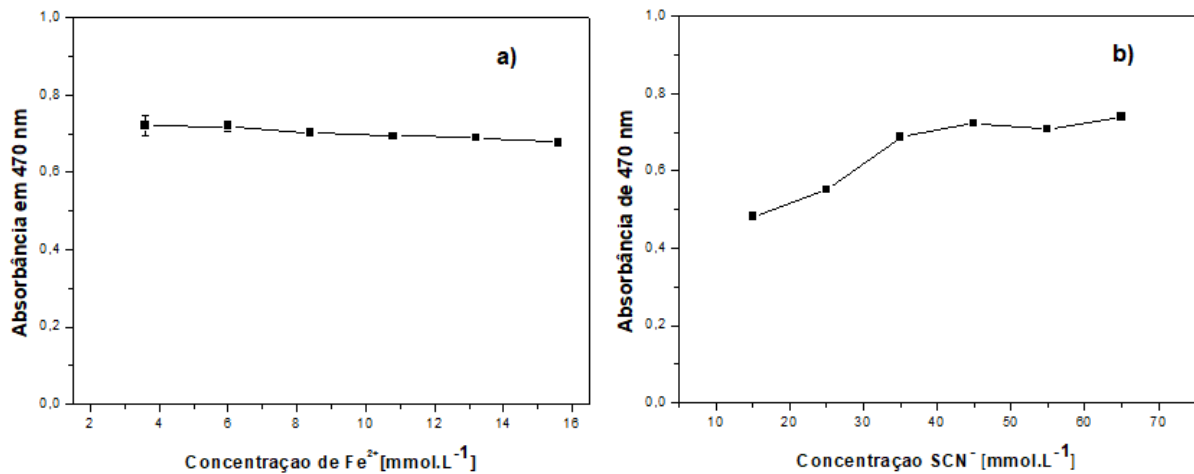
| Variável | Intervalo Avaliado | Concentração selecionada |
|---|--------------------|--------------------------|
| Fe^{2+} (mmol L^{-1}) | 3,60 – 15,6 | 6,00 |
| SCN^- (mmol L^{-1}) | 15,0 – 65,0 | 45,0 |

Fonte: A autora.

Como observado na Figura 14.a, o sinal analítico apresentou comportamento consideravelmente constante em relação a concentração da solução de Fe^{2+} . Já em relação a

concentração de SCN^- foi observado um comportamento crescente significativo, Figura 14.b.

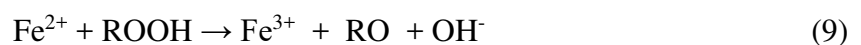
Figura 14 – Influência das concentrações: a) da solução de Fe^{2+} ; b) da solução de SCN^- .



Fonte: A autora

Vale ressaltar que durante as otimizações da concentração de Fe^{2+} , a concentração de SCN^- encontrava-se fixa em 50 mmol L^{-1} , bem como, para a otimização da concentração de SCN^- o Fe^{2+} encontrava-se com concentração fixa em $3,6 \text{ mmol L}^{-1}$

O meio reacional pode ser dividido em duas etapas: a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} devido a presença dos hidroperóxidos extraídos para a fase aquosa (9) e a complexação do Fe^{3+} com o SCN^- (10).



Vermelho intenso

No sistema FIA ocorre a extração não-exaustiva, de modo que, não há uma extração completa do analito, mas o suficiente para que se obtenha um sinal analítico. Somado a isso, neste sistema as extrações do analito são teoricamente constantes, pois, trabalha-se em condições rigorosas de volume, tempo e vazão. Assim, a quantidade de hidroperóxidos que são extraídos para a fase aquosa é a mesma independente da concentração de Fe^{2+} no meio, ou seja, mesmo em concentrações maiores os hidroperóxidos extraídos não conseguirão reagir com todo o Fe^{2+} oxidando-o.

Assim como o Fe^{2+} , o SCN^- é um dos reagentes necessários para a formação do complexo $[\text{Fe}(\text{SCN})]^{2+}$. E, como a presença de Fe^{3+} no meio é limitada pela extração dos

hidroperóxidos, uma forma de garantir o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do complexo é aumentar a concentração do SCN^- no meio. Este não necessita de uma reação anterior para sua obtenção no meio.

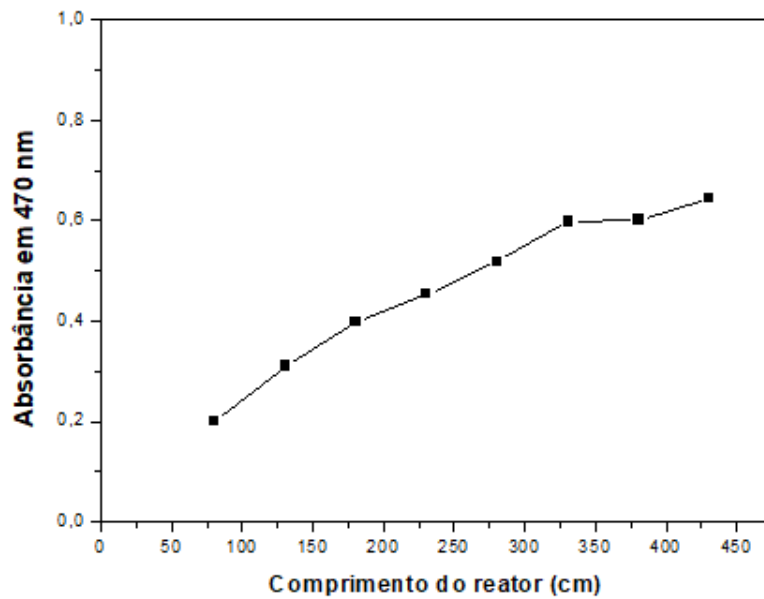
Logo, a concentração de Fe^{2+} foi fixada em $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$ para que houvesse excesso da espécie no meio e a quantidade de Fe^{2+} fosse suficiente para reagir com os hidroperóxidos, ou seja, evitar o esgotamento do reagente e conseqüentemente, garantir maior eficiência de extração. Enquanto que para o SCN^- optou-se pela concentração de $0,045 \text{ mol L}^{-1}$, para também garantir o excesso do reagente, pois, a partir de $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ o ganho de sinal analítico não foi significativo, indicando haver uma quantidade de SCN^- suficiente para reagir com o Fe^{3+} .

4.1.3 Comprimento da bobina reacional

O aumento do comprimento do reator influencia a extensão do filme de azeite formado nas paredes do tubo e, conseqüentemente, aumenta a superfície de contato entre as fases aquosa-orgânica. Além disso, aumenta o tempo de contato do reagente com os hidroperóxidos que também favorece a microextração. Com base nisso, o reator teve seu comprimento variado no intervalo de 80,5 a 430,5 cm.

Como pode ser observado na Figura 15, o aumento do comprimento contribuiu para o aumento significativo da resposta analítica até 330,5 cm. Logo, optou-se por trabalhar com este comprimento, pois, um reator de elevado comprimento reduz a frequência de amostragem e aumenta o tempo de análise.

Figura 15 – Efeito do comprimento do reator no sistema em fluxo.



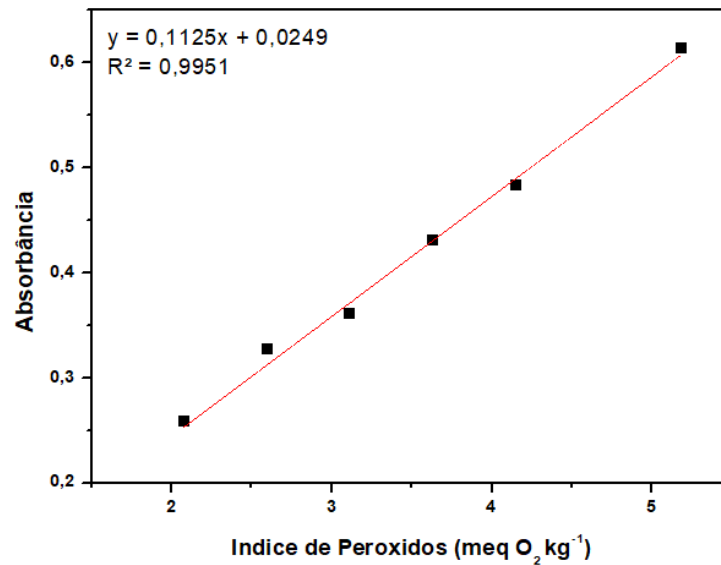
Fonte: A autora.

4.2 Características Analíticas

4.2.1 Faixa Linear

Foi observada uma faixa linear entre 2,0 – 6,0 meq O₂ kg⁻¹. Para construção da faixa linear foi empregado o seguinte método: adotou-se uma das amostras de azeite como padrão, de modo que, a concentração de hidroperóxidos dessa amostra foi considerada o ponto de maior concentração da curva. E esta concentração foi determinada por meio do método titulométrico. Os demais pontos, foram obtidos diluindo-se a amostra com octano. E determinou-se a concentração da amostra padrão por meio, do método oficial titulométrico.

Figura 16 - Curva de calibração obtida através da diluição com octano de uma amostra com valor de IP conhecido (n=3).



Fonte: A autora.

4.2.2 Limite de Detecção e Quantificação

Para a determinação do limite de detecção (LD), com o intuito de verificar qual a menor concentração do analito na amostra que o sistema FIA consegue detectar realizou-se 20 análises substituindo o azeite por octano, o qual foi utilizado como branco. E calculou-se o LD por meio da equação (11) (SKOOG, 2001):

$$LD = \frac{3 s_b}{b} \quad (11)$$

Onde,

s_b = refere-se ao desvio padrão do branco e

b = a inclinação da reta obtida para este experimento.

E o limite de quantificação (LQ), que corresponde a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada foi obtido multiplicando-se o LD por 3 (12) (SKOOG, 2001):

$$LQ = 3 LD \quad (12)$$

O LD obtido para o sistema foi de 0,05 meq O₂ kg⁻¹ e o LQ 0,15 meq O₂ kg⁻¹.

4.2.3 Coeficiente de Variação

Para determinar o coeficiente de variação, de modo a verificar o quão repetitivo o procedimento pode ser realizou-se a injeção de 20 amostras de azeite e calculou-se o coeficiente por meio da equação (13) (SKOOG, 2001):

$$C.V = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100\% \quad (13)$$

Onde,

σ = desvio padrão

\bar{X} = média das 20 injeções

O coeficiente de variação foi de 0,60% conferindo ao procedimento boa repetibilidade e baixa variação.

4.2.4 Frequência de amostragem

A frequência de amostragem foi calculada com base no número de análises possíveis por hora. Estimou-se a frequência de amostragem em 36 h⁻¹.

4.2.5 Exatidão

A exatidão do procedimento proposto foi avaliada pela análise das amostras pelo método oficial baseado em titulometria. Os valores obtidos por ambas as técnicas são apresentados na Tabela 5. Aplicando o teste t-pareado com um nível de confiança de 95%, pode confirmar que os valores obtidos pelo método proposto são estatisticamente similares aos valores obtidos pelo método oficial.

Tabela 5 - Comparação dos resultados obtidos pelos procedimentos: proposto e oficial.

| | Titulação (meq O ₂ kg ⁻¹) | FIA (meq O ₂ kg ⁻¹) |
|-----------|---|---|
| Amostra 1 | 5,02 ± 0,05 | 5,79±0,02 |
| Amostra 2 | 4,18±0,01 | 3,61±0,03 |
| Amostra 3 | 8,60±0,04 | 8,02±0,06 |
| Amostra 4 | 3,55±0,01 | 3,28±0,04 |
| Amostra 5 | 3,87±0,05 | 3,08±0,04 |
| Amostra 6 | 3,90±0,03 | 3,18±0,02 |

Fonte: A autora.

4.3 Comparação do procedimento desenvolvido com outros métodos

4.3.1. Comparação entre titulação e FIA

Comparando com o procedimento oficial titulométrico, é possível observar na Tabela 6 que o método FIA proposto para a determinação do IP em azeite possui como vantagens: um gasto consideravelmente menor de azeite por análise, bem como de reagentes, conseqüentemente, menor geração de resíduos e menor tempo de análise. Além disso, para que o método volumétrico tenha precisão depende de uma variedade de parâmetros, tais como, tempo e proteção da mistura de reação da luz e ar atmosférico. Vale ressaltar, que o método FIA ao contrário do titulométrico, é realizado em sistema fechado reduzindo a exposição do analista aos reagentes durante a análise e somado a isso, dispensa o uso de solventes orgânicos tóxicos, por exemplo, o clorofórmio. Somado a isso, favorece a obtenção de resultados mais precisos e de maior qualidade como observado na Tabela 6. E ainda a frequência de amostragem para o sistema FIA é maior.

Tabela 6 - Comparação entre os volumes gastos no FIA e no método titulométrico.

| Procedimento | Regentes | Volume Gasto (mL) |
|---|---|-------------------|
| Oficial - Titulométrico ^a | Clorofórmio | 10,00 |
| | Ácido acético glacial | 15,00 |
| | Solução saturada de iodeto de potássio | 1,00 |
| | Tiosulfato de sódio* | * |
| | Solução de amido 10 g/L | * |
| | Água destilada | 75,00 |
| Alternativo - FIA ^b | Amostra de azeite | Conforme Tabela 2 |
| | 1 ^a alíquota de azeite | 0,30 |
| | 2 ^a alíquota de azeite | 0,35 |
| | Solução de Fe ²⁺ /SCN ⁻ | 0,10 |
| | Carregador - água | 0,117 |

Fonte: Comissão Europeia (1991)^a; A autora^b.

* O volume gasto da solução de Tiosulfato de Sódio dependerá da quantidade de iodo que restou da reação entre a amostra de azeite e a solução saturada de Iodeto de Potássio, conforme a equação química (1). A solução de amido é utilizada apenas como indicador na titulação.

4.3.2 Comparação entre FIA e Quimiluminescência

A determinação do IP por meio da quimiluminescência (STEPANYAN *et al.*, 2005) é um dos métodos propostos na literatura como alternativa para substituição do método oficial (titulométrico).

Quando compara-se o FIA com a quimiluminescência nota-se que o FIA possui como vantagens: menor número de reagentes utilizados, menor volume gasto para análise e consequentemente, menor geração de resíduos (Tabela 7). Somado a isso, dispensa o uso de catalisadores, o preparo das soluções são mais simplificadas, de modo que, as amostras de azeite para otimização do sistema dispensam preparos anteriores como no método em comparação e não necessitam que o meio atinja o ponto de equilíbrio para que a medida possa ser realizada. Por outro lado, o FIA não possibilita que as análises sejam realizadas em campo, gastando-se mais tempo para a obtenção de resultados.

Tabela 7 - Comparação dos volumes gastos de cada reagente nos métodos: FIA e Quimiluminescência.

| | Regentes | Volume Gasto (μL) |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| Quimiluminescência ^a | Solução 5×10^{-4} mol L ⁻¹ DMA | 1800 |
| | Solução $4,5 \times 10^{-3}$ M IMI* | 250 |
| | Solução $4,5 \times 10^{-4}$ TCPO | 200 |
| | Solução 150 μM Cloreto de Manganês (II) | 40 |
| | Solução de azeite | 25 |
| FIA ^b | 1 ^a alíquota de azeite | 300 |
| | 2 ^a alíquota de azeite | 350 |
| | Solução de Fe ²⁺ /SCN ⁻ | 100 |
| | Carregador - água | 117 |

Fonte: Adaptado de Stepanyan *et al.*, 2005)^a; A autora^b.

Como observado na Tabela 8, o FIA apresentou menor faixa linear. Pois, ao contrário do método da quimiluminescência não utilizou-se um padrão para a construção da curva, e sim, diluições de uma amostra conhecida de azeite com octano. Enquanto que, para o outro método utilizou-se o Delio S como padrão, o qual consiste em um óleo sem hidroperóxidos em sua composição e foram dopando o mesmo com solução de peróxido de hidrogênio 35% (1:2). Observa-se também que o FIA indicou menor desvio padrão do que a quimiluminescência, logo, o FIA é um método com maior repetibilidade.

Tabela 8 - Comparação entre as características analíticas dos métodos: FIA e quimiluminescência.

| Características Analíticas | Quimiluminescência ^a | FIA ^b |
|----------------------------|--|--|
| Faixa Linear | 0,6-100 meq. O ₂ kg ⁻¹ | 2 - 6 meq. O ₂ kg ⁻¹ |
| Desvio Padrão | 1 - 5 % | 0,6% |
| LD | NI | 0,05 meq. O ₂ kg ⁻¹ |

Fonte: Adaptado de Stepanyan *et al.*, 2005)^a; A autora^b.

* X corresponde à PV (meq O₂ kg⁻¹)

5 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o FIA é uma boa alternativa para determinação do IP em azeites de oliva. A otimização univariada possibilitou determinar as melhores condições que influenciam no procedimento, sendo, a melhor eficiência de extração obtida com os volumes de 300 e 350 μL para as alíquotas de azeite e 100 μL para a alíquota do reagente ($\text{Fe}^{2+}/\text{SCN}^-$). Concentrações de Fe^{2+} e SCN^- foram fixadas em 6,00 e 45,0 mmol L^{-1} , respectivamente. A curva analítica mostrou linearidade de 2,0 à 6,0 $\text{meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$. O limite de detecção, o coeficiente de variação ($n = 20$) e a taxa de amostragem foram de 0,05 $\text{meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$, 0,60% e 36 h^{-1} , respectivamente. O procedimento desenvolvido foi aplicado à análise de diferentes tipos de azeites, e todos os resultados foram concordantes (95% de confiança) com os obtidos pelo procedimento de referência de titulação.

O método desenvolvido além de possuir metodologia simples, possibilitou o uso de baixos volumes de amostra (650 μL), resultando na redução do volume de resíduos totais gerados (1,00 mL) e baixo consumo de reagentes (200 $\mu\text{g Fe}^{2+}$ e 300 $\mu\text{g SCN}^-$).

Somado a isso, a realização de análises em sistema fechado reduz os riscos de contaminações, instabilidade da solução de Fe^{2+} e ocorrências de reações paralelas, favorecendo a obtenção de resultados com maior qualidade e mais confiáveis. Além disso, dispensa o uso de solventes orgânicos tóxicos, garante menor exposição do analista aos reagentes e possui maior frequência de amostragem.

O FIA quando comparado com o método da quimiluminescência também proposto na literatura como alternativa ao método padrão (titulométrico) possui como vantagens: o uso de menor variedade de reagentes e volume, logo, menor geração de resíduos, dispensa o uso de catalisadores, o preparo dos reagentes é simples e menor desvio padrão indicando melhor repetibilidade. Mas, como desvantagens: não possibilita que as análises sejam realizadas em campo, conseqüentemente, a obtenção do resultado é mais morosa.

REFERÊNCIAS

- AUED-PIMENTEL, S. et al. Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 31–34, 2008.
- BASTOS, J. S. DA. **Desenvolvimento de sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de peróxido de hidrogênio e cetoconazol**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados. Disponível em: <http://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-QUIMICA/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Juraciema.pdf>. Acesso em: 23 set. 2018
- BONIFÁCIO, V. G. **Desenvolvimento de procedimentos em fluxo envolvendo Espectrofotometria Convencional e com longo caminho óptico para determinação de ânions em águas**. 2008. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6094/1949.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 02 nov. 2018
- BORGES, K. B.; FIGUEIREIDO, E. C. DE; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N.º 1 de 30 de Janeiro de 2012**. Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva. Diário Oficial da União, Brasília, 03 fev. 2012, Seção 1. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPort alMapa&chave=629707739>. Acesso em: 16 set. 2018.
- COMISSÃO EUROPEIA, **Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991**. Relativo as características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. Jornal Oficial da União Europeia, [s.l.]: 1991. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31991R2568&from=EN>. Acesso em: 16 set. 2018.
- FARAJZADEH, M. A. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 32, n. 18, p. 3191–3200, 2009.
- FELDMAN. A. **Azeite de Oliva Extra - Virgem: Prós e Contras**, 18 jan. 2018. Disponível em: <https://www.enxaqueca.com.br/blog/azeite-de-oliva-extra-virgem/>. Acesso em: 15 set. 2018.

FRANÇA, L. M. DE. **Desenvolvimento de sistema de análise por injeção sequencial para a determinação espectrofotométrica da capacidade antioxidante em bebidas empregando o radical derivado do N-fenil-1,4-fenilenodiamina**. 2011. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Bahia, Salvador. Disponível em: [https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/15802/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Leandro MF.pdf](https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/15802/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Leandro%20MF.pdf). Acesso em: 23 set. 2018.

FRUGERI, P. M. *et al.* A spectrophotometric flow injection system for streptomycin determination in veterinary samples. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l], v. 117, p. 304–308, 2014.

GALLO. **O Azeite de Oliva vs outras Gorduras: Benefícios do Azeite**, 2015. Disponível em: <https://www.galooliveoil.com/br/beneficios-do-azeite/azeite-vs-outras-gorduras.aspx>. Acesso em: 23 set. 2018.

GASTRO.P. **Como é produzido o azeite de oliva?**, 2018. Disponível em: <https://www.petitgastro.com.br/como-e-produzido-o-azeite-de-oliva/>. Acesso em: 15 nov. 2018.

GRANATO, D.; NUNES, D. **Análises químicas, propriedades funcionais e controle de qualidade de alimentos e bebidas: uma abordagem teórico - prática**. 1. ed. [s.l]: Elsevier Academic, 2016.

HASHEMI, B. *et al.* Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s.l], v. 97, p. 83–95, 2017.

KALUA, C. M. *et al.* Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 273–286, 2007.

KAMOGAWA, M. Y.; MIRANDA, J. C. Uso de hardware de código fonte aberto “Arduino” para acionamento de dispositivo solenoide em sistemas de análises em fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1232–1235, 2013.

KULKARNI, A. A.; VAIDYA, I. S. Flow injection analysis : An overview. **Journal of Critical Reviews**, [s.l], v. 2, n. 4, p. 19–24, 2015.

LABOR, S. **Como funciona uma bomba peristáltica**, 2018. Disponível em: <http://www.splabor.com.br/blog/bombas-peristalticas-2/aprendendo-mais-o-que-e-e-como-funciona-uma-bomba-peristaltica/>. Acesso em: 24 set. 2018.

MARTINS, A. C. *et al.* The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. **Food Chemistry**, London, v. 138, n. 1, p. 574–580, 2013.

MARTINS, F. G. **Estudo espectrofotométrico de oxidação no sistema Ferro (II)/ Tiocianato e seu aproveitamento analítico**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-16102002-151750/pt-br.php>. Acesso em: 15 out. 2018.

MÉNDEZ, D.H.; GÁLVEZ, A.P.; MOSQUERA, M.I.M. A Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Peroxide Value in Food Lipids with High Carotenoid Content. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 11, p. 1151-1155, 2001.

MIOR, R. *et al.* Desenvolvimento de um método analítico baseado em microextração líquido-líquido para a determinação de cromo (VI) em amostras aquosas com detecção por espectrometria de absorção atômica em chama. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 7, p. 942–946, 2013.

MITSUTAKE, H. *et al.* Use of Mass Spectrometry with Electrospray Ionization and Exploratory Analysis for Classification of Extra Virgin Olive Oil Adulterated with Vegetable Oils. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. 2180–2189, 2015.

NOUROS, P. G.; GEORGIU, C. A.; POLISSIOU, M. G. Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil peroxide value. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam v. 405, n. 1–2, p. 239–245, 2000.

OLIVA. **Azeite**, 2016. Disponível em: <http://www.oliva.org.br/azeite/>. Acesso em: 23 set. 2018.

OLIVEIRA, A. F. DE *et al.* Parâmetros físico-químicos dos primeiros azeites de oliva brasileiros extraídos em Maria da Fé, Minas Gerais. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 11, n. 3, p. 255–261, 2010.

OLIVEIRA, A. R. M. DE *et al.* Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 637–644, 2008.

PARIKH, A. *et al.* Flow injection : A new approach in analysis. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 118–125, 2010.

PEREIRA, A. C.; ROCHA, F. R. P. Liquid-liquid microextraction in a multicommuted flow system for direct spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 829, p. 28–32, 2014.

PINTO, G. F. **Desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação de formaldeído em cogumelos**. 2017. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. Disponível: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/20925>. Acesso em: 20 nov. 2018.

RAMA, E. C.; COSTA-GARCÍA, A.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T. Pin-Based flow

injection electroanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 9958–9963, 2016.

REIS, B. F., GINÉ, M. F. & KRONKA, E. A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, São Paulo, v.12, n. 1, p. 82-91, 1988.

REIS, B. F. **Análise química em fluxo: Princípios e aplicações**, 1988. Obra não publicada.

RIOS, H. C. S.; PEREIRA, I. R. O.; ABREU, E. S. DE. Avaliação da oxidação de óleos , gorduras e azeites comestíveis em processo de fritura. **Revista Ciência & Saúde**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 118–126, 2013.

RODRÍGUEZ, M. P.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Simple and clean determination of tetracyclines by flow injection analysis. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 153, p. 386–392, 2016.

ROSSINI, L. **O que é Índice de Peróxidos?**, 10 mai. 2014. Disponível em: <https://azeiterossini.com.br/2014/05/10/o-que-o-que-e-indice-de-peroxido/>. Acesso em: 16 set. 2018.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow Injection Analysis**. 2. ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1988.

SERON, L.H. **Unidade 5 - Reações Químicas**, 22 nov. 2013. Disponível em: http://livresaber.sead.ufscar.br:8080/jspui/bitstream/123456789/1913/2/Unidade%205_Texto_Rea%C3%A7%C3%B5es%20qu%C3%ADmicas.pdf. Acesso em: 15 out. 2018.

SILVA JUNIOR, R. C. DA. **Desenvolvimento de um método de análise por injeção em fluxo (FIA) para determinação de dissulfeto de tetrametiluram (Tiram) utilizando reagente imobilizado em reator de fase sólida (RFS)**. 2011. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97765/silvajunior_rc_me_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 20 set. 2018.

SKOOG, D A; HOLLER, F J; NIEMAN, T A. **Princípios de Análises Instrumental**. Mc Graw- Hill, São Paulo, 2001.

SPIETELUN, A. *et al.* Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, London, v. 119, p. 34–45, 2014.

STEPANYAN, V. *et al.* Chemiluminescent evaluation of peroxide value in olive oil. **Talanta**, London, v. 65, n. 4, p. 1056–1058, 2005.