

---

## 2.5 Conclusões

A partir dos testes realizados e resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- (i) DMPD, DEPD, PAP e PPD demonstraram ter potencialidade para determinação espectrofotométrica de sulfeto em batelada e em sistema de análise em fluxo;
- (ii) Em consequência da cinética lenta de formação dos respectivos corantes fenotiazínicos, as aminas PAA e PAP não foram avaliadas mais aprofundadamente;
- (iii) A geração de  $\text{Cl}_2$  e formação de bolhas em linha foi uma limitação para o emprego do  $\text{ClO}^-$  como oxidante;
- (iv) Nas faixas de concentração estudadas para a amina,  $\text{Fe}^{3+}$  e de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na solução da amina, o planejamento fatorial composto central só permitiu a otimização do procedimento de determinação de sulfeto em fluxo empregando o reagente DMPD;
- (v) Entre os reagentes avaliados e apesar de não estar nas condições ótimas, o DEPD mostrou ser o mais sensível para determinação espectrofotométrica de sulfeto, seguido do PPD e DMPD;

---

## 2.6 Referências

- ALMY, H.L., A method for the estimation of hydrogen sulfide in proteinaceous food products, *Journal of the American Chemical Society*, 47,1381,1925.
- APAH *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, 19 edition, Washington, DC, 1995.
- BOLTZ, D.F. e HOWOLL, J.A., *Colorimetric Determination of Nonmetals*, 2ª edition , John Wiley & Sons, NY, 1978.
- BORGES, S.S. e KORN, M., Geração sonoquímica de oxidantes em solução aquosa saturada de tetracloreto de carbono. *Química Nova*, 25, 558, 2002.
- CASELA, I.G., GUASCITO, M.R. e DESIMONI, E., Sulfide measurements by flow injection analysis and ion chromatography with electrochemical detection, *Analytical Chimica Acta*, 409, 27, 2000.
- CASSELLA, R.J., TEIXEIRA, L.G., GARRIGUES, S., COSTA, A.C.E., SANTELLI, R.E. e LA GUARDIA, M., Determination of sulfide in waters by flow-injection solid phase spectrophotometric, *Analyst*, 125, 1835, 2000.
- DU, J. LI, Y. e LU, J., Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-S<sup>2-</sup>/R- SH system, *Analytica Chimica Acta*, 448, 79, 2001
- ENSAFI, A., Flow-injection determination of traces of sulfide by the brilliant green – sulfide reaction with spectrophotometric detection, *Analytical Letters*, 325 (8), 1525, 1992.
- EROGLU, A.E., VOLKAN, M. e ATAMAN, O.Y., Fiber optic sensor using novel substrates for hydrogen sulfide determination by solid surface fluorescence, *Talanta*, 53, 89, 2000.
- ESPINOLA, A., Fritz Feigl – Sua obra e novos campos tecno-científicos por ela originados, *Química Nova*, 27, 169, 2004.
- FAN, X., YOU, J., KANG, J., OU, Q. e Q. ZHU, New reagents for determination of amino acids by liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization, *Analytica Chimica Acta*, 367, 81, 1998.
- FARHADI, K. e MALEKI, R., Triiodide ion and alizarin red S as two new reagents for the determination of clotrimazole and ketoconazole, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30 , 1033, 2002.
- FIAMEGOS, Y., STALIKAS, C. e PILIDIS, G., 4-aminoantipyrine spectrophotometric method phenol analysis. Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta*, 467, 105, 2002.
- FOGO, J.K. e POPOWSKY, M., Spectrophotometric determination of hydrogen Sulfide, *Analytical Chemistry*, 21(6), 1949.
- GOWDA, A.T. e GOWDA, N.M.M., Application of Azure A in the Spectrophotometric Determination of Penicillin Drugs, *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 93, 39, 2000.
- HUMPHREY, R. E. e HINZE, W., Spectrophotometric determination of cyanide, sulfide and sulfite with mercuric chloronilate, *Analytical Chemistry*, 43 (8), 1100, 1971.

- 
- HURSE, T.J. e ABEYDEERA, W.P.P., Quantification of sulfur and sulfur containing compounds in wastewater by means of a combination of liquid chromatographic methods, *Journal of Chromatography A*, 942, 201, 2002.
- JIMENEZ, D., MANEZ, M., SANCENON, F., LIS, J.V.R., BITO, A. e SOTO, J., A new chromo-chemodosimeter selective for sulfide anion, *Journal of the American Chemical Society*, 2003.
- KARABÖCEK, S., NOHUT, S., DALMAN E, Ö. e GÜNER, S., A new spectrophotometric reagent for copper: 3,30-(1,3-propanediylidimine)bis-[3-methyl-2-butanone]dioxime, *Analytica Chimica Acta*, 408, 163, 2000.
- KORN, M.G.A., FERREIRA, A.C., TEIXEIRA, L.S.G. e COSTA, A.C.S., Spectrophotometric Determination of Zinc Using 7-(4-Nitrophenylazo)-8-Hydroxyquinoline-5-Sulfonic Acid, *Journal Brazilian Chemistry Society*, 10 (1),46, 1999.
- KUBAN, V., DASGUPTA, P.K. e MARX, J.N., Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater, *Analytical Chemistry*, 64, 36, 1992.
- LAWRENCE, N.S., DAVIS, J. e COMPTON, R.G.; Analytical strategies for the determination of sulfide: a review; *Talanta*, 52, 771, 2000.
- LAWRENCE, N.S., DAVIS, J., MARKEN, F., JIANG, L. , JONES, T.G.J, DAVIES, S.N. e COMPTON, R.G., Electrochemical detection of sulphide: a novel dual flow cell, *Sensors and Actuators B*, 69,189, 2000.
- LEGGETT, D.J., CHEN, N.H. e MAHADEVAPPA, D.S., Flow injection method for sulfide determination by the methylene blue method, *Analytica Chimica Acta*, 128, 163, 1981.
- LEVENTIS, N., CHEN, M. e LEVENTIS, C.S., Synthesis of substituted phenothiazine analogous to methylene blue by electrophilic and nucleophilic aromatic substitutions in tandem. A Mechanistic perspective, *Tetrahedron*, 53 (29), 10083, 1997.
- LOBINSKI, R. e MARCZENKO, Z., *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23, 55, 1992.
- MA, D., LI, Y., M.A, K., LI, J., CHEN, J., YAN, J. e WANG, Y., A high-selectivity spectrophotometric reagent for determining platinum(IV), *Talanta*, 53, 937, 2001.
- MARCZENKO, Z., *Spectrophotometric determination of elements*, Ellis Horwood Limited, NY, 1976.
- MESTRES, M. BUSTO, O. e GUASCH, J., Analysis of sulfur compounds in wine aroma, *Journal Chromatography A*, 881, 569, 2000.
- MOHAMED, F.A. ABDALLAH, M.A. e SHAMMAT, S.M., Selective spectrophotometric determination of p-aminophenol and acetaminophen, *Talanta*, 44, 61, 1997.
- MOUSAVI, M.F. e SHAMSIPUR, M., Spectrophotometric determination of traces amounts of sulfide ion based on its catalytic reduction of toluidine blue, *Bulletin Chemistry Society of Japan*, 65, 2770, 1992.
- NETO, B.B., SCARMINIO, I.S. e BRUNS, R.E., *Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, Editora Unicamp, 2ª edição, Campinas, 2003.
- NOE, C.R., KORNILIOS, S. e LACHMANN, 7-chloro-4-methyl-6-nitro-2H-chromen-2-one: a novel type of reagent for fluorescence analysis, *Tetrahedron Letters*, 44, 845, 2003.

- 
- PUACZ, W. e SZAHUN, J., Catalytic determination of sulfite in blood, *Analyst*, 120, 939, 1995.
- QUAGLIANO, J.V. e L.M. VALLARINO, L.M., *Química*, 3ª edição, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1973.
- REES, T.D., GYLLENSPETZ, A.B. e A.C. DOCHERTY, The determination of traces amounts of sulphide in condensed steam with N,N-diethyl-p-phenylenediamine, *Analyst*, 96, 201, 1971.
- RUZICKA, J. e HANSEN, E.H., *Flow Injection Analysis*, 2ª edition, John Wiley & Sons, NY, 1988.
- RUZICKA, J. e HANSEN, E.H. Flow injections analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Analytica Chimica Acta*, 78, 145, 1975.
- SAFAVI, A. e RAMEZANI, Z., Kinetic spectrophotometric determination of traces of sulfide, *Talanta*, 44, 1225, 1997.
- SEGUNDO, M. A. e RANGEL, O.S.S., A gas diffusion sequential injection system for the determination of sulphur dioxide in wines, *Analytica Chimica Acta*, 427, 279, 2001.
- SHIMOICHI, S., TSUKAMOTO, M., KUGA, K., SADAMTISU, J., NAKAGOSHI, T. e ZENKI, M., Synthesis of a new color –developing reagent for spectrophotometric determination of soaps on the basis of a ion association reaction of aqueous solution , *Analytical Sciences*, 17, 1335, 2001.
- SILVA, M.S.P., GALHARDO, C.X. e MASINI, J.C., Application of sequential injection-monosegmented flow analysis (SI –MSFA) to spectrophotometric determination of sulfide in simulated water samples, *Talanta*, 60, 45, 2003.
- SINGH, V., GOSAIN, S., MISHRA, S., JAIN, A. e VERMA, K.K., Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in air and water utilizing ethylene blue formation, *Analyst*, 125, 1185, 2000.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M. e HOLLER, F.J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7ª edition, Saunders College Publishing, Florida, 1997.
- SZABADVÁRY, F., *History of Analytical Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1966.
- UENO, K., IMAMURA, T. e CHENG, K.L., *Handbook of Organic Analytical Reagents*, 2ª edition, CRC Press, Florida, 1992.
- VALCÁRCEL, M., *Automatización y miniaturización en Química Analítica*, Springer, Barcelona, 2000.
- VALLEJO, B., P. RICHTER, TORAL, I., TAPIA, C. e LUQUE DE CASTRO, M.D., Determination of sulphide in liquid and solid samples by integrated pervaporation-potentiometric detection, *Analytica Chimica Acta*, 436, 301, 2001.
- WELCHER, F.J., *Organic Analytical Reagents*, 4ª edition , D. Van Norstrand Company, New Jersey, 1947.
- WHITE, P.C., LAWRENCE, N.S., DAVIS, J. e COMPTON, R.G., Electrochemical initiated 1,4 additions: a versatile route to the determination of thiols, *Analytica Chimica Acta*, 447, 1, 2001.
- YANG, X., GUO, X. Q. e ZHAO, Y. B., Novel spectrofluorimetric method for the determination of sulfide with rhodamine B hydrazine in a micelar medium, *Analytica Chimica Acta*, 456, 121, 2002.

---

ZHAO, S., XIA, X. e HU, Q., Complex formation of the new reagent 5-(6-methoxy-2-benzothiazoleazo)-8-aminoquinoline with cobalt and nickel for their sensitive spectrophotometric detection, *Analytica Chimica Acta*, 391,365, 1999.

ZHAO, Y.Y., CAI, L. S., JING, Z.Z., WANG, H., YU, J.X. e ZHANG, H.S., Determination of aliphatic amines using *N*-succinimidyl benzoate as a new derivatization reagent in gas chromatography combined with solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1021,175, 2003.

---

## CAPÍTULO III

---

### **Desenvolvimento de Sistema em Fluxo para a Determinação de Sulfito pelo Método do Azul de Metileno pela Redução a Sulfeto**

---

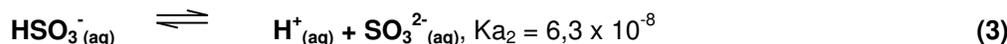
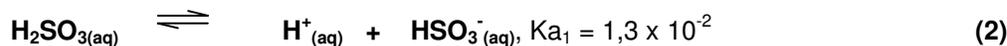
Neste capítulo é apresentada uma breve revisão sobre a química do S(IV), sua importância, seu uso em alimentos e os métodos de análise. É apresentado e discutido um sistema em fluxo para determinação indireta de sulfito em vinho e suco de frutas, no qual o sulfito em meio ácido é reduzido em linha para H<sub>2</sub>S, pela reação com Zn<sup>0</sup>; o qual permeia através de membrana de PTFE, encontrando os reagentes para a formação do azul de metileno. Para a redução, permeação e fixação do H<sub>2</sub>S foi construída uma unidade integradora de operações. Um circuito eletrônico foi desenvolvido para controle das válvulas solenóides, visando pré-concentração em linha do H<sub>2</sub>S. Para quantificação espectrofotométrica do H<sub>2</sub>S gerado empregou-se o método do azul de metileno. Foram otimizadas as condições do sistema e o método proposto foi comparado com procedimentos de referência.

## 3.1 Introdução

### 3.1.1 Compostos de S(IV)

O enxofre, no estado de oxidação IV, pode se encontrar na forma de  $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_3$ , sulfitos e bissulfito (Quagliano e Vallarino, 1973). O  $\text{SO}_2$  é um gás estável, incolor e com odor desagradável e irritante, formado pela redução de sulfatos, acidificação de soluções de sulfito ou pela queima de enxofre ao ar ( $\Delta H_{\text{form}}^\circ = -71.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). O  $\text{SO}_2$  é um agente alvejante e de fumigação, sendo usado na esterilização de frutas secas e vinhos. Adicionalmente, o  $\text{SO}_2$  apresenta propriedades antioxidantes que caracterizam seu uso como conservante em alimentos (Quagliano e Vallarino, 1973; Sienko e Plane, 1974).

O  $\text{SO}_2$  se dissolve em água formando solução de  $\text{H}_2\text{SO}_3$ , o qual é um ácido diprótico fraco e seus sais correspondentemente são os sulfitos ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) e os hidrogeno sulfitos ( $\text{HSO}_3^-$ ). Em solução aquosa o  $\text{H}_2\text{SO}_3$  apresenta os seguintes equilíbrios (Bronikowska e Rudzinski, 1995):



Como qualquer ácido fraco, a distribuição das espécies derivadas do  $\text{H}_2\text{SO}_3$  em meio aquoso varia com o pH do meio, como pode ser observado pelas curvas das frações ( $\alpha$ ) de cada espécie apresentadas na Figura 3.1.

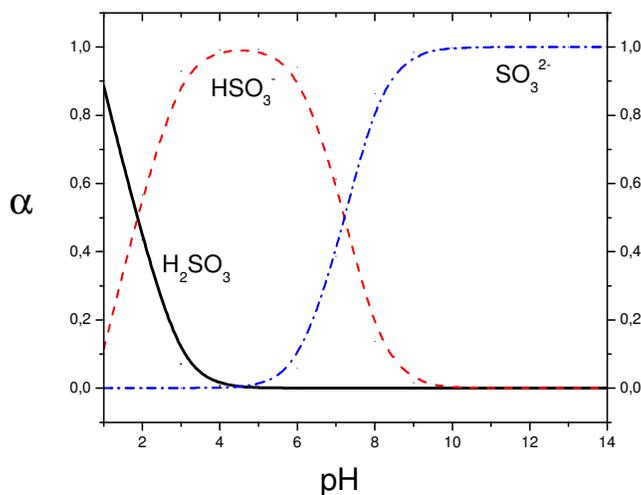


Figura 3.1. Distribuição das espécies de sulfito em solução aquosa em função do pH.

Muitas reações de interesse de compostos de S(IV) estão relacionadas ao fato destes serem agentes redutores. Esta propriedade é justificada possivelmente pelas formas isoméricas do  $\text{H}_2\text{SO}_3$  (Figura 3.2), devido ao fato das ligações S–H (2) serem redutoras, o que explicaria também a formação do íon  $\text{HSO}_3^-$  (Martins e Andrade, 2002 e Lee, 1980).

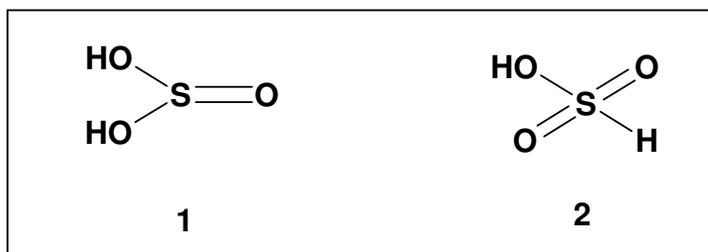


Figura 3. 2. Espécies isoméricas do ácido sulfuroso.

### 3.1.2 Uso de Compostos de S(IV) em Alimentos

Desde a antiguidade, os gregos, romanos e egípcios utilizam o  $\text{SO}_2$  na limpeza e preservação de barris de vinho (Fazio e Warner, 1990), mas somente a partir de 1920 que os compostos derivados do  $\text{SO}_2$  (sulfitos) têm sido regularmente utilizados no preparo, estocagem e distribuição de alimentos. As principais funções da adição de compostos de S(IV) em alimentos são a ação antimicrobiana e fungicida; a inibição da descoloração por processos enzimáticos e não-enzimáticos; ação antioxidante; capacidade de inibição de enzimas, incluindo as proteases, oxidases e peroxidases; e, como agente clareador (Leclercq *et al.*, 2000). Devido as suas múltiplas funções, os sulfitos e seus derivados são usados em diferentes tipos de alimentos, sendo seu uso recomendado em sucos de frutas, para a estabilização da coloração de frutas, em vinhos, em crustáceos (camarão e lagosta), cogumelos, geléias, cervejas, entre outros. Para cada classe de alimentos existem teores referenciais estabelecidos pela legislação vigente. Porém, deve ser destacado que há restrições ao seu uso em alguns alimentos, como, por exemplo, em carne vermelha bovina, devido à intensificação da coloração vermelha proporcionada pela adição de sulfito em carnes deterioradas, induzindo ao consumidor a impressão de estar adquirindo carne fresca. A Legislação brasileira admite teores máximos de sulfito entre 0,02 e 0,045%, a depender do tipo de alimento (Simão, 1987). Os teores máximos permitidos para sulfito em produtos comercializados em território nacional são apresentados na Tabela 3.1.

Os teores das espécies de S(IV) em alimentos devem ser controladas para não propiciarem odores desagradáveis (Aquarone *et al.*, 1983), efeitos citotóxicos, mutagênicos e antinutricionais, principalmente pela capacidade destes compostos de interagirem com algumas vitaminas: nicotinamida, tiamina (vitamina  $\text{B}_1$ ), piridoxina (vitamina  $\text{B}_6$ ) e ácido fólico (Pizzofetrato *et al.* 1998).

Tabela 3.1. Teores máximos de espécies de S(IV) admitidos pela Legislação brasileira para alguns alimentos (adaptado de Simão, 1987).

<b>Alimento</b>	<b>Teor máximo (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>
Geléias artificiais	200
Legumes e verduras desidratados	200
Produtos de frutas	200
Sucos de frutas	200
Sucos de frutas concentrados	300
Vinagres	200
Vinhos	450
Xaropes de glicose	450

Na Tabela 3.2 são apresentados os principais compostos de S(IV) utilizados como aditivos em alimentos no Brasil. A tabela foi construída relacionando o aditivo a um respectivo número gerado pelo Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (INS), elaborada pelo Comitê para Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos, para estabelecer um sistema numérico internacional de identificação dos aditivos alimentares nas listas de ingredientes, como alternativa à declaração do nome específico do aditivo (ANVISA, 2004).

Tabela 3.2. Principais aditivos de S(IV) utilizados no Brasil com seus respectivos INSS (adaptado de ANVISA, 2004).

<b>Aditivo</b>	<b>INS</b>
Dióxido de enxofre	220
Sulfito de sódio	221
Bissulfito de sódio	222
Metabissulfito de sódio	223
Metabissulfito de potássio	224
Sulfito de potássio	225
Sulfito de cálcio	226
Bissulfito de cálcio	227
Bissulfito de potássio	228

O íon sulfito possui nucleofilicidade suficiente para reagir, por adição, com compostos que apresentem grupos carbonílicos, produzindo adutos hidroxissulfonatos; ligações duplas carbono-carbono; quinonas; compostos heterocíclicos nitrogenados; além de açúcares reduzidos e proteínas (Pizzoferrato *et al.*, 1998). Essas reações com sulfito podem ocorrer nos produtos alimentícios, condicionadas à natureza, tipo de processamento e tempo de estocagem do alimento. Neste sentido, existe uma diferenciação entre as espécies de sulfito presentes nos alimentos. O “sulfito livre” é caracterizado por não está associado a nenhum tipo de composto e, por analogia, o “sulfito ligado” será caracterizado como aquele associado com algum composto que contenha os grupos funcionais acima mencionados. Desta forma, o teor de “sulfito total” corresponderá à soma das concentrações do sulfito na forma livre e ligada.

O sulfito nos vinhos geralmente encontra-se ligado, formando adutos com compostos carbonílicos (gerando hidroxissulfonatos) ou com as antocianinas. Para o vinho branco o sulfito geralmente encontra-se

associado ao formaldeído, sendo que a distribuição deste aduto é dependente do pH. Burroughs e colaborador em 1973 descreveram um extenso estudo sobre os equilíbrios dos principais compostos carbonílicos do vinho associados ao sulfito (Burroughs e Sparks, 1973). Para o vinho tinto geralmente o sulfito encontra-se ligado as antocianinas, como apresentado na Figura 3.3.

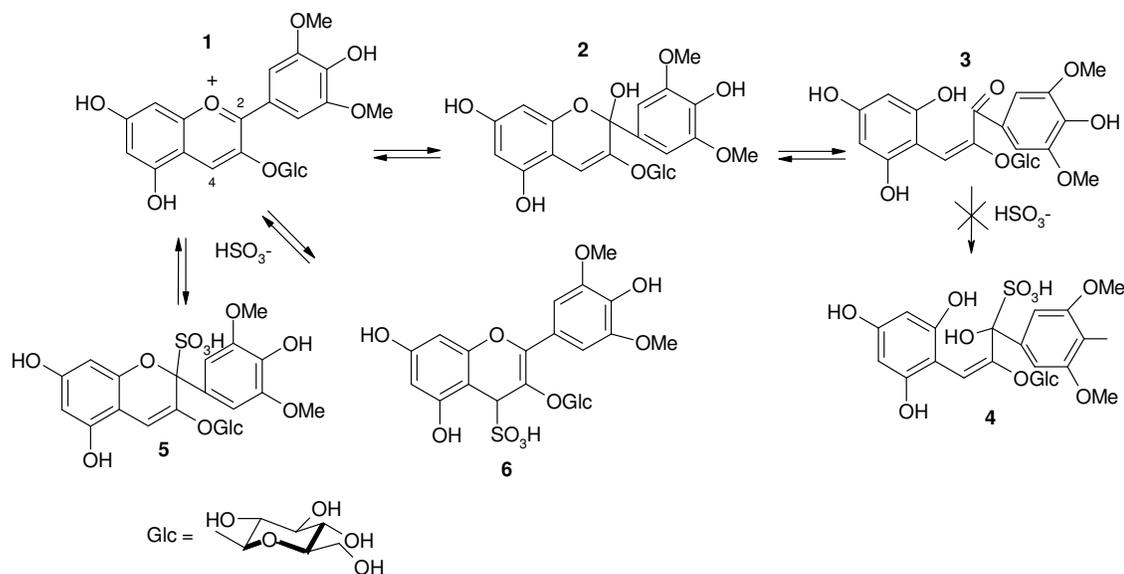


Figura 3.3. Representação dos equilíbrios de malvidin 3-O-glucosídeo (1) e reação com  $\text{HSO}_3^-$ .

O equilíbrio mostrado na Figura 3.3 depende do pH, assim, com o aumento deste ocorre a formação do carbinol, 2 e da chalcona, 3. Geralmente o pH do vinho é em torno de 3 – 3,5 (Aquarone, 1983) e possibilita a ocorrência das três espécies acima observadas, 1, 2 e 3. Desta forma, Jurd em 1964 demonstrou através de estudos espectrais que a reação do sulfito ocorria com a antocianina 1 e não com a chalcona 3. Porém, somente em 1998 com o trabalho de Berké e colaboradores que a estrutura foi totalmente elucidada através da combinação de RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D e  $^{33}\text{S}$ , a qual foi designada como a estrutura 6.

Geralmente, o sulfito ligado é recuperado *in vitro* pela acidificação e aquecimento da solução do alimento, enquanto que *in vivo*, esta espécie é liberada no trato digestivo. Deve ser considerado que o sulfito liberado no trato digestivo pode causar irritações gástricas, intoxicação para pessoas com reduzida atividade de sulfito oxidase, além de poder ser o precursor de asma brônquica (Leclercq *et al.*, 2000). Portanto, é necessário o conhecimento da distribuição da concentração das espécies de sulfito ligada e livre nos alimentos. Esta necessidade levou ao desenvolvimento de métodos analíticos capazes de quantificar e especiar sulfito em amostras complexas (Fazio e Warner, 1990).



---

notórias desvantagens: são laboriosos, empregam grandes quantidades de amostra (50 a 100 g), demandam longo período de análise (~2 amostra por hora) e permitem, em princípio, quantificar apenas o sulfito total. Contudo, já foram reportadas modificações no procedimento que possibilitam determinar quantitativamente sulfito livre e total, seguindo na essência o método preconizado por Monnier-Williams (Pizzoferrato *et al.*, 1998).

Na literatura são reportados vários outros procedimentos para determinação de sulfito em diferentes matrizes e em várias faixas de concentração. Os métodos freqüentemente relatados são: espectrofotométricos (Boltz e Howoll, 1978), fluorimétricos (Xin-Qi *et al.*, 2001; e, Yang *et al.*, 2002); cromatográficos com detecção eletroquímica (Casela *et al.*, 2000) e fluorimétrica (Gru *et al.*, 1998), cromatografia iônica (Miura *et al.*, 1998), eletroforese capilar (Jankovskiene *et al.*, 2001) e polarográficos (Umiker *et al.*, 2002).

Vários procedimentos para análise em fluxo também foram desenvolvidos para a determinação de sulfito. Estes empregavam detecção amperométrica (Alipázaga *et al.*, 2002), potenciométrica (Hassan *et al.*, 2001), enzimática (Fatibello Filho e Vieira, 1997 e Groom *et al.*, 1993) e por quimioluminescência (Qin *et al.*, 1998 e Qin *et al.*, 1998).

Em geral, as principais limitações dos métodos citados de análise de sulfito estão relacionadas à etapa de preparo da amostra, pureza e no processo de obtenção do reagente, principalmente se os métodos empregarem enzimas. Estes fatores corroboram com o fato da determinação de sulfito geralmente estar associada a uma etapa de separação (extração, difusão ou destilação). Neste sentido, é interessante que os métodos propostos possam simplificar esta etapa, visando incrementar o ritmo analítico, sem comprometer o nível de confiabilidade estabelecido para os resultados. Este efetivamente é um dos motivos que tornam atraentes o emprego de sistemas de análise em fluxo no desenvolvimento de métodos analíticos. Entre outras vantagens, os sistemas de análise em fluxo apresentam como características a redução física e temporal de operações, redução da manipulação e do consumo de reagentes e amostra, além da redução da quantidade de resíduos gerados, bem como permitem a incorporação de dispositivos no percurso analítico que possibilitam processos de separação e pré-concentração em linha (Reis *et al.*, 1989 e Rocha *et al.* 2001).

Uma das grandes vantagens do emprego de sistemas de análise em fluxo para as determinações de sulfito em amostras de alimentos é a possibilidade de separação do analito da matriz por difusão gasosa através de membrana permeável. Em 1979 foi desenvolvido por Baadenhuijsen e Seuren-Jacobs um sistema de análise em fluxo que empregava este conceito para determinação de CO<sub>2</sub> em plasma sanguíneo (Van der Linden, 1983). Desde então, são reportados trabalhos na literatura para determinação de diferentes analitos : NH<sub>3</sub> (Lima *et al.*, 1999); H<sub>2</sub>S (Kuban *et al.*, 1992); SO<sub>2</sub> (Weever e Kraak, 1997); ácido acético (Rangel e Toth, 1999); HF, HCN e CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (Ruzicka e Hansen, 1988); e, indireta para ácido tartárico (Rangel e Toth, 1998), utilizando difusão em linha.

A utilização do recurso da difusão gasosa em sistemas de análise em fluxo pode ser basicamente efetivada pela incorporação no sistema de um dispositivo que permita que líquidos fluam independentemente e paralelamente através dele. Assim, a inserção em uma das correntes de fluxo da

---

amostra líquida, em condição tal que permita a conversão do analito em uma espécie volátil capaz de se difundir pela membrana; e, tendo uma solução receptora fluindo na linha paralela, a primeira, capaz de converter a espécie derivada do analito original em uma forma estável no meio líquido, este poderá ser separado da matriz e, se necessário, pré-concentrado. Em muitos casos, as soluções são separadas por membrana semipermeável e a transferência do analito para o percurso analítico ocorre geralmente em um único módulo (Ruzicka e Hansen, 1988).

O emprego de sistemas de separação é decisivo para aumentar a seletividade dos procedimentos analíticos em geral e especialmente em sistemas de análise em fluxo (Canham *et al.*, 1988). Conceitos similares são aplicados para separação de espécies de interesse em sistemas em fluxo. Entre estes se destacam a pervaporação (Grassi *et al.*, 2002) e a diálise (Calatayud, 1995). A pervaporação pode ser caracterizada como a integração da evaporação com a difusão gasosa em um único módulo, no qual ocorrem a agitação ou o aquecimento da amostra. Na diálise, a separação pode ser comparada a uma micro-filtração, onde as espécies de menor massa molar são separadas de moléculas mais pesadas por difusão.

Para todos os casos, a seletividade e potencialidade do método estão condicionadas a alguns critérios, como a eficiência da separação, seletividade da membrana à(s) espécie(s) de interesse, concepção do sistema de fluxo e o tipo de detector selecionado.

Calatayud, em 1995, afirmava que a espectrofotometria era a técnica mais empregada em sistema de análise em fluxo. Os principais procedimentos com detecção espectrofotométrica para a determinação de sulfito utilizam corantes derivados do trifenilmetano - verde de malaquita (Cunniffi, 1995) e p-rosanilina (West e Gaeke, 1956). O método do verde de malaquita está associado à perda da coloração característica do reagente na presença de nucleófilos, como o sulfito. O mesmo princípio (descolorimetria) pode ser usado para a determinação de sulfito com p-rosanilina. Porém, diferenças estruturais entre os corantes possibilitam a geração de coloração na presença de formaldeído, após reação com sulfito quando a p-rosanilina é empregada.

Padrões de reação semelhantes são reportados na literatura para outros reagentes destinados à determinação de sulfito. Entre estes deve ser destacado o método empregando o verde brilhante (Safavi e Ensafi, 1991), o 4,4'-diaminotrifenilmetano (Lambert *et al.*, 1982), o p-aminoazobenzeno (Kniseley e Throop, 1966), a p-nitroanilina (Bethge e Carlson, 1968) e a 2-amino-4-nitroanilina (Lambert *et al.* 1978). As estruturas dos reagentes citados são mostradas na Figura 3.5.

Um dos principais problemas encontrados para determinação de sulfito é a instabilidade deste em solução. Isto por que o sulfito é facilmente oxidado pelo oxigênio atmosférico. Para evitar a conversão indesejada do analito, foram consideradas as possibilidades de adição de alguns estabilizantes, destacando-se:  $\text{HgCl}_4^-$  (West e Gaeke, 1956), ciclohexanona (Lambert *et al.*, 1982), morfina (Raman *et al.*, 1986), acetona e formaldeído (Lindgren e Cedergren, 1982). As melhores condições de estabilização do sulfito são encontradas com  $\text{HgCl}_4^-$  e formaldeído. Uma alternativa para evitar a adição de estabilizantes é a preparação de soluções imediatamente antes de executar as determinações.

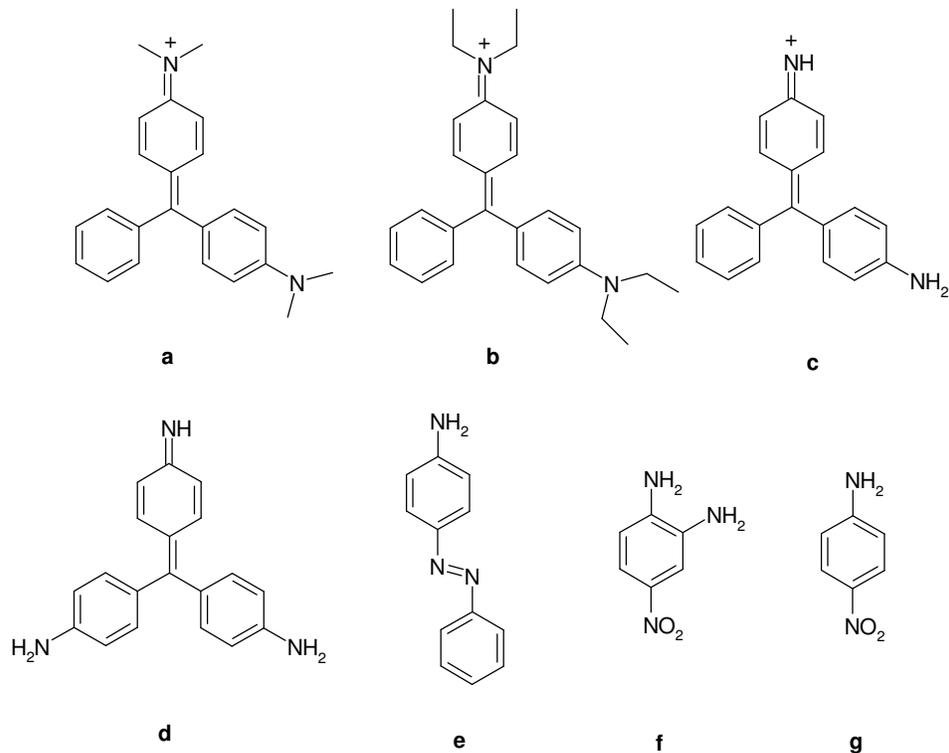


Figura 3.5. Reagentes orgânicos empregados para determinação de sulfito. (a) verde de malaquita, (b) verde brilhante, (c) 4,4'-diaminotrifenilmetano (d) p-rosanilina, (e) p-aminoazobenzene, (f) 4-nitro-1,2-diaminobenzene e (g) p-nitroanilina.

### 3.2 Metas

De acordo com os objetivos desta dissertação, as principais metas deste trabalho são:

- Desenvolvimento de sistema em fluxo para determinação de sulfito pelo método do azul de metileno através da redução a sulfeto;
- Desenvolvimento de unidade de integração de operações, visando o preparo, separação e reação para determinação indireta de sulfito;
- Otimização do sistema considerando as faixas de concentração do analito nas matrizes de estudo;
- Avaliação do desempenho do procedimento proposto e comparação com os resultados obtidos empregando procedimentos de referência.

---

## 3.3 Experimental

### 3.3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau analítico de pureza e suas soluções foram preparadas com água (condutividade  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) obtidas a partir de purificador EasyPure RF D7031.

Solução  $1 \text{ g L}^{-1}$  de DMPD (Merck) foi preparada a partir da dissolução de 1 g do reagente em 1 L de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Solução de  $\text{Fe}^{3+}$   $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada, dissolvendo 5,41 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Vetec) em 1 L de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Ambas as soluções eram inseridas isoladamente no sistema de fluxo para a produção de azul de metileno.

Solução carregadora 0,1% (m/v) de EDTA (Merck) e 15% (v/v) de álcool etílico (J.T. Baker) foi preparada dissolvendo 2 g de EDTA em água e acrescentando 300 mL de álcool etílico. O volume era levado para 2 L com água em balão volumétrico.

Solução de HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição apropriada do ácido concentrado. A solução de NaOH (Vetec)  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada a partir da dissolução de 1 g de NaOH em 500 mL de água.

Soluções de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}$  e ácido ascórbico foram preparadas para os testes de interferência a partir da diluição adequada de soluções estoque. Utilizou-se  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck),  $\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{nH}_2\text{O}$  (Merck) e ácido ascórbico (J.T. Baker), para os preparo das soluções aquosas.

Solução 2% (m/v) em acetato de zinco foi preparada, dissolvendo 2 g do reagente (Merck) em 100 mL de água, para, quando necessário, evitar a interferência do sulfeto presente nas amostras.

A solução estoque de sulfito era diariamente preparada, dissolvendo 0,157 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  anidro (Merck) em 1 L de solução de EDTA 0,01% (m/v), como proposto por Segundo *et al.*, 2002. As soluções de referência de sulfito foram preparadas, diluindo apropriadamente a solução estoque pouco antes de serem utilizadas nos experimentos, visando evitar a oxidação do sulfito (Lindgren e Cedegren, 1982).

### 3.3.2 Equipamentos

Para as determinações de sulfito pelo método do azul de metileno em sistema estático foi empregado espectrofotômetro Femto 432, equipado com cubeta de vidro com 10-mm de caminho óptico, e potenciômetro x-t modelo 107 Cole-Parmer.

Em geral, as determinações empregando sistema de análise em fluxo fizeram uso do espectrofotômetro Femto 432 equipado com cubeta de fluxo de 200  $\mu\text{l}$  e caminho óptico de 10 mm, do mesmo registrador já citado, de bomba peristáltica MiniPuls 3, Gilson, de oito vias, para a propulsão dos líquidos; válvula rotária Rheodyne 5020 de 6 portas, para a amostragem e injeção de amostra no percurso analítico; conjunto de válvulas solenóides de três vias 161T031, NRResearch; linhas de transmissão em polietileno (diâmetro interno de 0,8 mm) e tubos peristálticos de Tygon®. Os diagramas dos sistemas de fluxo empregados são apresentados nas Figuras 3.6 A e B.

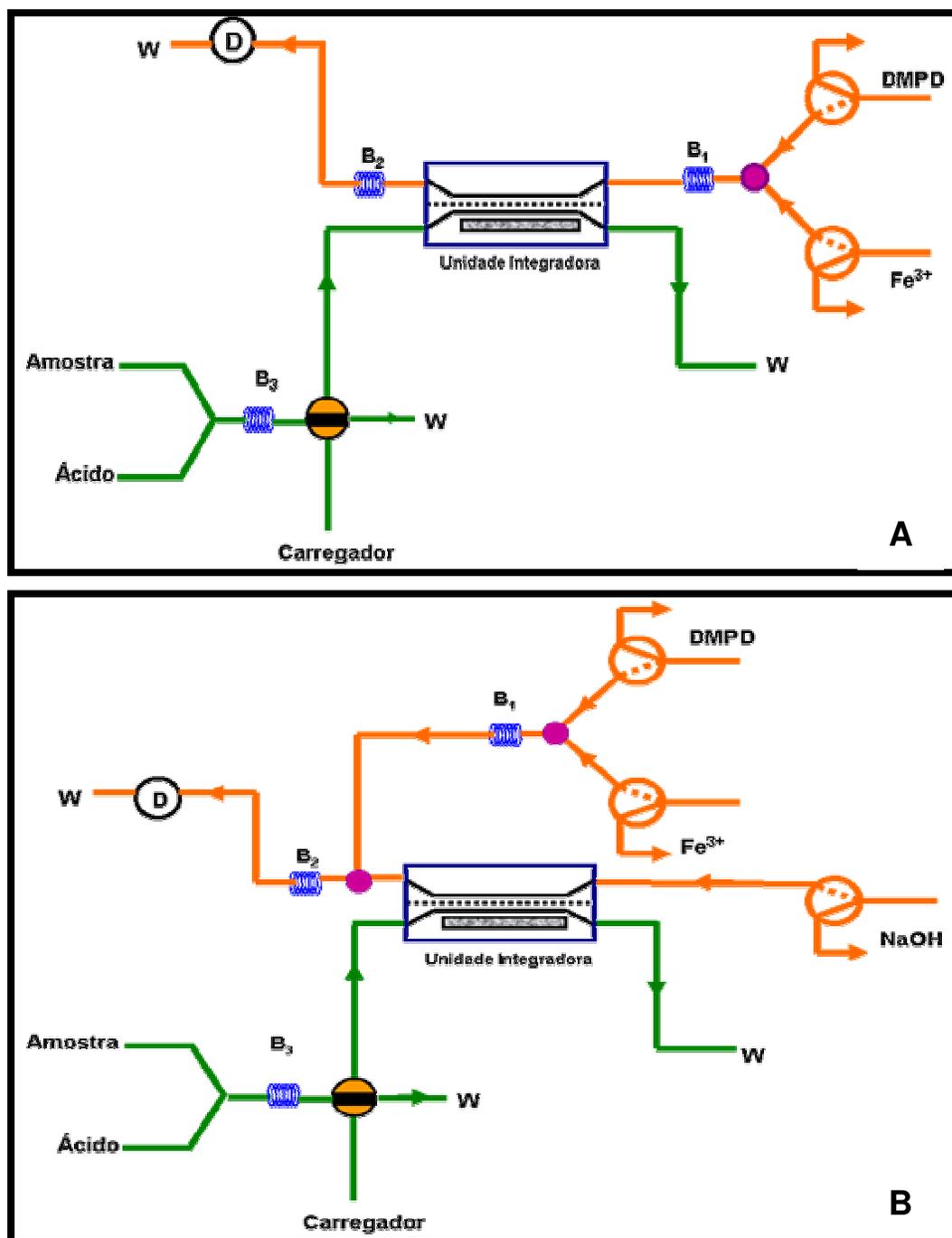


Figura 3.6. Diagramas de fluxo empregados para os estudos de pré-concentração com recepção em (A) solução de DMPD e Fe<sup>3+</sup> em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, e (B) solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup>. VR = Válvula rotária. UIO = Unidade integradora de operações. V1, V2 e V3 = Válvulas solenóides. B1, B2 e B3 = bobinas de reação. x e y = confluências. D = detector. W = Descarte.

Uma vez que muitos ensaios foram realizados em regime de interrupção do fluxo ("stop flow"), foi desenvolvido e acoplado ao sistema de amostragem (válvula rotária de 6 vias, apresentada na Figura 3.7)

um dispositivo eletromecânico para controle da ativação e desativação das válvulas solenóides. Este dispositivo era composto da própria válvula rotária (VR), na estrutura da qual foi incorporada uma haste metálica e duas chaves ópticas fixadas uma ao lado da outra, no próprio suporte da válvula, como apresentado no esquema da Figura 3.8. As chaves ópticas são dispositivos eletrônicos que são divididos em duas partes: um emissor de IV e um sensor. Quando uma chave óptica é ativada, o sensor capta a radiação emitida pelo emissor e responde similarmente a um transistor, até que a transmissão de radiação seja obstruída. Assim, a haste metálica incorporada à VR foi a peça utilizada para impedir a transmissão da radiação do emissor para o sensor. O acionamento do dispositivo foi condicionado ao giro e posição de VR (amostragem ou injeção). A haste fixada à VR passava pelas duas chaves ópticas (CH1 e CH2) que foram ligadas em série. Quando VR encontrava-se na posição de amostragem, a haste interrompia a transmissão em CH1, e as válvulas solenóides eram desativadas, seguindo o fluxo no sentido da UIO e do detector. Ao ir para posição de injeção com VR, a haste passava pela segunda chave óptica (CH2) e acionava V1, V2 e, quando pertinente, V3, de forma que os reagentes eram reciclados pelo intervalo de tempo programado. Assim, quando a haste fixada na VR passava na CH2, os fluxos das soluções de  $\text{Fe}^{3+}$ , DMPD e, quando pertinente, NaOH, na UIO eram interrompidos. Quando VR retornava à posição de amostragem (após o término da interrupção na parte superior da UIO) e passava pela segunda chave (CH2) ocorria acionamento de V1, V2 e V3, porém, estas eram desativadas quando o suporte atingia novamente a posição de amostragem, restabelecendo o fluxo em ambos os compartimentos da UIO.

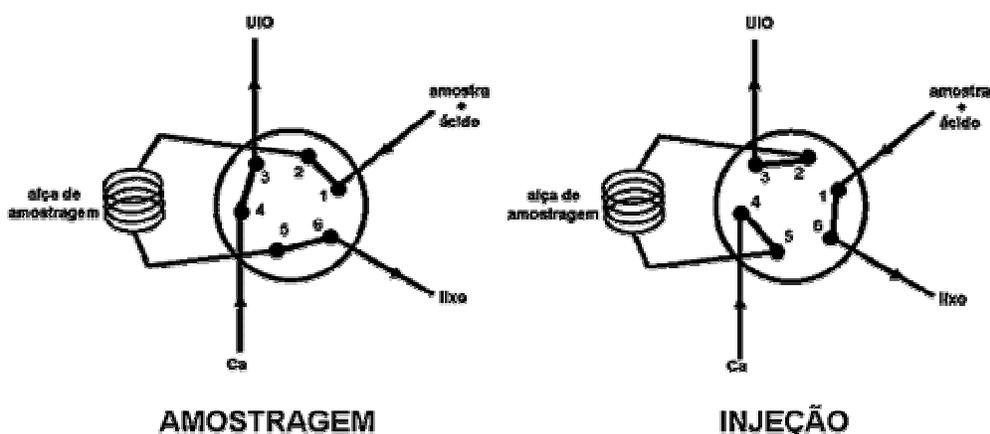


Figura 3.7. Esquema da VR, indicando os canais e a alça nas posições de amostragem e injeção.

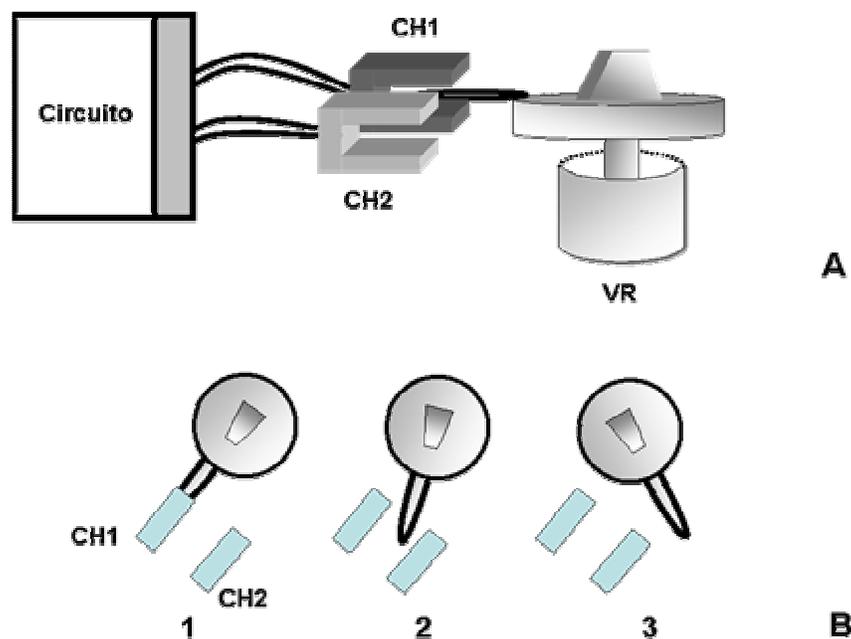


Figura 3.8. **(A)** Vista lateral da haste fixada na VR e as chaves ópticas (CH1 e CH2). **(B)** Vista frontal da VR em três situações distintas, (1) com a haste em CH1 – posição de amostragem, (2) haste entre CH1 e CH2 - em injeção, e (3) após a injeção.

O controle de tempo para o acionamento das válvulas solenóides quando VR passava da posição de amostragem para a de injeção, ou seja, após a haste passar por CH1 e CH2, foi feito empregando o circuito integrado (CI) 555. O tempo total de espera (interrupção do fluxo) era definido em função da resistência e capacitância dos dispositivos conectados, respectivamente, nas portas 6 e 8 do CI 555 (Scherz, 2000). O esquema do circuito construído é apresentado na Figura 3.9.

O circuito foi elaborado visando permitir o acionamento de V1, V2 e V3 para reciclo das soluções de DMPD,  $\text{Fe}^{3+}$  e NaOH, por conseqüência, interromper o fluxo destas soluções pela UIO por um intervalo de tempo controlado e, permitir a pré-concentração do  $\text{H}_2\text{S}$  produzido pela interação do sulfito, presente na amostra, com granulos de  $\text{Zn}^0$  retidos na vala da UIO.

O tempo de interrupção foi definido pela equação  $t(s)=1,1.R_1C_1$ , onde,  $R_1$  e  $C_1$  são respectivamente a resistência e a capacitância dos componentes ligados às portas 6 e 8 do CI (Scherz, 2000). Um resistor do tipo tripot, com resistência variável entre 0 a  $1\text{ M}\Omega$ , e um capacitor de  $47\ \mu\text{F}$ , destacados na Figura 3.9, possibilitariam um tempo máximo de interrupção real de 47,6 s. Inferior aos 52 s esperados pelo cálculo matemático.

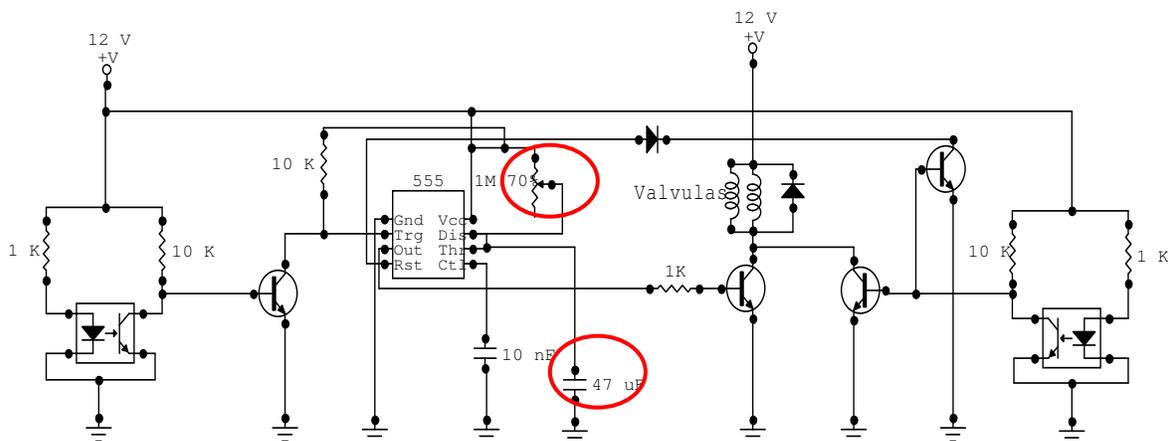


Figura 3.9. Diagrama do circuito eletrônico desenvolvido para controle das válvulas solenóides. Em destaque resistor e capacitor responsáveis pelo tempo de interrupção.

Para o sistema empregado nas determinações, o tempo efetivo utilizado para pré-concentração foi de 35,6 s, visto que a zona de amostra levava 12 s para atingir a UIO na vazão ótima. Ressalta-se que o uso das válvulas solenóides não configura o sistema em fluxo aqui proposto como multicomutado, pois no nosso caso todos estes três dispositivos eletromecânicos atuavam sempre de forma solidária e sincronizada.

Uma vez que muitos dos experimentos foram realizados sem a interrupção de fluxo para favorecer a permeação do  $H_2S$ , dois sistemas de análise em fluxo foram propostos para as condições de recepção direta em  $DMPD + Fe^{3+}$  e em solução de  $NaOH$ . Efetivamente, o diagrama destes sistemas eram similares àqueles apresentados nas Figuras 3.6A e 3.6B, com exceção de V1, V2 e V3 que foram abolidas. Os respectivos diagramas de fluxo são apresentados na Figuras 3.10 A e B.

Como anteriormente mencionado, uma unidade integradora de operações (UIO) foi construída pelo acoplamento de dois blocos de Perspex para viabilizar a associação de três operações unitárias em um único dispositivo nos sistemas de análise em fluxo propostos. Um dos blocos de Perspex foi usinado, criando uma vala com 72 mm de comprimento, 4 mm de largura e 2 mm de profundidade, para a acomodação do zinco granulado. Foram feitas furações em ambos os blocos para passagem dos fluxos e de seis parafusos responsáveis pela fixação da UIO. Aos dois compartimentos foram aderidas tiras de borracha de 1 mm de espessura, e entre as tiras foi inserida membrana de PTFE, de forma que toda a largura e comprimento da vala estivessem recobertos (Figura 3.11).

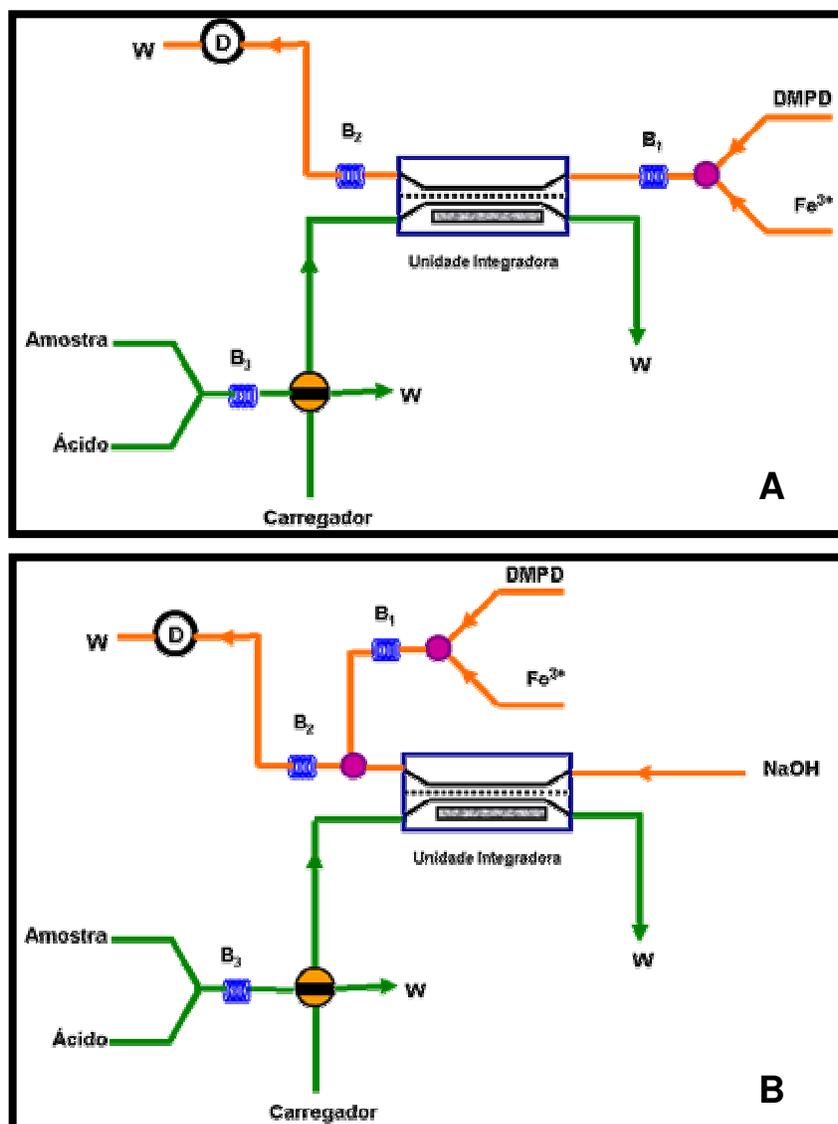


Figura 3.10. Esquema dos sistemas de análise em fluxo sem dispositivos para interrupção do fluxo. (A) Recepção em solução de DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  e de (B)  $\text{NaOH}$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$ .

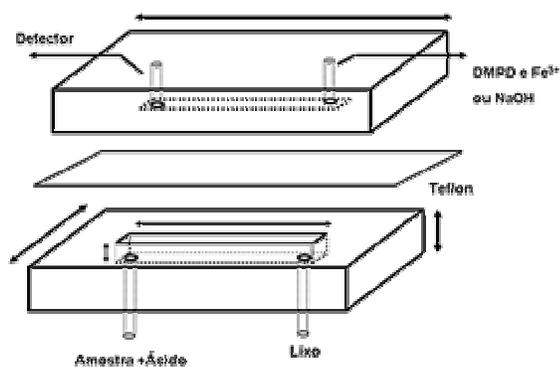


Figura 3.11. Esquema simplificado da unidade integradora de operações (UIO).

---

### 3.3.3 Procedimentos

Os sistemas propostos para a determinação de sulfito, em fluxo, foram baseados na redução do analito, na forma de  $\text{SO}_2$ , em meio ácido pelo zinco metálico, com a produção de  $\text{H}_2\text{S}$ . O  $\text{H}_2\text{S}$  gerado permeava através da membrana de PTFE da UIO, sendo receptado em solução de DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  ou, alternativamente, em solução de  $\text{NaOH}$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , seguindo para o sistema de detecção.

O processo de determinação de sulfito, empregando os módulos de análise propostos, pode ser sumariamente descrito como se segue:

Uma alíquota da amostra contendo sulfito era misturada em linha com alíquota de solução de ácido, levando à formação de  $\text{SO}_2$ . O  $\text{SO}_2$  gerado era reduzido pelo Zn granulado presente no compartimento inferior da UIO. A redução do sulfito a  $\text{H}_2\text{S}$  ocorria devido ao maior potencial de redução do Zn ( $E^\circ = 0,762 \text{ V}$ ) em relação ao do  $\text{SO}_2$  ( $E^\circ = 0,624 \text{ V}$ ) (Skoog *et al.*, 1997). Evidentemente que a concentração e o tipo de ácido, além do volume das alíquotas de ácido e amostra injetados interferiam diretamente na taxa de redução e, por conseqüência, na quantidade produzida de gás sulfídrico que podia permear através da membrana. Desta forma, estudos foram realizados visando estabelecer as melhores condições para a produção de  $\text{H}_2\text{S}$ .

Para a determinação de S(IV) em matrizes complexas, como para qualquer espécie volátil (ex. HCN,  $\text{NH}_3$ , álcool, entre outras), geralmente é conveniente a incorporação de uma etapa de separação no procedimento analítico. No sistema em fluxo proposto a separação ocorria em linha, no mesmo dispositivo onde era efetuada a redução do S(IV), empregando a UIO, esquematizada na Figura 3.11. Assim, a separação ocorreu, permeando o  $\text{H}_2\text{S}$  produzido através da membrana de PTFE. O  $\text{H}_2\text{S}$  produzido e permeado através da membrana era então coletado em solução ácida de DMPM +  $\text{Fe}^{3+}$  (Figuras 3.6 A e 3.10 A) ou, alternativamente, em solução de  $\text{NaOH}$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figuras 3.6 B e 3.10 B), visando à produção do azul de metileno.

Como já apresentado, a incorporação das válvulas solenóides (V1, V2 e V3) nos sistemas de fluxos esquematizados nas Figura 3.6 A e 3.6 B, visava à interrupção do fluxo para aumentar a taxa de permeação de  $\text{H}_2\text{S}$  pela membrana de PTFE. Isto por que, geralmente, a taxa de permeação em sistemas em fluxo é baixa, considerando a concentração total do analito injetado (Ruzicka e Hansen., 1988). Desta forma, para burlar a limitação da permeação em sistema dinâmico, onde as soluções doadoras (amostra + ácido) e receptoras ( $\text{DMPD} + \text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{NaOH}$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) são simultaneamente bombeadas foi desenvolvido um circuito eletrônico para controle das válvulas solenóides, criando uma situação temporária de interrupção do fluxo até o detector. A interrupção de fluxo ("stop flow") tradicionalmente é empregada quando: (i) se objetiva aumentar a sensibilidade da medida em função do aumento do tempo de residência (aumento do tempo de reação) ou, (ii) a velocidade da reação serve como base para o resultado analítico (métodos cinéticos) (Valcárcel *et al.*, 1987).

No sistema proposto para a determinação de sulfito em amostras de bebidas, tentou-se usar a interrupção do fluxo para a pré-concentração do  $\text{H}_2\text{S}$  permeado, visando aumentar a sensibilidade do método. Uma alternativa não explorada seria a interrupção do fluxo levando a rotação dos roletes da bomba

---

peristáltica a zero. Contudo, esta possibilidade não foi explorada. Como já apresentado, quando aplicada a interrupção do fluxo, as válvulas solenóides (V1, V2 e, quando pertinente, V3) eram ativadas e as soluções dos reagentes entravam em reciclo, como apresentado nas Figuras 3.6 A e 3.6 B. As válvulas solenóides geralmente são associadas a sistemas em fluxo acionadas por interfaces acopladas a computadores com softwares desenvolvidos para este controle. Contudo, para gerenciar o controle das válvulas solenóides foi construído no laboratório um circuito eletrônico que dispensava a associação a um computador. Informações sobre o circuito foram anteriormente apresentadas.

Os testes de performance e otimização dos sistemas foram efetuados sempre com soluções de referência de 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> em sulfito, visando atender a faixa de concentração de S(IV) nas amostras de bebidas em análise. Após a definição das melhores condições para a determinação de sulfito empregando recepção em solução de NaOH e em DMPD + Fe<sup>3+</sup>, o procedimento foi avaliado em amostras de sucos de frutas de pronto consumo e concentrados e em amostras de vinhos tinto e branco. Testes de recuperação foram realizados com amostras de sucos e de vinhos tinto e branco. Foram analisadas 11 amostras de vinhos de diferentes marcas, sendo 6 vinhos branco e 5 tintos. Quatro amostras de sucos concentrados e quatro amostras de sucos para pronto consumo de diferentes marcas e diferentes frutos (caju, maracujá, abacaxi e acerola) foram analisadas.

Para as determinações de sulfito livre em amostras de vinhos branco e tinto, as amostras não sofreram nenhum tipo de tratamento prévio. Contudo, nas determinações de sulfito total nas amostras de vinhos tinto e branco foi necessário um pré-tratamento, visando à liberação do S(IV) ligado. Assim, foram adicionados 1,6 mL de solução 4 mol L<sup>-1</sup> de NaOH a 10 mL das amostras. Posteriormente, caso fossem observados sólidos em suspensão, a amostra era centrifugada durante 10 min a 4000 rpm, e o sobrenadante era separado para prosseguir a análise.

Para amostras de sucos concentrados e de pronto consumo as amostras foram simplesmente centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min para a decantação de sólidos em suspensão e, após a separação do sobrenadante, era feita a amostragem no sistema de análise em fluxo, visando às determinações.

Para a comparação do desempenho do procedimento de análise em fluxo proposto foram empregados métodos de referência. Para a comparação dos resultados obtidos para sulfito livre (AOAC 47.3.45) e total (AOAC 47.3.44) em amostras de vinho branco. A comparação para sulfito livre e total em amostras de vinhos tinto foi realizada seguindo protocolo da União Européia, 1990 (a partir de Vahl e Converse, 1980). As amostras de sucos concentrados foram também analisadas, empregando método iodimétrico, visando à validação do procedimento de análise em fluxo proposto.

### **3.4 Resultados e Discussão**

Primeiramente foi testado o efeito do intervalo de tempo de interrupção do fluxo das soluções receptoras do H<sub>2</sub>S permeado, inserindo, no percurso analítico, soluções de referência de sulfito de 10 e 100 mg L<sup>-1</sup>, com recepção em solução de DMPD + Fe<sup>3+</sup> em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> e em solução de NaOH 50

mmol L<sup>-1</sup>, empregando os sistemas com interrupção de fluxo apresentados nas Figuras 3.6 A e 3.6.B, respectivamente. Estes estudos iniciais foram realizados, empregando a mesma alça de amostragem, os mesmos percursos analíticos e bobinas de misturas (B1 e B2). Os sinais obtidos para as injeções de 10 mg L<sup>-1</sup> com recepção em DMPD + Fe<sup>3+</sup> e em NaOH são apresentados na Figura 3.12 A e 3.12 B, respectivamente. Pôde ser constatado um discreto aumento do sinal analítico com o aumento do intervalo de tempo de interrupção do fluxo. Desta forma, o efeito de aumento de sensibilidade pela pré-concentração do H<sub>2</sub>S durante a interrupção do fluxo da solução receptora, como anteriormente previsto, não foi efetivamente alcançado. Comportamento similar pôde ser observado para a solução de referência de S(IV) com concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>.

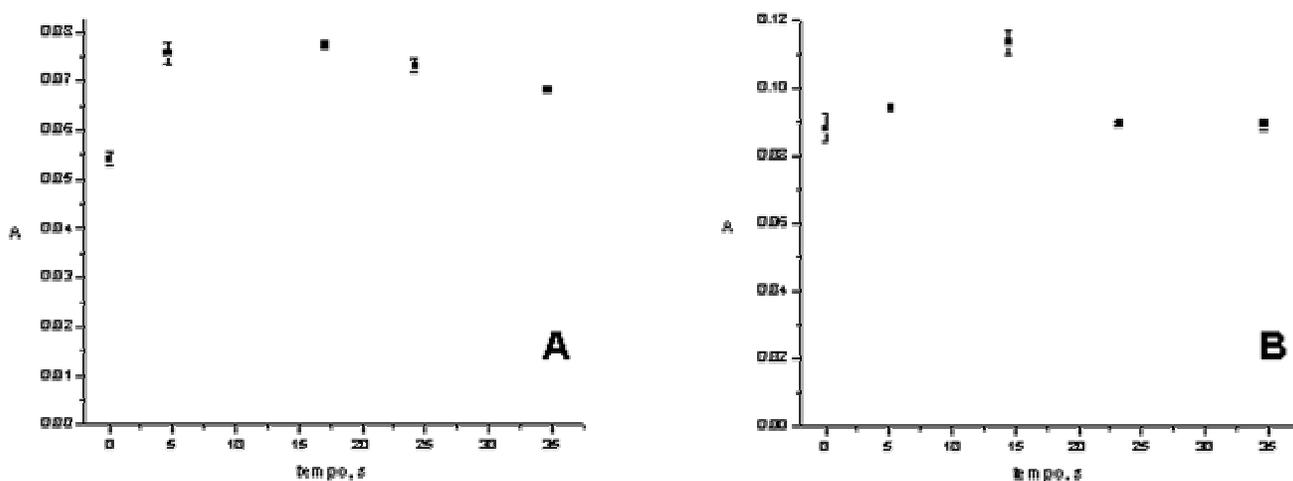


Figura 3.12. Efeito do tempo de interrupção de fluxo sob o sinal analítico para solução de sulfeto 10 mg L<sup>-1</sup> com recepção em (A) solução de DMPD + Fe<sup>3+</sup> (500 µL injetados) e (B) solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup> (250 µL injetados) .

O efeito observado sobre o sinal analítico (Figura 3.10 A e B), quando o dispositivo para ativação das válvulas solenóides e interrupção do fluxo da solução receptora foi incorporado ao sistema de análise em fluxo (Figuras 3.6 A e B), foi associado preponderantemente ao aumento do tempo de reação de H<sub>2</sub>S com DMPD + Fe<sup>3+</sup> (Figura 3.12 A), mas não exclusivamente relacionada com a pré-concentração do H<sub>2</sub>S. Caso o efeito de pré-concentração fosse o preponderante, o aumento do sinal analítico deveria ter sido mais evidente quando a solução de NaOH foi empregada como receptora. Isto, por que a concentração de NaOH era suficientemente elevada para converter todo o H<sub>2</sub>S permeado através da membrana de PTFE em HS<sup>-</sup>, fixando este em solução. Contudo, como pode ser observado na Figura 3.12 B, para tempos de interrupção do fluxo da solução receptora maiores que 15 s, não houve diferenças significativas no sinal analítico e portanto, na quantidade de azul de metileno produzida pela reação com sulfeto. Adicionalmente, a interrupção do fluxo da solução receptora de DMPD + Fe<sup>3+</sup> levou a um aumento de sinal analítico de ~50% (Figura 3.12 A), indicando que o tempo de reação possa ser o fator preponderante com a ativação das

válvulas solenóides. Também, para vazões do carregador (compartimento inferior da UIO, Figura 3.11) superiores a  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ , observou-se que o fluxo no compartimento superior da UIO não era interrompido, possivelmente devido a movimentos peristálticos produzidos pela própria membrana de PTFE. Desta forma, o sistema com interrupção de fluxo da solução receptora foi empregada em alguns poucos experimentos, optando-se pelos sistemas em fluxo apresentados nas Figuras 3.10 A e 3.10.B, para recepção com DMPD +  $\text{Fe}^{+3}$  e solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  em NaOH, respectivamente.

### 3.4.1 Avaliação da Conversão de $\text{SO}_2$ a $\text{H}_2\text{S}$ e da Taxa de Permeação

Outro fator importante avaliado foi a seletividade da membrana em relação às espécies  $\text{H}_2\text{S}$  e  $\text{SO}_2$ . Para tanto, foram realizados estudos para estimar a taxa de permeação destas espécies na unidade integradora de operações (UIO), usando a membrana semipermeável de PTFE, e a taxa de conversão de  $\text{SO}_2$  a  $\text{H}_2\text{S}$  pelo  $\text{Zn}^0$  em meio ácido. A capacidade de espécies voláteis difundirem através de uma membrana semipermeável está relacionada a fatores como pressão de vapor e o coeficiente de difusão no material (Canham *et al.*, 1988). O PTFE é o material mais empregado para membranas semipermeáveis em sistemas de análise em fluxo com difusão gasosa (Ruzicka e Hansen, 1988). Quimicamente ele é caracterizado como um polímero de adição, possuindo somente átomos de C e F em sua estrutura,  $-(\text{CF}_2-\text{CF}_2)_n-$ , evidenciados através do estiramento C-F em  $1230 \text{ cm}^{-1}$  no espectro infravermelho (Figura 3.13).

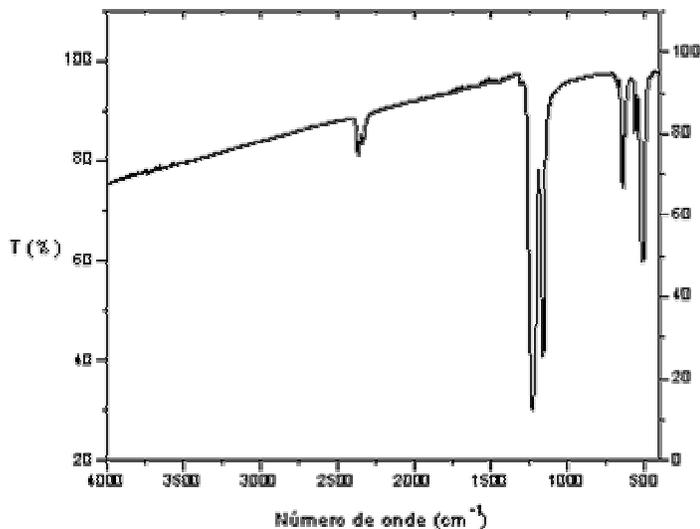


Figura 3.13. Espectro na região do IV da membrana de PTFE utilizada.

Para estimativa da taxa de permeação do  $\text{H}_2\text{S}$  foram comparados os sinais de soluções de referência de sulfeto injetadas no percurso analítico de sistemas idênticos aos esquematizados na Figura

3.10, substituindo o zinco da UIO por pérolas de vidros, com aqueles obtidos empregando o sistema em fluxo apresentado na Figura 3.14.

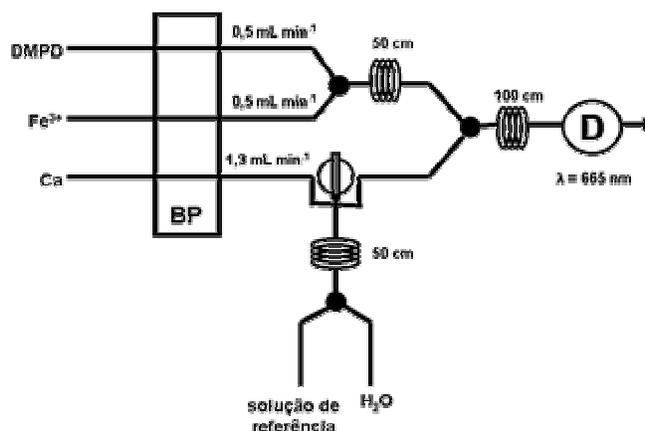


Figura 3.14. Diagrama de sistema de fluxo sem permeação de  $H_2S$ , empregado para estimar a taxa de permeação de  $H_2S$  quando o sistema do diagrama da Figura 3.10 foi utilizado.

Os sistemas utilizados para comparação adotaram as mesmas vazões indicadas no esquema da Figura 3.14, bem como as mesmas dimensões das bobinas. A alça de amostragem para o sistema representado na Figura 3.14 foi de 50 cm, enquanto que para o sistema da Figura 3.10 a alça de amostragem foi de 100 cm. Para os sistemas de permeação (Figura 3.10) foram injetadas soluções de referência de sulfeto com concentração até  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (com solução de  $HCl$   $1M$ ) e para o sistema de reação direta até  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (com  $H_2O$ ) em  $HS^-$ .

Para estimativa da taxa de permeação do  $SO_2$ , foi realizado procedimento semelhante, utilizando-se o método da p-rosanilina ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ ) para detectar o  $SO_2$  permeado, e substituindo as linhas de DMPD e  $Fe^{3+}$  nos sistemas da Figura 3.10, por uma linha correspondente ao coquetel de p-rosanilina e  $HCOH$  (Segundo e Rangel, 2001), sendo a concentração final de  $HCl$  de  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ . As concentrações das soluções injetadas de  $HSO_3^-$  foram correspondentes ao sistema anterior. O sistema utilizado para comparação é apresentado na Figura 3.15.

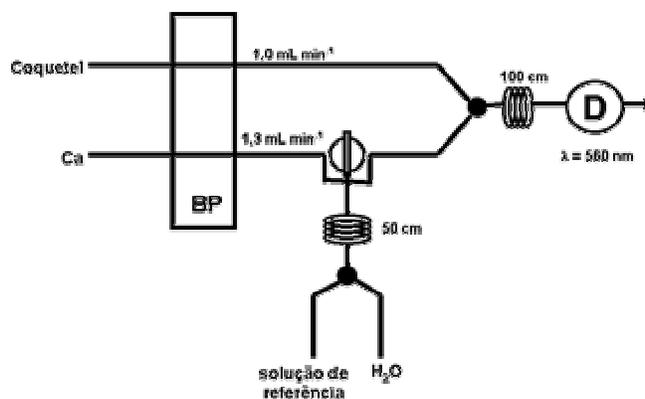


Figura 3.15. Diagrama de sistema FIA utilizado para estimar a taxa de permeação de  $SO_2$  (reação direta), quando comparado com os sistemas da Figura 3.10.

Na Tabela 3.3 são apresentados os resultados obtidos para os testes de conversão e permeação realizados. Pôde-se perceber que, empregando água como transportador, as relações das taxas de permeação entre o H<sub>2</sub>S e o SO<sub>2</sub> foram de 1,1 (H<sub>2</sub>S/SO<sub>2</sub>) quando a recepção se processou em meio ácido e ~ 3 vezes para recepção em meio alcalino. A mudança na composição do carregador influenciou de forma crítica na transferência de massa (permeação) de SO<sub>2</sub> através da membrana de PTFE, o que deve ser extensivo também para o H<sub>2</sub>S. Podem ser verificados aumentos na taxa de permeação maiores que 30 vezes tanto para a recepção em meio ácido (coquetel) como alcalino do SO<sub>2</sub>, utilizando solução de HCl 0,25 mol L<sup>-1</sup> como fluido transportador.

Pelos dados apresentados na Tabela 3.3, a maior taxa de permeação estimada para o H<sub>2</sub>S em meio alcalino, quando comparada ao SO<sub>2</sub>, deveria estar relacionada à imediata desprotonação do H<sub>2</sub>S, facilitando sua fixação. Em contraposição o SO<sub>2</sub> depende de duas reações (Eq. 2 e 3, item 3.1) para ser fixado como SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> na solução de NaOH.

As taxas de permeação alcançadas pelo H<sub>2</sub>S no sistema com Zn e solução 10% em CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH e 0,1% em EDTA (utilizado para complexar o Zn<sup>2+</sup> produzido) como carregador indicam que o método proposto apresenta grande potencialidade. Pôde-se, ainda, perceber que a UIO usando membrana semipermeável de PTFE aparenta ser mais seletiva à permeação de H<sub>2</sub>S.

Tabela 3.3. Comparação das taxas de permeação entre H<sub>2</sub>S e SO<sub>2</sub> em diferentes condições.

Espécie	% permeado <sup>a</sup>			Condição
	DMPD e Fe <sup>3+</sup>	Coquetel	NaOH 50 mmol L <sup>-1</sup>	
H <sub>2</sub> S	0,32	-	0,52	Carregador: H <sub>2</sub> O <sup>b</sup>
SO <sub>2</sub>	-	0,27	0,19	Carregador: H <sub>2</sub> O
SO <sub>2</sub>	-	8,66	5,66	Carregador: HCl 0,25 mol L <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> S	11,32	-	16,45	Na presença de Zn <sup>c</sup> Carregador: solução 10% em etanol e 0,1% em EDTA

(a) valores médios (N = 3) em relação à concentração injetada (b) usou-se o mesmo carregador para os dois sistemas (c) substituiu-se as pérolas de vidro por zinco metálico granulado (~ 3 g) nos sistemas da Figura 3.10.

De acordo com as concentrações das soluções de referência de H<sub>2</sub>S inseridos no percurso analítico do sistema da Figura 3.10 A, com zinco granulado na vala da UIO e, usando como carregador solução 10% (v/v) em etanol e 0,1% (m/v) em EDTA, pôde ser estimada em 10,31% a taxa de conversão de SO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>S, comparando os sinais obtidos pela introdução de soluções de sulfeto com sulfito. Esta taxa condicional de conversão foi obtida na vazão de 1,3 mL min<sup>-1</sup> do fluido carregador, para concentração de 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl, ao qual a amostra foi misturada e para massa de zinco, na vala, igual a 3 g. Como exemplificação, para 100 mg L<sup>-1</sup> de HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> inserido no percurso analítico do sistema em fluxo da Figura 3.10 A, 10,31 mg L<sup>-1</sup> seriam convertidos a H<sub>2</sub>S e, destes, 1,17 mg L<sup>-1</sup> permeariam pela membrana de PTFE da UIO.

### 3.4.2 Estudo da Vazão

O estudo da vazão foi implementado considerando as interações entre a vazão do carregador, que conduz a amostra até a unidade integradora de operações (parte inferior do sistema em fluxo) e a vazão da mistura das soluções de DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  ou da solução de  $\text{NaOH}$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (parte superior), como receptores.

Na superfície de resposta apresentada na Figura 3.16 onde a recepção foi efetuada na mistura de DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  pôde ser observado que para as menores vazões da solução transportadora da amostra (solução alcoólica de EDTA) e dos reagentes obteve-se os melhores resultados. Sabe-se, que o aumento da vazão diminui o efeito de dispersão da amostra (Reis *et al.*, 1989), porém para os sistemas em fluxo que utilizam permeação é interessante que o máximo de analito esteja em condição de ser separado da matriz, o que, para nosso caso, implica no aumento da permeação através da membrana. Este aumento foi favorecido para baixas vazões da solução doadora (amostra) e receptora (DMPD +  $\text{Fe}^{3+}$ ), como pode ser observado na Figura 3.16.

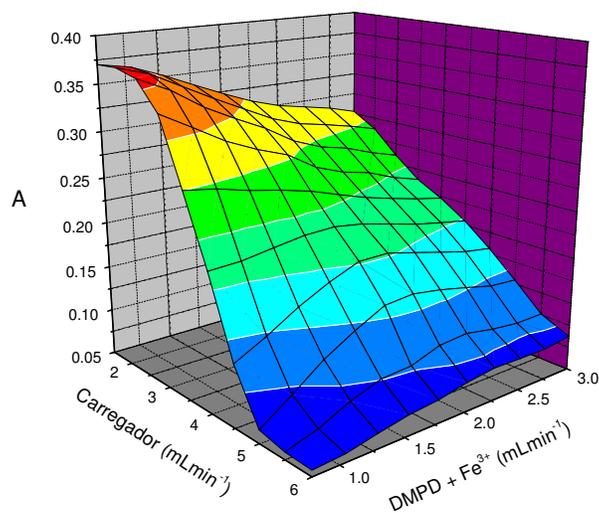


Figura 3.16. Superfície de resposta para a variação da vazão do carregador em função da vazão do DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$ , para amostragem de  $250 \mu\text{L}$  de solução de referência de  $\text{HSO}_3^-$   $100 \text{ mg L}^{-1}$  em meio ácido.

Apesar da cinética da reação de formação do azul de metileno ser rápida, selecionando baixa vazão para a solução reagente (DMPD +  $\text{Fe}^{3+}$ ), o aumento do tempo de residência do  $\text{H}_2\text{S}$  em contato com a solução receptora até atingir o detector levou a uma maior produção do corante. Conseqüentemente, baixas vazões da solução receptora favoreceram o aumento da sensibilidade. Contudo, nestas condições, o ritmo de determinações diminui, tornando o sistema menos produtivo.

A superfície de resposta gerada na Figura 3.17 mostrou um comportamento similar e esperado para a recepção em solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup>. A maior magnitude do sinal transiente obtido pela recepção do H<sub>2</sub>S formado e permeado em solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup> foi devido ao fato do H<sub>2</sub>S ser imediatamente fixado na forma de HS<sup>-</sup>, visto que a desprotonação é imediata. É provável que para a recepção na mistura reacional DMPD e Fe<sup>3+</sup> em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> parte do H<sub>2</sub>S permeado tenha retornado à solução doadora (amostra), enquanto que para recepção em solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup> ocorria a imediata fixação. Isto permitiu que menores volumes da amostra fossem injetados no sistema em fluxo. Desta forma, um possível aumento da vazão poderia ser compensado pelo aumento do volume de amostra injetado, levando a uma maior produtividade analítica, sem que houvesse comprometimento da sensibilidade do método.

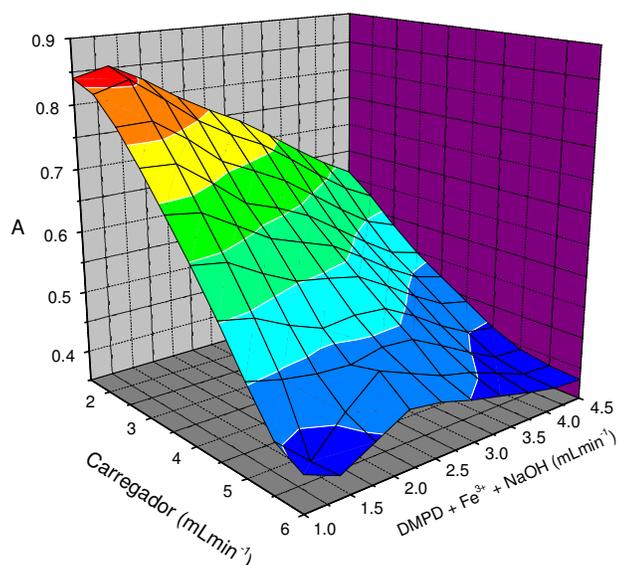


Figura 3.17. Variação do sinal analítico em função da vazão do carregador e da solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup> no sistema proposto, para amostragem de 125 µL de solução de referência de HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> 100 mg L<sup>-1</sup> em meio ácido.

Frente às informações obtidas, foram estabelecidas as vazões ótimas em 1,80 mL min<sup>-1</sup> para a solução doadora (amostra + ácido) da amostra; 0,80 mL min<sup>-1</sup> para a mistura das soluções de DMPD e Fe<sup>3+</sup>; e, finalmente, para a recepção em solução de NaOH o valor ótimo para a soma das vazões foi de DMPD, Fe<sup>3+</sup> e NaOH foi igual a 1,40 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.4.3 Alça de Amostragem

A alça de amostragem posicionada em VR define o volume de amostra a ser injetado no percurso analítico. Geralmente, o aumento da alça de amostragem apresenta relação linear com o sinal gerado, até que se atinja um patamar, onde o aumento da quantidade de analito não provoque variações significativas no sinal.

As curvas apresentadas nas Figuras 3.18 e 3.19 ilustram um comportamento típico para este tipo de avaliação. Para ambos os tipos de solução receptora e concentrações do analito, o sistema apresentou capacidade de atuar em faixas distintas de concentração sem o comprometimento da sensibilidade.

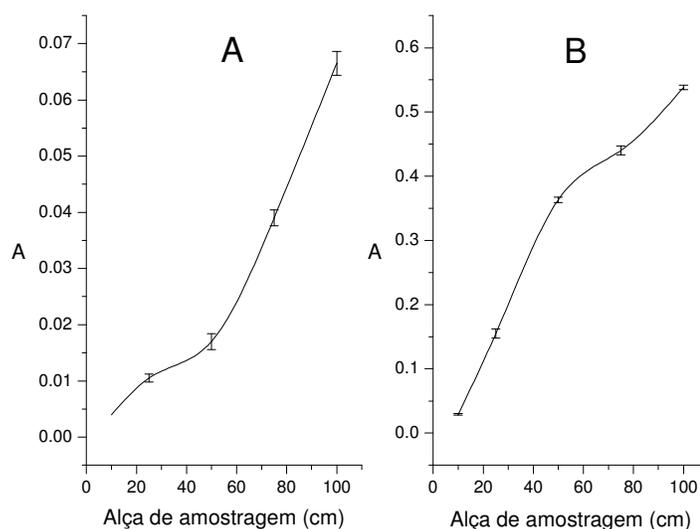


Figura 3.18. Variação do comprimento da alça de amostragem com recepção em DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  para (A)  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e (B)  $100 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HSO}_3^-$ .

A partir dos valores observados nas Figuras 3.18 e 3.19, percebeu-se que a depender do tipo de solução receptora alguns valores de comprimento de alça de amostragem não apresentavam as proporções adequadas entre os sinais obtidos e esperados. Geralmente os menores valores de alça de amostragem apresentavam sinais analíticos menores, diante dos observados para tamanhos proporcionais a este. Este comportamento deveria estar vinculado a uma maior dispersão da amostra na UIO para pequenos volumes injetados no percurso analítico, influenciada por caminhos preferenciais na vala contendo  $\text{Zn}^0$ .

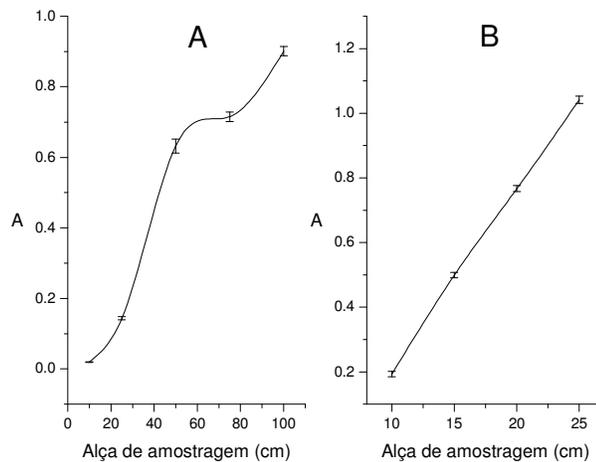


Figura 3.19. Variação do tamanho da alça de amostragem com recepção em NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup>, para (A) 10 mg L<sup>-1</sup> e (B) 100 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

De acordo com os sinais obtidos procurou-se padronizar o comprimento das alças de amostragem em função da faixa de concentrações das amostras que foram analisadas. Assim, para vinhos existem dois parâmetros que foram considerados, a avaliação de sulfito livre, geralmente entre 1 e 25 mg L<sup>-1</sup>, e de sulfito total, geralmente entre 70 a 150 mg L<sup>-1</sup> (Aquarone *et al.* 1983, Segundo *et al.*, 2000 e Lea *et al.*, 2000). Para sucos, a concentração de sulfito variou entre 0,5 e 5 mg L<sup>-1</sup> (sucos para pronto consumo) e 70 e 150 mg L<sup>-1</sup> (sucos concentrados). Uma vez que a faixa de concentração de sulfito nas amostras era bastante ampla, os comprimentos de alça de amostragem selecionados foram diferentes para atenderem às especificidades das amostras e do processo em si. Na Tabela 3.4 são apresentados os valores selecionados para o comprimento da alça de amostragem, visando atender as peculiaridades das amostras.

Tabela 3.4. Dimensões das alças de amostragem em função da faixa analisada e da solução receptora.

Faixa (mg L <sup>-1</sup> )	Recepção	
	DMPD + Fe <sup>3+</sup>	NaOH
0,5 – 25	100 cm	50 cm
25 – 300	50 cm	20 cm

### 3.4.4 Avaliação da Concentração de NaOH na Solução Receptora

No sistema, a solução receptora de NaOH foi a que apresentou os melhores resultados, desta forma, procurou-se otimizar a concentração desta e avaliar alguma possível relação com a concentração de sulfito na amostra.

Na curva apresentada na Figura 3.20 pôde ser constatado que para solução 100 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a concentração ótima da solução receptora de NaOH foi de 0,10 mol L<sup>-1</sup>, não havendo variações significativas para concentrações mais elevadas de NaOH. Porém, o mesmo comportamento não foi observado com a

---

concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  (Figura 3.21), atingindo um máximo em  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH e ligeiro decréscimo do sinal com aumento da concentração de NaOH na solução receptora.

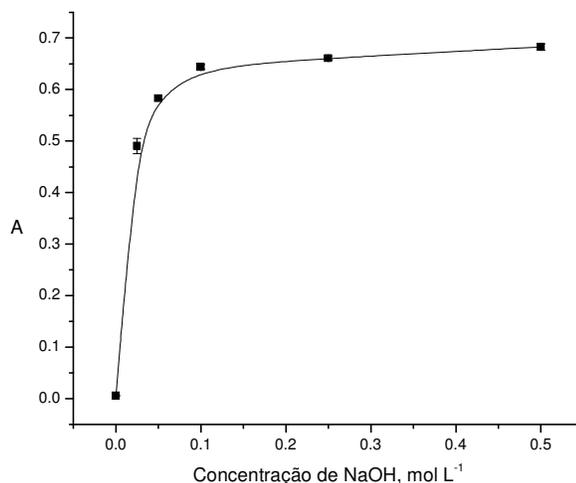


Figura 3.20. Variação do sinal analítico com a concentração de NaOH na solução receptora, para injeção de  $50 \mu\text{L}$  de solução  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  em meio ácido.

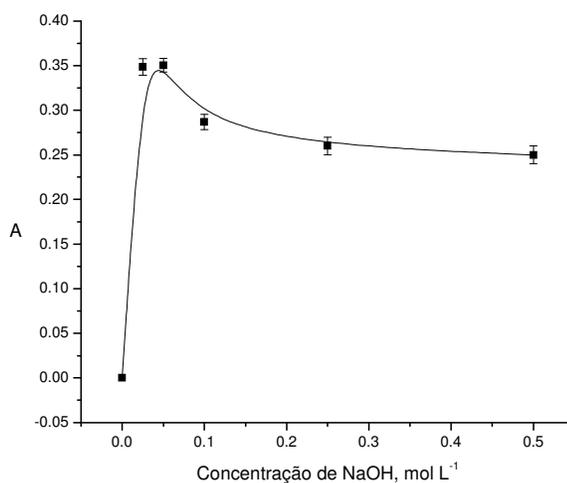


Figura 3.21. Variação do sinal analítico com a concentração de NaOH na solução receptora, para injeção de  $125 \mu\text{L}$  de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HSO}_3^-$  em meio ácido.

A diminuição do sinal para concentração de sulfito igual a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  com o aumento da concentração de NaOH pode estar relacionada, em princípio, com a menor quantidade de ácido disponível para produção do azul de metileno, devido ao fato de parte deste estar sendo consumido para a neutralização do NaOH. De acordo com os dados obtidos para as duas concentrações de sulfito avaliadas, optou-se por manter a concentração de NaOH na solução receptora em  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , visto que foi possível

viabilizar as determinações em ambos patamares de concentração do analito sem que houvesse perdas significativas de sensibilidade para concentrações da ordem de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 3.4.5 Influência do Tipo e Concentração do Ácido

A seleção do tipo e da concentração do ácido eram para garantir a redução do analito a  $\text{H}_2\text{S}$  e produção de  $\text{SO}_2$ . Foram avaliados dois ácidos minerais – o  $\text{HCl}$  e o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  – nas mesmas condições reacionais e de concentração, como mostrado nas Figuras 3.22 e 3.23.

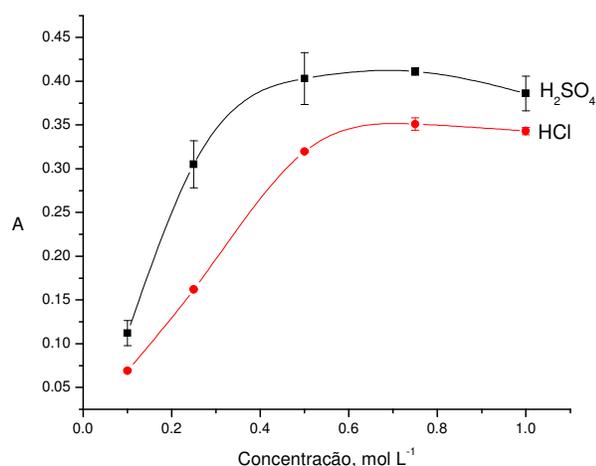


Figura 3.22. Influência do tipo e concentração do ácido na mistura com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  e recepção em  $\text{DMPD} + \text{Fe}^{3+}$ . O volume injetado foi  $250 \mu\text{L}$  da solução de referência em meio ácido.

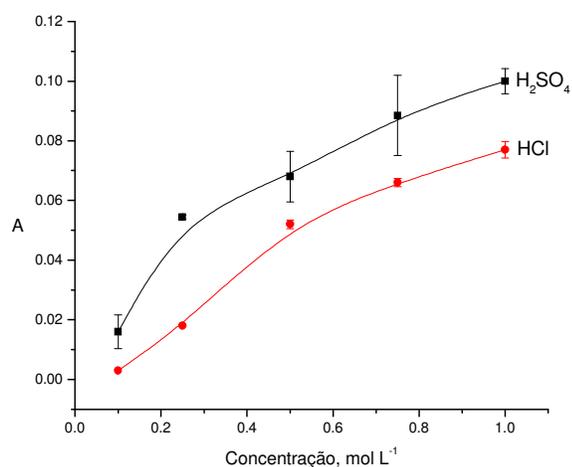


Figura 3.23. Influência do tipo e concentração do ácido na mistura com solução de referência de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  e recepção em  $\text{DMPD} + \text{Fe}^{3+}$ . O volume injetado foi de  $500 \mu\text{L}$  da solução de referência em meio ácido.

As curvas apresentadas nas Figuras 3.22 e 3.23 evidenciaram maiores sinais transientes com o uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Porém, os desvios obtidos nas triplicatas foram consideravelmente maiores que aquelas obtidos com  $\text{HCl}$ . Os maiores sinais do  $\text{H}_2\text{SO}_4$  podem ser justificados em função deste ser um ácido diprótico. Por sua vez, os maiores desvios dos sinais com o uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  podem ser atribuídos às interações com a solução alcoólica de EDTA (solução carregadora) e também pela maior viscosidade das soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , dificultando a homogeneização com a solução de  $\text{HSO}_3^-$ .

Devido ao fato do  $\text{HCl}$  apresentar uma variação menor em relação aos sinais e as diferenças dos sinais gerados com ambos os ácidos não serem significativamente relevantes, este foi selecionado para os estudos seguintes.

Na Figura 3.24 pode ser observado que para a concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HSO}_3^-$ , a concentração de  $0,80 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HCl}$  seria suficiente, proporcionando sinal adequado para cobrir a faixa de análise. Porém, para a concentração de sulfito de  $10 \text{ mol L}^{-1}$  este comportamento não se repetiu (Figura 3.23). Assim, diminuiu-se o volume de amostra injetada para adequar o sistema a faixa de concentração encontra nas amostras de vinhos e sucos.

Os sinais analíticos obtidos com a recepção do  $\text{H}_2\text{S}$  permeado em solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NaOH}$ , apresentados na Figura 3.24, indicaram similaridade de comportamento com a solução de  $\text{DMPD} + \text{Fe}^{3+}$ . Assim, a concentração de  $\text{HCl}$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  foi selecionada para atender as diferentes faixas de concentração e as diferentes naturezas das soluções receptoras.

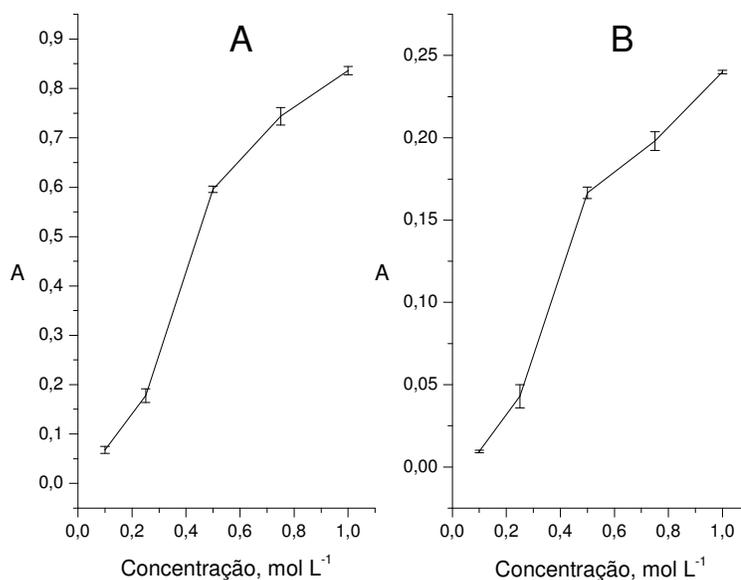


Figura 3.24. Efeito da concentração de  $\text{HCl}$  na mistura com solução de referência, para (A)  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e (B)  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HSO}_3^-$ , com recepção em  $\text{NaOH}$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os volumes injetados foram de  $100$  e  $250 \text{ }\mu\text{L}$  de solução de referência em meio ácido para (A) e (B), respectivamente.

### 3.4.6 Avaliação da Proporção entre Amostra e Ácido

As proporções entre os volumes da amostra e da solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> foram também investigadas. Na Figura 3.25 é apresentada a variação do sinal analítico para diferentes proporções de amostra e HCl nos dois sistemas receptores investigados – solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup> e solução de DMPD + Fe<sup>3+</sup>.

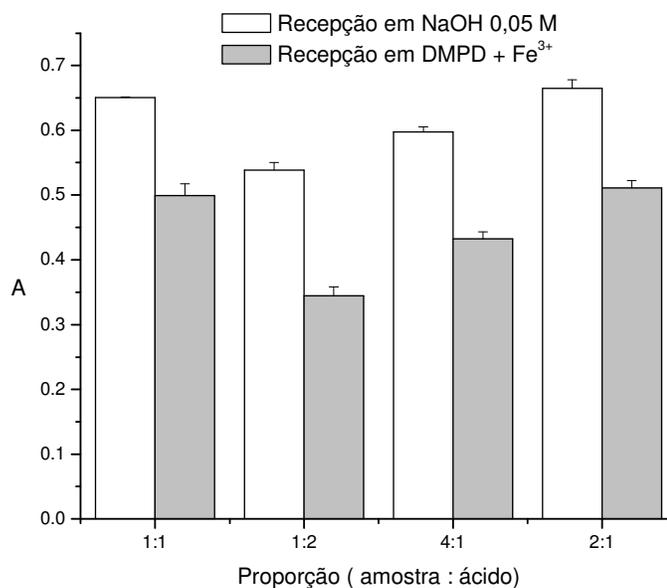


Figura 3.25. Efeito da proporção entre volume da amostra (100 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e de HCl, inseridos no percurso analítico para recepção do H<sub>2</sub>S permeado em solução 50 mmol L<sup>-1</sup> em NaOH e de DMPD + Fe<sup>3+</sup>. Os volumes das soluções de referência em meio ácido injetados foram de 100 e 500 µL para as respectivas soluções receptoras.

Pelo comportamento observado na Figura 3.25 pôde-se notar que não havia diferença significativa entre os sinais analíticos obtidos com as proporções de 1:1 e 2:1, amostra:ácido, para as diferentes soluções receptoras.

Para os estudos realizados com solução 10 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 3.26), pôde ser constatado boas performances, tanto para a proporção 1:1 como para a 2:1.

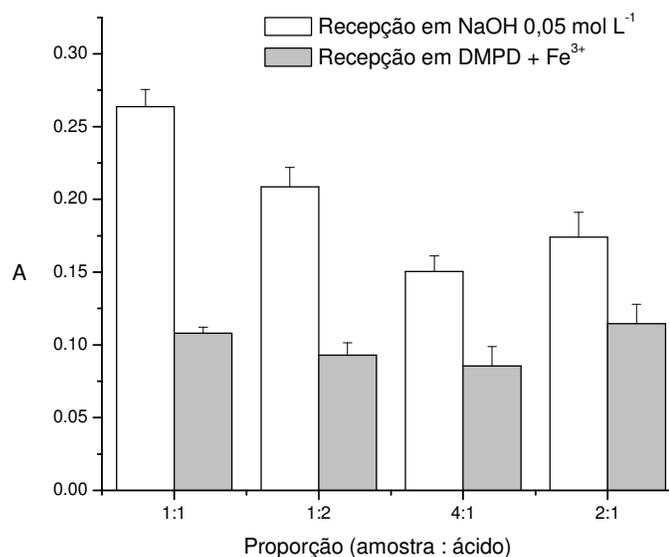


Figura 3.26. Efeito da proporção entre volume da amostra ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{HSO}_3^-$ ) e de HCl, inseridos no percurso analítico para recepção do  $\text{H}_2\text{S}$  permeado em solução  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  em NaOH e de DMPD +  $\text{Fe}^{3+}$ . Os volumes das soluções de referência em meio ácido injetados foram de 250 e 500  $\mu\text{L}$  para as respectivas soluções receptoras.

A inserção de excesso de amostra seria interessante, considerando a diminuição da quantidade de HCl e o maior tempo de vida do zinco metálico presente na UIO. Porém, a necessidade de garantir um meio suficientemente ácido para favorecer a produção e permeação do  $\text{H}_2\text{S}$ , dificultando a possível precipitação de  $\text{ZnS}$  no compartimento inferior da UIO, levou à escolha da proporção volumétrica de 1:1 entre amostra e HCl.

### 3.4.7 Percurso Analítico

A variação do percurso analítico de um sistema em fluxo influencia diretamente no grau de dispersão, existindo uma relação estreita deste parâmetro com a frequência analítica e a sensibilidade do procedimento. Para sistemas de análise em fluxo que fazem uso da difusão de espécies voláteis, este quesito é ainda mais crítico. Desta forma, procurou-se otimizar a dimensão do percurso analítico, levando em consideração: (i) a mistura efetiva do ácido com amostra (parte inferior da UIO) e (ii) o tempo de reação necessário para produção do azul de metileno (compartimento superior da UIO).

Para avaliação do percurso analítico na parte inferior da UIO, fixou-se em 70 cm o percurso entre a válvula de injeção e a UIO, e variou-se o comprimento da bobina de mistura da amostra e solução de HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados para esta avaliação são apresentados na Figura 3.27.

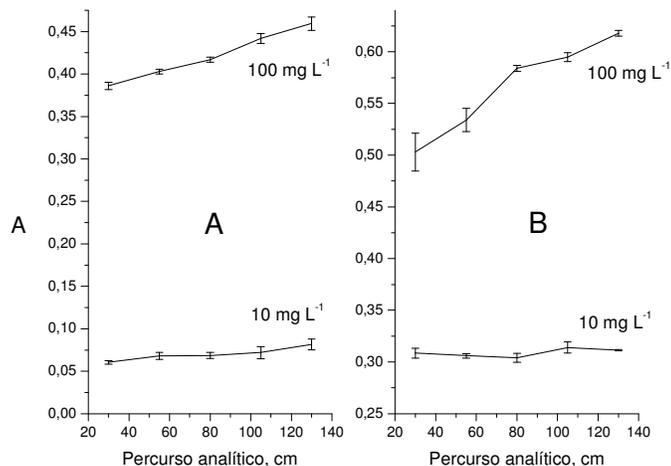


Figura 3.27. Variação do sinal analítico com o percurso analítico para parte inferior do sistema de análise em fluxo, (A) recepção em DMPD + Fe<sup>3+</sup> e (B) recepção em solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup>. Os volumes das soluções de referência em meio ácido injetados seguem os padrões dos testes anteriores.

Ocorreu pequena variação no sinal analítico com o aumento do percurso analítico da bobina de mistura da amostra com ácido (Figura 3.27). Para as soluções de referência de 100 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> a variação média verificada com o aumento do percurso analítico (de 30 para 130 cm) foi ~20% empregando quaisquer das soluções receptoras. Isto indicou que a mistura da amostra com o ácido era efetiva e que, possivelmente, a geometria da unidade integradora de operações influenciava positivamente na mistura.

Para avaliação do efeito da variação do percurso analítico na parte superior da UIO (Figura 3.28), o comprimento da bobina B1 não foi alterado (50 cm), mas o comprimento de B2, localizada após a UIO, foi avaliado de 50 a 200 cm (Figura 3.10 A e 3.10 B). As curvas apresentadas na Figura 3.28 A demonstram que, para a injeção de uma solução de referência de 100 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o aumento do percurso levou a um decréscimo do sinal analítico, para recepção em DMPD e Fe<sup>3+</sup>. A provável causa deste comportamento poderia estar relacionado com o aumento da dispersão do azul de metileno produzido para percursos analíticos mais longos. Para a recepção em solução de NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 3.28 B) percebeu-se que o maior sinal analítico era obtido para o percurso analítico de 140 cm. É provável que uma melhor mistura entre a solução receptora de NaOH e a mistura das soluções de DMPD e Fe<sup>3+</sup> estivesse ocorrendo nestas condições. Contudo, para percursos superiores a 140 cm, ficou evidente o decréscimo no sinal analítico, possivelmente pelo aumento da dispersão do corante.

A diminuição da concentração de HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> não provocou variações apreciáveis nos sinais analíticos obtidos em função do aumento do percurso analítico da parte superior do sistema de análise em fluxo. Isto, demonstrou que independente da composição da solução receptora a variação das concentrações de sulfito teria pouca influência, como observado nas curvas apresentadas na Figura 3.29.

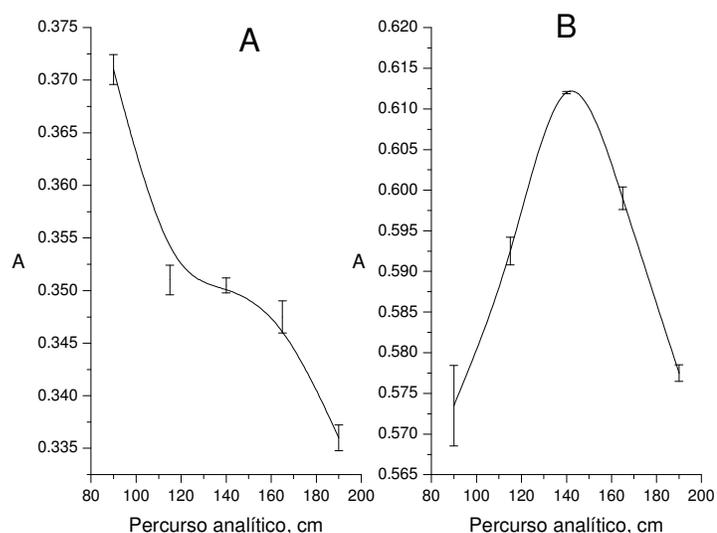


Figura 3.28. Efeito do percurso analítico da parte superior do sistema de análise em fluxo, para injeção de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  no percurso analítico com recepção em (A) DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  e (B) NaOH  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os volumes injetados de solução de referência em meio ácido foram de 250 e  $100 \mu\text{L}$  para as respectivas soluções receptoras.

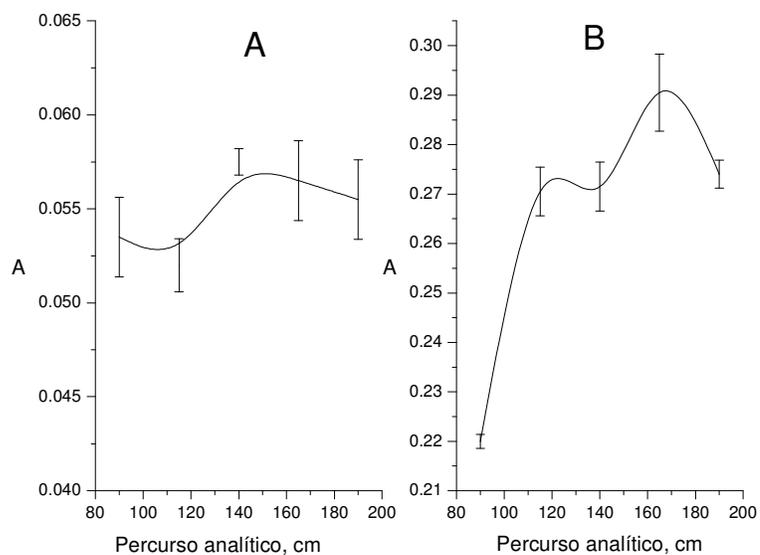


Figura 3.29. Efeito do percurso analítico para parte superior do sistema de análise em fluxo, para injeção de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  no percurso analítico com recepção em (A) DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  e (B) NaOH  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os volumes injetados de solução de referência em meio ácido foram de 500 e  $250 \mu\text{L}$  para as respectivas soluções receptoras.

### 3.4.8 Avaliação do Teor de Alcoólico do Carregador e nas Soluções de Referência

Pôde ser observado que diferentes marcas de vinho tinham teores alcoólicos, variando entre 7 e 11,5%. Desta forma, procurou-se avaliar a influência do etanol na determinação de sulfito.

Nas curvas apresentadas nas Figuras 3.30 e 3.31 pôde ser observado que quando o carregador estava isento de álcool o sinal analítico da solução de referência aumentava com o teor de álcool etílico. Sem dúvida, isto se tornaria um problema na calibração visto que seria difícil atender as peculiaridades das diferentes amostras de vinho a serem analisadas, sem optar pelo processo de adição de analito. Porém, com o aumento do teor de álcool no carregador foi observada uma diminuição da influência do teor de alcoólico nas soluções de referência, possibilitando até o preparo destas soluções sem a adição de álcool e contrapondo às recomendações da AOAC para determinação de sulfito livre (Cunniffi, 1995). Pelas informações obtidas optou-se preparar a solução transportadora com 15% (v/v) em etanol.

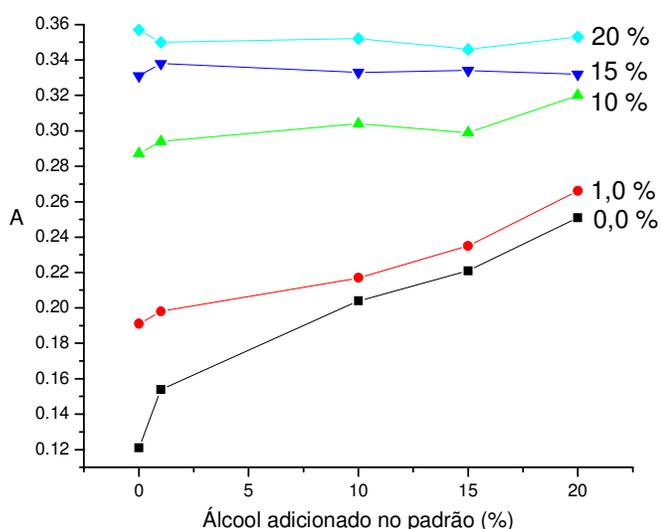


Figura 3.30. Influência do teor de álcool etílico adicionado nas soluções de referência frente aos diferentes teores de álcool no carregador. Injeção de 250  $\mu\text{L}$  de 100  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  em meio ácido com recepção em DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$ .

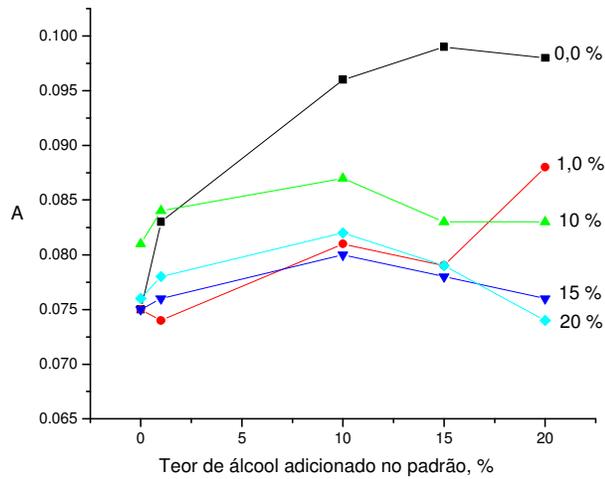


Figura 3.31. Influência do teor de álcool etílico adicionado nas soluções de referência frente aos diferentes teores de álcool no carregador. Injeção de 500  $\mu\text{L}$  de 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  em meio ácido com recepção em DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$ .

Foi observado um comportamento similar ao anteriormente discutido para a recepção em NaOH. O teor de 15% de álcool na solução transportadora mostrou ser eficiente para nivelar o efeito do álcool nas amostras e soluções de referência. A Figura 3.32 apresenta o comportamento referente à recepção do  $\text{H}_2\text{S}$  permeado em solução de NaOH.

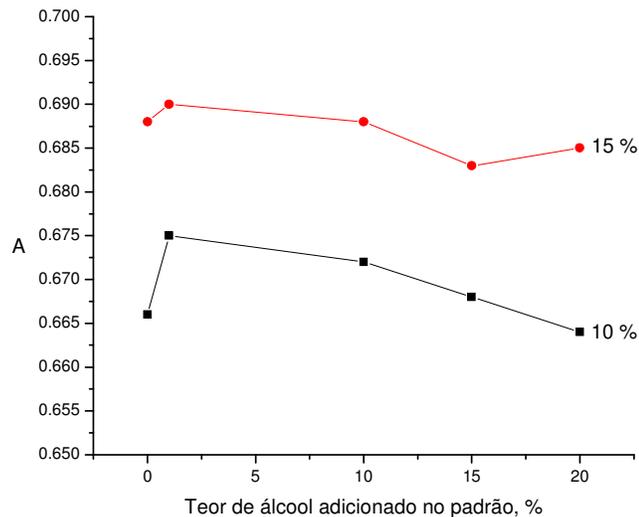


Figura 3.32. Influência do teor de álcool etílico adicionado nas soluções de referência frente aos diferentes teores de álcool no carregador. Injeção de 100  $\mu\text{L}$  de 100  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  em meio ácido com recepção em NaOH 50  $\text{mmol L}^{-1}$ .

Comparando os resultados com diferentes concentrações de  $\text{HSO}_3^-$  e para as duas soluções coletoras, percebeu-se que o teor de 15% (v/v) de álcool etílico no carregador tinha a capacidade de nivelar o efeito da quantidade de álcool nas soluções teste e, por consequência, nas amostras de vinho.

### 3.4.9 Parâmetros Otimizados

A partir dos testes realizados as condições ótimas do sistema (Figura 3.10 A e 3.10 B), são as seguintes:

Tabela 3.5. Parâmetros otimizados para determinação de sulfito em amostras de vinhos e suco de frutas pelo sistema proposto.

Parâmetro	Valor Otimizado
Vazão da solução transportadora	1,80 mL min <sup>-1</sup>
Vazão solução de DMPD + Fe <sup>3+</sup>	0,80 mL min <sup>-1</sup>
Vazão solução de NaOH	0,60 mL min <sup>-1</sup>
Concentração de NaOH	50 mmol L <sup>-1</sup>
Tipo e concentração do ácido	HCl 1 mol L <sup>-1</sup>
Proporção amostra: ácido	1:1
Percurso analítico (parte superior)	140 cm <sup>a</sup>
Percurso analítico (parte inferior)	130 cm <sup>b</sup>
Alça de amostragem (0,5 – 25 mg L <sup>-1</sup> de $\text{HSO}_3^-$ )	100 cm (recepção DMPD + Fe <sup>3+</sup> ) 50 cm (recepção NaOH)
Alça de amostragem (25 – 300 mg L <sup>-1</sup> de $\text{HSO}_3^-$ )	50 cm (recepção DMPD + Fe <sup>3+</sup> ) 20 cm (recepção NaOH)

a: a partir da UIO b: a partir da confluência de mistura da amostra e do ácido até a VR

Os parâmetros otimizados dos sistemas apresentados nas Figuras 3.10A e 3.10 B apresentados na Tabela 3.5 foram empregados para realizar as análises de vinhos brancos, tintos e sucos de frutas. Os resultados serão apresentados posteriormente.

### 3.4.10 Avaliação dos Interferentes

O sistema de análise em fluxo proposto tem a capacidade de separar o analito de interesse da matriz. Os potenciais interferentes seriam aqueles que possuíssem volatilidade suficiente para permear através da membrana e, sobretudo, interferirem no método adotado para determinação indireta de  $\text{HSO}_3^-$ . Desta forma, considerando o perfil das amostras e o método do azul de metileno realizou-se teste de interferência com  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{S}$ , visando às amostras de vinho.

Para as amostras de suco de fruta foi observada uma grande variação referente à concentração de ácido ascórbico discriminada nos rótulos, variando no intervalo de zero a 700 mg L<sup>-1</sup>. Este poderia interferir de duas formas distas, pela formação de adulto de uma de suas formas oxidadas com o  $\text{HSO}_3^-$  ou competido no processo de redução. Considerando estas possibilidades se investigou a possível interferência do ácido ascórbico no sistema.

O  $\text{CO}_2$  encontra-se presente nos vinhos devido aos processos de fermentação, utilizado para sua produção, geralmente é encontrado na faixa de 1000 a 2000  $\text{mg L}^{-1}$  (Atanassov *et al.*, 2000). De acordo com os perfis observados nas Figuras 3.33 e 3.34 (parte A) não se percebeu nenhum tipo de interferência do  $\text{CO}_2$ , independente da concentração de sulfito, bem como, da composição da solução receptora.

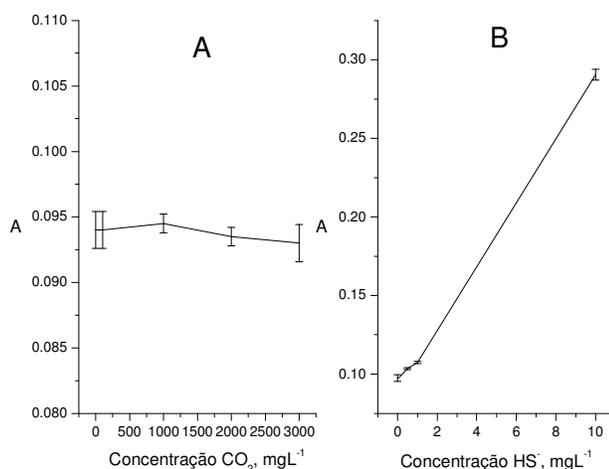


Figura 3.33. Efeito da interferência de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{S}$  em solução de  $\text{HSO}_3^-$  10  $\text{mg L}^{-1}$  com recepção em DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$  sendo (A)  $\text{CO}_2$  e (B)  $\text{HS}^-$ . O volume injetado de solução de referência em meio ácido contendo os possíveis interferentes foi 500  $\mu\text{L}$ .

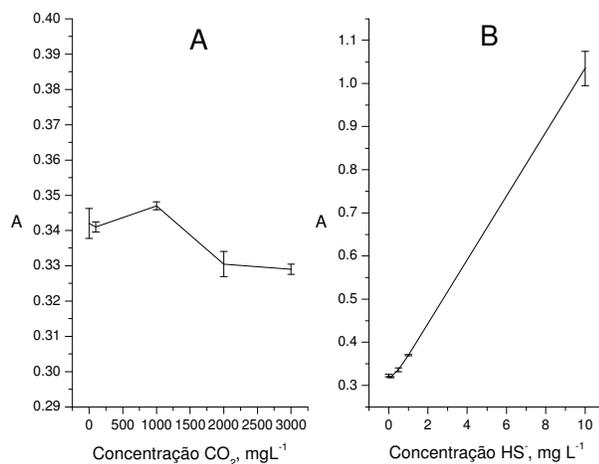


Figura 3.34. Estudo da interferência de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{S}$  em solução de  $\text{HSO}_3^-$  10  $\text{mg L}^{-1}$  com recepção em  $\text{NaOH}$  50  $\text{mmol L}^{-1}$ , sendo (A)  $\text{CO}_2$  e (B)  $\text{HS}^-$ . O volume injetado de solução de referência em meio ácido contendo os possíveis interferentes foi 250  $\mu\text{L}$ .

Para o  $\text{H}_2\text{S}$  não se observou efeito significativo de interferência positiva até uma concentração de 0,5  $\text{mg L}^{-1}$ , como pode ser observado nas curvas das Figuras 3.33B e 3.34B. Contudo, para concentrações de sulfeto superiores a 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  ocorria interferência positiva. Para tentar extinguir este efeito de

interferência procurou-se eliminar o H<sub>2</sub>S pela precipitação na forma de sulfetos de baixa solubilidade. Desta forma, o sulfeto precipitado seria separado por filtração (Skoog *et al.*, 1997). Diante das características de base mole do ânion sulfeto, foram avaliados metais com caráter de ácido mole ou com comportamento de fronteira, segundo o princípio ácido-base de Pearson (Pearson, 1966). A Tabela 3.6 apresenta os cátions geralmente utilizados para precipitação de sulfeto e seus respectivos valores das constantes do produto de solubilidade.

Tabela 3.6. Valores de solubilidade para formação de sulfetos de alguns metais.

Cátion	Solubilidade, mol L <sup>-1</sup>
Bi <sup>3+</sup>	~1,00 x 10 <sup>-20</sup>
Hg <sup>2+</sup>	2,20 x 10 <sup>-27</sup>
Ag <sup>+</sup>	1,26 x 10 <sup>-17</sup>
Cu <sup>2+</sup>	8,94 x 10 <sup>-19</sup>
Pb <sup>2+</sup>	1,73 x 10 <sup>-14</sup>
Cd <sup>2+</sup>	3,16 x 10 <sup>-14</sup>
Zn <sup>2+</sup>	5,47 x 10 <sup>-12</sup>
Co <sup>2+</sup>	1,73 x 10 <sup>-13</sup>

Dentre as alternativas apresentadas optou-se pelo uso do zinco, em virtude deste já estar presente no meio, não possuir propriedades catalíticas e não ser foto-sensível. O Zn<sup>2+</sup>, na forma acetato, vem sendo utilizado na fixação de sulfeto em procedimentos de amostragem ou de tratamento da amostra (Marczenko, 1976). Assim, para tentar eliminar a interferência positiva de sulfeto procedeu-se da seguinte maneira: preparou-se solução padrão com concentração final de 10 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> e variável de HS<sup>-</sup> (0 – 100 mg L<sup>-1</sup>), a estas foram adicionados 5 mL de solução 2% (m/v) em acetato de zinco, para um volume final de 50 mL. Após 15 min as soluções eram filtradas e a determinação era realizada. Os resultados para este experimento são apresentados na Figura 3.35.

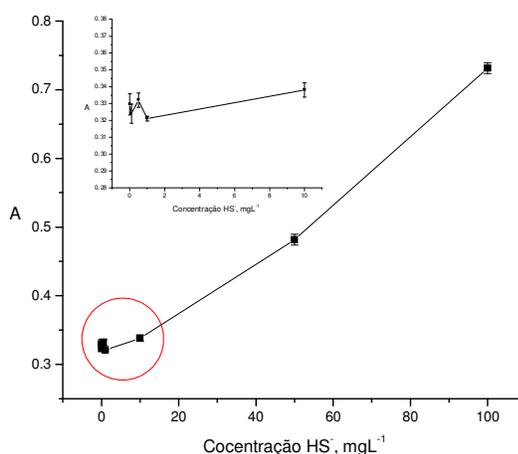


Figura 3.35. Avaliação da interferência de H<sub>2</sub>S para soluções de referência de 10 mg L<sup>-1</sup> em HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> com adição de solução de (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Zn e recepção em NaOH 50 mmol L<sup>-1</sup>. O volume injetado de solução de referência em meio ácido foi de 250 µL.

Nota-se que a adição de acetato de zinco foi eficiente para eliminar a interferência de sulfeto para concentrações deste interferente até  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Para concentrações maiores de sulfeto o procedimento testado não surtiu efeito, o que poderia ser contornado aumentando a concentração de  $\text{Zn}^{2+}$  na solução e o tempo de precipitação. Porém, isto não oferecia riscos para as determinações de sulfito em amostras de vinhos e sucos, visto que concentrações desta ordem não seriam encontradas em alimentos em condições de consumo. Mestres e colaboradores (1995) indicaram que as concentrações de  $\text{H}_2\text{S}$  em vinhos variavam até o máximo de  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ; faixa que não oferecia riscos de interferência empregando o procedimento proposto.

Para amostras de sucos de frutas, não existindo potencialmente nenhuma espécie volátil em concentração suficientemente alta para se tornar interferente, foi avaliado o efeito da concentração de ácido ascórbico, devido a grande variação de concentração deste composto nos produtos analisados. Os resultados são apresentados na Figura 3.36, onde pode-se notar que não houve interferência de ácido ascórbico para concentrações até  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

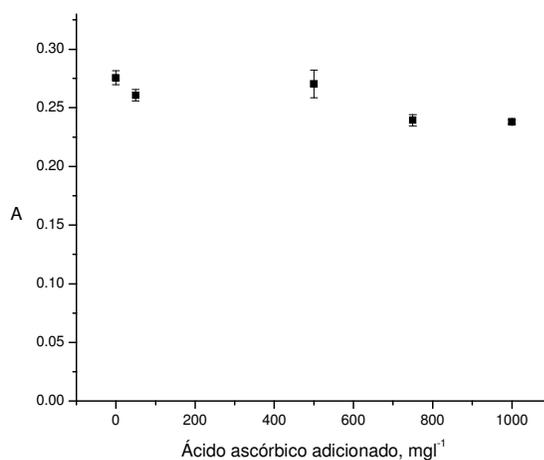


Figura 3.36. Efeito da concentração de ácido ascórbico no sinal analítico para  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{HSO}_3^-$  com recepção em DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$ . O volume injetado de solução de referência em meio ácido contendo os possíveis interferentes foi  $250 \text{ } \mu\text{L}$ .

### 3.4.11 Figuras de Mérito

Após a otimização do sistema de análise em fluxo para determinação indireta de sulfito, foram avaliadas as figuras de mérito para o procedimento analítico proposto. Para tanto, foram consideradas as faixas de concentração em sulfito e a solução receptora empregada (DMPD +  $\text{Fe}^{3+}$  e NaOH). Os resultados são apresentados na Tabela 3.7. Nota-se que a recepção de  $\text{H}_2\text{S}$  em solução de NaOH levou a aumento na sensibilidade, quando comparado com a coleta do  $\text{H}_2\text{S}$  em DMPD +  $\text{Fe}^{3+}$ , pelos menores valores dos limites de detecção e quantificação, apesar de estarem limitados a uma estreita faixa de trabalho. Isto poderia ser

contornado com reduções apropriadas no volume inserido no percurso analítico ou pelo aumento da vazão das soluções de DMPD e  $\text{Fe}^{3+}$ . Para as recepções em DMPD +  $\text{Fe}^{3+}$  e solução de NaOH foram observados RSD < 4%, indicando uma precisão do procedimento proposto para ambos os sistemas de recepção do  $\text{H}_2\text{S}$  permeado.

Tabela 3.7. Figuras de mérito para o procedimento em fluxo proposto.

Faixas ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Equação (r)	LD ( $3\sigma$ ), $\text{mg L}^{-1}$	LQ ( $10\sigma$ ), $\text{mg L}^{-1}$	RSD (%)
<b>Recepção DMPD + <math>\text{Fe}^{3+}</math></b>				
5 - 100	$A = 0,007C - 0,0016$ (0,9999)	0,35	1,16	2,18
25 - 300	$A = 0,0032C - 0,009$ (0,9995)	0,89	2,98	3,2
<b>Recepção NaOH</b>				
0,5 - 25	$A = 0,025C + 0,0065$ (0,9999)	0,12	0,4	2,39
25 - 200	$A = 0,0028C + 0,0098$ (0,9999)	0,25	0,86	3,3

Uma vez estabelecidas às figuras de mérito do sistema e visando a determinação de sulfito em amostras de vinhos e sucos de frutas foram executados testes de recuperação para averiguar os possíveis efeitos da matriz frente ao sistema de análise em fluxo proposto.

### 3.4.12 Teste de Recuperação

Para avaliar possíveis efeitos de matriz foram realizados testes de recuperação nas amostras a serem analisadas, visando determinar sulfito livre. Isto devido ao fato do sulfito ligado estar relacionado a outros fatores como a composição da amostra, tempo e forma de armazenamento. Os resultados obtidos nestes ensaios são apresentados na Tabela 3.8. Os resultados obtidos para a recuperação indireta de sulfito em amostras de vinhos e sucos de frutas mostraram recuperação superior a 95%, evidenciando a eficácia na conversão e separação do  $\text{H}_2\text{S}$  no sistema de análise em fluxo proposto.

Tabela 3.8. Resultados dos testes de recuperação de sulfito para amostras de vinho e sucos de fruta.

Amostra	Adicionado ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Encontrado ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Recuperação (%)	
		DMPD e $\text{Fe}^{3+}$	NaOH	DMPD e $\text{Fe}^{3+}$	NaOH
Vinho tinto	2,5	2,38	2,45	95,2	98,0
	5,0	4,89	4,93	97,8	98,6
	10	9,75	9,86	97,5	97,5
Vinho branco	2,5	2,39	2,48	95,6	99,2
	5,0	4,91	4,95	98,2	99,0
	10	9,91	9,93	99,1	99,1
Suco polpa	2,5	2,38	2,46	95,2	98,4
	5,0	4,87	4,85	97,4	97,0
	10	9,65	9,85	96,5	98,5

N = 3

### 3.4.13 Determinação de Sulfito em Amostras de Vinho e Sucos

Confirmada a capacidade do sistema de análise em fluxo para conversão e separação do H<sub>2</sub>S produzido pela redução de sulfito, foram determinados os teores de sulfito, livre e total, em amostra de vinho branco e tinto. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 3.9 e 3.10.

Como procedimento de referência para determinação de sulfito livre e total nas amostras de vinho branco foi utilizado o protocolo analítico da AOAC. O procedimento também foi realizado em sistema de análise em fluxo com separação *on line*, empregando câmara de permeação equipada com a mesma membrana semipermeável PTFE. O procedimento preconizado pela AOAC apresentava baixa frequência analítica (~ 12 amostras h<sup>-1</sup>) e necessitava do uso de HgCl<sub>4</sub><sup>-</sup> como estabilizante no preparo de soluções de referências e na diluição das amostras para a determinação do teor de sulfito total. O sulfito permeado era quantificado pelo produto da reação com verde de malaquita.

Tabela 3.9. Teores de **sulfito livre** em amostras de vinho branco e tinto.

Amostra	Método Proposto (mg L <sup>-1</sup> )		Método de Referência (mg L <sup>-1</sup> )
	Recepção		
	DMPD e Fe <sup>3+</sup>	NaOH	
<i>Vinho branco</i>			
1	6,1 ± 0,2	6,29 ± 0,08	6,6 ± 0,6
2	4,5 ± 0,9	4,75 ± 0,08	4,4 ± 0,2
3	4,4 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,2
4	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,2	5,38 ± 0,08
5	11,85 ± 0,07	12,09 ± 0,03	12,2 ± 0,3
6	3,1 ± 0,1	3,30 ± 0,03	3,45 ± 0,08
<i>Vinho tinto</i>			
7	2,69 ± 0,07	2,74 ± 0,03	NR
8	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,2	NR
9	10,76 ± 0,07	11,0 ± 0,2	NR
10	15,98 ± 0,07	16,2 ± 0,2	17,0 ± 0,4
11	12,7 ± 0,2	12,8 ± 0,3	13,3 ± 0,6

NR = Não realizado

Para determinação de sulfito em vinho tinto, no Manual de Bebidas Alcoólicas Fermentadas publicado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), é recomendada que seja feita a destilação da amostra de vinho em meio ácido (HCl), seguida da coleta do SO<sub>2</sub> em solução previamente padronizada de iodo. Em seguida, o iodo residual seria, então, titulado com solução de tiosulfato e a quantidade de sulfito na amostra poderia ser calculada pelo volume consumido da solução de tiosulfato necessário para atingir o ponto final da titulação. Portanto, outro procedimento de referência foi escolhido, devido as possíveis perdas durante a destilação do SO<sub>2</sub>. Além disto, este método analítico permite quantificar apenas sulfito total nas amostras, e apresenta produtividade analítica de ~2 amostras por hora. Desta forma, optou-se pelo procedimento recomendado pela União Européia, baseado em titulação iodimétrica. Este era baseado na titulação direta do sulfito livre. Contudo, após a adição de solução de NaOH, seguida de agitação e da adição de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o sulfito ligado era titulado. Apesar deste

procedimento ter sérias limitações para detectar o ponto final, foi possível a determinação das duas espécies de sulfito em amostras de vinho tinto. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Teores de **sulfito total** em amostras de vinho branco e tinto.

Amostra	Proposto (mg L <sup>-1</sup> )		Método de Referência (mg L <sup>-1</sup> )
	Recepção		
	DMPD e Fe <sup>3+</sup>	NaOH	
<i>Vinho Branco</i>			
1	75 ± 1	77 ± 1	72,8 ± 0,8
2	89 ± 2	90 ± 2	89,5 ± 0,1
3	86 ± 1	87 ± 2	86,7 ± 0,1
4	111,1 ± 0,2	114 ± 1	109,8 ± 0,3
5	84 ± 1	83 ± 2	83,24 ± 0,06
6	71 ± 1	72 ± 1	72,76 ± 0,04
<i>Vinho Tinto</i>			
7	27,3 ± 0,7	28,8 ± 0,8	NR
8	26,8 ± 0,8	29,8 ± 0,5	NR
9	55,0 ± 0,9	57,0 ± 0,8	NR
10	103 ± 2	106 ± 2	110 ± 1
11	95 ± 1	98 ± 1	104 ± 2

NR = Não realizado

Para avaliar se os resultados encontrados apresentaram boa concordância com o método proposto foi estabelecida a relação linear,  $C_{FIA} = Co + S C_{Ref}$ , sendo **S** o coeficiente angular, **Co** o coeficiente linear e associados a estes, **r** o coeficiente de correlação linear (Segundo e Rangel, 2001). Para sulfito livre e total foram estabelecidos os valores discriminados na Tabela 3.11, onde os valores entre parênteses são os limites do intervalo para 95% confiança. Pelos valores obtidos para **S** e **r** pôde ser constatada a relação linear entre o método proposto e o de referência para as amostras analisadas.

Tabela 3.11. Parâmetros para comparação do método proposto e do método de referência.

Sulfito	Co	S	r
Livre	0 (± 0,2)	1,0 (± 0,4)	0,997
Total	-4 (± 6)	1,06 (± 0,08)	0,991

O procedimento de referência indicado pelo Manual de Bebidas Não Alcoólica publicado pelo MAPA indica o método de Monnier – Willians, modificado por Shipton, para determinação de sulfito em amostras de sucos de frutas. Uma vez que nosso laboratório não possui o aparato adequado e pelo fato do processo ser laborioso, optou-se por realizar uma titulação iodimétrica para determinar o teor de sulfito nas amostras de sucos. Os resultados das determinações de sulfito nas amostras de suco de frutas são apresentados na Tabela 3.12.

Tabela 3.12. Teores de sulfito em amostras de sucos de frutas.

Amostra <sup>a</sup>	Proposto (mg L <sup>-1</sup> )		Método de Referência (mg L <sup>-1</sup> )
	Recepção		
	DMPD e Fe <sup>3+</sup>	NaOH	
12	73 ± 1	75 ± 1	78 ± 2
13	5,1 ± 0,1	5,48 ± 0,06	5,7 ± 0,7
14	4,09 ± 0,3	4,23 ± 0,01	NR <sup>b</sup>
15	2,19 ± 0,2	2,19 ± 0,01	NR
16	ND <sup>c</sup>	0,78 ± 0,03	NR
17	ND	0,60 ± 0,03	NR
18	ND	0,58 ± 0,01	NR
19	ND	0,7 ± 0,1	NR

a: Amostras de 12 – 15 **sucos concentrados** (caju, maracujá, acerola e abacaxi, respectivamente) e 16 – 19 de **sucos para pronto consumo** (caju, maracujá, acerola e abacaxi, respectivamente). b: Não realizado c: Não detectado

### 3.4.14 Comparação do Método Proposto a Outros Reportados na Literatura

O procedimento proposto, em sistema de análise em fluxo, para determinação indireta de sulfito foi comparado com outros métodos reportados na literatura onde a determinação de sulfito também era realizada empregando sistema de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica. Na Tabela 3.13 são apresentadas algumas características do procedimento desenvolvido nesta etapa do trabalho, com recepção do H<sub>2</sub>S permeado em solução de NaOH, com as de outros trabalhos já publicados.

Tabela 3.13 . Comparação de algumas características entre procedimentos em fluxo para determinação espectrofotométrica de sulfito e o processo proposto.

Trabalho	Separação	Faixa (mg L <sup>-1</sup> )	Produtividade (h <sup>-1</sup> )	LD (mg L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Amostra (s)
Mataix e Luque de Castro, 1998	Pervaporação	2 – 20	12	1,2	3,0	Vinhos brancos e tintos
Fatibello Filho e Vieira, 1997	Sem separação	3,2 – 48	26	0,18	< 0,6	Vinho branco e suco
Segundo e Rangel, 2001	Difusão	2 – 40 (L) 25 – 250 (T)	16	0,1 (L) 0,6 (T)	< 1,2 (L) < 2,3 (T)	Vinhos brancos e tintos
Weever e Kraak, 1997	Difusão	1 – 20	120	0,1	< 1,5	Vinhos brancos e tintos
Melo <i>et al.</i> , 2003	Difusão	1 -20	30	0,4	<0,015	Vinho branco
Atanassov <i>et al.</i> , 2000	Difusão	50 – 300	40	-	< 4,5	Vinhos brancos e tintos
Proposto	Difusão	0,5 – 25 (L) 25 – 200 (T)	40	0,12 (L) 0,25 (T)	< 2,4(L) < 3,3 (T)	Vinhos brancos e tintos e sucos

Sulfito livre (L) e total (T).

Pelas informações contidas na Tabela 3.12 pode-se observar que o procedimento desenvolvido neste trabalho apresentou frequência analítica, limite de detecção e faixas de trabalho compatíveis com os outros procedimentos. As duas faixas de trabalho apresentadas para o procedimento proposto, não são comumente observadas nos outros trabalhos, isto devido ao fato da maioria dos trabalhos determinarem apenas sulfito livre e, quando foi determinado sulfito total, recorrerem para diluição *off line*. Desta forma, pode-se concluir que o sistema de análise em fluxo proposto, associado a UIO apresentou excelente

---

desempenho na comparação dos resultados obtidos nos testes de validação para amostras de vinhos e sucos e por apresentar atributos comparáveis com os obtidos por diferentes pesquisadores, visando a determinação desse analito em amostra similares. Além disto o procedimento proposto atendeu aos quesitos da Química Analítica Moderna, quanto à automação, miniaturização e resposta rápida (Valcárcel *et al.*, 2000).

### 3.5 Conclusões

De acordo com os testes realizados e os dados obtidos, pôde-se concluir:

- (i) a unidade integradora de operações mostrou-se eficiente em corrigir descontinuidades temporais e espaciais na rotina de trabalho;
- (ii) o circuito desenvolvido para controle das válvulas solenóides, visando a interrupção de fluxo no compartimento superior da UIO, não foi eficiente para a pré-concentração do H<sub>2</sub>S permeado;
- (iii) a membrana de PTFE fixada na UIO mostrou-se mais seletiva a permeação de H<sub>2</sub>S do que de SO<sub>2</sub>;
- (iv) o teor de 15% (v/v) de álcool etílico na solução transportadora nivelou o efeito deste na permeação de H<sub>2</sub>S para soluções de referência preparadas sem a adição de álcool;
- (v) a recepção em solução de NaOH mostrou-se mais sensível que para recepção em DMPD e Fe<sup>3+</sup>;
- (vi) o sistema proposto mostrou-se adequado para determinação indireta de sulfito livre e total em amostra de vinhos (branco e tinto) e sucos de fruta (para pronto consumo e de polpa);
- (vii) a utilização de apenas um reagente (DMPD) torna o método proposto versátil, visto que o mesmo princípio de reação pode ser utilizado para quantificação de suas espécies distintas - H<sub>2</sub>S e SO<sub>2</sub>.

---

### 3.10 Referências

- ALIPÁZAGA, M.V., KOSMINSKY, L. COICHEV, N. e BERTOTTI, M., S(IV) induced autoxidation of Cu(II)/tetraglicine complexes in the presence of aldehydes: mechanistic considerations and analytical application, *Talanta*, 57, 375, 2002.
- ANVISA, [www.anvisa.gov.br/alimentos](http://www.anvisa.gov.br/alimentos), consultado em 5 de abril de 2004.
- AQUARONE, E., LIMA, U.A. e BORZANI, W., *Biotecnologia – Alimentos e Bebidas produzidos por fermentação*, Ed. Edgard Blucher Ltda, v 5, São Paulo, 1983.
- ATANASSOV, G.T., LIMA, R.C., MESQUITA, R.B.R., RANGEL, A.O.S.S. e TÓTH, I.V., Spectrophotometric determination of SO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in wines by flow injection, *Analisis*, 28, 77, 2000.
- BERKÉ, B., CHÉZE, C., VERCAUTEREN, J. e DEFFIEUX, G., Bisulfite addition to anthocyanins to anthocyanins, *Tetrahedron Letters*, 39, 5771, 1998.
- BETHGE, P.O. e CARLSON, M., p-nitroaniline as a colorimetric reagent for sulphur dioxide, *Talanta*, 16, 144, 1969.
- BOLTZ, D.F. e HOWOLL, J.A., *Colorimetric determination of nonmetals*, 2ª edition, John Wiley & Sons, NY, 1978.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 01 de 29 de janeiro de 1987. Dispõe sobre método analítico de bebidas e vinagre. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 04 fev. 1987.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.
- BRONIKOWSKA, W.P. e RUDZINSKI, K.J., Absorption of SO<sub>2</sub> into aqueous systems, *Chemical Engineering Science*, 46 (9), 2281, 1991.
- BURROUGHS, L.F. e SPARKS, A.H., Sulphite-binding power of wines and ciders, I – Equilibrium constants for the dissociation of carbonyl bisulphite compounds, *Journal Science Food Agriculture*, 24, 187, 1973.
- BURROUGHS, L.F. e SPARKS, A.H., Sulphite-binding power of wines and ciders, II – Theoretical considerations and calculation of sulphite binding equilibria, *Journal Science Food Agriculture*, 24, 199, 1973.
- BURROUGHS, L.F. e SPARKS, A.H., Sulphite-binding power of wines and ciders, III – Determination of carbonyl of compounds in a wine and calculation of its sulphite-binding power, *Journal Science Food Agriculture*, 24, 207, 1973.
- CALATAYUD, J.M., *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: automation in the laboratory*, Taylor & Francis, London, 1995.
- CANHAM, J.S., GORDON, G. e PACEY, G.E., Optimization of parameters for gas-diffusion flow-injection systems, *Analytica Chimica Acta*, 209, 157, 1988.
- CASELA, I.G., GUASCITO, M.R. e DESIMONI, E., Sulfide measurements by flow injection analysis and ion chromatography with elect. rochemical detection, *Analytical Chimica Acta*, 409, 27, 2000.
- CUNNIFF, O. ed., *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International, Arlington, Ch. 47, 33, 1995.

- 
- FATIBELLO FILHO, O. e VIEIRA, I.C., Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase, *Analytical Chimica Acta*, 354, 51, 1997.
- FAZIO, T. e WARNER, C.R., A review of sulfides in foods: analytical methodology and reported findings, *Food additives and contaminants*, 7(4), 433, 1990.
- GRASSI, V., MIYAZAWA, M., PAVAN, M.A. e KAMOGAWA, M. Y., Determinação em fluxo do carbonato residual do solo empregando pervaporação, *Química Nova*, 25(1), 149, 2002.
- GROOM, C.A, LUONG, J.H.T e MASSON, C., Development of a flow injection analysis mediated biosensor for sulfite, *Journal of Biotechnology*, 27, 117, 1993.
- GRU, C., SARRADIN, P.M., LEGOFF, H. NARCON, S. CAPRAIS e LALLIER, H. Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from *Riftia pachyptila*, *Analyst*, 123, 1289, 1998.
- HASSAN, S.S.M., MAREI, S.A., BADR, I. H. e ARIDA, H. A., Flow injection analysis of sulfite ion with a potentiometric titanium phosphate-epoxy based membrane sensor, *Talanta*, 54, 773, 2001.
- JANKOVSKIENE, G., DAUNOIRAVICIUS, Z. e PADARAUSKAS, A., Capillary electrophoretic determination of sulfite using the zone-passing technique of in-capillary derivatization, *Journal of Chromatography A*, 934, 67, 2001.
- JURD, L., Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins, *Journal of Food Science*, 29 (1), 16, 1964.
- KNISELEY, S.J. e THROOP, L.J., p-Aminoazobenzene for the spectrophotometric determination of sulfur dioxide, *Analytical Chemistry*, 38(9), 1270, 1966.
- KUBAN, V., DASGUPTA, P.K. e MARX, J.N., Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater, *Analytical Chemistry*, 64, 36, 1992.
- LAMBERT, J.L., CHEJLAVA, M.J., BEYAD, M.H. e PAUKSTELIS, J.V., The protonated 4,4'-diaminotriphenylmethyl cation as a reagent and cyclohexanone as an absorbant for sulphur dioxide determination, *Talanta*, 29, 37, 1982.
- LAMBERT, J.L., CHEJLAVA, M.J., PAUKSTELIS, J.V. e LIU, A.T., 4-nitro-1,2-diaminobenzene as a new chromogen in the West-Gaeke method for sulfur dioxide, *Analytica Chimica Acta*, 99, 379, 1978.
- LAWRENCE, N.S., DAVIS, J. e COMPTON, R.G.; Analytical strategies for the determination of sulfide: a review; *Talanta*, 52, 771, 2000.
- LEA, A.G.H., FORD, G.D. e FOWLER, S., Analytical techniques for the estimation of sulphite binding components in ciders and wines, *Food Science and technology*, 35, 105, 2000.
- LECLERCQ, C., MOLINARO, M.G., PICCINELLI, R., BALDINI, M., ARCELLA, D. e STACCHINI, P., Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphites – containing foods and their combination into standard meals for adults and children, *Food additives and contaminants*, 17(12), 979, 2000
- LEE, J.D., *Química Inorgânica: um novo texto conciso*, Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1980.

- 
- LIMA, F.C.C. MATOS, C.D. e VAZ, M.C., Flow-injection analysis of Kjeldahl nitrogen in milk and dairy products by potentiometric detection, *Analytica Chimica Acta*, 385, 437, 1999.
- VAN DER LINDEN, W.E., Membrane separation in flow injection analysis - gas diffusion, *Analytical Chimica Acta*, 151, 359, 1983.
- LINDGREN, M. e CEDERGREN, A., Conditions for sulfite stabilization and determination by ion chromatography, *Analytical Chimica Acta*, 141, 279, 1982.
- MARCZENKO, Z., *Spectrophotometric determination of elements*, Ellis Horwood Limited, N. York, 1976.
- MARTINS, C.R e ANDRADE, J.B., Química atmosférica do enxofre (IV): emissões, reações em fase aquosa e impacto ambiental, *Química Nova*, 25 (2), 259, 2002.
- MATAIX, E. e LUQUE DE CASTRO, M.D., Determination of total and free sulfur dioxide in wine by pervaporation-flow injection, *Analyst*, 123, 1547, 1998.
- MELO, D., ZAGATTO, E.A.G., MATTOS, I e MANIASSO, N., Spectrophotometric flow-injection determination of sulphite in white wines involving gas diffusion through a concentric tubular membrane, *Journal Brazilian Chemistry Society*, 14 (3), 375, 2003.
- MESTRES, M. BUSTO, O. e GUASCH, J., Analysis of sulfur compounds in wine aroma, *Journal Chromatography A*, 881, 569, 2000.
- MIURA, Y., FUZUNOBU, K. e KOH, T., Determination of sulfur compounds at the ppb level by ion chromatography utilizing their catalytic effects on the post-column reaction of iodine with azide, *Journal of Chromatography A*, 804, 143, 1998.
- PEARSON, G.R., Acids and Bases, *Science*, 151, 172, 1966.
- PIZZOFERRATO, L., LULLO, G. e QUATTUCCI, E., Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC, *Food Chemistry*, 43 (2), 275, 1998.
- QIN, W., ZHANG, Z. e ZHANG, C., Chemiluminescence flow system for the determination of sulfite, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 824, 1998.
- QIN, W., ZHANG, Z. e ZHANG, C., Reagentless chemiluminescence flow sensor for sulfite, *Analytica Chimica Acta*, 361, 201, 1998.
- QUAGLIANO, J.V. e VALLARINO, L.M., *Química*, 3ª edição, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1973.
- RAMAN, V., RAI, J., SINGH, M. e PARASHAR, D. C., Morpholine as an absorbing reagent for the determination of sulphur dioxide, *Analyst*, 111, 189, 1986.
- RANGEL, A.O.S.S. e TÓTH, I., Determination of ethanol in wines by flow injection spectrophotometry using gas-diffusion and an immobilized enzyme reactor, *American Journal Enol. Vitic.*, 50(3), 259, 1999.
- RANGEL, A.O.S.S. e TÓTH, I., Sequential determination of titratable acidity and tartaric acid in wines by flow injection spectrophotometry, *Analyst*, 123, 661, 1998.
- REIS, B.F., GINÉ, F. e KRONKA, E.A.M., A análise química por injeção em fluxo contínuo, *Química Nova*, 1, 82, 1989.
- ROCHA, F.R.P., NÓBREGA, J.A. e FATIBELLO FILHO, O., Flow analysis to greener analytical chemistry. An overview, *Green Chemistry*, 3, 216, 2001.

- 
- ROCHA, F.R.P., REIS, B.F., ZAGATTO, E.A.G., LIMA, J.L.F.C., LAPA, R.A. S. e SANTOS, J.L.M., Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends, *Analytical Chimica Acta*, 468, 119, 2002.
- RUZICKA, J. e HANSEN, E.H., *Flow Injection Analysis*, 2ª edition, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- SAFAVI, A. e ENSAFI, A.A., Kinetic spectrophotometric determination of traces of sulphites, *Analytical Chemistry Acta*, 252,121, 1991.
- SANTOS, J.C.C. e KORN, M., Desempenho de unidade integradora de operações (preparo/separação/reação) em sistema FIA na determinação de sulfito em sucos e vinhos, *Livro de Resumos 26ª RASBQ*, QA 024, Poços de Calda, 2003.
- SCHERZ, P., *Practical electronic for inventors*, Mc Graw-Hill, N. York, 2000.
- SEGUNDO, M.A. e RANGEL, O. S. S., A gas diffusion sequential injection system for the determination of sulphur dioxide in wines, *Analytica Chimica Acta*, 427, 279, 2001.
- SEGUNDO, M.A. e RANGEL, O.S.S, CLADERA,A. and CERDA, V., Multisyringe flow system: determination of sulfur dioxide in wines, *Analyst*, 125, 1501, 2000.
- SIENKO, M.J. e PLANE, R.A., *Química*, 4ª edição, Companhia Editora Nacional, São Paulo, 1974.
- SIMÃO, A.M. *Aditivos para alimentos sob aspecto toxicológico*, 2ª edição, Nobel, São Paulo, 1987.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M. e HOLLER, F.J., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7ª edition, Saunders College Publishing, Florida, 1997.
- SU, Y.C. e TAYLOR, S.L., Sulphite analysis of food ingredients: false positive responses with butter flavourings in the optimized Monier-Williams method, *Food additives and contaminants*, 12(2), 153, 1995.
- UMIKER, K.J., MORRA, M.J. e CHENG, I.F., Aqueous sulfur species determination using differential pulse polarography, *Microchemical Journal*, 73, 287, 2002.
- VAHL, J.M. e CONVERSE, J.E., *Journal of Association Official Analytical Chemistry*, 63,194,1980.
- VALCÁRCEL, M., *Automatión y miniaturización en Química Analítica*, Springer, Barcelona, 2000.
- VALCARCEL, M. e LUQUE DE CASTRO, M., *Flow injections analysis: principles and applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1987.
- WEEVER, L.G.D. e KRAAK, J.C., Determination of sulphites in wine by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection, *Analytica Chimica Acta*, 337,125, 1997.
- WEST, P.W. e GAEKE, G.C., Fixation of sulfur dioxide as disulfitomercurate (II) and subsequent colorimetric estimation, *Analytical Chemistry*, 28(12), 1956.
- XIN-QI, Z., DONG-HUI, L., HONG, Z. e JIN-GOU, Fluorimetric determination of sulfite by the co-quenching effect of formaldehyde and sulfite on the fluorescence of tetra-substitued amino aluminum phthalocyanine, *Analytica Chimica Acta*, 448, 71, 2001.
- YANG, X.F., GUO, X.Q. e ZHAO, Y.B., Novel spectrofluorimetric method for the determination of sulfite with rhodamine B hydrazine in a micellar medium, *Analytica Chimica Acta*, 456, 121, 2002.

---

**\_\_\_\_\_ CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS \_\_\_\_\_**

---

Este trabalho possibilitou uma interface entre conhecimentos aplicados em Química Analítica e Química Orgânica. Considerando o contexto em que foi desenvolvido é importante destacar: as propostas de trabalho desenvolvidas apresentaram cunho inovador e o bom número de técnicas, conceitos e métodos empregados para suportar as afirmações apresentadas.

A implementação de uma nova rota sintética suportada em um procedimento analítico mostrou-se adequada, e serviu de parâmetro para o estudo comparativo dos CFs para determinação espectrofotométrica de sulfeto em sistema de análise em fluxo. Apesar de somente as aminas N-substituídas terem apresentado velocidade de reação adequada para sistemas em fluxo, seria de suma importância estudos posteriores para uma melhor apreciação das potencialidades das aminas O-substituídas. O emprego do hipoclorito como oxidante para este padrão de reação deverá sofrer estudos mais detalhados, em virtude de suas claras vantagens e da experiência do nosso grupo de pesquisa na produção sonoquímica  $\text{ClO}^-$ .

A utilização do DMPD na determinação indireta de sulfito mostrou ser vantajosa, implicando no emprego de reagente único em procedimentos analíticos. Salienta-se que o azul de metileno pode ser recuperado e encontra uma série de aplicações, diferente para os produtos gerados em outros métodos para determinação de sulfito. A UIO desenvolvida mostrou-se capaz de reduzir descontinuidades espaciais e temporais na rotina de trabalho, concordando com tendências da Química Analítica Moderna visando à miniaturização e automação. O sistema em fluxo para determinação indireta de sulfito mostrou-se adequado associando a UIO e o conceito de reagente único.

A produção de CFs em reação para determinação de sulfeto pode ser empregada como princípio para utilização do suposto “descarte” como uma solução reagente, visando a determinação de outras espécies químicas. Estudos com o derivado **5a** como reagente de derivatização produzido *in situ*, devem ser implementados visto o grande número de reações e interações a que está sujeito o grupo amino.

A síntese de compostos com o núcleo fenotiazínico geralmente relata compostos com substituição nos anéis laterais ou ao átomo de nitrogênio heterocíclico. Porém estudos demonstraram que compostos contendo o grupo  $-\text{SH}$  apresentam o mesmo padrão de reação. Isto pode ser investigado visando aplicações analíticas e sintéticas de novos derivados de CFs e outros compostos da mesma natureza.

---

**ANEXO**

---

---

# CURRICULUM VITAE

## 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Josué Carinhanha Caldas Santos

**Filiação:** Luiz Sérgio Tupinambá Caldas Santos e Arlete Lago Carinhanha Santos

**Nascimento:** 19/07/1980, Santo Antônio de Jesus/Ba-Brasil

**Carteira de identidade:** 0865613400-SSPBa

## 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

**2002 – 2004**

Mestrado em Química

Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

**Título:** AVALIAÇÃO E SÍNTESE DE CORANTES FENOTIAZÍNICOS PARA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE SULFETO E SULFITO EMPREGANDO SISTEMAS DE ANÁLISE EM FLUXO. Ano de obtenção: 2004

**Orientador:** Prof. Dr. Mauro Korn

Bolsista do Conselho Nacional de Científico e Tecnológico/DF

**1998 – 2001**

Graduação em Licenciatura em Química

Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Bahia, Brasil

## 3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

**Á Fórmula**

2001 – 2002 : Químico, Controle de Qualidade de Fármacos e Princípios Ativos

## 4. TRABALHO EM CONGRESSOS

8 trabalhos apresentados

## 5. ARTIGO SUBMETIDO

*Flow Injection Biamperometric Determination of Pantoprazole in Pharmaceuticals,*

**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.**

Em fevereiro de 2004.