Pedro Miguel Gonçalves Rodrigues

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES.

Diacetilo e Vitalidade de Levedura em Indústria Cervejeira e Metalotioneínas em Estudos Ambientais.

Dissertação para Doutoramento em Química

na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Química da Faculdade de Ciências
da Universidade do Porto

PORTO 2003

Pedro Miguel Gonçalves Rodrigues

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES.

Diacetilo e Vitalidade de Levedura em Indústria Cervejeira e Metalotioneínas em Estudos Ambientais.

Dissertação para Doutoramento em Química
na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Química da Faculdade de Ciências
da Universidade do Porto

PORTO 2003

Aos meus Pais

À Catarina e aos meus Filhos

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Aquiles Araújo Barros, meu orientador, pelos ensinamentos que me transmitiu, pelo seu permanente apoio e pela confiança que sempre depositou em mim.

Ao Doutor José António Rodrigues, meu co-orientador, pela amizade e, pelos muitos e bons conselhos.

Ao Luís, ao Rodrigo, ao Sérgio e ao Paulo pela amizade, boa camaradagem e apoio.

À Unicer, pela colaboração que me foi facultada, pelos meios que me concedeu e pelas muitas e boas amizades que me proporcionou.

Ao Dr. Augusto Ferreira, responsável pelo meu acolhimento na Unicer, pelas oportunidades que me tem concedido.

Ao Professor Doutor Costa Lima e ao Doutor Rui Lapa pelo apoio concedido na automatização do sistema de diacetilo.

Ao Doutor John Hammond por tudo quanto me ensinou sobre levedura e fermentação.

À Professora Doutora Maria Armanda Reis, pela disponibilidade e colaboração que sempre me concedeu no trabalho das metalotioneínas.

A toda a minha Família pelo apoio incondicional, estímulo e exemplo que sempre me deu.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos i
Resumo iii
Abstract v
Résumé vii
Índice Geral ix
Índice de Figuras xv
Índice de Tabelas xxiii
Abreviaturas xxv

Parte I- Considerações sobre o uso de biomarcadores

1. Importância da biomonitorização para a avaliação da actividade metabólica celular 3
1.1. Metabolismo como espelho da actividade celular 3
1.2. Tradução molecular e bioquímica dos efeitos fisiológicos 4
1.3. Determinação molecular e bioquímica da actividade metabólica celular 4
1.4. Biomonitorização como ferramenta de análise biológica 5
2. Biomarcadores como interfaces entre a química analítica e sistemas biológicos "in vivo" 8
2.1. Utilização de biomarcadores em química analítica 8
2.1.1. Fundamentos 8
2.1.2. Tipos de biomarcadores 10
2.2. Factores de planeamento e análise de estudos de biomarcação 13
2.2.1. Critérios de escolha e avaliação de biomarcadores 13
2.2.2. Planificação e organização de estudos de biomarcação 15
2.2.3. Processos de validação de biomarcadores e de estudos de biomarcação 17
3. Biomarcação de processos da indústria cervejeira 23
3.1. Biomarcação na indústria de processamento alimentar 23
3.2. Biomarcadores na indústria cervejeira 23
4. Biomarcação em química ambiental na hidrosfera 25
4.1. Poluição na hidrosfera 25
4.2. Biomarcação de toxicidade ambiental na hidrosfera utilizando peixes 26
Referências bibliográficas

Parte II - Desenvolvimento de um sistema voltamétrico em linha para a biomonitorização de diacetilo na cerveja

Síntese - Parte II
1. Sistema de detecção voltamétrica em fluxo usando um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa 39
1.1. O estado da arte 39
1.1.1. Sistemas de fluxo com eléctrodos de mercúrio de gota suspensa 40
1.2. Detecção voltamétrica 43
1.2.1. Voltametria e polarografia 43

1.2.2. Voltametria de onda quadrada 45
1.2.3. Técnicas voltamétricas com pré-acumulação 46
1.2.3.1. Voltametria de redissolução com adsorção 46
1.2.3.2. Voltametria de redissolução anódica 47
1.2.3.3. Voltametria de redissolução catódica 47
1.2.4. Voltametria de onda quadrada de elevada frequência associada a técnicas de pré-acumulação. 48
1.2.4.1. Aumento da sensibilidade e da rapidez da análise 48
1.2.4.2. Eliminação do passo de desoxigenação 49
1.3. Características e funcionamento do sistema 49
1.3.1. Configuração da célula voltamétrica de fluxo 49
1.3.2. Configuração do sistema de fluxo 52
1.3.3 Esquema de funcionamento do sistema 53
1.4. Exemplos de aplicação do sistema desenvolvido 55
1.4.1. Determinação por voltametria com adsorção 55
1.4.1.1. Detecção de riboflavina 55
1.4.1.2. Detecção de azorubina (carmosina) 57
1.4.1.3. Detecção do azul de metileno 59
1.4.1.4. Detecção de catiões cobre (II) e cádmio(II) por complexação com óxima 61
1.4.2. Determinação por voltametria de redissolução anódica 64
1.4.3. Determinação por voltametria de redissolução catódica 67

2. Aplicação do sistema na análise de diacetilo e α-dicetonas na cerveja 69
2.1. Introdução 69
2.1.1. Importância da determinação do diacetilo e outras α-dicetonas na cerveja 69
2.1.1.1. Importância do diacetilo nas propriedades organolépticas da cerveja 69
2.1.1.2. Levantamento histórico breve 70
2.1.1.3. A importância do diacetilo no processo de fermentação e no produto final 71
2.1.2. Processo de produção de cerveja, uma perspectiva para enquadramento do tema 72
2.1.3. O diacetilo na cerveja 75
2.1.3.1. Biossíntese e excreção de ácidos α-acetohidroxilados pela levedura 76
2.1.3.2. Decomposição química espontânea dos ácidos α-acetohidroxilados em α-dicetonas 79
2.1.3.3. Reabsorção e redução celular do diacetilo pela levedura 81
2.1.3.4. Concentração de diacetilo – balanço entre a formação e remoção de diacetilo no processo de fermentação 82
2.1.4. Preparação de amostras - aspectos práticos da reacção de pré-conversão para a análise de diacetilo na cerveja 87
2.1.4.1. Catalisação da reacção de pré-conversão – efeito de vários factores 88
2.1.4.2. Interferências na análise - vias alternativas de formação do diacetilo 90
2.1.5. Métodos de determinação de diacetilo na cerveja 91
2.1.6 Pervaporação como método de separação do diacetilo – princípios e aplicações como técnica analítica de separação 93
2.1.6.1 Sistemas de pervaporação – características, propriedades e princípio de funcionamento 94
2.1.6.2 Tipos de pervaporação – modelos esquemáticos e aplicações 96
2.1.6.3 Separação de diacetilo por pervaporação 99
2.2. Determinação em fluxo de diacetilo e dicetonas vicinais na cerveja – estudo "off line" 100

2.2.1. Instrumentação, reagentes e soluções 101
2.2.1.1. Instrumentação 101
2.2.1.2. Reagentes, soluções e padrões 102
2.2.2. Sistema de voltametria com fluxo 103
2.2.3. Aplicação do sistema à determinação da 2,3-DMQ 107
2.2.3.1. Cinética da reacção de eléctrodo 108
2.2.3.2. Adsorção da 2,3-DMQ no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa 110
2.2.3.3. O efeito da OFDA na determinação voltamétrica 112
2.2.3.4. Efeito do caudal do fluxo na detecção da 2,3-DMQ 113
2.2.4. Análise em fluxo de dicetonas vicinais na cerveja por injecção directa após destilação e derivatização com OFDA "off line". 115
2.2.4.1. Separação por destilação 116
2.2.4.2. Reacção de derivatização 117
2.2.4.3. Optimização dos parâmetros instrumentais 118
2.2.4.4. Procedimento para análise voltamétrica em fluxo de α-dicetonas pelo método das adições de padrão 121
2.2.4.5. Avaliação do método 122
2.2.4.6. Estudo da interferência do 2-metilglioxal 123
2.2.4.7. Comparação do método voltamétrico em fluxo com o método espectrofotométrico de referência 124
2.3. Determinação em fluxo de diacetilo e dicetonas vicinais na cerveja – estudo "on-line" 127
2.3.1. Instrumentação, reagentes e soluções 127
2.3.1.1. Instrumentação 127
2.3.1.2. Reagentes, soluções e padrões 129
2.3.2. Concepção e desenho do sistema de análise de diacetilo em linha 130
2.3.2.1. Configuração base e princípios de funcionamento do sistema de fluxo em-linha. Circuitos e diagramas 130
2.3.2.2. Automação do sistema 133
2.3.2.3. Sistema com dois módulos de pervaporação em paralelo 135
2.3.2.4. Procedimento voltamétrico de referência 136
2.3.3. O módulo de pervaporação. Características e desenvolvimento 137
2.3.3.1. Esquemas e desenhos dos módulos de pervaporação utilizados 138
2.3.3.2. Tipo de membrana 140
2.3.3.3. Tipo de suporte da membrana 142
2.3.3.4. Câmara de recepção 144
2.3.3.5. Câmara de doação 145
2.3.3.6. Resumo das características do módulo de pervaporação utilizado 147
2.3.4. Integração do sistema para análise em-linha de diacetilo 149
2.3.4.1. Introdução do módulo de pervaporação para a separação e recuperação do diacetilo 149
2.3.4.2. Optimização de parâmetros de pervaporação 152
2.3.4.3. Optimizações de parâmetros de detecção 156
2.3.4.4. Estudo de interferências 159
2.3.4.5. Efeito do material do módulo de pervaporação 162
2.3.4.6. Preparação de amostras para a determinação do diacetilo total e de α-dicetonas 165
2.3.5. Desenvolvimento de um protótipo do equipamento 168
2.3.5.1. Hardware de controlo 168
2.3.5.2. Software de controlo e de aquisição de dados 169

2.3.5.3. Utilização de um ou dois módulos 171
2.3.6. Determinação de diacetilo em-linha 171
2.3.6.1. Condições instrumentais de análise 173
2.3.6.2 Método de referência – cromatografia em fase gasosa com detector de captura de electrões 174
2.3.6.3. Adaptação do método voltamétrico em fluxo à determinação em-linha de diacetilo na cerveja 175
2.3.6.4. Determinações de diacetilo livre e de diacetilo total 178
2.3.6.5. Determinações de diacetilo em diferentes fases do processo produtivo 179
2.3.6.6. Validação do método voltamétrico em fluxo por comparação com o método de referência por CG-DCE 181
2.3.7. Determinação de α-dicetonas em-linha 183
2.3.7.1. Equipamento, condições instrumentais de análise e procedimento 184
2.3.7.2. Método de referência 184
2.3.7.3. Características do método de determinação de α-dicetonas em-linha 184
2.3.7.4. Determinações de α-dicetonas em diferentes fases do processo 186
2.3.7.5. Validação do método por comparação com o método de referência 187
2.4. Desenvolvimento de um reactor de pré-conversão em-linha 189
2.4.1. Objectivos 189
2.4.2. Concepção do reactor 190
2.4.3. Desenvolvimento do reactor de pré-conversão 191
2.4.4. Optimização do sistema 193
2.4.4.1. Reactor de pré-conversão em teflon (PTFE) 193
2.4.4.2. Reactor de pré-conversão em cobre 194
2.4.5. Conclusão 198
Referências bibliográficas

Parte III - "Vitaltitration" (VT') - um método novo para determinação da vitalidade de levedura

Síntese - Parte III
1. Generalidades sobre leveduras utilizada na produção de cerveja 215
1.1. Características gerais 215
1.2. Utilização de levedura no fabrico de cerveja 216
2. A importância da biomonitorização da vitalidade da leveduras na industria cervejeira 219
2.1. Ciclo da levedura numa empresa cervejeira 220
2.2. A importância da fermentação na qualidade da cerveja 221
2.3. A vitalidade da levedura, o desempenho da fermentação e o carácter organoléptico da cerveja 222
2.4. Avaliação do estado fisiológico da levedura – definição de vitalidade e viabilidade 225
2.5. Métodos de determinação da viabilidade e vitalidade – o estado da arte 227
2.5.1. Métodos de determinação de viabilidade 227
2.5.2. Métodos de determinação de vitalidade 229
3. Desenvolvimento de um novo método de biomarcação de vitalidade para determinação do estado fisiológico de levedura – "vitaltitration" (VT') 232
3.1. Bases do desenvolvimento do método 232
3.2. Lavagem da levedura 233
3.3. Quantidade da levedura 234

3.4. Efeito da temperatura e da agitação 236
3.5. Meio de análise 236
3.6. pH limite 237
3.7. Valor da vitalidade (VT') no método vitaltitration 238
4. Determinação da vitalidade da levedura por "vitaltitration" 239
4.1. Princípios do método 239
4.2. Âmbito e campo de aplicação 239
4.3. Descrição sumária 240
4.4. Instrumentação e material 240
4.5. Reagentes 241
4.6. Procedimento 241
4.7. Expressão dos resultados 242
4.8. Características do método VT' 242
5. Validação laboratorial do método "vitaltitration" 244
5.1. Parte experimental 244
5.1.1. Levedura 244
5.1.2. Fermentações 245
5.1.3. Métodos de determinação de vitalidade utilizados 246
5.1.4. Métodos de determinação de viabilidade utilizados 246
5.2. Projecto do ensaio de "stress" nutricional - envelhecimento de levedura 247
5.3. Validação laboratorial do método "vitaltitration" com um ensaio de armazenamento de levedura 249
5.3.1. Variações da vitalidade VT' e AP20 ao longo do tempo 250
5.3.2. Variações da viabilidade ao longo do ensaio de armazenamento 251
5.3.3. Validação do método de VT' para determinação de vitalidade por comparação com o desempenho da fermentação 252
5.3.4. Conclusões 254
6. Validação industrial do método "vitaltitration" 255
6.1. Parte experimental 255
6.1.1. Levedura 255
6.1.2. Análises da vitalidade e viabilidade de levedura 255
6.1.3. Mosto 256
6.1.4. Fermentações 257
6.1.5. Análises 257
6.2. Efeito da vitalidade da levedura de sementeira, determinada por VT', no desempenho de fermentações industriais 258
6.3. Aplicações do método "vitaltitration" em estudos de biomonitorização para avaliação e melhoria de processos 260
6.3.1. Estudo de biomonitorização do efeito do tipo de mosto e do processo de fabrico na qualidade da levedura recolhida 260
6.3.2. Estudo de biomonitorização do efeito da vitalidade da levedura recolhida na estabilidade de espuma da cerveja 263
6.4. Alteração da vitalidade na fermentação e armazenamento industrial de levedura - considerações sobre vitalidade metabólica e a resistência da levedura ao "stress" 264
6.5. Conclusões e considerações sobre a utilização de métodos de Vitalidade na gestão e manuseamento industrial de levedura 267
Referências bibliográficas

Parte IV- Metalotioneínas como biomarcadores de exposição ambiental de peixes a metais pesados

Síntese - Parte IV
1. Algumas considerações sobre as metalotioneínas 283
1.1. Metalotioneínas - estrutura e funções 283
1.1.1. Características e estrutura das metalotioneínas 284
1.1.2. Funções biológicas das metalotioneínas 287
1.1.3. Factores de indução da síntese de metalotioneínas 288
1.2. Metalotioneínas como biomarcadores de exposição a catiões pesados 290
1.3. A voltametria na quantificação de metalotioneínas 291
1.3.1. Métodos de determinação das metalotioneínas 291
1.3.2. Voltametria das metalotioneínas na gota de mercúrio 292
2. Desenvolvimento de um método voltamétrico de determinação de metalotioneínas 295
2.1. Instrumentação, reagentes e soluções 296
2.1.1. Instrumentação 296
2.1.2. Reagentes, soluções e padrões 296
2.2. Optimização da técnica voltamétrica e dos parâmetros instrumentais 297
2.2.1. Efeito do catião cobre (II) em solução no sinal voltamétrico das metalotioneínas 297
2.2.2. Optimizações das condições de análise utilizando voltametria diferencial por impulsos 299
2.2.3. Optimização das condições de análise utilizando voltametria de onda quadrada 300
2.2.4. Optimização da concentração de catião cobre em solução 304
2.2.5. Optimização do meio de análise e estudo de interferências 305
2.2.6. Estabilidade das metalotioneínas em solução e o efeito do 2-mercaptoetanol 308
3. Biomonitorização da exposição de peixes a catiões de metais pesados 309
3.1. Parte experimental 309
3.1.1 instrumentação, reagentes e espécies animais 309
3.1.2 condições e meios de exposição dos peixes 310
3.1.3 preparação das amostras de extracto de fígado de peixe para análise 311
3.2. Características do método e aplicação à análise em amostras de extracto de fígado de peixe 312
3.2.1. Procedimentos de análise optimizados 312
3.2.2. Características do método voltamétrico de determinação de metalotioneínas 313
3.2.3. Aplicação do método voltamétrico desenvolvido à análise de metalotioneínas em trutas 314
3.3. Determinação da adaptabilidade de percas para estudos de biomonitorização de exposição a $CuSO_4$ 316
3.4. Conclusão 318
Referências bibliográficas

Anexos

Anexo I
Anexo II
Anexo III
Anexo IV
Anexo V

Índice de Figuras

PARTE I: Considerações sobre o uso de biomarcadores

Figura I-1. Relação de conceitos existente entre a indução ou alteração biológica intrínseca e a resposta biológica dada pelos organismos. 6
Figura I-2. Aplicações desenvolvidas nesta tese, abrangendo os três diferentes tipos de biomarcadores existentes (segundo a classificação quanto à sua forma de acção). 7
Figura I-3. Complementaridade da informação obtida pela análise química convencional e a análise recorrendo aos uso de biomarcadores 10
Figura I-4. Locais de acção dos diferentes tipos de biomarcadores (classificados segundo o seu nível de acção). 11
Figura I-5. Exemplo de uma curva de dose-resposta em que a resposta é a morte do organismo e o indutor é um composto xenobiótico tóxico. A percentagem cumulativa de mortes está representada no eixo dos Y 19
Figura I-6. Factores de bioacumulação de um xenobiótico na cadeia alimentar de um lago, envolvendo predação. Adaptado de [1]. 29

PARTE II: Desenvolvimento de um sistema voltamétrico em linha para a biomonitorização de diacetilo na cerveja

Figura II-1. Função de onda para voltametria de onda quadrada. I - Varrimento de potencial em escada; II - Série de impulsos em onda quadrada; III - Variação do potencial aplicado com o tempo; Es – Amplitude do degrau; Ep – Amplitude do impulso; τ – Período. 45
Figura II-2. Voltamograma obtido por voltametria de onda quadrada para um processo reversível (com adsorção do analito). É evidente o efeito amplificador da existência de duas correntes, uma catódica (I_1) e outra anódica (I_2), no sinal final obtido (ΔI). 46
Figura II-3. A: Esquema da célula de fluxo para eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. 1-Injector, 11- cavidade de injecção, 12- conector para o tubo de transporte, 13- Orifício para queda da gota de mercúrio; 2- gota de mercúrio suspensa, 3- célula de vidro; 4- tubo de transporte. B: Fotos da célula voltamétrica montada num posto Metrohm®. 50
Figura II-4. Esquemas dos injectores patenteados para o sistema de fluxo desenvolvido. 1- Injector Voltamétrico, 11- Cavidade de Injecção, 12- Fêmea, para ligação do tubo, 13- Orifício para queda da gota de mercúrio, 2- Gota de mercúrio suspensa. 51
Figura II-5. Esquema do sistema de injecção em fluxo utilizado com a célula voltamétrica em fluxo 52
Figura II-6. Curva de calibração para a riboflavina em tampão fosfato 0,2M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 1000 Hz de frequência e 50s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida. 57
Figura II-7. Curva de calibração para a azorubina (carmosina) em tampão amoniacal 0,1M, pH 9, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, utilizando voltametria de onda quadrada a 300 Hz de frequência e 30s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida. 59
Figura II-8. Curva de calibração para o azul de metileno em tampão fostato 0,1M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 2500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 550 Hz de frequência e 90s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida. 61
Figura II-9. Curva de calibração para o catião cobre II em tampão fosfato 0,1M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 400 Hz de frequência e 30s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida. 63

Figura II-10. Curva de calibração para o Cd^{2+} em tampão fosfato 0,1M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 1000 Hz de frequência e 50s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida. 64
Figura II-11. Curvas de calibração para os catões zinco (II), cádmio (II), chumbo (II) e cobre (II), em ácido perclórico 0,2M. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 300 Hz de frequência e 30s de acumulação. Em cima, à esquerda: Voltamogramas das curvas de calibração obtidas. 66
Figura II-12. Curva de calibração para o SO_2 em tampão acetato 0,1M, pH 4. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 500 µl, caudal de 1,33ml.min^{-1}, voltametria de onda quadrada a 600 Hz de frequência. Em baixo, à direita: voltamogramas da curva de calibração obtida. 68
Figura II-13. Prova da importância que a cerveja tem em termos sociais desde as civilizações da antiguidade. A: Degustação em grupo do que se pensa ser cerveja, fotolíto de uma gravação em pedra datada da época Suméria; B: Foto de uma pedra tumular Egípcia onde se pode observar uma representação do indivíduo aí depositado rodeado de vários itens necessários para a vida pós-morte, incluindo um jarro tipicamente usado para a cerveja; C: Fotolíto de uma cena tumular Egípcia (2500 AC), onde se encontra descrito vários dos passos de fabrico da cerveja, desde o fabrico do mosto, passando pela lavagem e preparação dos jarros, até à fermentação (repare-se no pormenor extraordinário da formação gradual da espuma típica deste processo ao longo dos jarros que estão em pé). 73
Figura II-14. Esquema de um diagrama de fermentação de cerveja, representado segundo diversos parâmetros analíticos. 74
Figura II-15. Esquema do processo de produção de cerveja 75
Figura II-16. Passos envolvidos na formação e redução de diacetilo no processo de fermentação de cerveja por *Saccharomyces Cerevisiae*. 76
Figura II-17. Vias de formação e redução do diacetilo e 2,3-pentanodiona activas em fermentações de cerveja com *Saccharomyces cerevisiae*. 77
Figura II-18. Reacções envolvidas na descarboxilação oxidativa do α-acetolactato e α-acetohidroxibutirato. 80
Figura II-19. Diagramas de fermentação de cerveja representando diferentes perfis possíveis de concentração de diacetilo total e azoto α-aminado (FAN) ao longo do tempo. 84
Figura II-20. Esquema de funcionamento de um módulo de pervaporação. 95
Figura II-21. Sistema de pervaporação do tipo I 97
Figura II-22. Sistema de pervaporação do tipo II 97
Figura II-23. Sistema de pervaporação do tipo III 98
Figura II-24. Sistema de pervaporação do tipo IV 99
Figura II-25. Reacção de derivatização entre a o-fenilenodiamina e o diacetilo. 100
Figura II-26. Esquema de montagem do sistema de análise em fluxo por voltametria com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. I- Célula voltamétrica em fluxo com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa; II – sistema de propulsão e injecção. 104
Figura II-27. Fotografias do sistema de análise em fluxo por voltametria com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, utilizado para os ensaios e análises de dicetonas vicinais na cerveja. I - vista geral; II – Vista da célula voltamétrica em fluxo; III – Vista do encaixe entre o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa e o injector (a) bem como das posições do eléctrodo de referência (b) e auxiliar (c). 105
Figura II-28. Perfil de resposta voltamétrica pretendido para a análise de 2,3-dimetilquinoxalina. Tempo de adsorção e de varrimento voltamétrico deve dar-se no patamar. 106
Figura II-29. Procedimento de GPES utilizado na análise "off line" de α-dicetonas na cerveja. 107
Figura II-30. Reacção de redução da 2,3-DMQ em meio aquoso, pH 7. 107
Figura II-31. Voltamogramas de voltametria de onda quadrada obtida para uma solução $1x10^{-5}$M de 2,3-DMQ para diferentes tempos de adsorção, com o sinal total (vermelho) e com de composição da corrente catódica (azul) e anódica (verde) do varrimento. 108
Figura II-32. Variação da altura de pico com a frequência de voltametria de onda quadrada, na presença de OFDA 0,05%, sem desoxigenação das soluções. 109
Figura II-33. Curvas de calibração da 2,3-DMQ para diferentes frequências de voltametria de onda quadrada, na presença de OFDA 0,05%. 110

Figura II-34. Variação da altura de pico com o tempo de adsorção, para 2,3-DMQ $1x10^{-5}$M, sem OFDA com frequência de 300Hz. 110
Figura II-35. Variação da altura de pico com o tempo de adsorção, para 2,3-DMQ $1x10^{-5}$M, na presença de OFDA 0,05%, frequência de 300Hz. 111
Figura II-36. Curvas de calibração de 2,3-DMQ para diferentes tempos de adsorção, na presença de OFDA 0,05%, e utilizando frequência de 300Hz. 112
Figura II-37. Efeito da degradação da OFDA nas curvas de calibração da 2,3-DMQ. A – Sem OFDA; B – Com OFDA 0,05%; C- Com OFDA 0,05% degradada. 113
Figura II-38. Sinais voltamétricos obtidos para diferentes caudais. Com 14 cm de tubo de 0,8mm entre a válvula de injecção e o injector voltamétrico, e um *"loop"* de 500µL. 114
Figura II-39. Efeito do caudal na altura de pico da 2,3-DMQ ,$1x10^{-6}$M, em tampão fosfato 0,1M pH 7 e OFDA 0,05%. 1s de tempo de adsorção e frequência de 300 hz. 114
Figura II-40. Esquema de análise de α-dicetonas na cerveja com detecção por voltametria ou espectrofotometria. 115
Figura II-41. Esquemas de montagem de destilação utilizados para a separação de α-dicetonas da cerveja. 116
Figura II-42. Curva de Calibração de diacetilo em tampão fosfato 0.1M, pH 7 e OFDA 0,05%. 117
Figura II-43. Efeito do aumento da proporção de amostra no sinal voltamétrico da α-dicetonas. Voltamogramas da variação de intensidade de corrente para diferentes quantidade de destilado. Ensaios em fluxo. Quantidade de destilado adicionado para 25 mL de volume final de solução derivatizada: a – br, b – 1 mL, c – 2 mL, d – 3 mL, e – 4 mL, f – 5 mL, g – 6 mL. Utilizando 1s adsorção e 300 Hz. 118
Figura II-44. Variação da intensidade de corrente na determinação voltamétrica em destilados de cerveja em função da frequência de varrimento. Ensaios em fluxo. Frequência de varrimento com voltametria de onda quadrada: a – 100 Hz, b – 200Hz , c – 250 Hz, d – 300Hz, e – 400 Hz, f – 500 Hz. 1s adsorção e 5 mL de destilado em 25mL de solução. 119
Figura II-45. Variação da intensidade de corrente na análise voltamétrica em fluxo de α-dicetonas de cerveja em função do tempo de adsorsão, para destilado simples e com adição de 86ppb de diacetilo. a – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com 1s adsorção, b – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com 3s adsorção, c – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com adição de $1x10^{-6}$M de diacetilo e 1s adsorção, d – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com adição de $1x10^{-6}$M de diacetilo e 3s adsorção. 120
Figura II-46. Determinação de diacetilo em cerveja pelo método das adições de padrão, usando análise voltamétrica em fluxo. 122
Figura II-47. Interferência da 2-metilquinoxalina na determinação voltamétrica de α-dicetonas em destilado de cerveja (48ppb de α-dicetonas), utilizando análise em batch (■) e análise em fluxo (●). 124
Figura II-48. Curva de calibração de diacetilo obtida por espectrofotometria (segundo EBC-Analytica), com sobreposição da recta de calibração utilizada na UNICER para os cálculos do valor de referência de α-dicetonas. 125
Figura II-49. Esquema do sistema de análise de diacetilo em linha com detecção por voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Sistema manual – as válvulas V1 a V5 são válvulas manuais de 3 vias, a V6 é uma válvula de injecção de 4 vias. Sistema semi-automático – as válvulas V1 a V5 são válvulas automáticas solenóides de 3 vias, a V6 é uma válvula de injecção de 4 vias. 131
Figura II-50. Foto do sistema manual, utilizado para a determinação de diacetilo em linha na cerveja por voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio. A - foto do sistema completo; fotos de aproximação de diferentes componentes do sistema: B - módulo de pervaporação, C – célula voltamétrica de fluxo, D - eléctrodos e injector. 132
Figura II-51. Esquema do sistema automático de análise de diacetilo em linha com detecção por voltametria em fluxo utilizando eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Todas as válvulas de V1 a V7 são válvulas automáticas solenóides de 3 vias. 134
Figura II-52. Esquema do sistema automático de análise de diacetilo em linha com dois módulos de pervaporação. Todas as válvulas de V1 a V12 são válvulas automáticas solenóides de 3 vias. 135
Figura II-53. Procedimento de voltamétrico de referência , utilizado na análise diacetilo "em linha". 137
Figura II-54. Foto do módulo de pervaporação, modelo I em *"perspex"*, utilizado em banho-maria. 138
Figura II-55. Fotos dos módulos de pervaporação, desenhados para utilização em banho seco. **A** - modelo II, com corpo todo em *"perspex"*. **B** – modelo III, com a câmara de doação em aço inoxidável. 139
Figura II-56. Foto dos componentes de um módulo do modelo III. 139

Figura II-57. Fotos da membrana de acetato de celulose com 5μm de porosidade; A – No momento da colocação de água à superfície; B – Após dois minutos. 140
Figura II-58. Fotos da membrana de PTFE com 5μm de porosidade; A – No momento da colocação de água à superfície; B – Após uma hora. 141
Figura II-59. Efeito do tempo de uso da membrana na curva de calibração. ■ - Membrana Nova; □ - Membrana com 2 meses de uso. Tempo de pervaporação de 9 min., com OFDA 0,05%, módulo do modelo I, 300 Hz e 5s de adsorção, caudal de injecção de 1,33mLmin^{-1}. 142
Figura II-60. Fotos da membrana de PTFE, 5mm, após ter sido utilizada no módulo de pervaporação com um suporte do tipo em cruz. A – Vista de cima; B – Vista de baixo. 142
Figura II-61. Modelos de suporte de membrana testados nos estudos de optimização do módulo de pervaporação. A – Suporte de "*Teflon*" em cruz, fabricado de acordo com Ivanildo Mattos et al; B – Suporte em aço inoxidável, com furos de 2,5 mm nos 30,0 mm centrais igualmente distribuídos, denominada placa CT; C - Suporte em rede de malha grossa, de aço inoxidável com 30,0 mm Ø em posição central, revestida externamente a "*teflon*" na restante parte do disco; D – Suporte de rede fina, em aço inoxidável, da marca Milippore® (utilizado usualmente como suporte de membranas em rampas de filtração), E - Suporte em aço inoxidável, com furos de 1,0 mm nos 30,0 mm centrais igualmente distribuídos, denominada placa UNICER. 143
Figura II-62. Curvas de calibração de diacetilo para diferentes tipos de suporte de membrana. ▦ - Suporte tipo B; ■ - Suporte do tipo E; ▲ – suporte tipo C. Tempo de pervaporação de 9 min., utilizando-se OFDA 0,05%, módulo do modelo 1, 300Hz, 5s adsorção, caudal de injecção de 1,33mLmin^{-1}. 144
Figura II-63. Curva de calibração de 2,3-DMQ, em tampão fosfato 0,1M, pH7 e OFDA 0,05%, utilizando a câmara de recepção do modulo de pervaporação, correspondente às seguintes concentrações equivalentes de diacetilo A - 0ppb; B - 17,2ppb; C - 34,4ppb; D - 68,8ppb; E - 94,6ppb; F - 129,0ppb. 150
Figura II-64. Curva de calibração de diacetilo em água obtida pelo sistema de determinação de diacetilo em-linha com pervaporação e detecção voltamétrica em fluxo. 151
Figura II-65. Curva de adição de padrão de diacetilo em cerveja, obtida pelo sistema de determinação de diacetilo em-linha com pervaporação e detecção voltamétrica em fluxo. Concentração de DAC na cerveja é de 27 ±4 ppb. 152
Figura II-66. Efeito do caudal de cerveja que passa pela câmara de pervaporação no sinal voltamétrico obtido. Tempo de pervaporação igual a 20 minutos. 153
Figura II-67. Efeito do tempo de pervaporação, utilizando o sistema on-line no sinal voltamétrico associado à determinação de diacetilo da cerveja. 154
Figura II-68. Efeito da temperatura de pervaporação no sinal voltamétrico correspondente a uma solução de diacetilo de 86ppb em água. A- 100°C; B-95°C; C- 90°C; D- 80°C; E-70°C; F- 60°C. Frequência de 500Hz, 5 s de adsorção, OFDA 0,005%. 156
Figura II-69. Efeito do tempo de adsorção no sinal voltamétrico para diferentes concentrações de diacetilo utilizando o sistema de determinação voltamétrica em-linha. 157
Figura II-70. Curvas de calibração de diacetilo em água utilizando diferentes tempos de adsorção, utilizando o sistema de determinação de diacetilo em-linha por voltametria em fluxo. 157
Figura II-71. Efeito da frequência de varrimento em onda quadrada na determinação de diacetilo de uma amostra de cerveja utilizando o sistema de análise de diacetilo em-linha. A- 800 Hz; B-700 Hz; C-600 Hz; D-500 Hz; E-400 Hz; F-300Hz; G-200 Hz. 158
Figura II-72. Curvas de calibração de diacetilo por pervaporação de diacetilo adicionado em cervejas 159
Figura II-73. Comparação entre os sinais resultantes de adições à cerveja de diacetilo e 2,3-pentanodiona, utilizando o sistema voltamétrico em fluxo e pervaporação a 90°C, com o módulo em "*perspex*". 162
Figura II-74. Efeito da temperatura de pervaporação no sinal voltamétrico de α-dicetonas, utilizando o módulo de aço, com soluções aquosas de 1x10^{-6}M de pentanodiona (100ppb) e diacetilo (86ppb). 163
Figura II-75. Calibração de 2,3-pentanodiona e diacetilo utilizando o módulo de aço a 85°C. 164
Figura II-76. Cinética de pré-conversão do α-acetolactato em diacetilo a 90°C, de uma amostra de cerveja em maturação. 166
Figura II-77. Software de controlo. A - Janela de entrada; B – Tabela de programação de rotinas de análise com as opções de controlo oferecidas pelo software, que se encontra carregado com um procedimento simples de análise de diacetilo num sistema com 1 único módulo de pervaporação; C- Janela indicativa do estado do sistema. 170
Figura II-78. Ciclo de análise em fluxo de diacetilo e α-dicetonas na cerveja, utilizando o sistema em-linha com 1 módulo de pervaporação. 171

Figura II-79. Ciclo de análise em fluxo de diacetilo e α-dicetonas na cerveja, utilizando o sistema em-linha com 2 módulos de pervaporação. 172
Figura II-80. Fotos do sistema em-linha utilizado para os ensaios de validação. A – vista geral; B – foto do módulo de pervaporação; C – foto do módulo de pervaporação montado no bloco de aquecimento. 173
Figura II-81. Condições instrumentais optimizadas para a determinação em-linha de diacetilo na cerveja 173
Figura II-82. Cromatograma de uma amostra de cerveja em maturação, obtido por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões, utilizando o método de referência (Analytica-EBC) para a indústria cervejeira. 174
Figura II-83. Curva de calibração de diacetilo na cerveja (A), utilizando o equipamento de determinação em-linha com voltametria em fluxo e separação por pervaporação. Em (B) encontra-se uma ampliação da zona de concentrações até 140ppb, na qual existe uma relação linear. 176
Figura II-84. Curvas de calibração de diacetilo em cerveja utilizando voltametria em fluxo e pervaporação. A – Resposta linear até 300ppb obtida modificando o tempo de pervaporação para 6 minutos. B – Resposta linear até 800 ppb, obtida modificando o tempo de pervaporação para 3 minutos. 177
Figura II-85. Voltamogramas de uma cerveja em final de maturação, obtidos com diferentes procedimentos de preparação de amostra. A- diacetilo livre, sem pré-conversão e analise imediata após colheita da amostra; B – diacetilo livre determinado após deficiente tratamento da amostra – deixada 4h sem filtrar mais 6 h à temperatura ambiente antes da análise; C- diacetilo total, com pré-conversão efectuada imediatamente após colheita da amostra. 179
Figura II-86. Valores de diacetilo determinados em amostras provenientes de diferentes fases do processo, e analisadas utilizando o sistema em-linha com as condições optimizadas e 9 minutos de pervaporação. 180
Figura II-87. Determinações de diacetilo em amostras de maturação e fermentação, utilizando o sistema de análise em-linha com 6 minutos de pervaporação. 181
Figura II-88. Regressão linear entre os resultados de diacetilo obtidos pelo método de referência por cromatografia gasosa e o método voltamétrico em-linha desenvolvido, com um tempo de pervaporação de 9 minutos. 182
Figura II-89. Regressão linear entre os resultados de diacetilo obtidos pelo método de referência por cromatografia gasosa e o método voltamétrico em-linha desenvolvido, com um tempo de pervaporação de 6 minutos. 183
Figura II-90. Curva de calibração de α-dicetonas na cerveja utilizando o equipamento de determinação em-linha com voltametria em fluxo e pervaporação com módulo em aço. (A) Calibração até 500 ppb de α-dicetonas; (B) Calibração até 140 ppb de α-dicetonas. 185
Figura II-91. Determinação de α-dicetonas por voltametria em-linha em amostras enviadas para a análise de rotina, englobando as fases de produto final, maturação e fermentação. 187
Figura II-92. Regressão linear entre os resultados de α-dicetonas obtidos pelo método de referência por cromatografia gasosa e o método voltamétrico em-linha desenvolvido, utilizando um módulo de pervaporação em aço. 188
Figura II-93. Esquema e fotos do reactor contínuo de pré-conversão em linha. 191
Figura II-94. Esquema utilizado nos ensaios de avaliação do rendimento da pré-conversão. 192
Figura II-95. Esquema utilizado para determinar o diacetilo formado por vias alternativas, que não derivado do α-acetolactato. 192
Figura II-96. Efeito da temperatura e comprimento do reactor na conversão de α-acetolactato em diacetilo utilizando reactores de fluxo em teflon (PTFE) e determinação do diacetilo formado pelo método voltamétrico em linha. Comprimentos do reactor: ■- 120cm, □ - 620cm, ▲ - 740 cm. 194
Figura II-97. Efeito da temperatura na formação de diacetilo utilizando o reactor de fluxo contínuo em cobre com 90cm de comprimento. 196
Figura II-98. Efeito do temperatura na percentagem de conversão de α-acetolactato em diacetilo utilizando reactores de pré-conversão em linha com diferentes comprimentos e portanto diferentes tempos residência de amostra: ■- 90cm (4:07min. de tempo de residência) e □ - 180 cm (8:15min. de tempo de residência). 197
Figura II-99. Tempos de reacção dos mais importantes procedimentos de pré-conversão em "batch" e do reactor de fluxo contínuo de pré-conversão em linha 199

PARTE III: - "Vitaltitration" (VT') - um método novo para determinação da vitalidade de levedura

Figura III-1. Fotografia de microscópio electrónico de varrimento de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* em divisão. 216
Figura III-2. Esquema do ciclo da levedura numa empresa cervejeira. 221
Figura III-3. Relação entre o estado fisiológico da levedura, a fermentação e a qualidade da cerveja. 223
Figura III-4. Implicações do estado fisiológico da levedura de sementeira na fermentação e qualidade da cerveja. 224
Figura III-5. Distinção entre os conceito de viabilidade e vitalidade. Ambos distinguem diferentes estados fisiológicos, embora em graus distintos. 226
Figura III-6. Variação do perfil de queda de pH em função da quantidade de levedura não lavada e para uma levedura lavada. □ - 2,50g de levedura não lavada, π - 5,00g de levedura não lavada, ■ - 2,50g de levedura lavada. 234
Figura III-7. Efeito da quantidade de levedura adicionada no perfil queda do pH. A: Perfis de queda de pH, em duplicado, para diferentes quantidades de levedura, respectivamente 2,500g e 1,000g; B: Efeito da quantidade de levedura no tempo de queda do pH de 10 para 6,5 235
Figura III-8. Efeito do pH de inicial no perfil de queda de pH para uma mesma levedura e utilizando uma quantidade de 2,50g. 237
Figura III-9. Fórmula de cálculo do valor de vitalidade VT', determinado pelo método de "vitaltitration". 238
Figura III-10. Exemplos de diferentes perfis de queda de pH obtidos com o método "vitaltitration". I – Levedura 1; a) levedura recém recolhida, b) levedura "envelhecida" (armazenada dois dias à temperatura ambiente), c) levedura "morta" (20 min. a 60ºC). II – Levedura 2; D/D') levedura em fase exponencial de fermentação (replicados), E/E') levedura recém recolhida (replicados) 243
Figura III-11. Tubos de fermentação de 2L do tipo "EBC tall-tubes", para colocação em sala Climatizada 245
Figura III-12. Fermentador e respectivo módulo de controlo utilizado no BRI para o desenvolvimento do método "vitaltitration". 246
Figura III-13. Foto do microscópio óptico/fluorescência utilizado para as determinações de viabilidade 247
Figura III-14. Esquema dos ensaios de envelhecimento em laboratório de levedura, e utilizados para a validação do método "vitaltitration" desenvolvido 248
Figura III-15. Variação da vitalidade de levedura ao longo do tempo de armazenamento, determinada utilizando o método "vitaltitration". ■ - armazenamento a 12ºC; □ - armazenamento a 4ºC 250
Figura III-16. Variação da vitalidade de levedura ao longo do tempo de armazenamento, determinada utilizando o acidification power test. ■ - armazenamento a 12ºC. □ - armazenamento a 4ºC 251
Figura III-17. Variação da viabilidade da levedura ao longo do tempo de armazenamento a 12ºC, determinada utilizando os métodos de: ■ - azul de metileno. ▦ - fluorescência com o ANSA 252
Figura III-18. Variação do desempenho fermentativo da levedura ao longo do seu armazenamento a 12ºC. ■ - tempo de fermentação necessário para a cerveja atingir o extracto de 5,12ºP; □ - tempo de fermentação necessário para a cerveja atingir um extracto de 2,58ºP. 253
Figura III-19. Efeito da vitalidade (VT') da levedura no tempo total de fermentação da cerveja (tempo até um extracto de 2,58ºP). 254
Figura III-20. Efeito da vitalidade VT' da levedura inoculada na velocidade de fermentação em ensaios industriais. 259
Figura III-21. Efeito da vitalidade VT' da levedura inoculada na atenuação real final da cerveja em ensaios industriais de fermentação. 259
Figura III-22. Diferenças de fermentabilidade encontradas nos mostos do tipo I e II, produzidos em duas salas de fabrico distintas. A – Atenuação limite do mosto; B – atenuação real final das cervejas, C – diferença de fermentabilidade (distância ao limite). 261
Figura III-23. Efeito de dois tipos distintos de mosto, I e II, na vitalidade e viabilidade da levedura recolhida, determinadas respectivamente pelo método "vitaltitration" e pelo método do azul de metileno. I – Mosto/Sala de Fabrico I; II – Mosto/Sala de Fabrico II. 262
Figura III-24. Valores de estabilidade de espuma obtidos das fermentações correspondentes às leveduras A e B. As barras denotam o erro das determinações (n = 5). Cerveja A – Correspondente à levedura em pior estado fisiológico; Cerveja B – Correspondente à levedura em melhor estado fisiológico 264
Figura III-25. Alteração da vitalidade e viabilidade de duas leveduras durante a fermentação. A- levedura I semeada; A' e A'' – Leveduras recolhidas de duas fermentações distintas em que tinha sido inoculada a levedura I; B- levedura II semeada; B' e B'' – Leveduras recolhidas

de duas fermentações distintas em que tinha sido inoculada a levedura II. 265
Figura III-26. Queda da vitalidade de duas leveduras durante um ensaio de armazenamento a 4ºC, determinada utilizando o método "vitaltitration". □ - Levedura A'' (da figura III-25) – 1ª geração; ■ - Levedura B' (da figura III-25) – 4ª geração. 267
Figura III-27. Escala funcional de vitalidade utilizando o índice VT' obtido para a levedura da estirpe USII. 268
Figura III-28. Esquema com as principais causas determinadas neste trabalho de alteração do nível de vitalidade da levedura no ciclo industrial e suas consequências na fermentação e no produto final. [1] levedura com vitalidade boa/aceitável; [2] levedura com vitalidade má/não aceitável; [3] mosto nutricionalmente equilibrado para a levedura; [4] mosto nutricionalmente deficiente para a levedura. 269

PARTE IV:

Figura IV-1. Estrutura terciária de metalotioneína complexando 7 catiões metálicos divalentes (cor laranja). A azul apresentam-se as cisteínas envolvidas na complexação nos dominios α (direito) e β (esquerdo) [67]. 285
Figura IV-2. Coordenação Cd–Cys numa Cd_7-MT de fígado humano [73]. 287
Figura IV-3. Análise voltamétrica por voltametria de onda quadrada de uma solução de metalotioneína $1x10^{-7}$ M em tampão borato 0,02M, NaCl 0,5M, pH 8,1: a) sem adição de Cu^{2+} ; b) com adição de $2,5x10^{-6}$M de Cu^{2+}. Os resultados foram obtidos utilizando uma frequência de 200Hz e um tempo de adsorção de 120s. 298
Figura IV-4. Voltamogramas correspondentes à adição metalotioneína padrão: 1- $2,5x10^{-9}$M; 2- $5x10^{-9}$ M; 3- $1x10^{-8}$ M; 4- $2,5x10^{-8}$ M; 5- $5x10^{-8}$ M; 6- $1x10^{-7}$ M; 7- $2,5x10^{-7}$ M; 8- $5x10^{-7}$ M; em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5M, pH8.1. Concentrações de catião cobre (II). A– 0; B– $1x10^{-7}$ M; C– $1x10^{-6}$ M; D– $2,5x10^{-6}$ M. Ensaios realizados por voltametria de onda quadrada a 200Hz com 120 s de pré-acumulação. 299
Figura IV-5. Curvas de calibração de metalotioneína em tampão borato 0.02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1: A) sem catião cobre (II); B) com catião cobre (II) $2,5x10^{-6}$M. Os ensaios foram realizados por voltametria diferencial por impulsos com acumulação de 60s e diferentes tempos de impulso: □ - 5 ms, ✱ - 10 ms. Os voltamogramas apresentados correspondem ao tempo de impulso de 5ms. 300
Figura IV-6. Variação da altura de pico em função do tempo de acumulação utilizando voltametria de onda quadrada na análise de uma solução $1x10^{-7}$M de metalotioneínas em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 com 2,5 x 10^{-6} M de catião cobre (II). Frequências de varrimento: □ - 25 Hz, ✱ - 100 Hz, ▲ -200 Hz, ▼ – 400 Hz. No canto superior esquerdo apresenta-se o voltamograma obtido a 100 Hz e 120s de adsorção. 301
Figura IV-7. Curvas de calibração para a metalotioneína usando um tempo de adsorção de 120s a diferentes frequências de onda quadrada, em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 com $1x10^{-6}$M de catião cobre (II). Frequência de onda quadrada: □- 10 Hz, ✱ - 25 Hz, ▲ -100 Hz, ▼- 200 Hz, ■- 300 Hz, ▣- 400 Hz. Os voltamogramas correspondentes à calibração obtida a 100 Hz com 120 s de acumulação, encontram-se no canto superior esquerdo. 302
Figura IV-8. Curvas de calibração para a metalotioneína usando um tempo de adsorção de 120s a diferentes frequências de onda quadrada, em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 sem catião cobre (II). Frequência de onda quadrada: ▣ - 10 Hz, ✱ - 25 Hz, ▲ -100 Hz, ▼ - 200 Hz, ■ - 300 Hz, ▣ - 400 Hz. Os voltamogramas correspondentes à calibração obtida a 100 Hz com 120 s de acumulação, encontram-se no canto superior esquerdo. 303
Figura IV-9. Variação da intensidade de corrente de pico em função da concentração de catião cobre(II) em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5M, pH8.1, num meio com solução padrão de metalotioneína $2x10^{-8}$M. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada com acumulação de 120s a 200Hz. 304
Figura IV-10. Curvas de calibração de metalotioneína padrão em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5M, pH8.1, para diferentes concentrações de catião cobre(II): ▣ - $1.0x10^{-7}$ M, ✱ - $2.5x10^{-7}$ M, ▲ - $1.0x10^{-6}$ M, ▼ - $2.5x10^{-6}$ M, ■ - $5.0x10^{-6}$ M. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada a 100Hz e com 120s de adsorção. 305
Figura IV-11. Curvas de calibração de padrões de metalotioneína em 3 tampões diferentes: □ - tampão fosfato pH 12, ✱ - tampão borato pH 10, ■ - tampão borato pH 8,1. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada a 100 Hz com acumulação de 120 e com $2,5x10^{-6}$ M de catião cobre (II). 306

Figura IV-12. Análise voltamétrica de uma solução de metalotioneína $2.5x10^{-8}$ M, na presença de $2x10^{-8}$ M 2-mercaptoetanol, em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5 M, pH 8.1 e $2.5x10^{-6}$ M de Cu^{2+}. Ensaio realizado por voltametria de onda quadrada a 200 Hz com acumulação de 120s. 307
Figura IV-13. Esquema do protocolo utilizado para a preparação de amostras para análise de metalotioneínas a partir de fígado de peixes, adaptado de DeConto Cinier [22]. 311
Figura IV-14. Curva de calibração de metalotioneína em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 num meio com catião cobre (II) ($2,5 \times 10^{-6}$ M). A análise voltamétrica foi feita por voltametria de onda quadrada com 200Hz de frequência e com um tempo de adsorção de 120 s. 314
Figura IV-15. Determinação voltamétrica de metalotioneínas, pelo método das adições de padrão, em trutas que tinham sido submetidas a um teste toxicológico sub-letal com 40 ppb de $CdCl_2$. Adição à célula voltamétrica de 20µl de extracto de fígado e de 15mL de tampão borato 0,02M, NaCl 0,5 M, pH 8,1, com $2,5x10^{-6}$ M Cu^{2+}. Análise por voltametria de onda quadrada a 200 Hz com 120s de adsorção. 315

Índice de Tabelas

PARTE I: Considerações sobre o uso de biomarcadores

Tabela I-1. Classificação funcional e dimensional de biomarcadores [4] 11
Tabela I-2. Testes de toxicologia/exposição mais utilizados em estudos de biomarcação, e suas principais características. 18
Tabela I-3. Principais factores condicionantes de estudos de biomarcação 21
Tabela I-4. Biomarcadores bioquímicos e moleculares mais utilizados em estudos ambientais, obtidos a partir de peixes. 27

PARTE II: Desenvolvimento de um sistema voltamétrico em linha para a biomonitorização de diacetilo na cerveja

Tabela II-1. Características das curvas de calibração de catiões metálicos obtidas por análise por voltametria de redissolução anódica com detector de fluxo e apresentadas na figura II-11 66
Tabela II-2. Alguns métodos de análise de diacetilo na cerveja 92
Tabela II-3. Reagentes e quantidades utilizados na preparação das soluções. 102
Tabela II-4. Reagentes e quantidades usadas na preparação das soluções padrão empregues nos estudos efectuados. 103
Tabela II-5. Procedimento para análise de α-dicetonas na cerveja final e em maturação por voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio utilizando o método das adições de padrão 121
Tabela II-6. Características analíticas e estatísticas da análise de diacetilo e dicetonas vicinais em fluxo. 123
Tabela II-7. Determinação do teor de α-dicetonas em diferentes fases de produção de cerveja pelo método de referência (método espectroscópico segundo o EBC) e pelo método de voltametria em fluxo. 126
Tabela II-8. Dados estatísticos da comparação do método voltamétrico em fluxo com o método espectrofotométrico segundo o EBC. 126
Tabela II-9. Reagentes e quantidades usadas na preparação das soluções padrão empregues nos estudos efectuados. 130
Tabela II-10. Modo de actuação das diferentes válvulas presentes na figura II-49. 133
Tabela II-11. Modo de actuação das diferentes válvulas existentes no esquema da figura II-52 126
Tabela II-12. Efeito de variação da altura/volume da câmara de recepção do módulo de pervaporação 145
Tabela II-13. Efeito de variação da altura/volume da câmara de doação do módulo de pervaporação. Ensaios feitos com módulo do modelo I. 147
Tabela II-14. Características do módulo de pervaporação utilizado na determinação de diacetilo em linha por voltametria em fluxo. 148
Tabela II-15. Alguns aspectos funcionais dos componentes e do sistema. 148
Tabela II-16. Valores relativos de altura de pico para soluções de diacetilo derivatizadas imediatamente, e soluções derivatizadas após recirculação de 2h a 90°C em tubo de *"teflon"* e PVC, e após passagem pelo módulo de pervaporação. 150
Tabela II-17. Variação relativa do sinal voltamétrico de diacetilo na cerveja para diferentes concentrações de OFDA em tampão fosfato 0,1M, pH7, utilizado para a reacção de derivatização na câmara superior. 158
Tabela II-18. Interferência do dióxido de enxofre e do acetaldeído no sinal voltamétrico de diacetilo. Amostra cerveja + 86 ppb de diacetilo. 160
Tabela II-19. Determinação de diacetilo e 2,3-pentanodiona na cerveja, utilizando o módulo de pervaporação em aço e temperatura do banho a 85°C. 164
Tabela II-20. Efeito da pré-conversão de cerveja em garrafa, na concentração de diacetilo determinada utilizando o sistema em fluxo. 166
Tabela II-21. Características analíticas e estatísticas da determinação em-linha de diacetilo na cerveja por voltametria em fluxo com pervaporação. 178
Tabela II-22. Características da regressão dos resultados obtidos por voltametria em-linha sobre os resultados obtidos por cromatografia gasosa 183
Tabela II-23. Características analíticas e estatísticas da determinação em-linha de α-dicetonas na

cerveja por voltametria em fluxo com pervaporação. 186
Tabela II-24. Características da regressão dos resultados obtidos para a determinação de α-dicetonas por voltametria em-linha sobre os resultados obtidos por cromatografia gasosa 188
Tabela II-25. Valores médios de percentagem de conversão de α-acetolactato em diacetilo obtidos para cervejas em diferentes fases do processo, utilizando diferentes tempos de passagem e temperaturas de pré-conversão. 198

PARTE III: - "Vitaltitration" (VT') - um método novo para determinação da vitalidade de levedura

Tabela III-1. Características típicas de leveduras "ale" e "lager" utilizadas na fermentação de cerveja 217
Tabela III-2. Principais métodos utilizados para a medição da viabilidade de levedura. 229
Tabela III-3. Principais métodos utilizados para a medição da vitalidade de levedura. 230
Tabela III-3. Principais métodos utilizados para a medição da vitalidade de levedura (continuação) 231
Tabela III-4. Equipamento e material utilizados para o desenvolvimento e aplicação dos estudos envolvendo o método "vitaltitration" para determinação de vitalidade de levedura 240
Tabela III-5. Soluções e reagentes utilizados no método "vitaltitration" 241
Tabela III-6. Referência de vitalidade com escala de VT' 243
Tabela III-7. Composição típica dos dois mostos utilizados neste trabalho, provenientes de duas salas de fabrico de mosto distintas 256
Tabela III-8. Diferenças encontradas na vitalidade e viabilidade entre a levedura recolhida após fermentar cada um dos dois tipos de mosto. 262
Tabela III-9. Diferenças de viabilidade e vitalidade das leveduras recolhidas dos dois tanques de fermentação. 263

PARTE IV: Metalotioneínas como biomarcadores de exposição ambiental de peixes a metais pesados

Tabela IV-1. Algumas propriedades características particulares das metalotioneínas [93]. 284
Tabela IV-2. Patologias humanas relacionadas com a desregulação dos níveis de metalotioneínas 288
Tabela IV-3. Factores que induzem a síntese de metalotioneínas[2]. 289
Tabela IV-4. Equipamentos utilizados na preparação das várias soluções utilizadas. 296
Tabela IV-5. Reagentes utilizados na preparação das várias soluções necessárias para o trabalho experimental. 297
Tabela IV-6. Condições instrumentais optimizadas para a análise de metalotioneínas em tampão borato 0,02M, NaCl 0,5M e pH 8,1 na presença de $2,5x10^{-6}$M de Cu^{2+}. 304
Tabela IV-7. Valores de concentração limite de catião zinco (II) e cádmio (II) a partir da qual constitui uma interferência superior a 5%. 307
Tabela IV-8. Variação do sinal voltamétrico de uma solução metalotioneína $5x10^{-8}$ M ao longo do tempo, em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5 M, pH 8.1 e $2.5x10^{-6}$ M de Cu^{2+}. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada a 200 Hz com acumulação de 120s. 308
Tabela IV-9. Instrumentação utilizada. 309
Tabela IV-10. Reagentes utilizados para a preparação de amostra de peixe 309
Tabela IV-11. Espécies de peixe utilizadas neste trabalho 309
Tabela IV-12. Amostras de extracto de fígado de truta utilizadas na determinação voltamétrica de metalotioneínas. 312
Tabela IV-13. Amostras de extracto de fígado de perca utilizadas na determinação voltamétrica de metalotioneínas. 312
Tabela IV-14. Concentração das metalotioneínas na célula voltamétrica e no fígado. 316
Tabela IV-15. Concentração das metalotioneínas em fígado de peixes submetidos ao estudo de biomarcação de exposição ambiental de percas a CuSO4. Quantificação pelo método das adições de padrão utilizando 100 μL de extracto de fígado. Ensaios realizados por voltametria de onda quadrada a 200Hz com tempo de acumulação de 120 s, em tampão borato 0.02 M, NaCl 0.5 M, pH8.1 com $2.5x10^{-6}$M de catião cobre (II) no meio de análise. 317

Abreviaturas

Abs - absorvância

AEC - "adenylate energy charge"

ANSA (MgANS) - ácido 1-anilino 8-nafltalenosulfónico (sal de magnésio)

AP - "acidification power"

ATP - adenosina tri-fosfato

BRI - "Brewing Research International"

CAP - "cumulative acidification power"

CG - cromatografia gasosa

CL_{50} - concentração letal 50.

DAC - diacetilo

DCE - detector de captura de electrões

DL_{50} - dose letal 50.

DI_p - variação da intensidade de corrente do pico.

DMQ -2,3-dimetilquinoxalina

DNA - ácido desoxiribonucleíco.

E_{ampl} - potencial de amplitude do impulso

EBC - "European Brewing Convention"

E_f - potencial de final (do varrimento)

E_i - potencial inicial (do varrimento)

EMGS - eléctrodo de mercúrio de gota suspensa

E_p - potencial de pico

E_{step} - potencial de escada

FAN - azoto α-aminado

FIA - "flow injection analysis"

GPES - "general purpose electrochemical software"

ICP - "intrecellular pH"

LD - limite de detecção (estimado)

MB - azul de metileno

MG - metilglioxal

MQ - metilquinoxalina

MT - metalotioneína

NADH - nicotinamida-dinucleótido (na forma reduzida)

OFDA - o-fenilenodiamina

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil.

PTD - 2,3-pentanodiona

PTFE - poli-tetrafluoreto de etilo

PVC - poli-cloreto de vinilo

RSD - desvio padrão relativo

SMDE - eléctrodo de mercúrio de gota estática

Tlag - tempo de espera entre a injecção e o varrimento

UTAD - Universidade de Trás os Montes e Alto Douro.

VDK - "vicinal diketones" (α-dicetonas, dicetonas vicinais)

VT - "vitaltitration"

PARTE I

CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE BIOMARCADORES

1. IMPORTÂNCIA DA BIOMONITORIZAÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE METABÓLICA CELULAR

1.1. Metabolismo como espelho da actividade celular

O conceito e a base de existência de vida pressupõe um sistema semi-isolado autónomo e independente que permanece num estado estacionário reagindo a estímulos externos. Aí é possível encontrar-se uma sucessão de reacções controladas que ocorrem de forma integrada entre si permitindo ao organismo a sua auto-suficiência. Na origem de todos estes sistemas que se denominam células está a informação genética que codifica todo um arsenal de proteínas, que permite orientar uma intrincada rede de reacções químicas regulando-as cineticamente. Desta forma, é possível manter intracelularmente um fluxo integrado e lógico de reacções às quais no global se denomina metabolismo.

A esta aparente simplicidade associada ao conceito de existência de vida contrapõe-se a enorme complexidade real que a envolve. Tal é facilmente apercebido mesmo em organismos unicelulares simples como bactérias, em que esta manutenção do estado estacionário envolve o controlo e regulação de mais de um milhar de reacções distintas. Esta complexidade é um factor evolutivo, sendo ainda maior à medida que o organismo é mais avançado, como se pode constatar pelo número de genes codificáveis no seu genoma, e que corresponde a mais vias metabólicas e mais locais de regulação. A título de exemplo, verifica-se que a levedura *Saccharomyces Cervisiae* (mais evoluída que as bactérias), já possui cerca de 6500 genes (catalisando mais de 10.000 reacções), número que sobe ainda mais nos seres multicelulares, como no caso dos seres humanos, cujo genoma deve possuir entre 23.000 e 29.000 genes codificáveis.

Sobressai desta organização dos sistemas biológicos vivos que os organismos reagem às condições que o meio impõe re-organizando o seu metabolismo de forma a melhor adaptar-se às novas condições, estruturando aquilo que usualmente se denominada de resposta biológica.

1.2. Tradução molecular e bioquímica dos efeitos fisiológicos

As células são sistemas semi-fechados, uma vez que necessitam por parte do meio envolvente de condições adequadas que permitam a sua sustentabilidade. A forma como a célula actua sobre o meio e interage com as restantes células do sistema corresponde aos chamados efeitos fisiológicos; ou seja, estes efeitos são a expressão funcional da célula ou organismo. Esta resposta e funcionamento dos seres vivos não é mais do que a tradução macroscópica da forma como funciona o seu metabolismo e da sua expressão genética. A forma como diferentes vias são activadas e desactivadas é uma consequência de estímulos ambientais, que permitem à célula a sua ambientação e o aproveitamento das disponibilidades que lhe são apresentadas. Verifica-se, portanto, que uma célula, quando colocada em determinadas condições, seja por alteração de disponibilidade de alimento, de fontes de azoto ou simplesmente por indução hormonal, condiciona a sua actividade celular, dirigindo o seu metabolismo de forma a melhor aproveitar a situação em que se encontra ou então para se proteger da adversidade.

Assim, há certas reacções a ser cineticamente favorecidas consoante a resposta fisiológica que está a ocorrer na célula. Partindo do conhecimento destas vias bioquímicas associadas a determinadas resposta biológicas, é possível correlacionar a acção enzimática ou a medição de metabolítos com a actividade metabólica ou o estado fisiológico da célula. A possibilidade de se poder desta forma controlar a generalidade das respostas biológicas que ocorrem em células e organismos é cada vez mais real, dado o aumento do conhecimento em termos de vias bioquímicas celulares, bem como os recentes avanços na codificação de genomas. Conhecendo a função biológica das proteínas codificadas pelos genes activados face a uma indução, é possível conhecer a natureza e forma da resposta biológica, a qual, caso possa ser quantificada, abre caminho para a o uso de métodos de biomonitorização.

1.3. Determinação molecular e bioquímica da actividade metabólica celular

A actividade relativa das vias metabólicas pode ser avaliada de três formas: através do nível relativo das enzimas que catalisam as reacções (em especial as envolvidas nos

passos limitantes), pelo nível de expressão de determinados genes ou pelos níveis de determinados metabolitos envolvidos nessas vias bioquímicas, sejam eles intermediários, reagentes, produtos finais ou ainda produtos secundários.

Neste contexto, reveste-se de particular importância a possibilidade de correlacionar a concentração de determinados compostos/metabolitos com a actividade metabólica das células. Esta possibilidade só não está mais generalizada dadas as dificuldades que muitas vezes há em os identificar e determinar especificamente, dada a complexidade das matrizes biológicas.

Por este motivo, os métodos enzimáticos continuam a ser os mais utilizados para a medição da actividade metabólica, apesar das dificuldades da sua aplicação em rotina, em especial associadas ao seu elevado custo e execução complexa, o que faz com que as suas aplicações se restrinjam a casos muito particulares, como, por exemplo, na detecção de patologias [7].

É precisamente para generalizar o uso de monitores de actividade biológica e para se ultrapassarem outras adversidades das determinações baseadas em actividade enzimática ou na expressão genética, que a abordagem por análise química convencional de compostos químicos envolvidos no metabolismo se reveste de grande relevo, tendo tido um grande desenvolvimento nos últimos anos. Esta abordagem complementa as medições fisiológicas simples, facultando informação extra, que permite, de forma mais integrada, determinar o comportamento do indivíduo num determinado momento.

A selecção dos compostos sensores da actividade bioquímica deverá contudo espelhar a situação metabólica ou resposta fisiológica que se pretende seguir, surgindo portanto como uma consequência da resposta biológica.

1.4. Biomonitorização como ferramenta de análise biológica

Define-se como biomonitorização a detecção, e eventual quantificação, da resposta biológica de um organismo quando sujeito a uma alteração biológica intrínseca ou a um indutor extrínseco. Ligados a este conceito de determinação da resposta biológica, surgem mais outros dois, o de biomarcador e o de biomarcação. O biomarcador é a característica ou agente da resposta biológica que irá ser detectada e, se possível,

quantificada; a biomarcação é o estudo da relação existente entre o indutor e a resposta biológica que este provoca, feito para determinar as condições qualitativas e quantitativas desta relação.

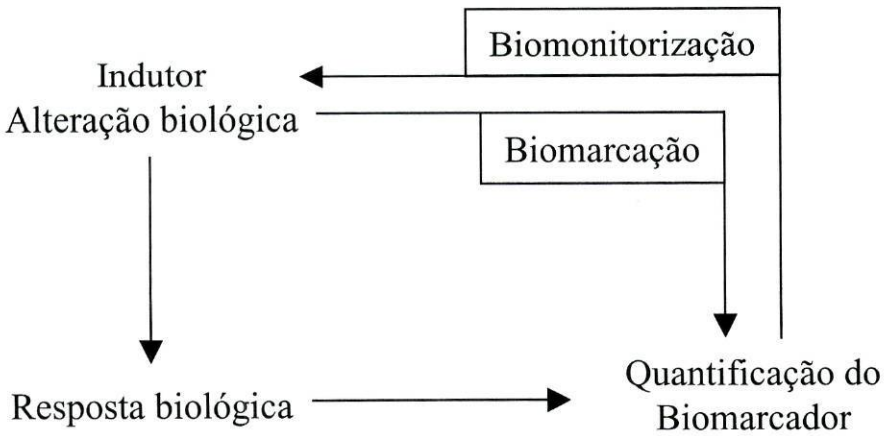


Figura I-1. Relação de conceitos existente entre a indução ou alteração biológica intrínseca e a resposta biológica dada pelos organismos.

Neste contexto, é, portanto, teoricamente possível uma monitorização qualitativa e/ou quantitativa de actividade metabólica dos organismos, a partir da qual podem ser deduzidas as condições a que os organismos estão sujeitos. A biomonitorização pode ter uma grande gama de utilizações, como por exemplo: na detecção de distúrbios metabólicos ou carências nutricionais; na detecção de potenciais contaminações microbianas; na caracterização e quantificação do perfil de determinados compostos com posterior utilização na aferição de qualidade de certos produtos (detecção de falsificações por exemplo); na determinação de perfis de concentração dos compostos ao longo do tempo permitindo a sua utilização como monitores de bioprocessos; na optimização de processos produtivos a detecção de potenciais anomalias produtivas; na determinação de poluição ambiental ou ainda para determinação e quantificação de "stress" ambiental (físico ou químico).

Um dos aspectos mais importantes deste trabalho é precisamente o estabelecimento de relações de biomarcação por identificação de biomarcadores de actividades bioquímicas específicas [17, 9, 26, 6, 21]. Pretende-se, ainda, demonstrar a importância que a biomonitorização poderá ter como ferramenta analítica em diversas áreas, sendo nesta

tese desenvolvidas três aplicações exemplificativas dos três diferentes tipos de biomarcadores existentes (segundo a classificação quanto à sua forma de acção), respectivamente aplicações baseadas: em biomarcadores de efeito, na Parte II; de susceptibilidade, na Parte III; de exposição, na parte IV (figura I-2). A primeira é uma biomonitorização de um processo produtivo de indústria alimentar, em que se utiliza o diacetilo como indicador do processo de fermentação de cerveja; esta aplicação demonstra a utilidade que o seguimento de determinados metabolitos pode ter para a avaliação do desempenho em bioprocessos a nível industrial e mesmo na qualidade final de produtos alimentares. Na segunda aplicação faz-se a biomonitorização da vitalidade de levedura *Saccharomyces Cerevisiae* através da determinação da sua actividade metabólica e avaliam-se as repercussões que o estado fisiológico da levedura pode ter na produção de cerveja, bem como a utilidade deste tipo de metodologia analítica na optimização de processos industriais. Na terceira aplicação desenvolve-se um método de quantificação de metalotioneínas em fígados de peixe, que são conhecidas como biomarcadores de exposição ambiental a catiões de metais pesados.

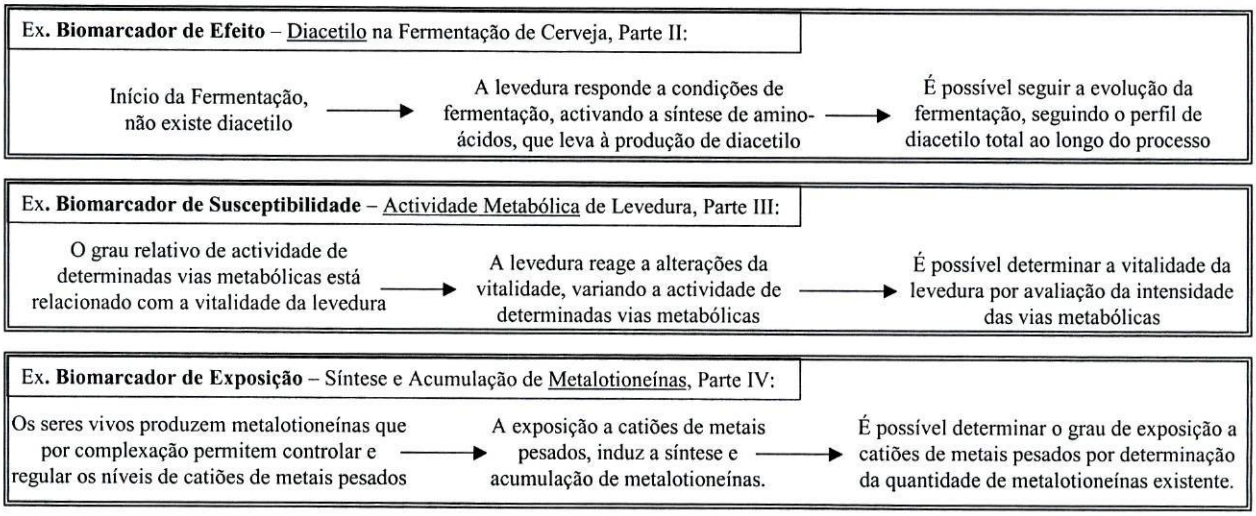


Figura I-2. Aplicações desenvolvidas nesta tese, abrangendo os três diferentes tipos de biomarcadores existentes (segundo a classificação quanto à sua forma de acção).

2. BIOMARCADORES COMO INTERFACES ENTRE A QUÍMICA ANALÍTICA E SISTEMAS BIOLÓGICOS "*IN VIVO*"

2.1. Utilização de biomarcadores em química analítica

2.1.1. Fundamentos

O termo biomarcador tem crescido de popularidade nos últimos anos. A este crescimento está associado o aumento do número de publicações sobre o assunto, abrangendo áreas de aplicação cada vez mais diversificadas, o que por seu lado levou a que surgissem um grande número de definições do termo de biomarcador, o qual é recorrentemente mal empregue apenas para explicar a aplicação concreta que versa na publicação. Apesar desta particularização do uso dos termos e conceitos de biomarcador, biomarcação ou biomonitorização/biodeterminação, existe uma consciência geral de que eles se aplicam sempre que se analisa uma determinada resposta biológica e se definem os termos em que esta ocorre.

Assim, um biomarcador pode ser definido como uma resposta biológica que ocorre no ser vivo face a um determinado acaso ou indução, sempre sob a forma de um reflexo do estado da amostra biológica ou sistema num determinado momento. O conceito de biomarcação, por seu lado, consiste no estudo, sob condições controladas, da resposta biológica de seres vivos ou de um sistema ecológico, por via de um ou mais biomarcadores, face a uma determinada eventualidade, um acaso ou uma indução que são conhecidos.

A aplicação da biomarcação tem vindo a ser muito desenvolvida e diversificada, podendo-se encontrar vários documentos muito interessante sobre o tema e que o abordam segundo vários ângulos e com diferentes finalidades, como, por exemplo, em estudos clínicos de carácter ambiental [18], como ferramenta em estudos epidemiológicos [14, 10, 29], em estudos toxicológicos [13, 19, 29, 15], na área de ciências da nutrição [31, 29], em estudos de impacto clínico de compostos de interesse alimentar [23], em estudos de modelos de biodisponibilidade e de farmacocinética em seres humanos[12], em modelos e estudos laboratoriais e clínicos de patologias [11], na industrial alimentar para avaliação de questões de higiene e segurança alimentares [24],

[29], como meios auxiliares e alternativos a testes com animais nas industrias química e farmacêutica [5], entre muitos outros.

Como se verifica, o interesse prático da biomarcação abrange diversas áreas, desde a medicina, à indústria química e farmacêutica, passando pelas áreas do ambiente e de química ambiental, até à indústria alimentar, enfim, todas áreas que de forma directa ou indirecta interajam com seres vivos ou ecossistemas.

Actualmente, a maior parte dos estudos de biomarcação é feita em ensaios clínicos e ambientais, nos quais é comum utilizarem-se biomarcadores para seguir e determinar quer anomalias patológicas, quer os efeitos biológicos de compostos químicos.

As principais características deste tipo de determinação de base biológica são de certo modo diferentes da análise físico-química convencional do indutor. Fazer, portanto, um contraponto entre ambos é importante, especialmente porque a própria análise físico-química é muitas vezes utilizada para a detecção e quantificação dos biomarcadores. A análise de biomarcação ou biomonitorização permite ter uma ideia de toda a influência a nível biológico que possui um determinado indutor ou acaso (intrínseco ou extrínseco ao organismo), permitindo determinar esta interacção biológica, ao contrário da análise físico-química convencional.

De facto, a análise físico-química convencional de um determinado poluente, por exemplo, não é por si só suficiente para avaliar o estado de saúde, sendo para tal necessário biomonitorizar o seu efeito sobre o ser vivo. Só então passa a ter significado o resultado da análise físico-química convencional, podendo-se então relacionar o seu nível com o seu potencial efeito xenobiótico. Esta situação, facilmente perceptível, dado que o efeito desse composto tóxico pode variar consoante as condições do meio ambiente, como por exemplo a presença de factores antagónicos ou sinérgicos, e portanto o uso de marcadores biológicos, torna ainda mais correcta a avaliação "*in vivo*" da sua acção.

A utilização de métodos de biomonitorização pode ser uma forma muito sensível de avaliar precocemente a degradação das condições do meio e de alterações metabólicas em organismos, permitindo controlar, logo numa fase inicial, o aparecimento de pequenas alterações, o que poderá possibilitar uma intervenção atempada antes da alteração da estrutura dos organismos e sobretudo antes de toda a população ou ecossistema serem irreversivelmente perturbados

A interface química/biologia tem um grande ênfase neste tipo de monitorização, uma vez que a interdependência destas disciplinas é a componente base nestes estudos de

monitorização. Com a utilização de biomarcadores pretende-se completar os fundamentos da química e não substituí-la.

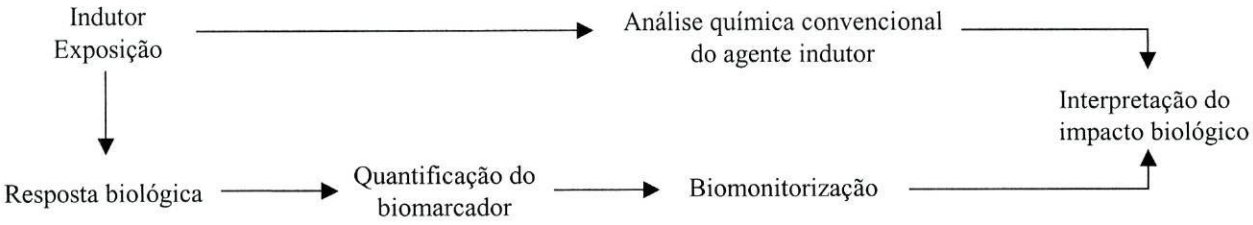


Figura I-3. Complementaridade da informação obtida pela análise química convencional e a análise recorrendo aos uso de biomarcadores

2.1.2. Tipos de biomarcadores

Dada a enorme quantidade de biomarcadores já existente e a grande diversidade de aplicações, não é possível a sua classificação simples. Então, verifica-se que actualmente existem vários critérios de classificação, nomeadamente, segundo o seu nível de acção, de acordo com a sua ordem funcional e dimensional e, ainda, com base na informação que deles pode ser recolhida.

No que concerne à classificação dos biomarcadores segundo o seu nível de acção, podemos considerar a existência de três tipos:

a) ***Biomarcadores de exposição***

Apenas dão indicação acerca da exposição a um agente ou condição físico ou químico, fornecendo pouca ou nenhuma informação acerca do significado biológico.

b) ***Biomarcadores de efeito***

Para além da exposição, medem os efeitos de um agente físico ou químico não documentado; porém, não a causa desse efeito.

c) ***Biomarcadores de susceptibilidade***

Medem a capacidade, inata ou induzida, de um indivíduo apresentar uma resposta a um dado agente ou condição a que foi sujeito.

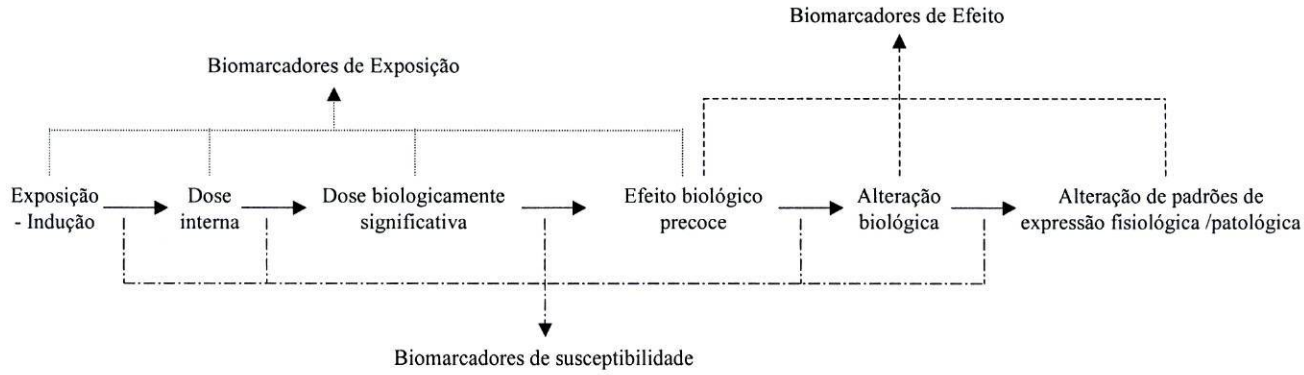


Figura I-4. Locais de acção dos diferentes tipos de biomarcadores (classificados segundo o seu nível de acção).

A classificação dos biomarcadores de acordo com a sua ordem funcional e dimensional é porventura a mais utilizada. Um exemplo deste tipo de classificação é apresentado na tabela I-1.

Tabela I-1. Classificação funcional e dimensional de biomarcadores [4]

Tipo	Subtipos	Exemplo
Moleculares	Alterações de DNA	Mutações
	Acção molecular de hormonas	Indução de respostas celulares por acção hormonal
	Ciclo de compostos exógenos não metabolizáveis	Acumulação de metais pesados
Bioquímicos	Metabolitos endógenos	Intermediários de vias metabólicas
	Metabolitos de xenobióticos químicos	Alterações intracelulares de compostos extracelulares (como forma menos agressivas)
	Manifestação de actividade enzimática	Aparecimento de uma determinada enzima
	Grau da actividade enzimática	Nível de actividade da enzima P450
	Produção de proteínas sem actividade enzimática	Produção de metalotioneínas
Imunológicos	Autoimunização	Anticorpos contra células do próprio organismo
	Imunidade adquirida	Aparecimento de anticorpos induzida por antigénios
	Perda de imunidade	Perda de capacidade de produção de anticorpos
Celulares	- Sem sub-tipos -	Alteração morfológicas em células, apoptose
Fisiológicos	- Sem sub-tipos -	Padrões anormais de comportamento Aparecimento de patologias
Histológicos	- Sem sub-tipos -	Histologia do fígado
Ecológicos	- Sem sub-tipos -	Alteração de equilíbrio de espécies

Por fim, refere-se a classificação de biomarcadores quanto ao tipo de informação que deles pode ser retirada, usualmente associada aos mecanismos em que estão envolvidos:

i) Biomarcadores não específicos

Certas respostas ou efeitos biológicos podem não ser directamente relacionados com o indutor que se pretende biomonitorizar. Neste tipo de biomarcadores os efeitos observados resultam não só directamente do indutor propriamente dito, mas também de outros factores laterais que podem ser por exemplo outros indutores, o que diminui a potencialidade de biomarcação e aumenta os factores de complexidade da análise. Existem, contudo, aplicações deste tipo de biomarcadores que são bastantes úteis, quando caracterizam uma resposta biológica que é dependente de outros factores, permitido caracterizar situações de sinergia ou antagonismo particulares, como a presença de outras moléculas no meio, a existência de um estado de "stress" generalizado nos organismos, um estado nutricional débil, entre outros.

A sua utilização é fundamentalmente feita conjuntamente com outros biomarcadores, permitindo ajudar a caracterizar genericamente factores de variabilidade.

ii) Biomarcadores específicos

Nestes casos a resposta de biomarcação pode ser directamente correlacionada entre o biomarcador e o indutor da resposta biológica. Esta é a forma ideal de biomarcação, mas igualmente a menos comum. Este tipo de biomarcação permite especificar a natureza e muitas vezes o nível da indução a que os seres vivos estiveram expostos e muitas vezes ter informação do período dessa exposição.

Embora se pretenda dar a ideia de que a biomarcação é de aplicação directa, na realidade, uma determinada resposta biológica a um certo indutor é, de uma forma geral, uma integração de várias adaptações de um nível inferior, pelo que um único

biomarcador pode não ser suficiente para avaliar de uma forma inequívoca a resposta no seu global e de forma precisa.

2.2. Factores de planeamento e análise de estudos de biomarcação

2.2.1. Critérios de escolha e avaliação de biomarcadores

Para poder vir a ser seleccionado, um biomarcador tem de à partida satisfazer determinados pré-requisitos, dos quais se destacam dois: definir de forma inequívoca e única a resposta biológica que se pretende monitorizar; e ser minimamente sensível, dando informação útil sobre a alteração de estado do ser vivo antes que este se torne a alterar ou que coloque em causa a sua própria existência (morte ou doença grave).
Contudo, para além destes, os critérios de escolha do biomarcador podem ser vários, sendo antes do mais condicionados pelo problema analítico que se pretende solucionar.

Desta forma, para se poder seleccionar determinada característica da resposta biológica como biomarcador, este deverá respeitar uma série de critérios [30], podendo-se para tal construir uma chave dicotómica adequada ao problema e com base em elementos como os que se apresentam de seguida:

1. ***Sensibilidade*** – Será esta mudança a primeira a ser produzida pelo indutor? Estará o biomarcador envolvido numa via não essencial?
   De uma forma geral, a sensibilidade do biomonitor é tanto maior quanto mais estiver envolvido em vias primárias de resposta biológica à indução provocada, e quanto mais fácil for determinar o analito. É ainda geralmente aceite que quanto mais precoce e rápida for a resposta e mais especifico o biomarcador mais pormenorizado e sensível este será; por exemplo, um biomarcador bioquímico é geralmente mais sensível do que um fisiológico e este mais sensível do que um ecológico.
2. ***Padrão da resposta biológica*** - É a mudança um resultado directo ou indirecto da exposição ou alteração biológica produzida?

Um exemplo é a resposta indirecta a um contaminante que induz uma resposta de "stress", que por seu turno induz variadas mudanças induzindo alteração a variados biomarcadores.

3. ***Especificidade biológica da Indução*** – É a mudança aplicável ao sistema ou espécie em estudo?

   Existem respostas biológicas que ocorrem em determinados organismos face a determinadas induções que podem não ocorrer em outros.

4. ***Especificidade físico-química da indução*** – A resposta biológica é especifica de um só composto ou indutor ou é um padrão comum de resposta que indica a exposição a vários tipos ou classes de compostos ou indutores?

   Existem classes de compostos químicos que induzem a mesma resposta biológica, como por exemplo as penicilinas, sendo difícil a biomonitorização de uma em particular utilizando um biomarcador não específico.

5. ***Características analíticas do biomarcador*** – Será possível analisar o biomarcador, e será que existem formas mais baratas de se chegar a uma mesma resposta?

   A escolha do biomarcador deverá ainda atender a outros factores analíticos, como a simplicidade, a rapidez da resposta e da análise, o menor custo, a fiabilidade da biomarcação.

6. ***Quantificação do biomarcador*** - É o biomarcador quantitativo? Será possível determinar uma relação quantitativa entre o indutor e o biomarcador?

   Se a resposta for quantitativa ou semi-quantitativa permite a quantificação do indutor, podendo dar informação sobre a dose e/ou o tempo a que o indivíduo está exposto. Nestes casos, a sua variabilidade, devida a factores como o clima, temperatura, sexo, idade e peso, etc., deve ser conhecida e mantida dentro de limites aceitáveis.

7. ***Limitações ético-legais*** - Existem problemas éticos e legais implicados? Para realizar o estudo será necessário matar, danificar irreversivelmente, ou causar dor e sofrimento aos organismos ou sistemas? A informação obtida será confidencial e/ou individual passível de protecção ou de autorização?

   Questões ético/legais são de primordial importância quando se lida com seres vivos ou organismos, pelo que o biomarcador deverá ser o menos intrusivo possível, implicando o menor dano passível ao sistema e deverá ser eticamente

aceitável (o de animais superiores deverá ser preterido). A obtenção e utilização da informação poderá ter condicionantes.

Uma consequência do aumento da exigência dos estudos sobre biomonitores leva a que a maioria da investigação esteja actualmente ao nível bioquímico e molecular, uma vez que este são aqueles que mais facilmente preenchem os critérios acima descritos [3]. Estes tipos de biomarcadores permitem detectar em primeiro lugar os sinais de aviso primários, embora podendo eles próprios muitas vezes contribuir para um posterior desenvolvimento da resposta generalizada à indução, como por exemplo o desenvolvimento de uma patologia. De uma forma geral, refere-se que os biomarcadores serão tanto mais úteis quanto mais clara, vincada e precoce for a sua associação com as mudanças.

Relativamente à avaliação dos biomarcadores, muitas vezes a própria chave dicotómica que rege a sua selecção pode ser utilizada, bastando por vezes apenas ligeiras alterações, introduzindo factores de sucesso e de limitação mais específicos. Neste processo de avaliação dos biomarcadores recorre-se a testes de biomarcação, geral e preferencialmente "in vivo"; é necessário sobretudo estabelecer o ponto de ligação de pelo menos uma das relações de dose-resposta, de dose-tempo-resposta ou de resposta-vitalidade e viabilidade do organismo/sistema.

No caso de biomarcadores capazes de medir o nível de exposição, é muito importante avaliar e definir claramente a susceptibilidade de cada indivíduo, bem como a sua própria vulnerabilidade. Estes factores podem ajudar a compreender as diferenças individuais e permitir um trabalho estatístico da amostragem para a população em estudo, ultrapassando as limitações de uma amostragem não representativa do tipo e do estado em que cada um destes indivíduos se podem encontrar [32].

2.2.2. Planificação e organização de estudos de biomarcação

Como já foi referido anteriormente, nos teste de biomarcação existe um conhecimento do tipo e concentração do indutor que se pretende biomonitorizar, sendo trabalhados os factores de estabelecimento da causalidade e de determinação da eficiência da

monitorização. A informação obtida, uma vez tratada, deverá permitir avaliar eventuais medidas de intervenção sobre o sistema, e poder ser utilizada na previsão e indicação de efeito ou alterações que poderão condicionar o processo ou o sistema a um nível superior. Nestes estudos de biomarcação, as amostras são colocadas em condições controladas e envolvem sempre pelo menos um dos testes de exposição, também conhecidos como testes de indução, de estimulação ou excitação.

Contudo, dada a sua complexidade, estes estudos requerem uma cuidada planificação, desde a identificação do problema até à pesquisa dos biomarcadores que permitam a correlação entre o problema e a aplicação propriamente dita. Para tal, o planeamento destes estudos de biomarcação deve enquadrar diversos factores, tais como:

1. Identificação e estudo do problema
2. Pesquisa dos biomarcadores
3. Escolha da espécie
4. Forma de obtenção dos organismos de testes
5. Análise dos organismos utilizados nos estudos
6. Procedimentos de grau de exposição (dose, tempo)
7. Avaliação da resposta
8. Análise de factores interferentes intrínsecos e extrínsecos
9. Análise – desenvolvimento ou aplicação de técnicas analíticas
10. Validação e aplicação dos processos de biomarcação
11. Análise de rotina de biomarcadores como parte integrante na resolução do problema inicialmente colocado.

De entre todos estes passos, aquele que porventura carece de um maior destaque é o dos procedimentos de grau de exposição, que constituem a base de toda a relação entre indutor e biomarcador. O conhecimento da biocinética das vias envolvidas na resposta poderá ajudar a determinar qual o metabolito, o tecido ou mesmo o tempo de amostragem adequados, podendo estas diferenciações elucidar pormenores como, por exemplo, distinguir situações de exposição distintas como uma exposição recente ou cumulativa de um composto tóxico (chumbo no rim ou chumbo no osso). Embora desejável, salienta-se que não é estritamente necessário conhecer os mecanismos envolvidos, em especial quando se fala em biomarcadores de exposição.

Um outro cuidado a ter em estudos de exposição é a dose a ser aplicada, que deverá ser realística em termos de exposição normal passível de ocorrer naturalmente, em especial quando se pretende a validação para estudos de biomonitorização. Os testes de biomarcação poderão inclusive seguir processos completos de progressão e ampliação da resposta biológica desde a indução até ao efeito final, sendo para tal necessário o uso de biomarcadores que possam demonstrar a integração de diferentes respostas ao longo do tempo. Para tal, a aplicação dos mesmos princípios utilizados nos testes toxicológicos reveste-se de particular utilidade [27], sendo de destacar os testes apresentados na tabela I-2.

2.2.3. Processos de validação de biomarcadores e de estudos de biomarcação

O âmbito de aplicação dos biomarcadores em estudos de biomarcação requer, em princípio, um conhecimento dos mecanismos e/ou razões que originam a resposta biológica, os quais formam a base cientifica da aplicação. Contudo nem sempre tal é possível, e existem casos de biomarcação induzida em que não existe uma relação bem conhecida dos mecanismos que levam à produção do biomarcador; nestes casos o processo de validação é mais complexo, pois é necessário validar não só o biomarcador e o estudo de biomarcação mas igualmente a especificidade do indutor.

Os programas de monitorização biológica ou biomonitorização podem ser analiticamente divididos em métodos qualitativos e métodos também quantitativos. Na validação é portanto necessário caracterizar qualitativa e eventualmente quantitativamente, quer a relação de biomarcação quer os factores de variabilidade. Em geral, a resposta biológica varia consoante a célula ou tecido celular (células do músculo esquelético são diferentes de células do fígado), o tipo de estímulo, a sua intensidade, o estado fisiológico do indivíduo (doente ou são) e mesmo a sua capacidade intrínseca de resposta; por exemplo, uma bactéria estritamente aeróbia é incapaz de responder a estímulos quando em ambiente anaeróbio, pois é incapaz de produzir inclusive energia para tal.

Tabela I-2. Testes de toxicologia/exposição mais utilizados em estudos de biomarcação, e suas principais características

Teste	Principais Características	Outras Particularidades
Testes de letalidade aguda – CL_{50}/DL_{50} (teste de exposição letal aguda)	Muito usados em ensaios exploratórios e preliminares De efeito significativo a breve trecho (o factor tempo é controlado). Espera-se que ocorra sempre resposta biológica mensurável Especialmente úteis para definir critérios exposição por relações dose-resposta.	Concentração letal (CL_{50}) ou a dose letal(DL_{50}) Os valores CL_{50} podem dar uma estimativa inicial da toxicidade e intensidade da resposta biológica causada por uma substância ou indutor – constituem um método rápido de determinar a sua perigosidade. Os valores CL_{50} são ponto de partida para a investigação da toxicidade de misturas de compostos químicos e de agentes físicos, já que estas misturas são uma realidade na prática As respostas agudas podem ser desta forma determináveis
Testes de exposição sub-letal	Espera-se sempre uma resposta se o composto for potencialmente indutor de alteração. Permitem definir melhor critérios de exposição total. O tempo de exposição pode ser considerado, criando relações de dose-tempo-resposta	CE_{50}(concentração estimativa) Mais difíceis de determinar pois as relações são mais dependentes de variações intrínsecas ao indivíduo. Os tempos de exposição podem ir desde minutos até semanas ou meses. As respostas tanto agudas como crónicas poderão ser mensuráveis
Testes de exposição crónica	A resposta poderá ser observada ao fim de semanas, ou mesmo anos. As concentrações e intensidade da indução são geralmente baixas Permitem definir critérios de exposição acumulativa.	Podem-se determinar respostas biológicas, que reflictam efeitos cumulativos do indutor Estes testes são efectuados com o objectivo de se estabelecer níveis de exposição sub-letais e sem efeito. Muito aplicados a testes envolvendo ciclos de vida de organismos.
Testes de exposição de campo	Permitem encontrar variações de tipo e padrões de resposta em condições reais. Úteis para definir a aplicação em campo de testes de biomarcação e na previsão de comportamento e performance dos organismos. Útil pare definir limitações da biomarcação devido a factores extrínsecos.	Servem para estudar e compensar situações de sinergia ou antagonismos entre a indução produzida e outros agentes existentes no meio. Servem para determinar efeito em sistemas dinâmicos em que a indução poderá não ser constante. Os factores de variabilidade intrínsecos deverão estar controlados e compensados para análise do efeito de factores extrínsecos.
Testes epidemiológicos	Testes de exposição envolvendo grandes populações. Permitem distribuição da resposta em função de características quer intrínsecas quer extrínsecas distintas. Úteis para definir critérios de exposição condicionada, e definir os condicionalismos da resposta biológica.	Necessidade de biomonitorização ao longo do tempo, com suporte documental dos níveis e duração das exposições e rastreabilidade dos indivíduos. Controlo de características intrínsecas e extrínsecas dos indivíduos estudados.

Embora os factores de variabilidade sejam um parâmetro importante, no cerne do processo de validação está a avaliação das relações dose-resposta ou dose-tempo-resposta. Para definir estas relações é necessário especificar uma resposta biológica

particular (tipo de biomarcador), determinar a sua intensidade, a duração da resposta (persistente, cumulativa ou transitória) e as condições em que essa resposta é obtida.

Esta relações podem ser estudadas recorrendo aos testes de exposição já referidos; contudo, é necessário tomar em atenção que estas relações de exposição/resposta diferem entre os diferentes tipos de organismos, e mesmo entre populações, pelo que os factores de variabilidade devem ser controlados ou condicionados. Na figura I-5, representa-se uma curva típica da relação dose-resposta de um teste de letalidade aguda; no ponto de mortalidade correspondente aos 50%, metade dos indivíduos morrem, e a dose aplicada, designada por DL_{50}, é um conceito muito utilizado para indicar a toxicidade específica de compostos químicos ou agentes físicos.

Durante a validação dever-se-á estabelecer critérios de dependência da magnitude da exposição, de preferência pelas relações dose-tempo-resposta. Quando estas relações não são conhecidas ou controladas, não são válidas extrapolações.

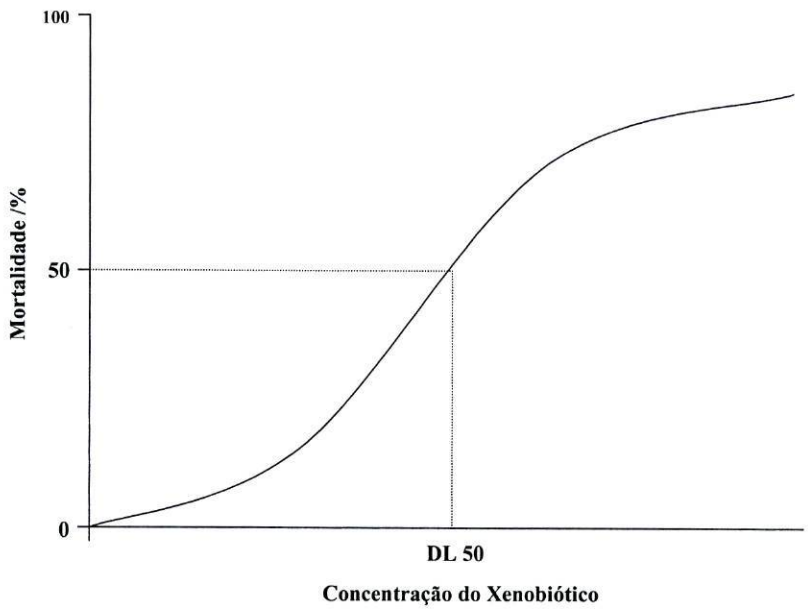


Figura I-5. Exemplo de uma curva de dose-resposta em que a resposta é a morte do organismo e o indutor é um composto xenobiótico tóxico. A percentagem cumulativa de mortes está representada no eixo dos Y

De uma forma geral, o processo de validação é tanto mais simples quanto mais específico for o biomarcador, ou mais restrito for o campo de aplicação, pois há menos variáveis para equacionar. Contudo, em estudos de biomonitorização o uso de mais do que um biomarcador é sempre preferível pois permite não apenas reduzir a variabilidade, mas além disso, ajudar a enquadrar o problema e as causas das perturbações.

Antes de se proceder à validação propriamente dita, é necessário avaliar os estudos de biomarcação, que, tal como na avaliação de biomarcadores, deverão seguir uma série de critérios consoante o problema que é colocado [16, 22, 28, 25]. A forma talvez mais expedita de o fazer é realizar os ensaios de forma a obter dados que permitam o preenchimento de uma chave dicotómica. Para organizar este tipo de chaves dicotómicas, apresentam-se de seguida, alguns dos critérios de sucesso ou insucesso que podem ser utilizados em testes de biomarcação:

i. Medição: Existe reprodutibilidade e repetibilidade da medição analítica do biomarcador?
ii. Existe relação entre o biomarcador e o estudo de biomarcação pretendido?
iii. Existem relações de dependência? Esses factores podem e são controlados?
iv. Os factores de dependência podem ser quantificados, e utilizados factores de correcção no estudo de biomarcação e em futuras aplicações de biomonitorização?
v. Pode-se identificar o estado inicial do indivíduo ou sistema e a concentração do biomarcador antes do estudo?

Relativamente à validação propriamente dita dos estudos de biomarcação, esta não é directamente comparável à validação de métodos analíticos convencionais, nem de métodos biológicos e clínicos "in vivo", na medida em que integra elementos de ambos. Por isso, na validação dos estudos de biomarcação é necessário tomar em consideração vários factores que têm de ser ponderados na descrição do método, no seu protocolo de execução, na quantificação e na análise [16, 22, 28, 25]:

a. A biocinética da substância indutora ou das vias de resposta ao estímulo induzido; ou seja, deverá relacionar qualitativa e/ou quantitativamente, e de preferência temporalmente a exposição.
b. A relevância do efeito de interesse – para o caso de biomarcadores de efeito (em que não são conhecidos os mecanismos da resposta biológica)
c. A validação de especificidade do biomonitor
d. O controlo analítico da qualidade; o uso de materiais e padrões de referência adequados ao estudo, de forma a estabelecer a qualidade do resultado.

e. A estabilidade do biomarcador, quer na matriz quer durante a análise
f. A reprodutibilidade da previsão do ponto final em estudo - para o caso de biomarcadores de efeito (em que não são conhecidos os mecanismos da resposta biológica)
g. A reprodutibilidade interlaboratorial - para o caso de biomarcadores de efeito (em que não são conhecidos os mecanismos da resposta biológica)
h. O controlo de qualidade da análise - para o caso de biomarcadores de efeito (em que não são conhecidos os mecanismos da resposta biológica)
i. A estabilidade do biomarcador, quer na matriz quer durante a análise - para o caso de biomarcadores de efeito (em que não são conhecidos os mecanismos da resposta biológica)
j. O levantamento de factores interferentes e formas de os controlar.

Embora este tipo de análise da resposta biológica seja sob muitos pontos de vista mais adequado do que a análise físico-química convencional, na verdade existem também aqui várias limitações (Tabela I-3).

Tabela I-3. Principais factores condicionantes de estudos de biomarcação

Factores extrínsecos ou ambientais	Nível de exposição
	Aclimatização e adaptação
	Oxigenação
	Temperatura
	Disponibilidade nutricional
	Pressão
	Actividade da água
	Competição com outros indivíduos
	Variações sazonais - estação do ano
	Dinamismo do sistema e mobilidade dos indivíduos entre sistemas distintos
	Abertura do sistema a trocas com o exterior
Factores intrínsecos ou biológicos	Património genético
	Diferenças taxonómicas, tipo de espécie
	Condição fisiológica do organismo
	Morfologia
	Estado de desenvolvimento
	Idade
	Sexo
	Estado reprodutivo (ciclo reprodutivo)
	Nível de "stress"
	Estado psíquico-compontamental
	Senescência ou senilidade

A especificidade da resposta biológica face a uma determinada indução pode portanto variar consoante vários factores. Este facto, nem sempre facilmente perceptivel, é contudo de importância capital, tal como se pode constatar no exemplo que se segue, onde se apresenta um caso ilustrativo de diferenças qualitativas e quantitativas de biomarcação que se podem encontrar em testes de biomonitorização utilizando como factor de variabilidade o tipo de espécie utilizado, e um mesmo indutor (H_2O_2):

> Colocando peróxido de hidrogénio numa cultura de bactérias anaeróbicas estritas, estas não são capazes de o degradar enzimaticamente pois não possuem codificação para enzimas que permita a sua degradação enzimática; contudo, quando o mesmo peróxido de hidrogénio é colocado numa cultura de bactérias microaerofilas, estas respondem aumentando a actividade da catalase (biomarcador I) que permite a degradação intracelular do H_2O_2; mas poderemos ainda ter outra situação com uma levedura aeróbica facultativa (como S. Cerevisiae), a qual por seu turno responde aumentando a produção e actividades das enzimas catalase (biomarcador I) e peroxidase (biomarcador II); mas como existe sinergia entre estas enzimas, o nível de actividade da catalase na levedura poderá ser inferior à induzida nas bactérias microaerófilas. Verifica-se, portanto, que um tipo de biomarcador poderá não servir todos os casos a estudar, tal como os níveis dos biomarcadores deverão ser validados individualmente atendendo a factores de eventual variabilidade como se apresentou no caso apresentado.

O advento de técnicas capazes de detectar características específicas aumenta as potencialidades deste tipo de estudo de biomarcação, ao mesmo tempo que reduz os factores de variabilidade biológica. Contudo, nos casos de falta de especificidade existem hoje em dia métodos de análise multivariável, envolvendo análise estatística de grupo, técnicas de ordenação e análise discriminativa, que permitem a obtenção de relações matemáticas entre amostras desde que duas ou mais variáveis tenham sido medidas.

3. BIOMARCAÇÃO DE PROCESSOS DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA

3.1. Biomarcação na indústria de processamento alimentar

A utilização de biomarcadores em indústria alimentar encontra-se numa fase bastante menos desenvolvida comparativamente com a sua utilização em outras áreas como na medicina (em ensaios clínico-farmacêuticos), em biologia e mesmo noutras indústrias congéneres, como a farmacêutica e a química. Apesar deste atraso, este cenário tem vindo a alterar-se nos últimos anos nos quais se tem registado um crescente desenvolvimento de aplicações. Este facto deriva de dois fenómenos distintos que cada vez mais pressionam quer a indústria (marketing do produto), quer as entidades oficiais como organismos de protecção do consumidor, os legisladores e as autoridades fiscalizadoras. Um destes fenómenos, que alterou a anterior conjuntura, é marcadamente sociológico, com a modificação da relação de exigência do consumidor para com os produtos, que se traduz no crescente grau de exigência manifestada pelos consumidores relativamente à consistência da qualidade dos produtos alimentares e dos efeitos que este podem exercer sob o seu bem estar e sobre a sua saúde. O segundo factor é, por outro lado, de natureza técnico-económica, e prende-se com a crescente consciencialização e reconhecimento da importância que os processo biológicos têm em toda a cadeia de produção e distribuição dos produtos, pelo que têm sido desenvolvidas formas de biomonitorização destes processos, que podem ir desde a determinação do seu desempenho na transformação e processamento dos alimentos, até à procura de meios de garantia de higiene e segurança alimentar dos produtos em casa do consumidor.

3.2. Biomarcadores na indústria cervejeira

Na indústria cervejeira, como em outras indústrias cujo processo base é a fermentação, a forma como os microorganismos se comportam ao longo do processo é um factor de primordial importância. A consistência de que a qualidade do produto final e o próprio desempenho da fermentação são dependentes de diversos factores, quer intrínsecos quer extrínsecos, levou a uma crescente procura de meios que permitam biomonitorizar

processos ou controlar factores que afectam essa capacidade transformativa dos microorganismos envolvidos.

Como já foi referido existe, actualmente, uma conjuntura que exige dos produtores a garantia da qualidade do produto. Este conceito da qualidade não é sinónimo de gama, mas antes de que o produto tenha consistência de qualidade, ou seja, que mantenha as suas características típicas em todos os lotes fabricado e enviados para o mercado, independentemente da forma como é fabricado. Para atingir este objectivo de obter a menor variabilidade possível do produto final, é importante não apenas uma consistência das variações devidas à qualidade das matérias primas mas também dos processos de transformação, o que leva a que seja muito importante desenvolver biomarcadores que permitam precisamente melhorar a consistência neste dois factores de variabilidade.

Embora a qualidade do produto seja um dos parâmetros mais importantes para a indústria, há ainda muitos outros também relevantes, dos quais se destacam a produtividade e a simplificação dos processos. No contexto destes dois últimos factores, verifica-se que as abordagens mais modernas de gestão da produção tendem a substituir o conceito do "processo controlado", tradicionalmente utilizado, pelo conceito de "processo sob-controlo". Esta mudança de conceitos pretende significar que os factores de eventual variabilidade do processo são analisados e controlados *"a-priori"*: evitam-se variações reactivas durante o processo, quer prevendo-as quer minimizando a necessidade de alterações durante o processo, o que permite a automatização dos procedimentos de produção e a menor variabilidade dos processos e produto obtidos. À partida, admitindo que os procedimentos de transformação são iguais, os factores de variabilidade reduzem-se a dois: a qualidade da matéria prima e o estado fisiológico dos microorganismos utilizados, os quais são na indústria cervejeira claramente bioprocessos e portanto passíveis de ser controlados por biomonitorização.

Concretamente no caso do processo de fermentação de cerveja tem grande importância o desenvolvimento de biomarcadores para duas aplicações distintas: a primeira são biomarcadores de seguimento, que se pretende que permitam a construção de diagramas de controlo do processo, os quais posteriormente se comparam com diagramas padrão para avaliar o desempenho relativo da fermentação; a outra envolve biomarcadores de indicação, que permitam obter informações específicas, como por exemplo sobre a qualidade das matérias primas, as condições de fermentação, o estado fisiológico do

microorganismo, a indicação do final do processo ou até a previsão da qualidade do produto.

Uma parte do trabalho apresentado nesta tese consiste no desenvolvimento de um método de determinação de um biomarcador, o diacetilo, que pode ser utilizado no estudo da fermentação de cerveja como biomarcador quer de seguimento quer de indicação.

Numa outra parte do trabalho aborda-se a importância industrial que a levedura *Saccharomyces Cerevisiae* tem no processo de fermentação, tendo sido desenvolvido um teste de biomonitorização da vitalidade da levedura por medição da sua actividade metabólica, que permite uma pré-avaliação do processo fermentativo; desta forma usando esta determinação conseguem-se identificar e reduzir factores de variabilidade dependentes do microorganismo utilizado, o que permite ter o processo "sob-controlo" no que diz respeito à qualidade da levedura, contribuindo assim para melhorar a gestão da produção da cerveja.

4. BIOMARCAÇÃO EM QUÍMICA AMBIENTAL NA HIDROSFERA

4.1. Poluição na hidrosfera

Os últimos 30 anos têm sido testemunha de um enorme crescimento de consciência e preocupação sobre efeitos da actividade humana no ambiente aquático. Muitas destas preocupações estão relacionadas com poluentes químicos libertados para o ambiente e que acabam por ir parar a rios, lagos e oceanos. Dependendo das suas propriedades físico-químicas, estes produtos químicos podem por isso ser encontrados na água, nos sedimentos marinhos e nos seres vivos que habitam estes ambientes. A contaminação química é geralmente maior perto dos centros urbanos, embora existam áreas remotas contaminadas como o caso das regiões polares e do fundo do mar.

Torna-se assim necessário fazer uma avaliação do grau de poluição do ambiente, que faz sentir os seus efeitos a dois níveis quer nos organismos que habitam esse meio,

como plantas e peixes, quer nos consumidores desses organismos, como o caso do homem que se alimenta desses peixes. Desta forma, a avaliação da poluição mais do que uma simples avaliação ambiental, é muitas vezes uma avaliação de segurança alimentar. Até ao fim dos anos 80, a vigilância ambiental na hidrosfera baseava-se essencialmente num conjunto de técnicas de análises físico-químicas mais ao menos sensíveis, permitindo uma avaliação das concentrações dos poluentes na água, nos sedimentos e nos organismos vivos. Contudo essas técnicas apresentam o inconveniente de não permitirem, por si só, dar um esclarecimento sobre o impacto real destes poluentes nos organismos vivos, incluindo os efeitos a médio-longo termo na população ou no ecossistema, o que tem levado ao desenvolvimento de estudos de biomarcação do impacto biológico de fenómenos de toxicidade ambiental [8].

4.2. Biomarcação de toxicidade ambiental na hidrosfera utilizando peixes

Quando os sistemas aquáticos que se pretende estudar são altamente dinâmicos, como sucede nos rios, usualmente os focos de poluição podem ser inconstantes e de grau variável, pelo que o uso de métodos convencionais para determinação de poluentes pode apresentar erros de amostragem não aceitáveis e o resultado das análises não ser significativo. Acresce ainda que factores como os de biodisponibilidade, bioacumulação e exposição efectiva não são possíveis de determinar por análise físico-química convencional simples do poluente, pelo que nestas condições o uso de biomarcação se torna uma forma mais expedita de análise. Nestes sistemas as primeiras questões que se colocam são precisamente o tipo de biomarcador que se irá determinar para resolver o problema em concreto, e o organismo onde se fará a biomarcação. A escolha do organismo para biomarcação deverá por isso atender a factores de residência e de dispersão dos indivíduos, sendo quase sempre preferível a selecção de peixes que permaneçam confinados a uma determinada área e que não sejam migratórios, o que ajuda a minimizar a variabilidade na exposição [2].

Relativamente ao tipo de biomarcador, a escolha deste depende muito do problema ambiental em causa, sendo relativamente usual equacionar o uso de mais do que um biomarcador. No caso dos peixes, pode-se sempre fazer uso complementar de

biomarcadores não específicos mas que por vezes se revelam importantes, como por exemplo, os histológicos, os fisiológicos ou comportamentais (ex. natação lateral dos peixes). Estes permitem obter informação complementar, o que possibilita uma redução da variabilidade em estudos multi-parametrizados. Para uma biomarcação mais dirigida, é preferível o uso de biomarcadores que registem mudanças bioquímicas ou moleculares, que permitem ser utilizados para monitorar e diagnosticar contaminações de forma mais rápida e precoce, antes que a contaminação coloque em causa a subsistência de indivíduos, populações ou mesmo ecossistemas. Na tabela I-4, indicam-se alguns dos biomarcadores bioquímicos e moleculares mais utilizados para estudos ambientais envolvendo peixes.

Tabela I-4. Biomarcadores bioquímicos e moleculares mais utilizados em estudos ambientais, obtidos a partir de peixes.

Biomarcador	**Descrição do efeito de biomarcação**
Citocrómo P450	O aumento de actividade permite identificar se ocorreu ou não exposição a contaminantes orgânicos
Metalotioneínas	Aumento da sua concentração após a exposição a metais pesados
Peroxidação lipídica	Indicação de redução de resistência a "stress" e presença de compostos tóxicos indutores de radicais livres
Endoperoxidase lipídica	Aumento da sua actividade é tido como um indicador da contaminação ambiental.
Concentração de glucose	Adaptação dos animais ao meio ambiente
"Heat shock proteins"	Existência de "stress" no organismo
Hormonas esteróides	Indicadores de problemas de reprodução
Catecolaminas e hormonas corticoesteróides	Alterações metabólicas, perturbações osmóticas e iónicas e diminuição dos mecanismos de defesa.
Expressão genética	Mudanças adaptativas
Formação de aductos de DNA	Indicador de efeitos carcinogénicos ou genetotóxicos.
Alterações na expressão genética	
Mutações genómicas	

Como já foi salientado anteriormente, poderão surgir algumas limitações nos estudos de biomarcação inerentes à sensibilidade das várias espécies aquáticas, das quais se salientam algumas:

- Variação da sensibilidade entre organismos e espécies a diferentes compostos químicos; pressupõe que não se deve extrapolar resultados para espécies distintas
- Dentro de uma comunidade, espera-se que os vários grupos respondam de um modo diferente a um determinado produto químico ou a uma mistura de produtos químicos, pelo que a resposta a uma situação de "stress" pode variar com a idade, sexo, estado de desenvolvimento e estado de nutrição de um

organismo, entre outros factores; pressupõe-se que a variabilidade dos resultados pode ser elevada se não forem corrigidos com biomarcadores complementares.

- Os dados toxicológicos de uma única espécie não podem ser relacionados com todos os grupos de organismos da comunidade, no caso dos vários grupos responderem de um modo diferente. Contudo, quanto mais severo for o impacto, mais e melhores correlações devem existir, sendo menor a possibilidade de grupos distintos responderem antagonicamente.
- Os factores ambientais são geralmente similares para comunidades e populações de peixes residentes dentro da mesma área; contudo é necessário certificar de que tal de facto sucede como, por exemplo, colocando barreiras para confinar os peixes.

Um dos principais problemas existentes em poluição ambiental é a entrada de produtos químicos bioacumuláveis na cadeia trófica, que resulta na subida da sua concentração nos organismos à medida que nos aproximamos do topo dessa cadeia. Desta forma, é comum atingir-se valores de concentração destes compostos em organismos maiores do que seria de esperar por bioacumulação, devido à bioampliação, tal como se pode observar na ilustração da figura I-6. Em oposição, o processo pelo qual os organismos diminuem a quantidade de tóxicos, quando colocados em locais não contaminados, designa-se por depuração ou biodepuração. O efeito tóxico dos compostos químicos não pode por isso enquadrar-se totalmente apenas em variáveis tóxicológicas simples como a sua toxicidade específica (a determinar pelos testes de letalidade aguda), dado que é dependente de outras variáveis como a concentração e/ou a dose do agente, a frequência e duração da exposição, as condições ambientais, e, ainda, os mecanismos e a capacidade de depuração dos organismos (determinados pelos testes de exposição sub-letal e/ou exposição crónica) [20].

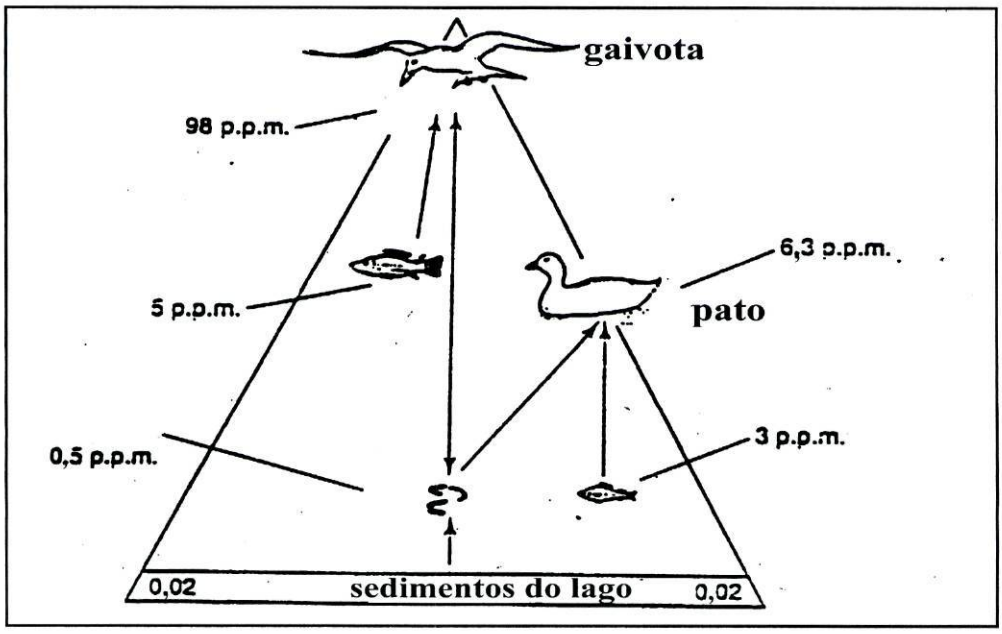


Figura I-6. Factores de bioacumulação de um xenobiótico na cadeia alimentar de um lago, envolvendo predação. Adaptado de [1].

Dentro destes compostos químicos que são bioacumuláveis, e cuja análise convencional no ambiente é difícil de aplicar na determinação de contaminação de organismos, encontram-se os catiões de metais pesados. Neste caso, o uso de biomarcadores torna-se muito importante, pois poderá permitir avaliar o grau de toxicidade que esses catiões podem ter no organismo sem necessidade de saber os mecanismos de exposição, ingestão e assimilação que estão subjacentes ao efeito tóxico.

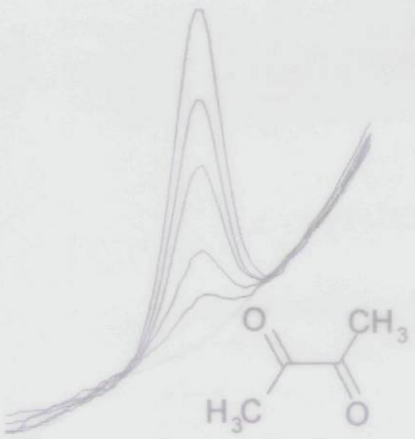
Para a biomarcação de exposição de organismos a concentrações excessivas de catiões de metais pesados existem as metalotioneínas, cuja produção e acumulação é induzida por exposição a elevadas concentrações de metais pesados. Assim, a partir da quantificação de metalotioneínas é possível determinar, por uma relação directa, o nível de metais pesados presentes num organismo independentemente da biodisponibilidade da forma química em que estes se encontram ou das condições ambientais, como a dureza da água, a temperatura, o pH e a salinidade, e que reconhecidamente afectam a toxicidade deste tipo de xenobióticos.

Nesta tese foi desenvolvido um método analítico para a determinação de metalotioneínas, que são proteínas envolvidas na defesa dos organismos contra os efeitos tóxicos de níveis excessivos de catiões de metais pesados e por isso servem de biomarcadores. O método foi posteriormente aplicado à análise de metalotioneínas em peixes, onde podem ser utilizadas como biomarcadores de exposição ambiental a catiões de metais pesados, podendo servir para biomonitorizar contaminações em rios por exemplo.

Referências Bibliográficas:

1. Abel, P.D., (1998). Water pollution biology, 21-23: 642-703.
2. Adams, S. Marshall. Bethesda, MD, (1990). Biological Indicators of Stress in Fish, American Fisheries Society.
3. Biomarkers' - Biochemical Indicators of Exposure, Response and Susceptibility to Chemicals, Published by Taylor & Francis.
4. Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, (1992). Edited by Robert J. Huggett, Richard A. Kimerle, Paul M. Mehrle, Jr. and Harold L. Bergman, Lewis Publishers.
5. Bottrill, K, (1998). The use of biomarkers as alternatives to current animal tests on food chemicals, ATLA, 26: 421-480.
6. Brooks, Butel, Ornston, (1995). Medical Microbiology, 20th ed., London, Appleton & Lang, Prentice Hall International.
7. Crotran, Kuman, Robbins, (1994). Pathologic Basis of Disease, 5th ed., New York, W.B. Saunders Company.
8. D.Mount, (1998), Ambient toxicity to assess biological impact, Advances in Environmental Science and Technology, 21: 237-246.
9. Geoffrey Zubay, (1993).Biochemistry, 3rd. Ed., London, W.M. C. Brown Publishers.
10. Grandjean, P., (1995). Biomarkers in epidemiology, Clinical Chemistry, 41: 1800-1803.
11. Greenwald, P, Wihin, KM Malone, W.F. Byar, DP, Freedman, LS, Stern, HR, (1992). The study of markers of biological effects in cancer prevention research trials, International journal of cancer, 52: 189-196.
12. Hattis, D, (1991). Use of biological markers and pharmacocinetics in human health risk assessment, Environmental Health perspectives, 90: 229-238.
13. Henderson, RF, Betchtoid, WE, Bond, J., Sun JD, (1989). The use of biological markers in toxicology, Critical Reviews of Toxicology, 20: 65-82.
14. Hulka, BS., Wilcosky, T., (1988). Biological markers in epidemiological research, Archives in environmental Health, 43: 83-89.
15. Lauwereys, RR, Hoet, P, (1993) Industrial Chemical exposure: Guidelines for biological monitoring, 2nd ed, 218pp, Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers.
16. Lehnert, G., Schaller, K-H, Angerer, J., (1999). Report pd the Status o the external quality control programme for occupational medical and environmental - medical toxicological analysis in biological materials in Germany, International Achieves of occupational and environmental Health, 72: 60-64.
17. Lupert Stryer, (1995). Biochemistry, 4th ed., New York, W.H. Freeman Company.
18. Nuclear Regulatory commission, (1987). Biological markers in environmental health research, Environmental health perspectives, 74: 3-9.
19. Nuclear regulatory commission, (1989). Biologic markers in reproductive toxicology, 40pp, Whashington, DC, USA, National Academy Press.
20. Pascoe, Edwards. Single species toxicity tests; Aquatic Ecotoxicology: fundamental concepts and methodologies, ed. Boudou and Ribeyre, vol 21, cap. 2.1: 93-126.
21. Prescott, L., Harley, J., Klein, D.; (1996). Microbiology, 3rd ed.,London, W.M.C. Brown Publishers.
22. Schulte, P, Mazzukelli, LF, (1991). Validation of biological markers for quantitative risk assessment, Environmental Health perspectives, 90: 239-246.
23. Setchell, KDR, Cassidy, A, (1999). Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health, Journal of Nutrition, 129: 758s-765s.

24. Sherlock, JC, (1995), Key issues in the use of biomarkers for assessing risk from food chemicals. In Biomarkers in Food Chemical risk assessment , pp 1-8, ed. HM Crews & AB Hanley), London, UK, Royal Society of Chemistry.
25. Taioli, E, Kinney, P., Zhitkovich, A, Fulton,H, Voitkin, V, Cosma, G, Frenkel, K, Toniolo, P, Garte, S, Costa, M, (1994). Application of reliability models to studies of biomarker validation, Environmental Health perspectives, 102: 306-309.
26. Talaro, K, Talaro, A., (1996). Foundations in Microbiology, 2nd ed., New York, W.C. Brown Publishers.
27. Toxic Contaminants and ecosystem Health: A great Lakes Focus, (1998). Advances in environmental and technology, ed. Evans M.S., 21: 247-256.
28. Vahrendorft, J, (1995). Design of studies for validation of biomarkers of exposure and their effective use in environmental epidemiology, Toxicology, 101: 82-92.
29. van Poppel, G, Verhagen, H, Heinzow, B. (1997), Biomarkers in epidemeiological and toxicological nutrition research, In food chemical risk analysis (ed DR Tennant), pp 87-105, Blackie academic and Professional press.
30. Ward, JB, Henderson, RE, (1996). Identification of needs in biomarker research, Environmental health perspectives, 104: 895-900.
31. Willet, W.C, (1991). The use of biomarkers in nutritional epidemiology, in biomarkers of dietary exposure, pp 9-14, ed. FJ Kok & P.van's Veer, London, UK, Smith-Gordon.
32. World Health Organization, (1993). Biomarkers and risk assessement: concepts and principles (environmental health criteria), nº 155, Geneva, Switzerland, WHO.


O
CH3
H3C
O

PARTE II

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA VOLTAMÉTRICO EM-LINHA PARA A BIOMONITORIZAÇÃO DE DIACETILO NA CERVEJA

As α-dicetonas são compostos usualmente associados a certos aromas característicos, encontrando-se presentes em virtualmente todos os alimentos fermentados. Dentro deste grupo de compostos, o diacetilo é o mais relevante atendendo ao seu característico aroma a manteiga/doce, que devido ao seu baixo limite de percepção sensorial pode frequentemente ser identificado nos alimentos fermentados, como nos derivados de lacticínios e nas bebidas alcoólicas, pois são produzidas elevadas quantidades relativas deste composto durante a fermentação.

A quantidade de diacetilo em bebidas alcoólicas como a cerveja e o vinho deve ter um controlo estrito, na medida em que este pode ter um efeito indesejável nas características organolépticas destes produtos [209]; no caso da cerveja o excesso de diacetilo é mesmo considerado um dos defeitos sensoriais críticos. Por esta razão, a determinação de diacetilo é particularmente importante na cerveja, sendo um dos mais importantes parâmetros a seguir no processo de fermentação e maturação; de tal forma que o final da fermentação é determinado apenas quando o valor de diacetilo no processo se encontra abaixo da especificação máxima que este pode ter para na cerveja final, constituindo portanto um biomarcador analítico de processo.

Na cerveja as principais α-dicetonas voláteis são o diacetilo e a 2,3-pentanodiona. O teor de α-dicetonas, correspondente à soma das concentrações desses dois compostos, tem sido utilizado também para o controlo do processo por razões históricas, uma vez que os métodos mais antigos não permitiam a separação dos compostos. E, embora esse valor tenha vindo a ser progressivamente substituído pelo valor do diacetilo, existem ainda fábricas que continuam a regular-se pelo valor das α-dicetonas.

Embora o diacetilo e a 2,3-pentanodiona sejam os compostos que do ponto de vista analítico interessa determinar, na verdade durante a fermentação a levedura não produz estas α-dicetonas mas antes os seus precursores, respectivamente o α-acetolactato e o α-acetohidroxibutirato. Estes precursores são contudo compostos altamente instáveis, que, por descarboxilação oxidativa, podem originar as respectivas dicetonas; daí que, antes de qualquer análise, seja necessário um passo de pré-conversão destes ácidos α-acetohidroxilados em dicetonas.

Apesar de haver vários métodos para a determinação de α-dicetonas, apenas dois são utilizados em larga escala pelos cervejeiros e adoptados pela "European Brewing Convention", constituindo portanto os seus métodos de referência. O primeiro, e o mais antigo, é um método espectrofotométrico que envolve um passo de destilação simples; o

segundo é um método de cromatografia em fase gasosa com detector de captura de electrões, que permite uma separação entre o diacetilo e a 2,3-pentanodiona. Estas α-dicetonas podem também ser determinadas por voltametria de adsorção com redissolução catódica, um método que pode constituir uma boa alternativa a outros métodos geralmente utilizados [117, 118].

Esta parte do trabalho foi divido em dois capítulos; o 1º capítulo começa com algumas considerações sobre a problemática de determinação voltamétrica em linha usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, prosseguindo com uma abordagem simples da detecção voltamétrica e terminando com a indicação das características e o modo de funcionamento do sistema em fluxo desenvolvido, e com a apresentação de exemplos simples de diferentes tipos de aplicações; no 2º capítulo é feita a optimização pormenorizada da detecção da 2,3-dimetilquinoxalina, que serve de base para o desenvolvimento de um equipamento para análise de diacetilo e α-dicetonas em linha baseado neste detector voltamétrico em fluxo.

Neste 2º capitulo descreve-se primeiro o desenvolvimento de um método "off-line" de determinação de α-dicetonas, utilizando o sistema de voltametria em fluxo descrito em pormenor no capítulo 1. Neste método as α-dicetonas são extraídas por destilação e derivatizadas com OFDA. As quinoxalinas resultantes são determinadas por voltametria de adsorção com redissolução catódica, utilizando um varrimento de potencial em onda quadrada com elevada frequência (> 100 Hz). Este tipo de varrimento permite um aumento significativo da razão entre a intensidade de corrente de redução da quinoxalina adsorvida e a intensidade de corrente de redução de oxigénio, possibilitando a determinação do composto adsorvido na presença do oxigénio. Com base no método descrito, foi possível desenvolver e construir um equipamento protótipo automático para a determinação em linha de diacetilo na cerveja [162, 163], conciliando a detecção voltamétrica em fluxo com EMGS com um processo de separação e derivatização em linha. A separação em linha é feita num módulo de pervaporação, no qual se efectuam a separação do diacetilo da restante matriz da cerveja e a reacção de derivatização simultaneamente. A estratégia utilizada para a automação do equipamento foi baseada numa rede de fluxo de multicomutação, tendo sido possível construir um equipamento com 2 módulos de pervaporação a trabalhar em paralelo, alimentando um único detector, o que permitiu obter uma cadência de análise de doze resultados por hora.

Quer o método "off-line" quer o método em linha foram aplicados com sucesso na determinação de diacetilo na cerveja em diversas fases de fabrico, nomeadamente, na fermentação, maturação e ainda na cerveja final. Verificou-se que os resultados obtidos pelos dois métodos voltamétricos em fluxo são concordantes com os obtidos utilizando os métodos de referência.

Por fim, foi desenvolvido um reactor de pré-conversão em linha, com o objectivo de tentar efectuar a análise de diacetilo em amostras vindas directamente das cubas de fermentação, permitindo assim a automatização completa do sistema de análise do diacetilo durante a fermentação/maturação da cerveja.

1. SISTEMA DE DETECÇÃO VOLTAMÉTRICA EM FLUXO USANDO UM ELÉCTRODO DE MERCÚRIO DE GOTA SUSPENSA

1.1. O Estado da Arte

O objectivo final do desenvolvimento de um método analítico é hoje em dia cada vez mais a sua possível utilização de forma automática com o mínimo de intervenção humana. Este objectivo é antes do mais limitado pelas potencialidades do equipamento e em especial do detector. A automatização dos processos e o desenvolvimento de detectores que possibilitem a análise em linha tem tido uma particular predominância nos últimos 40 anos e remete as técnicas que não são possíveis de automatizar cada vez mais para segundo plano, mesmo em certos casos em que estas demonstrem ter vantagens de sensibilidade.

Um exemplo que reproduz precisamente estas dificuldades é o caso do eléctrodo de gota de mercúrio, que permite a detecção de inúmeros compostos com sensibilidade e especificidade dificilmente obtidas por muitos outros detectores, quer electroquímicos quer espectroscópicos. No entanto, não existe até ao momento um detector electroquímico em fluxo com eléctrodo de gota de mercúrio fiável e que esteja disponível comercialmente, dadas as grandes dificuldades de fabrico e adaptação a postos polarográficos comerciais. Entre essas dificuldades podem-se apontar a necessidade de remoção do oxigénio das soluções, o que torna o processo de análise lento e mais complexo; a morosidade do varrimento de potencial das técnicas voltamétricas clássicas incompatível com a análise em condições de fluxo; a dificuldade que certas células já desenvolvidas apresentam na estabilização da gota de mercúrio em condições de fluxo não oferecendo reprodutibilidade quer na sua formação e sustentação; por fim, a dificuldade em acoplar o eléctrodo a sistemas de separação e preparação de amostras.

No trabalho apresentado é desenvolvido um detector voltamétrico em fluxo com eléctrodo de gota de mercúrio que permite ultrapassar as limitações indicadas, pelo que o seu uso pode ser muito competitivo em relação a outras metodologias.

1.1.1. Sistemas de fluxo existentes com eléctrodos de mercúrio de gota suspensa.

O desenvolvimento de um detector voltamétrico com eléctrodo de mercúrio para funcionamento em fluxo tem sido objecto de estudo nos últimos 30 anos, tendo vindo a ser resolvidos gradualmente diversos problemas de ordem química e técnica, com o aparecimento de soluções integradas que minimizam ou resolvem as dificuldades já descritas anteriormente.

O desenvolvimento do detector tem sido feito com três diferentes abordagens: o desenvolvimento de células de fluxo (I), o desenvolvimento de técnicas e equipamentos voltamétricos (II), e ainda o desenvolvimento de formas de suprimir a interferência do oxigénio (III).

O aumento da utilização de técnicas analíticas em fluxo levou, desde o seu início, ao desenvolvimento de detectores adequados. Por isso, não é de estranhar que já há muito tempo tenha surgido a ideia de aplicar o eléctrodo de gota de mercúrio a análises em fluxo, podendo-se citar, por exemplo, o trabalho publicado por Cahan et al [35] em 1969, em que é feita uma primeira descrição de um eléctrodo de gota de mercúrio a trabalhar em fluxo. Desde então é possível encontrar referências do desenvolvimento de diferentes modelos de células de fluxo [1, 48, 53, 64, 118, 179, 185, 214], algumas das quais chegaram mesmo ser produzidas por fabricantes de equipamentos como a 310 e a 340 da PAR® [2, 90, 147], a EFTA ("electrochemical flow through analyser") da Metrohm® [182, 183, 184], entre outras [73, 129, 154]. Contudo estas células sempre tiveram problemas que não permitiram que se impusessem como equipamentos comerciais, tendo sido apenas utilizadas em trabalhos de desenvolvimento. Estes detectores voltamétricos em fluxo, tanto podem ser células com o eléctrodo de gota de mercúrio incorporado como células de fluxo adaptáveis a eléctrodos de mercúrio comerciais. Nas células com eléctrodo incorporado a gota de mercúrio pode estar vertical de cima para baixo [205], invertida [69] ou horizontal [69], mas de uma forma geral em todos os casos há dificuldades na sustentação e reprodutibilidade da formação da gota de mercúrio, o que tem sido o maior problema no desenvolvimento deste tipo de eléctrodos. Foi precisamente para ultrapassar este problema que surgiram células de fluxo adaptáveis aos eléctrodos de gota de mercúrio comerciais [6, 25, 43, 45, 71, 82,

148, 152, 179, 180], em que os resultados menos satisfatórios se ficam a dever mais à própria configuração e arquitectura da célula do que à reprodutibilidade na formação da gota. Estes e outros detectores [3, 4, 38, 39, 113, 116, 124, 126, 133, 166, 204] são efectivamente células de fluxo de baixo volume, bem diferentes de outras soluções que não passam de automatizações e adaptações de células polarográficas convencionais em "batch" com enchimento e esvaziamento automatizado [26, 58, 59]. De referir, por último, que outra das dificuldades encontradas com muitos dos eléctrodos era a sua não adaptabilidade e falta de estabilidade para uso com técnicas de pré-acumulação, não permitindo o grande aumento da sensibilidade que geralmente se consegue com estas técnicas.

Para além das dificuldades na obtenção das interfaces entre o eléctrodo e o sistema de fluxo, também o equipamento de que se dispunha há 20 anos atrás era muito pouco adaptado à analise voltamétrica em fluxo. Embora as técnicas voltamétricas actualmente mais utilizadas já estivessem desenvolvidas muito antes dos anos 80 do último século, a maior e decisiva evolução dos equipamentos com controlo potenciostático digital só surgiu nos finais dos anos 80, e a sua divulgação só se verificou na década seguinte. Este factor é mais importante do que parece à primeira vista; de facto, apesar de algumas das células poderem ter alguma capacidade para utilização em fluxo, a própria passagem do fluxo provocava interferências significativas, dada a lentidão com que o varrimento de potencial era feito; a vulgarização do uso de técnicas anteriormente dificilmente disponíveis, como a voltametria de onda quadrada e outras técnicas de varrimento de potencial a elevada velocidade, criou condições para que este tipo de problema pudesse vir a ser ultrapassado.

O desenvolvimento de formas de evitar a interferência do oxigénio era outro requisito para se poder utilizar o eléctrodo de gota de mercúrio, tal como acontece também com outros eléctrodos. A solução aparentemente mais simples é a construção de um sistema o mais estanque possível à entrada de oxigénio e a purga das soluções antes de entrarem no sistema de fluxo; é, no entanto, uma solução muito pouco prática, que não nunca teve grande êxito. Outras maneiras propostas para reduzir a interferência do oxigénio em solução foram a sua eliminação física, a sua transformação química e ainda a redução da sensibilidade relativa do eléctrodo para o oxigénio.

A remoção física do oxigénio pode ser feita por passagem através de tubos permeáveis ao oxigénio colocados sob pressão reduzida [196] ou imersos em soluções desoxigenadas [39, 43, 107, 154, 165, 193], por difusão do oxigénio através de uma membrana [175] ou ainda por remoção do oxigénio por processos de neublização/atomização em linha [205, 213]. A reacção do oxigénio com agentes redutores dando origem a espécies não electroactivas no eléctrodo de mercúrio é uma outra solução para remover quimicamente o oxigénio [125, 166], podendo-se encontrar ainda outras formas de o eliminar, como processos fotoquímicos [19] ou electrolíticos [42, 83]. Por fim, uma forma completamente diferente de diminuir ou mesmo eliminar a interferência do oxigénio é reduzir a sensibilidade relativa do eléctrodo para o oxigénio em comparação com as espécies a analisar, o que é possível, em certos casos particulares, com o recurso a varrimentos de potencial a velocidade elevada e com tempos de amostragem muito curtos. É o que sucede no caso da análise de espécies que são rápida e reversivelmente redutíveis no eléctrodo de mercúrio, aproveitando o facto de a reacção de redução do oxigénio ser irreversível e relativamente lenta. Ao contrário do que sucede com essas espécies o aumento do sinal de redução do oxigénio com a frequência é pequeno a elevadas frequências [208], tornando-se progressivamente menos importante e mesmo negligenciável face ao sinal dos analitos que se pretende determinar. Este comportamento é observado por Barros et al [22] na determinação de concentrações de 2,3-DMQ superiores a 10^{-7} M, em que o sinal do oxigénio deixa de constituir uma interferência para frequências superiores a 100 Hz. A escolha do método de redução da interferência do oxigénio deve contudo ser bem equacionado dado que algumas das soluções propostas demonstraram ter limitações importantes, em especial quando se pretendem determinar compostos orgânicos, que podem facilmente ser adsorvidos, reagir ou sofrer interferências, como consequência da aplicação de determinados destes métodos de remoção física ou química do oxigénio. Alguns exemplos são a reacção com os agentes redutores utilizados na remoção do oxigénio, a adsorsão à superfície dos materiais porosos como o silicone, a degradação ou ainda a alteração fotoquímica dos analitos conjuntamente com a remoção do oxigénio.

1.2. Detecção voltamétrica

1.2.1. Voltametria e polarografia

A voltametria engloba uma grande variedade de técnicas electroquímicas, caracterizadas pela medição da intensidade de corrente em função do potencial que é aplicado a um eléctrodo. Quando existem em solução espécies químicas electroactivas, isto é, capazes de ser reduzidas ou oxidadas, estas reagem à superfície do eléctrodo se for aplicado um varrimento de potencial adequado, originando um fluxo de electrões que pode permitir a sua quantificação. O processo electroquímico é portanto controlado pelo potencial aplicado ao eléctrodo, denominando-se voltamograma à representação que relaciona o potencial aplicado e a intensidade de corrente detectada.

Historicamente, a voltametria desenvolveu-se a partir da polarografia, um tipo particular de voltametria inventado pelo químico Checoslovaco Jaroslav Heyrovsky no início dos anos 20.

A polarografia, que é ainda hoje um ramo importante da voltametria, caracteriza-se pela utilização de um eléctrodo de mercúrio gotejante. Este eléctrodo, de construção e propriedades únicas, apresenta várias vantagens, das quais se destacam:

1. Boa condutibilidade do mercúrio.
2. Superfície lisa (sem irregularidades) e continuamente renovada, possibilitando um comportamento regular do eléctrodo. A natureza de uma superfície estática, pelo contrário, é susceptível de alteração com o uso, o que se reflecte negativamente no voltamograma resultante.
3. Formação de gotas reprodutíveis com área de superfície uniforme, extremamente importante para a exactidão e precisão dos resultados.
4. Possibilidade de obtenção de gotas muito pequenas, de área de superfície reduzida (na ordem dos mm^2), o que favorece a polarização do eléctrodo, condição essencial para a medição da intensidade de corrente.
5. Sobrevoltagem invulgarmente alta associada à redução dos iões hidrogénio (H^+) na superfície do mercúrio, o que permite a utilização do eléctrodo a potenciais bastante catódicos; por exemplo, há muitos compostos orgânicos e organometálicos que só desta forma podem se electroquimicamente

determinados, pois os seus potenciais redução estão fora da janela de potencial de outros eléctrodos.

Actualmente os eléctrodos de mercúrio têm vindo a ser progressivamente mais utilizados no modo de gota suspensa, o que permite manter e em certos casos mesmo melhorar as características deste tipo de eléctrodo e ao mesmo tempo reduzir o consumo de mercúrio para níveis substancialmente inferiores (uma análise por gota).

A voltametria tem vindo a ter ao longo da história um percurso relativamente sinuoso, sendo uma técnica largamente difundida até aos anos 50, caindo posteriormente de popularidade, voltando a recuperar divulgação como técnica analítica desde meados dos anos 80. Esta recuperação deve-se essencialmente a dois factores curiosamente trabalhados e desenvolvidos na época de esmorecimento da técnica; por um lado, foram desenvolvidas novas técnicas voltamétricas, como as técnicas com varrimento de potencial por impulsos e de pré-concentração, que permitiram ganhos significativos de sensibilidade; por outro lado, o advento da electrónica permitiu a construção de equipamentos comerciais relativamente simples, confiáveis e de preço acessível. Na sequência destes desenvolvimentos, tem sido crescente o interesse da aplicação dos métodos voltamétricos à química analítica.

Os instrumentos voltamétricos modernos são essencialmente constituídos por três partes: a célula voltamétrica, o sistema potenciostático e um computador pessoal com software de controlo. A célula voltamétrica, onde ocorre a reacção electroquímica, é geralmente constituída por três eléctrodos, mergulhados na solução a analisar: o eléctrodo de trabalho, ao qual é aplicado o varrimento de potencial e onde ocorre a reacção electroquímica que se pretende detectar, o eléctrodo de referência e o contra-eléctrodo ou eléctrodo auxiliar, constituído por um material condutor e quimicamente inerte, como a platina ou carbono vítreo. O potenciostato, ao qual se encontra ligada a célula voltamétrica, é o sistema que aplica o potencial e mede a intensidade de corrente, podendo ainda existir associado a este sistema um controlador do eléctrodo. Os dados de potencial aplicado e intensidade de corrente medida podem ser exportados do potenciostato para um computador. Actualmente, existe software que permite programar todo o procedimento voltamétrico, incluindo o tratamento de dados.

1.2.2. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas voltamétricas de varrimento de potencial por impulsos. Neste tipo de voltametria a forma de variação do potencial pode ser descrita como a soma de uma variação em escada com uma onda quadrada (Figura II-1).

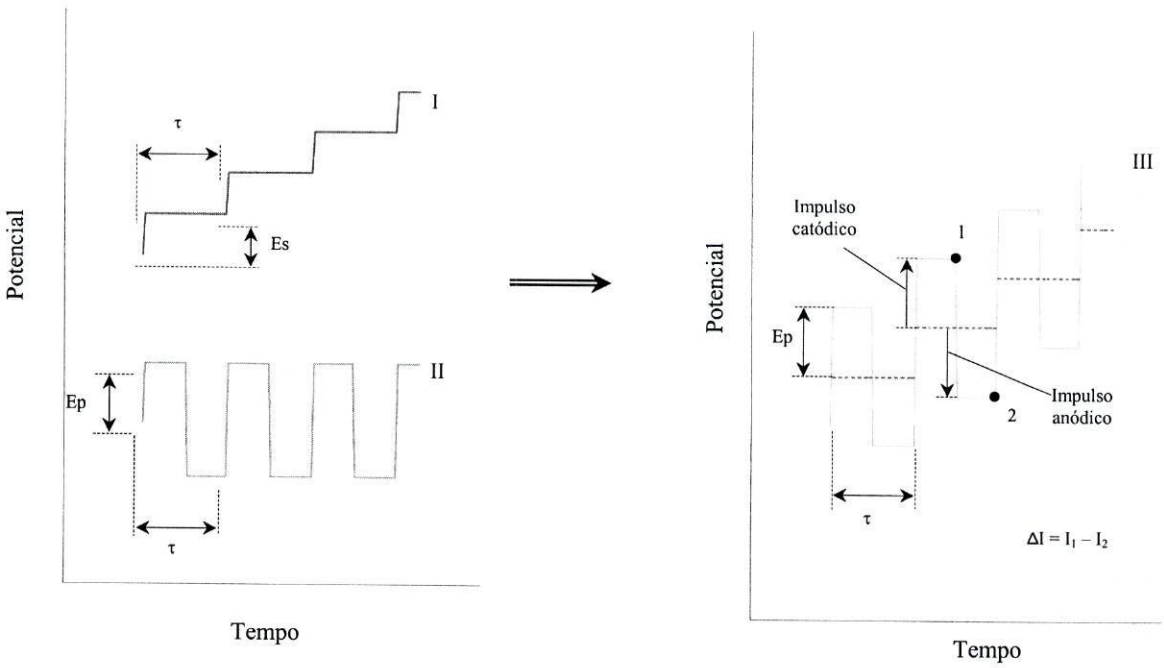


Figura II-1. Função de onda para voltametria de onda quadrada. I - Varrimento de potencial em escada; II - Série de impulsos em onda quadrada; III - Variação do potencial aplicado com o tempo; E_{step} – Amplitude do degrau; $E_{ampl.}$ – Amplitude do impulso; τ – Período.

O voltamograma de uma espécie electroactiva tem a forma de um pico (figura II-2), traduzindo a variação da diferença de intensidade de corrente entre dois pontos da onda quadrada (I_1 e I_2) em função do potencial (Figura II-1). Numa reacção de redução reversível, o produto formado durante o impulso catódico é oxidado durante o impulso anódico, obtendo-se uma corrente catódica devida à redução (positiva) e também uma corrente anódica (negativa) resultante da oxidação. Dado que estas correntes possuem sinais contrários, a altura do pico voltamétrico obtido corresponde à soma de ambas as intensidades de corrente, o que torna a voltametria de onda quadrada ainda mais

sensível. No caso do equipamento usado neste trabalho (PGSTAT 10 da Eco Chimie), o software GPES 4.4 acoplado ao potenciostato, impõe uma amostragem da intensidade de corrente na segunda metade do impulso, pelo que o uso de frequências mais elevadas implica tempos de amostragem cada vez mais curtos e próximos do momento da aplicação do impulso.

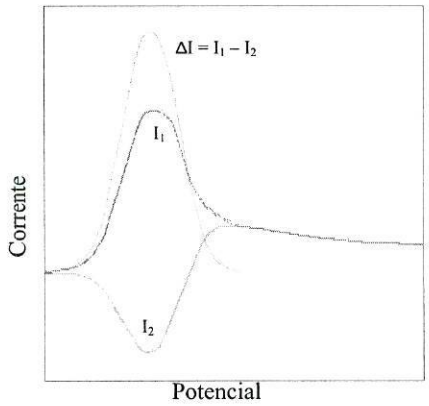


Figura II-2. Voltamograma obtido por voltametria de onda quadrada para um processo reversível (com adsorção do analito). É evidente o efeito amplificador da existência de duas correntes, uma catódica (I_1) e outra anódica (I_2), no sinal final obtido (ΔI).

1.2.3. Técnicas voltamétricas com pré-acumulação

O uso do eléctrodo de mercúrio de gota suspensa em electroanálise está actualmente muito associado ao uso de técnicas de pré-concentração, o que permite atingir-se limites de detecção e quantificação extremamente baixos. Nestas técnicas a análise voltamétrica ocorre em dois passos essenciais. No primeiro, há deposição do analito no eléctrodo; no segundo, ocorre o varrimento voltamétrico que conduz à remoção electroquímica do composto depositado no eléctrodo. Na voltametria de redissolução anódica a deposição é catódica e a remoção é feita por varrimento anódico; na voltametria de redissolução catódica passa-se o contrário.

1.2.3.1. Voltametria de redissolução com adsorção

Na voltametria de redissolução com adsorção, a pré-acumulação das espécies à superfície do eléctrodo é feita por adsorção podendo a redissolução ser anódica ou catódica, dependendo das características das espécies.

A adsorção é um fenómeno de interacção física, não implicando qualquer reacção química nem de transferência de carga entre o eléctrodo e a espécie. É um processo dependente do potencial aplicado ao eléctrodo, das condições do meio e do tempo de duração da deposição, condições que devem ser optimizadas aquando do desenvolvimento de um metodologia analítica. A resposta analítica é proporcional à concentração do analito na solução, desde que não ocorra saturação do eléctrodo.

Como a espécie adsorvida se encontra numa camada imediatamente adjacente à superfície do eléctrodo, está imediatamente disponível para reagir; por isso, o mecanismo de transporte de massa da espécie durante a reacção electroquímica é independente do transporte por difusão, pelo que a reacção da espécie adsorvida é extremamente rápida. Note-se que o passo de pré-acumulação é geralmente efectuado com agitação, por forma a aumentar a eficiência do processo, uma vez que desta forma se mantém constante a concentração do analito na solução junto ao eléctrodo ao longo de todo este passo.

1.2.3.2. Voltametria de redissolução anódica

Este tipo de voltametria é usado essencialmente na determinação da concentração de catiões metálicos, que podem ser pré-concentrados por redução aos respectivos metais, desde que estes possam formar amálgamas com o mercúrio. No passo de deposição do metal, o potencial é colocado a valores suficientemente catódicos para permitir a redução dos catiões metálicos a metal, que se dissolve no mercúrio formando uma amálgama. Quanto maior a sensibilidade requerida, maior é o tempo de deposição necessário. No passo de redissolução, é feito um varrimento anódico. De notar que, ao contrário do que sucede na voltametria de adsorção, a reacção de redissolução envolve mecanismos de transporte de massa mais complexos e lentos, uma vez que o metal tem que difundir do interior da gota para a superfície. Daí, que neste tipo de técnica não ser tão benéfico o aumento da velocidade de varrimento de potencial como no caso da voltametria de adsorção.

1.2.3.3. Voltametria de redissolução catódica

No caso mais vulgar deste tipo de voltametria os compostos a analisar reagem quimicamente com o eléctrodo de mercúrio formando sais insolúveis com o catião dimercúrio (I). Neste caso procede-se à oxidação intencional do próprio eléctrodo de mercúrio, por aplicação de um potencial suficientemente positivo. O catião dimercúrio

(I) formado à superfície do eléctrodo vai reagir com aniões como o cloreto ou o iodeto, por exemplo, formando um filme dos correspondentes sais. O passo de redissolução consiste num varrimento catódico para reduzir o sal depositado tornando-o novamente solúvel. As espécies determináveis por esta técnica são, pois, aniões cujos sais de dimercúrio são muito insolúveis.

1.2.4. Voltametria de onda quadrada de elevada frequência associada a técnicas de pré-acumulação.

1.2.4.1. Aumento da sensibilidade e da rapidez da análise

O aparecimento de equipamentos com controlo digital da geração do potencial veio permitir a introdução de técnicas voltamétricas com varrimento rápido de potencial. Essas técnicas possibilitaram o desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a sensibilidade da analise voltamétrica, na medida em que, de uma forma geral, quanto maior a velocidade de varrimento ou menor o tempo de medição após a aplicação do impulso, maior é o ganho de sinal [173]. Quando se utiliza o eléctrodo de mercúrio este facto é ainda mais evidente quando a espécie se encontra pré-concentrada à superfície do eléctrodo, adsorvida por exemplo, pois desta forma está imediatamente disponível para redução/oxidação, sendo nestes casos um processo electroquímico não exclusivamente dependente da difusão do analito desde o seio da solução [155].

O eléctrodo de mercúrio de gota suspensa apresenta características óptimas em termos de discriminação da corrente capacitiva, associadas a técnicas de varrimento de potencial por impulsos, o que o torna particularmente apto para utilização em técnicas voltamétricas de elevada velocidade, como a voltametria de onda quadrada de elevada frequência. A rápida queda da corrente capacitiva que ocorre neste eléctrodo [22], permite aproximar a aquisição de dados do momento da aplicação do impulso sem que ocorra uma interferência significativa desta corrente, podendo-se desta forma quantificar a reacção electroquímica mais próxima do seu início e eventualmente mais perto da sua velocidade máxima.

Quando se utiliza voltametria com pré-acumulação e varrimentos de potencial em onda quadrada de elevada frequência, é possível no caso de compostos cuja reacção é quasi-reversível, um aumento significativo da intensidade de corrente; de facto, como o composto se mantém à superfície do eléctrodo quer na sua forma oxidada como

reduzida, obtém-se uma soma efectiva das componentes catódica e anódica das intensidades de corrente, como se pode observar na figura II-2, o que está de acordo com o defendido por Lovric e Komorsky-Lovric [123] e por O'Dea e Osteryoung [155]. O aumento da frequência permite menores tempos de amostragem do sinal; ou seja, a integração dá-se mais perto do momento da aplicação do impulso de potencial, obtendo-se um aumento do sinal, de acordo com o previsto por Lovric e Komorsky-Lovric et al [112], e observado por diversos autores [5, 22, 68, 72, 73, 106, 164, 216]. Esta técnica oferece ainda uma vantagem adicional especialmente adequada a sistemas em fluxo, uma vez que o varrimento rápido do potencial permite que o voltamograma possa ser obtido em milisegundos.

1.2.4.2. Eliminação do passo de desoxigenação

A principal desvantagem do uso de voltametria para determinação de espécies por redução é a necessidade de se ter de remover o oxigénio. Consequentemente, seria de grande vantagem se se pudesse reduzir ou mesmo eliminar este requisito. Como já foi referido anteriormente, têm sido desenvolvidas técnicas para automatizar o passo de remoção do oxigénio envolvendo a sua remoção física ou química da solução a analisar. Contudo, o uso de voltametria de onda quadrada de elevada frequência permite analisar certos compostos mesmo na presença do oxigénio sem que este interfira na determinação, aproveitando o facto de a reacção de redução do oxigénio ser irreversível e relativamente lenta. Neste caso, o aumento do sinal de redução com a frequência é pequeno [208], tornando-se progressivamente menos importante e mesmo negligenciável face aos analitos que se pretendem determinar, desde que a redução destes seja rápida e reversível. Este comportamento é observado por Barros et al [22] na determinação da 2,3-DMQ (10^{-7} M), em que o sinal do oxigénio deixa de constituir uma interferência para frequências superiores a 100 Hz, podendo-se fazer determinações analíticas mesmo na sua presença.

1.3. Características e funcionamento do sistema

1.3.1. Configuração da célula voltamétrica de fluxo

Neste capítulo é apresentado um novo modelo de célula voltamétrica de fluxo que foi desenvolvido de modo a poder ser aplicado ao eléctrodo de mercúrio de gota suspensa

(EMGS) do posto de polarografia 663VA da Metrohm®, e que não apresenta os problemas observados em outros detectores voltamétricos de fluxo propostos por outros investigadores. Com esta nova célula de fluxo, e utilizando voltametria de onda quadrada de elevada frequência, não é necessário qualquer dispositivo de desoxigenação [21, 162, 163, 179]. Esta célula de fluxo, apresentada em esquema e em foto na figura II-3, contém importantes modificações em relação a outras versões, e é constituída por um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, por um injector e por um vaso de suporte contendo o electrólito.

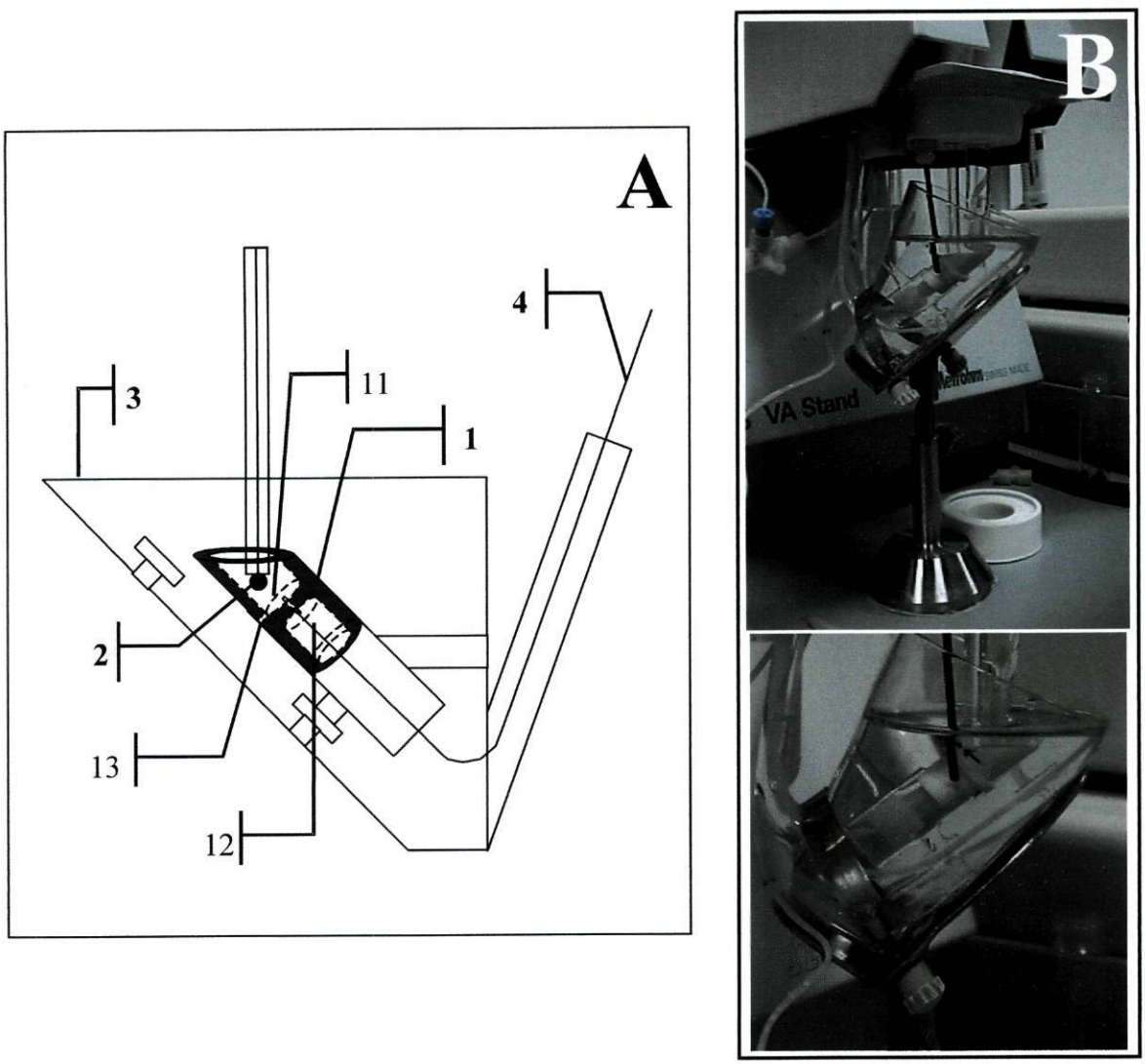


Figura II-3. A: Esquema da célula de fluxo para eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. 1-Injector, 11-cavidade de injecção, 12- conector para o tubo de transporte, 13- Orifício para queda da gota de mercúrio; 2- gota de mercúrio suspensa, 3- célula de vidro; 4- tubo de transporte. B: Fotos da célula voltamétrica montada num posto Metrohm®.

Embora não seja necessário desmontar o sistema entre análises, este é extremamente simples de montar, sendo apenas necessário baixar o capilar com a gota de mercúrio de tal forma que a ponta deste se adapte na cavidade existente no injector. Este injector encaixa numa guia, feita por um tubo de vidro que se encontra fixo com um angulo de 45° à célula de vidro.

Na figura II-4, estão representados os três modelos de injector propostos para o sistema e que estão em fase de patenteação [63, 162]. Como se pode observar, existe um certo espaço livre na cavidade entre o capilar e o injector, o que permite minimizar variações de caudal, com o consequente aumento da repetibilidade das determinações. Os injectores são fabricados em teflon (PTFE) e existe na parte mais baixa da cavidade de injecção um orifício para o exterior, para saída e recolha das gotas de mercúrio.

A célula de vidro, que está montada num suporte metálico (Figura II-3B) e na qual se encontram mergulhados os três eléctrodos, é cheia com uma solução de electrólito de composição igual à do eluente. Um tubo de escoamento a trabalhar em sucção permite um funcionamento tipo sifão, mantendo constante o nível da solução durante o trabalho.

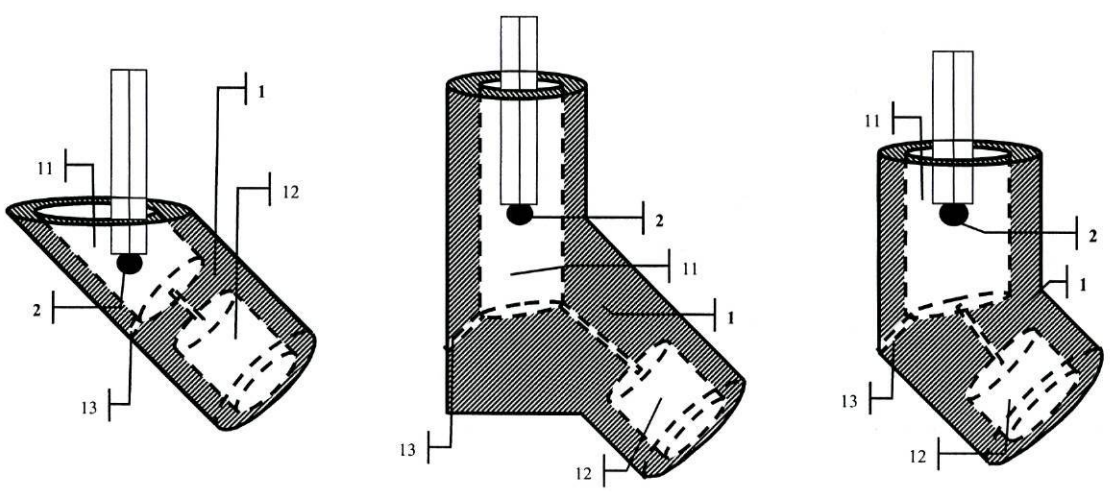


Figura II-4. Esquemas dos injectores patenteados para o sistema de fluxo desenvolvido. 1- Injector Voltamétrico, 11- Cavidade de Injecção, 12- Fêmea, para ligação do tubo, 13- Orifício para queda da gota de mercúrio, 2- Gota de mercúrio suspensa.

1.3.2. Configuração do sistema de fluxo

O sistema análise por injecção em fluxo, consiste numa bomba peristáltica Gilson® Minipuls 2 (Villiers Le Bel, France), utilizando tubo de PVC de 1,52 mm de diâmetro interno. O tubo de transporte é em PTFE com 0,8mm de diâmetro interno e 1,6 mm de diâmetro externo. A injecção das amostras é efectuada por uma válvula de injecção de 4 vias da Rheodyne®, modelo 5041, montada com um "loop" de volume variável consoante a aplicação.

O equipamento voltamétrico utilizado é um Autolab® PGSTAT 10 (EcoChimie®, Utrech, Netherlands), controlado por PC com o software GPES® para Windows™ – Versão 4.4, em que a amostragem da corrente é feita nos últimos 20ms do impulso se durar mais de 40ms, ou na última metade se este durar menos de 40ms. É utilizado um posto de polarografia Metrohm® 663VA, com o eléctrodo de mercúrio no modo de SMDE ajustado para um tamanho de gota de 2 e com eléctrodos auxiliar e de referência respectivamente de carbono vítreo e de AgCl/Ag (3M KCl).

O esquema da montagem do sistema em fluxo pode ser observado na figura II-5, sendo de realçar a existência de 3 sistemas independentes, um para carregamento da amostra no "loop", um para a injecção da amostra no circuito de detecção e um último para sucção do electrólito em excesso da célula voltamétrica.

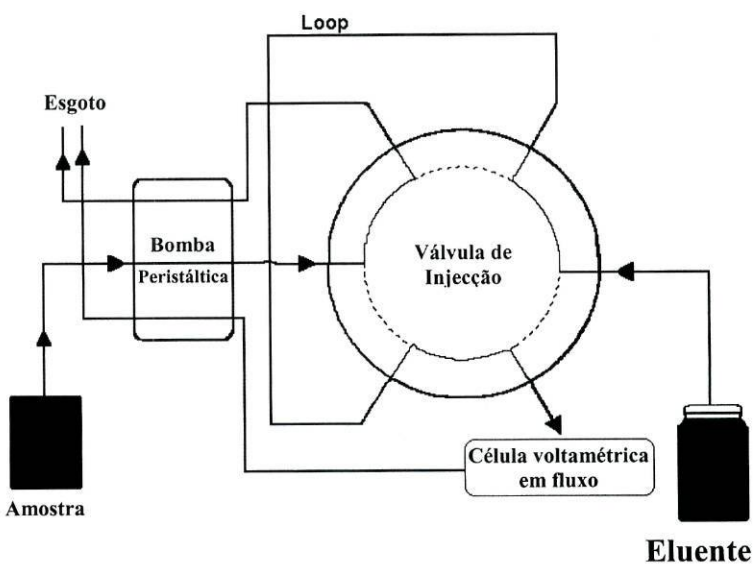


Figura II-5. Esquema do sistema de injecção em fluxo utilizado com a célula voltamétrica em fluxo

A análise voltamétrica com o sistema de fluxo é feita de acordo com os passos seguintes:

1. Carregamento da amostra no "loop"
2. Injecção da amostra na célula de fluxo
3. Detecção da amostra
4. Limpeza do circuito de injecção com o eluente

Geralmente cada um destes ciclos demora aproximadamente 2, minutos para um "loop" de 500μL, e um caudal de 1,33 mL/min.

1.3.3 Esquema de funcionamento do sistema

Na célula voltamétrica de fluxo apresentada, a amostra é transportada para o eléctrodo por um sistema do tipo FIA ("flow injection analysis") e analisada quando chega ao eléctrodo. Dado que no final do fluxo existe uma cavidade semi-fechada, o líquido que lá chega tem sempre tendência para sair, pelo que esta construção evita a interferência na análise de compostos existentes no electrólito suporte. Contudo a manutenção das características do electrólito ao longo do tempo é importante, devendo optar-se, se possível, por dar a mesma base de composição ao eluente e à amostra, em especial no que diz respeito ao pH e à força iónica.

O electrólito poderá ainda constituir um parâmetro de desenvolvimento da aplicação, na medida em que o aumento da condutividade da solução, feito por exemplo através do aumento da força iónica, permite reduzir, em certos casos significativamente, a corrente capacitiva e acelerar a sua queda após a aplicação do impulso, permitindo a obtenção de linhas de base mais estáveis e de sinal mais baixo mesmo para frequências elevadas.

Em termos de varrimento voltamétrico este sistema é particularmente adaptado para uso com técnicas voltamétricas com varrimento de potencial a elevadas velocidades, como a voltametria de onda quadrada a elevadas frequências, geralmente superiores a 100-150Hz, necessárias para que o oxigénio deixe de constituir interferência. Existe, porém, a necessidade de os compostos terem de estar disponíveis para rapidamente reagirem electroquimicamente, sendo ainda ideal que esta reacção seja o mais reversível possível.

A elevada velocidade do varrimento possibilita ainda que a análise seja instantânea, não sendo necessário paragem do fluxo e não ocorrendo interferências por parte deste no voltamograma, dentro de limites de caudais razoáveis (até cerca de 4mL/min). A medição é portanto pontual e não contínua, pelo que é necessária uma sincronização precisa entre a injecção e a detecção.

Neste tipo de voltametria de elevada velocidade de variação de potencial a componente de corrente de difusão é mínima, pois a aquisição de dados dá-se antes que ocorra este tipo de transporte de massa, pelo que é necessário que haja uma pré-acumulação da espécie no eléctrodo, mesmo que a duração deste passo seja curta. Tal como nos processos em "batch", também é possível utilizar em fluxo qualquer uma das três técnicas de pré-acumulação referidas anteriormente, embora possa haver diferenças nas características particulares de cada aplicação. Por exemplo, verifica-se que a voltametria de adsorção é particularmente sensível e adaptável a este sistemas, mas exige cuidados especiais durante a acumulação, que têm a ver com a cinética de adsorção e com a reversibilidade do processo.

No caso das voltametrias de redissolução catódica e anódica, não há problemas na remoção da espécie do eléctrodo uma vez que a passagem do eluente sem a espécie, depois da passagem da amostra, não altera a quantidade de espécie acumulada no eléctrodo; daí que o maior cuidado a ter se prenda com uma boa sincronização entre a injecção da amostra e o momento da análise.

No caso de se utilizar adsorção é necessário ter em atenção que este fenómeno poderá ser reversível, sendo preferível o uso de uma injecção que permita a existência durante alguns segundos de um patamar de concentração da espécie a analisar no eléctrodo. Deste modo obtém-se uma adsorção constante e máxima, permitindo melhorias de sinal. A existência do patamar permite ainda aumentar a repetibilidade da determinação, uma vez que há uma maior margem de manobra na sincronização da análise e de injecção. Na prática, o aumento do patamar pode ser obtido por redução da distância da válvula de injecção ao eléctrodo ou por aumento do volume do "loop" que contém a amostra a injectar.

1.4. Exemplos de aplicação do sistema desenvolvido.

O sistema voltamétrico em fluxo desenvolvido foi aplicado por forma a comprovar as suas potencialidades na detecção em fluxo de compostos químicos de natureza distinta, nomeadamente compostos orgânicos, organometálicos e inorgânicos. Nas aplicações foram utilizados os três tipos de pré-acumulação anteriormente referidos, confirmando-se o que se tinha dito em relação à aplicabilidade do eléctrodo.

Na apresentação que se segue não se faz uma descrição exaustiva das aplicações, mas tão somente se procura evidenciar e caracterizar as potencialidades de utilização do eléctrodo de fluxo desenvolvido. As optimizações efectuadas restringem-se a aspectos instrumentais e hidrodinâmicas, tendo as restantes condições sido adaptadas da bibliografia.

O sistema e o equipamento utilizado são os já referidos anteriormente, com a detecção a dar-se no patamar de chegada da amostra ao eléctrodo. A preparação da amostra para injecção é feita "off line" por diluição dos padrões no meio tampão utilizado como eluente e eléctrolito.

1.4.1. Determinação por voltametria com adsorção

1.4.1.1 Detecção de riboflavina

A riboflavina, conhecida como vitamina B2, é um co-factor essencial para o funcionamento celular, e está envolvida numa série de vias metabólicas como a respiração oxidativa responsável pelo fornecimento celular de energia. Pertence ao grupo das vitaminas hidrossolúveis, e devido ao seu tom amarelo intenso é também utilizada como corante.

A riboflavina é constituída por uma ribose ligada a uma flavina, que é o grupo responsável pelas reacções de carácter electroquímico. É precisamente devido à facilidade com que se dão as transferências de electrões nesta molécula, que esta possui relevância biológica em reacções envolvendo transferência de carga.

A riboflavina pode ser determinada recorrendo à voltametria com adsorção num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, uma vez que é um composto electroactivo e que facilmente adsorve à superfície do eléctrodo [61].

Condições de análise utilizadas

As condições utilizadas para a determinação de soluções padrão de riboflavina em fluxo foram as seguintes:

Hidrodinâmicas:

"loop" de 1500 μL.

Caudal de 1,33 ml min^{-1}.

Patamar de concentração 5-55 s.

Físicas e Químicas:

Tampão fosfato 0,2M, pH=7.

Tempo de acumulação (adsorção) 50 s.

Instrumentais e Voltamétricas:

Voltametria de onda quadrada, frequência de 1000 Hz.

t_{lag}= 5s; E_{ac}= -0,3V

E_i= -0,3V; E_f= -0,8V; E_{step}= 1,95 mV; E_{ampl}= 30 mV.

Stand 663VA no modo SMDE com tamanho de gota 1.

Características do método

A redução da riboflavina adsorvida no eléctrodo de mercúrio é muito rápida, o que permite o uso de elevadas frequências de varrimento, e que neste exemplo foi de 1000Hz. Como se pode observar na figura II-6, o pico voltamétrico apresenta uma boa definição, sobretudo se se tiver em consideração a elevada frequência utilizada.

A curva de calibração obtida na determinação voltamétrica em fluxo da riboflavina pode ser representada por um polinómio de 2º grau, com um erro relativo inferior a 2%; o limite de detecção é da ordem dos $2x10^{-8}$ M.

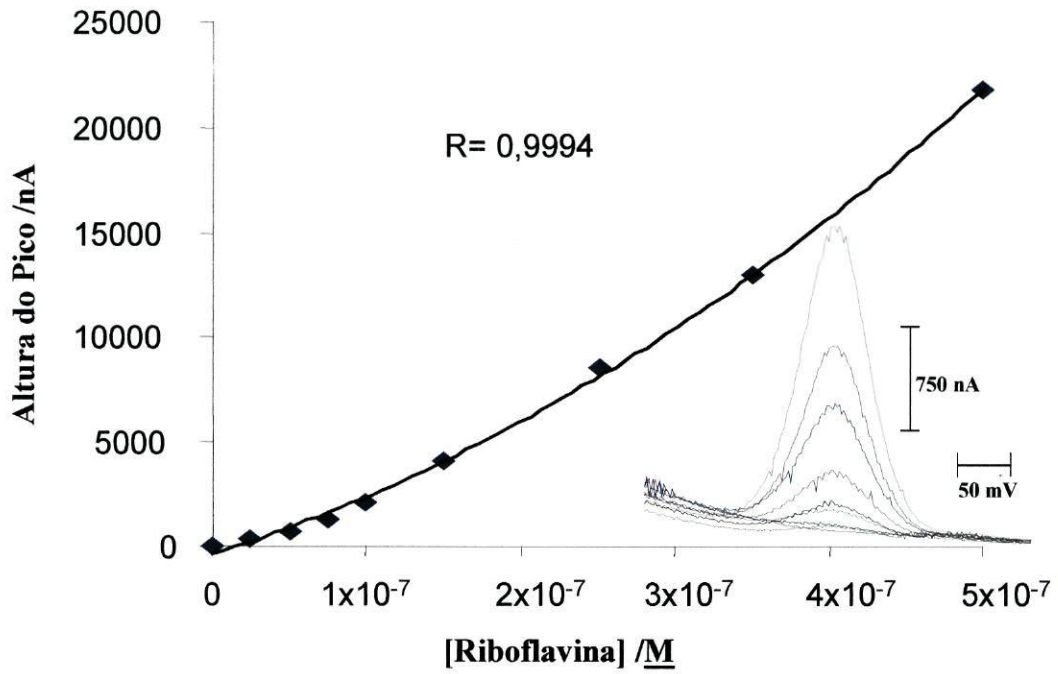


Figura II-6. Curva de calibração para a riboflavina em tampão fosfato 0,2M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 1000 Hz de frequência e 50s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida.

1.4.1.2.Detecção de azorubina (carmosina)

A azorubina, também conhecida como carmosina, é um corante monoazóico de cor vermelha, muito utilizado na indústria alimentar e farmacêutica, registado como E122 pelo código de aditivos alimentares da União Europeia.

A determinação de corantes azóicos, incluindo a azorubina, por voltametria com adsorção apresenta vantagens em relação a outros métodos, sendo possível determinar alguns destes corantes com limites de detecção extremamente baixos [67].

Condições de análise utilizadas

As condições utilizadas para a determinação de azorubina em fluxo, foram as seguintes:

Hidrodinâmicas:

"loop" de 1500 μL.

Caudal de 1,33 ml min^{-1}.

Patamar de concentração 5-55 s.

Físicas e Químicas:

Tampão amoniacal 0,1M, pH=9.

Tempo de acumulação (adsorção) 30 s.

Instrumentais e Voltamétricas:

Voltametria de onda quadrada, frequência de 300 Hz.

t_{lag}= 10s; E_{ac}= -0,35V

E_i= -0,35V; E_f= -0,8V; E_{step}= 1,05 mV; E_{ampl}= 4,95 mV.

Stand 663VA no modo SMDE com tamanho de gota 2.

Características do método

A azorubina também reage rapidamente à superfície do eléctrodo de mercúrio uma vez adsorvida embora não se observe uma cinética de reacção tão rápida neste caso como no anterior com a riboflavina. Na figura II-7, está representada a curva de calibração da azorubina em tampão amoniacal bem como os respectivos voltamogramas. Verifica-se que neste caso o limite de detecção (LD) é bastante baixo, $2x10^{-9}$M, com picos mais bem definidos; no entanto, erro relativo é de cerca de 5%, valor superior ao obtido no caso anterior.

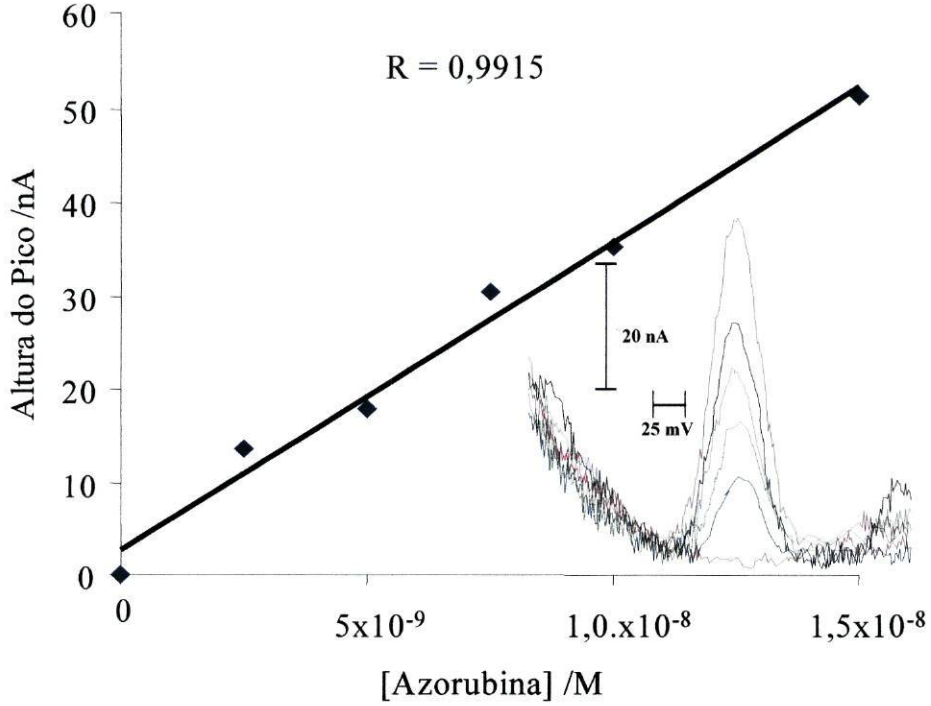


Figura II-7. Curva de calibração para a azorubina (carmosina) em tampão amoniacal 0,1M, pH 9, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, utilizando voltametria de onda quadrada a 300 Hz de frequência e 30s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida.

1.4.1.3.Detecção do azul de metileno

O azul de metileno é um corante de cor azul com uma longa história de utilização; foi um dos primeiros corantes a serem sintetizados quimicamente em quantidades industriais, mas a sua utilização como corante têxtil e de cerâmica é hoje em dia pouco importante. Contudo, continua a ser utilizado actualmente em outras aplicações de carácter biológico e clínico, como por exemplo na determinação de viabilidade celular (distinção de tecidos celulares e de células mortas das vivas) ou ainda como anti-fúngico. O azul de metileno é utilizado, também, em Química Analítica, como indicador na quantificação de SH_2 entre outros.

O azul de metileno pode ser determinado por voltametria de redissolução com adsorção no eléctrodo de mercúrio, com um limite de detecção que permite a sua determinação residual em águas de aquacultura, onde por vezes é utilizado como anti-fúngico para mascarar uma deficiente higiene e salubridade dos viveiros.

Condições de análise utilizadas

As condições utilizadas para a determinação de azul de metileno em fluxo, foram as seguintes:

Hidrodinâmicas:

"loop" de 2500 μL.

Caudal de 1,33 ml min^{-1}.

Patamar de concentração 5-100 s.

Físicas e Químicas:

Tampão fosfato 0,1M, pH=7.

Tempo de acumulação (adsorção) 90 s.

Instrumentais e Voltamétricas:

Voltametria de onda quadrada, frequência de 550 Hz.

t_{lag}= 10s; E_{ac}= -0,60V

E_i= -0,05V; E_f= -0,5V; E_{step}= 1,05 mV; E_{ampl}= 4,95 mV.

Stand 663VA no modo SMDE com tamanho de gota 2.

Características do método

O azul de metileno apresenta nestas condições um pico voltamétrico aos –0,25V. A curva de calibração obtida é uma recta, representada na figura II-8, juntamente com os voltamogramas obtidos. Utilizando o detector em fluxo desenvolvido obteve-se um limite de detecção de $1,5x10^{-8}$M, e um erro relativo inferior a 2%.

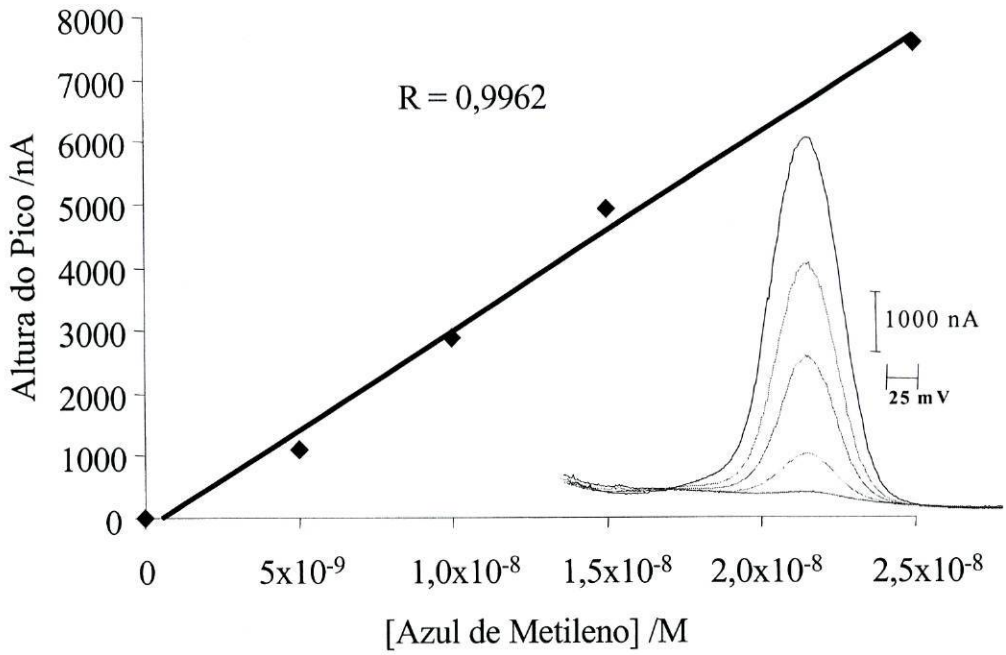


Figura II-8. Curva de calibração para o azul de metileno em tampão fostato 0,1M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 2500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 550 Hz de frequência e 90s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida.

1.4.1.4. Detecção de catiões cobre (II) e cádmio(II) por complexação com óxima

A determinação de catiões metálicos recorrendo à sua complexação e detecção por voltametria de adsorção tem sido proposta como forma de aumentar a especificidade e baixar os limites de detecção. O uso de agentes complexantes orgânicos apropriados tem permitido o aumento da sensibilidade utilizando a pré-concentração por adsorção. A óxima é um agente complexante que tem sido utilizado na determinação dos catiões cobre (II), cádmio (II) e chumbo (II) em águas por voltametria de redissolução com um eléctrodo de mercúrio[153, 198].

Condições de análise utilizadas

As condições utilizadas para a determinação de cobre (II) e cádmio (II) complexados com óxima foram as seguintes:

Determinação de catião cobre (II), na presença de óxima:

Hidrodinâmicas:

"Loop" de 1500 μL.

Caudal de 1,33 ml min^{-1}.

Patamar de concentração 5-55 s.

Físicas e Químicas:

Tampão fosfato 0,1M, pH=7.

Solução complexante de óxima a $1x10^{-5}$M

Tempo de acumulação (adsorção) de 30s

Instrumentais e Voltamétricas:

Voltametria de onda quadrada

Frequência de 400Hz.

t_{lag}= 10s; E_{ac}= -0,1V

E_i= -0,1V; E_f= -1,0V; E_{step}= 1,95 mV;

E_{ampl}= 20 mV.

SMDE com tamanho de gota 2.

Determinação de catião cádmio (II), na presença de óxima:

Hidrodinâmicas:

"Loop" de 1500 μL.

Caudal de 1,33 ml min^{-1}.

Patamar de concentração 5-55 s.

Físicas e Químicas:

Tampão fosfato 0,1M, pH=7.

Solução complexante de óxima $1x10^{-5}$M

Tempo de acumulação (adsorção) 10 s

Instrumentais e Voltamétricas:

Voltametria de onda quadrada

Frequência de 400 Hz.

t_{lag}= 10s; E_{ac}= -0,1V

E_i= -0,1V; E_f= -1,0V; E_{step}= 1,95 mV;

E_{ampl}= 20 mV.

SMDE com tamanho de gota 2.

Características do método

Os compostos organometálicos resultantes da complexação dos catiões cobre (II) e cádmio (II) pela óxima são adsorvidos à superfície do eléctrodo de gota de mercúrio. Tal como nos casos anteriores, verifica-se que a redução dos compostos adsorvidos é extremamente rápida o que permite a utilização de varrimentos de frequência elevada com o objectivo de baixar os limites de quantificação.

Na determinação de catião cobre (II), verificou-se que o branco apresentava um pico ao potencial de redução do composto organometálico, a –0,52 mV, devido à existência de catião cobre (II) como impureza do reagente de óxima (apenas reagent grade), que elevou o limite de detecção deste catião para os 18 ppb. Admite-se que o uso de óxima

com um grau de pureza superior (tipo pro-analysis) irá permitir baixar significativamente o limite de determinação deste catião metálico. Relativamente à curva de calibração, representada na figura 9, verifica-se que existe uma relação linear entre a altura do pico e a concentração de catião cobre II, com um erro relativo inferior a 3% nesta gama de concentrações.

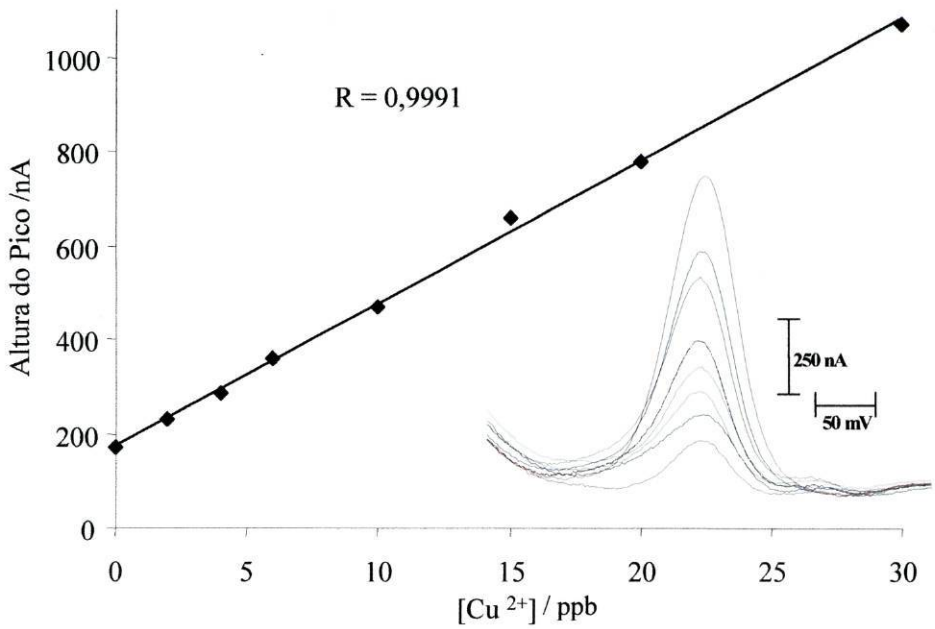


Figura II-9. Curva de calibração para o catião cobre II em tampão fosfato 0,1M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 400 Hz de frequência e 30s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida.

Na figura II-10 pode ser observada a curva de calibração obtida para o catião cádmio (II), nas condições descritas em cima. Neste caso, verifica-se que o reagente óxima não possui catião cádmio (II) em concentração detectável pelo presente método. O potencial de redução deste complexo, distinto do obtido para o cobre, é de -0,77V, pelo que é possível a determinação de catião cádmio (II) na presença de catião cobre (II). Na determinação de catião cádmio (II) utilizando este método obtém-se uma curva de calibração linear e um limite de detecção de 4 ppb; as determinações têm um erro relativo associado inferior a 2% nesta gama de concentrações.

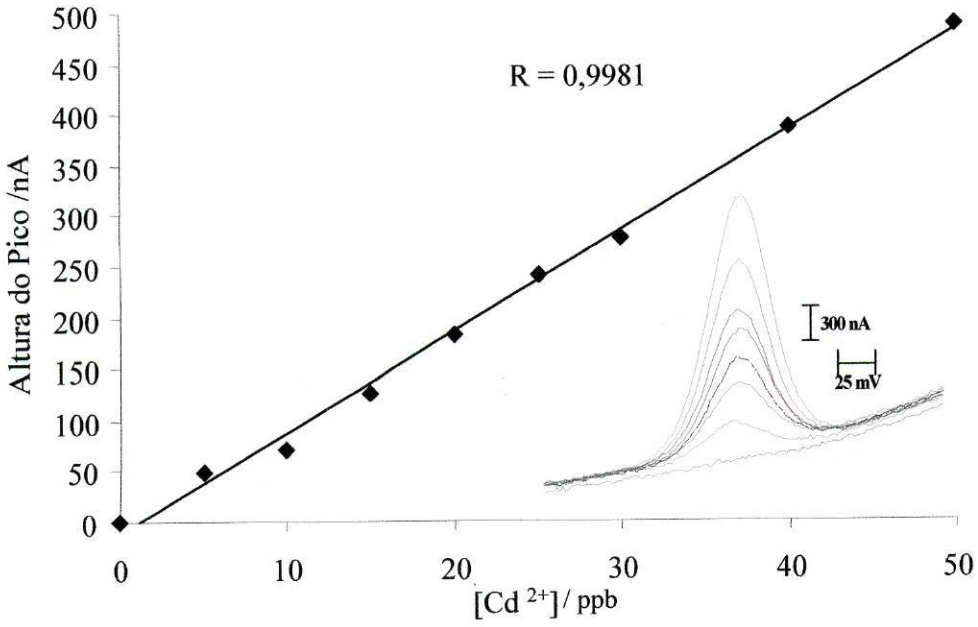


Figura II-10. Curva de calibração para o Cd^{2+} em tampão fosfato 0,1M, pH 7, utilizando o método da curva de calibração. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 1000 Hz de frequência e 50s de adsorção. Em baixo, à direita: Voltamogramas da curva de calibração obtida.

1.4.2. Determinação por voltametria de redissolução anódica

Detecção de Catiões Metálicos (Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+})

A determinação de catiões metálicos por voltametria de redissolução anódica constitui hoje em dia uma das aplicações voltamétricas mais difundidas, constituindo um método de referência para a determinação dos catiões zinco (II), cádmio (II), chumbo (II) e cobre (II) [144]. O uso de eléctrodos de mercúrio permite que os metais obtidos por redução dos respectivos catiões, se dissolvam e concentrem formando uma amálgama com o mercúrio, antes de se proceder ao varrimento no sentido anódico que os reoxida, regenerando os catiões metálicos.

Condições de análise utilizadas

As condições utilizadas para a determinação dos quatro catiões metálicos em fluxo foram as seguintes:

Hidrodinâmicas:

"loop" de 1500 μL.

Caudal de 1,33 ml min^{-1}.

Patamar de concentração 5-55 s.

Físicas e Químicas:

Solução tampão em ácido perclórico 0,2M.

Tempo de acumulação (amalgamagem) 30 s.

Instrumentais e Voltamétricas:

Voltametria de onda quadrada, frequência de 300 Hz.

t_{lag}= 10s; E_{ac}= -1,2V.

E_i= -1,2V; E_f= -0,15V; E_{step}= 4,95 mV; E_{ampl}= 10 mV.

Stand 663VA no modo SMDE com tamanho de gota 2.

Características do método

Os quatro catiões metálicos podem ser determinados simultaneamente, utilizando o mesmo procedimento. Durante a fase de pré-acumulação os catiões são reduzidos a metal e amalgamados na gota de mercúrio; contudo, ao contrário dos compostos adsorvidos, a sua redissolução é mais lenta uma vez que é necessário que os metais amalgamados difundam do interior da gota para a superfície, o que faz com que a velocidade global do processo electroquímico seja mais lenta. Por este motivo, não adianta utilizar velocidades de varrimento superiores aos 300Hz, pois acima desse valor não ocorrem aumentos significativos de sensibilidade. Na figura II-11, estão representadas as curvas de calibração para o Zn^{2+} (E_p= -1,05V), o Cd^{2+} (E_p= -0,64V), o Pb^{2+} (E_p= -0,45V) e o Cu^{2+} (E_p= -0,24V) em ácido perclórico 0,2M. Na mesma figura podem ainda ser observados os voltamogramas correspondentes às adições padrão efectuadas nas calibrações.

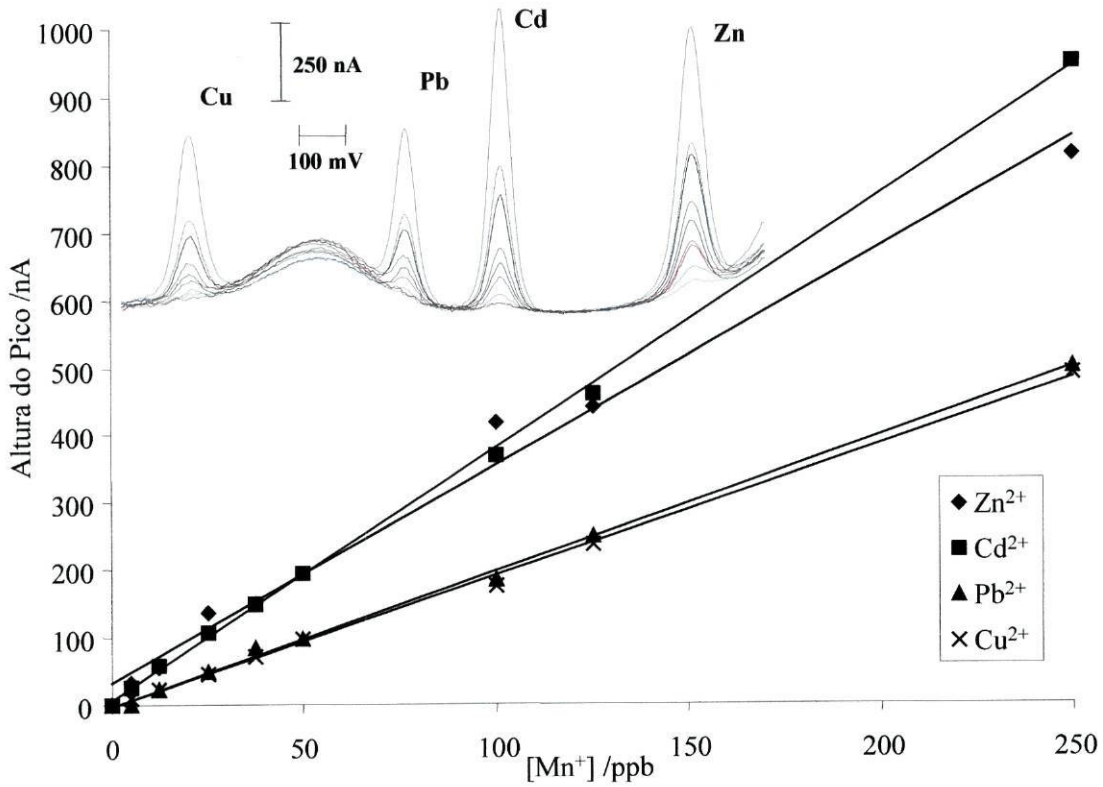


Figura II-11. Curvas de calibração para os catões zinco (II), cádmio (II), chumbo (II) e cobre (II), em ácido perclórico 0,2M. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 1500 µl, um caudal de 1,33ml.min^{-1}, varrimento de potencial com voltametria de onda quadrada a 300 Hz de frequência e 30s de acumulação. Em cima, à esquerda: Voltamogramas das curvas de calibração obtidas.

O limite de detecção mais elevado foi obtido no caso do Zn^{2+}, devido ao facto de o branco possuir uma contaminação residual de zinco, apesar de a preparação do tampão ter sido feita com ácido perclórico ulta-puro e água destilada. As características obtidas para as diferentes curvas de calibração são apresentadas na tabela II-1.

Tabela II-1. Características das curvas de calibração de catiões metálicos obtidas por análise por voltametria de redissolução anódica com detector de fluxo e apresentadas na figura II-11.

Catião	Coeficiente de correlação linear (r)	Limite de detecção	Erro Relativo
Zinco (II)	0,9982	18ppb	5%
Cádmio (II)	0,9996	5 ppb	3%
Chumbo (II)	0,9992	7ppb	3%
Cobre (II)	0,9992	5ppb	3%

1.4.3. Determinação por voltametria de redissolução catódica

Detecção do dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre é um dos mais importantes anti-oxidantes e anti-sépticos utilizados na indústria alimentar, apesar de a sua utilização estar condicionada na maioria dos casos por limites máximos admissíveis impostos por lei, que variam consoante o produto alimentar em causa. O dióxido de enxofre pode ser encontrado em solução sob três formas distintas consoante o pH, todas elas com diferente eficiência anti-oxidante, anti-séptica e ainda capacidade redutora. O SO_2 pode ainda reagir com grupos carbonilo formando aductos e reduzindo a sua acção efectiva.

A determinação e o controlo do nível de SO_2 é um importante parâmetro de controlo de qualidade do produto em várias indústrias alimentares. A determinação voltamétrica com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa constitui uma alternativa a métodos espectrofotométricos ou amperométricos para a determinação do SO_2 [21].

Condições de análise utilizadas

As condições utilizadas para a determinação de dióxido de enxofre em fluxo foram as seguintes:

Hidrodinâmicas:

"loop" de 500 μL.

Caudal de 1,33 ml min^{-1}.

Patamar de concentração 5-25 s.

Físicas e Químicas:

Tampão acetato 0,1M, pH=4.

Tempo de acumulação 0 s (3 segundos efectivos)[1].

Instrumentais e Voltamétricas:

Voltametria de onda quadrada, frequência de 550 Hz.

t_{lag}= 10s; E_{ac}= -0,0V

E_i= -0,0V; E_f= -1,0V; E_{step}= 1,05 mV; E_{ampl}= 25 mV.

Stand 663VA no modo SMDE com tamanho de gota 3.

[1] Sem tempo de acumulação no procedimento do programa GPES, contudo demora cerca de 3s desde que se forma a gota até que se inicia o varrimento voltamétrico.

Características do método

O SO_2 é um composto que reage rapidamente com o mercúrio formando um filme à superfície do eléctrodo. Este composto pode ser rapidamente redissolvido por varrimento catódico, numa reacção electroquímica extremamente rápida. Note-se que neste método o tempo de acumulação não é exactamente zero mas cerca de 3s, que é o tempo que decorre desde a formação da gota até ao início do varrimento. O uso de tempos de acumulação superiores é possível em soluções puras; contudo quando se utilizam matrizes os fenómenos de competição e/ou alteração da superfície do eléctrodo reduzem a sensibilidade, pelo que o uso de tempos de acumulação superiores é desaconselhado. Utilizando o detector em fluxo desenvolvido obteve-se uma curva de calibração rectilínea, que se pode observar na figura II-12, juntamente com os respectivos voltamogramas, com um limite de detecção de 0,8ppb e um erro relativo inferior a 2%.

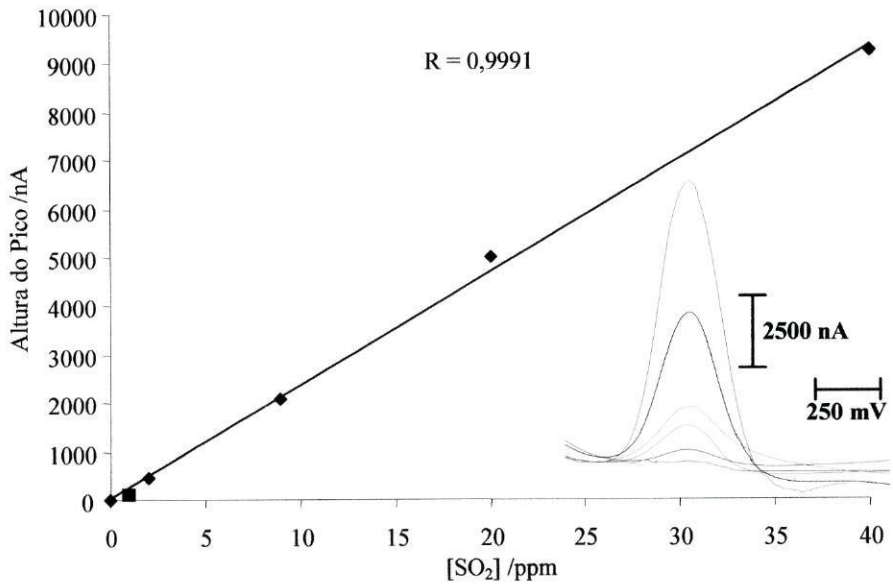


Figura II-12. Curva de calibração para o SO_2 em tampão acetato 0,1M, pH 4. Para a detecção foi utilizado o sistema voltamétrico em fluxo com um "loop" de 500 µl, caudal de 1,33ml.min^{-1}, voltametria de onda quadrada a 600 Hz de frequência. Em baixo, à direita: voltamogramas da curva de calibração obtida.

2. APLICAÇÃO DO SISTEMA NA ANÁLISE DE DIACETILO E α-DICETONAS NA CERVEJA

2.1. Introdução

2.1.1. Importância da determinação do diacetilo e outras α-dicetonas na cerveja

2.1.1.1. Importância do diacetilo nas propriedades organolépticas da cerveja

O aroma das bebidas fermentadas, como é o caso da cerveja, é certamente um aspecto determinante na sua qualidade. Como foi dito anteriormente, o diacetilo é um dos compostos mais críticos neste contexto por os seus níveis durante a fermentação atingirem valores muito superiores ao seu limite de percepção na cerveja final. Há, portanto, necessidade de prolongar a fermentação até que esses níveis desçam abaixo do seu limite de percepção no produto acabado. O diacetilo e a 2,3-pentanodiona são as α-dicetonas (dicetonas vicinais) voláteis que existem em maior quantidade na cerveja representando a sua quase totalidade [76].

Estas duas dicetonas vicinais são produtos secundários do metabolismo de amino-ácidos, mas ao contrários dos álcoois superiores que também estão envolvidos nestas vias metabólicas, são produzidas unicamente por processos anabólicos, ou seja, na biossíntese de amino-ácidos. Estas duas dicetonas possuem um forte aroma a manteiga considerado muito desagradável quando presente na cerveja, e, embora ambas sejam indesejáveis no produto final, como o diacetilo possui um limite de percepção sensorial na cerveja 10 vezes inferior à 2,3-pentanodiona (0,05-0,1ppm e 0,8-1,0ppm respectivamente) é o diacetilo que maior problema constitui no produto final. De facto, atendendo a que, de uma forma geral, estes dois compostos estão presentes em concentrações similares na cerveja final, a percepção sensorial pode ser estudada considerando o diacetilo isoladamente [81].

É desejável, por isso, que o nível de α-dicetonas e em especial o diacetilo na cerveja esteja abaixo do seu limite de percepção sensorial; de facto, embora o aroma a diacetilo seja característico de algumas cervejas do tipo *"Ale"*, *"Stouts"* ou Pretas [81] onde o limite de percepção sensorial do diacetilo pode subir aos até aos 0,25ppm, este aroma é altamente indesejável nas cervejas do tipo *"Lager"* [81], as quais correspondem, actualmente, a mais de 80 % do mercado de cerveja a nível mundial. O limite de percepção sensorial do diacetilo pode, portanto, variar com a composição da cerveja, ou com o nível de certos ingredientes. Verifica-se por exemplo que em cervejas com forte aroma a malte ou lúpulo ou ainda com elevados teores em SO_2 existe perda de sensibilidade organoléptica para o diacetilo [200, 203]. Mais ainda, tal como sucede para outros compostos, a sensibilidade para o diacetilo varia de indivíduo para indivíduo, existindo pessoas com menor sensibilidade que necessitam inclusive de ser treinadas para o detectar mesmo em concentrações relativamente elevadas [76, 146, 203]. Meilgaard et al referem mesmo um estudo em que cerca de 20% de pessoas não o identificam [143].

Como nestas cervejas de "fermentação baixa", as chamadas *"Lager"*, os níveis de diacetilo se devem situar abaixo dos 0,06ppm e durante a fermentação este é produzido pela levedura atingindo valores muito superiores, o seu nível tem de ser controlado de forma rigorosa e criteriosa durante a maturação, altura em que o diacetilo é reduzido na cerveja pela levedura [27, 34].

2.1.1.2. Levantamento histórico breve

A primeira referência histórica para a existência de um defeito organoléptico na cerveja associado ao aroma a manteiga foi registada por L. Pasteur, nos seus *"Études Sur La Bière"*, publicados em 1876 [161]. Independentemente o diacetilo foi posteriormente identificado por Shonfeld em 1907 [146], sendo necessário esperar até 1937 para que Shimwell e colaboradores [188] associassem esse aroma a manteiga a níveis excessivos de diacetilo na cerveja [76, 146, 203].

Desde então têm sido desenvolvidos vários métodos para a determinação de diacetilo nesta matriz [146]. As primeiras referências a especificações máximas na cerveja datam dos anos 60, onde era admitido que os níveis de diacetilo (à data α-dicetonas) não deveriam ser superiores a 0,2ppm [146]. Contudo, o advento de técnicas de análise mais modernas e mais sensíveis capazes de separar o diacetilo da 2,3-pentanodiona, permitiu

que estas especificações viessem a baixar ao longo dos anos. Actualmente, as especificações utilizadas pelas maiorias das cervejeiras situam-se entre os 0,05-0,08ppm de diacetilo ou 0,1-0,18ppm de α-dicetonas. Esta evolução do cuidado posto na análise e controlo do diacetilo e da fermentação/maturação, permitiu que os produtos comercializados também eles melhorassem de forma clara o que é confirmado pela variação das gamas de diacetilo encontrado em cervejas *"lager"* existentes no mercado, que nos anos 60 podiam variar de 0,26 a 1,20ppm enquanto nos dias de hoje rondam os 0,02 a 0,08ppm de diacetilo [146, 203]. No caso das cervejas dos tipos *"Ale"*, *"Stout"* ou Preta estes intervalos sobem substancialmente. Note-se, ainda, que os problemas organolépticos associados ao diacetilo são menos importantes em outras bebidas alcoólicas, podendo a sua concentração ir até aos 8ppm em vinhos, ou até valores ainda maiores nas bebidas espirituosas e vinhos fortificados [22, 179, 203].

2.1.1.3. A importância do diacetilo no processo de fermentação e no produto final

A determinação de diacetilo é uma das mais importantes análises na indústria cervejeira, não só por fazer parte dos procedimentos de garantia de qualidade mas, sobretudo, porque o final da fermentação e maturação da cerveja é determinado pela descida do nível de diacetilo abaixo do seu limite de percepção sensorial na cerveja, numa fase também conhecida como "diacetyl rest" ou tempo de guarda. Verifica-se, portanto, que a saída de cerveja para o mercado está dependente do facto de a cerveja ficar mais ou menos tempo nos tanques de fermentação, consoante indicação analítica do seu nível a cada momento. Para além desta importância para indicação do final da maturação, o controlo dos níveis de diacetilo bem como seu perfil de concentração ao longo da fermentação são igualmente importantes para o cervejeiro, uma vez que permitem retirar informação importante para controlo do processo, bem como para avaliar a composição e qualidade do mosto ou ainda detectar eventuais problemas relacionados com a sementeira e a própria fermentação [135, 145].

Um terceiro ponto relevante da análise do diacetilo na cerveja é no controlo do produto final, onde a determinação de diacetilo aparece quase invariavelmente incluída nos planos de auditoria. Dado que o diacetilo é um composto crítico para a qualidade sensorial da cerveja, é comum as empresas cervejeiras terem a análise de diacetilo como rotina incluída nos seus planos de inspecção e ensaio tanto na cerveja de processo como no produto final.

A análise de diacetilo tem encontrado ainda outras aplicações para a indústria cervejeira, de entre as quais se destacam duas recentemente propostas. Na primeira, associa-se a capacidade de redução do diacetilo pela levedura à previsão da vitalidade da levedura [27]. Na segunda, a monitorização dos níveis de diacetilo na cerveja final ao longo do tempo é utilizada no estudo da estabilidade organoléptica, funcionando como marcador do envelhecimento [28].

2.1.2. Processo de produção de cerveja, uma perspectiva para enquadramento do tema

A cerveja é um dos mais antigos alimentos processados que é conhecido, acreditando-se que exista há pelo menos 6000 anos. Pensa-se que foram os Sumérios o primeiro povo a fabricar a cerveja de forma sistematizada. E, embora desde então todas as grandes civilizações e impérios tenham dominado ininterruptamente o seu fabrico, até ao início do último milénio a sua qualidade era sofrível. Só na Idade Média, quando a arte cervejeira passou a ser dominada por monges, é que a sua qualidade e diversidade melhorou significativamente. Neste período várias foram as alterações processuais introduzidas, das quais a mais significativa foi a introdução do lúpulo, a partir da qual a cerveja passou a ter características muito similares às que ainda hoje possui; de tal forma que a lei Baviera da pureza, regulamentada em 1516, e que define as matérias primas de fabrico de cerveja, persiste até aos dias de hoje na Alemanha. Nesta lei, estava estabelecido que a cerveja só poderia ser fabricada com cevada (mais tarde malte), lúpulo e água. Apenas o isolamento e propagação de células de levedura, em 1883, por Emmil Hansen veio obrigar a alterações a esta lei.

O fabrico propriamente dito da cerveja pode ser feito de muitas formas, recorrendo a matérias primas distintas e a aditivos e auxiliares tecnológicos que ao longo do tempo vieram a ser introduzidos no mercado. De uma forma geral, cada cerveja possui a sua receita e processo de fabrico, sendo necessário cumprir as suas especificações, mesmo que sejam utilizados equipamentos diferentes.

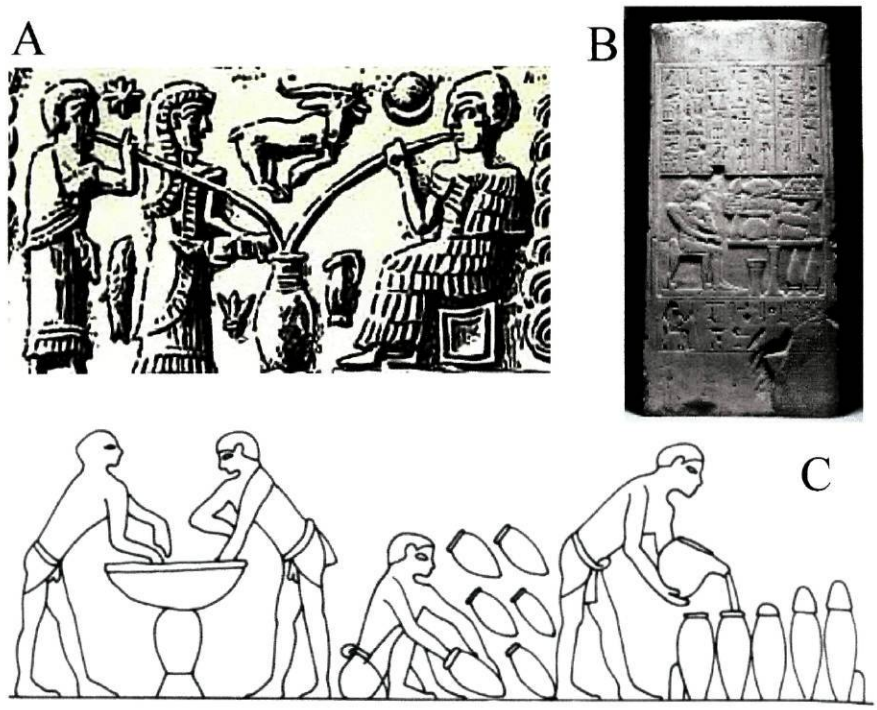


Figura II-13. Prova da importância que a cerveja tem em termos sociais desde as civilizações da antiguidade. A: Degustação em grupo do que se pensa ser cerveja, fotolíto de uma gravação em pedra datada da época Suméria; B: Foto de uma pedra tumular Egípcia onde se pode observar uma representação do indivíduo aí depositado rodeado de vários itens necessários para a vida pós-morte, incluindo um jarro tipicamente usado para a cerveja; C: Fotolíto de uma cena tumular Egípcia (2500 AC), onde se encontra descrito vários dos passos de fabrico da cerveja, desde o fabrico do mosto, passando pela lavagem e preparação dos jarros, até à fermentação (repare-se no pormenor extraordinário da formação gradual da espuma típica deste processo ao longo dos jarros que estão em pé).

Na figura II-14 está representado um diagrama de fermentação contendo diversos parâmetros analíticos como o extracto (densidade em °P), a temperatura da cuba de fermentação, o número de células de levedura em suspensão, o teor em diacetilo total, o teor em azoto α-aminado (FAN) e a quantidade de etanol produzida. Embora o termo fermentação seja muitas vezes o termo utilizado para caracterizar todo o processo, este para os cervejeiros caracteriza apenas a zona de fermentação em que existe grande actividade da levedura e que é caracterizada pela elevada redução do extracto e produção de etanol. Para caracterizar a parte menos activa da fermentação é costume utilizar-se o termo maturação, geralmente efectuada a temperatura inferior, e que é

especialmente caracterizada por permitir um apuramento das características organolépticas da cerveja e a sua estabilização coloidal.

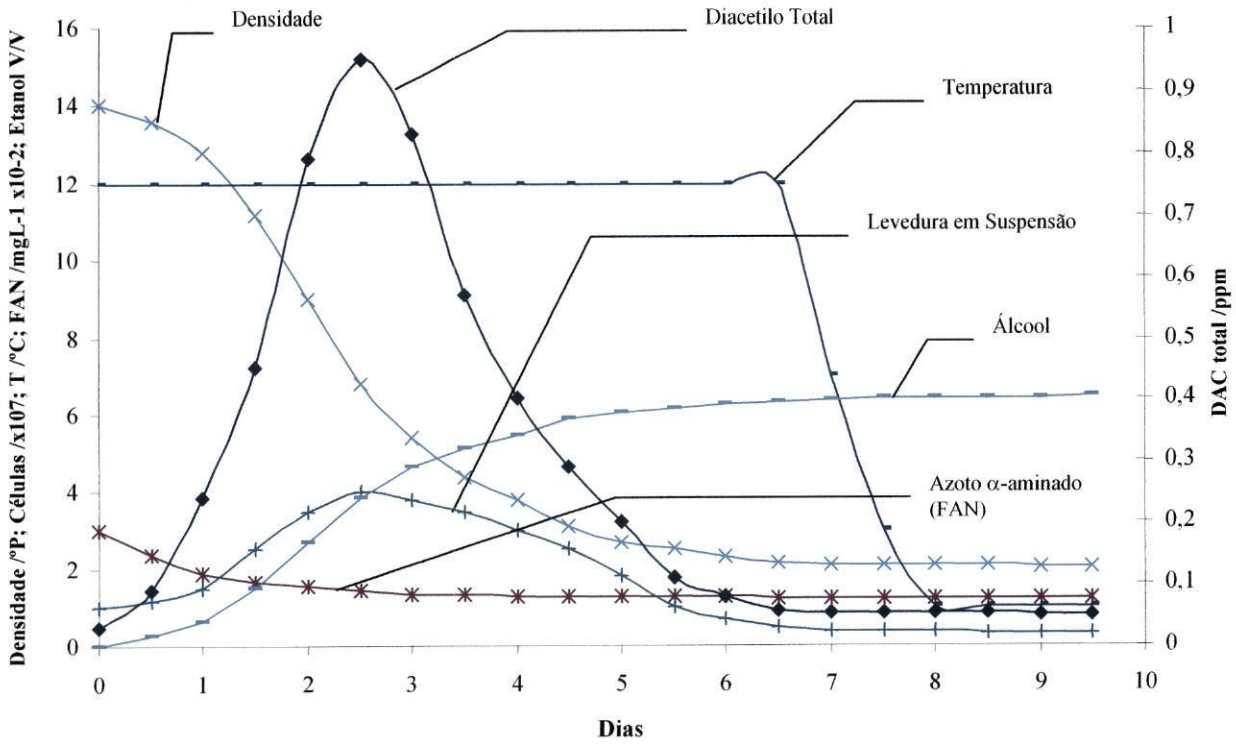


Figura II-14. Esquema de um diagrama de fermentação de cerveja, representado segundo diversos parâmetros analíticos.

Os diferentes passos que constituem o fabrico da cerveja estão sumariados na figura II-15, podendo ser encontradas as particularidades de cada um, no esquema de fases que é apresentado no anexo I.

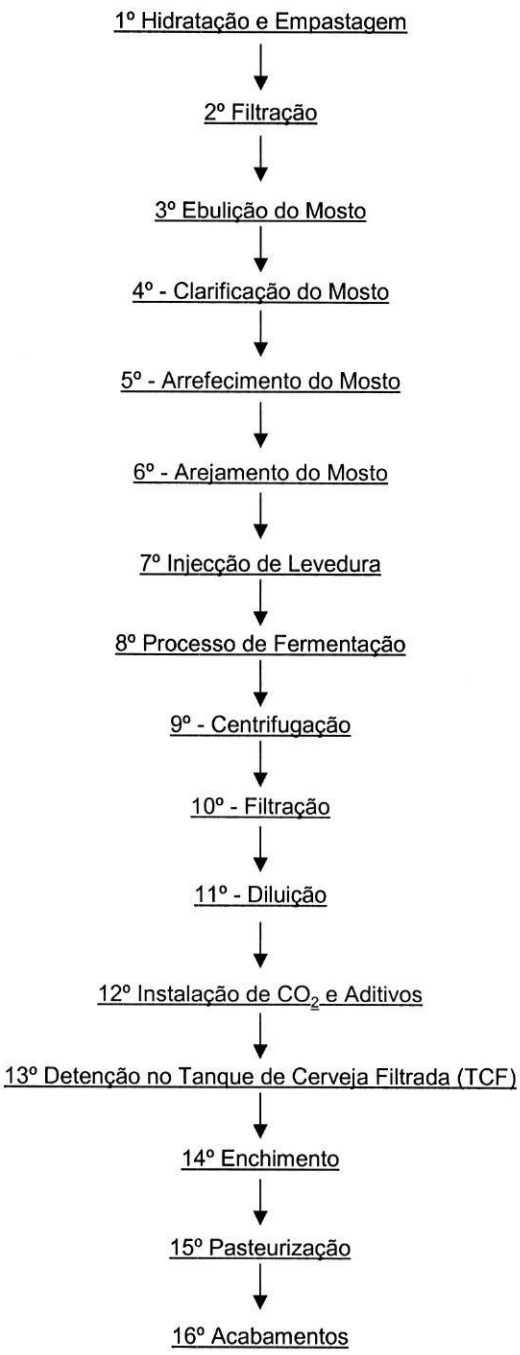


Figura II-15. Esquema do processo de produção de cerveja

2.1.3. O diacetilo na cerveja

O diacetilo e a 2,3-pentanodiona não são directamente produzidos pelas leveduras; constituem produtos secundários do metabolismo celular, formando-se a partir de ácidos α-acetohidroxilados, estes sim intermediários das vias de biossíntese de amino-ácidos. Estas vias anabólicas, bem como os restantes passos que conduzem à formação e ainda à redução do diacetilo, estão representados na figura II-16. Os ácidos α-

acetohidroxilados produzidos em excesso numa primeira fase da fermentação são excretados pelas levedura para a cerveja/mosto. É precisamente no seguimento desta fase que se formam quer o diacetilo quer a 2,3-pentanodiona por descarboxilação oxidativa não enzimática do α-acetolactato e do α-acetohidroxibutirato, respectivamente. A concentração destas α-dicetonas diminui numa fase posterior da fermentação, denominada de "diacetil rest[a]", por reabsorção pela levedura e posterior redução, a acetoína e posteriormente a 2,3-butanodiol [37], e a 2,3-pentanodiol, respectivamente.

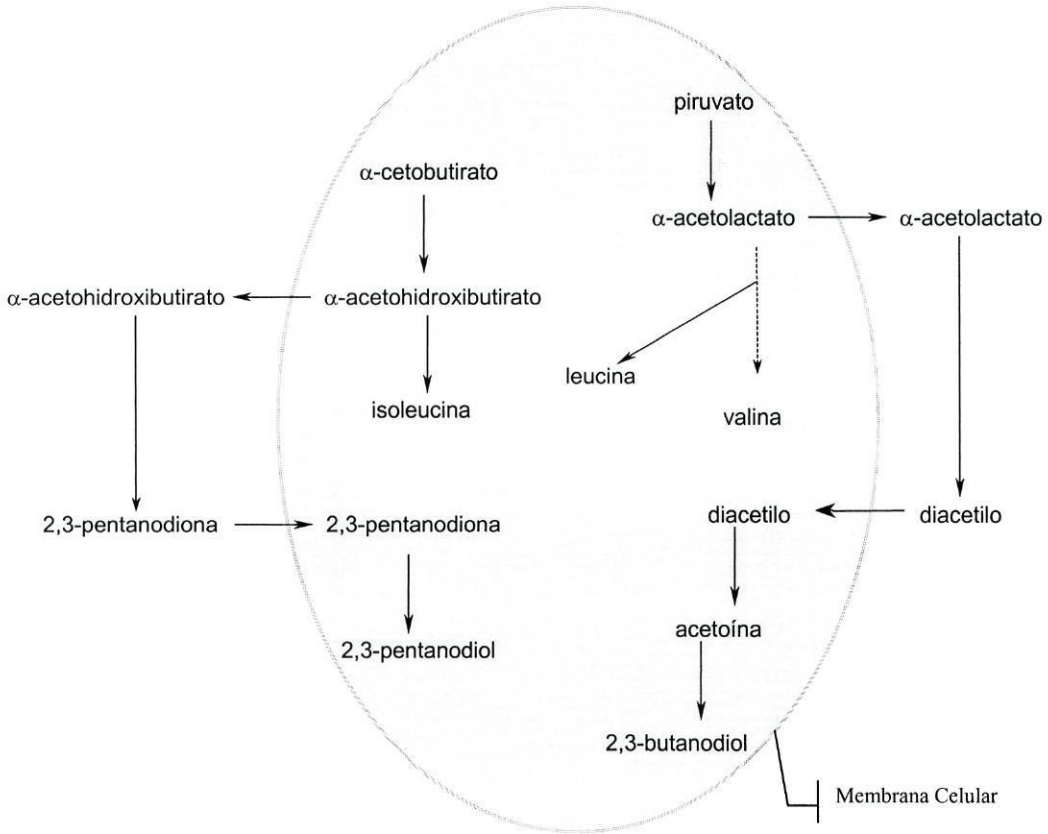


Figura II-16. Passos envolvidos na formação e redução de diacetilo no processo de fermentação de cerveja por *Saccharomyces Cerevisiae*.

Quando é feito o tratamento térmico de pasteurização da cerveja em garrafa aqueles dois precursores são definitivamente transformados nas respectivas α-dicetonas.

2.1.3.1. Biossíntese e excreção de ácidos α-acetohidroxilados pela levedura

Há vários trabalhos que começaram por demonstrar que a presença de diacetilo na cerveja em fermentação se deve à acção das leveduras [76, 80, 158]. Mais tarde veio-se

a provar que, de facto, não é o diacetilo que se encontra na cerveja mas antes o seu precursor, o α-acetolactato, produzido intracelularmente por actividade da *Saccharomyces Cerevisiae* e excretado pela levedura para a cerveja [41, 76, 81, 88, 92, 101, 192, 202, 203].

Embora outras vias de síntese de α-acetolactato e de diacetilo tenham sido propostas ao longo do tempo por vários autores [40, 114], a que está esquematizada na figura II-17 é aquela que actualmente se admite existir em fermentações de cerveja feitas com *Saccharomyces Cerevisiae* [44, 52, 127, 128, 134, 171, 187, 189, 190, 191, 206, 207]. Nesta figura representa-se ainda as vias envolvidas na formação e redução não só do diacetilo como da 2,3-pentanodiona.

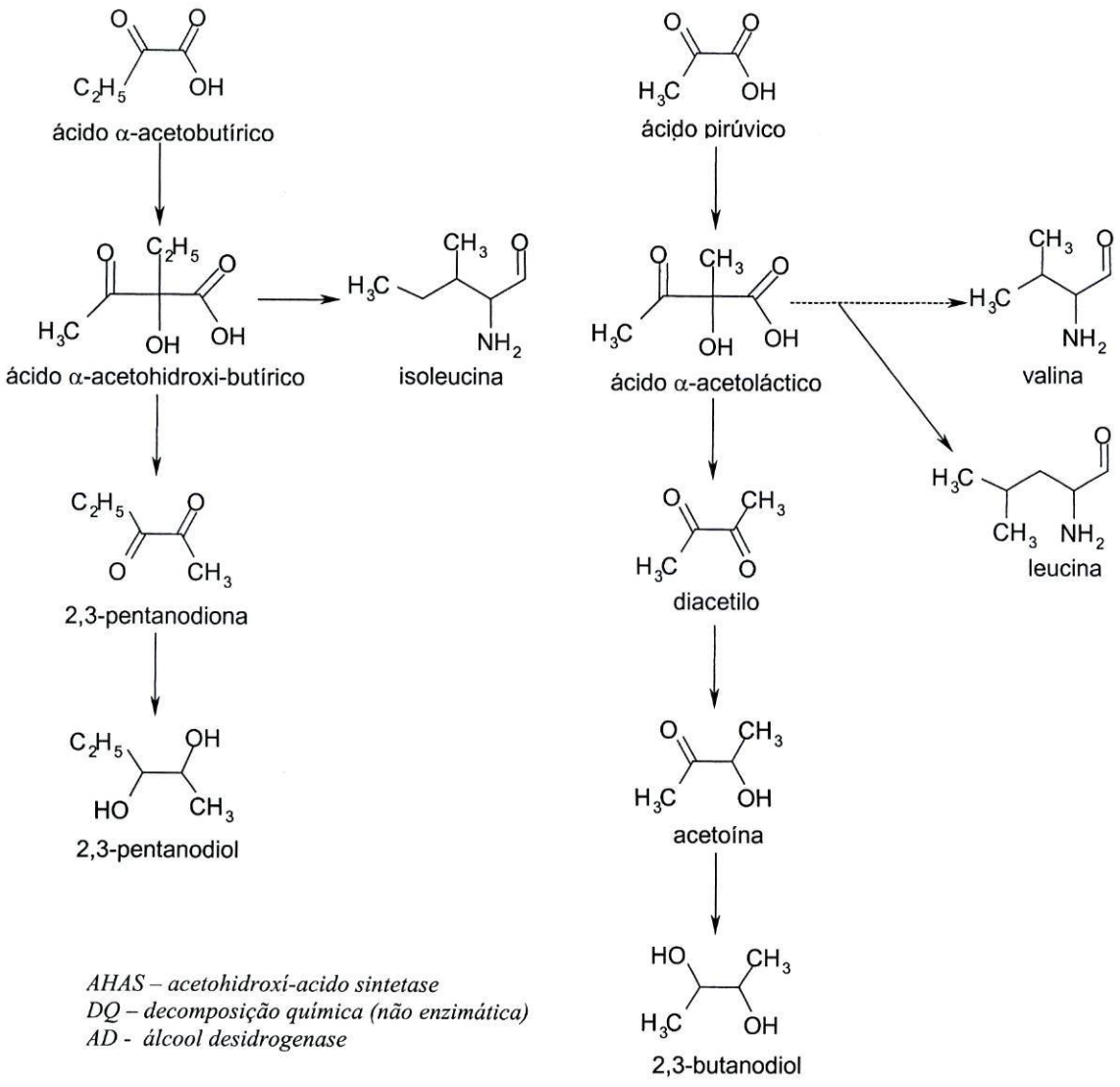


Figura II-17. Vias de formação e redução do diacetilo e 2,3-pentanodiona activas em fermentações de cerveja com *Saccharomyces Cerevisiae*.

Como se observa na figura, o diacetilo é formado a partir do seu precursor, o ácido α-acetoláctico, existente predominantemente sob a forma de α-acetolactato ao pH da cerveja e que é um intermediário da via de biossíntese da valina e leucina; por seu lado a 2,3-pentanodiona é produzida a partir do α-acetohidroxibutirato, também ele um intermediário mas da via de biossíntese da isoleucina [81, 86, 88, 92, 101, 192, 202, 203]. Embora em outros organismos a síntese destes precursores seja feita por duas enzimas distintas, na levedura utilizada para produção de cerveja (*S.Cerevisiae*), é a mesma enzima, a α-acetohidroxi-ácido sintetase, que parece estar envolvida na formação quer do α-acetolactato quer do α-acetohidroxibutirato [41, 203].

O aparecimento destes ácidos α-acetoxidroxilados no mosto em fermentação sugere que os mecanismos de regulação nas leveduras são inadequados para retroactuar e regular completamente a produção destes compostos mesmo em condições de abundância de isoleucina, leucina e valina [81]. Esta falta de regulação a nível celular faz com que estes intermediários seja produzidos excessivamente quando estas vias de biossíntese são activadas, o que conduz a um aumento substancial da sua concentração intracelular. Reflexo deste aumento, e porque a membrana celular é permeável a elevados gradientes deste composto, estes precursores passam para a cerveja reflectindo-se num aumento do seu nível também na cerveja. É portanto a este fenómeno de excreção que se deve o aumento dos ácidos α-acetohidroxilados na cerveja, cujo perfil reflecte precisamente a sua formação a nível intracelular.

Verifica-se que ambas as vias de biossíntese da valina e da isoleucina partilham entre si mais outras três enzimas comuns, para além da α-acetohidroxi-ácido sintetase, e que catalisam portanto reacções paralelas (figura II-17). Todo este ciclo de produção de amino-ácidos é portanto sujeito ao mesmo tipo de regulação, que se sabe ser multilocalizada, dependente do mecanismo de regulação geral comum para os amino-ácidos, de repressão multivariada e de ainda retroinibição. Em particular, a treonina desaminase e a α-acetohidroxi-ácido sintetase são sujeitas a uma forte regulação por retroinibição, pela isoleucina e pela valina respectivamente [127]. Todo o trabalho de confirmação destas vias e sua regulação foi já feito com detalhe, tendo todos os genes que codificam para estas enzimas já sido identificados e clonados, fazendo parte de uma sequência de genes denominada ILV [167]. Com esta informação, e os avanços em biologia molecular que ao longo destas duas últimas décadas têm existido, passou a existir um potencial para controlar a concentração de α-dicetonas por manipulação

genética [84, 115, 210]. Esta possibilidade é ainda mais importante do ponto de vista dos cervejeiros, na medida em que as vias de formação não produzem apenas dicetonas vicinais mas são igualmente uma fonte de um grande número de álcoois superiores importantes [81]. A registar bem esta realidade, várias leveduras já foram transformadas por manipulação genética, de modo a terem uma baixa capacidade de produção de diacetilo e 2,3-pentanodiona.Sabe-se que quase todas as grandes cervejeiras internacionais possuem, hoje em dia, nos seus bancos de levedura estirpes geneticamente manipuladas com estas potencialidades, embora não exista conhecimento da sua utilização a nível industrial.

2.1.3.2. Decomposição química espontânea dos ácidos α-acetohidroxilados em α-dicetonas

O diacetilo e a 2,3-pentanodiona são portanto formados por descarboxilação oxidativa do α-acetolactato e do α-acetohidroxibutirato [49, 86, 101]. Estas reacções representadas na figura II-18, são decomposições químicas espontâneas, sem a intervenção de qualquer enzima [76, 100]. Verifica-se, portanto, que a levedura não é necessária para a formação de dicetonas vicinais a partir dos respectivos ácidos α-acetohidroxilados [92], compostos pouco estáveis, que podem facilmente ser convertidos nas α-dicetonas correspondentes na presença de oxigénio ou outros oxidantes [89]. O grau e a velocidade desta conversão são afectados pelo pH, pela temperatura, pela concentração do oxigénio e ainda pela presença de determinados catiões metálicos em solução, como o Fe^{3+}, o Cu^{2+} e o Al^{3+} [49, 81, 87].

Inoue et al, em 1968, efectuaram o estudo do diacetilo durante a fermentação e concluíram que este se encontra em pequena quantidade na cerveja durante o processo [101], o que veio a ser confirmado mais tarde por outros [88, 202]. Mais ainda, verificaram que, pelo contrário, o seu precursor o α-acetolactato se encontra em elevada concentração. Vários estudos foram desde então realizados para determinar se, nas condições de fermentação, esta reacção se dava no seio da cerveja em fermentação ou se os ácidos α-acetohidroxilados eram por seu turno primeiro reabsorvidos pela levedura e só depois é que sofriam a descarboxilação intracelularmente. De facto, o que se veio a concluir é que a presença de levedura não afectava a remoção de α-acetolactato [92] e, embora a sua reabsorção possa de facto ocorrer nestas condições, é tão lenta que pode ser desprezada [87, 92, 176, 215].

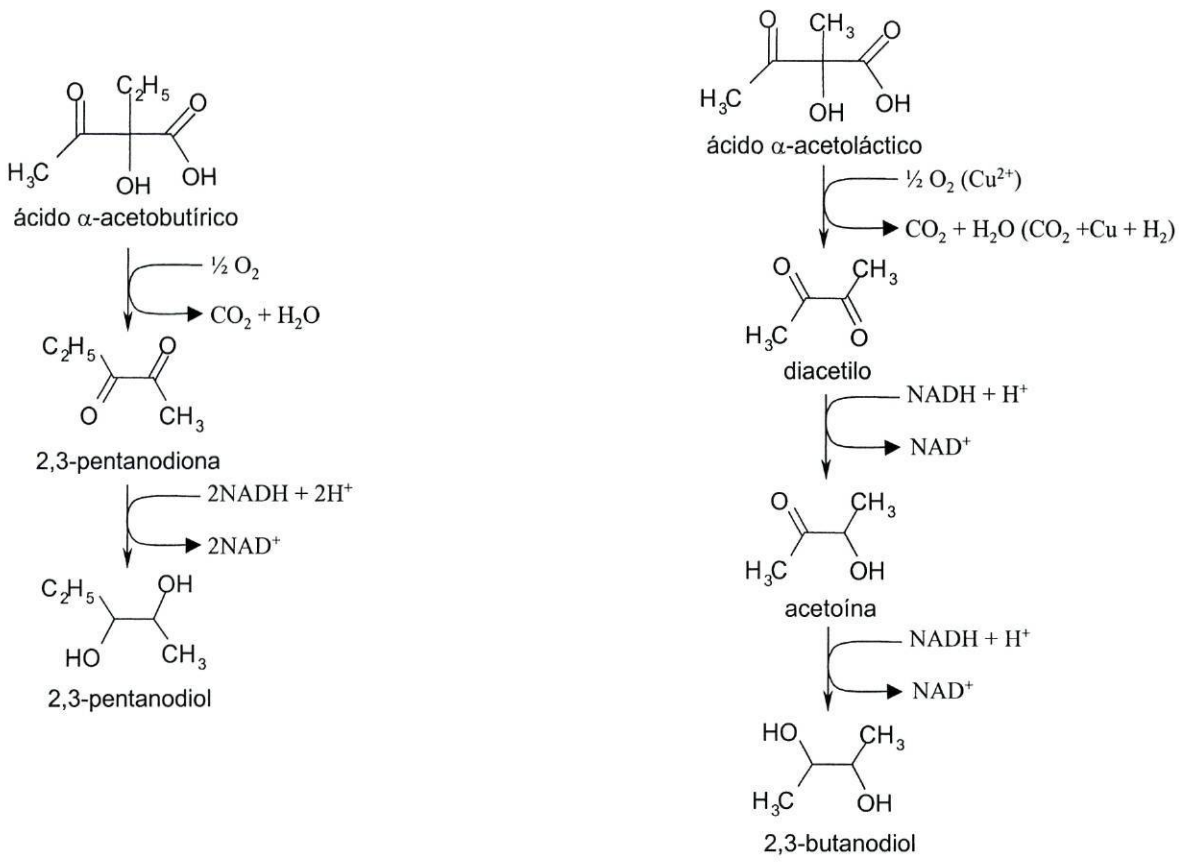


Figura II-18. Reacções envolvidas na descarboxilação oxidativa do α-acetolactato e α-acetohidroxibutirato.

A reacção de descarboxilação do α-acetolactato na presença de oxigénio ou outro oxidante dá origem a diacetilo, mas também pode haver uma outra reacção de descarboxilação, não oxidativa, que dá origem a acetoína directamente. No entanto, esta reacção não é observada nas condições encontradas na cerveja, admitindo-se que a incorporação involuntária de quantidades mínimas de oxigénio nos tanques de fermentação é suficiente para que apenas a descarboxilação oxidativa espontânea ocorra durante a fermentação e maturação.

Esta reacção de descarboxilação oxidativa é considerada pela maioria dos autores como o passo limitante da remoção do diacetilo da cerveja, pelo que todo o processo de redução da concentração do diacetilo está na prática dependente desta reacção e das condições que a favorecem. Verifica-se que a decomposição do α-acetolactato é cada vez mais difícil à medida que se aproxima o final da fermentação, fenómeno esse descrito por Haukeli et al [87] e bem conhecido na prática cervejeira. Este facto, deve-se provavelmente a uma conjugação de factores que influenciam directamente a reacção, como a diminuição da concentração do α-acetolactato ao longo do tempo, a diminuição

da agitação ao longo do tempo e ainda devido ao facto de a cerveja gradualmente se tornar cada vez mais redutora e por isso a descarboxilação oxidativa ser cada vez mais difícil.

Esta reacção será objecto de uma análise mais pormenorizada num dos sub-capítulos seguintes, por constituir um dos passos necessários na preparação de amostras para a análise de diacetilo na cerveja.

2.1.3.3. Reabsorção e redução celular do diacetilo pela levedura

Ao contrário da reacção de descarboxilação oxidativa, em que se forma o diacetilo, a redução do diacetilo requer catalisação enzimática, pelo que a presença de levedura é necessária para a redução final do diacetilo na cerveja. O diacetilo é, pois, um produto transitório da fermentação, sendo reduzido primeiro a acetoína e depois a 2,3-butanodiol durante este processo [76]. Então, uma vez formadas as α-dicetonas, o principal factor que passa a influenciar o seu nível na cerveja é a taxa à qual estas são metabolizadas pela levedura. Desta forma, uma levedura metabolicamente muito activa rapidamente reduz o diacetilo, primeiro a acetoína e posteriormente a 2,3-butanodiol. Esta rápida e eficiente acção da levedura é descrita em vários trabalhos, nos quais se demonstra que o diacetilo pode ser quase totalmente removido de soluções, mesmo daquelas consideradas muito concentradas relativamente aos níveis máximos que ocorrem nas cervejas [17, 33, 103, 134, 194].

Até há pouco tempo, era aceite pela generalidade dos investigadores que as duas reacções de redução do diacetilo (formação de acetoína seguida da formação do 2,3-butanodiol) eram catalizados por uma mesma enzima, a álcool-desidrogenase, quando utilizada na fermentação a *Saccharomyces Cerevisiae* [81, 199, 203]. No entanto, Louis-Eugene et al, em 1988, conseguiram isolar ambas as actividades catalíticas em dois péptidos distintos, o que sugere estamos na presença de enzimas distintas [122] e não apenas de uma que catalizaria as duas reacções.

Devido ao facto de o diacetilo ser rapidamente metabolizado pela levedura, não se encontram quantidades apreciáveis deste composto durante a fase activa da fermentação e, embora a velocidade de remoção do diacetilo varie ao longo da fermentação, está estimado que a taxa de remoção do diacetilo pela levedura é entre dez [99, 102] e cem [87] vezes superior à velocidade da reacção de descarboxilação oxidativa que o forma. Van den Berg et al, referem que a actividade de redução do diacetilo a acetoína é na fase de maturação apenas de 30 % da actividade registada durante a fase de fermentação

mais activa, e estes mesmos autores referem que provavelmente na fase final da fermentação a reabsorção do diacetilo em solução poderá também contribuir activamente para limitar a sua velocidade de redução na cerveja em maturação [199].

Esta teoria enquadra-se de facto melhor na prática cervejeira, sugerindo que o processo de reabsorção é também ele responsável pelo desaparecimento do diacetilo na cerveja e não apenas a descarboxilação oxidativa, sustentando desta forma a prática de re-suspensão de levedura para acelerar a redução do diacetilo em cubas de fermentação, e justificando Legeay et al 1989, segundo os quais a velocidade de redução também é dependente da área de levedura exposta (em suspensão) [99]. Há outras observações que corroboram esta teoria, como a diminuição da velocidade da redução de diacetilo devido a uma abrupta indução da floculação por aplicação de frio às cubas de fermentação ou quando a levedura é removida destas [16, 87]; inversamente, o processo de redução pode ser acelerado por adição de mosto com levedura em fase exponencial [110] ou usando reactores com leveduras imobilizadas [159], correspondendo a um aumento da exposição da levedura à cerveja. Está também descrito que a redução do diacetilo depende do estado fisiológico e da própria actividade da levedura na fermentação [29].

Relativamente ao produto intermédio da redução do diacetilo, a acetoína, esta também possuí um aroma desagradável, descrito como "musty taste", mas com um elevado limite de percepção sensorial, de 3,0 ppm, muito superior aos níveis que usualmente se encontram na cerveja, pelo que não constitui um problema. Relativamente ao produto final da redução do diacetilo, o 2,3-butanodiol, também não há problema, uma vez que é um composto considerado neutro do ponto de vista sensorial [66]. Pode, portanto, concluir-se que o diacetilo, ao ser removido da cerveja, se converte em compostos sensorialmente muito menos activos [203].

2.1.3.4. Concentração de diacetilo – balanço entre a formação e remoção de diacetilo no processo de fermentação

Durante a fermentação os elevados níveis de α-acetolactato sugerem um desequilíbrio na regulação entre a produção pela levedura dos ácidos α-acetohidroxilados e a sua utilização para a produção de amino-ácidos, facto que conduz à sua acumulação na levedura e posterior excreção para a cerveja [94]. De forma inversa, nos passos finais da fermentação a levedura irá reabsorver e reduzir o diacetilo da cerveja [37, 55, 212].

A concentração final de diacetilo na cerveja é portanto dependente dos factores seguintes:

- O nível e período de síntese e excreção de α-acetolactato pela levedura.
- As condições e período deixado para a conversão deste precursor em diacetilo.
- A capacidade de remoção do diacetilo pela levedura .

A integração da actividade relativa de cada um destes passos no decurso do processo de fermentação tem sido utilizado, em especial nos últimos anos, para previsão e modelação do processo de fermentação, como atestam várias publicações [75, 117, 195].

Na figura II-19, fermentação A, é possível observar um perfil típico de diacetilo total (α-acetolactato + diacetilo livre) ao longo de uma fermentação isotérmica. De uma forma genérica pode-se afirmar que quanto mais baixo for e mais cedo surgir o pico do diacetilo, melhor será o perfil, pois mais fácil será reduzir o diacetilo e mais tempo haverá para o fazer. Em geral, considera-se que níveis de diacetilo até 1,1 ppm e de 2,3-pentanodiona até 0,6 ppm são considerados valores limites acima dos quais se está na presença de dificuldades de processo devido, ou a irregularidade nos procedimentos de produção, ou uma levedura de má qualidade ou de mosto de má qualidade; de qualquer forma, considera-se que acima destes valores de diacetilo é necessário actuar sobre o processo. Analogamente, quando o pico de formação de diacetilo apresenta um ombro na sua parte anterior (como o existente na figura II-19 - Fermentação C), é sinal de que também há problemas.

Uma vez que os ácidos α-acetohidroxilados são intermediários nas vias de biossíntese, a sua formação está portanto agregada ao crescimento das leveduras também ao nível de compostos azotados no mosto [150, 151]. Uma situação típica de alteração do perfil normal de concentração de diacetilo ao longo do tempo é o aumento da altura do pico como se observa na figura II-19, fermentação B, devido por exemplo a uma sementeira muito baixa, que induz um maior crescimento total de levedura e portanto um aumento da biossíntese de amino-ácidos. Outra alteração típica é a que se observa na figura II-19 (fermentação C), em que existe um nível muito baixo de azoto α-aminado no mosto, que conduz à necessidade de biossíntese tardia de amino-ácidos após acabarem as fontes de amino-ácidos no meio.

Finda a fase de crescimento exponencial da concentração de diacetilo em função do tempo de fermentação, correspondendo à predominância da reacção de formação de α-acetolactato, segue-se a redução da concentração do diacetilo total. Este decaimento deve-se ao facto de o seu precursor estar a ser formado a uma velocidade inferior àquela a que é descarboxilado. A taxa de diminuição do diacetilo total é portanto dependente de factores que influenciam esta reacção química de decomposição. Tipicamente, dar-se-á um decaimento mais rápido a uma temperatura de fermentação mais elevada. Nesta fase os níveis de diacetilo livre mantêm-se baixos, indicando que a reacção de descarboxilação é a mais importante.

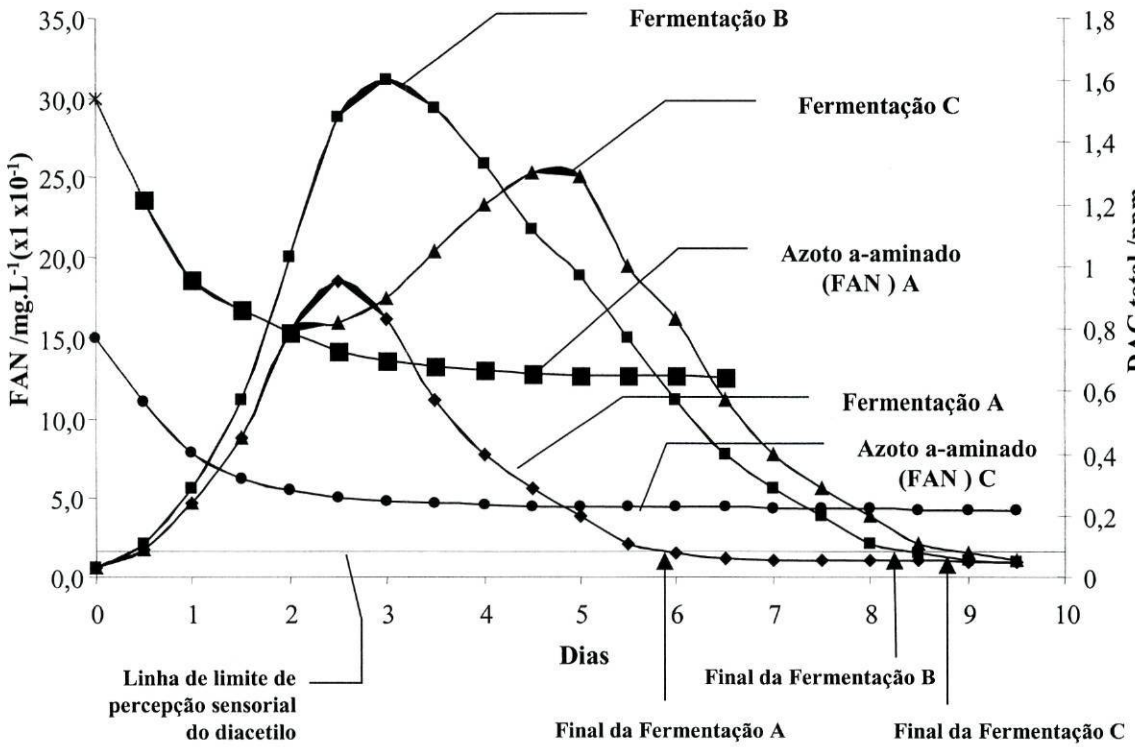


Figura II-19. Diagramas de fermentação de cerveja representando diferentes perfis possíveis de concentração de diacetilo total e azoto α-aminado (FAN) ao longo do tempo.

À medida que o valor de diacetilo se aproxima da especificação para o final da fermentação, a redução do diacetilo torna-se cada vez mais lenta, e a capacidade de remoção do diacetilo livre pela levedura torna-se cada vez mais importante, uma vez que está a diminuir a razão entre o diacetilo total e diacetilo livre existente na cerveja.

Na figura II-19, são apresentados os diversos tipos de comportamento que podem ocorrer durante a fermentação, sendo evidente a importância que a concentração do

diacetilo tem no processo de fermentação e em especial na sua duração. As situações apresentadas são as que mais frequentemente ocorrem nas empresas cervejeiras, configurando os casos práticos que se descrevem seguidamente, reportados à figura II-19.

Figura II-19 - fermentação A (Fermentação normal):

A concentração inicial de diacetilo não é zero, o que prova que já existe algum diacetilo mesmo antes de a levedura ser inoculada; não sendo portanto de excluir que algum diacetilo se forme durante o fabrico do mosto como produto de reacções de Maillard.

Como se pode observar no gráfico, na parte final da fermentação, a redução do nível de diacetilo é mais ou menos constante ao longo do tempo, o que reflecte a sua rápida remoção do meio, velocidade que diminuí caso uma floculação muito forte da levedura seguida da sua retirada dos tanques de fermentação.

Numa fermentação dita normal há apenas um pico de diacetilo total, que idealmente deverá ser ténue e ocorrer o mais cedo possível. Este tipo de perfil permite obter um tempo de redução do diacetilo mais curto com menor tempo global de fermentação.

Figura II-19 - fermentação B (Fermentação anómala com produção excessiva de diacetilo):

Neste tipo de perfil há, também, um único pico de diacetilo total, que ocorre cedo na fermentação mas atinge valores muito elevados. Este caso pode, por exemplo, corresponder a uma situação de sementeira muito baixa de levedura, o que implica a necessidade de a levedura se propagar mais; nestas circunstâncias, há globalmente uma maior biossíntese de amino-ácidos e portanto surge um pico mais intenso de diacetilo total coincidente com o máximo da fase exponencial de propagação da levedura. Quando há uma produção muito elevada de diacetilo total, o tempo necessário para a sua redução é maior, o que de uma forma geral faz aumentar o tempo total do processo de fermentação.

Figura II-19 - fermentação C (fermentação anómala com produção tardia de diacetilo):

Esta representação corresponde a uma fermentação deficiente em azoto α-aminado, verificando-se que o perfil de diacetilo total apresenta um pico correspondente à fase exponencial de propagação da levedura onde existe normalmente mais biossíntese, mas

aparecendo um segundo pico mais intenso numa fase posterior da fermentação. Este 2º pico desenvolve-se quando se começam a esgotar as fontes de amino-ácidos disponíveis no mosto, pelo que a levedura tem que efectuar a sua biossíntese "de novo", o que acarreta o tal aumento tardio do diacetilo total. O aparecimento deste segundo pico é um problema grave, uma vez que há ainda menos tempo para reduzir o diacetilo em solução no caso de se querer manter constante o tempo de fermentação. Em geral, tanto nesta situação como na anterior, há necessidade de prolongar o tempo de fermentação/maturação [150, 151].

Figura II-19 - fedução do teor de azoto α-aminado A e C:

Estes dois gráficos de redução do azoto α-aminado (FAN) da cerveja durante a fermentação são gráficos de apoio aos perfis de diacetilo A e C. O perfil de FAN A corresponde à fermentação A, e representa um mosto com uma concentração adequada de azoto α-aminado. O perfil FAN C corresponde à fermentação C e representa um mosto com teor insuficiente de azoto α-aminado relativamente às necessidades para a fermentação.

No caso do gráfico FAN A, foi utilizado um mosto com elevado teor em FAN, o que caracteriza um pico de diacetilo na fase inicial de fermentação representado na fermentação A; e, uma vez que não ocorre esgotamento de amino-ácidos no mosto, não é necessário aumentar as vias de biossíntese mais do que o usualmente necessário.

No caso do gráfico FAN C, verifica-se um valor inicial de FAN muito inferior ao caso anterior, como resultado da utilização de um mosto deficiente em amino-ácidos absorvíveis. Neste segundo caso, como o FAN do meio não é suficiente para satisfazer as necessidades da levedura, acaba por existir uma necessidade suplementar de produzir amino-ácidos *"de novo"* quando se esgota o FAN absorvível da cerveja. Como consequência desta actividade suplementar de biossíntese, obtém-se um perfil como o representado na fermentação C: há uma primeira fase com a produção normal de diacetilo, que corresponde ao ombro que se encontra antes do grande pico de produção de diacetilo total, que ocorre tardiamente, na sequência do esgotamento do FAN no mosto.

A variação do teor de 2,3-pentanodiona durante a fermentação é análoga à do diacetilo, embora a sua concentração seja em geral um pouco mais baixa.

Esta analogia explica-se porque os precursores destas α-dicetonas estão envolvidos na formação de amino-ácidos com funções similares e são necessários nos mesmos momentos do ciclo celular; consequência disto, as vias de síntese destes amino-ácidos são muito semelhantes entre si, tal como a sua regulação, existindo inclusive três enzimas comuns na síntese, quer de valina quer da isoleucina.

A semelhança entre o diacetilo e a 2,3-pentanodiona também se verifica quanto ao seu desaparecimento, razão pela qual o perfil de decréscimo é também paralelo entre os dois compostos; de facto, dada a sua similaridade estrutural, as reacções de conversão dos dois são semelhantes, o mesmo sucedendo na passagem pela membrana para o interior da célula. Como o passo de redução de diacetilo e da 2,3-pentanodiona não é um factor limitante da sua remoção da cerveja, estas não são reacções que influenciem por si só o perfil destas dicetonas na cerveja ao longo da fermentação e da maturação.

2.1.4. Preparação de amostras - aspectos práticos da reacção de pré-conversão para a análise de diacetilo na cerveja

O facto de durante a fermentação da cerveja o diacetilo estar praticamente todo sob a forma de α-acetolactato é um problema do ponto de vista analítico, pois o valor que interessa determinar na cerveja é o diacetilo total (diacetilo livre mais todo o diacetilo potencial). De facto, o α-acetolactato com o tempo acaba por se transformar em diacetilo, sendo o diacetilo total igual ao diacetilo livre mais o α-acetolactato existente. Esta transformação tem sido desde sempre uma das maiores dificuldades que se tem colocado na análise de diacetilo, tendo persistido até aos dias de hoje dadas as dificuldades de controlar a extensão deste processo de transformação.

O α-acetolactato é um produto relativamente instável, sofrendo com relativa facilidade reacções de descarboxilação; por isso, para determinar apenas o diacetilo livre é necessário tomar precauções na recolha e tratamento de amostras de cerveja. Estas boas práticas de manuseamento da amostra incluem a recolha da amostra em atmosfera inerte, a sua manutenção a baixa temperatura e a realização da análise o mais breve possível.

Pelo contrário, quando se pretende determinar o valor de diacetilo total, é preciso promover a reacção de pré-conversão, por forma a assegurar que esta transformação seja total ou pelo menos que se dê de forma sempre proporcional e na maior extensão

possível em toda a gama de concentrações de interesse. Ao longo dos anos, têm sido propostos vários processos de pré-conversão *"batch"*. O procedimento mais usado [92] consiste em aquecer as amostras durante 90 min. a 60°C num vaso aberto; há, também, quem sugira um aquecimento durante 20-30 min. a 90°C num vaso fechado. Outras propostas podem ser encontrados em diversas referências; Postel e Beier sugerem 60 min. a 80°C [168]; Inoue propõe 10min. a 90°C [93], ou ainda Pajunen que usa 60-70°C durante 45 min. [159], entre muitos outros, o que vem demonstrar a diversidade de procedimentos.

Esta falta de uniformidade tem sido referida pelos diversos comités de análise das diferentes associações de cervejeiros; por exemplo, no relatório publicado com um teste interlaboratorial comparativo de métodos de análise de diacetilo efectuado em 1991 pela American Society of Brewing Chemists [8], chega-se à conclusão que todos o métodos de pré-conversão utilizados envolvem procedimentos comuns de arejamento e aquecimento. Embora o arejamento não tenha constituído um grande ponto de diferença entre os laboratórios (ou por incorporação do ar do "headspace" ou por incorporação do oxigénio durante o transvase da cerveja), existem contudo grandes diferenças entre os laboratórios no que diz respeito ao tratamento térmico, que pode ir dos 60°C aos 100°C e ter uma duração entre os 10min. e as 2h. Esta disparidade alerta para a possibilidade de se estar a converter diferentes quantidades de α-acetolactato em diacetilo consoante o procedimento de pré-conversão utilizado, e por isso já na altura era recomendada uma uniformização dos procedimentos de pré-conversão [9, 10, 11, 12]. A existência de um equipamento para efectuar este tipo de pré-conversão em linha poderá permitir uma unificação dos procedimentos; actualmente, um dos problemas é precisamente a falta deste equipamento no mercado [9, 10, 11, 12].

2.1.4.1. Catalisação da reacção de pré-conversão – efeito de vários factores

A conversão do α-acetolactato em diacetilo é uma reacção não catalisada enzimaticamente, não sendo necessária a levedura para a pré-conversão dos precursores; pelo contrário, é necessário remover a levedura o mais depressa possível após recolha da amostra para evitar que se reinicie a síntese de diacetilo.

Esta reacção de pré-conversão é bastante afectada por uma diversidade de factores físico-químicos, como a temperatura, o pH, a presença de oxigénio e, ainda, a presença

de determinados catiões metálicos ou agentes químicos em solução [9, 10, 11, 12, 81, 85, 87]. Faz-se seguidamente referência ao efeito de alguns destes parâmetros.

Efeito da temperatura:

Como se deduz dos procedimentos utilizados na pré-conversão, o aumento da temperatura promove a reacção de forma muito significativa. Contudo, o aumento excessivo da temperatura pode ser contraproducente. De facto, no caso de se utilizarem temperaturas acima dos 88ºC, que é o ponto de ebulição do diacetilo, pode haver perdas deste composto por evaporação, pelo que para temperaturas acima dos 80ºC é aconselhável utilizar vasos fechados. O uso de temperaturas elevadas pode ainda promover reacções laterais de produção de diacetilo, como reacções de Maillard, o que irá ser discutido adiante.

Efeito do pH:

O pH tem um efeito acentuado na conversão dos ácidos α-acetohidroxilados em α-dicetonas. Verifica-se que a valores de pH mais baixos há um favorecimento da descarboxilação [202], com o consequente aumento da velocidade da reacção [76, 87, 92].

Efeito de catiões metálicos:

A reacção de auto-oxidação espontânea do α-acetolactato em diacetilo é catalisada pela presença de catiões metálicos em solução [49, 87, 203]. de Man et al, em 1959, publicaram um trabalho em que mostraram o efeito de diversos iões [49]; entre os iões testados, verificaram que apenas o Fe^{3+}, o Cu^{2+} e o Al^{3+} catalisam a descarboxilação do ácido α-acetoláctico a pH 4,8, e a pH 2,2 apenas os iões Cu^{2+} e Fe^{3+} são activos.

A reacção de descarboxilação oxidativa envolvendo o Cu^{2+}, que foi apresentada na figura II-18, também se verifica para o Fe^{3+} e dá-se por via de um mecanismo no qual se forma como intermediário um complexo organometálico entre ambos os compostos [49, 87].

Uma das formas de promover a reacção é adicionando $CuSO_4$ [140], mas há autores que indicam que mesmo quantidades vestigiais destes catiões são suficientes para promover a reacção [87]. O uso do Cu^{2+} é preferido relativamente ao uso do Fe^{3+}, uma vez que este, na forma de Fe^{2+}, é paralelamente um catalisador da oxidação directa da acetoína

em diacetilo, o que poderá levar ao aumento dos níveis de diacetilo sem ser por via do α-acetolactato [203].

O potencial redox da cerveja e a presença de O_2:

Como se referiu anteriormente, a pré-conversão do α-acetolactato em diacetilo é uma descarboxilação oxidativa. No entanto, também poderá ocorrer uma descarboxilação simples, sendo o produto final a acetoína e não o diacetilo, o que poderá dar origem a erros por defeito na determinação deste.

O potencial redox da cerveja bem como a presença de oxigénio são dos parâmetros que mais interferem no deslocamento destes equilíbrios; de acordo com Inoue et al (1968), a conversão de α-acetolactato em diacetilo dá-se em muito maior extensão para um potencial redox superior, sendo vulgarmente referenciado como valor limite o rH= 10 [96, 97]. O oxigénio, como sucede com outros aceitadores de electrões como os catiões metálicos já referidos, favorece a descarboxilação oxidativa bem como o aumento da velocidade de reacção [87, 140].

A adição de agentes redutores, como o Fe^{2+} ou o hidrogenossulfito de sódio [95, 96] promove a descarboxilação não oxidativa com formação directa de acetoína pelo que é desaconselhado o seu uso na preparação de amostras.

2.1.4.2. Interferências na análise - vias alternativas de formação do diacetilo

A possibilidade de o diacetilo ser formado, durante a preparação da amostra e a determinação, por vias que não a descarboxilação oxidativa do α-actolactato, tem sido ainda pouco estudada, e poderá ser em determinados casos um factor relevante para a qualidade de resultados do próprio método. O diacetilo, não sendo um composto exclusivamente resultante da decomposição do α-acetolactato, pode por isso ser formado por outras vias, e podendo surgir teores de diacetilo anormalmente elevados.

Destas reacções a mais conhecida é sem dúvida a reacção de oxidação da acetoína a diacetilo. O seu mecanismo tem sido alvo de extensos estudos, e embora a reacção se possa dar na presença de oxigénio, não se tem conseguido provar que ocorra nas condições encontradas na cerveja, pelo que é de supor que não constitua uma importante interferência na determinação de diacetilo.

Menos conhecida, mas porventura até mais importante, é a via de formação de diacetilo através de reacções de Maillard. É desde há muito conhecido que o diacetilo constitui um dos produtos resultantes das reacções de Maillard, sendo incluído no grupo de

produtos de fissão. As reacções que lhe dão origem são reacções de segundo nível deste complexo mecanismo, conhecidas como reacções hidrolíticas de fissão. E, embora o diacetilo possa reagir com amino-ácidos numa degradação de Strecker ou ainda sofrer uma condensação aldólica dando origem a outros compostos, na prática verifica-se um balanço líquido positivo, ou seja, forma-se geralmente mais diacetilo do que aquele que é degradado.

A formação de diacetilo por estas vias é portanto favorecida por condições que favoreçam as reacções de Maillard, das quais se destaca o aumento da temperatura, e/ou as que promovam dentro das reacções de Maillard as vias de fissão hidrolítica, como seja o pH elevado. Embora até à data exista pouca informação sobre estas vias de formação na cerveja durante a pré-conversão, encontra-se descrito um aumento da formação de diacetilo de forma ininterrupta com o aumento do tempo de pré-conversão e em especial nos casos em que esta se dá a elevada temperatura, para além de se encontrarem referenciados aumentos mais elevados de diacetilo quando se coloca a cerveja a pH 7,7 ou 8,3 [8, 30, 31, 98].

Embora estas observações indiciem que poderá ocorrer formação de diacetilo por outras vias durante a preparação da amostra, e durante a determinação, na verdade nenhum trabalho em concreto foi ainda feito para estudar estes mecanismos e a sua interferência na determinação de diacetilo na cerveja.

2.1.5. Métodos de determinação de diacetilo na cerveja

Desde que em 1939 Shemwell associou o diacetilo ao aroma a manteiga existente na cerveja, a determinação do diacetilo tem sido uma das mais importantes análises efectuadas à cerveja. Uma prova disso é a contínua evolução dos métodos de análise desde então e até aos nossos dias. Na tabela II-2 são apresentados diversos métodos de determinação de diacetilo na cerveja, bem como várias das respectivas referências bibliográficas.

Uma análise cuidada dos métodos disponíveis mostra que não existe nenhum método capaz de determinar directamente o diacetilo na cerveja, uma vez que todos possuem em comum procedimentos de pré-conversão e de separação da amostra antes da sua detecção. No que diz respeito à detecção existem métodos electroquímicos e espectroscópicos. Os processos de separação propostos são a destilação, simples ou por

arrastamento de vapor, a pervaporação e a cromatografia, gasosa ou líquida de elevada eficiência.

Tabela II-2. Alguns métodos de análise de diacetilo na cerveja

Separação	Detecção	Referências
Destilação	***Espectrofotometria***	7, 14, 30, 54, 62, 70, 77, 91, 97, 130, 156, 157
	Polarografia/Voltametria	22, 111, 177, 178, 179
Cromatografia Gasosa	***Ionização com Chama (FID)***	18
	Captura de electrões	15, 32, 57, 60, 85, 86, 88, 89, 92, 109, 131, 140, 174, 181, 202, 201
	Espectrometria de Massa	119, 132
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	***Espectrofluorimetria***	142, 209
	Espectrofotometria – U.V.	20, 200
Pervaporação	***Espectrofotometria***	105, 156
	Voltametria	21, 180
Outros		13, 56

Até à data apenas dois métodos encontraram implementação em larga escala pelos cervejeiros, sendo considerados como métodos de referência. O mais antigo permite a determinação de α-dicetonas após a destilação da cerveja e a detecção espectrofotométrica das quinoxalinas resultantes da sua derivatização com a OFDA. O mais recente, é o método por cromatografia em fase gasosa (pela técnica de headspace) com detector de captura de electrões, que permite a determinação independente do diacetilo e da 2,3-pentanodiona.

O método espectrofotométrico tem vindo a cair em desuso por diversas razões, das quais se destacam: não permitir a distinção entre o diacetilo e a 2,3-pentanodiona; possuir um limite de detecção da ordem de grandeza do nível de α-dicetonas encontrado actualmente nas especificações de cerveja. A lentidão e a necessidade de uma grande intervenção do analista têm sido outros factores que têm vindo a desaconselhar o uso do método.

Por seu lado, o método cromatográfico, embora apresente uma boa qualidade geral de resultados, também tem várias desvantagens importantes, das quais se destacam: o elevado custo do equipamento, que impede a sua aplicação em centros de produção de cerveja de menor dimensão; a baixa cadência de resultados, com cada análise a demorar cerca de 110 min., ainda que possa ser aumentada até uma cadência até 4 resultados/h no caso de utilização de um amostrador automático com forno para gestão de várias amostras, mas com novo aumento do custo do equipamento. A cromatografia gasosa pode, ainda, apresentar algumas interferências da matriz, como o etanol, o SO_2, o acetaldeído, entre outros, o que pressupõe a necessidade de uma nova calibração sempre

que se mude de tipo de cerveja ou se esteja a trabalhar com amostras de diferentes fases do processo de fermentação/maturação.

Contudo, a maior desvantagem comum aos dois métodos é a sua inadequação para serem utilizados fora do laboratório, inviabilizando a realização de análises nas caves de fermentação, junto aos tanques de fermentação.

Neste trabalho propõe-se a construção de um equipamento baseado no sistema apresentado no capítulo 1, capaz de ultrapassar algumas das dificuldades encontradas nos métodos de referência, inclusive esta última, de análise de diacetilo na própria linha de produção.

2.1.6 Pervaporação como método de separação do diacetilo – princípios e aplicações como técnica analítica de separação

Actualmente, no desenvolvimento de novos métodos analíticos, a componente de separação apresenta uma importância cada vez maior. Este facto é justificado pelas novas exigências que se vão colocando aos químicos analíticos, com a necessidade de desenvolvimento das análises em diversas vertentes como a quantificação de novos compostos, descoberta de novos analítos, maior selectividade da análise e, por vezes, ainda, uma diminuição dos limites de detecção. Não é por isso de estranhar que hoje em dia uma grande maioria dos métodos analíticos tenha pelo menos um passo de separação.

No que se refere ao diacetilo na cerveja, não existem métodos directos de determinação, devido à elevada complexidade da matriz. Por este motivo é necessária uma separação antes de efectuar a detecção, sendo de destacar a utilização de destilação simples ou por arrastamento de vapor e de técnicas cromatográficas, nomeadamente em fase gasosa e líquida de elevada eficiência. Mais recentemente, a pervaporação encontrou aplicação na separação de diacetilo em cerveja em sistemas de FIA [105, 156].

Para o desenvolvimento de um sistema "em-linha" de determinação de diacetilo em cerveja, é necessário dispor de um sistema de separação em linha e proceder à sua integração. Dadas as limitações dos processos de destilação e a complexidade dos sistemas de cromatografia líquida, optou-se pelo desenvolvimento de um sistema de pervaporação para a separação do diacetilo da cerveja, dada a sua maior simplicidade, robustez e adaptabilidade a sistemas de análise em fluxo.

Neste sub-capítulo, apresenta-se uma breve discussão sobre a técnica de separação por pervaporação, indicando os princípios pelos quais se rege e referindo algumas das suas aplicações.

2.1.6.1 Sistemas de pervaporação – características, propriedades e princípio de funcionamento

A pervaporação é uma das mais recentes tecnologias de separação. Esta técnica integra-se no grupo de técnicas de separação ditas não cromatográficas, nas quais por exemplo também se incluem a destilação, a extracção supercrítica, a diálise, o processo de difusão de gás, a extracção líquido-líquido, a permuta iónica, a evaporação em contínuo, a precipitação entre outros [51].

Os princípios da pervaporação foram desenvolvidos nos anos 70, aparecendo a primeira aplicação analítica utilizando esta técnica logo em 1981 [197]. Contudo, foi apenas nos anos 90 que começaram a aparecer várias aplicações utilizando este processo de separação tanto a nível industrial como laboratorial.

A técnica de separação por pervaporação combina num mesmo módulo a sequência de dois fenómenos: a evaporação do analito para o espaço de volatilização ("headspace"/"air-gap") e a difusão de gás contendo o analito, através de uma membrana selectiva. Neste método não existe contacto entre a amostra, que pode ser líquida ou sólida, e a membrana, o que o distingue perfeitamente da técnica de difusão de gás ("gas-diffusion"), na qual existe contacto directo entre a amostra e a membrana [108, 149].

Quando se comparam os dois métodos, verifica-se que a pervaporação apresenta uma superior durabilidade e mantém a mesma eficiência, sensibilidade e características ao longo do tempo, pois evita a colmatação da membrana e a passagem de interferências não voláteis, como sucede em muitas das situações quando se utiliza o processo de difusão de gás [141].

As membranas de separação constituem na pervaporação, como em muitas das restantes técnicas não cromatográficas, um importante parâmetro do processo. A escolha de uma membrana correcta pode permitir uma separação mais efectiva dos compostos evaporados [51]. A área de modificação e desenvolvimento de novas membranas apresenta actualmente uma forte expansão o que atesta bem a importância crescente destas técnicas.

As membranas utilizadas nos módulos de pervaporação podem ser simples, modificadas ou apenas com superfície modificada. Esta modificação de superfície pode, ainda, ser permanente ou transitória, podendo inclusive ser efectuada *"in loco"*.

Os módulos de pervaporação têm sido igualmente utilizados adicionalmente com função de reactor, para além da função de separação. As reacções podem dar-se em diferentes fases do processo: na câmara de doação, para converter o composto a analisar num outro mais volátil, por exemplo; na membrana, quando, por exemplo, esta tem na sua composição grupos que reajam com interferências diminuindo a sua recuperação no pervaporado; na câmara de recepção, que pode, por exemplo, conter um agente derivatizante que converta o composto a analisar num outro que seja mais facilmente detectável.

Do ponto de vista funcional a pervaporação é um processo relativamente simples, que pode ser traduzido em quatro passos envolvendo a evaporação e permeação através de uma membrana [141], conforme se pode ver esquematicamente na figura II-20. No 1º passo, dá-se a volatilização do analito na câmara inferior, denominada de câmara de doação, onde se encontra o líquido ou sólido a separar. No 2º passo, o analito, no estado gasoso, desloca-se no "headspace" por difusão e/ou convecção até à membrana, localizada entre a câmara doadora e a câmara receptora, onde o composto é recolhido. A passagem do composto através da membrana constitui o 3º passo do processo. No 4º e último passo dá-se a recolha do pervaporado na câmara de recepção, que pode ser feita por difusão do analito gasoso na câmara ou, no caso de aí existir um líquido, por dissolução do composto pervaporado seguida de difusão.

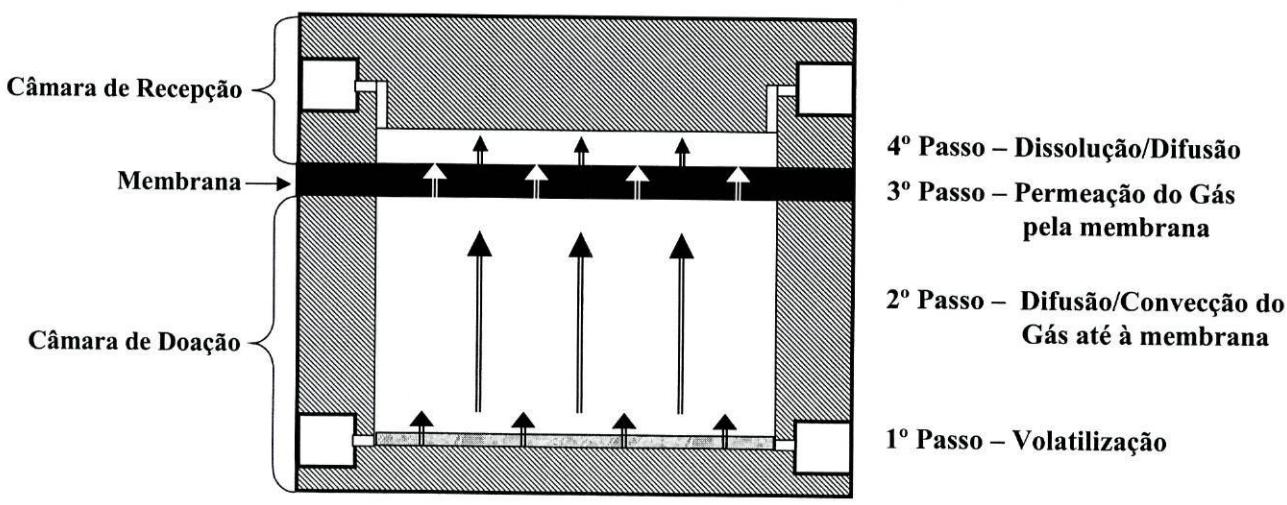


Figura II-20. Esquema de funcionamento de um módulo de pervaporação.

2.1.6.2 Tipos de pervaporação – modelos esquemáticos e aplicações

A pervaporação tem diversas aplicações analíticas, que envolvem a recuperação dos pervaporados quer na fase gasosa quer na fase líquida [46]. Estas diferentes aplicações resultaram no desenvolvimento de diferentes modelos e tipos de pervaporação.

Os módulos de pervaporação podem ser usados em fluxo, com passagem contínua ou descontínua quer das amostras para pervaporar quer dos pervaporados para análise, e a alteração do modo de funcionamento dos módulos pode permitir regular taxas de recuperação. Por exemplo, com a paragem de um líquido de recolha de pervaporados e a passagem contínua de amostra é possível inclusive utilizar os módulos de pervaporação para concentrar os compostos a analisar[36].

Apresenta-se, em seguida, os 4 diferentes tipos de estruturas de pervaporação possíveis. Destes, apenas os tipos I e II são verdadeiramente equipamentos de pervaporação; os tipos III e IV podem igualmente ser considerados sistemas de difusão de gás, e são aqui incluídos por também serem muitas vezes identificados na bibliografia como módulos de pervaporação.

Pervaporação do tipo I:

Este é o mais antigo tipo de pervaporação utilizado com fins analíticos, envolvendo a recolha de um pervaporado gasoso [139, 169]; o esquema do módulo pode ser observado na figura II-21. Este tipo de módulo está associado a sistemas de detecção de amostras na forma gasosa, sendo actualmente muito utilizado como interface para preparação de amostras para injecção em aparelhos de cromatografia gasosa, substituindo as técnicas convencionais por "headspace" e "purge and trap" [47, 74]. Tal como em todos os outros modelos, podem ser utilizadas amostras no estado líquido recorrendo a métodos em fluxo; contudo, também podem ser utilizados para efectuar análise de sólidos, sendo neste último caso necessário abrir o módulo para introdução das quantidades desejadas [108].

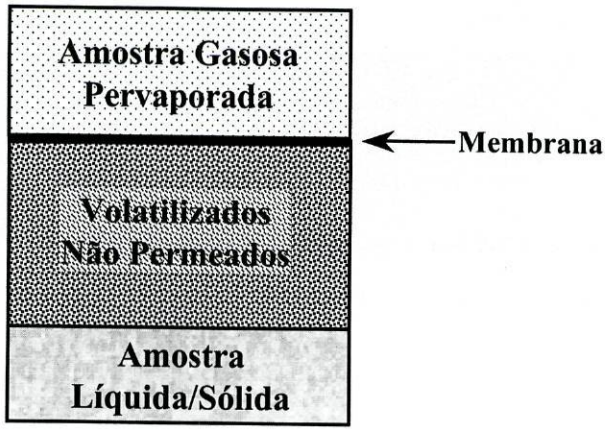


Figura II-21. Sistema de pervaporação do tipo I

Pervaporação do tipo II:

Neste tipo de pervaporação existe um líquido de recolha na câmara de recepção, o que implica que após a permeação o analito tem de se dissolver e difundir nesta solução [36, 50, 78, 79, 105, 136, 137, 138]. Na figura II-22 é apresentado um esquema deste tipo de módulos de pervaporação. Estes estão particularmente vocacionados para injecção de pervaporados líquidos para um detector em fluxo, podendo também servir na preparação de amostra para utilização em linha com cromatografia líquida. Este tipo de estrutura de pervaporação é adoptado no trabalho de determinação de diacetilo em linha desenvolvido nesta tese.

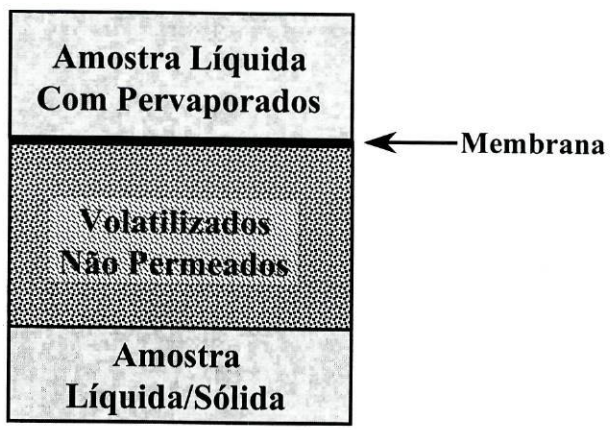


Figura II-22. Sistema de pervaporação do tipo II

Pervaporação do tipo III:

Este tipo de módulo é muito idêntico aos utilizados em técnicas de difusão de gás para a recuperação de pervaporados no estado gasoso [65]. Na figura II-23 é apresentado um esquema deste tipo de módulos de pervaporação, podendo-se observar que o líquido a analisar entra directamente em contacto com a membrana, e por isso o mecanismo é diferente do anteriormente descrito por não existir um espaço gasoso ("air gap"/"headspace") a separar a amostra da membrana. O tipo de mecanismo envolvido pode variar consoante o tipo de membrana: com uma membrana hidrófobica, o primeiro passo é a volatilização do analito directamente para o interior da membrana, seguido de permeação e difusão na câmara de recepção; com uma membrana hidrofílica, há primeiro uma adsorção do analito à superfície da membrana, seguida da difusão através da membrana e volatilização na outra extremidade, sendo por fim difundido na câmara de recepção [74].

Este tipo de pervaporação é especialmente aplicado em processos industriais nas áreas agro-alimentar, de bio-processamento e ainda em aplicações ambientais, como por exemplo na eliminação de compostos orgânicos em lamas activadas, entre muitas outras [65].

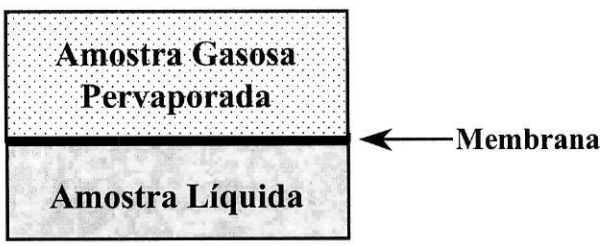


Figura II-23. Sistema de pervaporação do tipo III

Pervaporação do tipo IV:

Este tipo de módulo constitui uma alteração do anterior e está especialmente concebido para recuperação em fase líquida dos pervaporados, tal como se pode verificar pelo esquema apresentado na figura II-24. Estes módulos de pervaporação permitem a utilização de caudais elevados de amostra, sendo a membrana uma barreira física que

impede a subida do nível do líquido na câmara de doação. Desta forma ultrapassam-se as dificuldades por vezes encontradas nos módulos do tipo II, que podem ter problemas quando se utilizam caudais de passagem de amostra muito elevados, ou amostras muito densas.

Este módulo possui uma câmara intermédia adicional entre a câmara de doação e a de recepção, a denominada câmara de volatilização, e apresenta características comuns aos módulo II e III, sendo o seu mecanismo de funcionamento a fusão dos mecanismos de pervaporação desses dois modelos.

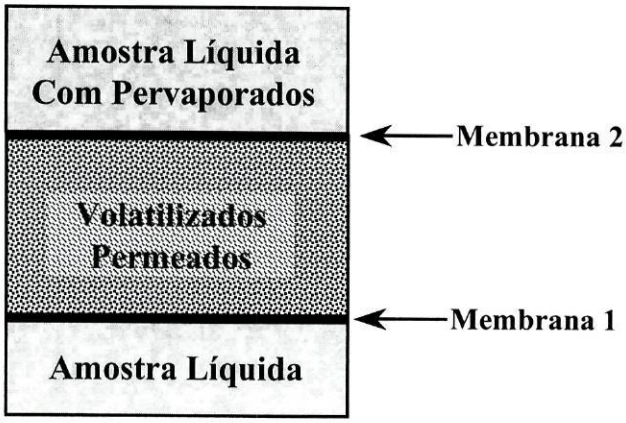


Figura II-24. Sistema de pervaporação do tipo IV

2.1.6.3 Separação de diacetilo por pervaporação

A utilização da pervaporação para separação do diacetilo é bem conhecida, tendo sido primeiro utilizada por Prizing et al em 1990 [170], e posteriormente por vários outros autores, tanto a nível industrial como laboratorial [23, 24, 104, 105, 156, 160, 172, 186]. Foi precisamente com base nos bons resultados que têm vindo a ser apresentados por esta técnica que se resolveu introduzir a pervaporação como processo de separação em linha na determinação de diacetilo na cerveja com detecção voltamétrica em fluxo [180]. Particularmente importante como ponto de partida deste trabalho foi o modelo de módulo de pervaporação do tipo II, apresentado por De Mattos et al, em 1995 [51]; este modelo constitui a base de uma nova arquitectura de pervaporadores que se adapta muito bem ao desenvolvimento de novos métodos analíticos.

2.2. Determinação em fluxo de diacetilo e dicetonas vicinais na cerveja – estudo "off line"

Como se referiu no primeiro capítulo desta parte II, algumas quinoxalinas têm características que lhes permitem serem determinadas por voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio. Uma dessas quinoxalinas, a 2,3-dimetilquinoxalina (2,3-DMQ), resultante da reacção de derivatização entre o diacetilo e a o-fenilenodiamina (OFDA), foi numa primeira fase utilizada como composto modelo para o desenvolvimento de todo o sistema de detecção, no qual se incluí princípios, desenho do injector e configuração do sistema. Subsequentemente a análise de diacetilo na cerveja foi a primeira aplicação deste sistema de detecção. A 2,3-DMQ foi escolhida como base de trabalho para desenvolvimento do detector por dois motivos: o primeiro prende-se com as características químicas e electroquímicas desta quinoxalina que se enquadram de forma perfeita nos fundamentos e requisitos que regem o funcionamento e aplicabilidade deste detector, das quais se destacam a rapidez e a reversibilidade da reacção electroquímica no eléctrodo e a sua forte adsorsão à superfície da gota de mercúrio; o segundo foi o interesse em desenvolver um detector sensível que permitisse a análise em fluxo de diacetilo na cerveja.

Neste sub-capítulo é estudado o comportamento do detector em fluxo e do próprio sistema para a detecção da 2,3-DMQ, bem como a sua aplicação na quantificação de dicetonas vicinais na cerveja, como alternativa ao método espectrofotométrico.

O método voltamétrico proposto para a determinação do diacetilo envolve uma reacção de derivatização com a o-fenilenodiamina (OFDA) usada em outros métodos descritos para determinação de compostos α-dicarbonilados. Nesta reacção, esquematizada na figura II-25, o diacetilo é convertido quantitativamente na 2,3-dimetilquinoxalina, que é o composto que é electroquimicamente detectado.

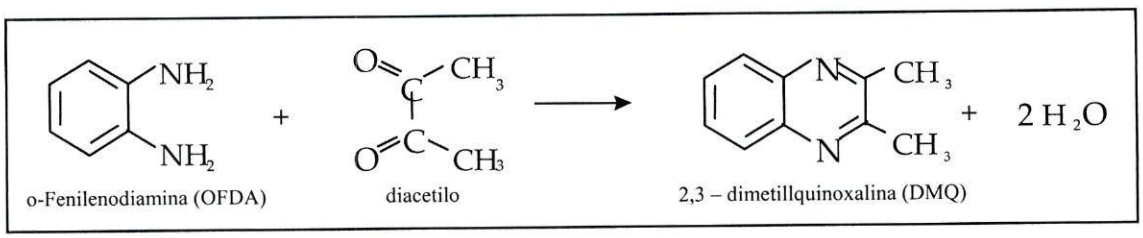


Figura II-25. Reacção de derivatização entre a o-fenilenodiamina e o diacetilo.

2.2.1. Instrumentação, reagentes e soluções

2.2.1.1. Instrumentação

Para a realização deste trabalho foi utilizada a seguinte instrumentação dividida em categorias distintas:

Instrumentação de pesagem:

- Balança analítica Mettler®, modelo AE50 – utilizada para pesagem rigorosa de reagentes e padrões.
- Balança Mettler®, modelo PE2000, para pesagem de reagentes.

Medição rigorosa de volumes:

- Micropipetas Gilson® Pipetman, modelo P1000, para volumes compreendidos entre 200 e 1000μL.
- Micropipetas Gilson® Pipetman, modelo P200, para volumes compreendidos entre 20 e 200μL.
- A medição de volumes de solução superiores a 1,00mL foi efectuada com material de vidro aferido.

Instrumentação diversa:

- Tina de ultra-sons Bandelin® Sonorex, modelo TK30, para dissolução, homogeneização e desgaseificação de reagentes e padrões.
- Medidor de pH Metrohm®, modelo 605, equipado com um eléctrodo de vidro combinado Metrohm®, Ref.: 6.02.02.000.
- Válvula de injecção de 4 vias da marca Rheodyne®, modelo 5041, para injecção de amostras para análise.
- "Loop" de injecção de 500μL em Teflon (PTFE), marca Rheodyne®.

Equipamento de espectrofotometria:

- Espectrofotómetro Hitachi® UV-VIS de feixe duplo, modelo U-2000.
- Células espectrofotométricas em quartzo, marca Hellman®, com espessura de 1,001 cm.

Equipamento voltamétrico:

- Sistema voltamétrico EcoChimie®, modelo Autolab® PGSTAT 10, controlado através de um computador pessoal equipado com o software GPES® para Windows® – versão 4.4.
- Posto de polarografia Metrohm®, modelo 663VA Stand, com eléctrodo multimodo de mercúrio (MME); eléctrodo de referência de AgCl/Ag (KCl 3M); e eléctrodo auxiliar de grafite.

Equipamento de propulsão e tubos de ligação:

- Bomba peristáltica Gilson®, modelo minipulls 2.
- Tubos de peristáltese em policloreto de vinilo (PVC) com dois diâmetros internos diferentes: respectivamente de 0,35mm e 1,54mm de diâmetro interno; e cujos débitos de caudal foram devidamente calibrado na bomba peristáltica.
- Tubos de ligação em teflon (PTFE), 0,8mm de diâmetro interno e 1,6mm diâmetro externo, marca Omnifit®.
- Ligadores de 5/36'' da marca Gilson®.

2.2.1.2. Reagentes, soluções e padrões

Foi utilizada água "Ultrapura" na preparações de todas as soluções e de padrões. Esta foi obtida através de um processo de purificação que engloba sequencialmente a passagem num sistema de permuta iónica, um passo de destilação e passagem final por um sistema de purificação de água "Simplicity" da Milippore®.

Tabela II-3. Reagentes e quantidades utilizados na preparação das soluções.

Solução	Reagente	Preparação
Cloreto de hidrogénio 0,1M	HCl 37%, p.a., Merck®	Diluir 8,4mL de cloreto de hidrogénio concentrado em 1000mL de água.
Tampão fosfato, 0,1M, pH 7.	HNa_2PO_4, p.a., Merck®.	Dissolver 14,1g de hidrogenofosfato de sódio em água, ajustando o pH por adição de HCl 1M, e diluir a 1000mL.
o-fenilenodiamina	o-fenilenodiamina, paa síntese, Merck®.	Dissolver a quantidade pretendida em solução tampão ou água e colocar num frasco escuro ou opaco, mantendo-se o mais possível ao abrigo da luz. Preparação diária.

Tabela II-4. Reagentes e quantidades usadas na preparação das soluções padrão empregues nos estudos efectuados.

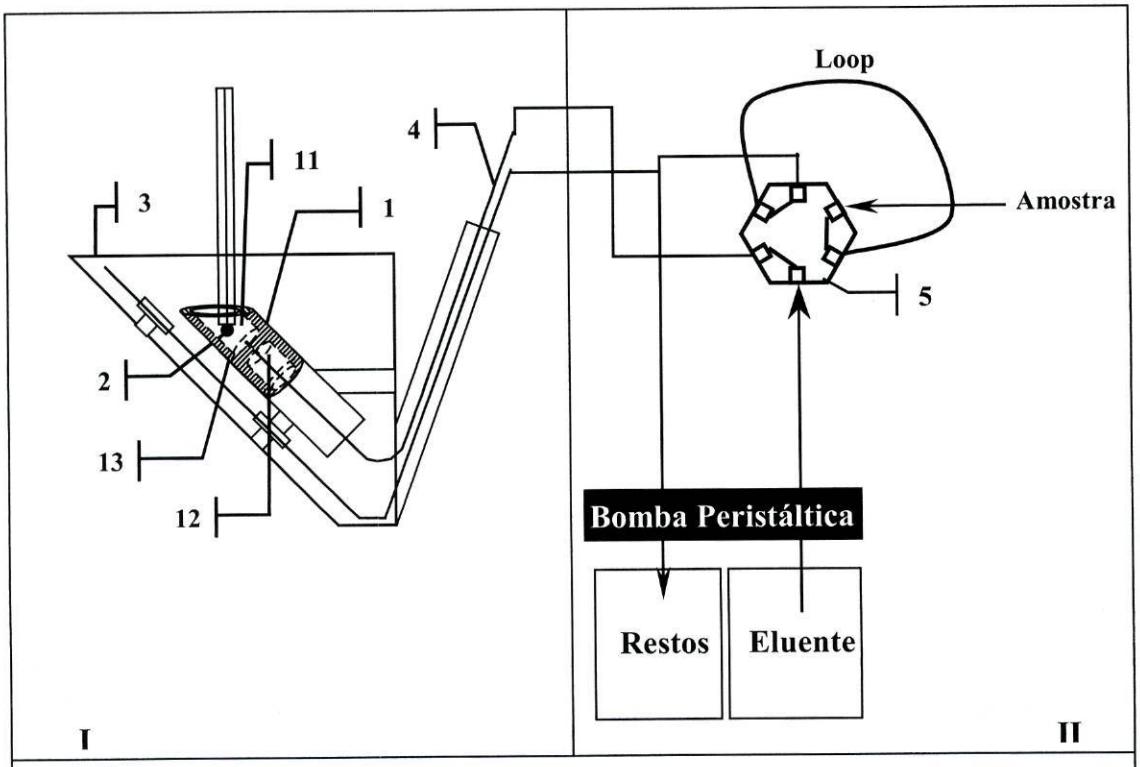
Solução Padrão	Reagente	Concentração	Preparação
2,3-dimetilquinoxalina (2,3-DMQ)	2,3-DMQ, Aldrich®, 97% pureza.	$1{,}00\times10^{-3}$M	Pesar rigorosamente 158 mg de 2,3-DMQ e dissolver em 100,0mL de água com auxílio de ultra-sons.
2-metilquinoxalina (2-MQ)	2-MQ, Aldrich®, 97% pureza	$1{,}00\times10^{-3}$M	Pesar rigorosamente 144mg de 2-MQ e dissolver em 100,0mL de água com auxílio de ultra-sons.
Diacetilo (DAC)	2,3-butanodiona, Aldrich®, 97% (líquido) pureza.	$2{,}50\times10^{-3}$M 215 ppm	Pesar rigorosamente 108mg de diacetilo e diluir em água, num balão de 500,0mL. Preparação semanal e armazenada a 4°C.
2,3-pentanodiona (2,3-PTD)	2,3-PTD, Aldrich®, 98% (líquido) pureza.	$2{,}50\times10^{-3}$M 250 ppm	Pesar rigorosamente 125 mg de 2,3-PTD e diluir em água, num balão de 500,0mL. Preparação semanal e armazenada a 4°C.

2.2.2. Sistema de voltametria com fluxo

O sistema de detecção por voltametria com fluxo para determinação "off line" de diacetilo e dicetonas vicinais encontra-se esquematizado na figura II-26. O sistema pode ser dividido em duas partes: a célula voltamétrica de fluxo com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (Parte I) e o sistema de propulsão e injecção (Parte II). Como se pode ver nas figuras II-26 e II-27, o capilar do eléctrodo de mercúrio de gota suspensa entra no injector, sendo a sua posição ajustada de tal forma que o fluxo esteja alinhado em direcção à gota de mercúrio. Os eléctrodos de referência e auxiliar devem igualmente encontrar-se mergulhados dentro da solução contida na célula de vidro, na qual o nível de electrólito é mantido constante por acção de um dreno ligado em contracorrente que suga o excesso através da bomba peristática. Na figura II-26, são apresentados pormenorizadamente os componentes do sistema. De referir que quer a célula de vidro quer o injector foram projectados e construídos no âmbito deste trabalho.

O eléctrodo de mercúrio utilizado possui o mesmo tipo de montagem utilizado nas determinações estáticas por polarografia, pelo que este sistema funciona com qualquer posto de voltametria comercial Metrohm®. A montagem do sistema de voltametria dá-se

por simples introdução do capilar na cavidade de injecção, tendo o cuidado de centrar a ponta do capilar em relação ao orifício de injecção.



Legenda:

1- Injector voltamétrico
- 11- Cavidade de injecção.
- 12- Conector-fêmea para ligação do tubo de transporte da amostra.
- 13- Orifício para queda da gota de mercúrio.

2- Gota de mercúrio suspensa.
3 - Célula voltamétrica em vidro
4 - Tubo de transporte da amostra.
5 - Válvula de injecção.

Figura II-26. Esquema de montagem do sistema de análise em fluxo por voltametria com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. I- Célula voltamétrica em fluxo com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa; II – sistema de propulsão e injecção.

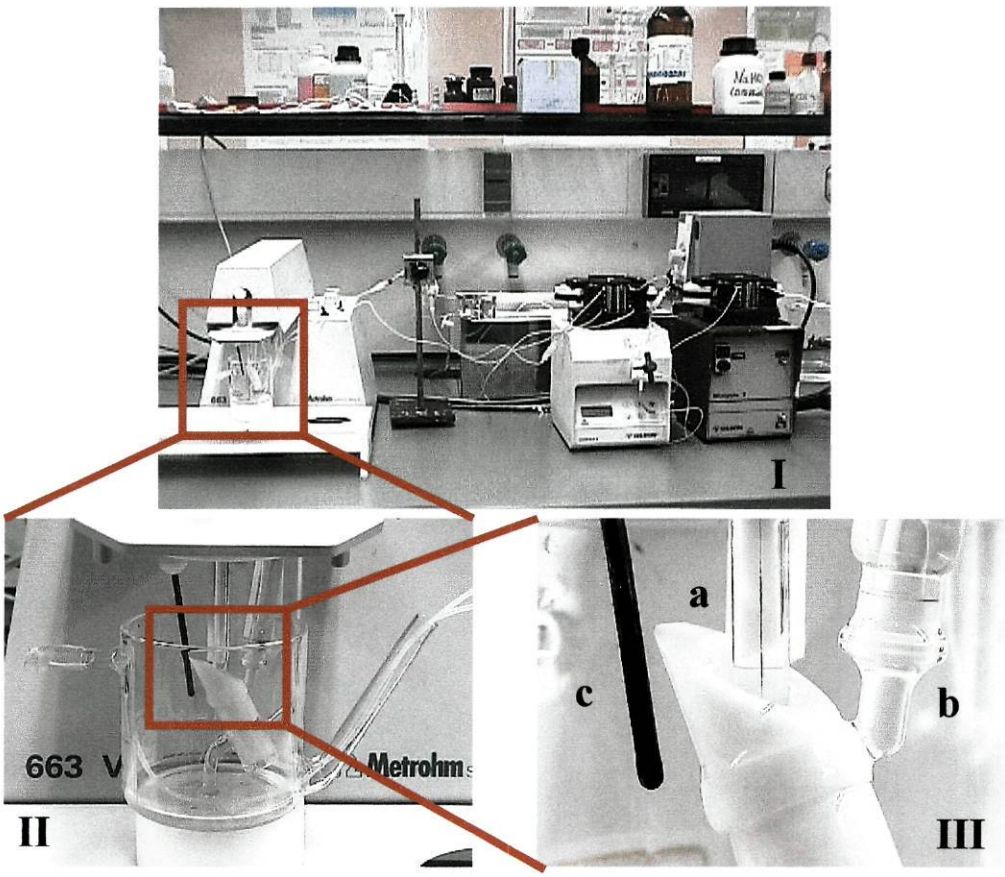


Figura II-27. Fotografias do sistema de análise em fluxo por voltametria com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, utilizado para os ensaios e análises de dicetonas vicinais na cerveja. I - vista geral; II – Vista da célula voltamétrica em fluxo; III – Vista do encaixe entre o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa e o injector (a) bem como das posições do eléctrodo de referência (b) e auxiliar (c).

O funcionamento do sistema segue o princípio dos sistemas de análise por injecção em fluxo – FIA (do inglês Flow Injection Analysis), com a particularidade não se utilizarem tempos de residência elevados, uma vez que se pretende que a dispersão seja mínima no momento da análise e durante o tempo de adsorção.

De facto, dado que as concentrações que se pretendem determinar de diacetilo e dicetonas vicinais são relativamente baixas, e porque a análise voltamétrica propriamente dita é feita de forma pontual e discreta, a redução da dispersão é importante para melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade. Para tal reduz-se a distância entre a válvula de injecção e a cabeça de injecção. Há contudo, outros factores a ter em atenção, em especial o caudal e o volume de amostra injectada.

Na figura II-28 apresenta-se esquematicamente a evolução da chegada da amostra (através de intensidade de corrente de redução da espécie a analisar) em função do tempo após a injecção.

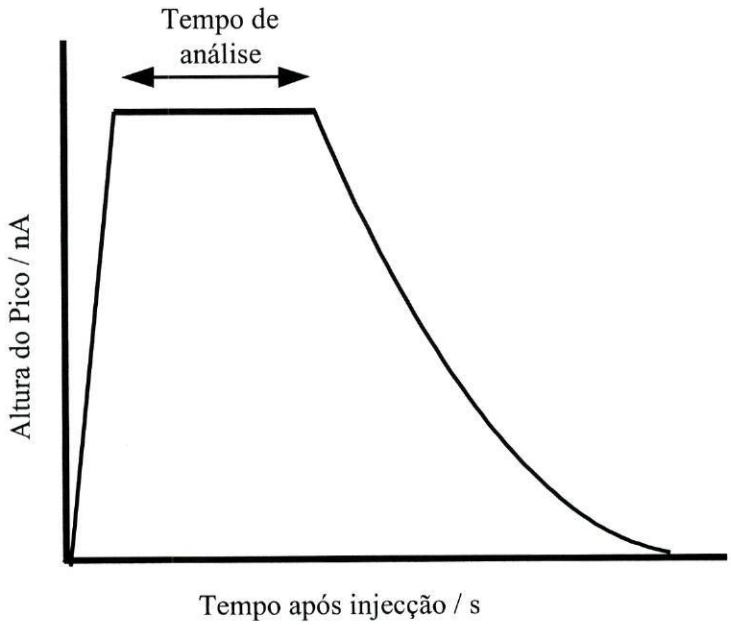


Figura II-28. Perfil de resposta voltamétrica pretendido para a análise de 2,3-dimetilquinoxalina. Tempo de adsorção e de varrimento voltamétrico deve dar-se no patamar.

Como o eluente/electrólito está a ser permanentemente bombeado para o detector, excepto no momento de injecção da amostra, a solução em volta do capilar está a ser permanentemente renovada e limpa.

Para efectuar a análise primeiro coloca-se a válvula de injecção na posição de enchimento e carrega-se a amostra no *"loop"*; de seguida roda-se a válvula para a posição de injecção e ao mesmo tempo inicia-se o procedimento de análise e aquisição de dados no GPES, no qual o tempo de purga foi ajustado de forma a que o período de adsorção e análise se situe dentro do patamar de concentração. Na figura II-29 pode-se observar um procedimento tipo de GPES utilizado para análise "off line" de VDK's na cerveja. No posto de polarografia, Metrohm® 663VA stand, o tamanho da gota de mercúrio foi ajustado para a posição 2.

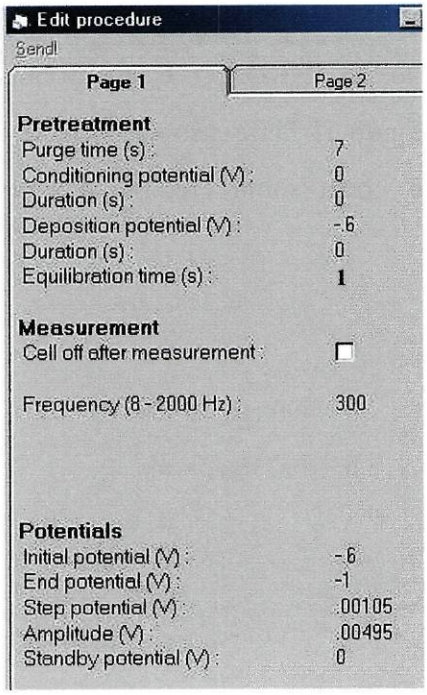


Figura II-29. Procedimento de GPES utilizado na análise "off line" de α-dicetonas na cerveja.

2.2.3. Aplicação do sistema à determinação da 2,3-DMQ

Na determinação de diacetilo, este é previamente convertido em 2,3-DMQ por reacção com a OFDA. Seguidamente, a 2,3-DMQ é adsorvida no eléctrodo e determinada por redissolução catódica, de acordo com a reacção esquematizada na figura II-30. O varrimento do potencial é feito por onda quadrada de elevada frequência, sendo que ambos os passos, de adsorção e varrimento de potencial, ocorrem sem paragem do fluxo, na altura em que existe um patamar de concentração de amostra a chegar ao eléctrodo.

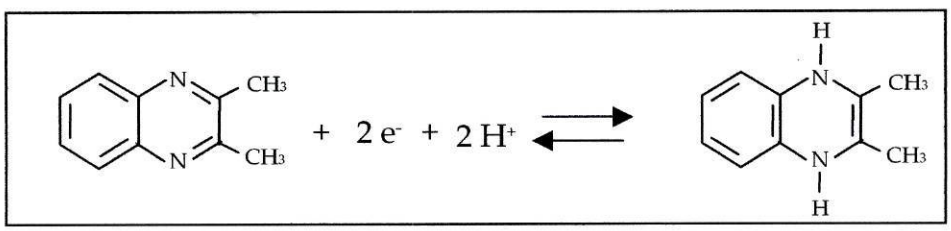


Figura II-30. Reacção de redução da 2,3-DMQ em meio aquoso, pH 7.

2.2.3.1. Cinética da reacção de eléctrodo

Dado que a reacção de redução da 2,3-DMQ é electroquimicamente reversível, conforme se pode observar na figura II-31, o uso da voltametria de onda quadrada permite ganhos de sensibilidade pela soma efectiva das correntes de redução e oxidação.

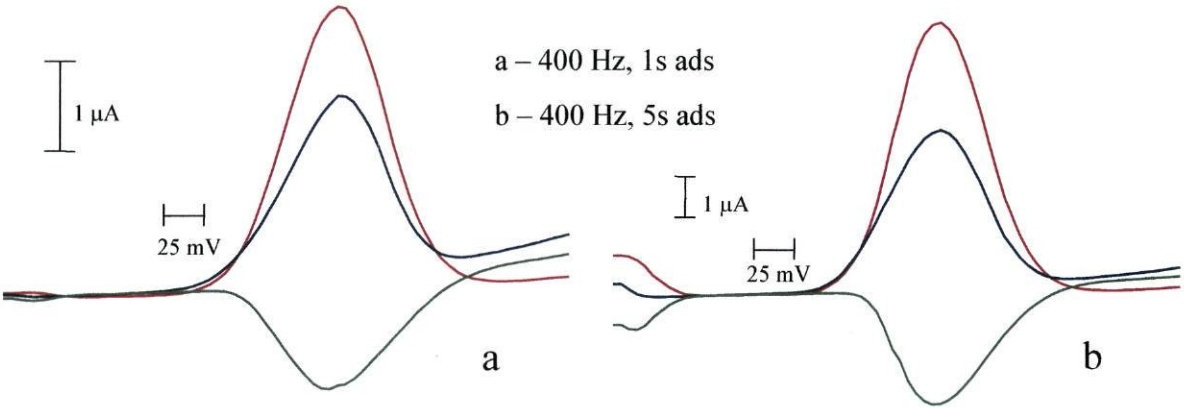


Figura II-31. Voltamogramas de voltametria de onda quadrada obtida para uma solução $1x10^{-5}$M de 2,3-DMQ para diferentes tempos de adsorção, com o sinal total (vermelho) e com decomposição da corrente catódica (azul) e anódica (verde) do varrimento.

Pela análise dos dois voltamogramas apresentados, verifica-se que para as frequências utilizadas não ocorre remoção devida à convecção ou redissolução da espécie reduzida do eléctrodo ao longo do tempo.

A reacção electroquímica de oxidação/redução da 2,3-DMQ no eléctrodo de mercúrio é extremamente rápida, o que permite o uso de elevadas frequências de varrimento em voltametria de onda quadrada, com o consequente aumento pronunciado da altura de pico devido à correspondente diminuição do tempo de amostragem (2ª metade do tempo de impulso para frequências $\geq$ 25Hz). Mas, a principal vantagem do uso de elevadas velocidades de varrimento é que o aumento da sensibilidade da 2,3-DMQ é de tal forma acentuado, que a interferência do oxigénio se torna desprezável (pois a reacção de redução do O_2 é irreversível e mais lenta), permitindo a detecção sem qualquer necessidade de desoxigenação das soluções (frequências acima de 100-150Hz). A figura II-32 ilustra bem este tipo comportamento, podendo-se verificar que é possível fazer determinações mesmo na presença de oxigénio; ocorre um forte aumento da intensidade

de corrente da reacção de oxidação-redução da 2,3-DMQ com o aumento de frequência, muito embora se verifique um menor aumento relativo para as frequências mais elevadas, acompanhado por uma menor definição dos picos. Estes ensaios foram realizados na presença da OFDA, que é o agente derivatizante com o qual o diacetilo reage para dar origem à 2,3-DMQ, pelo que em condições de análise do diacetilo está sempre em solução. Os ensaios foram realizados com 2,3-DMQ ($1x10^{-5}$M) em tampão fosfato 0,1M, pH 7 e OFDA 0,05%. As condições voltamétricas foram as utilizadas no procedimento da figura II-29, a menos da variação da frequência.

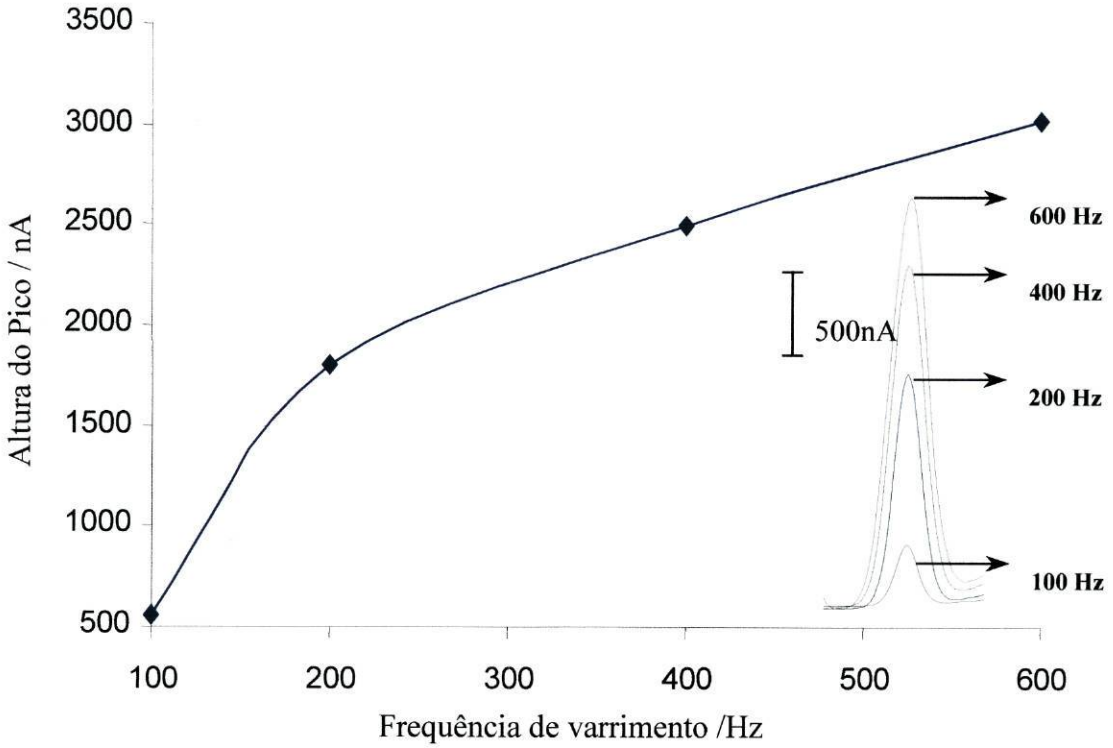


Figura II-32. Variação da altura de pico com a frequência de voltametria de onda quadrada, na presença de OFDA 0,05%, sem desoxigenação das soluções.

Na figura II-33, podem-se observar as curvas de calibração da 2,3-DMQ para diferentes frequências, verificando-se que para concentrações baixas do composto existe proporcionalidade entre a altura de pico e a concentração para 100, 200 e 400 Hz. As condições de análise são igualmente as descritas no procedimento apresentado na figura II-29, com diferentes frequências.

A frequência de 300 Hz foi a considerada mais conveniente, pois para frequências superiores o aumento de sensibilidade não é muito pronunciado, e está associado a uma cada vez pior definição do pico.

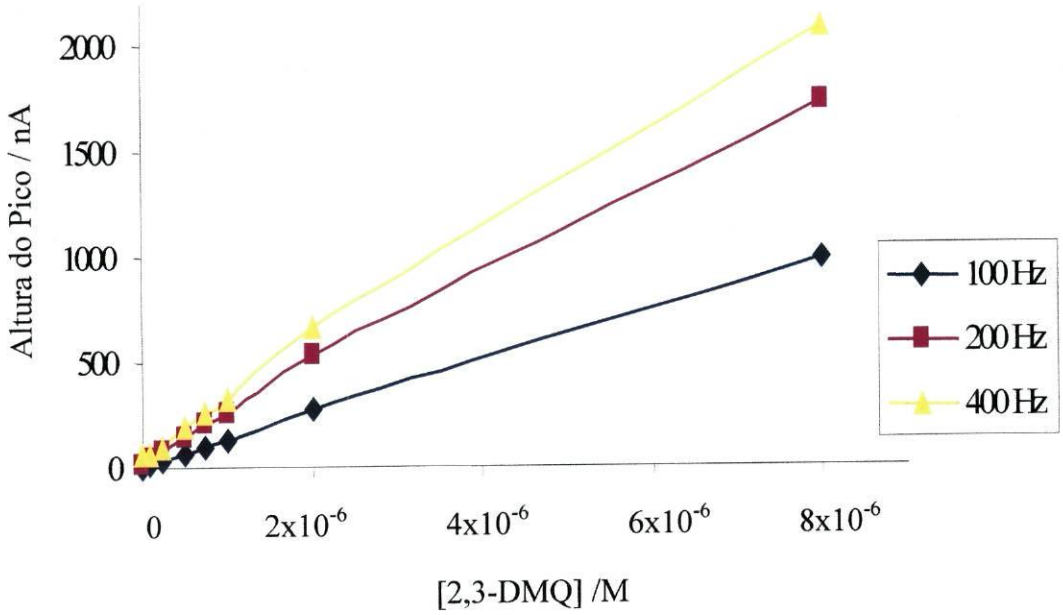


Figura II-33. Curvas de calibração da 2,3-DMQ para diferentes frequências de voltametria de onda quadrada, na presença de OFDA 0,05%.

2.2.3.2. Adsorção da 2,3-DMQ no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa

Outra característica importante da 2,3-DMQ é a sua forte tendência para adsorver à superfície do eléctrodo de mercúrio, o que permite o aumento da concentração efectiva da espécie à superfície do eléctrodo. Os estudos de adsorsão foram feitos utilizando as condições voltamétricas descritas no procedimento da figura II-29, apenas variando o tempo de adsorção. Os ensaios foram feitos na presença de OFDA 0,05%, concentração utilizada na reacção de conversão quantitativa do diacetilo em 2,3-DMQ, de acordo com trabalhos anteriores [106, 164, 178, 177, 22].

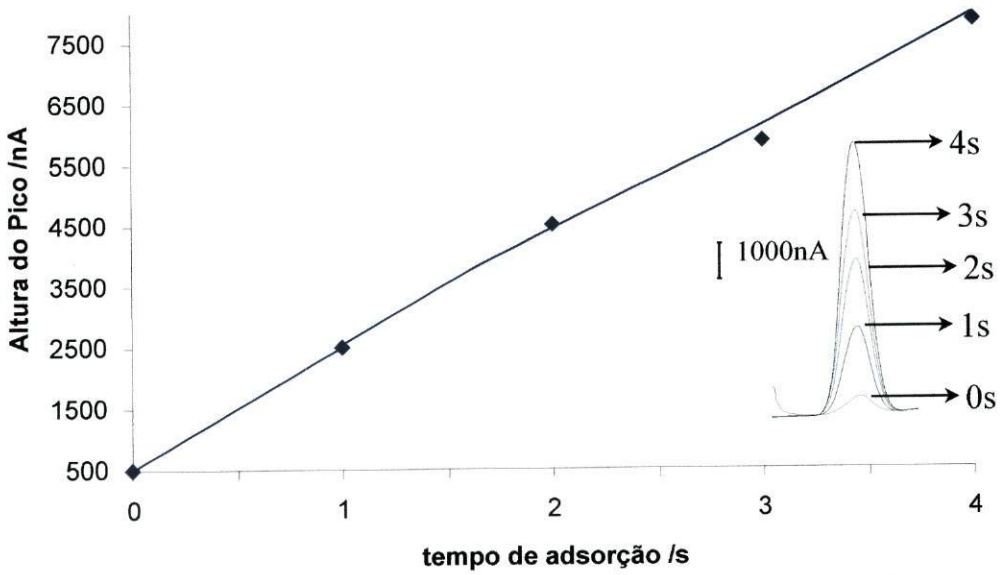


Figura II-34. Variação da altura de pico com o tempo de adsorção, para 2,3-DMQ $1x10^{-5}$M, sem OFDA com frequência de 300Hz.

Conforme se pode observar na figura II-34, a 2,3-DMQ adsorve muito rapidamente sendo apenas necessário 4 segundos para que a resposta analítica de uma solução $1x10^{-5}$M aumente cerca de 20 vezes, sem perda de definição no pico voltamétrico.

Na presença de OFDA o comportamento é substancialmente diferente, pois este composto e/ou seus derivados também adsorvem à superfície do eléctrodo de mercúrio, alterando as isotérmicas de adsorção. Como a OFDA está presente numa concentração elevada, a superfície da gota de mercúrio disponível para a adsorção de 2,3-DMQ é muito menor, pelo que a gota fica saturada muito rapidamente. De facto, como se pode observar na figura II-35, a velocidade de adsorção deixa de ser proporcional ao tempo de adsorção ao fim de apenas 1 segundo.

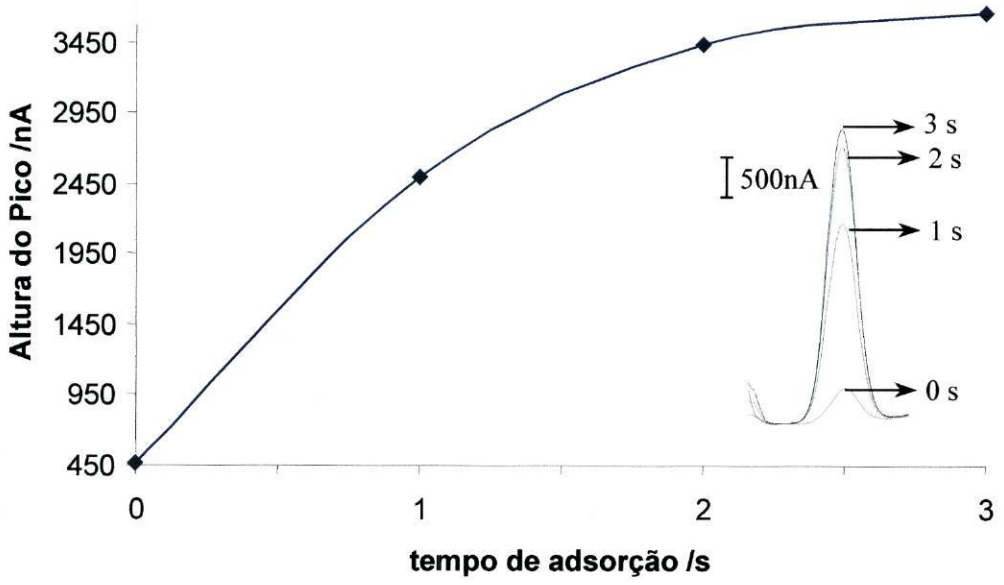


Figura II-35. Variação da altura de pico com o tempo de adsorção, para 2,3-DMQ $1x10^{-5}$M, na presença de OFDA 0,05%, frequência de 300Hz.

Na figura II-36, estão representadas curvas de calibração da 2,3-DMQ, na presença de 0,05% de OFDA, para diferentes tempos de adsorção. Como seria de prever, o uso de maiores tempos de adsorção, apesar de proporcionar uma maior sensibilidade, tem o inconveniente de originar curvas de calibração não lineares, por saturação de eléctrodo. Por isso, decidiu-se optar por um tempo de adsorção de 1s, com o qual se consegue uma calibração linear para concentrações de diacetilo como as que se encontram na cerveja final e na cerveja nas fases de fermentação e maturação.

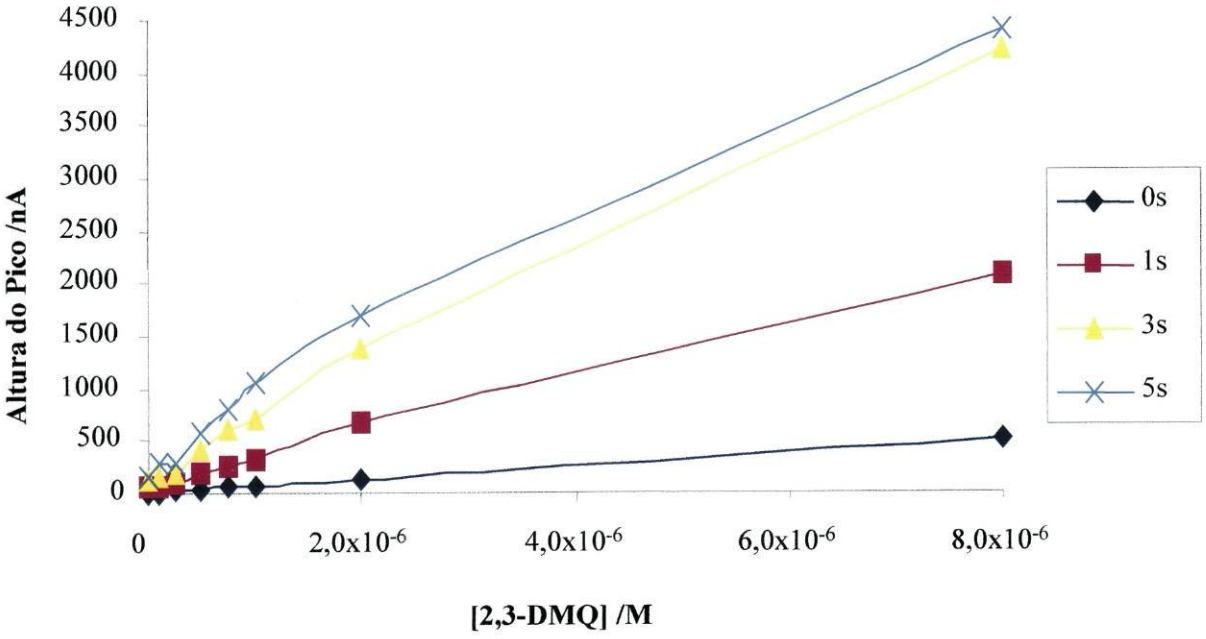


Figura II-36. Curvas de calibração de 2,3-DMQ para diferentes tempos de adsorção, na presença de OFDA 0,05%, e utilizando frequência de 300Hz.

2.2.3.3. O efeito da OFDA na determinação voltamétrica

A OFDA é um reagente bastante instável, podendo degradar-se facilmente sobretudo por acção da luz e do calor, com formação de produtos de degradação electroquimicamente activos. Com o objectivo de verificar se esta situação poderia afectar a determinação da 2,3-DMQ, obtiveram-se as 3 curvas de calibração que se apresentam na figura II-37. A primeira com 2,3-DMQ em tampão fosfato 0,1M pH 7 sem qualquer OFDA, a segunda de 2,3-DMQ em tampão fosfato com OFDA 0,05% preparada na hora e mantida no escuro e portanto preservada de degradação, e a terceira é uma curva da calibração de 2,3-DMQ cujas adições padrão foram efectuadas em tampão fosfato e OFDA 0,05% após terem sido sujeitas a um aquecimento de 70ºC durante 1:30H e por isso claramente alteradas como se constatava pela típica cor amarela que também apresentam as soluções degradadas de OFDA. A condições voltamétricas utilizadas para este ensaio foram as condições finais optimizadas para a detecção da 2,3-DMQ, e que se encontram apresentadas na figura II-29.

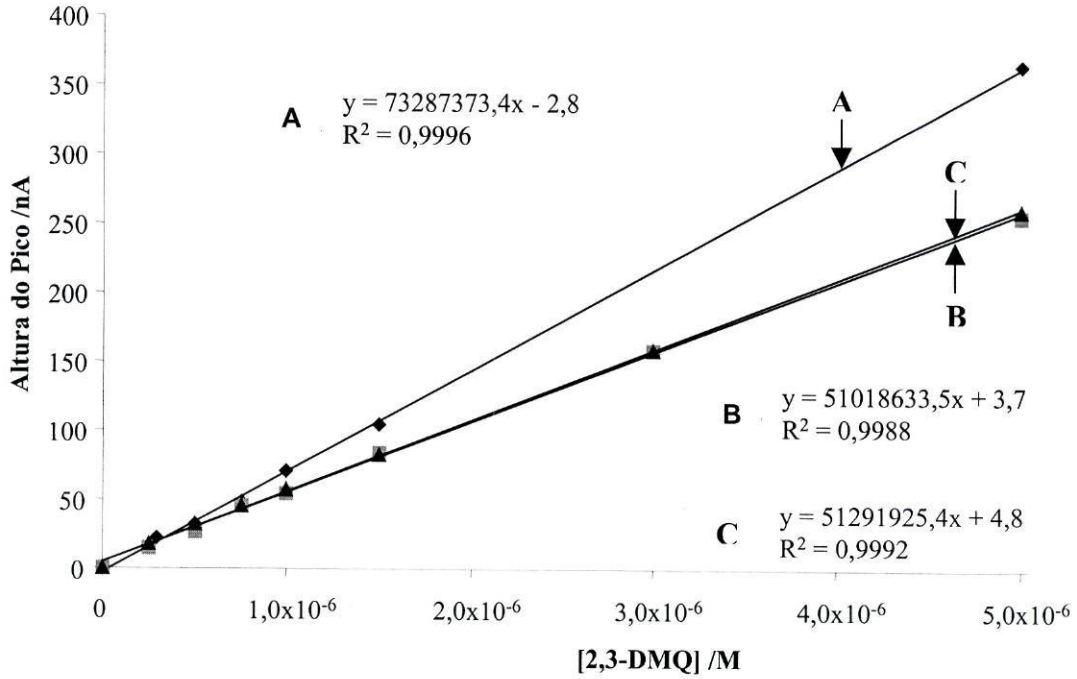


Figura II-37. Efeito da degradação da OFDA nas curvas de calibração da 2,3-DMQ. A – Sem OFDA; B – Com OFDA 0,05%; C- Com OFDA 0,05% degradada.

Como se pode observar as curvas obtidas na presença de OFDA são praticamente coincidentes, pelo que o efeito da sua degradação é irrelevante.

2.2.3.4. Efeito do caudal do fluxo na detecção da 2,3-DMQ

A influência do caudal foi outro dos parâmetros estudados, tendo-se avaliado a resposta voltamétrica para caudais entre 0,35 $mL.min^{-1}$ e 2,55 $mL.min^{-1}$.

Para efectuar estes ensaios é necessário definir a zona de amostragem para cada um dos caudais estudados, sendo esta definida como o espaço de tempo durante o qual se obtém uma constância da resposta voltamétrica. Na figura II-38 são apresentados diagramas esquemáticos com os valores da altura de pico para diferentes caudais. Verifica-se que a intensidade de corrente aumenta com o aumento do caudal, mas é necessário ter em atenção que para caudais muito elevados se diminui o tempo de constância da resposta voltamétrica. Por outro lado, caudais muito baixos além de produzirem sinais inferiores também originam períodos curtos de resposta constante, devido à maior dispersão que a amostra possui. De qualquer forma é necessário ter em atenção que quanto maior for o *"loop"* maior é o período de amostragem, e por outro lado, quanto menor a distância a percorrer até ao eléctrodo menor é a dispersão.

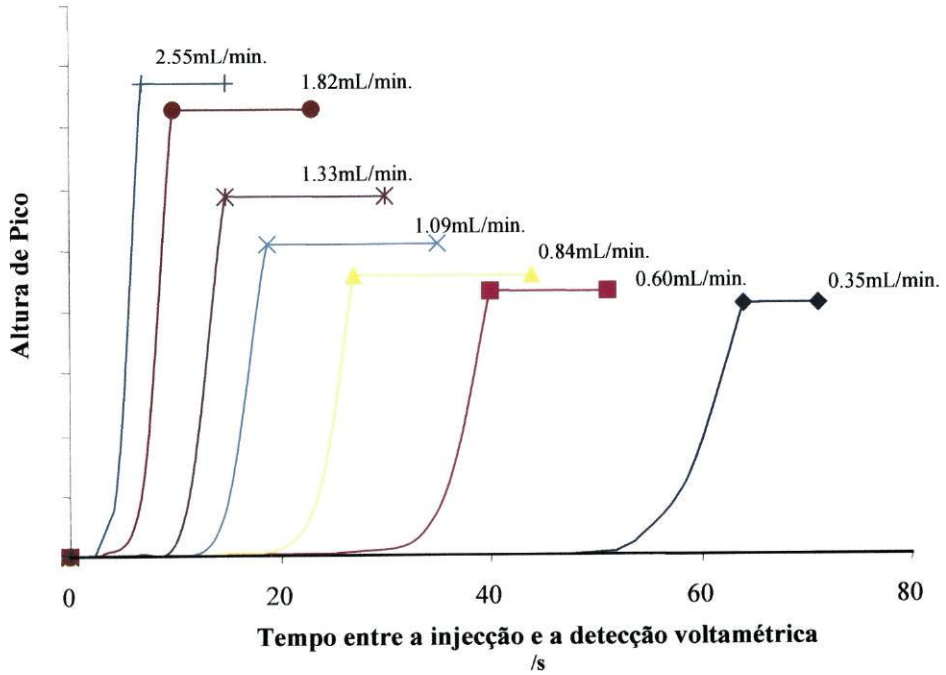


Figura II-38. Sinais voltamétricos obtidos para diferentes caudais. Com 14 cm de tubo de 0,8mm entre a válvula de injecção e o injector voltamétrico, e um *"loop"* de 500µL.

A figura II-39 foi construída a partir dos dados da figura II-38, representando a altura do pico em função da velocidade de fluxo. Neste gráfico, observa-se um aumento da altura de pico com o aumento do caudal. Contudo, acima de 1,5 $mL.min^{-1}$ começa-se a notar mais ruído nos voltamogramas e acima de cerca de 3 $mL.min^{-1}$ a gota não consegue manter-se suspensa caindo devido à turbulência.

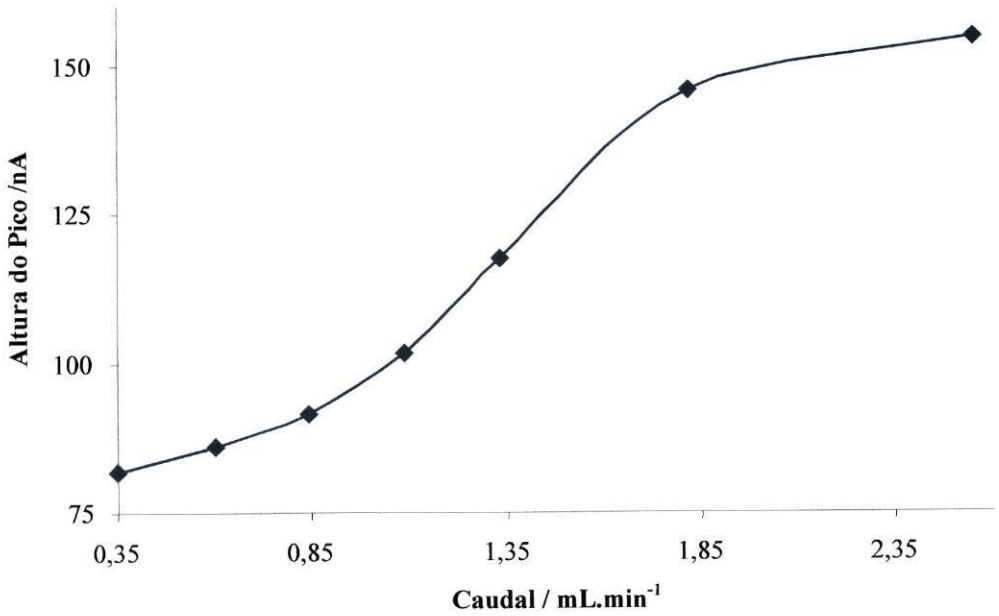


Figura II-39. Efeito do caudal na altura de pico da 2,3-DMQ ,$1x10^{-6}$M, em tampão fosfato 0,1M pH 7 e OFDA 0,05%. 1s de tempo de adsorção e frequência de 300 hz.

Por isso, decidiu-se adoptar um caudal de 1,33 $ml.min^{-1}$, como o melhor compromisso entre sensibilidade e estabilidade do eléctrodo. Além disso, no caso de existir necessidade de aumentar a sensibilidade, é preferível aumentar o tempo de adsorção ou a frequência, evitando-se desta forma aumentos no caudal, que para além de tudo também originariam maiores consumos de eluente/electrólito.

2.2.4. Análise em fluxo de dicetonas vicinais na cerveja por injecção directa após destilação e derivatização com ofda "off line".

Após o desenvolvimento do detector e das condições para a detecção da 2,3-DMQ, procedeu-se à aplicação do sistema à determinação de dicetonas vicinais na cerveja. Não obstante a análise de 2,3-DMQ ser de fácil execução, a análise de diacetilo e dicetonas vicinais na cerveja apresenta complicações adicionais advindas da matriz. Verifica-se não ser possível determinar directamente diacetilo e dicetonas vicinais na cerveja, tendo sido necessário introduzir uma fase de extracção prévia por destilação. Na figura II-40 é apresentado o esquema do procedimento utilizado na análise de dicetonas vicinais na cerveja com detecção por voltametria ou espectrofotometria.

Neste trabalho passou-se a utilizar como medida de concentração os ppb (µg/Kg) em vez da molaridade por ser esta a medida utilizada pelos cervejeiros e por ser aquela que usualmente se encontra na bibliografia, conseguindo-se desta forma uma mais rápida e fácil comparação de referências.

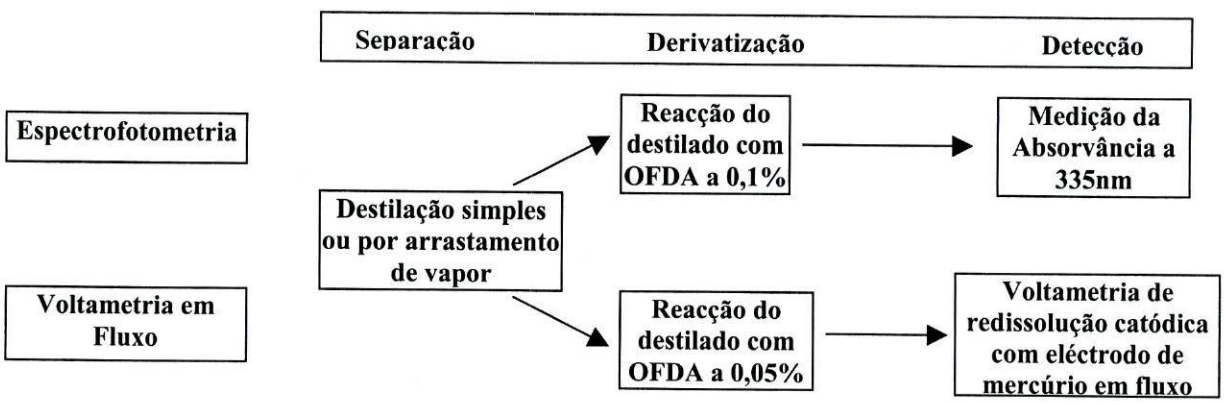


Figura II-40. Esquema de análise de α-dicetonas na cerveja com detecção por voltametria ou espectrofotometria.

2.2.4.1. Separação por destilação

O procedimento tradicional de análise de α-dicetonas na cerveja por espectrofotometria apresenta um passo inicial de separação das dicetonas vicinais por destilação. Em voltametria este passo é igualmente necessário.

Para a destilação de cerveja, dois processos distintos podem ser utilizados, a destilação simples ou destilação por arrastamento de vapor. O primeiro processo é o que se encontra descrito no método de referência para os cervejeiros; contudo a destilação por arrastamento de vapor apresenta vantagens em termos de maior selectividade e eficiência no que concerne à separação. Na figura II-41 estão representados os dois tipos de montagem utilizada nos ensaios efectuados.

A eficiência da recuperação tanto do diacetilo como da 2,3-pentanodiona por destilação é próxima dos 100% para volumes recuperados superiores a 10mL por cada 100mL de cerveja, dados esses que foram confirmados neste trabalho.

Como os resultados obtidos pelos dois métodos não apresentam diferenças significativas, decidiu-se adoptar o método de destilação simples, com a recolha de 25mL de destilado a partir de 100mL de cerveja, conforme está indicado no método de referência.

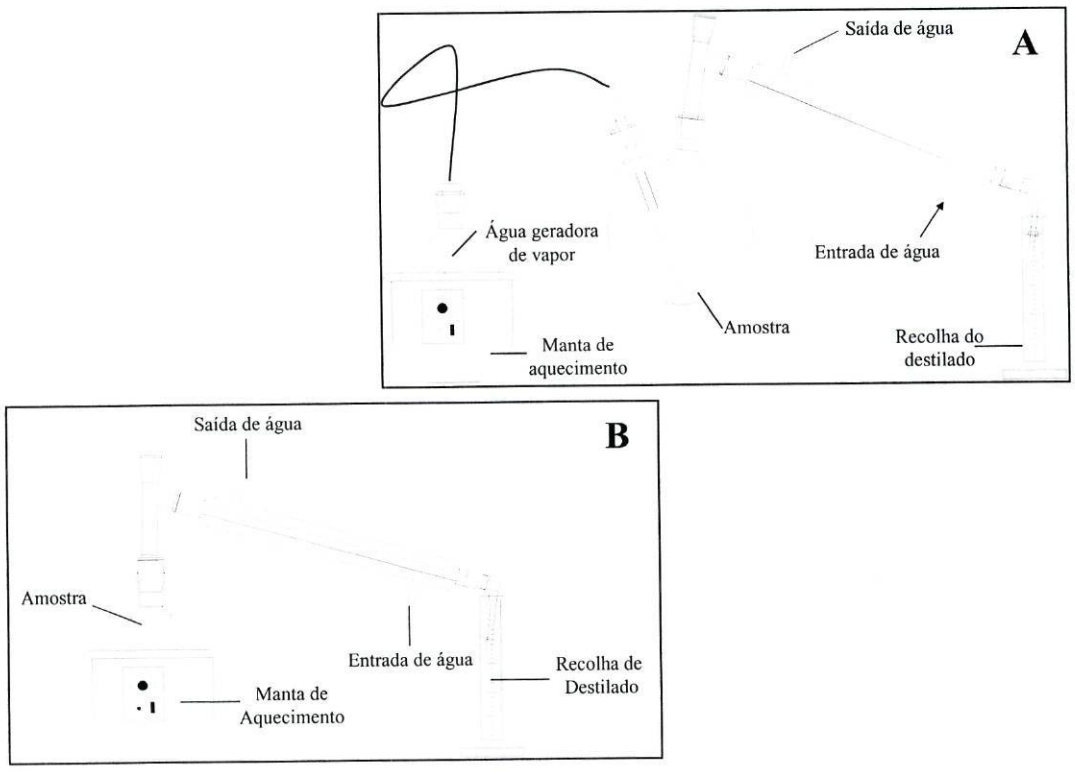


Figura II-41. Esquemas de montagem de destilação utilizados para a separação de α-dicetonas da cerveja. A – Destilação por arrastamento de vapor. B – Destilação simples.

2.2.4.2. Reacção de derivatização

A reacção de derivatização com a OFDA utilizada neste método envolve a conversão quantitativa de compostos α-dicarbolnílicos nas suas correspondentes quinoxalinas, as quais são por seu turno quantificadas. No caso particular do diacetilo forma-se a 2,3-DMQ, de acordo com a reacção que se apresentou na figura II-25. A derivatização da 2,3-pentanodiona é similar, formando-se portanto a 2-etil-3-metilqunoxalina. Como estas são as duas mais importantes α-dicetonas na cerveja, usualmente a determinação de ambas em conjunto é referenciada na industria cervejeira como a quantificação de α-dicetonas, designação que será igualmente usada no decurso deste capítulo.

Tal como o processo de destilação, também a reacção de derivatização e a análise voltamétrica em *"batch"* foram já alvo de estudos aprofundados, tendo-se verificado que em meio tampão fosfato 0,1M, de pH=7 e usando uma concentração de OFDA a 0,05% a reacção de derivatização se completava em 3 minutos e as condições eram convenientes para a análise voltamétrica da quinoxalina formada.

Na figura II-42, está representada a curva de calibração de diacetilo por voltametria em fluxo usando o eléctrodo de mercúrio nessas condições. Para tal procedeu-se previamente à preparação das soluções padrão derivatizadas, as quais foram posteriormente injectadas no sistema de fluxo, com um caudal de 1,33 $mL.min^{-1}$. As condições instrumentais de análise são as descritas no procedimento apresentado na figura II-29.

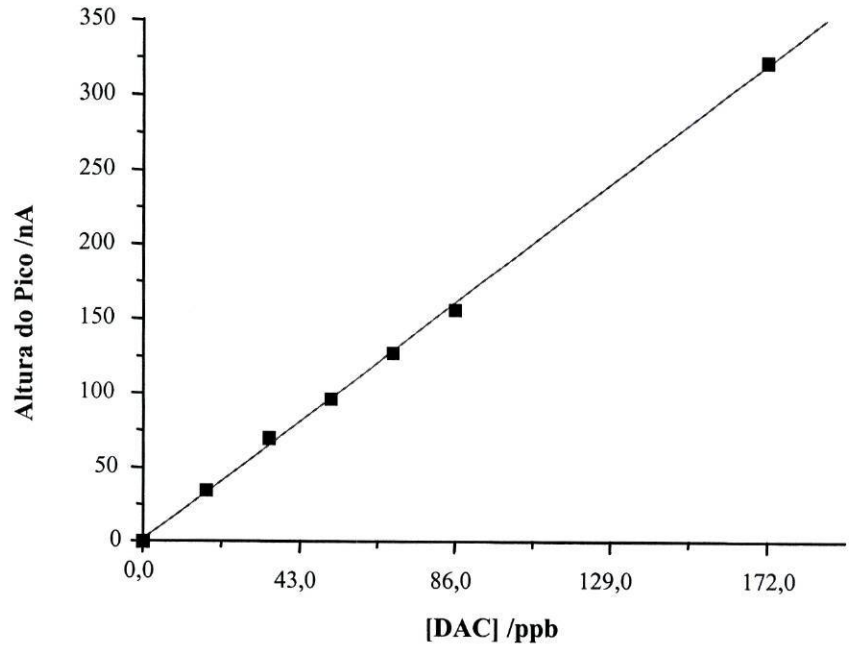


Figura II-42. Curva de Calibração de diacetilo em tampão fosfato 0.1M, pH 7 e OFDA 0,05%.

Como se pode observar, existe uma relação linear entre a quantidade de diacetilo e a resposta voltamétrica obtida. Mais, esta proporcionalidade directa estende-se por uma vasta gama de concentrações, que vai de 8 até 900 ppb, abarcando toda a gama de concentrações de diacetilo que usualmente interessa quantificar na cerveja.

A reacção de derivatização em destilados de cerveja, e a detecção voltamétrica em fluxo foi também objecto de estudo, por forma a determinar até que ponto o efeito de matriz afectaria a determinação de dicetonas vicinais na cerveja.

Conforme se observa na figura II-43 existe um aumento da intensidade de corrente com o aumento do volume de destilado no volume final. Contudo, dado que estamos numa zona de resposta analítica linear, pode-se concluir que a curvatura que se observa é devida à interferência da matriz. Daí seja aconselhável usar adições pequenas de destilado, até 3 mL, para que seja possível efectuar determinações usando o método das adições de padrão (necessidade de comportamento linear).

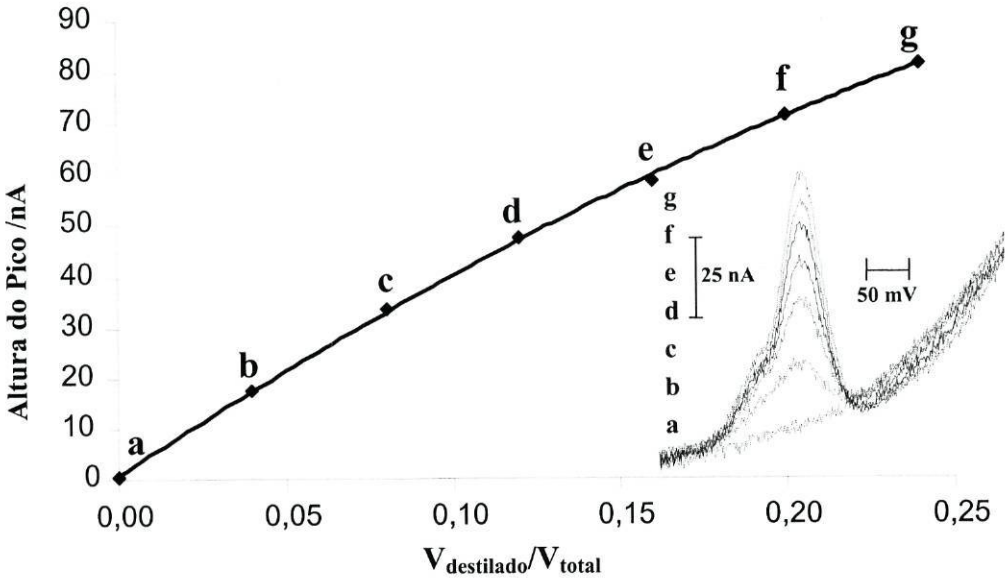


Figura II-43. Efeito do aumento da proporção de amostra no sinal voltamétrico da α-dicetonas. Voltamogramas da variação de intensidade de corrente para diferentes quantidade de destilado. Ensaios em fluxo. Quantidade de destilado adicionado para 25 mL de volume final de solução derivatizada: a – br, b – 1 mL, c – 2 mL, d – 3 mL, e – 4 mL, f – 5 mL, g – 6 mL. Utilizando 1s adsorção e 300 Hz.

2.2.4.3. Optimização dos parâmetros instrumentais

Muito embora seja o diacetilo o composto que se pretende controlar durante o processo de fermentação/maturação, até ao advento das técnicas cromatográficas de separação, as duas principais α-dicetonas presentes na cerveja, o diacetilo e a 2,3-pentanodiona, eram analisadas em conjunto, uma vez que a destilação e a reacção de derivatização com a OFDA não são especificas para o diacetilo. Por esta razão, tradicionalmente, quando se

utiliza o método espectrofotométrico, o termo "nível de diacetilo" refere-se ao conjunto destas duas α-dicetonas. O mesmo sucede na análise voltamétrica, uma vez que as quinoxalinas resultantes destas α-dicetonas possuem o mesmo potencial normal de redução, a cerca de –850 mV, apresentando propriedades e um mecanismo de redução no eléctrodo de mercúrio similares.

O efeito da matriz pode fazer variar consideravelmente as características e condições instrumentais da detecção, pelo que optimizações similares às efectuadas em 2.2.3. foram efectuadas na presença de destilado de cerveja. Partindo do procedimento base apresentado na figura II-29 e mantendo o caudal de 1,33mLmin^{-1}, foram estudados o efeito da frequência e do tempo de adsorção na determinação de α-dicetonas em destilados de cerveja. Utilizaram-se 5,0mL de destilado de cerveja para um volume total de 25,0mL, em tampão fosfato em 0,1M, pH 7 e OFDA 0,05%.

Com se pode observar na figura II-44, a interferência do oxigénio não permite a utilização de frequências de 100 Hz, contrariamente ao que sucede com soluções puras de 2,3-DMQ em fosfato 0,1M, pH 7 e OFDA 0,05%. Verifica-se ainda, apesar do aumento da intensidade de corrente com o aumento da frequência, que os picos se tornam progressivamente menos definidos, o que não era tão evidente na ausência de matriz, como se viu em 2.2.3.. Por isso decidiu-se adoptar um valor de frequência de onda quadrada de 300 Hz, uma vez que a frequências mais elevadas os voltamogramas se tornam menos definidos e as linhas de base são mais elevadas e menos regulares, piorando os limites de detecção e de quantificação. Para além disso para frequências demasiado elevadas, 500Hz ou mais, verifica-se a diminuição da gama de resposta linear.

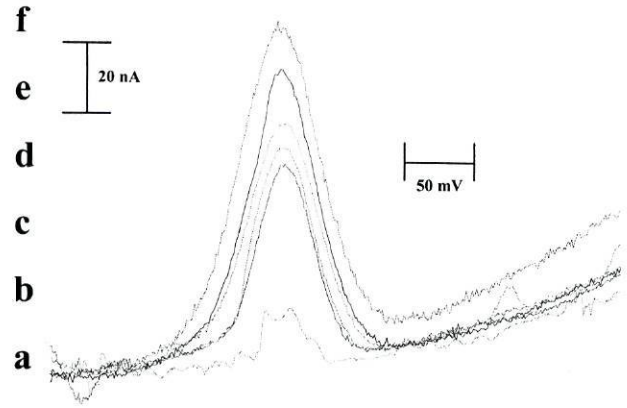


Figura II-44. Variação da intensidade de corrente na determinação voltamétrica em destilados de cerveja em função da frequência de varrimento. Ensaios em fluxo. Frequência de varrimento com voltametria de onda quadrada: a – 100 Hz, b – 200Hz , c – 250 Hz, d – 300Hz, e – 400 Hz, f – 500 Hz. 1s adsorção e 5 mL de destilado em 25mL de solução.

As quinoxalinas são usualmente determinadas por voltametria de redissolução catódica, após um período de pré-concentração no EMGS por adsorção à superfície do eléctrodo. Foi anteriormente verificado que a 2,3-DMQ é um composto rapidamente adsorvido à superfície do mercúrio, o que permite utilizar períodos curtos de adsorção, mesmo quando a concentração de diacetilo é muito baixa. Na célula voltamétrica de fluxo, a adsorção é feita em fluxo, uma vez que o eléctrodo permanece encaixado na cabeça de injecção. O varrimento de potencial é feito directamente, sem interrupção do fluxo.
A figura II-45, ilustra bem o que se acabou de referir, com as quinoxalinas provenientes da derivatização do destilado de cerveja a adsorverem de uma forma tão rápida na gota de mercúrio, que o sinal voltamétrico é praticamente o mesmo para 1s e para 3s de adsorção. Este comportamento pode ser explicado admitindo que na presença do destilado de cerveja poderá ter aumentado a adsorção competitiva ou poderá mesmo ter havido uma modificação da própria superfície do eléctrodo de mercúrio.

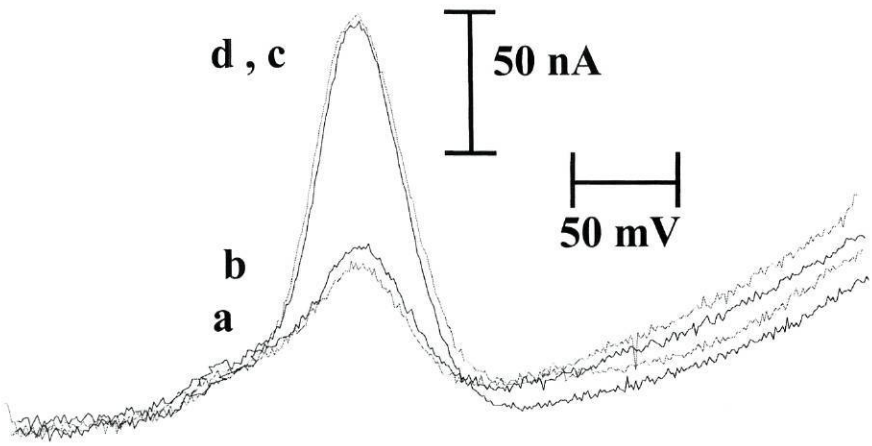


Figura II-45. Variação da intensidade de corrente na análise voltamétrica em fluxo de α-dicetonas de cerveja em função do tempo de adsorsão, para destilado simples e com adição de 86ppb de diacetilo. a – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com 1s adsorção, b – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com 3s adsorção, c – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com adição de $1x10^{-6}$M de diacetilo e 1s adsorção, d – derivatizado de destilado de cerveja (20%) com adição de $1x10^{-6}$M de diacetilo e 3s adsorção.

O caudal utilizado para estes ensaios foi o mesmo que foi optimizado para a detecção de 2,3-DMQ, mas foi necessário introduzir mais alguns procedimentos. Entre estes está a lavagem do sistema e o carregamento do loop com uma nova amostra. Antes de se efectuar a injecção de uma nova amostra é necessário limpar o circuito de injecção, por forma a que não ocorra interferência da amostra precedente. O procedimento adoptado consistiu na passagem de um caudal de 4,5 $mL.min^{-1}$ de eluente durante 3 minutos, com

a vantagem adicional de diluir a concentração de OFDA na solução de electrólito presente na célula de vidro, evitando a sua visível degradação neste vaso ao longo do dia. O carregamento do *"loop"* pode ser feito manualmente, ou bombeando a amostra durante 1 min. com um caudal de 0,75 $mL.min^{-1}$. Este tempo utilizado para carregar e lavar o sistema permite o completar da própria reacção de derivatização.

2.2.4.4. Procedimento para análise voltamétrica em fluxo de α-dicetonas pelo método das adições de padrão

Na tabela II-5, apresenta-se o procedimento utilizado na análise de α-dicetonas em cerveja final ou durante a fermentação e maturação (concentrações até 250 ppb), envolvendo destilação e derivatização "off line", seguida de detecção por voltametria em fluxo num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

Tabela II-5. Procedimento para análise de α-dicetonas na cerveja final e em maturação por voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio utilizando o método das adições de padrão

1º - Destilação das amostras de cerveja:

i) Num balão de 250 mL, coloca-se 100 mL de cerveja

ii) Leva-se a cerveja à fervura e destila-se 25,0 mL da cerveja, devendo o controlo da temperatura ser tal que se destile à velocidade de mais ou menos 1 gota por segundo.

2º - Derivatização das α-dicetonas:

a) Para um balão de 20 mL pipeta-se 4 mL de destilado de cerveja e perfaz-se o volume com uma solução 0,0625% de OFDA em tampão fosfato 0,125M a pH 7.

b) Deixa-se a solução a reagir pelo menos 3 minutos.

3º - Introduz-se a amostra no *"loop"*, por passagem de 1mL de solução derivatizada com uma seringa ou bombeando a amostra.

4º - Procede-se à injecção da amostra contida no "loop" e efectua-se o varrimento voltamétrico na célula voltamétrica de fluxo (caudal de 1,33mL.min^{-1}), carregando de forma síncrona no Start do Software Autolab e rodando a válvula de injecção.

5º - Antes da nova injecção lava-se o sistema com tampão fosfato 0,1M, pH 7, durante 2 minutos a 4,5mL.min^{-1}.

6º - Repetem-se as operações de 2 a 5 para diferentes adições de padrão, efectuadas a seguir à adição dos 4mL de destilado e antes da adição da OFDA em tampão fostato.

7º - Calcula-se a concentração de α-dicetonas na solução derivatizada pelo método das adições de padrão, tendo em atenção que:

$$[DAC]_{cerveja} = [2,3\text{-}DMQ]_{amostra\ derivatizada} \times (20/4) \times (25/100)$$

2.2.4.5. Avaliação do método

Fez-se a aplicação do método desenvolvido para a determinação de diacetilo na cerveja. Na figura II-46, é apresentada uma curva de adição de padrão de diacetilo em amostra de destilado de cerveja, efectuada de acordo com o procedimento descrito. A concentração de α-dicetonas determinada nesta amostra é de 36,4± 7,4ppb, podendo-se observar que é um valor bem superior ao limite de quantificação.

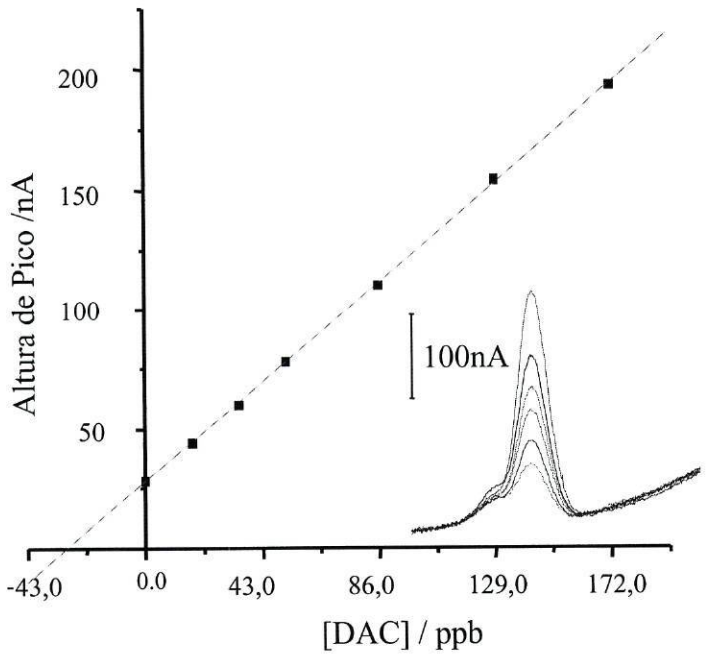


Figura II-46. Determinação de diacetilo em cerveja pelo método das adições de padrão, usando análise voltamétrica em fluxo.

Na tabela II-6 apresentam-se algumas características analíticas e estatísticas da curva de calibração de diacetilo apresentada na figura II-42 e da curva de adição de padrão em destilado de cerveja apresentada na figura II-46. Por análise desta tabela verifica-se que os declives, os limites de detecção e os limites de quantificação são da mesma ordem de grandeza usando o método de curva de calibração ou o método de adição de padrão.

Este sistema de análise voltamétrica em fluxo com eléctrodo de mercúrio permite a determinação de α-dicetonas na solução derivatizada num intervalo de concentrações entre 20ppb a 860ppb, conferindo uma ainda maior versatilidade se atendermos a que a diluição de destilado na solução de derivatizante pode ser maior ou menor do que a proporção de 0,20 utilizada no exemplo da figura II-46.

A detecção voltamétrica de dicetonas vicinais em fluxo apresenta uma excelente repetibilidade (RSD inferior a 2%), podendo ser analisadas até 15 amostras por hora.

Tabela II-6. Características analíticas e estatísticas da análise de diacetilo e dicetonas vicinais em fluxo.

Método	Curva de Calibração	Curva de Adição de Padrão
Figura	*II-42*	*II-46*
Proporção de destilado	*0*	*0,20*
Fórmula	*Y = 1,46+ 1,85X*	*Y= 59,95+ 1,64X*
Coeficiente de regressão linear	*0,9995*	*0,9996*
Limite de detecção	*5 ppb*	*6 ppb*
Limite de quantificação	*18 ppb*	*20 ppb*
Concentração da amostra	*31,6± 2,0 ppb*	*36,4± 2,9 ppb*
Repetibilidade Típica RSD	*<2%*	*<2%*
Nível de Confiança Utilizado	*95%*	*95%*

2.2.4.6. Estudo da interferência do 2-metilglioxal

O 2-metilglioxal é uma α-dicetona que usualmente existe nas bebidas alcoólicas. Ainda que na cerveja a sua concentração não seja, de uma forma geral, muito elevada, pode constituir uma interferência quando se determina concentrações baixas de diacetilo como as que podem existir no produto acabado.

O 2-metilglioxal, sendo uma α-dicetona, também reage com a OFDA. Dá origem à 2-metilquinoxalina, que apresenta resposta instrumental tanto voltamétrica como espectrofotométrica. Esta quinoxalina é portanto voltametricamente activa, e ainda que o seu potencial normal de redução seja distinto do da 2,3-DMQ e da 2-etil-3-metilquinoxalina, a diferença é de apenas 60 mV, sendo o pico da 2-MQ mais anódico. Desta forma se a concentração de 2-MG for suficientemente elevada os dois picos podem se sobrepor, constituindo este composto uma interferência assinalável. Usualmente a interferência do MG pode ser ultrapassada recorrendo a um passo de destilação por arrastamento de vapor [178], mas quando se usa destilação directa a separação do 2-MG não é tão eficiente.

Neste trabalho foi estudada a interferência da 2-MQ na análise voltamétrica em fluxo tendo-se efectuado ainda ensaios por voltametria com célula voltamétrica tradicional em *"batch"*, conforme descrito por José António [106]. Para a análise voltamétrica utilizando o sistema de fluxo desenvolvido, utilizou-se uma amostra derivatizada de destilado de cerveja, cuja concentração em α-dicetonas era de 48 ppb, preparada e analisada de acordo com o procedimento proposto e condições voltamétricas descritas na figura II-29, tendo-se utilizado a mesma amostra de destilado de cerveja para os ensaios em *"batch"*.

Na figura II-47, apresenta-se o gráfico da interferência relativa do pico da 2-MQ no pico da 2,3-DMQ com o aumento da concentração da 2-MQ, e no qual se pode observar grandes diferenças quando se utiliza análise em fluxo ou em *"batch"*. Verifica-se que

para concentrações baixas de α-dicetonas, como a existente nesta cerveja, a interferência da 2-MQ é maior quando se utiliza análise em *"batch"*. A sobreposição dos dois picos ocorre a concentrações mais elevadas quando se utiliza a análise em fluxo, tendo-se considerado como valor máximo admissível de sobreposição dos picos o aumento de 30% do sinal da 2,3-DMQ. Para esta concentração de α-dicetonas (48ppb) este ponto é atingido com uma concentração de 2-MQ 4,5 vezes inferior no caso da análise em *"batch"* relativamente à análise em fluxo. Estas diferenças de comportamento podem ser justificadas pelas alterações impostas dos parâmetros instrumentais, obtendo-se picos mais bem definidos com menor largura a ½ altura no caso da voltametria em fluxo.

Esta redução da interferência poderia ainda ser mais vincada no caso de análise de 2-MG, pois este composto demora cerca de 6-7 minutos a reagir, mais do dobro do tempo do diacetilo e da 2,3-pentanodiona, pelo que se a reacção ocorrer num espaço de 3-4 minutos haverá menos 2-MQ. Contrariamente, no caso da análise voltamétrica em *"batch"* é preciso eliminar o oxigénio, durante 6-8 minutos, o que permite que a reacção ocorra sempre na sua totalidade.

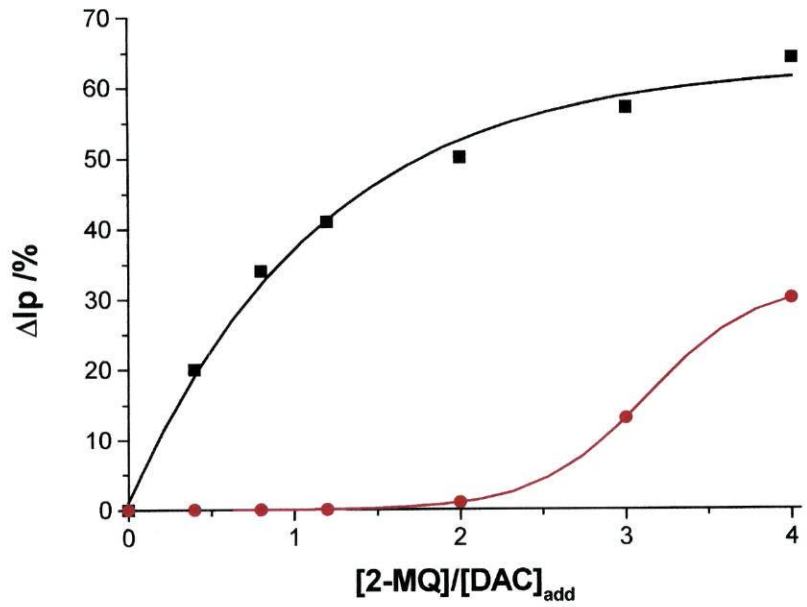


Figura II-47. Interferência da 2-metilquinoxalina na determinação voltamétrica de α-dicetonas em destilado de cerveja (48ppb de α-dicetonas), utilizando análise em batch (■) e análise em fluxo (●).

2.2.4.7. Comparação do método voltamétrico em fluxo com o método espectrofotométrico de referência

Tradicionalmente o nível de diacetilo na cerveja é determinado pelo método espectrofotométrico adoptado pelo European Brewing Convention (EBC) [14], o qual

como já se referiu quantifica não apenas o diacetilo mas também a 2,3-pentanodiona. Embora este método tenha vindo a ser progressivamente substituído pela determinação por cromatografia em fase gasosa (CG) [15], a determinação por espectrofotometria continua a ser utilizado em muitas cervejeiras, em especial as mais pequenas, devido ao custos associados à determinação por CG.

Os resultados obtidos pela metodologia de voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio foram comparados com os fornecidos pelo método espectrofotométrico descrito no EBC-Analytica [14]. Este método de referência baseia-se na análise por espectrofotometria, após destilação e derivatização, conforme o procedimento descrito no anexo II. De notar que os passos de destilação e derivatização são iguais ao do método voltamétrico.

Na figura II-48 estão representadas, para o método espectrofotométrico, a curva de calibração de diacetilo obitda no laboratório da Faculdade de Ciências, e a recta de calibração utilizada na UNICER. Neste estudo de comparação de métodos, as amostras foram pré-convertidas e destiladas separadamente no laboratório de produção da UNICER, seguindo um dos duplicados para a análise de rotina no local de onde vêm os valores de referência, enquanto o outro duplicado seguiu para a análise voltamétrica em fluxo.

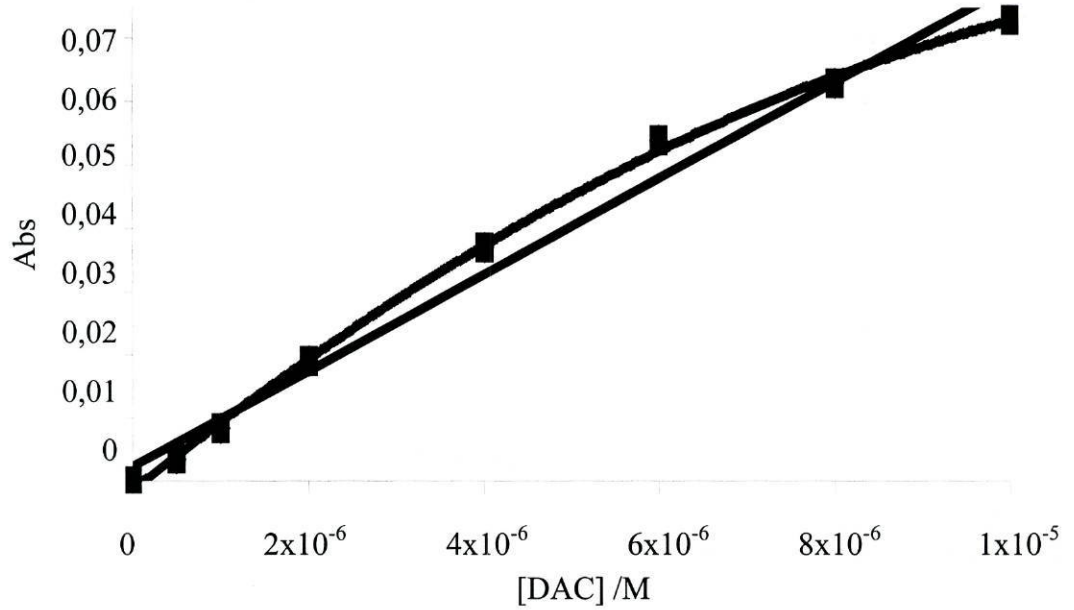


Figura II-48. Curva de calibração de diacetilo obtida por espectrofotometria (segundo EBC-Analytica), com sobreposição da recta de calibração utilizada na UNICER para os cálculos do valor de referência de α-dicetonas.

No gráfico da figura II-48 observa-se, ainda, que existe uma pequena diferença entre a calibração realizada na faculdade e na Unicer. Esta disparidade pode ser justificada pelo

facto de na UNICER se utilizar, por motivos práticos, uma recta de calibração; de facto, a representação linear permite que o próprio software do equipamento proceda ao cálculo automático das concentrações, ao contrário do método da curva de calibração que não é suportado pelo mesmo software.

Foram determinadas as concentrações de α-dicetonas em amostras de cerveja em fermentação, em maturação e em garrafa, e portanto cobrindo a totalidade das fases do processo em que estes compostos são mais relevantes. Os resultados obtidos encontram-se agrupados na tabela II-7.

Por análise desta tabela de resultados verificam-se algumas diferenças entre os métodos. De salientar que relativamente aos valores de diacetilo baixos, está descrito que o método espectrofotométrico dá usualmente valores superiores aos verdadeiros pois não existe correcção para a absorvância do destilado, facto este que aliás explica a diferença obtida para a ordenada na origem, que é justificada pela existência deste erro sistemático [178].

Tabela II-7. Determinação do teor de α-dicetonas em diferentes fases de produção de cerveja pelo método de referência (método espectroscópico segundo o EBC) e pelo método de voltametria em fluxo.

Fase de Produção	**Espectrofotometria Unicer (recta de calibração)**	**Voltametria por Fluxo**	**Espectrofotometria Faculdade (curva de calibração)**
Cerveja em garrafa	90	52 ± 7	93
Cerveja em garrafa	100	59 ± 7	99
Cerveja em maturação	470	361 ± 6	415
Cerveja em fermentação	700	670 ± 7	689
Cerveja em fermentação	810	849 ± 7	881

Na Tabela II-8, podem-se observar elementos estatísticos, obtidos na comparação do método espectrofotométrico com o método voltamétrico, a partir dos quais se pode concluir que os dois métodos apresentam uma boa correlação, a menos de um erro sistemático no método espectrofotométrico, o qual, como já foi referido, se deve à não existência de correcção para o destilado de cerveja (neste método o branco não é feito na presença da matriz).

Tabela II-8. Dados estatísticos da comparação do método voltamétrico em fluxo com o método espectrofotométrico segundo o EBC.

Coeficiente de correlação	0,9903
Erro do declive	0,0559
Erro da ordenada na origem	28,6
Fórmula	Y = 44,9± 28,6 + 0,9799 ± 0,0559 X
intervalo de confiança	95%
n	5

2.3. Determinação em fluxo de diacetilo e dicetonas vicinais na cerveja – estudo "on-line"

A determinação voltamétrica de diacetilo directamente em cerveja não é possível devido à interferência da matriz. Por isso, foi necessário um passo prévio de separação. A técnica escolhida foi a pervaporação, que, devido à sua simplicidade, baixo custo, facilidade de interligação e reduzida dimensão, foi possível adaptar às necessidades deste sistema.

Todo o processo de concepção do equipamento envolveu uma série de desenvolvimentos à volta de uma configuração base, com vista a melhorar a prestação e produtividade do sistema. Neste sub-capítulo é apresentada uma visão global da configuração base do sistema, do seu funcionamento e da perspectiva do desenvolvimento técnico do equipamento ao longo do trabalho.

2.3.1. Instrumentação, reagentes e soluções

2.3.1.1. Instrumentação

As determinações voltamétricas foram efectuadas utilizando um sistema voltamétrico já descrito no sub-capítulo anterior, 2.2..

Neste trabalho foram utilizadas duas bombas peristálticas; uma Gilson® Minupulls 2 (Villiers Le Bel, France), para circuitos de caudal constante como o circuito de cerveja; e uma bomba peristáltica Gilson® Minipulls 3 (Villiers Le Bel, France), para caudais variáveis, controlada via PC através de uma placa de ADC/CAD, board DCPCLD 8115. O tubo utilizado nas bombas peristálticas é em Tygon™ (PVC), com diferentes diâmetros internos, de acordo com os caudais pretendidos. O sistema de fluxo contém uma rede de válvulas solenóides de três vias da NResearch®, modelo 161T031, sendo as tubagens em PTFE (Teflon) de 0.8mm de diâmetro interno.

O módulo de pervaporação foi feito, consoante o modelo, pelas oficinas do Departamento de Física da Universidade do Porto ou pelas oficinas gerais da UNICER, Bebidas de Portugal, SGPS - SA, baseado no modelo descrito por Ivanildo de Mattos et al [51], modificado neste trabalho. Os suportes de membrana desenvolvidos para os módulos de pervaporação foram igualmente fabricados, consoante o modelo, por estas

mesmas duas oficinas. As membranas utilizadas no módulo de pervaporação são em PTFE com 5.0 μm porosidade e 47 mm diâmetro, da marca Gelman® Sciences.

Neste trabalho foram utilizados dois modelos distintos de unidades de aquecimento, para efectuar a pervaporação. Numa fase inicial utilizou-se um banho húmido, da marca Julabo®, modelo Variomag Type E; posteriormente, e por motivos práticos, passou-se a utilizar um bloco de aquecimento com controlo de aquecimento digital, da Falc®, modelo Falc-Termobloc TD150 P3. Neste banho seco foi utilizado um bloco de alumínio com três encaixes devidamente torneados e fresados à dimensão dos módulos de pervaporação do modelo II e III, podendo portanto o bloco aquecer até 3 módulos em simultâneo.

Foi construído um "drive de potência", baseado num circuito integrado ULN 2003, para actuação e alimentação das válvulas solenóides, cujo controlo era feito via software utilizando um PC equipado com uma placa PCL-711s interface card (American Advantech®, San José, CA). O software de controle do automatismo foi programado em Visual Basic® 3.0 (Microsoft®), o qual permite o controlo do automatismo, nomeadamente, bombas peristálicas, válvulas solenóides e gatilho (*"trigger"*) do software de aquisição de dados. A aquisição automática de dados, gravação e processamento dos voltamogramas são feitos pelo software GPES® 4.8 Project, através de rotinas despoletadas pela transmissão de um *"trigger"* externo, através da P2 do Modulo DIO48 do Autolab®, enviado por indicação do software de controlo.

Nos estudos de comparação de métodos foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa Varian 3400 com um detector de captura de electrões da marca Varian®, tendo acoplado um gestor de amostras também da marca Varian®, modelo Genesis auto-sampler.

Para a realização deste trabalho foram utilizados os instrumentos descritos em 2.2.1.1 e ainda:

Medição rigorosa de volumes:

- Micropipetas Socorex® de volume variável, modelo 1000, para volumes compreendidos entre 200 e 1000μL.
- Micropipetas Socorex® de volume variável, modelo 200, para volumes compreendidos entre 20 e 200μL.

Instrumentação e material diverso:

- Tina de ultra-sons Grant, para dissolução, homogeneização e desgaseificação de reagentes e padrões.

- Válvulas solenóides de 3 vias Nresearch®, modelo 161T031.
- Membranas de PTFE com porosidade de 5.0 μm e 47 mm diâmetro, da marca Gelman® Sciences.
- *"Drive de potência"* de 12V, baseado em unidades de integrados ULN 2003.

Instrumentação de controlo de válvulas e bomba peristáltica

- Placa de ADC/CAD, board DCPCLD 8115.
- Placa PCL-711s interface Card (American Advantech®, San Jose, CA).

Banhos de aquecimento:

- Banho de água de 20L, com cabeça de aquecimento e circulação de água da Julabo®, modelo Variomag Type E.
- Banho seco da marca Falc®, modelo Falc-Termoblock TD150 P3, (Falc Instruments S.r.l, Lurano, Italy), com bloco de alumínio torneado e fresado à medida dos módulos de pervaporação, nas oficinas do departamento de Física.

Equipamento de cromatografia:

- Cromatógrafo Gasoso Varian®, modelo 3400, com detector de captura de electrões de ^{63}Ni.
- Coluna capilar Chrompack®, modelo PP Wax 58 (FFAP)CB, com comprimento de 50m, 0,25mm de diâmetro externo, 0,2μm de diâmetro interno.
- Gestor de amostras, da marca Varian®, modelo Genesis auto-sampler.

Equipamento voltamétrico:

- Software GPES® para Windows – versão 4.8.

Equipamento de propulsão e tubos de ligação:

- Bomba peristáltica Gilson®, modelo minipulls 3.

2.3.1.2. Reagentes, soluções e padrões

Na preparação de todas as soluções, foi utilizada água ultra pura, com condutividade inferior a 0,1μS/cm, obtida conforme foi descrito anteriormente em 2.2.1.2. O tampão fosfato antes de ser utilizado era colocado no ultra-sons 5 min. para desgaseificação. A solução de derivatização em orto-fenilenodiamina (OFDA) era preparada diariamente, e mantida ao abrigo da luz num recipiente escuro em PVC, mantendo-se longe de qualquer fonte de calor.

As soluções padrão mãe de diacetilo e 2,3-pentanodiona ($2,5x10^{-3}M$), eram preparadas semanalmente e guardadas no frigorifico. Estas, e as restantes soluções padrão utilizadas para efectuar as adições de padrão eram preparadas no dia do próprio uso.
Foram igualmente utilizados as mesmas soluções e padrões descritas em 2.2.1.2, tendo porém sido utilizados adicionalmente os padrões descritos na tabela II-9.

Tabela II-9. Reagentes e quantidades usadas na preparação das soluções padrão empregues nos estudos efectuados.

Solução Padrão	Reagente	Concentração	Preparação
Dióxido de enxofre (SO_2)	Metabissulfito de potássio, 96%, Riedel-deHaën®.	1000ppm	Pesar rigorosamente 177mg do reagente e dissolver em 100,0mL de água. Preparação semanal e guardada no frio.
Acetaldeído	Acetaldeído, Merck®, 98% (líquido) pureza.	1000 ppm	Retirar o acetaldeído do frigorifico (o líquido deve estar frio, ex. 4°C), pesar 1000mg e diluir a 1000,0mL com água.

2.3.2. Concepção e desenho do sistema de análise de diacetilo em linha

2.3.2.1. Configuração base e princípios de funcionamento do sistema de fluxo em linha. Circuitos e diagramas

Como se pode observar nos esquemas seguintes (figuras II-49, II-51 e II-52), o sistema é formado basicamente por dois circuitos, A e B, um para a extracção do diacetilo da cerveja (circuito de cerveja) e o outro para a determinação do diacetilo (circuito de detecção). Numa outra perspectiva, poder-se-á considerar uma parte I relativa às fases de pervaporação e derivatização, e uma parte II relativa à fase de determinação voltamétrica.

Em termos instrumentais o sistema de determinação de diacetilo em linha está construído em torno do detector voltamétrico em fluxo já anteriormente descrito, de uma unidade de separação do diacetilo e da 2,3-pentanodiona da cerveja por pervaporação, e de elementos de propulsão com bombas peristálticas. A forma de funcionamento do sistema é bastante simples, e resulta da interligação dos passos descritos para a determinação *"off line"* do diacetilo, com a diferença de que a fase de preparação da amostra (I) é agora feita numa unidade de pervaporação colocada "on-line" ("em linha"). O módulo de pervaporação é constituído por duas câmaras separadas por uma membrana hidrófoba permeável a gases. Na câmara inferior (de doação), que se encontra incluída no circuito de cerveja (A), dá-se a volatilização do diacetilo durante a fase de separação. O diacetilo volatilizado e que se encontra no *"headspace"*, passa

através da membrana para a câmara superior (de recepção). Nesta câmara, que já faz parte do circuito detecção, dá-se reacção de derivatização do diacetilo com a o-fenilenodiamina (anteriormente aí introduzida). Após a derivatização, o conteúdo da câmara superior é injectado em direcção à célula voltamétrica em fluxo onde se dá a detecção. Este módulo de pervaporação é estanque por forma a impedir perdas no sistema.

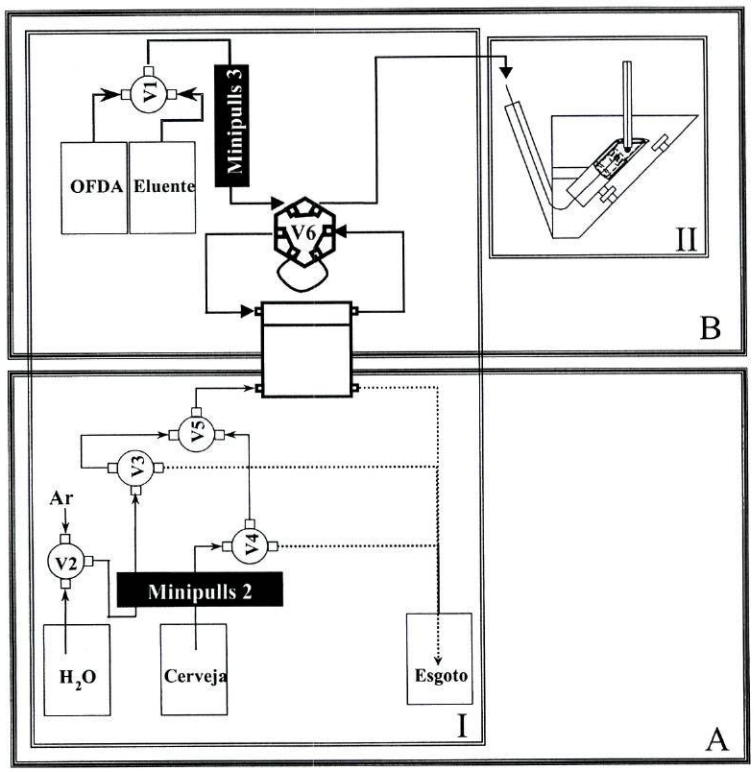


Figura II-49. Esquema do sistema de análise de diacetilo em linha com detecção por voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Sistema manual – as válvulas V1 a V5 são válvulas manuais de 3 vias, a V6 é uma válvula de injecção de 4 vias. Sistema semi-automático – as válvulas V1 a V5 são válvulas automáticas solenóides de 3 vias, a V6 é uma válvula de injecção de 4 vias.

No circuito de cerveja (A) é utilizada uma bomba peristáltica que funciona a velocidade constante, e portanto, o caudal de admissão da cerveja é também constante. O circuito de cerveja é constituído por 4 válvulas de 3 vias, permitindo a circulação de cerveja durante o período de pervaporação, alternando com ar ou água durante o período de limpeza. Neste circuito a válvula V2 é a única a trabalhar em sucção, seleccionando a entrada de ar ou água. As outras duas válvulas, V3 e V4, são respectivamente a válvula de retorno do ar/água que permanece ligada durante a pervaporação e a válvula de retorno da cerveja que se encontra ligada durante a injecção e lavagem do módulo. Por fim, a válvula V5 permite comutar entre cerveja ou ar/água, no início dos períodos de pervaporação e de limpeza, respectivamente.

No circuito de análise/detecção (B) é usada uma bomba peristáltica de caudal variável, pois neste caso utiliza-se caudais distintos: um caudal intermédio durante a injecção, um caudal elevado para redução do tempo de carregamento da OFDA, ou um caudal baixo para reduzir o consumo de eluente durante a pervaporação.

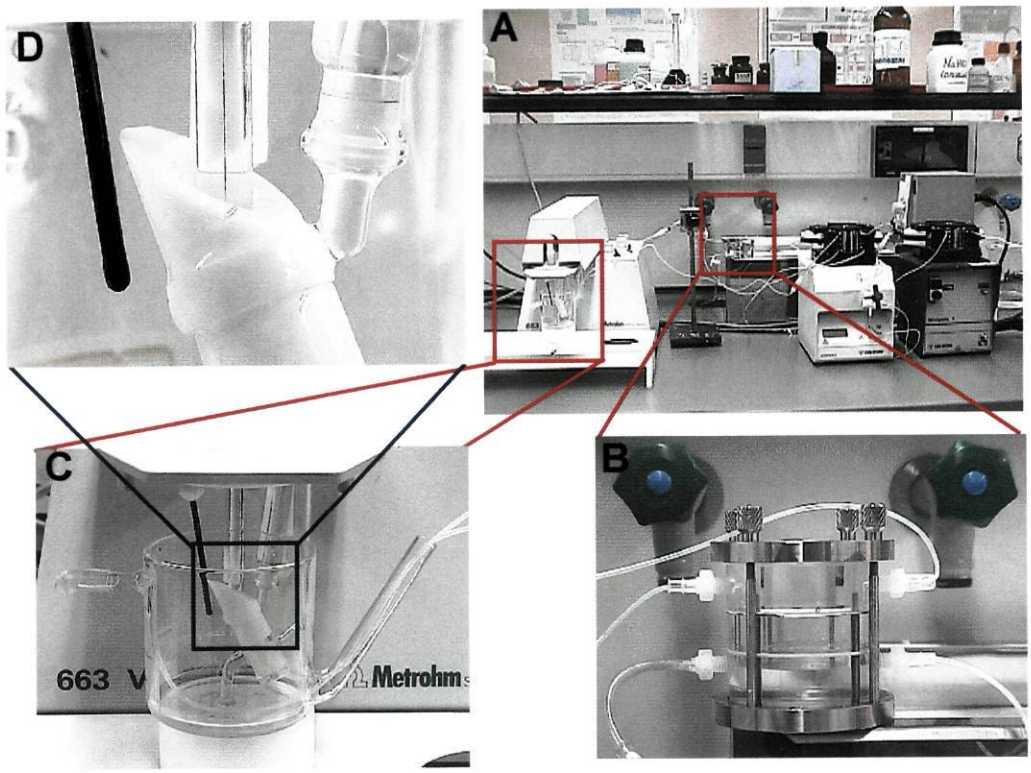


Figura II-50. Foto do sistema manual, utilizado para a determinação de diacetilo em linha na cerveja por voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio. A - foto do sistema completo; fotos de aproximação de diferentes componentes do sistema: B - módulo de pervaporação, C - célula voltamétrica de fluxo, D - eléctrodos e injector.

A malha do circuito de análise possui apenas 2 válvulas, uma de três vias de selecção e uma de 4 vias de injecção. A válvula V1 trabalha em sucção, seleccionando a entrada de eluente ou de OFDA. A válvula V6 é uma válvula de injecção: quando está fechada isola o módulo de pervaporação e o eluente flui directamente para o detector; por rotação de 60°, o eluente é obrigado a passar através da câmara de recepção do módulo de pervaporação arrastando o diacetilo derivatizado até ao detector.

Na tabela II-10 apresenta-se um quadro com o resumo do funcionamento das válvulas utilizadas no sistema de análise de diacetilo em fluxo por voltametria de adsorção com redissolução catódica em eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

Tabela II-10. Modo de actuação das diferentes válvulas presentes na figura II-49.

Válvula	Acção	Activada	Desactivada
V1	Selecção da admissão de OFDA ou eluente no circuito de detecção.	Entrada de OFDA para o circuito de detecção.	Entrada de eluente para o circuito de detecção.
V2	Selecção da admissão de ar ou água na câmara de doação.	Entrada de água para lavagem da câmara de doação do módulo de pervaporação.	Entrada de ar para lavagem da câmara de doação do módulo de pervaporação.
V3	Retorno de ar/água para o esgoto.	Deixa passar ar ou água para a válvula V5, durante o período de lavagem.	Faz retorno de ar ou de água para o esgoto durante a pervaporação
V4	Retorno de cerveja para o esgoto.	Faz retorno de cerveja para o esgoto durante a lavagem.	Deixa passar cerveja para a válvula de selecção V5, no período de pervaporação.
V5	Selecção de ar/água ou cerveja.	Selecciona a entrada de ar ou água para a câmara de doação do módulo de pervaporação durante o período de lavagem.	Selecciona a entrada de cerveja para a câmara de doação do módulo de pervaporação durante o período de pervaporação.
V6	Válvula de injecção.	Abertura do canal de fluxo para a câmara de recepção do módulo de pervaporação, para injecção, lavagem do "loop" e enchimento com OFDA.	"By-pass" do eluente sem passagem através do módulo. Módulo isolado para a recolha de diacetilo durante a pervaporação

2.3.2.2. Automação do sistema

A determinação de diacetilo ou α-dicetonas, pelo sistema de análise apresentado, envolve uma série de procedimentos analíticos, a cada um dos quais está associado um determinado conjunto de canais de fluxo. Esta rede de canais e a sua regulação (abertura e fecho), foi conseguida através de uma malha de válvulas de 3 vias, que funciona segundo o princípio de multicomutação [120]. A abertura e fecho dos canais desejados dirige o fluxo de acordo com o diagrama pretendido. Isto é controlado pela actuação simples sobre as válvulas correctas durante o tempo pretendido.

Contudo, dado o elevado número de passos do procedimento e a intrincada rede de válvulas existente, foi necessário recorrer à automatização do sistema não só para reduzir o trabalho manual, mas também para reduzir os erros e melhorar o sincronismo e cronometragem dos passos referentes ao procedimento de análise.

Desta forma procedeu-se à automatização do sistema, que permite que haja um controlo automático das válvulas, da velocidade da bomba peristáltica de velocidade variável (minipulls 3), e até mesmo a aquisição e tratamento dos dados instrumentais. Para este processo recorreu-se a rotinas multi-passo que permitem controlar e sincronizar o estado das válvulas (ligadas ou desligadas), os caudais do sistema, a duração de cada passo do procedimento, e ainda o disparo de um sinal de *"trigger"* que desencadeia o processo de aquisição de dados pelo GPES® 4.8 – Project. Este controlo de todo o sistema em

fluxo foi conseguido através de um software de controlo a trabalhar como *"master"* e especialmente criado para o efeito, sendo a aquisição de dados feita pelo GPES® 4.8 - project neste caso a trabalhar como *"slave"*.

Na figura II-49, é apresentada uma primeira aproximação da automação do sistema, e de construção em tudo igual à do sistema manual, exceptuando as válvulas de 3 vias que passaram a ser controladas através do PC. Na figura II-51, já se pode observar o esquema do sistema totalmente automático, que difere apenas do anterior na válvula de injecção, que passa a ser constituída por duas válvulas, V2 e V3, que estão a actuar de forma síncrona, e quando activadas abrem o canal de fluxo para a câmara de recepção/superior do módulo de pervaporação, durante os passos de injecção lavagem e carregamento da OFDA; quando são desligadas permitem a passagem directa do eluente para o detector sem comunicação pelo módulo, o que sucede durante a pervaporação. O resto do sistema apresenta uma constituição exactamente igual ao sistema de injecção semi-automático.

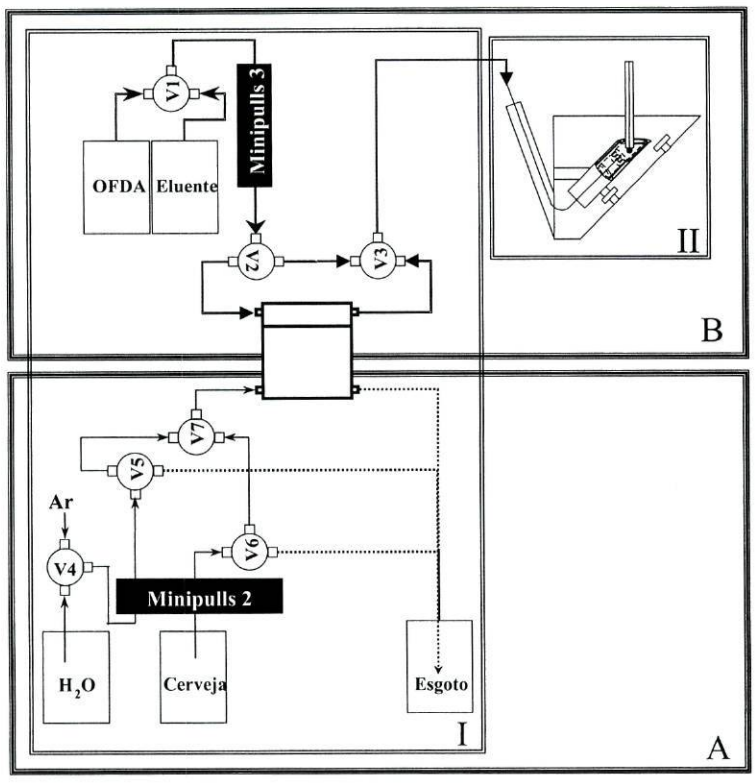


Figura II-51. Esquema do sistema automático de análise de diacetilo em linha com detecção por voltametria em fluxo utilizando eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Todas as válvulas de V1 a V7 são válvulas automáticas solenóides de 3 vias.

2.3.2.3. Sistema com dois módulos de pervaporação em paralelo

Como se verá adiante, o passo limitante da análise é o de pervaporação (2/3 do tempo total) e não o de detecção. A frequência da análise está portanto limitada pelo passo analítico de separação, durante o qual se poderia efectuar mais do que uma detecção. No sentido de diminuir o tempo do passo limitante, procedeu-se a uma adaptação do sistema, em que foram colocados dois módulos de pervaporação a trabalhar em paralelo, e de forma desfasada (figura II-52): enquanto um módulo está na fase de injecção o outro está mais ou menos a meio da pervaporação, o que permite aumentar a frequência da análise para o dobro. Como se pode observar, foi necessário acrescentar 5 válvulas e duas uniões de 3 vias. Por exemplo, a válvula V2 permite dirigir o fluxo do sistema de análise/detecção para o módulo I ou para o módulo II, de forma alternada.

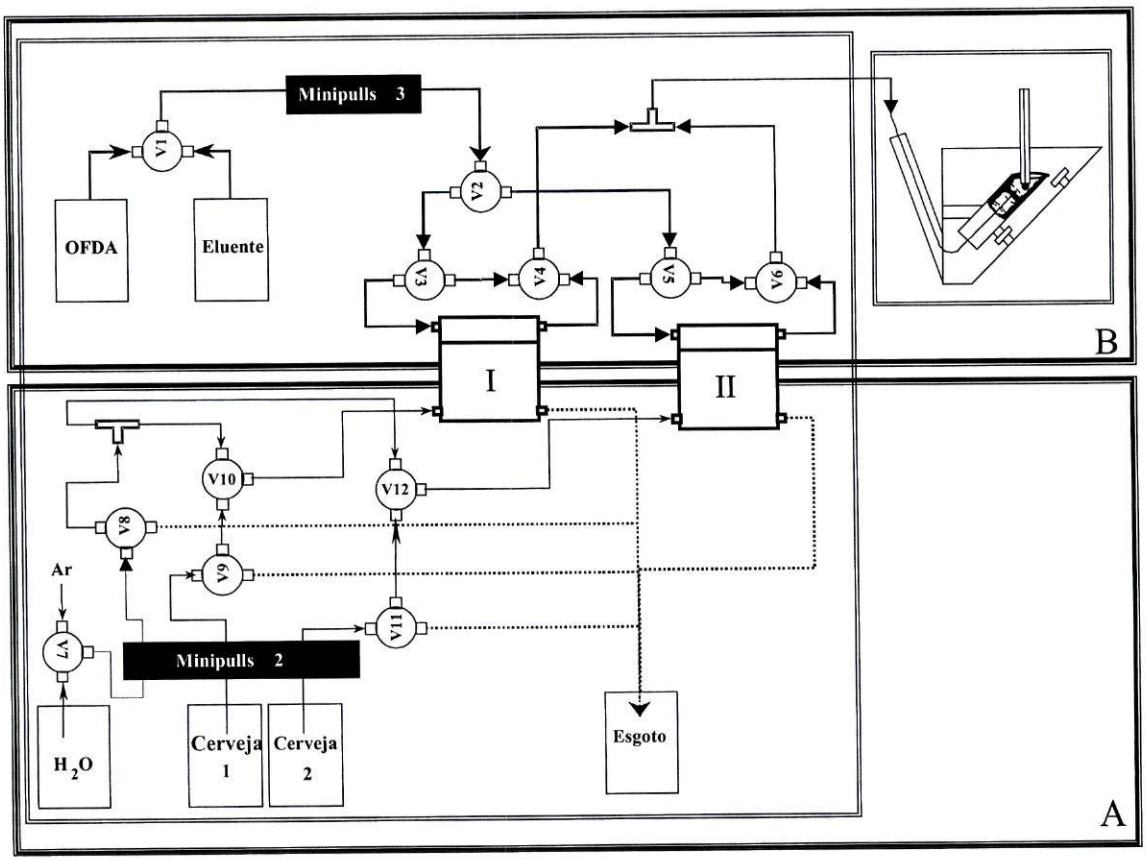


Figura II-52. Esquema do sistema automático de análise de diacetilo em linha com dois módulos de pervaporação. Todas as válvulas de V1 a V12 são válvulas automáticas solenóides de 3 vias.

Na tabela II-11 apresenta-se um quadro com o resumo das funções desempenhadas por cada uma das válvulas utilizadas no sistema de automático de análise de diacetilo em fluxo por voltametria com 2 módulos de pervaporação.

Tabela II-11. Modo de actuação das diferentes válvulas existentes no esquema da figura II-52.

Válvula	Acção	Activada	Desactivada
V1	Selecção da admissão de OFDA ou eluente no circuito de detecção.	Entrada de OFDA para o circuito de detecção.	Entrada de eluente para o circuito de detecção.
V2	Abertura do circuito para o modulo I ou II.	Circuito de detecção aberto para entrada do fluxo para o módulo de pervaporação I.	Circuito de detecção aberto para a entrada do fluxo para o módulo de pervaporação II.
V3 e V4	Válvulas de injecção, a actuar de forma síncrona, no módulo I.	Abertura do canal de fluxo para a câmara de recepção do módulo de pervaporação I, para injecção, lavagem do "loop" e enchimento com OFDA.	"By-pass" do eluente sem passagem através do módulo I. Módulo I isolado para a recolha de diacetilo durante a pervaporação.
V5 e V6	Válvulas de injecção, a actuar de forma síncrona, no módulo II.	Abertura do canal de fluxo para a câmara de recepção do módulo de pervaporação II, para injecção, lavagem do "loop" e enchimento com OFDA.	"By-pass" do eluente sem passagem através do módulo II. Módulo II isolado para a recolha de diacetilo durante a pervaporação.
V7	Selecção da admissão de ar ou água no sistema, para lavagem das câmaras de doação.	Entrada de água no sistema para lavagem das câmaras de doação dos módulos de pervaporação I e II.	Entrada de ar no sistema para lavagem da câmaras de doação dos módulos de pervaporação I e II.
V8	Retorno de ar/água para o esgoto.	Deixa passar ar ou água para as válvulas V10 e V12, durante os períodos de lavagem, respectivamente dos módulos de pervaporação I e II.	Faz retorno de ar ou de água para o esgoto durante os períodos em que ambos os módulos se encontram a pervaporar.
V9	Retorno de cerveja 1 para esgoto.	Faz retorno de cerveja 1 para o esgoto durante a lavagem do módulo de pervaporação I.	Deixa passar cerveja para a válvula de selecção V10, no período de pervaporação da cerveja 1.
V10	Selecção de ar/água ou cerveja 1, para o módulo de pervaporação I.	Selecciona a entrada de ar ou água para a câmara de doação do módulo de pervaporação I, durante o período de lavagem deste.	Selecciona a entrada de cerveja 1 para a câmara inferior do módulo I durante o período de pervaporação desta.
V11	Retorno de cerveja 2 para esgoto.	Faz retorno de cerveja 2 para o esgoto durante a lavagem do módulo de pervaporação II.	Deixa passar cerveja para a válvula de selecção V12, no período de pervaporação da cerveja 2.
V12	Selecção de ar/água ou cerveja 2, para o módulo de pervaporação II.	Selecciona a entrada de ar ou água para a câmara de doação do módulo de pervaporação II, durante o período de lavagem deste.	Selecciona a entrada de cerveja 2 para a câmara inferior do módulo II durante o período de pervaporação desta .

2.3.2.4. Procedimento voltamétrico de referência

Na análise em linha a injecção e a detecção por voltametria em fluxo regem-se pelos mesmos princípios e procedimentos que foram descritos para a análise off-line de diacetilo na cerveja. Foi portanto com estes valores que se iniciaram os estudos de optimização do sistema, pelo que o caudal de injecção foi mantido nos 1,33 $mL.min^{-1}$, e se utilizou o mesmo procedimento voltamétrico de base (a frequência passou a ser de 500Hz) e que se pode observar na figura II-53, com ligeiras correcções para atender ao aumento da distância do módulo ao detector.

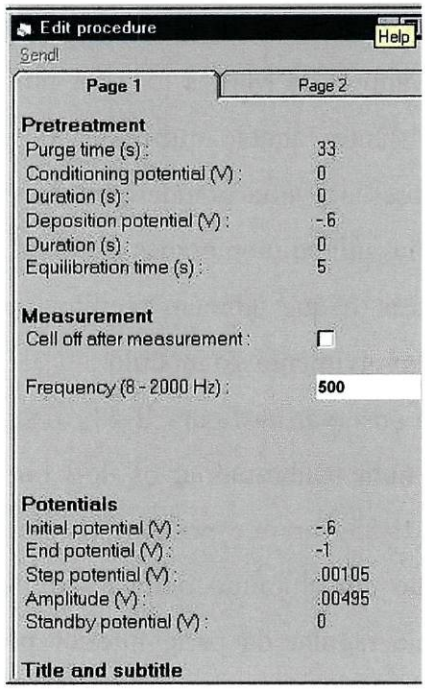


Figura II-53. Procedimento de voltamétrico de referência , utilizado na análise diacetilo "em linha".

2.3.3. O módulo de pervaporação. Características e desenvolvimento

A determinação directa de diacetilo na cerveja não é possível devido às interferências existentes na matriz. Por esta razão ao longo dos anos têm vindo a ser aplicadas várias metodologias para separação do diacetilo da matriz, das quais se podem destacar a destilação simples ou por arrastamento de vapor e técnicas cromatográficas, nomeadamente a cromatografia gasosa e a cromatografia liquida de alta eficiência. No entanto, apenas a destilação simples e a cromatografia gasosa têm tido aplicação na industria cervejeira. Dadas as limitações e complexidade dos processos de destilação simples para aplicação em linha e da composição da fase móvel usada na cromatografia de alta eficiência, a pervaporação surgiu como uma alternativa de separação mais simples e mais facilmente adaptável à determinação de diacetilo e α-dicetonas por voltametria em fluxo.

Neste sub-capítulo vão ser considerados vários aspectos relacionados com as características dimensionais e estruturais do módulo de pervaporação, e de que forma estas afectam o seu comportamento. Outros factores que influenciam o processo de pervaporação, como os físico-químicos e hidrodinâmicos, serão objecto de estudo num sub-capítulo posterior.

2.3.3.1. Esquemas e desenhos dos módulos de pervaporação utilizados

O modelo proposto por Ivanildo de Mattos [51] foi utilizado como ponto de partida, pois foi dos modelos existentes aquele que pareceu reunir as características mais convenientes. De facto, apresenta uma grande área de volatilização, de exposição da membrana e de recuperação, utiliza membranas standard; e, não menos importante, é um modelo fácil de fabricar, o que também facilitou o fabrico das peças diferentes durante o processo de desenvolvimento do módulo.

No modelo I, que se pode observar na figura II-54, o aquecimento foi conseguido por imersão da parte inferior num banho-maria; os dois outros modelos, II e III, que se podem observar na figura II-55, foram especialmente desenhados para serem inseridos num bloco de aquecimento em alumínio onde foram feitos encaixes à sua medida. Nestes últimos a superfície regular da parte inferior possibilita um maior e melhor contracto com o bloco de alumínio.

O modelo I foi feito em "*perspex*" (acrílico), conforme pode ser visualizado na figura II-54, tendo uma unidade sido fabricada nas oficinas do Departamento de Física da FCUP e outras unidades nas oficinas gerais da Unicer - Bebidas de Portugal, SGPS- SA. O desenho técnico deste modelo I é apresentado no anexo III

Verifica-se que o *"perspex"* sofre uma degradação e deformação contínua e progressiva; contudo o módulo pode durar vários anos, caso não sujeito a temperaturas superiores aos 100ºC.

A manutenção do módulo é bastante simples, resumindo-se a procedimentos analíticos de limpeza e mudança de membrana a cada 3 meses por razões de segurança; de longe a longe é necessário limpar internamente incrustações que aparecem na câmara de doação, em especial as que se depositam nos orifícios de entrada e saída.

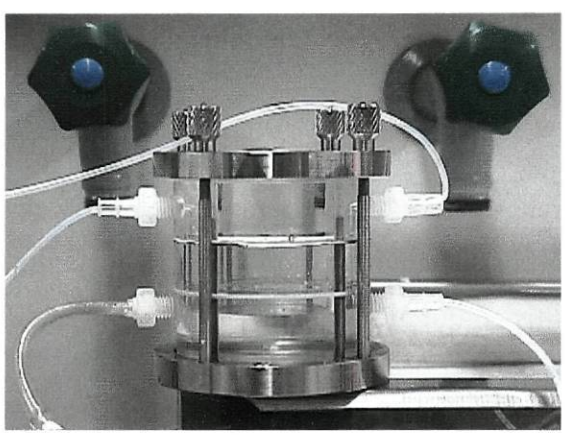


Figura II-54. Foto do módulo de pervaporação, modelo I em "*perspex*", utilizado em banho-maria.

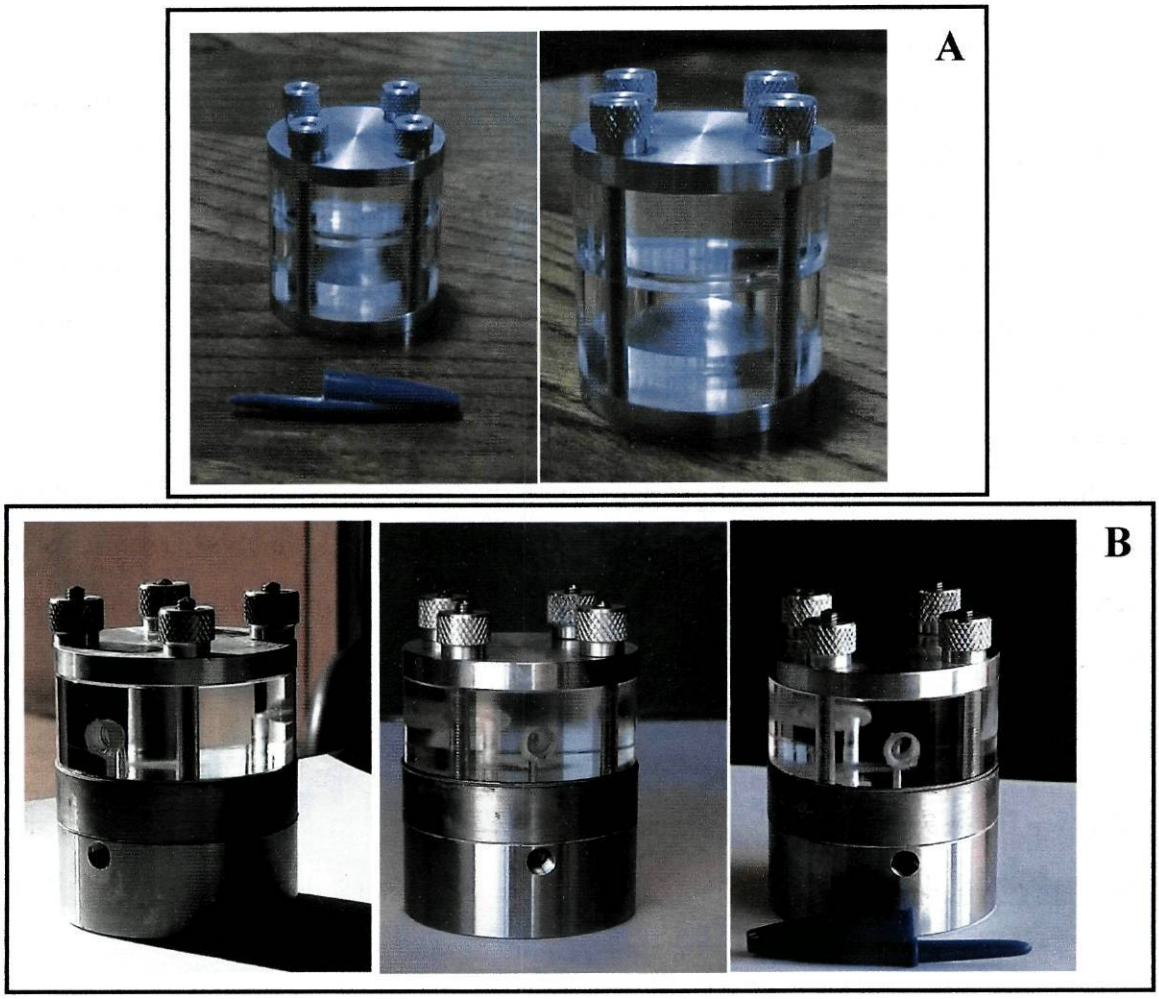


Figura II-55. Fotos dos módulos de pervaporação, desenhados para utilização em banho seco. **A** - modelo II, com corpo todo em "*perspex*". **B** – modelo III, com a câmara de doação em aço inoxidável.

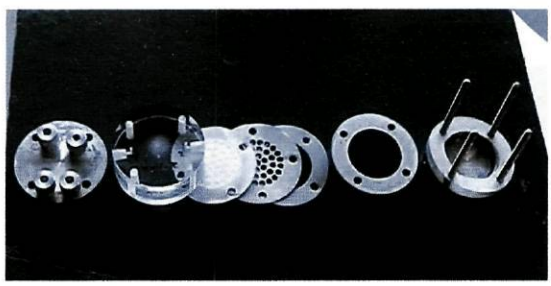


Figura II-56. Foto dos componentes de um módulo do modelo III.

Os modelos II e III, figura II-55, apresentam uma estrutura e componentes iguais entre si variando apenas no material utilizado para o fabrico da câmara inferior. No caso do módulo II esta é em "*perspex*" (acrílico) e no caso do módulo III esta é feita em aço inoxidável. Na figura II-56, mostra-se uma foto dos componentes do sistema, pertencentes a um módulo do modelo III. No anexo IV, são apresentado os desenhos técnicos em CAD-3D correspondente a estes modelos II e III.

Neste módulos bem como no modelo I foram sempre utilizados "*o-rings*" de "*teflon*" entre cada uma das peças individuais que constituem o corpo dos módulos, por forma a selá-los e a torná-los perfeitamente estanques.

O módulo do modelo III foi construído em aço inoxidável, de modo a ser mais resistente à corrosão. Contudo, mesmo neste caso foi possível observar ligeiros sinais de corrosão por picada ao fim de 4 meses.

2.3.3.2. Tipo de membrana

O sistema de pervaporação que se utiliza neste trabalho pressupõe a satisfação de duas características para a membrana: tem de ser capaz de suportar a solução aquosa que por cima recolhe o diacetilo ou as α-dicetonas e tem que ser permeável à passagem de diacetilo e das α-dicetonas. Não é portanto de estranhar que tenham sido estes dois aspectos os primeiros a ser estudados.

Os estudos foram feitos com dois tipos de membranas com características diametralmente opostas: hidrofílicas de acetato de celulose e hidrofóbicas de PTFE (*"teflon"*). Nos ensaios feitos com membranas de acetato de celulose com uma porosidade de 5μm verificou-se que imediatamente humedeciam e deixavam passar líquido para a câmara inferior mesmo quando se parava o caudal no circuito de detecção. Este efeito pode ser observado na figura II-57, quando se coloca água na superfície da membrana. A figura II-57A apresenta o momento de colocação da gota de água à superfície da membrana com o papel absorvente por baixo perfeitamente seco; a figura II-57B é uma foto tirada passados 2 minutos, em que se vê o a membrana húmida sem água à superfície, que entretanto passou através da membrana e foi absorvida pelo papel, o qual agora se encontra molhado.

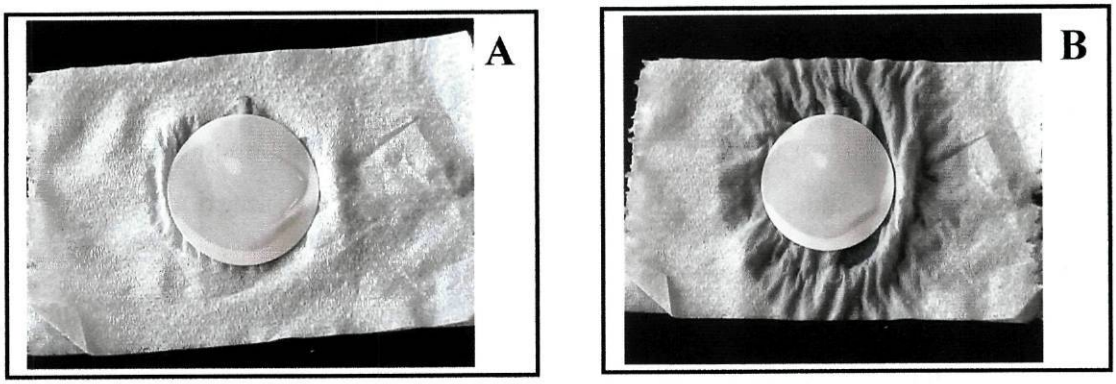


Figura II-57. Fotos da membrana de acetato de celulose com 5μm de porosidade; A – No momento da colocação de água à superfície; B – Após dois minutos.

Nos ensaios feitos com uma membrana hidrofóbica de PTFE (*"teflon"*) com 5μm de porosidade, verifica-se que a água não passa facilmente para a parte inferior, conforme se pode observar nas fotografias apresentadas na figura II-58. Fizeram-se ensaios de pervaporação com membranas de PTFE de maior porosidade (45μm), tendo-se verificado que para os caudais máximos utilizáveis no circuito de detecção se verifica a passagem de soluções através da membrana.

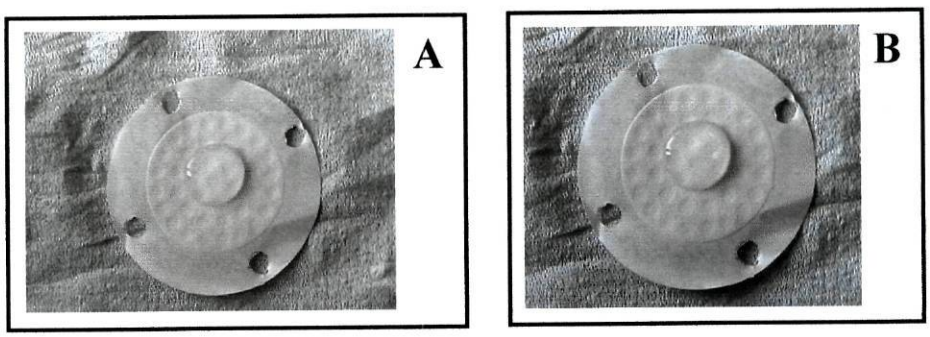


Figura II-58. Fotos da membrana de PTFE com 5μm de porosidade; A – No momento da colocação de água à superfície; B – Após uma hora.

Em conclusão, verifica-se que em termos de impermeabilidade à passagem do líquido contido na câmara superior do módulo de pervaporação as membranas de PTFE de 5μm são uma boa opção. Por outro lado, também se verifica que estas membranas se deixam atravessar pelo diacetilo, como se pode concluir das curvas de calibração do diacetilo representadas na figura II-59. Foram seleccionadas membranas de PTFE com 5.0 μm de porosidade e 47 mm de diâmetro, da marca Gelman® Sciences.

A duração da membrana de separação, com manutenção da eficiência ao longo do tempo, é um outro parâmetro importante para o sistema. Verificou-se que a membrana adoptada, quando colocada sobre um suporte adequado, é muito estável. Como se pode ver na figura II-59, os resultados obtidos são praticamente coincidentes para uma membrana nova e após 2 meses de utilização. De uma forma geral, as membranas podem ser mudadas mais ou menos de 3 em 3 meses sem que se note perda de eficiência, desde que se tenha o cuidado de evitar o contacto da cerveja com a membrana e não tocar na parte central das membranas pela qual se dá a permeação, os 30 mm de Ø centrais.

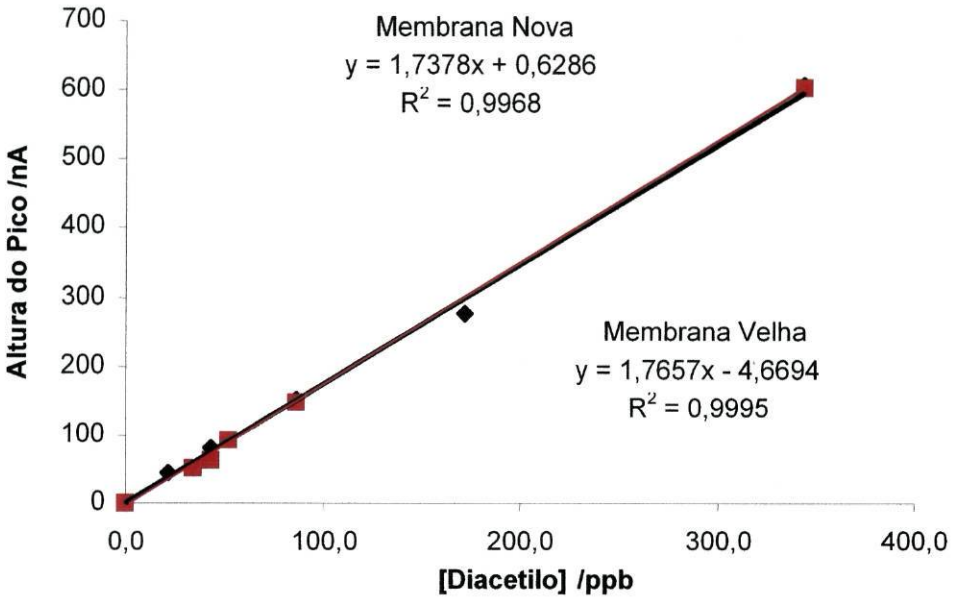


Figura II-59. Efeito do tempo de uso da membrana na curva de calibração. ◆ - Membrana Nova; ■- Membrana com 2 meses de uso. Tempo de pervaporação de 9 min., com OFDA 0,05%, módulo do modelo I, 300 Hz e 5s de adsorção, caudal de injecção de 1,33mLmin^{-1}.

2.3.3.3. Tipo de suporte da membrana

Quando se utiliza a pervaporação como meio de separação, é necessário assegurar a estabilidade dimensional da câmara de recepção ao longo do tempo. Verificou-se que se não se utilizar suporte de membrana ou se se utilizar o suporte descrito por outros investigadores, se observa uma deformação muito significativa e progressiva das membranas, como se pode constatar na figura II-60. Uma das consequências é a obtenção de sinais voltamétricos que variam ao longo do tempo para uma mesma concentração de diacetilo na amostra de cerveja.

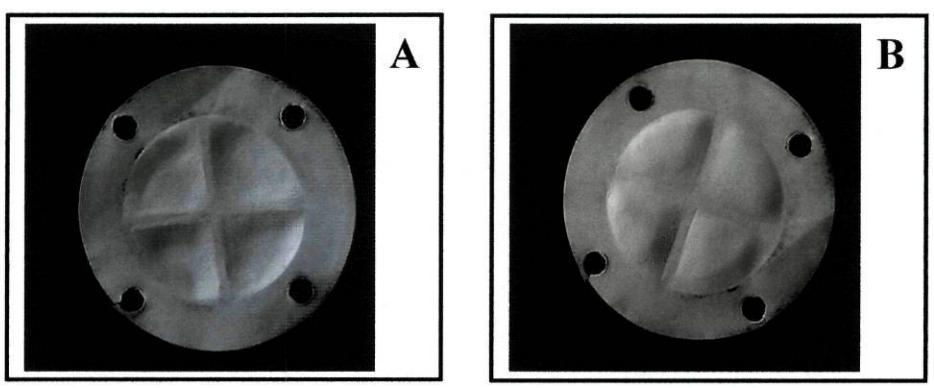


Figura II-60. Fotos da membrana de PTFE, 5mm, após ter sido utilizada no módulo de pervaporação com um suporte do tipo em cruz. A – Vista de cima; B – Vista de baixo.

Por esta razão, procurou-se desenvolver novos suportes que evitassem a deformação da membrana, com o conseguinte aumento da reprodutibilidade, mas de modo a não afectar a eficiência da pervaporação. Na figura II-61, estão representados os modelos de suporte de membrana testados.

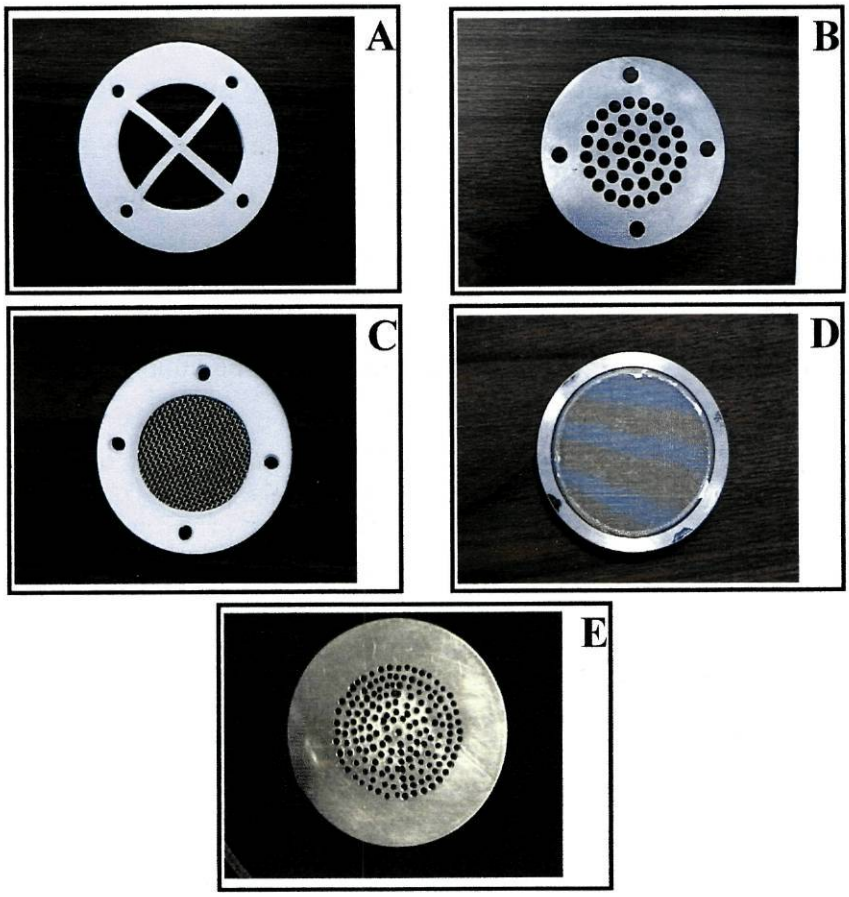


Figura II-61. Modelos de suporte de membrana testados nos estudos de optimização do módulo de pervaporação. A – Suporte de "*Teflon*" em cruz, fabricado de acordo com Ivanildo Mattos et al; B – Suporte em aço inoxidável, com furos de 2,5 mm nos 30,0 mm centrais igualmente distribuídos, denominada placa CT; C - Suporte em rede de malha grossa, de aço inoxidável com 30,0 mm Ø em posição central, revestida externamente a "*teflon*" na restante parte do disco; D – Suporte de rede fina, em aço inoxidável, da marca Milippore® (utilizado usualmente como suporte de membranas em rampas de filtração), E - Suporte em aço inoxidável, com furos de 1,0 mm nos 30,0 mm centrais igualmente distribuídos, denominada placa UNICER.

O tipo de suporte utilizado pode afectar muito área de contacto entre a membrana e a câmara de doação. Como este é um factor muito importante para a eficiência da fase de permeação do diacetilo ou α-dicetonas, é natural que diferentes tipos de suporte possam afectar a eficiência da pervaporação de forma diferente. Dos suportes apresentados na figura II-61, verifica-se que o suporte do tipo A, embora oferecendo uma elevada área de contacto, dá origem à deformação de membrana, como se disse anteriormente. Do lado oposto, temos o suporte em rede de malha fina, do tipo D, que é o que apresenta

melhor apoio para a membrana; no entanto, pelo facto de ter uma área de rede de 40 mm de diâmetro, e por isso superior à largura das câmaras, cria reentrâncias com fenómenos de acumulação de líquidos que afectam a reprodutibilidade por serem difíceis de lavar.

Na figura II-62 é possível observar o efeito do tipo de suporte na curva de calibração de diacetilo, obtida por pervaporação durante 9 min., e utilizando as condições voltamétricas descritas na figura II-53. Verifica-se que o suporte do tipo B apresenta uma maior sensibilidade do que o do tipo E, que por sua vez é mais sensível que o do tipo C. Estas diferenças poderão ser explicadas admitindo uma diminuição da área de contacto da membrana com a câmara de doação, sendo de assinalar que nas três situações a membrana apresenta uma boa estabilidade. Consequentemente, decidiu-se adoptar o suporte do tipo B para o fabrico dos módulos de pervaporação.

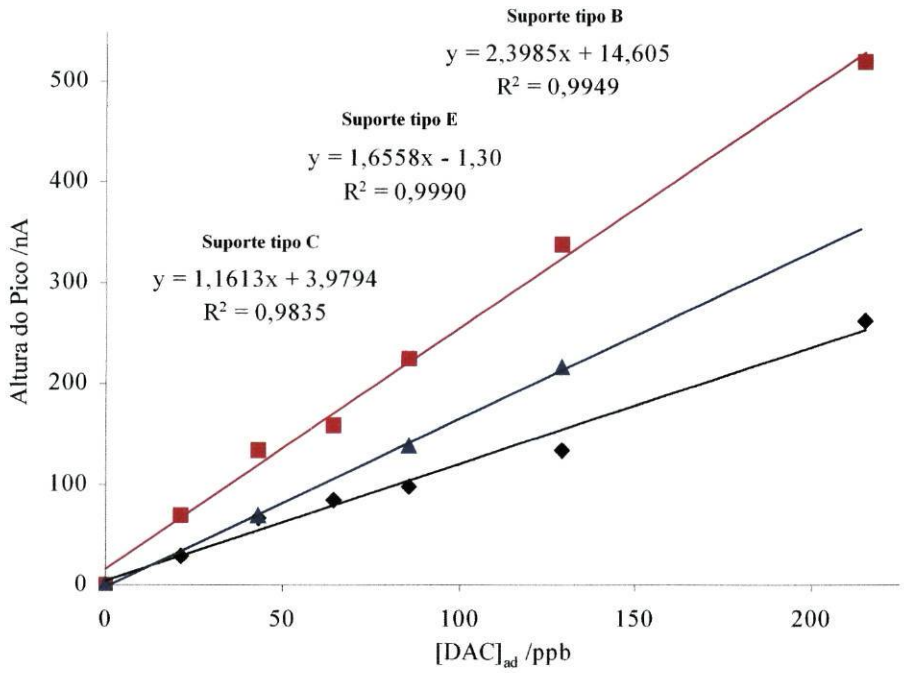


Figura II-62. Curvas de calibração de diacetilo para diferentes tipos de suporte de membrana. ■ - Suporte tipo B; ▲ - Suporte do tipo E; ◆– suporte tipo C. Tempo de pervaporação de 9 min., utilizando-se OFDA 0,05%, módulo do modelo 1, 300Hz, 5s adsorção, caudal de injecção de 1,33mLmin^{-1}.

2.3.3.4. Câmara de recepção

Neste sistema de determinação de diacetilo, a câmara de recepção do módulo de pervaporação, para além de recolher os compostos pervaporados, é também o local onde se dá a reacção de derivatização; além disso, faz parte do "*loop*" onde se encontra a amostra que vai ser injectada em direcção ao detector voltamétrico em fluxo. Por estas razões a concepção desta cavidade é importante, pois deverá ser suficientemente grande

para que o volume de injecção permita obter um patamar de concentração constante de amostra de chegada ao eléctrodo, mas não tão grande que provoque uma diluição desnecessária dos compostos pervaporados. Além disso, é preciso garantir uma boa difusão do diacetilo pervaporado na solução receptora, para facilitar a ocorrência da reacção de derivatização.

Os estudos foram iniciados com uma câmara de recepção cilíndrica, com o raio de 15 mm, e altura variável. Verificou-se que em todos os ensaios com diferentes alturas de câmara existiu homogeneidade das amostras analisadas, indicando que não há limitações por difusão ou reacção com a OFDA.

De referir que a existência de reacção com a OFDA na câmara receptora favorece a dissolução do diacetilo e das α-dicetonas na solução receptora. Verificou-se, ainda, que a variação do volume desta câmara se traduz numa alteração do sinal voltamétrico mais ou menos proporcional ao factor de diluição/concentração correspondente, o que permite concluir que a quantidade de composto pervaporado e derivatizado é independente do volume da câmara de recepção, nestas condições.

Na tabela II-12 são representados os valores de algumas características associadas à variação da altura da câmara de recepção.

Tabela II-12. Efeito de variação da altura/volume da câmara de recepção do módulo de pervaporação.

Altura da câmara superior /mm	0,8	1	1,2	1,6	2,0
Volume da câmara superior /μL	565	707	848	1131	1414
Factor de concentração* do pervaporado	1,50	1,20	1,00	0,75	0,60
Tempo bruto de escoamento /s	25s	32s	38s	51s	64s
Tempo de dispersão /s	23s	24s	25s	29s	35s
Patamar de detecção /s	Sem patamar	28-35	28-42	29-50	29-57

*assumindo valor 1,00 para módulo com câmara de recepção de 1,2mm de altura

2.3.3.5. Câmara de doação

No módulo de pervaporação a câmara de doação tem a função de evaporar/volatilizar os compostos a separar e analisar, havendo um espaço de volatilização (*"headspace"*) entre a amostra (matriz) e a membrana de separação. A pervaporação pode ser efectuada mantendo a amostra estática na câmara de doação ou fazendo uma passagem contínua da amostra. No caso de determinação de diacetilo na cerveja, verificou-se que o processo de passagem contínua é o mais conveniente. O processo de passagem contínua demonstrou ser mais sensível e reprodutível, para além de ser mais fácil lavar o módulo. Pelo contrário, a manutenção de amostra estática no módulo, a 90ºC, não foi possível

dada a formação de espuma de cerveja, chegando até a atingir a membrana; para além de o processo de lavagem ser neste caso mais difícil.

Na passagem contínua de cerveja, esta espalha-se formando um filme na base da câmara de doação, facilitando um rápido aquecimento e homogeneização da temperatura da amostra. Isto sucede porque os orifícios de entrada e saída se encontram à mesma altura e na base da câmara. Este facto ainda permite uma melhor limpeza de todos os restos de cerveja que anteriormente aí pudessem permanecer. Por estas razões, um factor que também é importante é manter a horizontalidade do módulo.

A concepção inicial da câmara doação consistia num cilindro de 15mm de raio, com dois orifícios na base, um de entrada de cerveja e outro de saída. Durante os estudos de desenvolvimento foram testadas várias alturas para esta câmara de doação, cujas características se encontram sumariadas na tabela II-13. Verifica-se que quanto maior é o volume da câmara inferior menor é altura de pico voltamétrico obtido após pervaporação e derivatização, o que se explica por uma diluição da concentração do diacetilo na fase gasosa do *"headspace"* dado que a eficiência da volatilização não se deve alterar significativamente com o aumento do volume da câmara. Este resultado indica que quanto menor for a altura da câmara, maior é a eficiência da pervaporação; contudo, em especial no caso de cervejas altamente carbonatadas, uma altura demasiado baixa da câmara é contraproducente, pois a espuma da cerveja pode atingir a membrana, inviabilizando a análise e mesmo afectando a própria membrana.

Como se vê na tabela II-13, o sinal voltamétrico é quase invariavelmente proporcional ao volume da câmara de doação, mostrando a importância da diluição do diacetilo no *"headspace"*. No entanto, existem pequenas diferenças em relação a essa proporcionalidade, que podem ser explicadas por factores cinéticos no aumento da concentração de composto volatilizado no "*headspace*", pela cinética de permeação e de dissolução na solução receptora e ainda pela extensão da própria volatilização. Assim se explicaria que quando se aumenta a altura da câmara de doação, de 2 para 4cm, seja necessário mais tempo para que ocorra o aumento da concentração de diacetilo no *"headspace"*; como consequência, também se está a retardar cineticamente a dissolução do diacetilo na câmara de recepção, obtendo proporcionalmente menos recuperado por unidade de tempo que a eventual diluição simples do próprio *"headspace"*. No sentido inverso, se a câmara de doação for demasiado baixa, como deve suceder com a câmara com 5 mm altura e para os 9 minutos de pervaporação, poder-se-á atingir um limite no processo de pervaporação e derivatização com a saturação em diacetilo no

"headspace". Tendo em consideração estes efeitos opostos, considerou-se como um bom compromisso a construção de uma câmara de doação com altura de 15mm.

Tabela II-13. Efeito de variação da altura/volume da câmara de doação do módulo de pervaporação. Ensaios feitos com módulo do modelo I.

Altura da câmara inferior /mm	*5,0*	*10,0*	*15,0*	*20,0*	*40,0*
Volume da câmara inferior /mL	*3,53*	*7,07*	*10,60*	*14,14*	*28,27*
Factor de diluição do "headspace"	*3,00*	*1,50*	*1,00*	*0,75*	*0,37*
Altura do pico após pervaporação /nA*	*565,9*	*296,8*	*194,3*	*137,7*	*52,4*

*9 min. de pervaporação a 90ºC, OFDA 0,05%, [DAC] de 215 ppb

Posteriormente foi ainda estudada a dinâmica da distribuição de fluxos na câmara inferior, tendo-se concluído que por vezes a distribuição do filme não era uniforme e igual pela superfície da base da câmara, podendo ocorrer a formação de canais preferenciais. Para resolver este problema foram introduzidos dois canais circulares em torno do perímetro da base para conduzir o fluxo de cerveja de forma regular, entre a entrada e a saída. Com esta alteração foi possível melhorar um pouco mais a reprodutibilidade da pervaporação, evitando os problemas anteriores.

O sistema de pervaporação tem que ser limpo no final de cada ensaio, por forma a evitar que a amostra seguinte seja afectada per restos de diacetilo ou α-dicetonas da amostra anterior, o que criaria um efeito de memória. Embora na câmara de recepção a simples passagem de eluente remova todos os vestígios da amostra anterior, na câmara de doação a limpeza não é um procedimento tão simples, pois para além de restos líquidos da amostra precedente ainda existe o *"headspace"* da pervaporação anterior que é necessário remover. Por isso, foram criados procedimentos de limpeza recorrendo à passagem de ar para renovar a fase gasosa e de água para remover os restos líquidos da amostra anterior. Por forma a facilitar a saída de ar e de água, os quais circulam a um caudal elevado para acelerar o processo de limpeza, foi aumentado o diâmetro do orifício de saída para que não ocorresse aumento da pressão na câmara de doação. Claro que é preciso ter em atenção que quanto maior for a câmara de doação (maior volume) mais difícil é a sua limpeza.

2.3.3.6. Resumo das características do módulo de pervaporação utilizado

Nas tabelas II-14 e II-15 são apresentados resumos das características dos módulos de pervaporação utilizados para a determinação de diacetilo em linha utilizando voltametria em fluxo com eléctrodo de mercúrio, bem como da forma como essas características afectam a análise.

Tabela II-14. Características do módulo de pervaporação utilizado na determinação de diacetilo em linha por voltametria em fluxo.

Componente	*Características*
Câmara de doação	"*Perspex*" (para determinação de diacetilo) ou aço inoxidável (para determinação de α-dicetonas), circular, 15,0 mm de altura, 30,0 mm Ø. Orifícios de entrada e saída do módulo, são respectivamente de 1,2mm Ø e 1,8 mm Ø. Rasgo de 0,5mm de profundidade em torno de todo o perímetro da base O tubo de saída do modulo para o esgoto é de 4,5mm Ø, e com um comprimento de 10cm.
Câmara de recepção	"*Perspex*", circular, 1,2 mm altura, 30,0 mm Ø. Orifícios de entrada e saída do módulo, são respectivamente de 1,2mm de Ø e 1,8 mm de Ø.
Suporte de membrana	Disco em aço inoxidável, com 47 mm Ø, 1mm d espessura, perfurado em 30,0mm de Ø da sua zona central, com buracos de 2,5 mm Ø simetricamente distribuídos
membrana	PTFE, com porosidade de 5.0 μm e 47 mm Ø

Tabela II-15. Alguns aspectos funcionais dos componentes e do sistema.

Componente	*Comentário*
Câmara de doação	Quanto maior o volume, menor o sinal analítico, devido à diluição do "*headspace*" e ao aumento do tempo necessário para aumentar a concentração de diacetilo volatilizado. Mais tempo de limpeza é necessário para remover o diacetilo volatilizado anteriormente. Pelo contrário se a câmara for demasiado baixa, a espuma da cerveja poderá atingir a membrana afectando a determinação e reduzindo o tempo de vida desta.
Câmara de recepção	O aumento da dimensão desta câmara aumenta o volume de injecção. Este deve ser suficientemente grande para permitir um patamar de concentração estável na chegada ao eléctrodo; contudo quanto maior este "*loop*" mais diluídas serão as soluções de recolha, e portanto menor será o sinal voltamétrico resultante, para um mesmo tempo de pervaporação e concentração de amostra de cerveja.
Circuito de cerveja	Este circuito necessita de limpeza regular, com ar e água, após o final de cada pervaporação por forma a limpar o "*headspace*" e resíduos de cerveja que ai possam permanecer. A pressão desenvolvida nesta câmara não deverá ser demasiado elevada por forma a evitar que passe ar pela membrana para o circuito de detecção onde poderá causar problemas.
Circuito de detecção	Existe a necessidade de limpar a câmara de recepção antes de nova pervaporação, o que é feito através da passagem de eluente. Os caudais de passagem nesta câmara deverão manter-se abaixo dos valores que implicariam o desenvolvimento de pressões suficientemente altas para vencer a pressão superficial da água sobre a membrana, com o seu conseguinte atravessamento.
Suporte de membrana	O suporte de membrana deverá permitir a maior área possível de membrana em contacto com a câmara de doação, mas sem perda da estabilidade da membrana ao longo do tempo.
Membrana	A membrana deverá antes do mais suportar o liquido sobre si sem que este passe para a câmara inferior. Deverá ainda permitir a passagem do composto de interesse e ser o mais estável possível ao longo do tempo.

2.3.4. Integração do sistema para análise em-linha de diacetilo

O sistema de análise em-linha de diacetilo e α-dicetonas na cerveja consiste na integração num só sistema das 3 fases da análise: a separação de diacetilo da amostra de cerveja, a sua reacção com a OFDA e a detecção da 2,3-dimetilquinoxalina formada. Este processo de incorporação dos diferentes componentes envolveu estudos de desenho do sistema e a optimização de parâmetros tanto instrumentais como experimentais, cuja interpretação nos permite compreender os fenómenos e os processos inerentes à determinação de diacetilo utilizando este sistema.

As optimizações que se apresentam de seguida foram efectuadas utilizando o módulo de pervaporação descrito anteriormente, em *"perspex"*, com uma câmara de recepção de 1,2mm de altura, e de doação de 15mm de altura, e separador do tipo B (CT).

2.3.4.1. Introdução do módulo de pervaporação para a separação e recuperação do diacetilo

Antes da optimização individual dos parâmetros da análise, é necessário verificar a capacidade do sistema para efectuar os passos de análise. Por isso numa primeira fase foi verificado se a ligação entre o sistema concebido e a pervaporação preenchia os pré-requisitos necessários para prosseguir os estudos.

No sistema desenvolvido utiliza-se tubos de ligação em *"teflon"* e para bombear em PVC, que são sujeitos a temperaturas elevadas; o primeiro aspecto estudado foi o da impermeabilidade destes tubos à passagem do diacetilo, tanto à temperatura ambiente como à temperatura de 90°C, superior ao ponto de ebulição do diacetilo, que é de 88°C.

Para testar o sistema foi então feita uma montagem de recirculação de soluções de diacetilo em circuito fechado com tubo de *"teflon"* mergulhado em banho de água à temperatura de 90°C. Para a recirculação o circuito possuía ainda um tubo de PVC ligado a uma bomba peristáltica, que assegurava um caudal de cerca de 1mL.min^{-1}, durante 2h. Após este período as soluções eram arrefecidas por recirculação num banho frio durante 5 minutos, retiradas e derivatizadas para posterior quantificação por voltametria de adsorção em fluxo com eléctrodo de mercúrio conforme o procedimento descrito em 2.2. Os valores de referência correspondem a soluções padrão de diacetilo que foram derivatizadas directamente e detectadas da mesma forma. Na tabela II-16, é possível observar que não existem diferenças significativas quando se passa o diacetilo por tubo de *"teflon"* a 90°C, pelo que se depreende que não há fugas na tubagem,

mesmo após as 2h de recirculação que é tempo mais que suficiente para efectuar qualquer análise. Deste estudo também se pode concluir que o diacetilo é estável à temperatura de 90ºC.

Na sequência destes ensaios foi ainda testada a eficiência do módulo de pervaporação, usando uma solução padrão de diacetilo. Para isso, foi passada (0,45mL.min^{-1}) uma solução de 2150 ppb de diacetilo pela câmara de doação do módulo de pervaporação, colocado num banho a 90ºC (câmara de recepção com OFDA 0,05% em tampão fosfato 0,1M, pH 7); a solução de diacetilo pervaporado foi derivatizada e detectada conforme o anterior ensaio de recirculação. Como se pode ver na tabela II-16, apesar da perda de 24% do diacetilo da solução, verifica-se que o módulo possui capacidade para volatilizar este composto, o qual atravessa a membrana e derivatiza com a OFDA.

Tabela II-16. Valores relativos de altura de pico para soluções de diacetilo derivatizadas imediatamente, e soluções derivatizadas após recirculação de 2h a 90ºC em tubo de *"teflon"* e PVC, e após passagem pelo módulo de pervaporação.

[DAC] /ppb	Derivatização directa	Recirculação 2h a 90ºC	Passagem pelo módulo de pervaporação a 90ºC
43	100	103	-
86	100	102	76
215	100	100	-
430	100	98	-

A câmara de recepção do módulo de pervaporação possui uma geometria circular e um volume que permitem a detecção da 2,3-DMQ de uma forma similar ao *"loop"* utilizado em 2.2.. Na figura II-63 apresentam-se os voltamogramas obtidos com diferentes soluções de 2,3-DMQ utilizando um caudal de 1,33 mLmin^{-1} e o procedimento descrito na figura II-29 do capítulo 2.2; verifica-se que com esta geometria circular e uma profundidade da câmara de recepção de 1,2mm existe uma relação linear entre a concentração desta quinoxalina e a altura de pico, e com voltamogramas bem definidos.

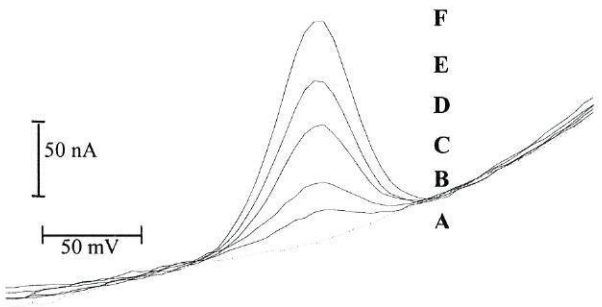


Figura II-63. Curva de calibração de 2,3-DMQ, em tampão fosfato 0,1M, pH7 e OFDA 0,05%, utilizando a câmara de recepção do modulo de pervaporação, correspondente às seguintes concentrações equivalentes de diacetilo A - 0ppb; B - 17,2ppb; C - 34,4ppb; D - 68,8ppb; E - 94,6ppb; F - 129,0ppb.

Provada a volatilização de diacetilo na câmara de doação, passou-se ao estudo da sua recuperação e derivatização na câmara de recepção. Para isso pervaporaram-se e determinaram-se soluções modelo de diacetilo padrão em água, o que permitiu não só testar a recuperação como a repetibilidade do sistema e a sua robustez.

Na figura II-64, apresenta-se uma curva de calibração de diacetilo em água utilizando o sistema de análise em-linha com pervaporação. A curva foi feita por pervaporação a 90°C, de diferentes soluções de diacetilo padrão durante 9 min., com um caudal de 0,45mL.min^{-1}, tendo-se utilizado no circuito de detecção uma solução de OFDA 0,005% em tampão fosfato 0,1M a pH 7, e o procedimento voltamétrico descrito na figura II-53 excepto a frequência que foi de 300Hz. Nestas condições obteve-se uma relação linear entre o diacetilo analisado e a altura do pico voltamétrico, numa gama de concentrações que vai pelo menos até 68,8ppb. Esta curva de calibração apresenta ainda um bom coeficiente de correlação linear, provando que o sistema pode ser utilizado na determinação do diacetilo.

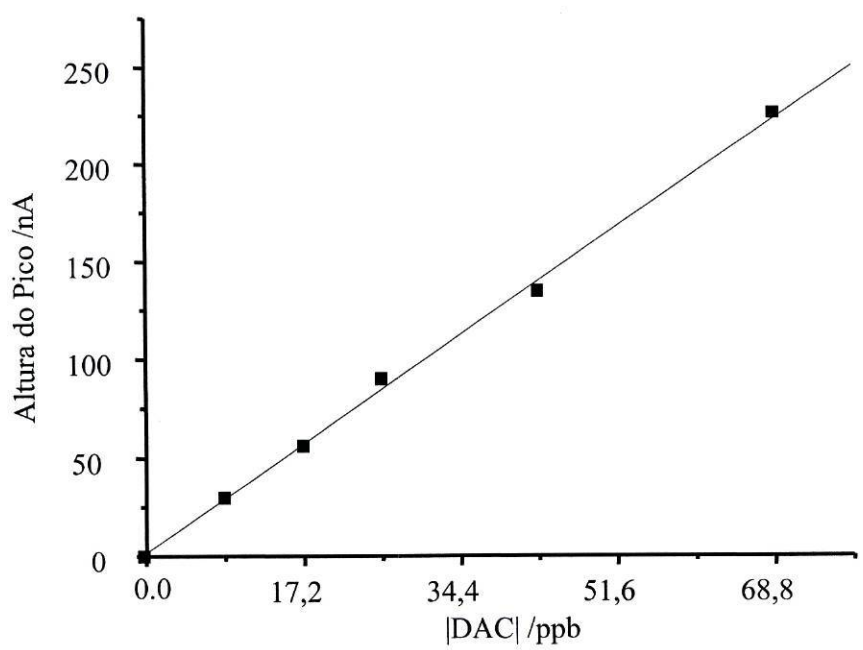


Figura II-64. Curva de calibração de diacetilo em água obtida pelo sistema de determinação de diacetilo em-linha com pervaporação e detecção voltamétrica em fluxo.

Com o objectivo de estudar a possibilidade de aplicação do método de adição de padrão na determinação de diacetilo na cerveja fizeram-se várias adições de diacetilo padrão a uma amostra de cerveja em garrafa. Os voltamogramas obtidos, utilizando as mesmas condições de análise utilizadas para a curva de calibração de diacetilo em água, são apresentados na figura II-65. Verifica-se que os voltamogramas se apresentam bem

definidos e o pico correspondente à 2,3-DMQ não possui outros picos interferentes. Extrapolando-se o valor da abcissa para a ordenada na origem, determinou-se uma concentração de diacetilo nesta cerveja de 27 ppb.

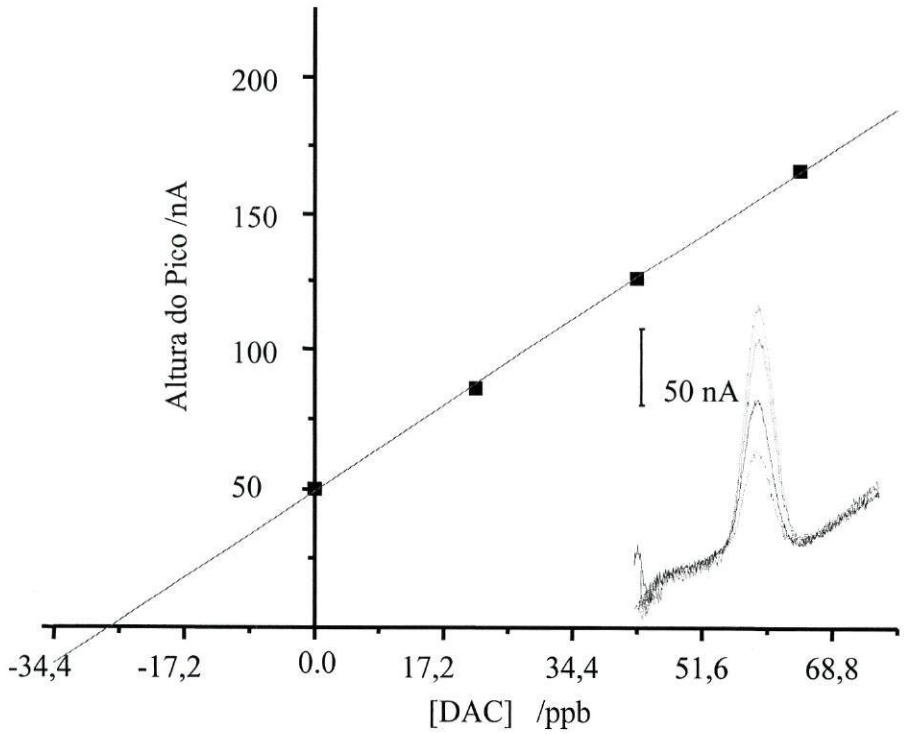


Figura II-65. Curva de adição de padrão de diacetilo em cerveja, obtida pelo sistema de determinação de diacetilo em-linha com pervaporação e detecção voltamétrica em fluxo. Concentração de DAC na cerveja é de 27 ±4 ppb.

Por comparação entre os declives das rectas da figuras II-64 e II-65, observa-se uma perda de sensibilidade quando ocorre pervaporação de diacetilo na cerveja, o que se deverá eventualmente à passagem de outros compostos não electroactivos mas que podem interferir na análise. Fica, no entanto, provada a possibilidade de utilização do método das adições de padrão.

2.3.4.2. Optimização de parâmetros de pervaporação

Optimização do caudal da cerveja

O caudal com que a cerveja é bombeada para o sistema é um factor que afecta directamente o tempo médio de residência desta no interior do módulo de pervaporação. Esta variação do período de tempo médio que a cerveja demora a passar pelo sistema afecta as condições de pervaporação do diacetilo para o "*headspace*".

Na figura II-66, representa-se o efeito da variação do caudal de cerveja na altura do pico da 2,3-DMQ resultante da pervaporação de cerveja durante 20 minutos. Verifica-se que

quanto maior o caudal da cerveja menor é o sinal voltamétrico o que indica que o passo de volatilização do diacetilo é um passo limitante no processo. No entanto, quando se utilizam caudais demasiado baixos torna-se mais difícil o controlo do caudal bem como a reprodução da passagem de cerveja pelo módulo verificando-se uma diminuição da reprodutibilidade do processo de pervaporação. Decidiu-se utilizar uma caudal de 0,40 $mL.min^{-1}$, como um bom compromisso entre a sensibilidade e a reprodutibilidade da pervaporação.

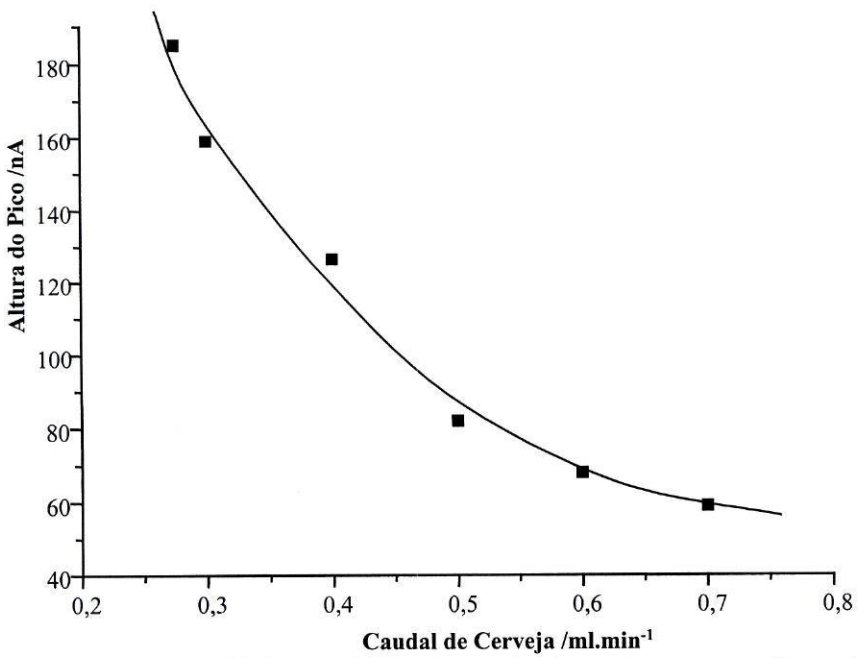


Figura II-66. Efeito do caudal de cerveja que passa pela câmara de pervaporação no sinal voltamétrico obtido. Tempo de pervaporação igual a 20 minutos.

Relativamente ao período de aquecimento da cerveja no módulo, verificou-se que para os caudais estudados, a cerveja ao passar pela câmara de doação forma sempre um fino canal de passagem pelo fundo desta cavidade, permitindo um aquecimento quase instantâneo e uniforme da cerveja, pelo que o período de aquecimento não é neste caso um factor determinante.

Optimização do tempo de pervaporação

O tempo de pervaporação é outro dos parâmetros que influencia a quantidade total de cerveja que passa a cada nova pervaporação, sendo directamente proporcional à quantidade de diacetilo possível de volatilizar. Por isso, quanto maior o tempo de pervaporação maior é a quantidade de diacetilo recuperado e derivatizado na câmara de recepção.

Para testar o efeito do tempo de pervaporação no sinal voltamétrico foi mantido um caudal de cerveja de 0,4 $mL.min^{-1}$, e variou-se o tempo de pervaporação. Na figura II-67, é possível observar que a relação de aumento do sinal com o aumento do tempo de pervaporação tem uma forma sigmoidal. Há uma fase inicial de retardamento da pervaporação, que é atribuída à necessidade de existir um período mínimo de processo para que o diacetilo evapore, permeie através da membrana e reaja com a OFDA, tempo este que com este módulo e condições demora cerca de 4 minutos. Segue-se uma fase de aumento proporcional da quantidade de diacetilo recuperado e derivatizado em relação ao aumento do tempo de pervaporação. Prosseguindo ainda mais a pervaporação esse aumento deixa de ser tão significativo, o que pode ser devido ao aumento paralelo da recuperação de compostos da cerveja que interferem na análise. Neste processo há portanto uma primeira fase com uma recuperação baixa de diacetilo, seguido-se uma fase de recuperação proporcional ao tempo de pervaporação, à qual se segue um novo abaixamento, por pervaporação de outros compostos que interferem na análise. Para o processo de pervaporação decidiu-se adoptar um tempo de 9 minutos, como um bom compromisso entre sensibilidade e tempo de análise.

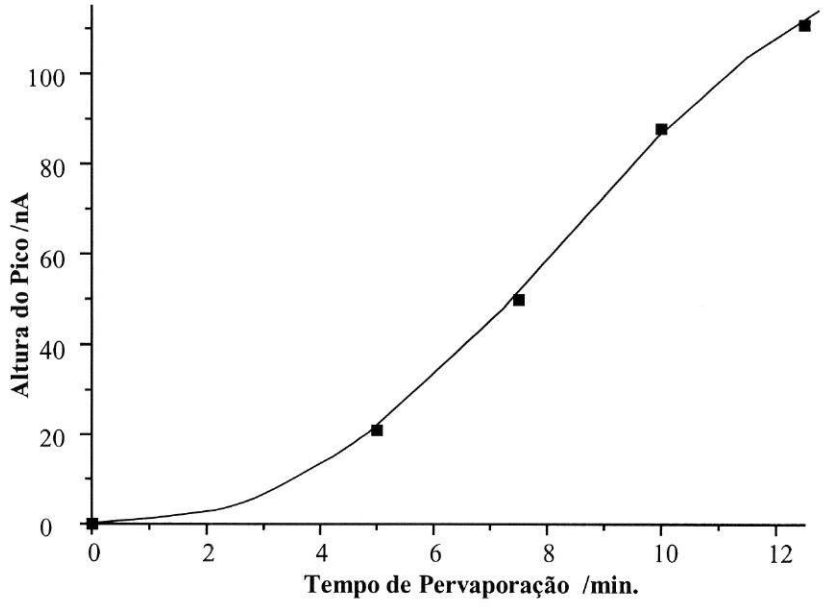


Figura II-67. Efeito do tempo de pervaporação, utilizando o sistema on-line no sinal voltamétrico associado à determinação de diacetilo da cerveja.

Com estes 9 minutos, conseguem-se de limites de quantificação da ordem dos 10ppb, o que está perfeitamente ajustado ao caso da cerveja, em que os valores normais são da ordem de algumas dezenas de ppb. No entanto, podem-se obter limites de quantificação mais baixos utilizando maiores tempos de pervaporação.

Efeito da temperatura de pervaporação

Um dos parâmetros mais importantes da pervaporação é a temperatura à qual o processo decorre, uma vez que o primeiro passo necessário é precisamente a evaporação. De uma forma geral o aumento da temperatura facilita a volatilização, o que poderá levar a um aumento da eficiência do processo. Idealmente a temperatura deverá ser igual ou superior ao ponto de ebulição do composto a separar; contudo esta não é uma condição necessária, como aliás veremos no caso do diacetilo.

É necessário ainda ter em atenção que a alteração da temperatura poderá conduzir à volatilização de outros compostos não desejados, presentes na matriz, pelo que o estudo do efeito de temperatura de pervaporação deve ser feito com cuidado.

O diacetilo possui um ponto de ebulição de 88ºC, mas como se pode ver na figura II-68 este já é pervaporado a uma temperatura bem inferior. Apesar de o sinal correspondente ao diacetilo em água aumentar com o aumento da temperatura de pervaporação, acima dos 90ºC há o inconveniente de facilmente se formarem bolhas de gás na câmara de recepção que dificultam a detecção; mais, no caso de cerveja pode-se formar espuma em maior abundância na câmara de doação o que por sua vez dificulta o processo de lavagem do módulo.

Com base nos estudos efectuados foi estabelecida a temperatura de 90ºC para a pervaporação de diacetilo, por forma a obter uma boa sensibilidade sem ocorrência dos fenómenos desvantajosos para a análise acabados de referir.

Verificou-se ainda que à temperatura de 90ºC não ocorre pervaporação apreciável de outros compostos existentes na cerveja os quais poderiam interferir na análise de diacetilo.

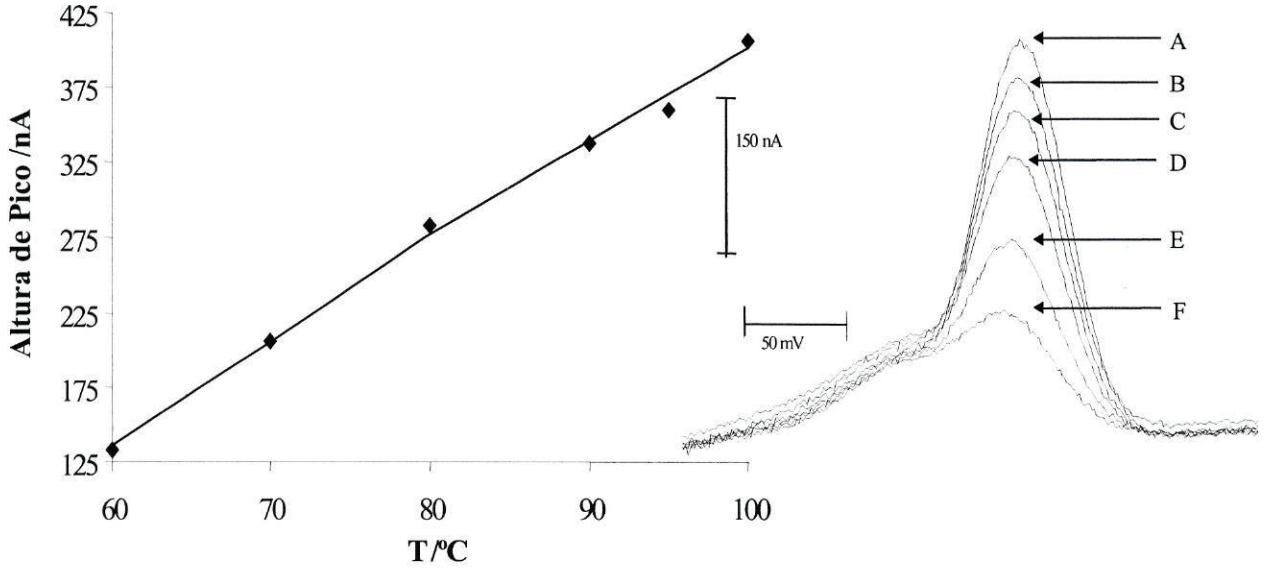


Figura II-68. Efeito da temperatura de pervaporação no sinal voltamétrico correspondente a uma solução de diacetilo de 86ppb em água. A- 100ºC; B-95ºC; C- 90ºC; D- 80ºC; E-70ºC; F- 60ºC. Frequência de 500Hz, 5 s de adsorção, OFDA 0,005%.

2.3.4.3. Optimizações de parâmetros de detecção

Optimização das condições de adsorção

Em determinadas técnicas voltamétricas, é feita a concentração dos analitos à superfície do eléctrodo antes do varrimento de potencial, possibilitando desta forma um incremento de sensibilidade.

Na figura II-69 é possível observar a variação do sinal com o aumento do tempo de adsorção, para diferentes concentrações de diacetilo. A altura do pico aumenta com o tempo de adsorção, mas começa a diminuir a partir dos 10s. Este fenómeno da diminuição dos sinais deve-se ao facto de o patamar de concentração máxima durar apenas 10 segundos, pelo que a partir desse período a concentração da 2,3-DMQ começa a diminuir no eléctrodo por redissolução no eluente.

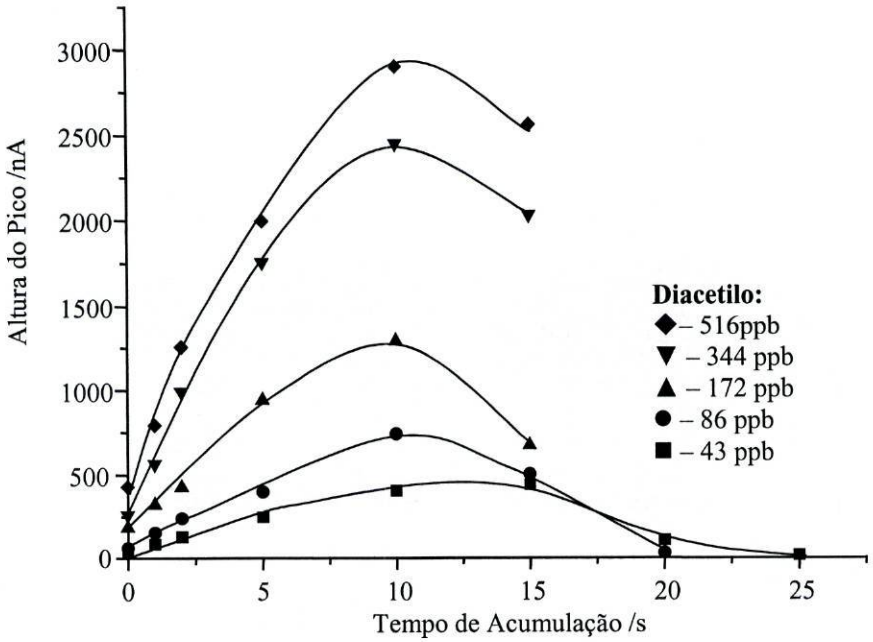


Figura II-69. Efeito do tempo de adsorção no sinal voltamétrico para diferentes concentrações de diacetilo utilizando o sistema de determinação voltamétrica em-linha.

Os resultados da figura II-69 são apresentados de uma outra forma (curva de calibração) na figura II-70. Para um tempo de adsorção superior a 5s observa-se uma progressiva perda de linearidade na curva de calibração, provavelmente por saturação do eléctrodo para o qual deverá contribuir a adsorção competitiva de outros compostos em especial da OFDA e seus produtos de degradação. Daí que se tenha decidido adoptar um tempo de acumulação de 5s, como o melhor compromisso entre sensibilidade máxima e a existência de uma gama de calibração linear.

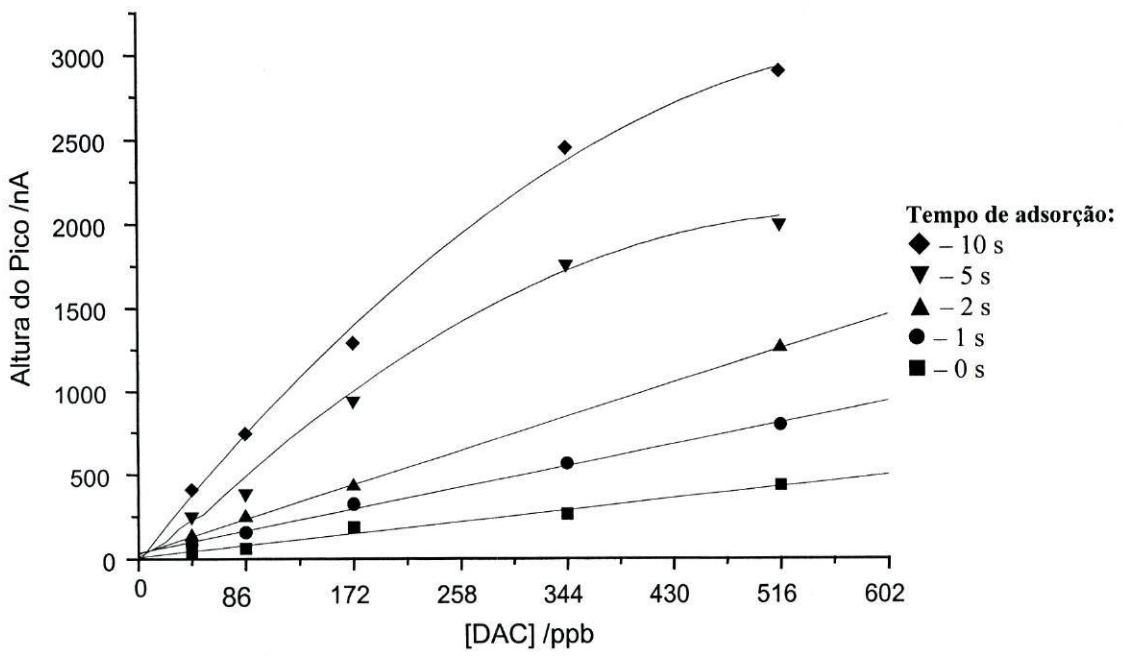


Figura II-70. Curvas de calibração de diacetilo em água utilizando diferentes tempos de adsorção, utilizando o sistema de determinação de diacetilo em-linha por voltametria em fluxo.

Optimização da frequência de onda quadrada

Como se referiu anteriormente a utilização de frequências de varrimento em onda quadrada elevadas permite a determinação de diacetilo sem a necessidade de recorrer à tradicional desoxigenação das soluções a analisar, uma vez que o sinal voltamétrico da 2,3-DMQ é muito superior ao do oxigénio.

O aumento da frequência permite ainda aumentar a altura do pico e portanto da sensibilidade, como se pode ver na figura II-71. Atendendo a que para as frequências mais elevadas há uma pior definição da linha de base sem grande aumento de sensibilidade, decidiu-se utilizar uma frequência de 500 Hz para a análise de diacetilo em-linha.

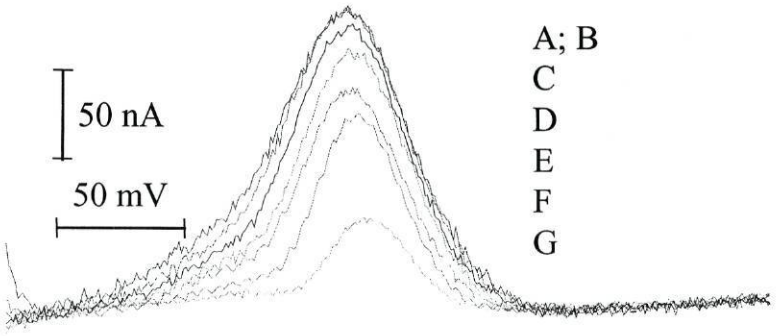


Figura II-71. Efeito da frequência de varrimento em onda quadrada na determinação de diacetilo de uma amostra de cerveja utilizando o sistema de análise de diacetilo em-linha. A- 800 Hz; B-700 Hz; C-600 Hz; D-500 Hz; E-400 Hz; F-300Hz; G-200 Hz.

Optimização da concentração de o-fenilenodiamina

A velocidade e a extensão da reacção de derivatização da OFDA com o diacetilo aumentam com o aumento da concentração de OFDA e da temperatura.

Por outro lado, um aumento da concentração de OFDA pode dar origem a uma menor adsorção da 2,3-DMQ no eléctrodo, causando uma diminuição do sinal voltamétrico por voltametria com adsorção, conforme se pode observar na tabela II-17.

Tabela II-17. Variação relativa do sinal voltamétrico de diacetilo na cerveja para diferentes concentrações de OFDA em tampão fosfato 0,1M, pH7, utilizado para a reacção de derivatização na câmara superior.

[OFDA] W/W	**0.0025%**	**0.0050%**	**0.0075%**	**0.010%**	**0.020%**	**0.035%**	**0.05%**
% Sinal	76	100	73	71	69	49	30

Enquanto a quantidade de OFDA não é suficiente para que a reacção de derivatização seja completa, o sinal aumenta com a concentração da OFDA (até 0,005%). Para concentrações superiores de OFDA, o sinal tem tendência a decrescer dada a sua interferência no processo de adsorção no eléctrodo. No entanto, a resposta voltamétrica continua a ser linear, como se pode observar na figura II-72.

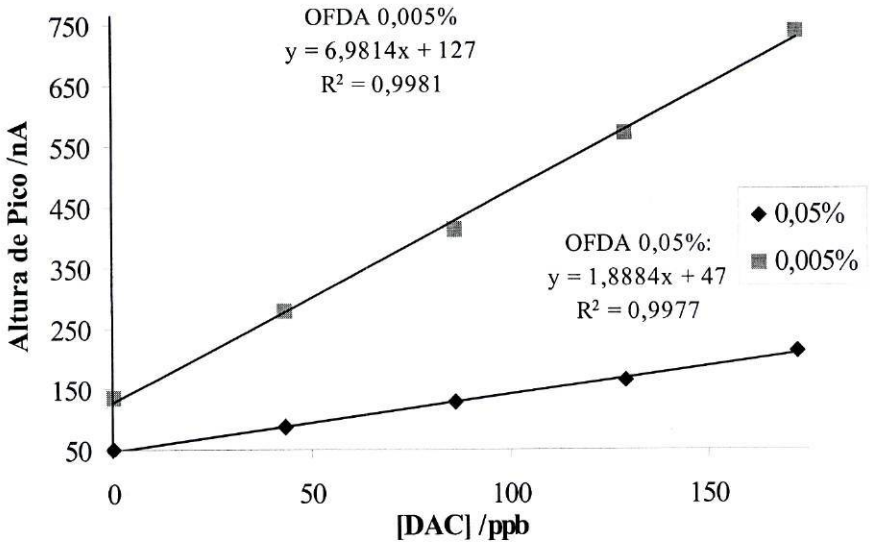


Figura II-72. Curvas de calibração de diacetilo por pervaporação de diacetilo adicionado em cervejas distintas, utilizando OFDA 0,05% e OFDA 0,005%.

2.3.4.4. Estudo de interferências

O oxigénio é considerado a mais importante das interferências em qualquer redução voltamétrica utilizando um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Contudo, como já foi demonstrado, na determinação do diacetilo em-linha quando se utiliza um varrimento de onda quadrada de elevada frequência, neste caso acima de 100Hz, o oxigénio deixa de constituir um problema na análise, não existindo a necessidade de o eliminar da solução a analisar.

O etanol é uma outra interferência a considerar, uma vez que existe um ligeiro decréscimo da sensibilidade na sua presença, situação esta que é similar à encontrada nas determinações em vinhos [179], embora essa diminuição dos sinais devido ao etanol seja no sistema em-linha bastante menor. Para a determinação de diacetilo em cerveja os valores de etanol usuais (inferiores a 7% em volume) não provocam alterações significativas na curva de calibração.

O dióxido de enxofre é um outro composto que pode interferir e que aparece na cerveja naturalmente (formado durante a fase de fermentação) ou por adição antes do

enchimento. O dióxido de enxofre, na forma de hidrogenosulfito, forma um aducto com diacetilo por ligação aos seus dois grupos cetónicos. Para estudar o efeito desta possível interferência, procedeu-se à determinação de diacetilo em-linha por voltametria em fluxo utilizando cerveja, que, após ter sido deixada aberta à exposição do ar para oxidar o SO_2 natural, foi dopada com 86 ppb de diacetilo e concentrações distintas de SO_2 até ao máximo de 10ppm (esta é uma concentração que se pode encontrar na cerveja final, mas que constitui um valor superior aos níveis usualmente encontrados na cerveja em fermentação). A reposta voltamétrica correspondente ao pico da 2,3-DMQ não varia significativamente com o aumento da concentração de SO_2 adicionada, como se pode observar na tabela II-18, pelo que se conclui que nestas condições de análise e para concentrações de dióxido de enxofre até 10 ppm, este não constitui uma interferência na determinação em-linha do diacetilo.

Em geral, o acetaldeído representa mais de 90% da quantidade total dos aldeídos existentes na cerveja, tendo por isso sido utilizado como indicador de possível interferência de aldeídos e outros compostos carbonílicos na determinação em-linha de diacetilo. Com esse objectivo, fizeram-se análises de diacetilo na cerveja com a adição de acetaldeído até 10ppm, valor que é superior aos valores que usualmente se encontram na cerveja. Na tabela II-18, pode-se observar que também o acetaldeído não interfere na análise em-linha do diacetilo na cerveja (verificou-se, apenas, que a adição de 10ppm provoca uma ligeira subida da linha de base).

De salientar que estes três compostos, o etanol, o dióxido de enxofre e o acetaldeído, interferem na determinação do diacetilo pelo método de referência por CG-DCE, num grau maior do que no método voltamétrico o que revela uma vantagem adicional do método aqui apresentado.

Tabela II-18. Interferência do dióxido de enxofre e do acetaldeído no sinal voltamétrico de diacetilo. Amostra cerveja + 86 ppb de diacetilo.

	[SO_2/Acetaldeído] / ppm	**Variação Relativa /% sinal**	**Notas**
SO_2	1,00	(-) 8	A cerveja ficou 5 dias a oxidar o SO_2 existente, pelo que não existe SO_2 natural nas análises.
	2,00	(-) 6	
	5,00	0	
	10,00	(+) 1	
Acetaldeído	0.05	(-) 4	A análise do diacetilo foi feita logo após a abertura da cerveja.
	0.25	(-) 1	
	1	(+) 1	
	2	(+) 5	
	5	0	
	10	(-) 4	

A 2,3-pentanodiona é um outro composto carbonílico muito similar ao diacetilo, que usualmente se encontra na cerveja em concentração similar ou ligeiramente inferior à do diacetilo. Estes dois compostos constituem a quase a totalidade das α-dicetonas voláteis existentes na cerveja, pelo que a sua determinação conjunta é geralmente designada por teor de dicetonas vicinais. Embora esta determinação de α-dicetonas continue a ser o método utilizado em muitas cervejeiras para controlo da fermentação, a 2,3-pentanodiona possui um limite de percepção sensorial 10 vezes superior ao do diacetilo, pelo que a sua influência no aroma da cerveja é muito menor do que a do diacetilo. Por esta razão, e com o advento das técnicas cromatográficas que permitem a determinação separada destes dois composto, tem-se evoluído para a utilização em termos industriais apenas do valor referente ao diacetilo.

A 2,3-pentanodiona é usualmente uma interferência na análise voltamétrica do diacetilo pois também reage com a OFDA dando origem a uma quinoxalina (2-etil-3-metilquinoxalina) que possui um potencial normal de redução igual ao da 2,3-dimetilquinoxalina. Para avaliar a interferência da 2,3-pentanodiona na determinação em-linha de diacetilo, foi feita a comparação entre os sinais resultantes da adição à cerveja de diacetilo e de 2,3-pentanodiona. Como se pode observar na figura II-73, o método voltamétrico em fluxo desenvolvido é muito mais sensível para o diacetilo do que para a da 2,3-pentanodiona. Estes estudos foram efectuados para uma gama de concentração destes compostos que cobre as concentrações que se podem encontrar na cerveja final e durante a fase de maturação, que são as fases em que o controlo do diacetilo é mais importante.

A menor sensibilidade para a 2,3-pentanodiona (ponto de ebulição de 110-112ºC) pode ser explicada por ser um composto menos volátil do que o diacetilo (ponto de ebulição de 88ºC), e portanto apenas uma pequena fracção ser pervaporada à temperatura de 90ºC a que está o banho. Portanto, verifica-se que nestas condições de análise e para as concentrações estudadas, a 2,3-pentanodiona não constitui uma interferência significativa na determinação em-linha de diacetilo na cerveja utilizando o módulo de pervaporação em *"perspex"*.

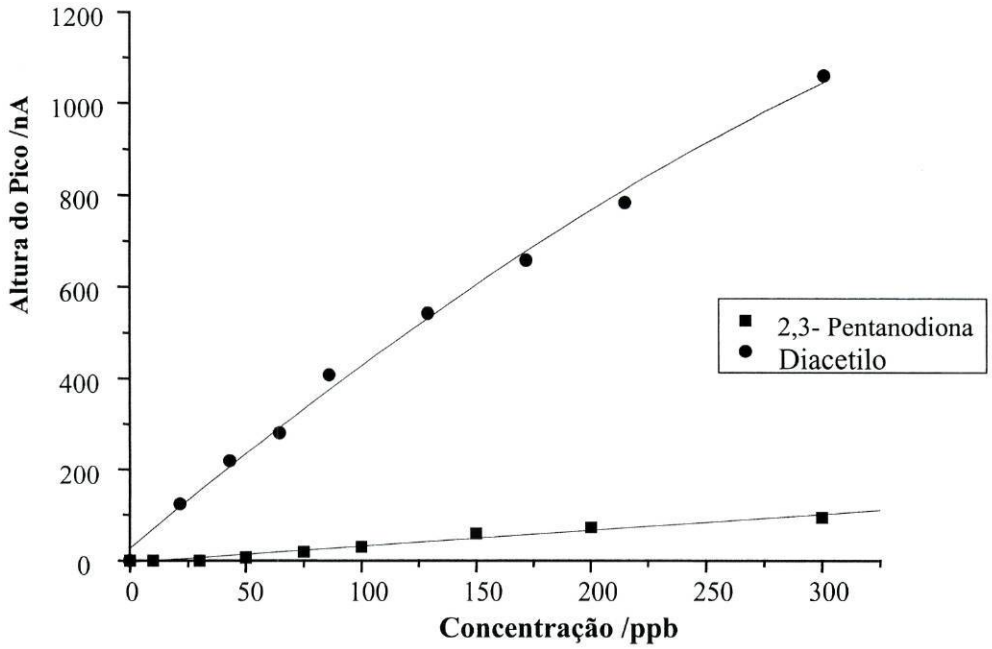


Figura II-73. Comparação entre os sinais resultantes de adições à cerveja de diacetilo e 2,3-pentanodiona, utilizando o sistema voltamétrico em fluxo e pervaporação a 90ºC, com o módulo em "*perspex*".

Dos estudos anteriores, verifica-se que o sistema em-linha desenvolvido com detecção voltamétrica em fluxo acoplado a um módulo de pervaporação em "*perspex*", se apresenta como um sistema bastante específico para a determinação de diacetilo na cerveja, capaz de separar de forma efectiva e eficaz o diacetilo da restante matriz de cerveja.

2.3.4.5. Efeito do material do módulo de pervaporação

Embora o teor de diacetilo simples seja cada vez mais o valor de referência para os cervejeiros, a tradicional utilização do teor de α-dicetonas no controlo do processo continua a ser amplamente empregue, quer para as muitas cervejeiras que usam o método espectrofotométrico de referência, muito mais barato, quer mesmo para as que já utilizam a cromatografia como método de análise mas que mantêm ainda o seu processo controlado pelo nível de dicetonas vicinais totais. Neste contexto, foram estudadas possibilidades de determinar conjuntamente o diacetilo e a 2,3-pentanodiona na cerveja utilizando o sistema desenvolvido.

Os primeiros modelos do módulo de pervaporação foram feitos em *"perspex"*, um material translúcido, que permite a visualização do interior, facilitando o acompanhamento do processo de pervaporação. Porém, o uso deste material plástico não constitui a melhor opção no sentido de facilitar a transferência de calor do banho de

aquecimento para a cerveja, sendo o uso de metais uma opção mais lógica. Desta forma foi fabricado um módulo cuja câmara de doação foi feita em aço inoxidável, o que desde logo permitiu uma maior uniformidade entre a temperatura do banho e a temperatura no interior do módulo.

Para este estudo variou-se a temperatura de pervaporação e determinou-se o seu efeito na pervaporação de soluções aquosas $1x10^{-6}M$ de diacetilo (86ppb) e de 2,3-pentanodiona (100ppb) utilizando o módulo em aço.

Os resultados obtidos com as condições anteriormente desenvolvidas, mas substituindo módulo em *"perspex"* por um módulo em aço estão representados na figura II-74. Nesta figura pode-se verificar que com o módulo de aço existe um grande aumento da recuperação da 2,3-pentanodiona em relação ao diacetilo, quando comparado com o módulo em *"perspex"* (ver figura II-73). A diferença encontrada no comportamento de ambos os compostos no módulo de aço em relação ao de *"perspex"* pode ser justificada pelo facto de o primeiro permitir uma homogeneidade da temperatura entre o interior e exterior do módulo, muito embora este factor por si só não justifique o comportamento observado.

Deste estudo concluí-se que usando uma temperatura de pervaporação de cerca de 85°C, e o módulo em aço, se consegue uma recuperação similar dos dois compostos na cerveja. Desta forma fica facilitada a determinação das dicetonas vicinais recorrendo a curvas de calibração ou de adição de padrão de diacetilo.

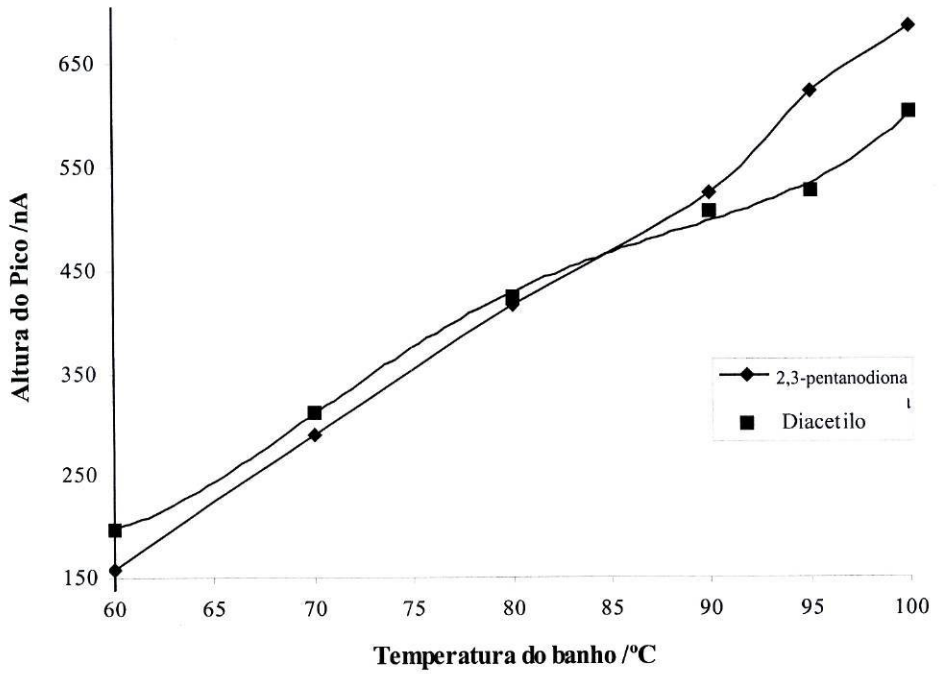


Figura II-74. Efeito da temperatura de pervaporação no sinal voltamétrico de α-dicetonas, utilizando o módulo de aço, com soluções aquosas de $1x10^{-6}M$ de pentanodiona (100ppb) e diacetilo (86ppb).

Esta semelhança de comportamento foi confirmada pelas curvas de calibração do diacetilo e da 2,3-pentanodiona obtidas com pervaporação a 85°C, e que se apresentam na figura II-75.

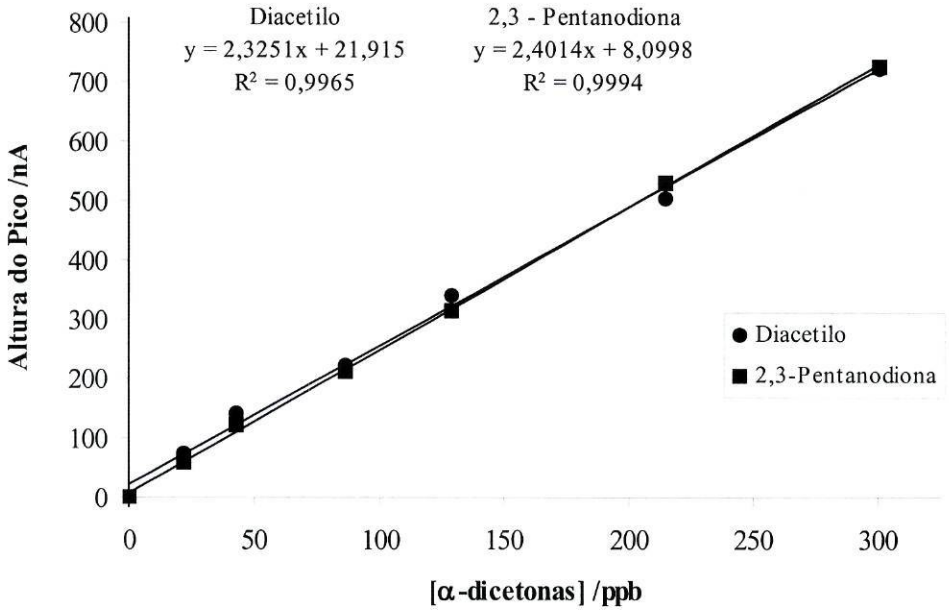


Figura II-75. Calibração de 2,3-pentanodiona e diacetilo utilizando o módulo de aço a 85°C.

Na tabela II-19, são apresentados os resultados obtidos na análise de uma amostra de cerveja dopada quer com diacetilo quer com 2,3-pentanodiona, utilizando o método de determinação de α-dicetonas em-linha desenvolvido, verificando-se apenas uma diferença mínima nos aumentos dos sinais obtidos para cada um dos casos. Este resultado sugere que o sistema em-linha com voltametria de adsorção em fluxo e pervaporação, também pode ser utilizado para a determinação de α-dicetonas, necessitando apenas uma modificação do módulo de pervaporação que terá de ter a câmara de doação em aço e uma temperatura do banho de 85°C.

Tabela II-19. Determinação de diacetilo e 2,3-pentanodiona na cerveja, utilizando o módulo de pervaporação em aço e temperatura do banho a 85°C.

Amostra	***Cerveja***	***Cerveja + 2,5x10^{-6} M DAC***	***Cerveja + 2,5x10^{-6} M PTD***
Altura do Pico /nA	192	715	698
Diferença Relativa		3,20%	

2.3.4.6. Preparação de amostras para a determinação do diacetilo total e de α-dicetonas

A quantificação do diacetilo na cerveja é muito importante para o controlo do processo de fermentação, designadamente na sua fase de maturação. No produto final a determinação do diacetilo serve para auditoria ao produto comercializado.

Como já se referiu anteriormente o diacetilo propriamente dito, chamado diacetilo livre, não existe em níveis muito significativos durante a fermentação/maturação, existindo sob a forma de diacetilo potencial como α-acetolactato. Durante a fermentação existe biossíntese pela levedura do α-acetolactato e não do diacetilo, sendo o precursor excretado para a cerveja numa fase inicial. Como a sua conversão em diacetilo é muito lenta nas condições de fermentação e quando no exterior das células, verifica-se que do diacetilo total encontrado na cerveja a quase totalidade está sob a forma de α-acetolactato. Então, caso se queira quantificar o diacetilo total, é necessária a pré-conversão do α-acetolactato em diacetilo antes da determinação.

A conversão de α-acetolactato em diacetilo é uma reacção de descarboxilação oxidativa, que já anteriormente foi discutida. Esta reacção de conversão dá-se usualmente no interior das células de levedura, mas também se dá espontaneamente na cerveja sendo neste caso dependente da existência de oxigénio e catalizada pelo calor e catiões metálicos. Têm sido propostas várias formas de efectuar esta pré-conversão na cerveja, sendo contudo o procedimento descrito no analytica-EBC [14, 15] talvez o mais utilizado pela indústria cervejeira, Neste procedimento a pré-conversão é obtida por aquecimento de cerveja à temperatura de 60°C, durante 90 minutos. Na figura II-76 é possível observar a cinética da pré-conversão a temperatura mais elevada (90°C) e que demora cerca de $^1/_3$ do tempo do procedimento tradicional.

Em relação à determinação de α-dicetonas o caso da 2,3-pentanodiona é análogo ao do diacetilo, e por isso é necessária também uma pré-conversão do seu precursor, o α-acetohidroxibutirato, em 2,3-pentanodiona antes da sua análise, a qual pode feita exactamente com o mesmo tipo de procedimentos.

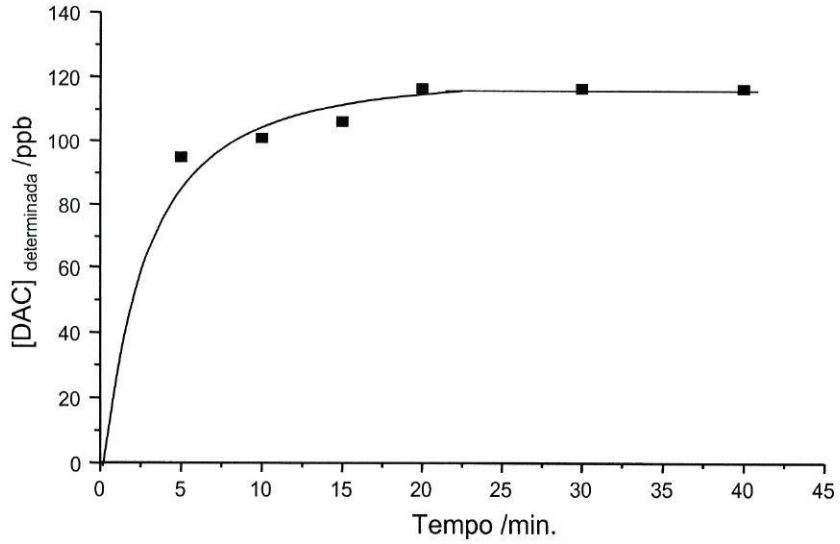


Figura II-76. Cinética de pré-conversão do α-acetolactato em diacetilo a 90ºC, de uma amostra de cerveja em maturação.

Em termos de preparação para análise há dois procedimentos distintos, conforme se trata de cerveja em fermentação/maturação ou cerveja já pasteurizada. Do ponto de vista analítico, a pasteurização actua como a pré-conversão pelo que as amostras de cerveja já pasteurizadas podem seguir para análise directamente, como se pode concluir pelos resultados apresentados na tabela II-20. Na cerveja não pasteurizada o diacetilo está quase todo sob a forma de α-acetolactato, sendo portanto necessária a pré-conversão porque, de uma forma geral, é o valor do diacetilo total que interessa aos cervejeiros. Para análise do diacetilo livre na fermentação/maturação não se pode efectuar nem pré-conversão nem pasteurização da amostra.

Tabela II-20. Efeito da pré-conversão de cerveja em garrafa, na concentração de diacetilo determinada utilizando o sistema em fluxo.

Amostra	**Directamente /ppb**	**60 min. 60ºC /ppb**	**Variação Relativa / %**
1	30	30	0
2	47	45	-4
3	29	32	+10
4	25	22	-12
5	28	27	-4
6	29	29	0
Média	**31,3**	**30,7**	**-2**

Convém notar que há outras diferenças na preparação de amostras, uma vez que carbonatação é superior no produto final e a presença de levedura e proteínas não estabilizadas é superior na cerveja em fermentação/maturação.

Pelo facto de a preparação de amostras exigir diferentes procedimentos consoante a sua natureza, apresenta-se de seguida os procedimentos tipo estabelecidos para a análise em-linha de diacetilo e α-dicetonas na cerveja em diferentes fases do processo.

Amostras em fermentação/maturação e cerveja não pasteurizada

As amostras devem ser filtradas por duas vezes através de papel de filtro para reter a maioria da levedura em suspensão, que de outra forma poderia causar uma redução acelerada do diacetilo da amostra provocando erros negativos de determinação. A esta filtração segue-se a descarbonatação e oxigenação da cerveja, feitas através do transvase desta entre gobelés por 10 vezes.

Seguidamente, passa-se, consoante o tipo de análise, para a fase de pré-conversão ou para a análise directa da cerveja; neste último caso (determinação de diacetilo livre) a amostra pode ser aspirada directamente para o circuito de cerveja e a análise começar de imediato.

No caso da determinação do diacetilo total, é necessário um passo de pré-conversão. Este pode ser feito por aquecimento da amostra filtrada durante 90 min. a 60ºC em vaso aberto ou durante 25min a 90ºC num vaso estanque. Antes da aspiração da cerveja para o sistema de análise em-linha é preciso esperar que a amostra atinja a temperatura ambiente.

Amostras de cerveja já pasteurizada

Este tipo de cerveja geralmente já sofreu um passo de filtração prévio pelo que apenas necessita de ser descarbonatada antes de ser aspirada para análise.

Amostras para análise por CG-DCE

Antes de serem colocados no analisador, estas amostras são submetidas ao mesmo tipo de preparação usada na análise voltamétrica. Nos ensaios comparativos foram utilizadas as mesmas amostras para ambas as determinações.

2.3.5. Desenvolvimento de um protótipo do equipamento

A adaptação do sistema de separação em-linha por pervaporação obrigou ao aumento da complexidade do sistema. Foi necessário introduzir uma rede de válvulas com o objectivo de formar diferentes canais de fluxo que permitissem efectuar a análise de forma automática.

A automatização foi efectuada usando uma estratégia de multicomutação, à base de válvulas selectoras de três vias, as quais apresentam várias vantagens como, maior simplicidade, baixo custo, e facilidade de controlo.

O funcionamento do automatismo segue um procedimento tipo, constituído por uma sequência de passos que representam uma acção analítica definida, que corresponde à abertura de sucessivos circuitos de fluxo e/ou variação de caudal do sistema. Cada procedimento pode então ser definido por um ajuste conveniente da sequência de válvulas actuadas, da duração do passo, do caudal imposto ao circuito de detecção e do controlo da aquisição de dados.

Com a introdução do automatismo a análise torna-se muito mais simples, o que permite aumentar o rendimento e reduzir os erros de manuseamento. Como se referiu anteriormente a pervaporação constitui de longe o passo limitante da análise; de tal modo que é possível efectuar a detecção, incluindo a lavagem do sistema de detecção, em menos de metade do tempo que demora a pervaporação; sendo assim, foi possível introduzir um segundo sistema de pervaporação desfasado do primeiro, o que permitiu duplicar a frequência de análise.

2.3.5.1. Hardware de controlo

O sistema de fluxo foi automatizado utilizando uma estratégia similar à descrita para sistemas de fluxo multicomutados [120]. A utilização de uma rede automática multiválvulas provou ser a opção mais adequada, tendo sido utilizadas na sua construção válvulas solenóides de selecção com 3 vias. Os solenóides são actuados por passagem de corrente alterna de 12V, proveniente de um *"drive"* de potência construído com base em duas unidades de integrados ULM 2003 e controlado via PC por sinais TTL. O envio dos sinais TTL do PC está a cargo de um placa PCL-711s, que os gera segundo o procedimento executado pelo software de controlo. Um deste sinais TTL é ainda reencaminhado para a porta 2 do módulo DIO48 do Autolab PGSAT 10, para servir de *"trigger"* para inicializar o software de aquisição de dados.

Apenas uma das bombas peristálticas foi utilizada com velocidade variável, a minipulls3 (mnp3), à custa de um controlo analógico de velocidade conseguido por modelação variável de 0-10V, sinal esse que era variado por uma placa ADC/CAD DCPLD 8115, consoante o procedimento executado pelo software de controlo.

2.3.5.2. Software de controlo e de aquisição de dados

Software de controlo

O software de controlo permite regular os fluxos e caudais do sistema bem como a aquisição de dados, tendo sido desenhado de forma a que se possam criar rotinas de análise com múltiplos passos. Numa mesma rotina podem-se incluir um ou mais procedimentos de análise, sendo cada um dos passos que a constituem correspondente a um novo ajuste da actuação das válvulas e/ou velocidade da bomba peristáltica mnp3. Sempre que se pretenda alterar a circulação de fluidos pelos circuitos de análise e/ou de cerveja bem como os seus caudais, ou caso se pretenda enviar um sinal de *"trigger"* para inicializar o software de aquisição de dados, terá que ser criada uma nova rotina.

O software de controlo do automatismo foi programado em Visual Basic 3.0, podendo a respectiva folha de entrada ser observada na figura II-77A. Essa janela de entrada no software contém uma opção para programar novas rotinas de análise (1), outra para iniciar o software de controlo (2), outra para editar e fazer alterações à rotina (3), as opções 4 e 6 para recolha e carregamento para execução de ficheiros de rotinas previamente gravadas para análises com 1 e 2 módulos de pervaporação respectivamente e, por fim, as opções 5 e 7 que gravam rotinas previamente escritas ou editadas, sendo 7 a opção de saída.

A figura II-77B apresenta uma tabela de programação das rotinas de análise (neste caso um procedimento para sistema com apenas 1 módulo de pervaporação), cujos diferentes passos se encontram em colunas. Podem ser controladas até 14 válvulas, as quais se definem em energisadas (1) e sem corrente (0); é ainda possível variar a direcção de rodagem da cabeça da bomba peristáltica (para a direita ou para a esquerda), o caudal do circuito de análise e o envio de um sinal "trigger" para activação do GPES; na opção tempo coloca-se a duração pretendida para cada passo.

A Figura II-77C é uma janela que nos indica o estado do sistema, como as válvulas que estão actuadas, a velocidade da bomba peristáltica e ainda o envio do *"trigger"*.

Quando se inicia o software de controlo, é portanto possível visualizar o estado do sistema conforme o procedimento, o que permite a qualquer momento saber em que fase é que está a análise.

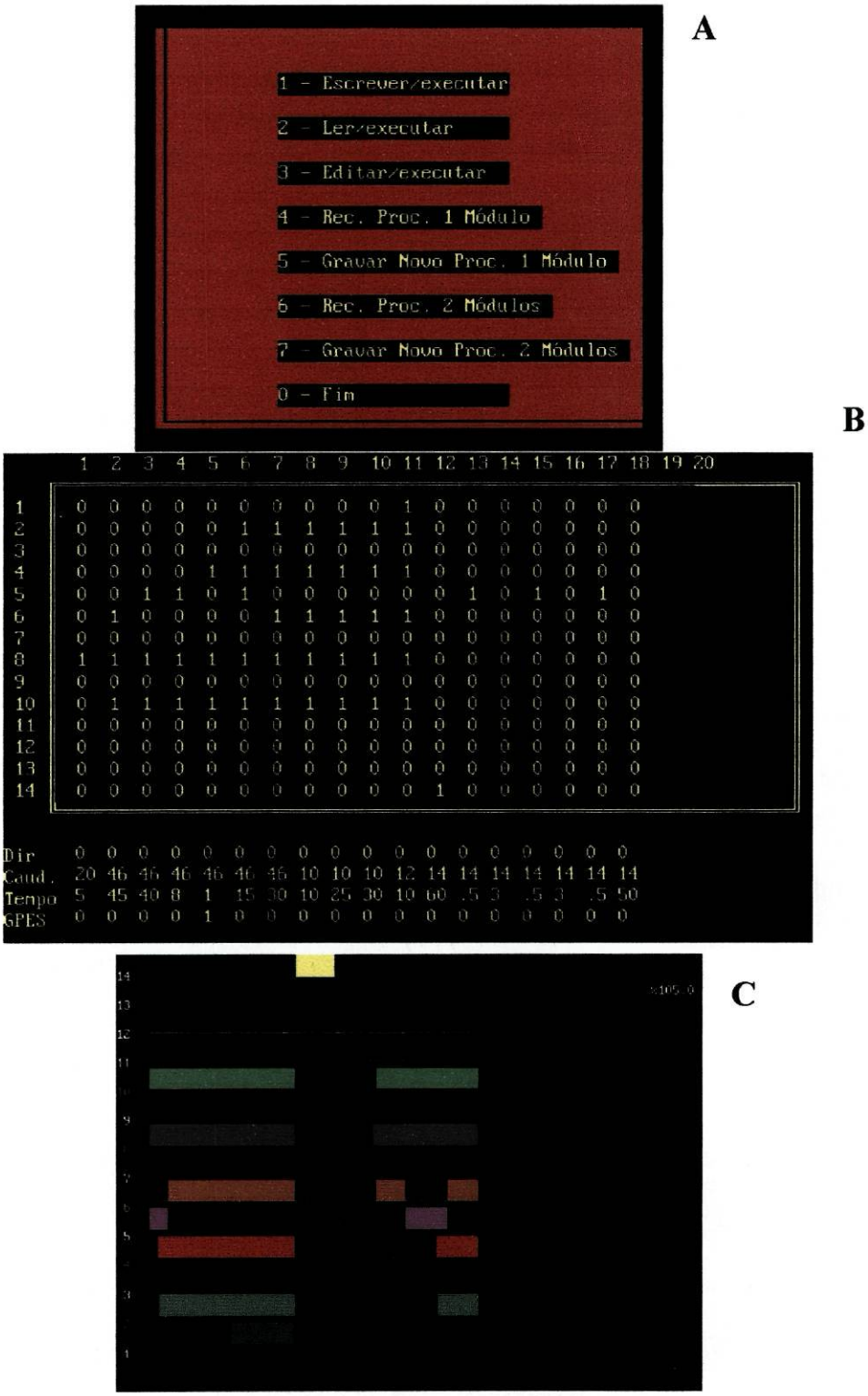


Figura II-77. Software de controlo. A - Janela de entrada; B – Tabela de programação de rotinas de análise com as opções de controlo oferecidas pelo software, que se encontra carregado com um procedimento simples de análise de diacetilo num sistema com 1 único módulo de pervaporação; C- Janela indicativa do estado do sistema.

Software de aquisição de dados

Para a aquisição de dados utilizou-se o software "Project" do GPES 4.8, constituído também por uma rotina que espera um sinal externo TTL para fazer carregamento do procedimento voltamétrico, a aquisição de dados, e por fim a gravação e tratamento analítico dos voltamogramas. A activação deste programa está dependente do software de controlo, actuando de forma autónoma após ter sido desbloqueado pelo sinal de *"trigger"*, programado para ser enviado no momento da injecção.

2.3.5.3. Utilização de um ou dois módulos

A utilização de pervaporação em-linha veio permitir a análise em contínuo de diacetilo na cerveja. Contudo, quando se muda de amostra pode-se ter de determinar diferentes concentrações de analito pelo que o uso de procedimentos de limpeza é necessário de forma a eliminar a interferência da análise anterior. Esta limpeza é feita por passagem alternada de água e ar, respectivamente para eliminar resíduos líquidos de cerveja e o diacetilo presente no *"headspace"*. Naturalmente, existe um passo de limpeza análogo no circuito de detecção, que consiste na passagem de eluente pela câmara de recepção durante o período de lavagem da câmara inferior.

Estes passos de limpeza introduzem portanto novas tarefas no procedimento de análise, que conta agora com 4 fases distintas: a detecção, a lavagem do sistema, o enchimento com o-fenilenodiamina e a pervaporação.

Temporalmente estes processos encontram-se organizados conforme se pode observar na figura II-78, onde se pode ver a disposição das diferentes fases a decorrer em cada um dos circuitos.

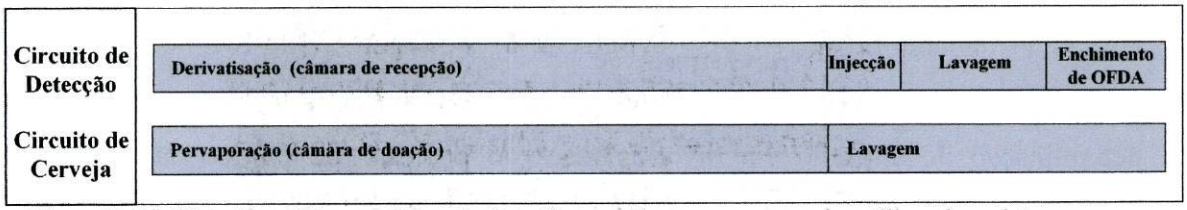


Figura II-78. Ciclo de análise em fluxo de diacetilo e α-dicetonas na cerveja, utilizando o sistema em-linha com 1 módulo de pervaporação.

Como se pode observar, a célula voltamétrica em fluxo está sem funcionar durante a maior parte do tempo, enquanto decorre o passo de pervaporação. Esta circunstância permite que o mesmo detector possa ser utilizado por mais do que um sistema de pervaporação desde que estejam convenientemente desfasados. Uma vez que são necessários 2-3 minutos para a detecção, incluindo injecção, lavagem e enchimento com a OFDA e 9 minutos para a pervaporação, é possível triplicar a cadência de análise, colocando 3 módulos em fases distintas ligadas a um único detector. Como aplicação, construiu-se um sistema com dois módulos em alternância de fase, o que permitiu aumentar a frequência horária de análise de 5 para 10. Naturalmente a rotina de programação é neste caso mais complexa, tal como o desenho do próprio sistema. Contudo os procedimentos individuais para cada um dos módulos de pervaporação mantiveram-se, embora temporalmente desfasados, como se pode observar na figura II-79.

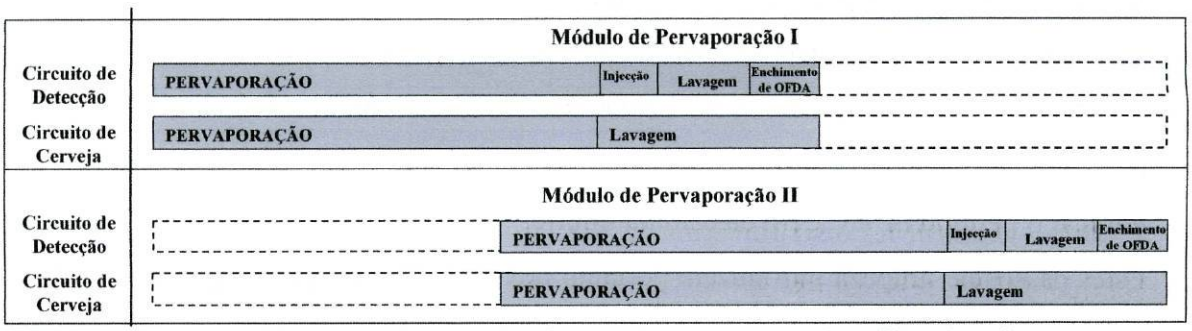


Figura II-79. Ciclo de análise em fluxo de diacetilo e α-dicetonas na cerveja, utilizando o sistema em-linha com 2 módulos de pervaporação.

2.3.6. Determinação de diacetilo em-linha

O equipamento desenvolvido de determinação em-linha de diacetilo na cerveja foi testado no laboratório da UNICER- Bebidas de Portugal, SGPS-SA, localizado no centro de produção de Leça do Balio. O objectivo foi aplicar o equipamento na determinação de diacetilo em diversas fases do processo de fabrico da cerveja, e efectuar a comparação desses resultados com os obtidos pelo método de referência de CG-DCE utilizado nesse mesmo laboratório.

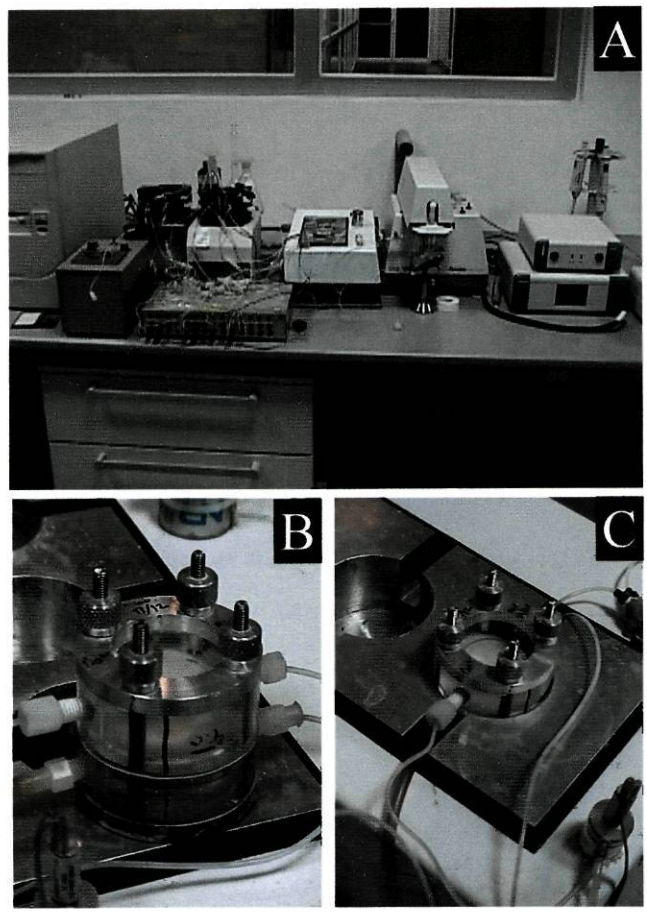


Figura II-80. Fotos do sistema em-linha utilizado para os ensaios de validação. A – vista geral; B – foto do módulo de pervaporação; C – foto do módulo de pervaporação montado no bloco de aquecimento.

2.3.6.1. Condições instrumentais de análise

Na figura II-81, resumem-se as condições instrumentais de análise de diacetilo em-linha utilizando o equipamento de voltametria em fluxo proposto.

Hidrodinâmicas:

Circuito de Detecção:

"*Loop*" aprox. 850 µl.
Caudal, 1,33 ml min-1.
Patamar de detecção após injecção 20-55 s.

Circuito de Cerveja:

Caudal de cerveja, 0,40 ml min-1 .

Físico/Químicas:

Eluente, tampão fosfato 0,1M, pH 7.
Solução de recepção, tampão fosfato 0,1M, pH 7 com OFDA 0,005%.
Tempo de pervaporação/derivatização, 9min.
Temperatura de pervaporação, 90ºC.

Voltamétricas:

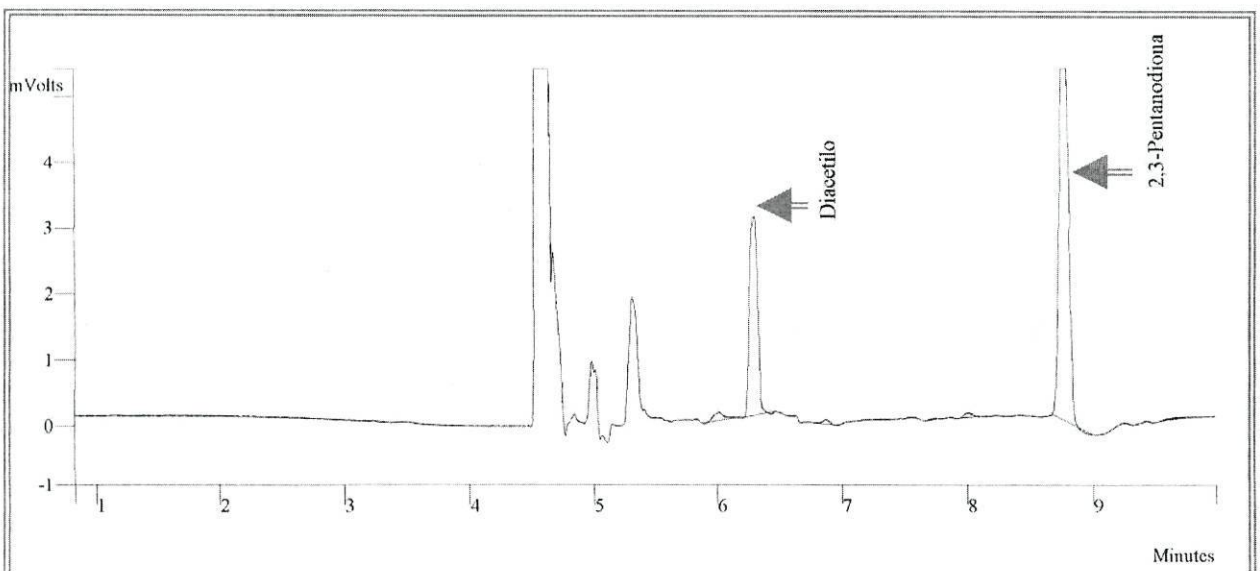
Voltametria de onda-quadrada, com varrimento a 500 Hz de frequência.
t_{purga}= 22s; $E_{adsorção}$= -0,6V; $t_{adsorção}$=5s.
E_i= -0,6V; E_f= -1,0V; E_{escada}= 1,05 mV; $E_{amplitude}$= 4,95 mV.
Posto 663VA "Stand", ajustado sem purga, sem agitação e para um tamanho de gota de 2.

Figura II-81. Condições instrumentais optimizadas para a determinação em-linha de diacetilo na cerveja.

2.3.6.2. Método de referência – Cromatografia em fase gasosa com detector de captura de electrões

Dado que o método espectrofotométrico de referência [14] (Analytica-EBC) não permite determinar individualmente o diacetilo, o uso do método de cromatografia gasosa com detecção por DCE [15] (Analytica-EBC) tem vindo a ser generalizado nas grandes cervejeiras. Este método, que está descrito no Anexo V, permite detectar separadamente o diacetilo e a 2,3-pentanodiona, pelo que pode também ser utilizado para a determinação das α-dicetonas.

Na figura II-82, está reproduzido um cromatograma típico obtido utilizando o método de referência para determinação de diacetilo e 2,3-pentanodiona. Este cromatograma foi obtido com uma amostra de cerveja em maturação.



Calculation Notes:

Nº. de Pico	Nome do Pico	Resultado (ppm)	Tempo de Retenção (Min.)	Área do Pico
1	Diacetilo	0,073	6,29	13677
2	Pentanodiona	0,089	8,77	31713
	Totals	**0,162**		**45390**

Figura II-82. Cromatograma de uma amostra de cerveja em maturação, obtido por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões, utilizando o método de referência (Analytica-EBC) para a indústria cervejeira.

Cada análise de diacetilo na cerveja por cromatografia gasosa demora aproximadamente 115 minutos, muito embora a utilização de um amostrador automático com gestão de temperaturas permita ter uma cadência de cerca de 3 resultados por hora.

2.3.6.3. Adaptação do método voltamétrico em fluxo à determinação em-linha de diacetilo na cerveja

As condições operacionais do equipamento desenvolvido foram optimizadas de forma a permitir a análise de diacetilo na cerveja para uma amplitude de utilização entre os 10ppb e os 800ppb, cobrindo toda a gama concentrações para a qual a determinação de diacetilo é importante do ponto de vista cervejeiro, desde a fermentação até ao produto final. Contudo, a gama de operacionalidade do método pode ser alargada por modificação de alguns parâmetros instrumentais simples, como o tempo de pervaporação, o tempo de adsorção ou mesmo o tamanho da gota de mercúrio, por exemplo.

Para a quantificação do diacetilo na cerveja podem ser utilizados o método das adições de padrão ou o método da curva de calibração. O método das adições de padrão é recomendado para a detecção de baixos níveis de diacetilo e portanto para a determinação de diacetilo em produto final. Como foi verificado anteriormente, a sensibilidade do método voltamétrico em fluxo com pervaporação é diferente na cerveja e na água, pelo que as curvas de calibração simples não são possíveis de se utilizar, sendo necessário utilizar uma curva de calibração em cerveja, como a que se pode observar na figura II-83. Por esta razão a curva de calibração é obtida de uma forma diferente da usual, com a altura de pico a ser calculada por subtracção entre todos os sinais resultantes das sucessivas adições de padrão e o sinal da amostra de cerveja com baixo nível em diacetilo (sempre inferior a 20ppb). Este mesmo tipo de curva de calibração é também utilizado para a determinação de diacetilo na cerveja por GC-DCE, estando portanto comparativamente em iguais circunstâncias.

A determinação do diacetilo pelo método da curva de calibração é mais aconselhável como método de rotina uma vez que os cálculos são mais fáceis, o procedimento do operador é mais simples e se consegue obter pelo menos o dobro da cadência de saída de resultados, podendo abranger uma gama de concentrações superior.

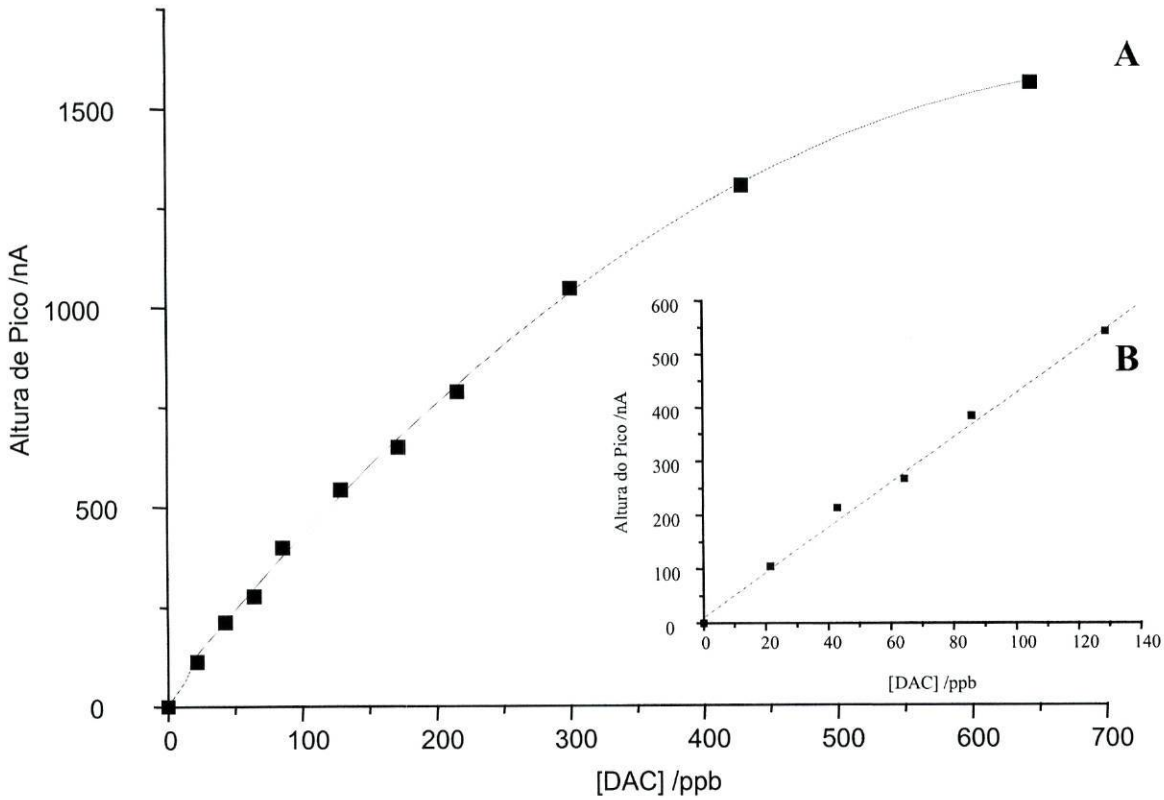


Figura II-83. Curva de calibração de diacetilo na cerveja (A), utilizando o equipamento de determinação em-linha com voltametria em fluxo e separação por pervaporação. Em (B) encontra-se uma ampliação da zona de concentrações até 140ppb, na qual existe uma relação linear.

Na figura II-83A, apresenta-se uma curva de calibração típica que abrange concentrações dos 10 aos 800 ppb, a qual deixa de ser rectilínea a partir dos 150 ppb. Como no final da maturação e na cerveja final os níveis de diacetilo são usualmente inferiores a 150ppb, pode-se utilizar a equação de recta para cálculo de diacetilo nestas fases. Durante a fermentação a concentração de diacetilo atinge valores acima dos 150 ppb. A perda de linearidade deve-se essencialmente a uma saturação do eléctrodo quando se utiliza adsorção, pelo que baixando a sensibilidade do método se pode alargar a zona de linearidade para uma maior gama de concentrações de diacetilo, como se pode observar na figura II-84, para tempos de pervaporação mais baixos.

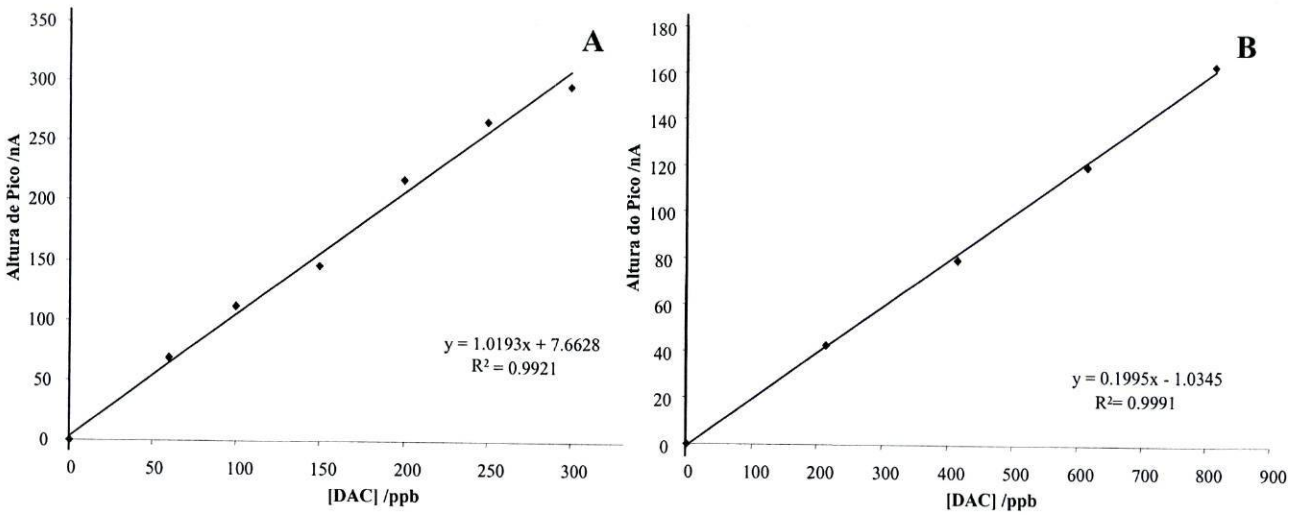


Figura II-84. Curvas de calibração de diacetilo em cerveja utilizando voltametria em fluxo e pervaporação. A – Resposta linear até 300ppb obtida modificando o tempo de pervaporação para 6 minutos. B – Resposta linear até 800 ppb, obtida modificando o tempo de pervaporação para 3 minutos.

Na tabela II-21, são indicadas as características associadas à determinação de diacetilo por cada um dos dois métodos propostos. Verifica-se que o método das adições de padrão apresenta um menor limite de quantificação e um menor erro associado à determinação de baixas concentrações de diacetilo, sendo por isso o método mais adequado para a determinação rigorosa em cervejas com baixos níveis de diacetilo. Por outro lado, apesar dos maiores erros associados à determinação de diacetilo pelo método da curva de calibração, a sua maior simplicidade torna-o recomendável para aplicação pelas cervejeiras no controlo da fermentação e do produto final. Verifica-se que, utilizando as curvas de calibração da figura II-83B, se obtêm erros absolutos inferiores a ±5ppb, numa gama de concentrações entre os 20 e os 140 ppb de diacetilo na cerveja, e portanto de acordo com a especificação exigida nestas concentrações, que está definida como ±5 ppb. Para outras gamas de concentração não existe especificação de erro admissível, não sendo portanto possível verificar a qualidade absoluta do erro encontrado das determinações efectuadas com as restantes curvas de calibração.

Em conclusão, verifica-se que o método optimizado conforme as condições da figura II-81 permite a determinação de diacetilo no final da maturação e na cerveja final, de acordo com as especificações de análise a cumprir. Para concentrações mais elevadas, o erro de determinação torna-se menos relevante por duas razões: primeiro, porque na fermentação a determinação de diacetilo tem apenas um carácter informativo de eventuais anomalias da fermentação observáveis através do perfil de concentração deste

composto ao longo do processo; em segundo, verifica-se que durante a fermentação, e em especial para concentrações elevadas de diacetilo, os factores que mais contribuem para o próprio erro do método são a amostragem na cuba e o manuseamento da amostra (tempo de transporte, condicionamento, preparação e pré-conversão).

Tabela II-21. Características analíticas e estatísticas da determinação em-linha de diacetilo na cerveja por voltametria em fluxo com pervaporação.

Figura	**II-83A**	**II-83B**	**II-84A**	**II-84B**
Fórmula	$Y=17,8+4,27X+2,95x10^{-3}X^2$	$Y=8,05+4,24X$	$Y=4,66+1,02X$	$Y=-1,00+1,99X10^{-1}X$
Coeficiente de Correlação (r)	0,9990	0,9990	0,9961	0,9995
Teste de Linearidade (t)	-	$37,3^{\#}$	$18,1^{\#}$	$56,4^{\#}$
Limite de Detecção	12,3* ppb	6,9 ppb	16,5 ppb	17,7 ppb
Limite de Quantificação	$41,1^{\#}$ ppb	23,1 ppb	54,9 ppb	58,9 ppb
Erro Associado ao Declive	-	$\pm 2,02x10^{-1}$	$\pm 8,19x10^{-2}$	$\pm 8,0x10^{-3}$
Erro associado aos Factores X e X^2	$X = \pm 0,1722$ $X^2 = \pm 2,7x10^{-4}$	-	-	-
Erro da ordenada na origem	±18,2 nA	±14,3 nA	±8,75 nA	±2,35 nA
N	11	6	7	5
Repetibilidade Típica - RSD	<5%	<5%	<6%	< 5%
Nível de Confiança	95%	95%	95%	95%

$^{\#}$ Como $t > t_{tabelado}$, então existe uma correlação significativa de linearidade.
*assumindo que para concentrações de diacetilo inferiores a 140ppb, X^2 tem valor nominal de zero.

2.3.6.4. Determinações de diacetilo livre e de diacetilo total

O método desenvolvido apresenta ainda a possibilidade adicional de determinação do diacetilo livre na cerveja, o que é uma vantagem em relação aos métodos de referência. Na ausência do passo prévio de conversão de α-acetolactato em diacetilo, a cerveja ao passar directamente no módulo pervapora apenas o diacetilo livre, pois o tempo de semi-residência na câmara de doação é extremamente baixo (inferior a 1 minuto), tempo insuficiente para que ocorra pré-conversão durante esta passagem.

Na figura II-85, apresentam-se os voltamogramas obtidos na determinação de diacetilo livre (II-85A) e total (II-85C) numa cerveja em fim de maturação, notando-se, como era esperado, uma clara diferença de sinais, confirmando que a maioria do diacetilo na cerveja se encontra sob a forma de α-acetolactato.

A importância de um correcto procedimento de preparação de amostra na determinação do diacetilo livre pode ser avaliada comparando os voltamogramas das figuras II-85B e II-85A. No ensaio da figura II-85B foi utilizado um incorrecto procedimento de preparação da amostra, uma vez que a cerveja foi colocada à temperatura ambiente durante 4h sem ser filtrada e mais 6h após filtração antes de ser analisada. Este aumento do diacetilo revela que a amostra tem que ser logo filtrada e bem acondicionada e esperar o menor tempo possível antes da determinação; caso contrário pode haver um aumento dos níveis de diacetilo, quer por formação via "*de novo*" pela levedura, quer por conversão de α-acetolactato.

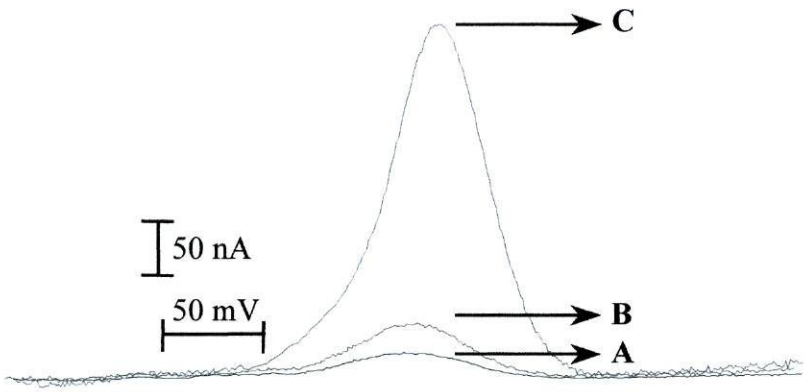


Figura II-85. Voltamogramas de uma cerveja em final de maturação, obtidos com diferentes procedimentos de preparação de amostra. A- diacetilo livre, sem pré-conversão e analise imediata após colheita da amostra; B – diacetilo livre determinado após deficiente tratamento da amostra – deixada 4h sem filtrar mais 6 h à temperatura ambiente antes da análise; C- diacetilo total, com pré-conversão efectuada imediatamente após colheita da amostra.

2.3.6.5. Determinações de diacetilo em diferentes fases do processo produtivo

O protótipo desenvolvido foi aplicado com sucesso à determinação de diacetilo na cerveja em várias fases do processo de produção, nomeadamente na fermentação, maturação e produto final.

A determinação de diacetilo é especialmente importante no final da maturação, pois serve como indicador do fim do processo nas cubas. Na análise de 26 amostras diferentes de cerveja final obtiveram-se valores situados entre os 18 ±4 e os 43 ±4 ppb. Na análise de 47 amostras de diferentes cervejas em maturação obtiveram-se valores entre os 38 ±4 e os 101 ±4 ppb. Finalmente, foram ainda analisadas duas amostras de cerveja em fermentação uma com 183 ±8 ppb e outra com 343 ±15 ppb. Estas determinações foram feitas com base na curva de calibração da figura II-83A no caso de

concentrações superiores a 140 ppb, e na curva de calibração da figura II-83B no caso de concentrações inferiores a este valor. Todas estas determinações foram efectuadas a partir de amostras chegadas ao laboratório para análise de rotina e estão representadas na figura II-86.

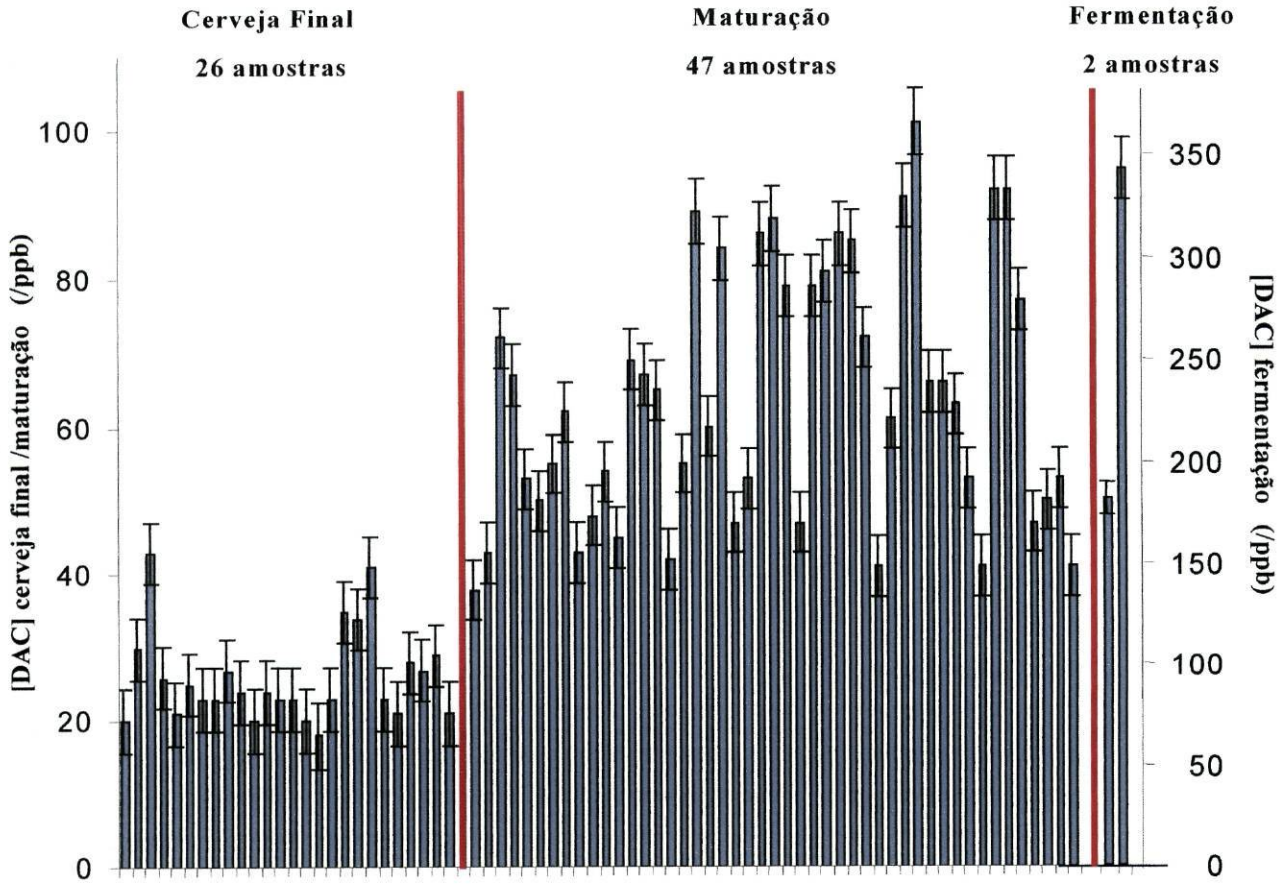


Figura II-86. Valores de diacetilo determinados em amostras provenientes de diferentes fases do processo, e analisadas utilizando o sistema em-linha com as condições optimizadas e 9 minutos de pervaporação.

Na figura II-87, estão representados os valores referentes à determinação de diacetilo utilizando a curva de calibração da figura II-84A, e as mesmas condições analíticas aí descritas. Fez-se a análise de 13 amostras, propositadamente retiradas de cubas em maturação (7 amostras) e fermentação (6 amostras). Na análise de amostras em maturação obtiveram-se valores de diacetilo na cerveja entre 45 ±12 e 164 ±9ppb; na análise de diacetilo na fermentação foram obtidos teores compreendidos entre 192 ±9 e 324 ±15ppb.

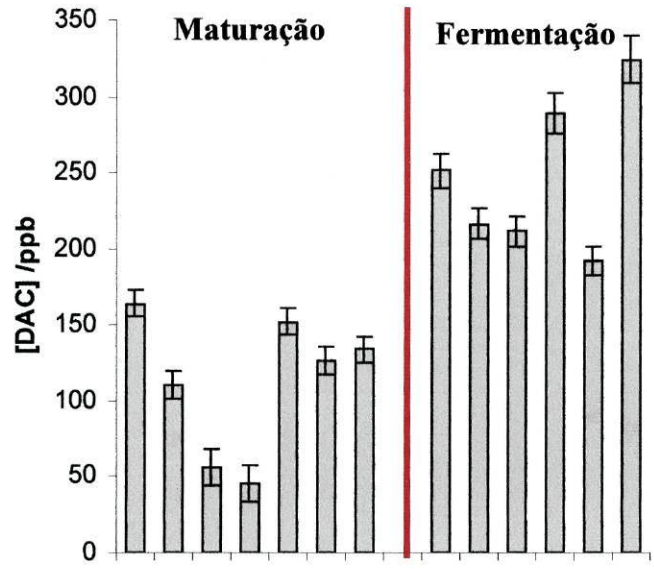


Figura II-87. Determinações de diacetilo em amostras de maturação e fermentação, utilizando o sistema de análise em-linha com 6 minutos de pervaporação.

2.3.6.6. Validação do método voltamétrico em fluxo por comparação com o método de referência por CG-DCE

Os resultados obtidos com o sistema automático em fluxo foram comparados com os obtidos com o método de referência cromatográfico utilizado na indústria cervejeira. Para esta validação do método voltamétrico em-linha foram utilizadas 88 amostras para ambas as análises, representativas de três diferentes fases do processo, nomeadamente na fermentação (8), na maturação (54) e na cerveja final (26). O número de amostras analisadas na fase de maturação é muito maior, na medida em que é nesta fase que é mais importante proceder à determinação do diacetilo.

Nas figuras II-88 e II-89 são apresentados os resultados obtidos pelos dois métodos, verificando-se que existe uma correlação linear entre eles. De notar que na determinação utilizando apenas 6 minutos de pervaporação a falta de sensibilidade do método voltamétrico justifica os desvios negativos observados para concentrações de diacetilo inferiores a 60 ppb (figura II-89).

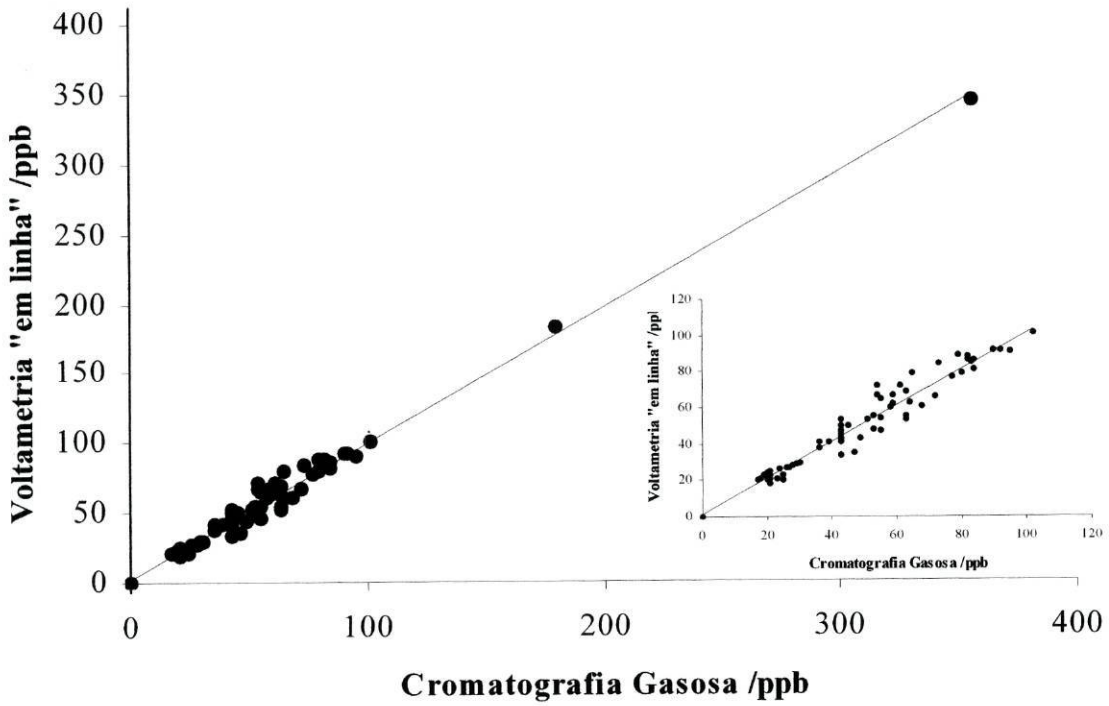


Figura II-88. Regressão linear entre os resultados de diacetilo obtidos pelo método de referência por cromatografia gasosa e o método voltamétrico em-linha desenvolvido, com um tempo de pervaporação de 9 minutos.

A análise dos valores apresentados na tabela II-22 mostra que os resultados obtidos por ambos os métodos não são estatisticamente diferentes, para um grau de confiança de 95%. Pode-se concluir, portanto, que o método voltamétrico em-linha é um método alternativo para análise de diacetilo na cerveja, para uma gama de concentrações entre 20 e 400ppb, o que representa a totalidade das amostras enviadas para análise laboratorial neste período.

Um outro aspecto importante nesta validação do método é a sua exactidão relativamente à indicação do final da maturação/fermentação, aplicação principal da análise do diacetilo ao processo. Os resultados obtidos para o diacetilo no final da maturação confirmam que o método voltamétrico cumpre satisfatoriamente os requisitos necessários de indicação do final da fermentação.

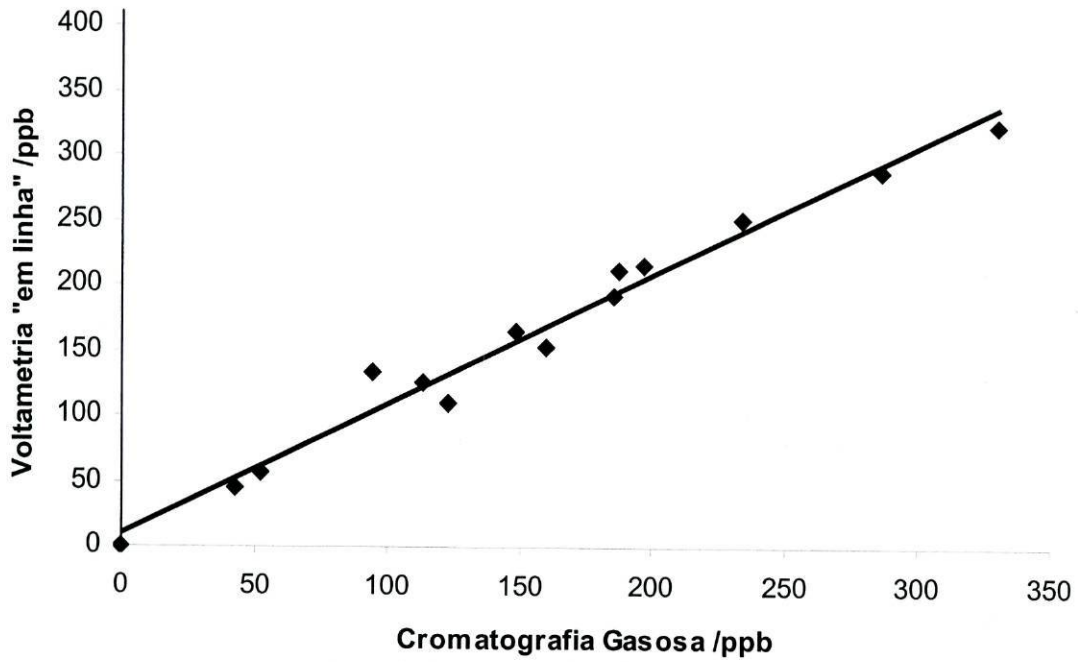


Figura II-89. Regressão linear entre os resultados de diacetilo obtidos pelo método de referência por cromatografia gasosa e o método voltamétrico em-linha desenvolvido, com um tempo de pervaporação de 6 minutos.

Tabela II-22. Características da regressão dos resultados obtidos por voltametria em-linha sobre os resultados obtidos por cromatografia gasosa

Tempo de pervaporação	9 minutos	6 minutos
Fórmula	$V^{*} = 2,5 + 0,97\ CG^{\#}$	$V^{*} = 9,4 + 0,99\ CG^{\#}$
R	0,991	0,989
Erro do declive	0,03	0,10
N	75	13
Nível de Confiança	95%	95%

* V – Resultado de voltametria em-linha em ppb.
# CG – Resultado obtido por cromatografia gasosa em ppb.

2.3.7. Determinação de α-dicetonas em-linha

O sistema para determinação em-linha do diacetilo na cerveja pode com ligeiras alterações ser igualmente utilizado para a determinação de α-dicetonas. Esta possibilidade confere ao equipamento uma capacidade analítica adicional importante, uma vez que a determinação de α-dicetonas também tem aplicação na indústria

cervejeira. Nesta aplicação o módulo de pervaporação é fabricado em aço em vez de "*perspex*". A utilização deste material confere ao sistema características de separação muito distintas das obtidas com o módulo em *"perspex"*, como foi demonstrado anteriormente. Quando se utiliza o módulo de metal, a uma temperatura de 85ºC, há pervaporação simultânea do diacetilo e da 2,3-pentanodiona, o que permite a quantificação das α-dicetonas na cerveja. Esta potencialidade foi testada na cerveja em várias fases de produção na UNICER, tendo sido comparados os resultados obtidos com os do método de referência.

2.3.7.1. Equipamento, condições instrumentais de análise e procedimento

O equipamento utilizado é exactamente igual ao descrito para o diacetilo, variando apenas o material de fabrico do módulo que neste caso é aço inoxidável.

As condições instrumentais de análise e respectivo procedimento de determinação são em tudo similares aos optimizados para a determinação de diacetilo à excepção da temperatura de pervaporação que baixa dos 90ºC para os 85ºC.

2.3.7.2. Método de referência

O método de referência utilizado nos ensaios de comparação com a voltametria em-linha foi a cromatografia gasosa com detector de captura de electrões (CG-DCE). Nesta metodologia a 2,3-pentanodiona e o diacetilo são ambos determinados na mesma corrida, sendo apenas necessário somar os seus valores para obter as α-dicetonas.

2.3.7.3. Características do método de determinação de α-dicetonas em-linha

A determinação de α-dicetonas na cerveja apresenta características similares às descritas para a determinação de diacetilo utilizando o mesmo sistema. Para as condições anteriormente descritas obtém-se uma curva de calibração de dicetonas vicinais que é linear numa gama de concentrações até 150ppb, abrangendo os níveis usualmente encontrados no produto final e na maturação. Esta calibração pode contudo estender-se mais utilizando uma curva de calibração representada por um polinómio de 2º grau. Desta forma é possível recorrer ao método das adições de padrão ou ao método

da curva de calibração. No primeiro caso a sua utilização está limitada a adições na gama de resposta linear. O método da curva de calibração apresenta uma maior facilidade de utilização para análise de rotina, pelo que foi utilizado para análise de α-dicetonas no processo de produção de cerveja. Esta curva é obtida pela adição de dicetonas vicinais na cerveja (assumindo uma massa molar média de 93 $g.mol^{-1}$), recorrendo para o efeito a uma cerveja com baixo teor em α-dicetonas, e efectuando uma correcção do valor da amostra aos valores obtidos com a adição de padrão.

Na figura II-90 está representada uma curva de calibração de α-dicetonas na cerveja, verificando-se que há um comportamento linear até aos 150 ppb (figura II-90B).

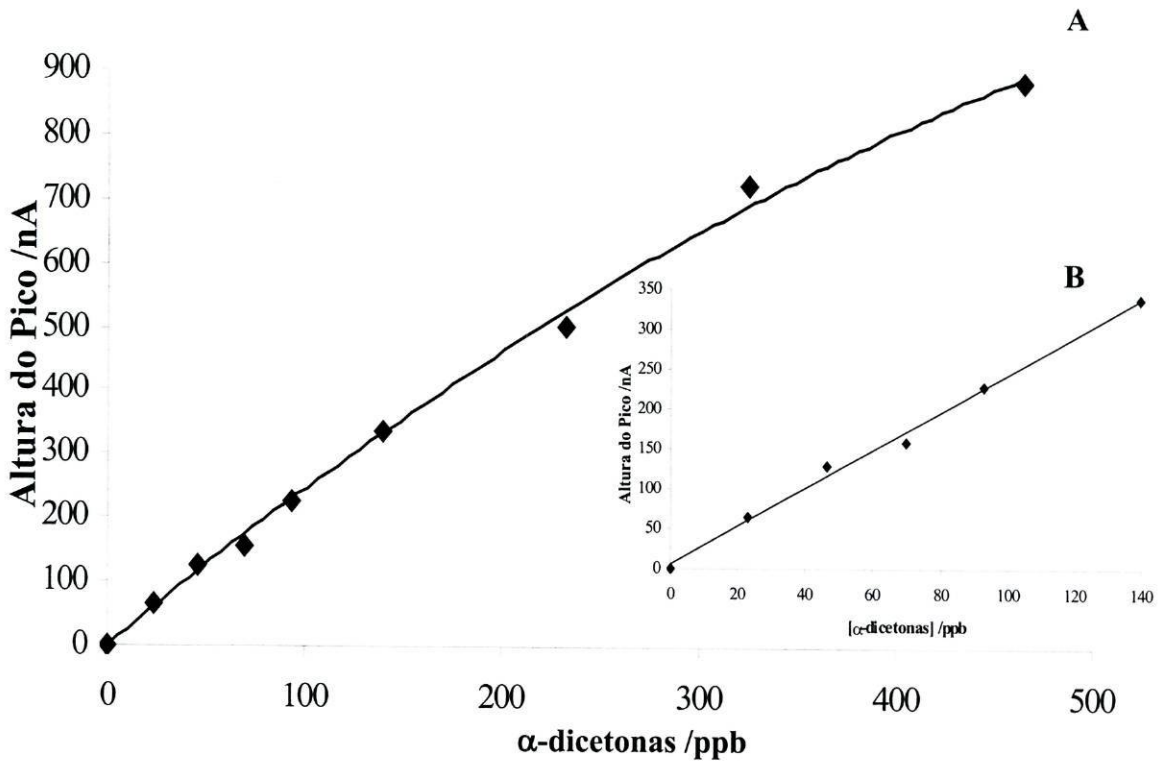


Figura II-90. Curva de calibração de α-dicetonas na cerveja utilizando o equipamento de determinação em-linha com voltametria em fluxo e pervaporação com módulo em aço. (A) Calibração até 500 ppb de α-dicetonas; (B) Calibração até 140 ppb de α-dicetonas.

Na tabela II-23 são indicadas algumas das características associadas à determinação em-linha de α-dicetonas, utilizando cada uma das curvas de calibração apresentadas na figura II-90. O uso da equação de recta apresenta uma menor gama de utilização mas apresenta um menor limite de detecção e de quantificação. Como as concentrações de

α-dicetonas no produto final e maturação se encontram, de uma forma geral, entre os 20ppb e os 300ppb, o método permite a determinação de α-dicetonas nestas fases com um erro inferior a 6ppb. Como durante a fermentação a determinação de α-dicetonas não apresenta o mesmo interesse para a prática cervejeira, não se prolongou a curva de calibração para valores de α-dicetonas mais elevados, muito embora a utilização de diferentes optimizações permita um ajuste da curva de calibração das α-dicetonas similar ao obtido paro o caso do diacetilo como, por exemplo, diminuindo o tempo de pervaporação.

Tabela II-23. Características analíticas e estatísticas da determinação em-linha de α-dicetonas na cerveja por voltametria em fluxo com pervaporação.

Figura	II-90A	II-90B
Fórmula	$Y=-1,1+2,62X-1,51x10^{-3}X^2$	$Y= 5,26 +2,38\ X$
Coeficiente de Correlação (r)	0,9973	0,9974
Limite de Detecção	16,4* ppb	9,7 ppb
Limite de Quantificação	54,6* ppb	32,4 ppb
Erro Associado ao Declive	-	$\pm 1,85x10^{-1}$
Erro associado aos Factores X e X^2	$X = \pm 0,28$ $X^2 = \pm 7,6x10^{-4}$	-
Erro da ordenada na origem	±27,7 nA	±18,5 nA
n	9	6
Repetibilidade Típica - RSD	<5%	<5%
Nível de Confiança	95%	95%

*assumindo que para concentrações de α-dicetonas inferiores a 250ppb, X^2 tem valor nominal de zero.

2.3.7.4. Determinações de α-dicetonas em diferentes fases do processo

Para testar o processo de determinação em-linha de α-dicetonas, foram efectuadas análises de cerveja em diferentes fases de produção. Na figura II-91, são representadas as 54 determinações de α-dicetonas efectuadas em amostras de cerveja em maturação e de cerveja final recorrendo-se à curva de calibração da figura II-90B, e de duas amostras de cerveja em fermentação aplicando a curva de calibração da figura II-90A. Na análise de 15 amostras diferentes de cerveja final obtiveram-se valores situados entre os 23 ±5 e os 84 ±5 ppb. Na análise de 37 amostras diferentes de cerveja em maturação

obtiveram-se valores entre os 74 ±5 e os 231 ±5 ppb. Finalmente foram ainda analisadas duas amostras de cerveja em fermentação uma com 326 ±5 ppb e outra com 660 ±9 ppb. Estas determinações correspondem às diferentes amostras recebidas no laboratório do centro de produção de Leça do Balio para análise de rotina, evidenciando-se pelo número de análises efectuadas a importância que esta determinação tem nas fases de produto final e maturação, ao contrário do menor interesse na fase de fermentação, com apenas duas amostras

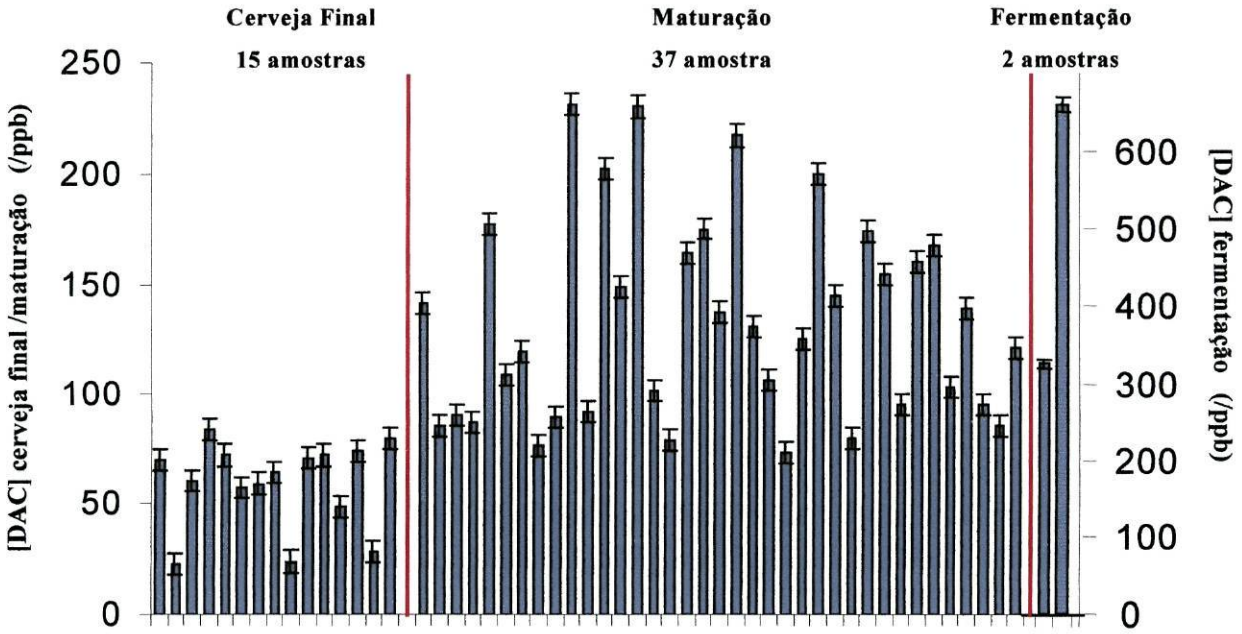


Figura II-91. Determinação de α-dicetonas por voltametria em-linha em amostras enviadas para a análise de rotina, englobando as fases de produto final, maturação e fermentação.

2.3.7.5. Validação do método por comparação com o método de referência

Para validar os resultados obtidos com esta adaptação da determinação de diacetilo em-linha para a determinação de α-dicetonas, procedeu-se à análise das mesmas amostras utilizando o método de referência por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões.

A comparação dos dois métodos está representada na figura II-92, sendo claramente visível a correlação entre os resultados. Na tabela II-24 é feita a comparação dos

métodos, podendo-se concluir que os resultados obtidos pelo método cromatográfico e pelo método voltamétrico não são estatisticamente diferentes, para um grau de confiança de 95%.

Tabela II-24. Características da regressão dos resultados obtidos para a determinação de α-dicetonas por voltametria em-linha sobre os resultados obtidos por cromatografia gasosa

Fórmula	$V^{*} = 10,5 + 1,02\ CG^{\#}$
r	0,9897
Erro do declive	± 0,04
Erro da ordenada na origem	± 6,0
n	54
Nível de Confiança	95%

* V – Resultado obtido por voltametria em-linha, em ppb.
\# CG – Resultado obtido por cromatografia gasosa, em ppb.

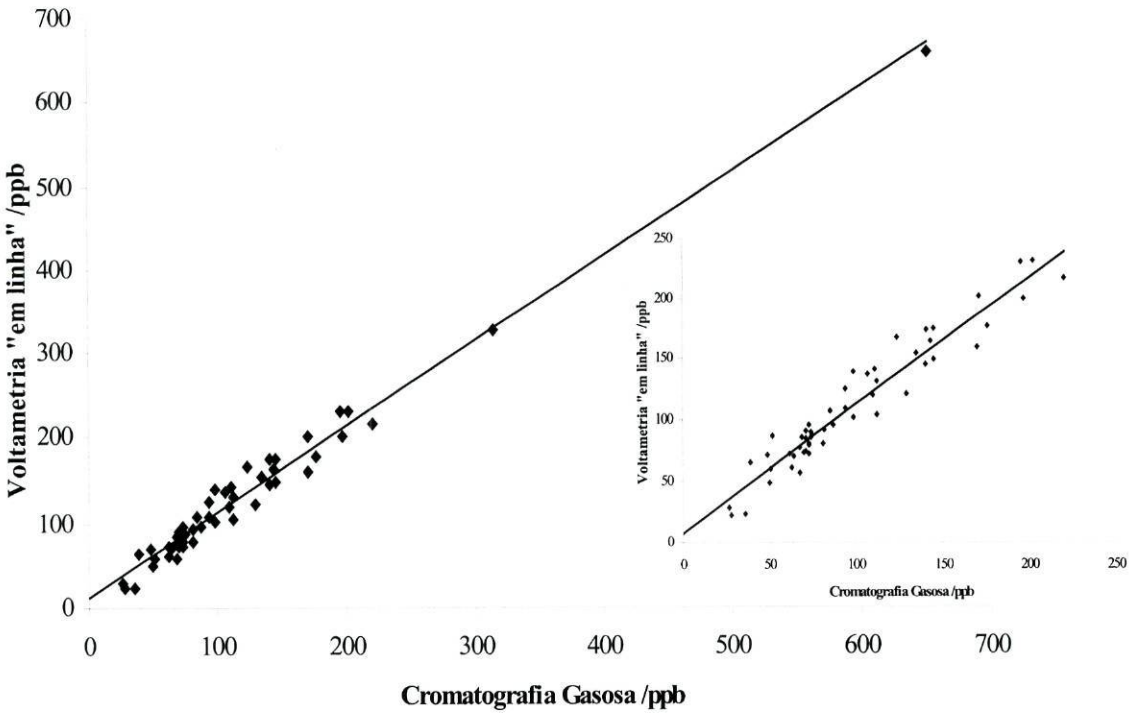


Figura II-92. Regressão linear entre os resultados de α-dicetonas obtidos pelo método de referência por cromatografia gasosa e o método voltamétrico em-linha desenvolvido, utilizando um módulo de pervaporação em aço.

2.4. Desenvolvimento de um reactor de pré-conversão em-linha

A determinação de diacetilo nas cubas de fermentação é o objectivo último pretendido pelos cervejeiros. Contudo tal só é possível se houver uma interface que permita uma conversão rápida em linha do α-acetolactato em diacetilo.

De facto, uma vez que durante a fermentação e maturação a maior parte do diacetilo total está sob a forma de α-acetolactato, a pré-conversão deste para a análise de cerveja é essencial. Tradicionalmente, as amostras são recolhidas e sofrem essa conversão em *"batch"* utilizando um dos processos já anteriormente referidos, não existindo, até à data, nenhum equipamento que efectue essa pré-conversão em linha [9, 10, 11, 12].

Mais do que apenas constituir uma interface que permita a análise de diacetilo na cerveja directamente na linha de produção, este reactor permitiria também a uniformização dos procedimentos de pré-conversão, o que lhe daria a possibilidade de aplicação como processo de tratamento de amostra para os equipamentos tradicionais de análise de diacetilo em laboratório.

A único sistema encontrado que descreve um processo de análise directa de cerveja em fermentação é o publicado em 1993 por Mathis et al. Nesse trabalho é utilizado um reactor de pré-conversão semi-contínuo, em que a conversão é feita num vaso aquecido em *"batch"*; após o usual período de pré-conversão, o conteúdo do reactor é injectado num sistema de análise cromatográfico, constituindo portanto apenas uma automatização do tratamento manual e não um verdadeiro reactor em linha [140].

2.4.1. Objectivos

O objectivo do desenvolvimento de um reactor de pré-conversão em linha seria a adaptação do método voltamétrico em fluxo desenvolvido para a análise directa de amostras de fermentação/maturação, abrindo assim a possibilidade de utilização deste equipamento na análise de diacetilo na cerveja directamente nos tanques de fermentação através de uma saída. A pré-conversão no reactor tem que ser rápida e eficiente, de modo a permitir um caudal de admissão de cerveja pré-convertida suficiente para a separação no módulo de pervaporação. Este equipamento poderá ainda permitir a

obtenção de amostras pré-convertidas para análise de diacetilo recorrendo a outros equipamentos de detecção.

2.4.2. Concepção do reactor

A concepção e o desenvolvimento deste reactor foram feitos de forma a tentar aproveitar processos conhecidos de catalisação da reacção de descarboxilação oxidativa, como sejam o aumento de temperatura e a presença de catiões metálicos.

Relativamente à estrutura do reactor, optou-se pela construção de um reactor de pré-conversão em linha com funcionamento em contínuo, sem qualquer interrupção do fluxo, o que permite uma simplificação do automatismo de controlo.

O reactor é constituído por um tubo enrolado em espiral à volta de uma estrutura cilíndrica, que pode ser convenientemente encaixada num bloco de aquecimento, como se observa na figura II-93.

A saída do reactor de pré-conversão é ligada ao módulo de pervaporação, podendo o maior ou menor comprimento dessa ligação permitir que a cerveja tenha um maior ou menor arrefecimento antes de ser pervaporada.

Material

- Bloco de aquecimento da marca Falc® modelo Falc-Termoblock TD 50 P3, (Falc instruments S.r.l., Lurano, Itália), com bloco de cobre torneado e fresado à medida.
- Tubo de cobre puro, com diâmetro interno de 1,5mm e diâmetro externo de 3,0mm, marca Uchoa-Erloss®.
- Tubo de teflon (PTFE), com diâmetro interno de 0,8mm e diâmetro externo de 1,6mm, da marca Omnifit®.

Ligadores de tubos diversos, marca Omnifit®.

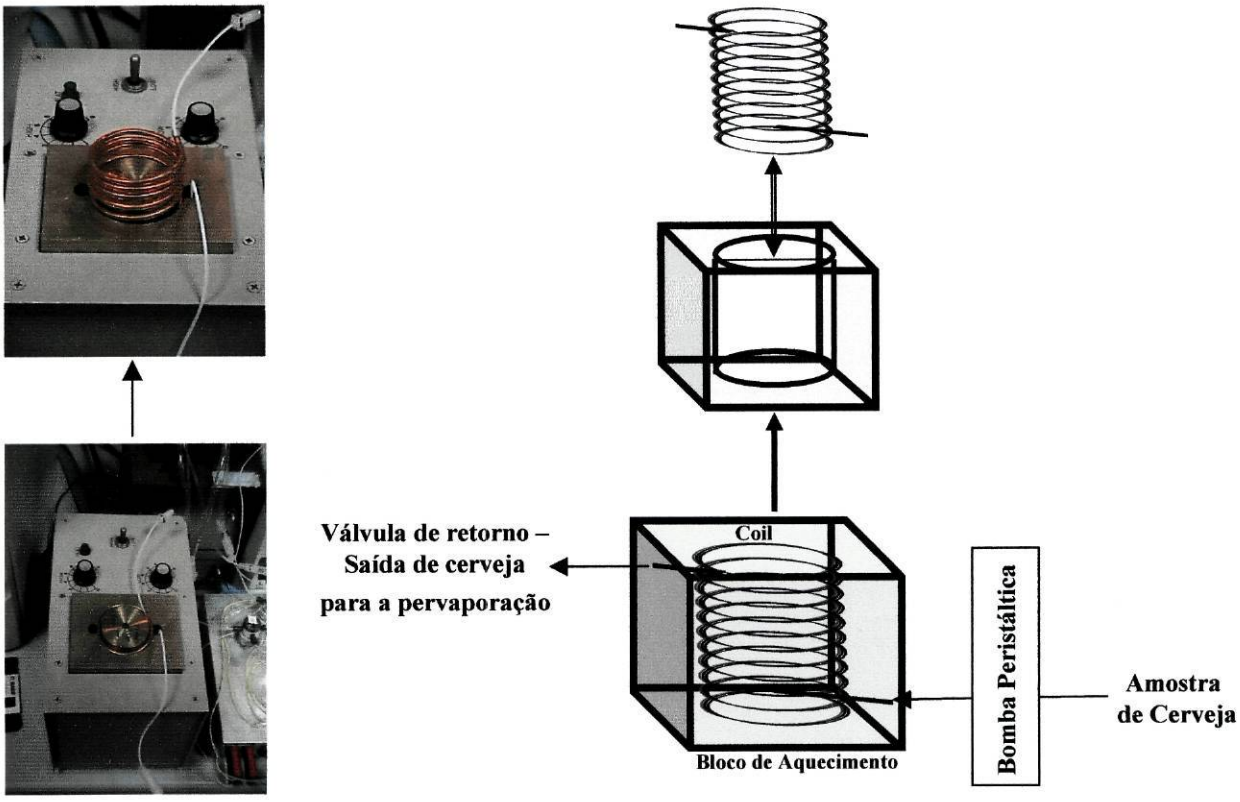


Figura II-93. Esquema e fotos do reactor contínuo de pré-conversão em linha.

2.4.3. Desenvolvimento do reactor de pré-conversão

Nos ensaios efectuados para o desenvolvimento do reactor de pré-conversão não foi possível utilizar soluções padrão de α-acetolactato, uma vez que este composto é muito instável. Em vez disso, foram utilizadas cervejas em fermentação/maturação, nas quais quase todo o diacetilo está sob a forma daquele seu precursor. Decidiu-se utilizar o valor de diacetilo obtido recorrendo à pré-conversão em *"batch"* tradicional, 90 min. a 60ºC, como valor de referência para o valor total de α-acetolactato. Assim, considera-se que o rendimento de um processo de pré-conversão é de 100% se o valor de diacetilo determinado por esse processo for igual ao obtido recorrendo ao processo tradicional de 90min. a 60ºC.

Nestes ensaios, a determinação do diacetilo livre foi feita utilizando o sistema voltamétrico de determinação de diacetilo na cerveja em linha, na ausência do reactor de

pré-conversão em fluxo. Este valor de referência de diacetilo determinado por voltametria foi também confirmado por CG-ECD.

Nestes estudos manteve-se constante o caudal de bombagem da cerveja bem como a temperatura do módulo de pervaporação, não sendo alterado portanto qualquer parâmetro já optimizado do sistema voltamétrico de determinação de diacetilo em linha.

Na figura II-94, apresenta-se um esquema dos ensaios utilizados no desenvolvimento do reactor contínuo de pré-conversão em linha.

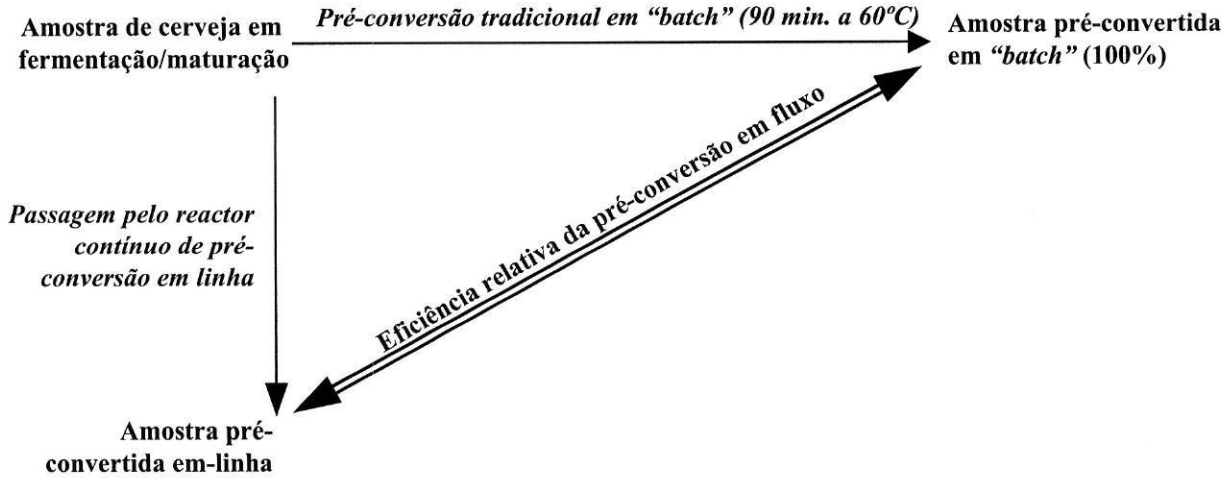


Figura II-94. Esquema utilizado nos ensaios de avaliação do rendimento da pré-conversão.

Na figura II-95 está esquematizado o procedimento utilizado para o cálculo do efeito da pré-conversão em fluxo na formação de diacetilo por vias que não a descarboxilação oxidativa do α-acetolactato.

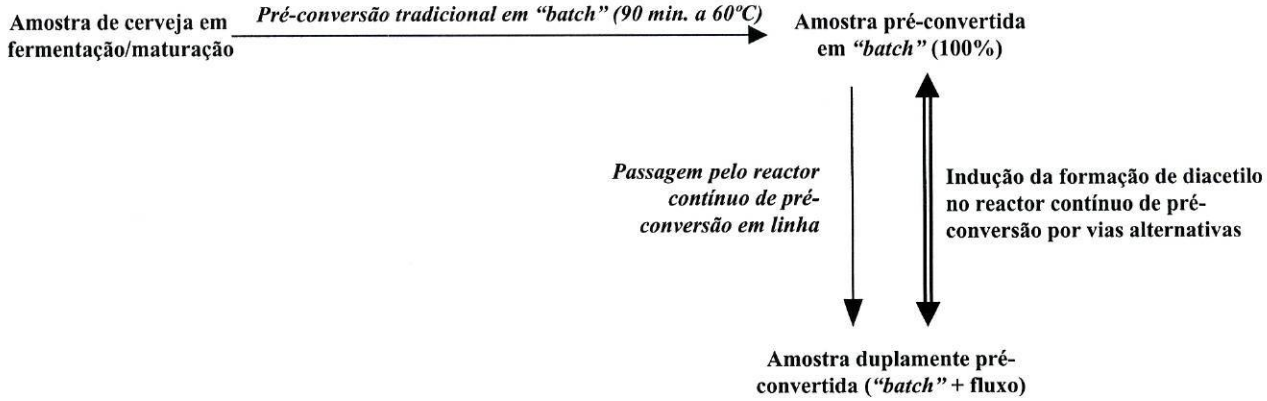


Figura II-95. Esquema utilizado para determinar o diacetilo formado por vias alternativas, que não derivado do α-acetolactato.

2.4.4. Optimização do sistema

Os principais parâmetros estudados no desenvolvimento do sistema foram o tempo de residência e a temperatura de reacção bem como o material do reactor. A variação de outros parâmetros que poderiam afectar a velocidade de reacção, como por exemplo o pH, não foi considerada, pois implicaria sempre uma maior complexidade do sistema.

Relativamente ao material foram escolhidos um polímero inerte, o teflon (PTFE), e ainda um metal, o cobre. Em ambos os casos, foram estudados o efeito da temperatura do banho de aquecimento bem como o efeito do comprimento do tubo do reactor, que evidentemente condiciona o tempo de residência da amostra dentro deste.

2.4.4.1. Reactor de pré-conversão em teflon (PTFE)

A utilização de um material inerte, que não esteja envolvido directamente na reacção, foi a primeira abordagem quanto ao material de construção do reactor. O material escolhido foi o PTFE, por ser um material extremamente inerte e não poroso ao diacetilo, como já tinha sido verificado em estudos realizados no âmbito deste trabalho.

Foram feitos vários reactores utilizando o habitual tubo com 0,8mm de diâmetro interno e 1,6mm de diâmetro externo, com comprimentos de 120 cm, 620 cm e 740cm, a que correspondiam respectivamente tempos de residência da amostra dentro do reactor de 1:30min., 8:00min. e 9:30min..

Utilizando o esquema de ensaios apresentado na figura II-94, foi estudada a percentagem de conversão para estes reactores a diferentes temperaturas, apresentada na figura II-96. Verifica-se que o uso de um reactor de teflon não permite a conversão completa do α-acetolactato em diacetilo, mesmo para temperaturas e comprimentos do reactor elevados.

De notar que a utilização de temperaturas superiores a 100ºC é bastante problemática, uma vez que começam a surgir bolhas gasosas que originam irregularidade nos caudais.

Conclui-se, portanto, que com um reactor em teflon a conversão do α-acetolactato em diacetilo está longe de ser completa, sobretudo se forem usadas temperaturas mais moderadas. Para temperaturas mais elevadas o grau de conversão aumenta (sem atingir os 100%), mas o aparecimento de bolhas gasosas não permite a obtenção de ensaios reprodutíveis.

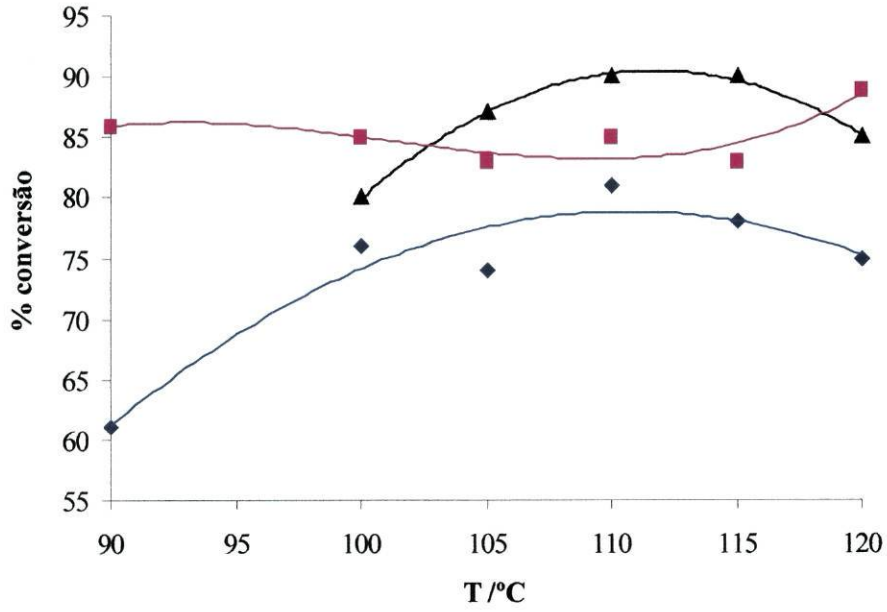


Figura II-96. Efeito da temperatura e comprimento do reactor na conversão de α-acetolactato em diacetilo utilizando reactores de fluxo em teflon (PTFE) e determinação do diacetilo formado pelo método voltamétrico em linha. Comprimentos do reactor: ◆- 120cm, ■ - 620cm, ▲ - 740 cm.

2.4.4.2. Reactor de pré-conversão em cobre

Dadas as dificuldades encontradas com o teflon resolveu-se testar o cobre como material do reactor. A escolha deste metal deveu-se essencialmente ao conhecimento que se tinha sobre o efeito catalisador do Cu^{2+} na reacção de conversão do α-acetolactato em diacetilo. Este material possui ainda outras vantagens associadas: tem uma boa maleabilidade e, sendo um metal relativamente nobre, não sofre excessiva corrosão, podendo-se manter o mesmo reactor em funcionamento durante bastante tempo. O cobre possui, ainda, uma boa condutividade térmica, o que permite uma homogeneização da temperatura mais rápida e uniforme do que no caso do reactor de teflon.

A escolha do cobre em vez do ferro (aço inox) ou do alumínio ficou a dever-se especialmente a razões de estabilidade do material. O alumínio é muito susceptível à corrosão pela cerveja pelo que a sua utilização foi *à priori* eliminada. O uso de ferro, sob a forma de aço inoxidável, foi equacionado apenas como alternativa, na medida em que tem sido o cobre o material geralmente escolhido pelos fabricantes de reactores de equipamento analítico que envolve contacto com cerveja, como disso é exemplo o caso

dos reactores onde ocorre reacção a quente entre a ninidrina e os amino-ácidos, na preparação de amostras para injecção em HPLC-UV.

Por outro lado, embora o cobre seja um material relativamente resistente à corrosão, sabe-se que mesmo assim sofre corrosão quando em contacto com a cerveja, como se veio a observar pela corrosão dos próprios reactores aqui descritos; aliás, isto veio a tornar-se uma vantagem, como se verá, uma vez que a libertação de cobre ajuda a catalisar a reacção de pré-conversão, num efeito similar ao já descrito com a adição de $CuSO_4$ [140].

Decidiu-se utilizar um tubo de cobre com um diâmetro interno superior ao do tubo de teflon anteriormente utilizado. Pretendeu-se com isto evitar os problemas de falta de regularidade do fluxo de cerveja, uma vez que aumentando o diâmetro interno quase para o dobro, 0,8mm no tubo de teflon para 1,5mm para o tubo de cobre, foi possível reduzir a resistência do reactor à passagem da cerveja, verificando-se uma maior estabilidade do caudal à saída do reactor.

Foram construídos dois reactores em tubo de cobre puro, enrolados em espiral, com o comprimento de 90cm e 180cm, a que correspondem respectivamente tempos de residência de amostra no reactor de 4:07min. e 8:15min..

Efeito da temperatura

Para o estudo do efeito da temperatura foi utilizado o reactor de cobre com 90cm, tendo sido efectuados os ensaios de acordo com o esquema da figura II-94. Os resultados médios obtidos são apresentados na figura II-97, verificando-se um aumento progressivo e contínuo da formação de diacetilo, que para valores acima de 60ºC ultrapassa os 100% da conversão relativos à pré-conversão em *"batch"*. Conclui-se que a temperatura óptima de conversão para este reactor é de 58ºC, que curiosamente se aproxima da temperatura aconselhada pelo método tradicional em *"batch"*.

Relativamente à gama de temperaturas acima dos 60ºC, verifica-se a formação de mais diacetilo do que o obtido no procedimento em "batch" tradicional, 90min. 60ºC, o que pode ser explicado devido às condições extremas utilizadas. De facto é conhecido que o diacetilo é um produto das reacções de Maillard, pelo que condições que favoreçam essas reacções poderão favorecer a sua formação. Desta forma, um aumento da temperatura do reactor poderá conduzir à formação de diacetilo por esta via alternativa, que não a partir do α-acetolactato. O uso de temperaturas inferiores a 65ºC é desde logo aconselhado pois é não só a temperatura de pasteurização a que são sujeitas as cervejas

no processo como é a temperatura aconselhada pelo procedimento tradicional de pré-conversão. A corroborar esta tese, foram feitos ensaios como os descritos na figura II-95, de dupla pré-conversão, tendo-se verificado um aumento da quantidade de diacetilo obtido quando se faz passar pelo reactor de fluxo amostras já pré-convertidas em *"batch"*, o que traduz precisamente esta formação *"de novo"* por vias que não a partir do α-acetolactato. Por esta razão é necessário evitar tanto quanto possível temperaturas demasiado elevadas mesmo que possam conduzir a um aumento da velocidade de reacção.

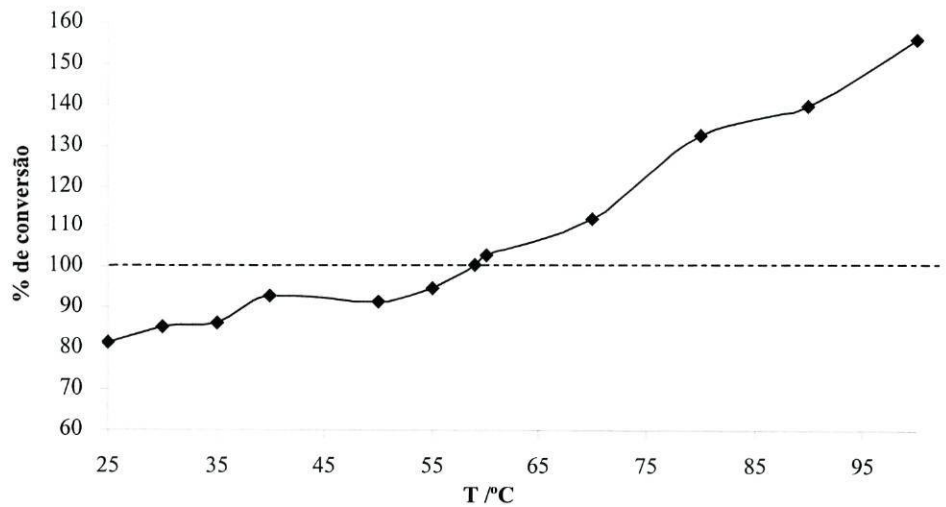


Figura II-97. Efeito da temperatura na formação de diacetilo utilizando o reactor de fluxo contínuo em cobre com 90cm de comprimento.

Efeito do comprimento do reactor

Como se verificou que a elevadas temperaturas ocorre a formação de diacetilo não derivado do α-acetolactato, foi estudado o efeito do aumento do tamanho do tubo de forma a verificar se com o aumento do tempo de permanência da amostra se poderia reduzir a temperatura.

Nesse sentido, fizeram-se novos ensaios comparando o reactor de 90cm usado anteriormente, com um novo reactor, de 180cm, a que correspondem tempos de residência da amostra no reactor de, respectivamente 4:07min. e 8:15min. Os resultados obtidos apresentam-se na figura II-98. Como se pode observar, com o aumento do comprimento do reactor os 100% da reacção são obtidos a uma temperatura inferior, que para o reactor de 180cm é de cerca de 52ºC. Numa análise mais pormenorizada do gráfico verifica-se que a diferença de conversão entre os reactores aumenta com o

aumento da temperatura, o que confirma que a temperaturas elevadas aumenta a formação de diacetilo por vias alternativas.

Como um aumento para o dobro do tempo de passagem da cerveja não acarreta uma redução dramática da temperatura necessária para a pré-conversão em fluxo, optou-se por utilizar o reactor de 90cm, que funciona a uma temperatura idêntica à do método de pré-conversão tradicional bem como da própria pasteurização e com isso reduz-se o tempo deste passo de preparação da amostra para cerca de 4 minutos.

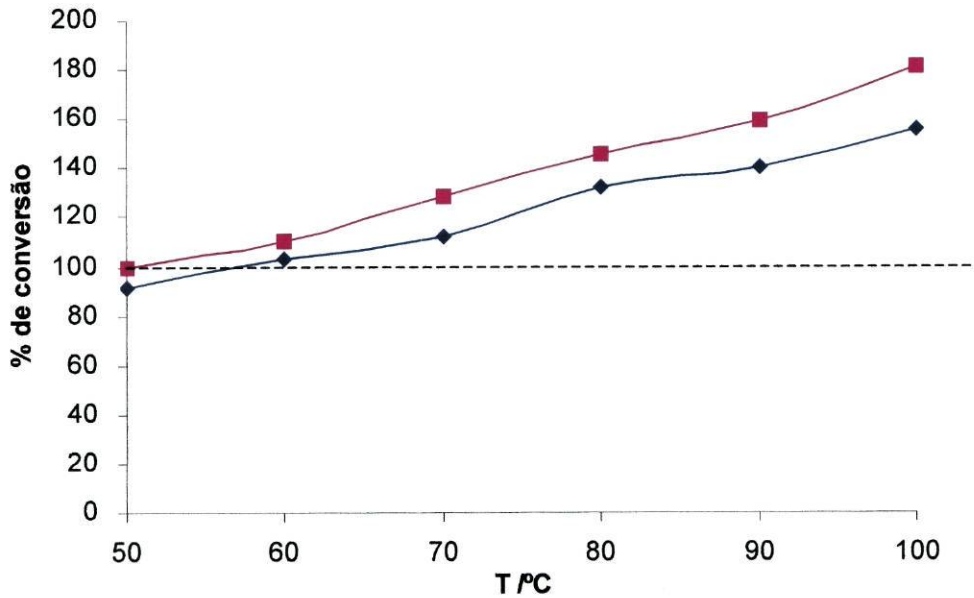


Figura II-98. Efeito do temperatura na percentagem de conversão de α-acetolactato em diacetilo utilizando reactores de pré-conversão em linha com diferentes comprimentos e portanto diferentes tempos residência de amostra: ◆- 90cm (4:07min. de tempo de residência) e ■ - 180 cm (8:15min. de tempo de residência).

Eficiência do reactor na pré-conversão de diferentes amostras

Para testar a eficiência do reactor efectuaram-se ensaios com cervejas provenientes de diferentes fases do processo de fermentação, e que possuíam diferentes níveis de diacetilo total e portanto diferentes níveis de α-acetolactato. Com estes ensaios pretendeu-se avaliar a eficiência do reactor para converter diferentes concentrações de α-acetolactato utilizando diferentes tempos de passagem e temperaturas. Na tabela II-25, apresenta-se os valores médios de conversão obtidos para cervejas em diferentes fases.

É importante notar que para temperaturas até 60ºC não ocorre diferença significativa nem variabilidade entre amostras distintas quando se utiliza o reactor de 90cm

(4:07min. de pré-conversão), sucedendo o mesmo para uma temperatura de 50ºC no reactor de 180cm (8:15min. de pré-conversão). Contudo, para temperaturas superiores de pré-conversão verifica-se uma maior variabilidade dos níveis de diacetilo convertido, o que poderá indicar que vias alternativas de formação desta α-dicetona poderão estar mais ou menos activas consoante a composição da cerveja, o que vem reforçar a conclusão de que deve ser evitado o uso de temperaturas elevadas. Este resultado vem ainda confirmar que o uso de um tubo de cobre com comprimento de 90cm e uma temperatura de 58ºC são suficientes para pré-converter qualquer amostra de cerveja de processo com níveis diacetilo total até 240 ppb.

Tabela II-25. Valores médios de percentagem de conversão de α-acetolactato em diacetilo obtidos para cervejas em diferentes fases do processo, utilizando diferentes tempos de passagem e temperaturas de pré-conversão.

		% Conversão	
Tempo de pré-conversão /min.	T /ºC	Cerveja Maturação (até 120 ppb)	Cerveja em Fermentação (de 120 até 240ppb)
4:07	50	96	79
	60	101	101
	70	123	132
	80	127	138
	90	129	151
	100	157	155
8:15	50	102	97
	60	106	115
	70	136	121
	80	138	154
	90	154	164
	100	177	185

Estabilidade do diacetilo no interior do reactor

A estabilidade de soluções de diacetilo durante a passagem no interior do reactor foi igualmente estudada. Para isso, adicionaram-se 860 ppb de diacetilo à cerveja antes de passar no reactor, tendo-se verificado que não ocorria qualquer degradação deste composto durante a pré-conversão utilizando-se uma temperatura de 60ºC.

2.4.5. Conclusão

Como conclusão pode-se afirmar que é possível a pré-conversão em linha de diacetilo recorrendo a um reactor contínuo. Usando um tubo em cobre com o comprimento de

90cm (4:07 min. de tempo de residência) a conversão de 100% é obtida a uma temperatura inferior a 60°C. Este facto é importante, pois esta é a temperatura de referência quer da pasteurização quer no mais utilizado dos processos de pré-conversão em *"batch"*; além disso, verifica-se que o uso de temperaturas superiores poderá originar a formação de diacetilo por outras vias, como, por exemplo, as reacções de Maillard.

Em síntese, as características do reactor de fluxo contínuo desenvolvido para pré-conversão em linha são as seguintes:

- Tubo cilíndrico de cobre puro com 1,5mm de diâmetro interno por 3,0mm de diâmetro externo, enrolado em espiral com 90 cm de comprimento.
- Temperatura de pré-conversão de 58°C.
- Caudal de cerveja de 0,39 $mL.min.^{-1}$.

Como se pode ver na figura II-99, com este equipamento de pré-conversão em linha é possível fazer uma dramática redução do tempo da pré-conversão, o que pode permitir a sua utilização no futuro como interface entre a linha de produção de cerveja e o sistema de voltametria em fluxo para determinação do diacetilo em linha.

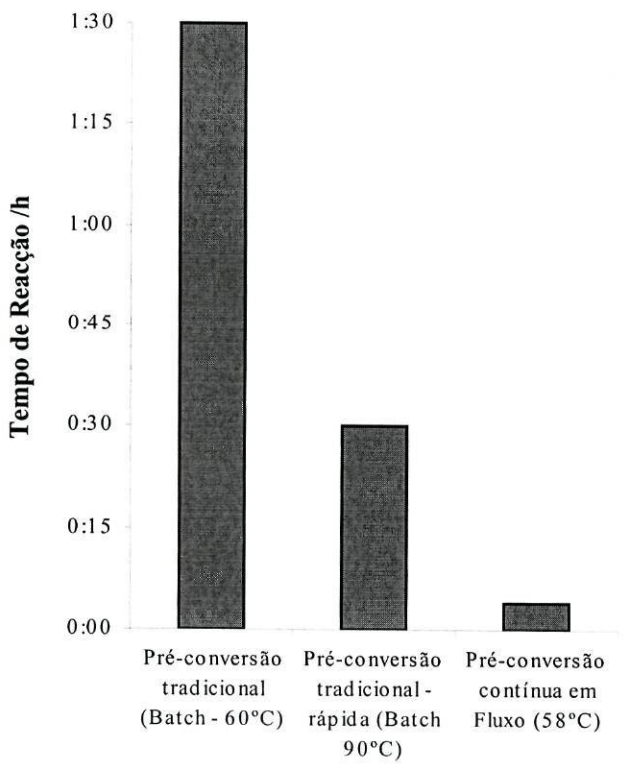


Figura II-99. Tempos de reacção dos mais importantes procedimentos de pré-conversão em "batch" e do reactor de fluxo contínuo de pré-conversão em linha

Referências Bibliográficas:

1 Abate, G, Lichtig, J, Masini, JC, (2002). Construction and evaluation of a flow-through cell adapted to a commercial static mercury drop electrode (SMDE) to study the adsorption of Cd(II) and Pb(II) on vermiculite, Talanta, 58 (3): 433-443.

2 Alexander, PW, Marpaung, H, (1982). Rapid-flow analysis using differential pulse polarography with automatic sampling, Talanta, 29 (3): 213-217.

3 Alexander, PW, Shah, MH, (1979). Automated continuous-flow determinations of serum-proteins by pulse polarography, Talanta, 26 (2): 97-102.

4 Alexander, PW, Shah, MH, (1980). Automated continuous-flow determination of serum-albumin by differential pulse polarography, Anal. Chem., 52 (12): 1896-1900.

5 Almeida, P. J., Rodrigues, J. A., Barros, A. A., Fogg, A. G., (1999). Voltammetric studies of antraquinone dyes adsorbed at a hanging mercury drop electrode using fast pulse techniques, Anal. Chim. Acta, 385: 287-293.

6 Alpizar, J, Cladera, A, Cerda, V, Lastres, E, Garcia, L, Catasus, M, (1997). Simultaneous flow injection analysis of cadmium and lead with differential pulse voltammetric detection, Anal. Chim. Acta, 340 (1-3): 149-158.

7 Alvarez, R, Haya, EF, Delgado, MA, Ferrete, FJ, (1989). Vicinal diketones in beer .1. A modified EBC method for the determination of diacetyl and other vicinal diketones in beer, J. Inst. Of Brew., 95 (1): 21-23.

8 American Soc. Brew. Chem., (1991). Revised methods of diacetyl analysis, J. Am. Soc. Brew. Chem., 49: 172-173.

9 American Soc. Brew. Chem., (1999). Selective measurement of acetohydroxy acid precursors of vicinal diketones, J. Am. Soc. Brew. Chem., 57: 159-161.

10 American Soc. Brew. Chem., (2000). Selective measurement of acetohydroxy acid precursors of vicinal diketones, J. Am. Soc. Brew. Chem., 58: 190-193.

11 American Soc. Brew. Chem., (2001). Selective measurement of acetohydroxy acid precursors of vicinal diketones, J. Am. Soc. Brew. Chem., 59: 226-228.

12 American Soc. Brew. Chem., (2002). Selective measurement of acetohydroxy acid precursors of vicinal diketones, J. Am. Soc. Brew. Chem., 60: 211-212.

13 American. Soc. Brew. Chem., Inc. (USA), (1992). Revised Methods of diacetyl analysis, J. Am. Soc. Brew. Chem., 50 (4): 151-152.

14 Analytica -Ebc, Section 9, Beer, Method 9.24.1, Vicinal Diketones In Beer: Spectrofotometric Method, European Brewing Convention, "Analytica-EBC", 4th ed., Brauerei und Getranke-Rundschau, Zurich, 1987.

15 Analytica -EBC, Section 9, Beer, method 9.24.2. - Vicinal Diketones in Beer: Gas Chromatographic method, European Brewing Convention, "Analytica-EBC", 5th ed., Brauerei und Getranke-Rundschau, Zurich, 1998.

16 Awford, BB, (1977). Tech. Quaterly - Master Brew. Ass. of the Americas, 14: 129.

17 Baker, DA, Kirsop, BH, (1973). J. Inst. of Brewing, 79: 43.

18 Barceló, C, Gassiot, M, Ferrer, M, (1978). Determination of diacetyl in beer by gas-chromatography with flame-ionization detection, J. of Chromatography, 147: 463-469.

19 Barisci, JN, Wallace, GG, (1992). Removal of oxygen in flowing solutions using a photochemical process, Electroanalysis, 4 (3), 323-326.

20 Barros, A, Rodrigues, JA, Almeida, PJ, Oliva-Teles, (1999). Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by HPLC with UV spectrophotometric detection, after derivatization with o-phenylenediamine, J. Of Liquid Chromatography & Related Technologies, 22 (13): 2061-2069.

21 Barros, A., Rodrigues, J., Almeida, P., Guido, L., Rodrigues, P., Santos, J., Machado Cruz, J.M., Ferreira, A.A., (2001). Application of voltammetry in beer analysis, Proc. 28th Eur. Brew. Conv. Cong., Budapest, Fachverlag Hans Carl, Nurnberg, Germany: 773-782.

22 Barros, A.A, Rodrigues, J.A, Almeida, P.J., Rodrigues, P.G., Fogg, A.G., (1999). Voltammetry of Compounds Confined at the HMDE surface, Anal. Chim. Acta, 385: 315-323.

23 Baudot A, Marin M, (1996). Dairy aroma compounds recovery by pervaporation, J. Membrane Sci., 120 (2): 207-220.

24 Baudot A, Souchon I, Marin M, (1999). Total permeate pressure influence on the selectivity of the pervaporation of aroma compounds, J. Membrane Sci., 158 (1-2): 167-185.

25 Bond, AM, (1999). 200 years of practical electroanalytical chemistry: past, present and future directions illustrated by reference to the on-line, on-stream and off-line determination of trace metals in zinc plant electrolyte by voltammetric and potentiometric techniques, Anal. Chim. Acta, 400: 333-379

26 Bond, AM, Hudson, HA, Vandenbosch, PA, (1981). High flow-rate cells for continuous monitoring of low concentrations of electroactive species by polarography and stripping voltammetry at the static mercury drop electrode, Anal. Chim. Acta, 127, 121-133.

27 Boulton, C.A., Box, W.G., Quain D.E., Molzahn, S.W., (2001). Vicinal diketone reduction as measure of yeast vitality, Tech. Quaterly - Masters Brew. Assoc. of the Americas, 38 (2): 89-93.

28 Bravo, A., Scherer, E., Madrid, J., Herrera, J., Virtanen, H., Rangel-Aldao, R., Identification of alpha-dicarbonyl compounds in aged beers: their role in ageing process, Proc. 28th Eur. Brew. Conv. Cong. Budapest, Fachverlag Hans Carl, Nurnberg, Germany, 2001: 602-611.

29 Brenner, MW, (1970). Tech. Quaterly-Master Brew. Ass. of the Americas, 7: 43.

30 Brenner, MW, Blick, S.R., Frenkel, G., Siebenberg, J., (1963). Proc. Eur. Brew. Conv. 9th Brussels: 233.

31 Brenner, MW, Kamimura, M, (1969). Proc. Of the Am. Soc. Brew. Chem.: 153.

32 Buckee, G. K., Mundey, A.P., (1994). Determination of vicinal diketones in beer by gas chromatography (headspace technique) - collaborative trial, J. Inst. of Brewing, 100: 247-253.

33 Burger, M, Gleinister, PR, Becker, K, (1957). Proc. of the Am. Soc. Brew. Chemists: 80

34 Cabane, BC, Ramos-Jeunehomme, C, Lapage, N, Masschelein, CA, (1974). Vicinal diketones - the problem and prospective solution, Proc. Congr. Am. Soc. of Brewing Chem.: 94.

35 Cahan, B, Haynes, R, (1969). Differential and derivative polarography for continuous analysis in a flow system - application to alloy dissolution, j. Electroanal. Chem., 22 (3): 339.

36 Canizares P, de Castro MDL, (1997). Enzymatic interference-free assay for oxalate in urine, Fresen. J. Anal. Chem., 357 (6): 777-781.

37 Casey, GP, Sall, CJ, Maurer, JM, Tutor, GL, Pringle, AT, (1992). Use of an experimental design program to examine the influence of wort amino acids or vicinal diketones in lager fermentations, Techn. Quaterly - Masters Brew. Assoc. of the Americas, 29: 111-116.

38 Cataldi, TRI, Palmisano, F, Zambonin, PG, (1989). Flow-Injection With Anodic Polarographic Detection For The Determination Of Allopurinol In Pharmaceutical Formulations, Analyst, 114 (11): 1449-1452.
39 Cavicchioli, A, Gutz, IGR, (2001). In-line TiO2-assisted photodigestion of organic matter in aqueous solution for voltammetric flow analysis of heavy metals in water samples, Anal. Chim. Acta, 445 (2): 127-138.
40 Chuang, L.F, Collins, EB, (1969). Biosyntesis of diacetyl in bacteria and yeast, Journal of Bacteriology, 95(6): 2083-2089.
41 Chuang, L.F, Collins, EB, (1972). Inhibition of diacetyl synthesis by valine and the roles of alpha-ketoisovaleric acid in the synthesis of diacetyl by Saccharomyces cerevisiae, J. of General Microbiology, 72: 201-210.
42 Colombo, C, van den Berg, CMG, (1998). In-line deoxygenation for flow analysis with voltammetric detection, Anal. Chim. Acta, 377 (2-3): 229-240.
43 Colombo, C, vandenBerg, CMG, Daniel, A, (1997). A flow cell for on-line monitoring of metals in natural waters by voltammetry with a mercury drop electrode, Anal. Chim. Acta, 346 (1): 101-111.
44 Cowland, TW, Maule, DR, (1966). J. Inst. of Brewing , 72: 480.
45 de Carvalho, LM, Schwedt, G, Henze, G, Sander, S, (1999). Redoxspeciation of selenium in water samples by cathodic stripping voltammetry using an automated flow system, Analyst, , 124 (12): 1803-1809.
46 de Castro ML, Papaefstathiou, I, (1998). Analytical pervaporation: a new separation technique, Trac-Trends In Analytical Chemistry, 17 (1): 41-49.
47 de Castro, MDL, Gamiz-Gracia, L, (2000). Analytical pervaporation: An advantageous alternative to headspace and purge-and-trap techniques, Chromatographia, 52 (5-6): 265-272.
48 De Donato, A, Pedrotti, JJ, Gutz, IGR, (1999). A batch injection analysis system for ascorbic acid determination using amperometric detection on a sessile mercury drop electrode, Electroanalysis, 11 (15): 1124-1129.
49 de Man, JC, (1959). The formation of diacetyl and acetoin from a-acetolactic acid, Recueil Trav. Chim., 78: 480-486.
50 de Mattos IL, Zagatto EAG, (1999). Flow systems including pervaporation for spectrophotometric monitoring of ethanol in industrial fermentations, Anal. Sci., 15 (1): 63-66.
51 de Mattos, IL, de Castro, MDL, Valcárcel, M, (1995). Pervaporation - an integrated evaporation gas-diffusion approach to analytical continuous separation techniques, Talanta, 42 (5): 755-763.
52 de Robichon-Szulmajster, H, Magee, PT, (1968). European Journal of Biochemistry, 3: 492.
53 Debowski, J, Duszczyk, K, Kutner, W, Sybilska, D, Kemula, W, (1982). Evaluation of a flow-through polarographic detector for the determination of redox compounds in high-performance liquid-chromatography, Journal Of Chromatography, 241 (1): 141-146.
54 del Campo, G, Lajo, M.C, (1992). Spectrophotometric determination of biacetyl, in destillates of wine by flow injection, Analyst, 117: 1343.
55 Dellweg, H, (1985). Diacetyl and beer maturation, Monatsschrift Fur Brauwissenschaft, 38 (6): 262-266.
56 Determination Of Diacetyl In Beer - Collaborative Studies, (1978). Journal Of The Association Of Official Analytical Chemists, 61 (1): 100-103.
57 Dews, B., Bauarwald, G., Niefind, HJ, (1968), Monatsschrift für Brauerei, 21: 96.

58 do Nascimento, PC, Bohrer, D, de Carvalho, LM, (1998). Cyanide determination in biological fluids using a microdiffusion method with a flow system and polarographic Detection, Analyst, 123 (5): 1151-1154.
59 doNascimento, PC, Bohrer, D, Tramontina, J, (1997). Automated polarographic determination of sulfide as contaminant in parenteral amino acid solutions, Analyst, 122 (8): 835-838.
60 Dupire, S, (1998). Determination of total vicinal diketones in beer by headspace capillary gas chromatography, J. Inst. of Brewing, 104 (2): 67-68.
61 Ernestina Maria Rocha Moreira, determinação da riboflavina por voltametria com adsorção, Dissertação para Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1999.
62 European Brewery Convention: Analysis Committee, (1976). J. Inst. of Brewing, 82: 53.
63 European Patent Application G01N27/48, publicada em 20.11.2002, Bulletin 2002/47.
64 Fernandez-Bobes, C, Fernandez-Abedul, MT, Costa-Garcia, A, (1998). Anodic stripping of heavy metals using a hanging mercury drop electrode in a flow system, Electroanalysis, 10 (10): 701-706.
65 Fernandez-Rivas C, Munoz-Olivas R, Camara C, (2001), Coupling pervaporation to AAS for inorganic and organic mercury determination. A new approach to speciation of Hg in environmental samples, Fresen. J. Anal. Chem., 371 (8): 1124-1129.
66 Fix, GJ, (1993). Diacetyl: formation, reduction and control, Brewing Techniques, July/August.
67 Fogg AG, .Barros, AA, Cabral, JO, (1986). Analyst, 111: 831.
68 Fogg, A. G., Zanoni, M. V. B., (1994). Anal. Proc., 31: 173
69 Fogg, AG, Summan, AM, (1984). Simple wall-jet detector cell holding either a solid electrode or a sessile mercury-drop electrode and an illustration of its use in the oxidative and reductive flow-injection voltammetric determination of food coloring matters, Analyst, 109 (8): 1029-1034.
70 Fornachon, J.C., Lloyd B., (1965). Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine, J. Sci. Food Agric., 16: 710-716.
71 Forsman, U, Karlsson, A, (1982). Polarographic-determination of penicilloic acid in penicillin preparations with a flow-injection system, Anal. Chim. Acta, 139: 133-142.
72 Forster, R. J., (1995). Langmuir, 11: 2247
73 Forster, R. J., (1996). Analyst, 121: 733.
74 Galban J, Sanz-Vicente I, Castillo JR, Luque de Castro, MD, (2001). Integrated analytical pervaporation-gas-phase absorptiometry: theoretical aspects and applications, Anal. Chim. Acta, 434 (1): 81-93.
75 Garcia, AI, Garcia, LA, Diaz, M, (1994). Modeling of diacetyl production during beer fermentation, J. Inst. of Brewing, 100 (3): 179-183.
76 Gilles du Perron de Revel, Le diacetyle, les composes dicarbonyles et leurs produits de réduction dans le vin, Thèse pour le Doctorat de L'Université de Bordeaux II, 1992.
77 Gjertsen, P., Undstrup, S., Trolle, B, (1964). Monatsschrift für Brauerei, 17: 232-234.
78 Gonzalez-Rodriguez J, Perez-Juan P, de Castro MDL, (2002). Sequential spectrophotometric determination of methanol and iron in vinegar by a flow injection-pervaporation method, Anal. Bioanal. Chem., 374 (1): 120-125.

79 Gonzalez-Rodriguez J, Perez-Juan PP, de Castro MDL, (2001). Semiautomatic flow-injection method for determination of volatile acidity in wines, J. AOAC Int, 84 (6): 1846-1850.
80 Gross, NM, Werkmann, CH, (1947). Arch Biochem, 15: 125.
81 Hammond, J.R.M., (1993). The yeasts, vol 5 - Brewer's yeasts, 2nd ed, eds. Rose, A.H. and Harrison, J.S., Academic Press Inc. Ltd, London: 7-67.
82 Hanekamp, HB, Voogt, WH, Bos, P, (1980). Application of pulse techniques in a polarographic flow-through detector with potential-controlled drop synchronization, Anal. Chim. Acta, 118 (1): 73-79.
83 Hanekamp, HB, Voogt, WH, Bos, P, Frei, RW, (1980). An electrochemical scrubber for the elimination of eluent background effects in polarographic flow-through detection, Anal. Chim. Acta, 118 (1): 81-86.
84 Hansen, J, KiellandBrandt, MC, (1996). Modification of biochemical pathways in industrial yeasts, J. of Biotechnology, 49 (1-3): 1-12.
85 Hardwick, BC, (1994). Selective measurement of acetohydroxy acid precursors of vicinal diketones in beer by decarboxylation with aniline hydrochloride, J. Am. Soc. Brew. Chemists, 52 (3): 106-110.
86 Harrisson G.A., Byrne W.J. , Collins E., (1965). The determination of diacetyl and 2,3-pentanodione in the beer headspace by gas chromatography, J. Inst of Brewing, 71: 336-339.
87 Haukeli, A.D., (1978). J. Inst. Of Brewing, 84: 85-89.
88 Haukeli, A.D., and Lie, S., (1971). The influence of 2-acetohidroxi acids on the determination of vicinal diketones in beer and during fermentation, J. Inst. Of Brewing, 77: 538-543.
89 Haukeli, A.D., and Lie, S., (1972). Production of diacetyl, 2-acetolactate and acetoin by yeast during fermentation, J. Inst. Of Brewing, 78: 229-232.
90 Hikima, S, Hasebe, K, Kakizaki, T, (1992). Flow-injection method for the polarographic-determination of l-lactate using an immobilized enzyme reactor, Anal. Sci., 8 (2): 165-168.
91 Inoue T., (1978). Improvements of the micro method for more rapid and precise determination of vicinal diketones in beer, J. Am. Soc. Brew. Chemists, 36: 139-143.
92 Inoue T., Yamamoto, Y., (1970). Diacetyl and beer fermentation, Proc. Congr. Am. Soc. Brew. Chemists: 198-208.
93 Inoue, T, (1982). Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd, 25: 13.
94 Inoue, T, (1992). A Review of diacetyl Control Technology, Proc. Conv. - Inst. Brew. (Aust.-N.Z. Sect), 22nd: 76-79.
95 Inoue, T, Masuyama, K, Yamamoto, Y, Okada, K, (1968). Report of the Research Lab. Of the Kirin Brewery, Co, Ltd, 11: 1.
96 Inoue, T, Masuyama, K, Yamamoto, Y, Okada, K, (1968). Report of the Research Lab. Of the Kirin Brewery, Co, Ltd, 11: 17.
97 Inoue, T, Masuyama, K, Yamamoto, Y, Okada, K, Kuroiwa, Y, (1968). Proc. Of the Am. Soc. Brew. Chem.: 158.
98 Inoue, T, Yamamoto, Y, (1970). Reports of the research laboratories of the Kirin brewery Co., Ltd, 13: 79.
99 Inoue, T, Yamamoto, Y, (1970). Reports of the research laboratories of the Kirin brewery Co., Ltd, 13: 89.
100 Inoue, T, Yamamoto, Y, Kobubo,E, Kuroiwa, Y, (1973). Report of Research Labs, nº 16, Kirin Brewing Co., Takasaki, Japan.
101 Inoue, T., (1968). J. Ferm Techn., 46 (4): 341-344.

102 Inoue, T., Yakamoto, Y., (1969). Archives in Biochem. and Biophysics, 135: 454.
103 Ishibashi, T, Sasahara, T, Okada, K, (1969). Report of the Research, Laboratories of the Kirin Brewery Co, Ltd, 12: 1.
104 Ishii N, Matsumura M, Kataoka H, Et Al., (1995). Diacetyl fermentation coupled with pervaporation using oleyl alcohol supported liquid membrane, Bioprocess Eng., 13 (3): 119-123.
105 IzquierdoFerrero JM, FernandezRomero JM, deCastro MDL, (1997). On-line flow injection-pervaporation of beer samples for the determination of diacetyl, Analyst, 122 (2): 119-122.
106 José António Maia Rodrigues, Análise voltamétrica, após derivatização, de compostos passíveis de condensação cíclica. Análise em alimentos, Dissertação para Doutoramento em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1998.
107 Kakizaki, T, Hasebe, K, Yoshida, H, (1987). Catalytic polarographic-determination of vanillylmandelic acid in urine using a continuous de-oxygenation flow-injection system, Analyst, 112 (11): 1593-1596.
108 Kamogawa MY, Nogueira ARA, Miyazawa M, Artigas J, Alonso, J, (2001). Determination of soil calcareous efficiency using flow system with pervaporative separation, Anal. Chim. Acta, 438 (1-2): 273-279.
109 Kavadzed, A. V., Rodopulo A.K., Egorov I.A., (1977). Alpha diketones and alpha-hidroxiketones in wines, Applied biochemistry and microbiology, 13: 150-154.
110 Kieninger, H, (1977), J. Inst. of Brewing, 83: 72.
111 Kocková-Kratochvilová, A., Vavruchová,A.E Vopatková-Nováková, D., (1956). Brauwissenschaft, 9: 98.
112 Komorsky-Lovric, S., Lovric, M., (1995). Anal. Chim. Acta, 305: 248.
113 Kowalski, Z, Kubiak, W, (1984). Linear-sweep voltammetry at a dropping mercury-electrode in continuous-flow systems, Anal. Chim. Acta, 159: 129-137.
114 Kringstad, H, Rasch, S, (1966). J. Inst. of Brewing, 72: 56.
115 Kronlof, J, Linko, M, (1992). Production of beer using immobilized yeast encoding alpha-acetolactate decarboxylase, J. Inst. of Brewing, 98 (6): 479-491.
116 Kubiak, WW, Kowalski, Z, (1994). Flow-injection analysis with detection at mercury drop electrode in the presence of surfactants, Talanta, 41 (8): 1319-1325.
117 Kurz, T, Fellner, M, Becker, T, Delgado, A, (2001). Observation and control of the beer fermentation using cognitive methods, J. Inst. Brewing, 107 (4): 241-252.
118 Kutner, W, Debowski, J, Kemula, W, (1980). Polarographic detection for high-performance liquid-chromatography using a flow-through detector, Journal of Chromatography, 191: 47-60.
119 Landaud, S, Lieben, P, Picque, D, (1998). Quantitative analysis of diacetyl, pentanedione and their precursors during beer fermentation by an accurate GC/MS method, J. Inst. Of Brewing, 104 (2): 93-99.
120 Lapa, RAS., Lima, JLFC, Reis, BF, Santos JLM, (1998). Continuous sample recirculation in an opened-loop multicommutated flow system, Anal. Chim. Acta, 377: 103-110.
121 Legeay, O., Ratomahenina, R., Galzy, P., Nicolas, M., (1989). Study of diacetyl reductase in a polyploid brewing strain of Saccharomyces carlbergensis. Agric. Biol. Chem., 53 (2): 531-532.
122 Louis-Eugene, S, Ratomahenina, R, Galzy,P, (1988). Enzimatic reduction of biacetyl by a strain of Saccharomyces ovarum, Folia Microbiol., 33: 38-34.
123 Lovric, M., Komorsky-Lovric, (1988). J. Electroan. Chem., 248: 239.

124 Lund, W, Opheim, LN, (1975). Automated polarographic analysis .1. Design of flow-through cells and deaeration unit, Anal. Chim. Acta, 79: 35-45.
125 Maccrehan, W.A., May, WE, (1984). Anal. Chem., 56: 625.
126 Macdonald, A, Duke, PD, (1973). Small-volume solid-electrode flow-through electrochemical cells - preliminary evaluation using pulse polarographic techniques, Journal Of Chromatography, 83: 331-342.
127 Magee, PT, De Robichon-Szulmajster, H, (1968). European Journal of Biochemistry, 3: 502.
128 Magee, PT, Hereford, LM, (1969). J. of Bacteriology, 98: 857.
129 Mahoney, LA, Odea, J, Osteryoung, JG, (1993). Development and characterization of an automated flow system for voltammetric analysis, Anal. Chim. Acta, 281 (1): 25-33.
130 Mariaud, M., Levillain,P., (1994). New quantitative determination of 2,3-dioxobutane (diacetyl) in alcoholic beverages by an indirect spectrofluorimetric procedure with use of 2,3-diaminonaphtalene as reagent of derivatization, Talanta, 41 (1): 75-79.
131 Marsili, R.T., (1981), J. Chromatogr. Sci., 19: 451-456.
132 Martineau, B, Acree, T, Henickkling, T, (1994). A simple and accurate GC/MS method for the quantitative- analysis of diacetyl in beer and Wine, Biotechnol. Tech., 8 (1): 7-12.
133 Martins, EO, Johansson, G, (1982). A flow-through cell for differential pulse anodic-stripping voltammetry, Anal. Chim. Acta, 140 (1): 29-37.
134 Masschelein, CHA, Jeunehomme-Ramos, CL, Jenard, H., Devreux, A, (1971). Proc. Of the Eur. Brewery Congr., Estoril: 211.
135 Master Brewers' Association of the Americas, (1977). The Practical Brewer, 2nd ed., Impressions Inc., Madison, WI: 297-298, 332.
136 Mataix E, de Castro MDL, (1998). Determination of total and free sulfur dioxide in wine by pervaporation-flow injection, Analyst, 123 (7): 1547-1549.
137 Mataix E, de Castro MDL, (1999). Sequential determination of carbon dioxide and free sulfur dioxide in wine by flow-injection pervaporation with in series potentiometric-photometric detection, Fresen. J. Anal. Chem., 365 (4): 377-380.
138 Mataix E, de Castro MDL, (1999). Sequential determination of total and volatile acidity in wines based on a flow injection-pervaporation approach, Anal. Chim. Acta, 381 (1): 23-28.
139 Mataix E, de Castro MDL, (2000). Pervaporation prior to gas chromatography for the determination of enological parameters, Chromatographia, 52 (3-4): 205-210.
140 Mathis C, Pons MN, Engasser JM, Lenoel, M, (1993). Development of an online method for the monitoring of vicinal diketones and their precursors in beer fermentation, Anal. Chim. Acta, 279 (1): 59-66.
141 Mattos, IL, De Castro, MDL, (1994). Study of mass-transfer efficiency in pervaporation processes, Anal. Chim. Acta, 298 (2): 159-165.
142 McCarthy, SL, (1995). Analysis of diacetyl and 2,3-pentanedione in beer by HPLC with fluorometric detection, J. Am. Soc Brew. Chem., 1995, 53 (4):178-181.
143 Meilgaard, MC, (1991). The flavour of beer, Tech. Quaterly - Masters Brew. Assoc. of the Americas, 28 (3): 132-141.
144 Metrohm, Application Bulletin nº231/1, B 129 16.
145 Moll, M. (1991). Beers and Coolers, Intercept, Ltd: Andover, England, 191-193.
146 Morrison, NM, Bendiak, DS, (1987). Today's diacetyl: The total vicinal diketone profile of beer, Tech. Quaterly - Masters Brew. Assoc. of the Americas, 24: 14-20.

147 Mrzljak, RI, Bond, AM, Cardwell, TJ, Cattrall, RW, Knight, RW, Newman, OMG, Champion, BR, (1994). Online and off-line voltammetric methods for the determination of nickel in zinc plant electrolyte, Analyst, 119 (5): 1057-1061.
148 Mrzljak, RI, Bond, AM, Cardwell, TJ, Cattrall, RW, Knight, RW, Newman, OMG, Champion, BR, Hey, J, (1993). Online monitoring of cobalt in zinc plant electrolyte by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry, Anal. Chim. Acta, 281 (2): 281-290.
149 Mulder, M, (1990). Basic principles of membrane technology, Kluwer Academic Publisher: 2-269.
150 Nakatani, K, Takahashi, T, Nagami, K, Kumada, J, (1984). Kinetic study of vicinal diketones in brewing I: Formation of total vicinal diketones, Tech. Quaterly - Masters Brew. Assoc. of the Americas,21 (2): 73-78.
151 Nakatani, K, Takahashi, T, Nagami, K, Kumada, J, (1984). Kinetic study of vicinal diketones in brewing II: Theoretical aspect for the formation of vicinal diketones, Tech. Quaterly - Masters Brew. Assoc. of the Americas, 21 (4): 175-185.
152 Neuburger, GG, Johnson, DC, (1986). Constant-potential pulse polarographic detection in flow-injection analysis without deaeration of solvent or sample, Anal. Chim. Acta, 179: 381-388.
153 Nimmo, M, Fon es, GR, Chester, R., (1998). Atmospheric deposition: a potential source of trace metal organic complexing ligands to the marine environment, Croatica Chemica Acta, 71 (2): 323-341.
154 Noufi, M, Yarnitzky, C, Ariel, M, (1990). Determination of nitrate with a flow-injection system combining square-wave polarographic detection with online deaeration, Anal. Chim. Acta, 234 (2): 475-478.
155 O' Dea, J.J., Osteryoung, J.G., (1993). Anal. Chem, 65: 3090.
156 Ogbomo I, Becker T, Hummel W, (1997). Experiments on the enzymatic on-line determination of diacetyl and 2-acetolactate in beer, Monatsschr Brauwiss 50 (5-6): 108-113.
157 Owades, J.L., Jakovac, JA, (1963). Proc. Am Soc Brew. Chemists: 22.
158 Owades, JL, Maresca, L, Rubin, G, (1959). Proc. Congr. Am Soc. Brew. Chem.: 22.
159 Pajunen, E, Mäkinen, V, Gisler, R, (1987). Proc. Of the 31st Eur. Brec Conv.: 441.
160 Papaefstathiou I, Bilitewski U, deCastro MDL, (1996). Pervaporation: An interface between fermenters and monitoring, Anal Chim Acta, 330 (2-3): 265-272.
161 Pasteur, L., (1876). Études sur la Bière, Vol. 5, Masson, Paris.
162 Patente de invenção Portuguesa PT/10260801, em nome da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
163 Patente de invenção Europeia - Aceitação de pedido provisório para Patente Europeia, European Patent Application G01N27/48, publicada em 20.11.2002, Bulletin 2002/47.
164 Paulo Joaquim Ferreira de Almeida, Aplicações Analíticas da Voltametria com Adsorção, Dissertação para Doutoramento em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2000.
165 Pedrotti, JJ, Angnes, L, Gutz, IGR, (1994). A fast, highly efficient, continuous degassing device and its application to oxygen removal in flow-injection analysis with amperometric detection, Anal. Chim. Acta, 298 (3): 393-399.
166 Persson, B, Rosen, L, (1981). Flow-injection determination of isosorbide dinitrate with polarographic detection, Anal. Chim. Acta, , 123: 115-123.
167 Pettersen, JGL, Holmberg, S, Nilsson-Tillgren, T, Kielland-Brandt, MC, Gjermansen, C., (1983). Approaches to genetic improvement of brewers yeast.

Cloning of isoleucina-valine genes. EBC Monograph IX, Symposium on biotechnology: 30.

168 Postel, W, Meier, B, Lebensm, Z, (1981). Unters. Forsch., 173: 85.

169 Priego-Lopez E, de Castro MDL, (2002). Pervaporation-gas chromatography coupling for slurry samples - Determination of acetaldehyde and acetone in food, J. Chrom. A, 976 (1-2): 399-407.

170 Prinzing,V, Ogbomo, I, Lehn, C, Schmidt, HL, (1990). Fermentation control with biosensors in flow-injection Systems - problems and progress", Sensor Actuat. B-Chem., 1(1-6): 542-545.

171 Radhakrishnan, A.N., Wagner, RP, Snell, EE, (1960). J. Biol. Chem., 235: 2322.

172 Rajagopalan N, Cheryan M, Matsuura T, (1994). Recovery of diacetyl by pervaporation, Biotechnol Tech, 8 (12): 869-872.

173 Ramaley, L., Dalziel, JA, Tan, WT, (1981). Can. J. Chem, 59: 3334

174 Rankine B.C., Fornachon J.C.M., Bridson D.A., (1969). Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality, Vitis, 8: 129-134.

175 Reinke, R, Simon, J, (2002).The online removal of dissolved oxygen from aqueous solutions used in voltammetric techniques by the chromatomembrane method, Anal. Bioanal. Chem., 374 (7-8): 1256-1260.

176 Rice, JF, Helbert, JR, (1973). Proc. Congr. Am. Soc. Brew. Chem.: 11.

177 Rodrigues, J. A., Barros, A. A, Rodrigues, P. G., (1999). Differential pulse polarographic determination of alpha-dicarbonyl compounds in foodstuffs after derivatization with o-phenylenediamine, J. Agric. Food Chem., 47 (8): 3219-3222.

178 Rodrigues, J. A., Barros, A. A., Machado Cruz, J. M., Ferreira, A. A., (1997). Determination of diacetyl in beer using differential-pulse polarography, J. Inst. Brew., 103: 311-314.

179 Rodrigues, JA, Barros, AA, Almeida, PJ, Rodrigues, PG, Fogg, AG, (2001). Flow injection square wave cathodic stripping voltammetric determination at a hanging mercury drop electrode of rapidly reduced compounds - Determination of diacetyl in wine as 2,3-dimethylquinoxaline, Anal. Chim. Acta, 449 (1-2): 119-127.

180 Rodrigues, PG, Rodrigues, JA, Barros, AA, Lapa, RAS, Lima, JLFC, Cruz, JMM, Ferreira, AA, (2002). Automatic flow system with voltammetric detection for diacetyl monitoring during brewing process, J. Agric. Food Chem., 50 (13): 3647-3653.

181 Ronkaine.P, Brummer S, Suomalai.H, (1970). Determination of 2-acetolactic acid and 2-aceto-2-hydroxybutyric acid in a fermented solution by gas chromatography, Anal Biochem, 34 (1): 101.

182 Ruhling, I, Schafer, H, Ternes, W, (1999). HPLC online reductive scanning voltammetric detection of diquat, paraquat and difenzoquat with mercury electrodes, Fresenius J. Anal. Chem., 364 (6): 565-569.

183 Sander, S, (1999). Comparison of different flow-through adsorptive stripping voltammetric methods for the determination of molybdenum(VI), Fresenius J. Anal. Chem., 365 (5): 435-443.

184 Sander, S, Wagner, W, Henze, G, (1997). Possibilities for the automated determination of trace concentrations of uranium in water samples by Adsorptive stripping voltammetry, Anal. Chim. Acta, 349: 93-99.

185 Saur, D, Spahn, E, (1995). Flow-Through Voltammetry (Ftv) With The Hanging Mercury Drop Electrode (Hmde), Fresenius J. Anal. Chem., 351 (2-3): 154-157.

186 Schafer T, Bengtson G, Pingel H, (1999). Recovery of aroma compounds from a wine-must fermentation by organophilic pervaporation, Biotechnol. Bioeng., 62 (4): 412-421.

187 Shigematsu, N, Yabuuchi, S., (1964). Bulletin of Brewing Science (Tokyo), 10: 45.
188 Shimwell, JL, and Kirkpatrick,WF, (1939). J. Inst. of Brewing, 45: 137.
189 Strassman, M, Shatton, JB, Corseg, ME, Weinhouse, S., (1958). J. of the Am. Chem. Soc., 80: 1771.
190 Strassman, M, Shatton, JB, Weinhouse, S., (1960). J. Biol. Chem., 235: 700.
191 Suomalainen, H, Linnahalme, T., (1966). Archives of Biochemistry and Biophysics, 114: 502
192 Suomalainen, H., Ronkainen, P, (1968). Nature, 220: 792.
193 Taylor, LR, (1993). An automated deoxygenation and sample-handling system for polarography and voltammetry, Am. Lab., 25 (2): 44.
194 Tolls, TN, Shovers, J, Sandine, WE, Elliker, PR, (1970). Applied Microbiology, 19: 649.
195 Trelea, IC, Landaud, S, Latrille, E, Corrieu, G, (2002). Prediction of confidence limits for diacetyl concentration during beer fermentation, J. Am. Soc. Brew. Chem., 60 (2): 77-87.
196 Trojánek e K. Holub, (1980). Anal. Chim. Acta, 121: 23.
197 Usthche, H, Histi, G, (1981). J. Memb. Sci., 8: 105.
198 van den Berg, CMG, (1986). J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem., 215: 111-121.
199 van den Berg, R, Harteveld, PA, Martens, FB, (1983). Diacetyl reducing activity in brewers yeast, Proceedings of the 19th Congress of the European brewery convention: 497-504.
200 Verhagen, LC, De Jong, RL, and Strating J., (1987). Analisys of vicinal diketones in beer by HPLC. Proc. Eur. Brew. Conv. 21st Congress, Madrid: 615-622
201 Wainwright T., White F.H., (1975). Analysis of diacetyl and related compounds in fermentation, J. Inst. Brewing, 81: 37-45.
202 Wainwright T., White F.H., (1975). Occurrence of diketones and alpha-acetohydroxyacids in fermentation, J. Inst, Brewing, 81: 46-52.
203 Wainwright, T, (1973). Diacetyl - A review. Part I - Analytical and biochemical considerations: Part II - Brewing experience, J. Inst. of Brewing, 79: 451-470.
204 Wang, FQ, Li, SY, Liu, SD, Zhang, YN, Liu, ZY, (1994). Application of differential-pulse anodic-stripping voltammetry with a stopped-flow system for the simultaneous determination of Pb, Cu, Sb, and Bi in environmental-samples, Anal. Lett., 27 (9): 1779-1787.
205 Wang, J, Ouziel, E, Yarnitzky, C, Ariel, M, flow detector based on square-wave polarography at dropping mercury-electrode, Anal. Chim. Acta, 1978, 102, 99-112.
206 Watanabe, Y, Hayashi, K, Shimura, K, (1959). Biochimica et Biophysica Acta, 31: 583.
207 Wixon, RL, Shatton, JB, Strassman, M, (1960). J. Biol. Chem., 235, 128.
208 Wojciechowski, M., Go, W., Osteryoung, J., (1985), Anal. Chem. 57: 155.
209 Yamaguchi, M, Ishida,J., Xuan-Xuan, Z., Yoshitake, T., (1994). Determination of glioxal and methylglioxal and diacetyl and 2,3-pentanodione in fermented foods by HPLC with fluorescence detection, J. of Liq. Chromatography, 17 (1): 203-211.
210 Yamano, S, Tomizuka, K, Sone, H, Imura, M, Takeuchi, T, Tanaka, J, Inoue, T, (1995). Brewing performance of a brewers-yeast having alpha-acetolactate decarboxylase from acetobacter-aceti subsp xylinum, J. of Biotechnology, 39 (1): 21-26.
211 Yamauchi, Y, Okamoto, T, Murayama, H, Kajino, K, Amikura, T, Hiratsu, H, Nagara, A, Kamiya, T, Inoue, T, (1995). Rapid maturation of beer using an

immobilized yeast bioreactor, 1. Heat conversion of alpha-acetolactate, J. of Biotechnology, 38 (2): 101-108.

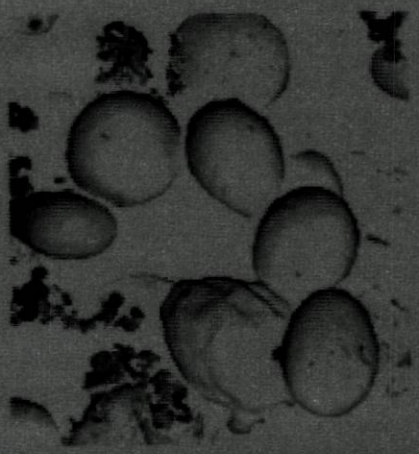
212 Yamauchi, Y, Okamoto, T, Murayama, H, Kajino, K, Nagara, A, Noguchi, K, (1995). Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 2. balance of total diacetyl reduction and regeneration, Journal Of Biotechnology, 38 (2): 109-116.

213 Yarnitzky, C, Ouziel, E, (1976). Nebulizer for eliminating oxygen from polarographic flow cells, Anal. Chem., 48 (13): 2024-2025.

214 Yarnitzky, CN, Rosenzveig, M, (1994). The auto-drop static mercury-electrode - a novel concept, Electroanalysis, 6 (2): 139-143.

215 Yoshizawa, K., (1964). Agric. Biol. Chem., 28: 179.

216 Zanoni, M. V. B., Fogg, A. G., (1994). Anal. Proc., 31: 217.



PARTE III

"VITALTITRATION" (VT') - UM MÉTODO NOVO PARA DETERMINAÇÃO DA VITALIDADE DE LEVEDURA

A qualidade da levedura é um dos factores que afecta directamente o desempenho da fermentação. Desta forma, para se produzir uma cerveja com consistência da qualidade e boas características organolépticas, é necessário ter levedura que nos permita ter processos de fermentação idênticos. Para tal é necessário conhecer o estado fisiológico da levedura a ser semeada evitando-se a inoculação caso a seja uma levedura com baixa vitalidade. Está bem estabelecida a importância que a qualidade da levedura utilizada no processo de fermentação tem para a industria cervejeira; contudo a ausência de métodos expeditos e acessíveis para a determinação de vitalidade tem limitado o uso deste tipo de medições e a sua introdução rotineira nas empresas. Actualmente, as empresas remetem-se a medições mais simples como a viabilidade, que apenas indica se as células estão mortas ou vivas.

Foi precisamente para ultrapassar as limitações das determinações de viabilidade, em especial do método do azul de metileno (praticamente o único que é utilizado), que foi introduzido o conceito de vitalidade que reflecte de uma forma mais apropriada o estado fisiológico da levedura. Para tentar superar as principais limitações dos métodos de determinação de vitalidade actualmente existentes que se desenvolveu-se um novo método simples e bastante sensível, denominado "vitaltitration". Este método baseia-se na medição da actividade metabólica da levedura, reflectindo a capacidade das células de produzir CO_2, de extrudir H^+ e, ainda que indirectamente, as reservas internas de energia.

Verifica-se que o método "vitaltitration" é muito sensível à perda de vitalidade de levedura em ensaios de laboratório. Este método pode ainda ser utilizado para a biomonitorização de levedura de sementeira dado que é possível através dele fazer uma previsão do desempenho desta em fermentações tanto laboratoriais como industriais. Este método foi aplicado à monitorização de alterações do estado da levedura, para aplicação a optimizações de processos no fabrico de cerveja.

1. GENERALIDADES SOBRE LEVEDURAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE CERVEJA

1.1. Características Gerais

As leveduras são organismos eucariotas unicelulares, que taxonomicamente se encontram no grupo dos fungos. Destas, as que possuem maior importância comercial pertencem ao género *Saccharomyces*, as quais, devido às sua excelente capacidade fermentativa encontram grande aplicação, desde o fabrico de pão até produtos alcoólicos como cerveja, vinhos e destilados.

Estas leveduras têm uma elevada capacidade de utilização de açúcar, que foi uma das primeiras características que lhes foi atribuída; daí o nome *Saccharomyces,* que significa em latim "aquela que transforma açúcar". Como se depreende, estas leveduras são microorganismos metabolicamente muito activos e de reprodução muito rápida, o que lhes permite assumir o controlo de fermentações em pouco tempo, relativamente a outros microorganismos. As leveduras do género *Saccharomyces* são responsáveis pela esmagadora maioria dos processos de fermentação alcoólica conhecidos, mesmo aqueles que ocorrem naturalmente sem a adição propositada destes microorganismos.

Estas leveduras podem levar a cabo dois tipos de processos metabólicos quimioorganotróficos distintos. Na presença de O_2 as leveduras crescem eficientemente em meios ricos em açúcares, originando como produto do seu metabolismo o CO_2 podendo ainda dividir-se rapidamente. No entanto, na ausência de O_2 e abundância de fontes de carbono há alteração para um metabolismo anaeróbio, ocorrendo uma diminuição da taxa de crescimento da população, e originando-se como principais produtos do metabolismo o etanol e CO_2 num processo conhecido como fermentação alcoólica.

As leveduras encontram-se classificadas como fungos, sendo no caso das *Saccharomyces* geralmente organismos com a forma de uma elipse e de dimensões bastante superiores às das bactérias, podendo ser, portanto, microscopicamente diferenciáveis destas, até porque também possuem organelos celulares característicos de células eucariotas. Na figura III-1 podemos observar uma fotografia por microscópio electrónico de varrimento, de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* em plena fase de

divisão por gemulação, distinguindo-se a célula mãe da filha pela diferença de volume e pela existência de cicatrizes de divisões anteriores na célula mais velha.

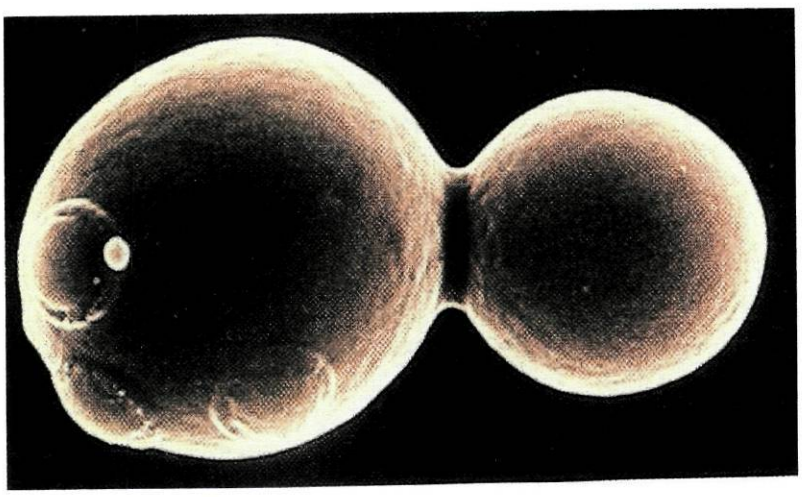


Figura III-1. Fotografia de microscópio electrónico de varrimento de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* em divisão.

Como qualquer outra célula viva, também as leveduras sofrem um processo de degeneração que culmina com a morte celular. Embora esta degradação do estado fisiológico possa ser um acontecimento súbito, geralmente decorre de forma e progressiva, ao longo do qual a levedura vai alterando o seu estado fisiológico, variando o que tradicionalmente se designa de vitalidade e, que é precisamente o que se abordará nesta parte III.

1.2. Utilização de levedura no fabrico de cerveja

A nível da industria cervejeira a levedura utilizada divide-se tradicionalmente, em dois grande tipos, as leveduras do tipo "ale" e as leveduras do tipo "lager". Embora possuam claras diferenças em temos de desempenho e comportamento fermentativo, são actualmente ambas classificadas taxonomicamente como *Saccharomyces cerevisiae*. Estudos genómicos recentes demonstram que os dois tipos de leveduras são "de facto" muito similares, pertencendo as leveduras do tipo "lager" a um ramo evolucional muito recente que se estima ser de apenas umas centenas de anos; as diferenças que

actualmente já se encontram entre as "lager" e "ale" devem-se ao exaustivo isolamento e manipulação que as primeiras foram tendo, em especial ao longo dos dois últimos séculos.

As leveduras do tipo "lager" possuem no caso da fermentação da cerveja algumas características muito apreciadas pelos cervejeiros sendo por isso muito mais utilizadas do que as "ale". Na tabela III-1 são indicadas algumas das características típicas mais importantes de cada um destes dois tipos de levedura [44].

Tabela III-1. Características típicas de leveduras "ale" e "lager" utilizadas na fermentação de cerveja.

Leveduras tipo "ale" *Outras designações: "top fermenting"; Saccharomyces cerevisiae*	Leveduras que normalmente proporcionam uma maior rentabilidade fermentativa a temperaturas entre 15 e 23 °C. Geralmente estas leveduras ascendem ao topo dos fermentadores quando floculam no final da fermentação, devido ao facto da membrana celular ter fortes característica hidrofóbicas, e também devido às bolhas de CO_2 libertadas durante o processo.
Leveduras tipo "lager" *Outras designações: "bottom fermenting"; Saccharomyces uvarum; Saccharomyces carlsbergensis*	As estirpes pertencentes a este "grupo" são geralmente usadas com maior rentabilidade a temperaturas entre 8 e 18 °C. Este tipo de levedura tem uma membrana com elevado carácter hidrofílico e, portanto, tende a assentar no fundo do fermentador à medida que a fermentação se aproxima do fim e começa a flocular.

A levedura durante a fermentação de cerveja, passa por uma sucessão de alterações metabólicas e fisiológicas importantes, que lhes permite a adaptação e o melhor aproveitamento possível das condições proporcionadas pelo meio a cada momento. Inicialmente é feita uma sementeira limitada de levedura num meio rico em açúcares e outros nutrientes, o que permite a sua propagação e multiplicação, dentro de certos limites, à medida que se dá a fermentação alcoólica [64, 108]. Com o decorrer da fermentação a quantidade de açúcar e outros nutrientes diminui para valores limitantes que originam por parte da levedura uma resposta de defesa, macroscopicamente visível pela diminuição do seu metabolismo e pela indução da agregação de células (floculação) [29, 130]. De uma forma mais pormenorizada este ciclo de fermentação é caracterizado para a levedura por 4 fases:

I. ***Fase "lag"*** - Esta fase é caracterizada pela síntese de compostos essenciais à multiplicação das células bem como pela alteração do padrão de expressão genética e de síntese proteica que permitirá à levedura sair de um estado adormecido e metabolicamente pouco activo, recorrendo a reservas

energéticas intracelulares. Verifica-se um decréscimo acentuado do pH e a redução de todo o oxigénio do mosto, sendo utilizadas as reservas de glicogénio intracelular como fonte de energia, uma vez que a assimilação de açúcares é diminuta por não existirem transportadores de membrana que facilitem a sua entrada para a célula.

II. ***Fase de crescimento*** - Durante esta fase dá-se uma multiplicação intensa das leveduras. Geralmente já não existe oxigénio no meio, mas os esteroides e ácidos-gordos essenciais à expansão da membrana celular já foram sintetizados na fase "lag" encontrando-se armazenados, existindo no mosto os restantes nutrientes e amino-ácidos essenciais.

III. ***Fase de fermentação*** - Fase anaeróbia, em que os açúcares são oxidados a álcool (etanol) e dióxido de carbono. Normalmente existe também a produção de produtos secundários como ésteres, álcoois superiores, cetonas, aldeídos, sulfuretos orgânicos e inorgânicos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e compostos nitrogenados (dependendo do organismo e das condições de fermentação), os quais são responsáveis pelo aroma e sabor característico da cerveja em questão. Durante esta fase ocorre uma grande convecção nos fermentadores devido à produção de CO_2, pelo que a levedura se encontra em suspensão. À medida que a quantidade de açúcares diminui e o etanol aumenta, as leveduras passam a estar cada vez menos activas, iniciando-se um processo de agregação conhecido como floculação. No final desta fase a levedura activa a produção de glicogénio, que lhe permitirá ter fonte interna de energia para sobreviver durante a dormência.

IV. ***Fase estacionária*** - Nesta fase a levedura floculada assenta no fundo do fermentador ou sobe à superfície consoante o tipo, diminuindo drasticamente o seu metabolismo e entrando numa fase de dormência.

2. A IMPORTÂNCIA DA BIOMONITORIZAÇÃO DA VITALIDADE DA LEVEDURA NA INDUSTRIA CERVEJEIRA

O desenvolvimento de métodos de determinação do estado fisiológico da levedura, para biomonitorização, encontra-se entre os temas que presentemente apresentam um maior interesse nas área de fermentação e de gestão de levedura [126]. Esta importância advém da crescente consciencialização das relações de dependência existentes entre uma boa levedura e uma fermentação consistente, e da relação que a própria fermentação tem com as características organolépticas do produto fermentado [36, 43, 118].

Assim, pode-se afirmar que o bom desempenho fermentativo é largamente dependente da boa qualidade da levedura utilizada. Há, portanto, reflexos da levedura na qualidade organoléptica da cerveja, que também se estendem ao controlo e duração do processo de fermentação. Para além disso, como a fermentação usualmente constitui o passo limitante do processo de fabrico de cerveja, a vitalidade da levedura tem importantes reflexos económicos [5, 6].

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver uma metodologia inovadora que permitisse de forma simples e sensível a monitorização do estado fisiológico da levedura, vulgarmente conhecido como vitalidade.

A avaliação da vitalidade permitirá medir o efeito de processos e procedimentos sobre o estado fisiológico da levedura e desta forma obter uma melhor compreensão destas variáveis. A biomonitorização da vitalidade da levedura poderá ainda ser usada como instrumento para a avaliação dos protocolos de manuseamento e gestão de levedura nas cervejeiras, bem como pode vir a constituir uma ferramenta para selecção de levedura baseada no princípio de "limite de qualidade para rejeição".

2.1. Ciclo da levedura numa empresa cervejeira

A levedura utilizada no processo de fabrico de cerveja é geralmente recuperada para posteriormente voltar a ser semeada numa nova fermentação. Contudo ao fim de várias fermentações sucessivas, que geralmente se designa como gerações, a levedura vai começando a perder propriedades, sendo a certa altura eliminada do processo industrial. Dada esta limitação do ciclo industrial das leveduras é necessário o fornecimento de levedura fresca para o processo, proveniente de um banco de levedura conservado a muito baixa temperatura, de modo a manter as suas características fisiológico-genéticas. Deste banco de levedura são retiradas regularmente células de levedura virgem que numa primeira fase são propagadas laboratorialmente em condições aeróbicas de forma a ter quantidade suficiente para inoculação num propagador industrial. Uma vez inoculada a nova levedura no propagador industrial, este irá propagar regularmente porções de levedura em quantidade suficiente para inocular uma cuba industrial, sendo essa a primeira fermentação alcoólica completamente em anaerobiose que a levedura efectuará.

No final da fermentação a levedura sofre um processo de agregação conhecido como floculação, que no caso de levedura "lager", é seguido de sedimentação e assentamento no fundo da cuba. A levedura pode ser facilmente recolhida para uma cuba refrigerada onde é mantida até voltar a ser necessária para uma nova inoculação. Nessa altura, procede-se à sua bombagem para uma cuba com balança onde se pesa a massa necessária. Embora todo o processo de fermentação e de manuseamento de levedura seja completamente estanque e asséptico, há por vezes necessidade de proceder à sua higienização para evitar que outros microorganismos que possam aparecer na levedura sejam semeados nas cubas, reproduzindo-se e causando aromas indesejados na cerveja. Este processo de higienização é feito, se necessário, através de uma lavagem ácida da levedura, uma vez que esta é resistente a valores baixos de pH, que geralmente matam os restantes microorganismos.

Na figura III-2 está esquematizado o ciclo da levedura numa empresa cervejeira.

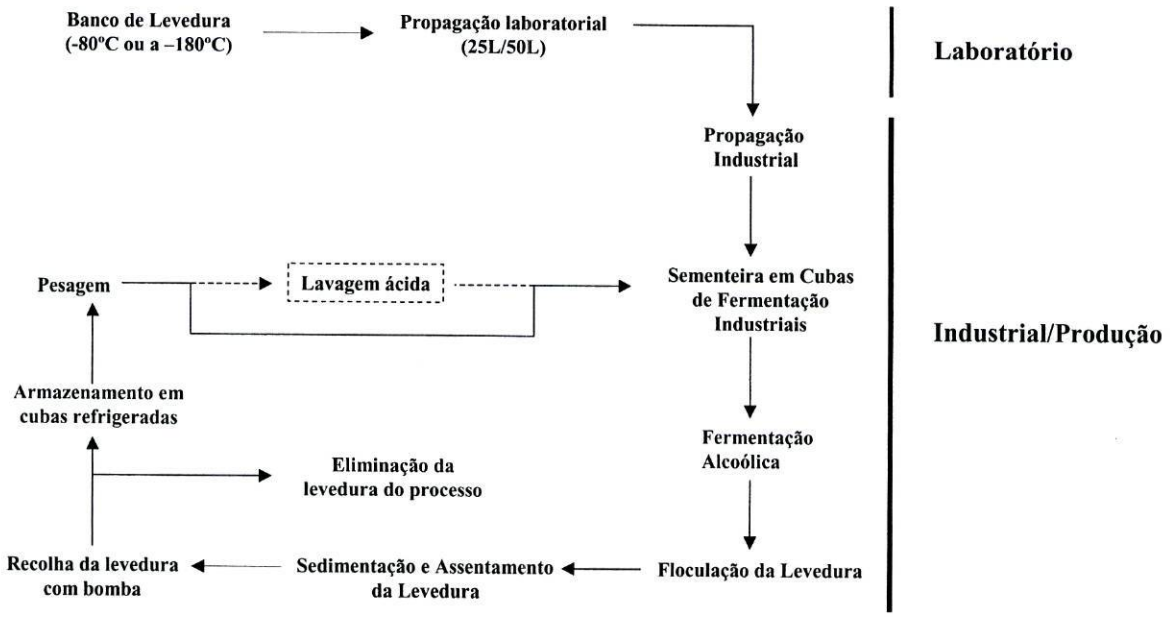


Figura III-2. Esquema do ciclo da levedura numa empresa cervejeira.

2.2. A importância da fermentação na qualidade da cerveja.

O principal objectivo de um cervejeiro é a produção de cerveja com boas características organolépticas, mas de uma forma reprodutível. Esta preocupação crescente de manutenção do produto com uma consistência da qualidade alerta para a necessidade de controlo dos factores de variabilidade do fabrico, o que só é possível se também a fermentação for devidamente controlada [153].

Ao contrário do que por vezes é entendido pelos consumidores, o tipo e a qualidade da cerveja não são dependentes apenas das matérias primas utilizadas e do processo de fabrico do mosto mas, também, do processo de fermentação. É por isso necessário que as fermentações sejam consistentes para que se produza uma cerveja com qualidade uniforme. É claro que a composição do mosto é desde logo um factor que afecta esse desempenho da fermentação que é, portanto, indirectamente afectada pelas referidas matérias primas e pelo processo de fabrico do mosto; no entanto este bioprocesso é dependente, acima de tudo, da levedura utilizada no processo [112]. Comprova-se, por exemplo, que a introdução de grandes quantidades de células mortas e autolizadas pode originar "off-flavours" (aromas indesejados), baixa estabilidade da espuma ou ainda turvação não filtrável. [102].

Verifica-se, portanto, que a eficiência da fermentação bem como o carácter e a qualidade do produto final estão intimamente ligados à quantidade e qualidade da

levedura que é semeada, dado que é durante este processo que esta forma os compostos que mais influenciam as características organolépticas da cerveja, como determinados esteres, álcoois superiores, ácidos orgânicos, aldeídos, diacetilo, entre outros [9, 46, 47, 94, 136, 139]. É actualmente aceite que quanto melhor o estado fisiológico da levedura, melhor é a qualidade da cerveja produzida e que quanto mais constante for a vitalidade da levedura semeada mais constante será a fermentação [66].

Como ainda não existe um método de determinação de vitalidade para uso em rotina, a variabilidade do estado fisiológico da levedura semeada é uma das principais causas da variabilidade em fermentações, da qual podem advir as variações mais inesperadas no processo. Pelo contrário, a quantidade de levedura bem como o controlo de outras variáveis físico-químicas importantes no processo de fermentação (ex. temperatura, oxigenação) são hoje em dia parâmetros bem regulados, não sendo geralmente fonte de problemas [12, 17].

Então para que se produza uma cerveja de boa qualidade é necessário considerar muitos parâmetros envolvendo todo o processo de fabrico desde a qualidade das matérias primas, até ao controlo do desempenho da fermentação. Dada a importância da fermentação para as características organolépticas da cerveja, e as dificuldades particulares que existem no seu controlo após se ter iniciado (o que dificulta uma eventual correcção reactiva do processo), é importante uma gestão preventiva e não reactiva, ou seja, que tenhamos o processo sob controlo e não que seja um processo controlado. Isto significa que um tratamento adequado antes do início da fermentação poderá prevenir factores de variabilidade que podem advir durante a fermentação, reduzindo eventuais alterações ao processo durante o seu decurso. Este facto alerta para a vantagem do controlo rotineiro de vitalidade da levedura antes de ser semeada, evitando-se a sua utilização caso esta não cumpra as especificações a ser estabelecidas [39].

2.3. A vitalidade da levedura, o desempenho da fermentação e o carácter organoléptico da cerveja.

A relação existente entre a vitalidade da levedura, o desempenho da fermentação e o carácter organoléptico da cerveja é bem conhecida, embora exista uma grande dificuldade em a definir. Sabe-se que a qualidade (vitalidade e viabilidade) da levedura

de sementeira é o mais importante factor que afecta o desempenho e a consistência da fermentação, de que resultarão cervejas de qualidade aceitável ou, pelo menos, cervejas em que a fermentação não constitui factor de variabilidade [57]. Na figura III-3 é apresentado um diagrama que representa a relação existente entre o estado fisiológico da levedura, a fermentação e a qualidade da cerveja.

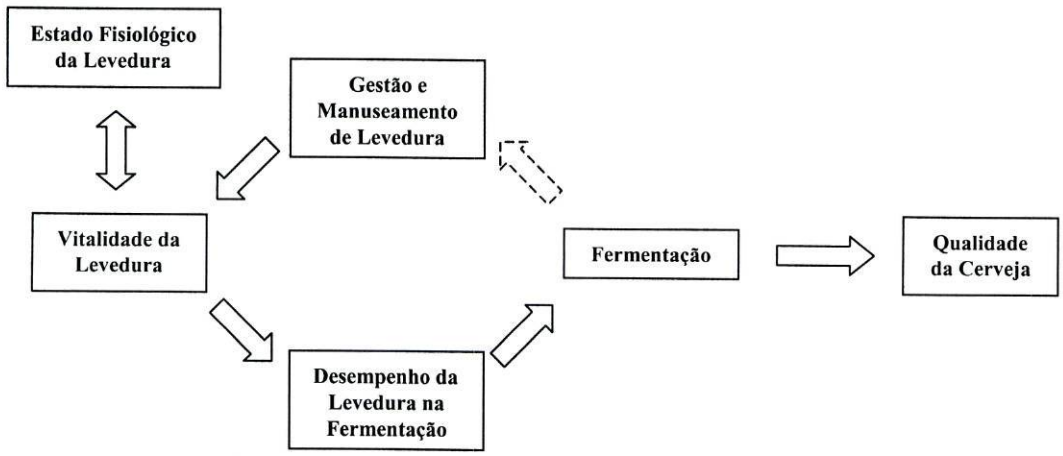


Figura III-3. Relação entre o estado fisiológico da levedura, a fermentação e a qualidade da cerveja.

A levedura como qualquer outro ser vivo apresenta alterações morfológicas, histológicas e moleculares ao longo do seu período de vida, pelo que é de esperar que um população de levedura ao fim de um certo número de fermentações seja diferente daquela que existia no início [7, 120, 121, 140]. É ainda igualmente suposto que as leveduras, tendo sido expostas mais frequentemente a factores de pressão ambiental, possuam níveis de "stress" celular mais elevados [46, 142, 144]. Consequentemente, ao longo do seu período de vida útil no processo de uma empresa cervejeira, a levedura passa por uma fase em que possui condições ideais para fermentar, durante a qual fermentará mais rapidamente e em maior extensão produzindo uma cerveja de qualidade, mas deve ser eliminada do processo antes de perder estas propriedades.

É desejável que a levedura de processo mantenha o seu estado fisiológico o mais elevado possível durante um longo período de tempo. É por isso importante não só conhecer a vitalidade da levedura antes de ser semeada, como também desenvolver medidas quer preventivas quer correctivas de gestão e manuseamento de levedura, que permitam minimizar alterações do seu estado fisiológico [5].

Estes aspectos têm levantado, em especial ao longo dos últimos 20 anos, uma crescente preocupação em melhoramentos do processo e em optimizar parâmetros de gestão e manuseamento industrial de levedura [9, 45, 49, 126, 130, 145, 150]. No entanto, continuam a não existir na industria cervejeira formas expeditas de avaliar a vitalidade de levedura, que possam ser utilizadas como uma rotina antes de esta ser semeada [57,118].

A vitalidade da levedura é afectada por variados factores quer intrínsecos quer extrínsecos. Entre os primeiros incluem-se alterações genéticas que a levedura possa ter ao longo do tempo, bem como a sua capacidade intrínseca de resistência ao "stress". Apesar da importância dos factores intrínsecos, geralmente aqueles que mais contribuem para a queda da vitalidade da levedura são factores extrínsecos, associados à prática comum de efectuar re-inoculação em série da levedura recolhida no final da fermentação que, entretanto, passa a estar sujeita a uma série de procedimentos causadores de "stress" como a própria fermentação passando pela recolha, armazenamento e, eventualmente, uma lavagem ácida [24]. As variações de vitalidade da levedura sob condições industriais podem ser bastante subtis, tornando ainda mais difícil e complexa a determinação de vitalidade de levedura [57]. Com o objectivo de melhorar os processos de gestão e manuseamento de levedura, o que em última instância permitirá melhorias na consistência da produção e no incremento da própria qualidade da cerveja, tem sido muito procurado o desenvolvimento de meios que permitam uma medição rigorosa da qualidade da levedura.[73].

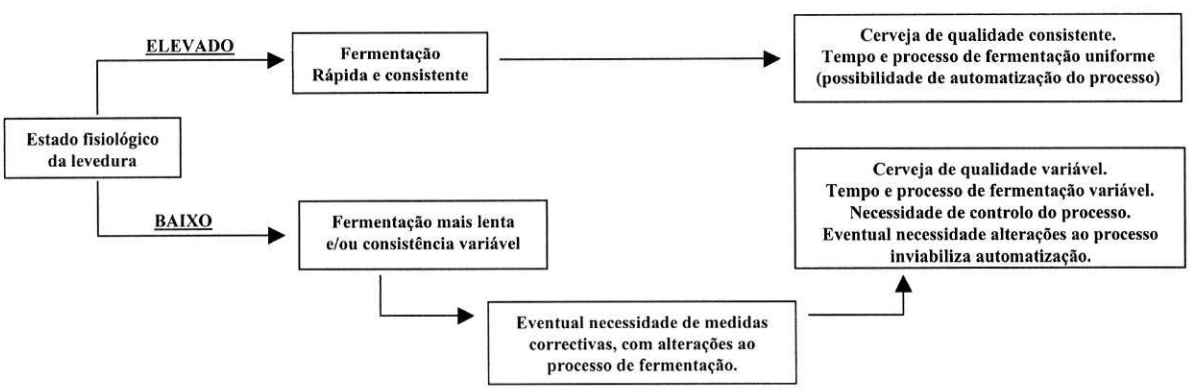


Figura III-4. Implicações do estado fisiológico da levedura de sementeira na fermentação e qualidade da cerveja.

2.4. Avaliação do estado fisiológico da levedura – definição de vitalidade e viabilidade.

Quando se fala em qualidade da levedura pode-se estar a falar de dois aspectos distintos: da qualidade higiénica da levedura e do seu estado fisiológico. Destes dois só o segundo é na realidade considerado um aspecto de qualidade intrínseco, uma vez que o primeiro reflecte apenas os parâmetros de higiene do processo da levedura [57].

O estado fisiológico da levedura é geralmente expresso de duas formas distintas: a viabilidade e a vitalidade. A viabilidade é uma expressão mais restrita do estado fisiológico, considerando apenas se as células estão vivas ou mortas. A vitalidade por seu turno é mais abrangente, caracterizando-se como uma medida gradual do vigor das células vivas, sendo "de facto" aquela que reflecte o verdadeiro estado fisiológico da população de levedura. Obviamente o uso da vitalidade expressa melhor o estado fisiológico, uma vez que as células, tal como qualquer outro ser vivo, geralmente sofrem um processo de degeneração gradual e não abrupto, durante o qual vão perdendo capacidades [121, 140]. Embora de maior utilidade, a determinação de vitalidade é uma análise de carácter excepcional e não de rotina; por isso, embora seja mais limitada a informação fornecida, a viabilidade continua a ser a medida de estado fisiológico mais utilizada, devido essencialmente ao facto de a sua determinação ser mais simples, e de já existirem métodos rotineiros para a sua determinação [61].

Na figura III-5 apresenta-se em esquema as diferenças entre a vitalidade e a viabilidade.

O conhecimento das causas da senescência da levedura ao longo de sucessivos ciclos de fermentação permite definir melhor os bons procedimentos de gestão de levedura e, com isso, conseguir que esta permaneça o menos alterada possível fisiologicamente durante o seu período de vida útil num processo de industrial. Alguns desses factores de variabilidade foram já identificados, estando descritos em diversa bibliografia [125, 72, 79, 11, 48].

Estes avanços que têm vindo a ser feitos no aprofundamento das causas de senescência da população de levedura têm permitido a elaboração de planos de gestão de levedura, contemplando boas práticas de manuseamento e administração da levedura, podendo inclusive conter medidas preventivas e correctivas [84, 125, 111].

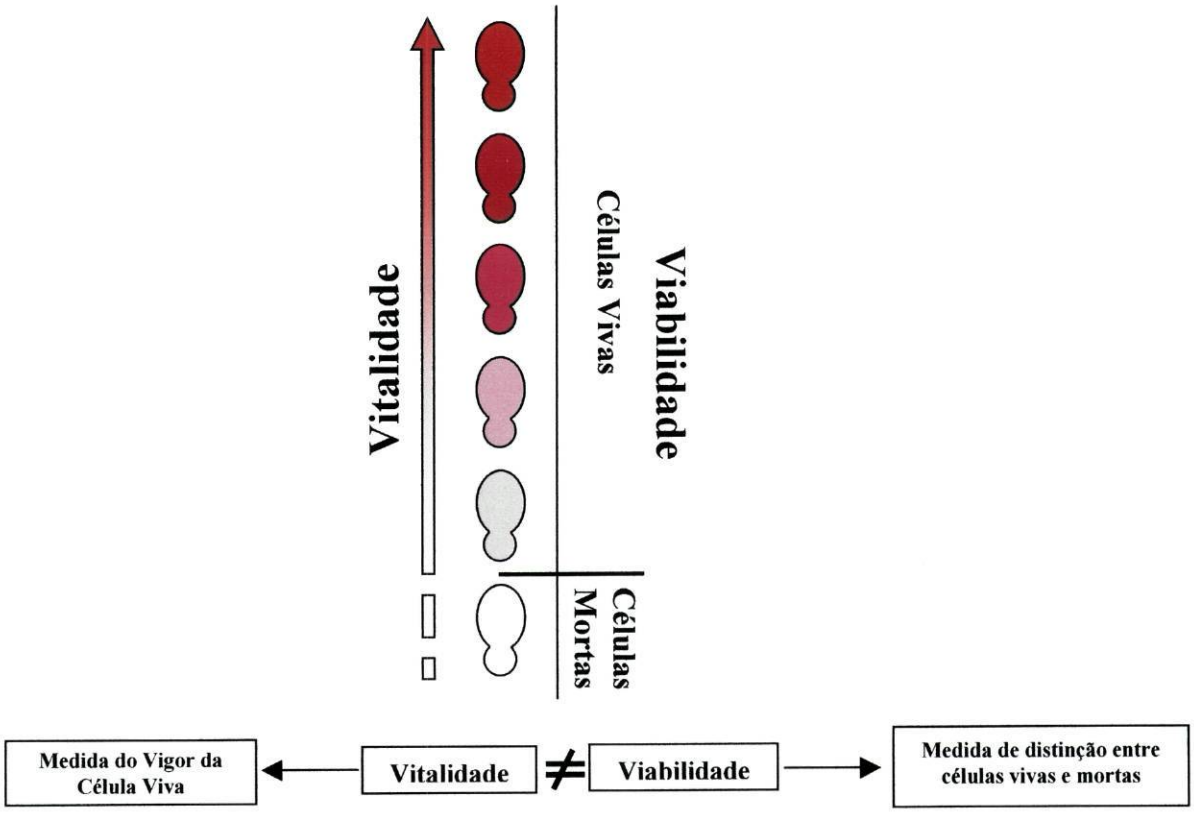


Figura III-5. Distinção entre os conceito de viabilidade e vitalidade. Ambos distinguem diferentes estados fisiológicos, embora em graus distintos.

Salienta-se ainda a importância da determinação da vitalidade da levedura para o desenvolvimento de novos processos de fermentação mais evoluídos do que os actuais tanques de fermentação em "batch", como nos novos processos baseados em reactores com levedura imobilizada. Nestes fermentadores de funcionamento em contínuo, o controlo do estado fisiológico torna-se ainda mais importante dado o uso intensivo que a levedura é sujeita [83, 100, 151]. Nestes casos o uso de métodos para a determinação da vitalidade podem ser aplicados com vários propósitos: na determinação do grau de uso do reactor e eficiência da levedura imobilizada; na definição de parâmetros de renovação da levedura ou reciclagem do reactor; ou ainda, na optimizações de processo, que o torne menos agressivo e cause o mínimo de decréscimo da vitalidade da levedura que se encontra imobilizada.

2.5. Métodos de determinação da viabilidade e vitalidade – o estado da arte

A vitalidade da levedura é uma complexa mistura de muitos aspectos que reflectem a condição fisiológica da cultura de sementeira, e é por isso considerada muito útil para prever a subsequente performance fermentativa [5]. Contudo, dada a complexidade associada às alterações fisiológicas que diminuem a vitalidade, existem diversos métodos para a sua determinação baseadas na medição de diferentes parâmetros. Por outro lado, a medição de viabilidade é muito mais simples, pois geralmente se limita detectar a existência de acção ou homeostase celular ou a sua ausência, não necessitando de reflectir o seu grau de actividade.

Como já foi referido anteriormente, tem havido avanços claros no controlo das fermentações, em especial no que toca à medição de parâmetros não fisiológicos da fermentação; no entanto, o controlo da qualidade fisiológica da levedura tem-se limitado à determinação de viabilidade, por não haver métodos de avaliação da vitalidade que satisfaçam os requisitos para serem utilizados em rotina, ou seja, métodos que sejam rigorosos, práticos, rápidos, baratos, que permitam definir uma escala expedita de vitalidade e limites de qualidade para rejeição e, por fim, que possam ser automatizáveis.

2.5.1. Métodos de determinação de viabilidade

Os métodos de avaliação da viabilidade baseiam-se na existência ou ausência de actividade celular. Nestes métodos essa actividade pode ser determinada com base em quatro princípios distintos: na replicação celular, na utilização dos denominados corantes de viabilidade ("viability stains"), na medição de produtos celulares ou resultantes da actividade metabólica, e ainda métodos baseados na avaliação do potencial da membrana celular [67].

Os métodos baseados na replicação celular reflectem a capacidade de um determinado número conhecido de células se poder reproduzir se forem viáveis (se estiverem vivas), permanecendo sem se dividir as que já estão mortas; estes métodos embora sejam aqueles que melhor e mais precisamente denotam o critério de viabilidade, são pouco práticos e muito morosos sendo na realidade muito pouco utilizados.

Os métodos baseados no uso de corantes de viabilidade não medem a capacidade de replicação, mas permitem indicar determinadas características celulares das quais se

destacam a integridade estrutural e funcional da membrana, e a actividade de determinadas enzimas intracelulares. De uma forma geral, o que se verifica é uma coloração diferencial entre as células vivas e as mortas, que respondem de forma diferente incorporando ou não o corante ou ainda transformando-o intracelularmente. Em todo o caso, é necessária a contabilização relativa das células coradas, usualmente por observação ao microscópio óptico ou de fluorescência, embora actualmente existam aparelhos de citometria em fluxo que permitem avaliar a intensidade luminosa em contínuo. A diferenciação entre as células vivas e mortas depende do corante utilizado. Por exemplo, há corantes que penetram o citoplasma e se acumulam em células vivas e outros que o fazem apenas em células mortas. Há ainda corantes que penetram na célula de levedura quer esteja viva ou morta, mas que na célula viva são transformados por acção enzimática convertendo-se em produtos ou incolores ou com uma determinada cor característica. Este grupo de métodos de determinação de viabilidade, baseado no uso de corantes, inclui a quase totalidade dos métodos utilizados pela indústria, remetendo os restantes métodos, quer de viabilidade quer de vitalidade, para aplicações específicas, usualmente efectuadas apenas com um carácter eventual. A coloração por azul de metileno (MB - corante de campo claro) e pelo ácido 1-anilino 8-nafltalenosulfónico (ANSA - corante fluorescente) são actualmente os dois únicos métodos recomendados por associações cervejeiras para a determinação do estado fisiológico de levedura [62, 2, 84] e, por isso, constituem as referências para a indústria.

Os métodos que envolvem a medição de compostos metabólicos celulares baseiam-se no facto de a produção destes compostos, depender tanto da existência de vida como da actividade relativa das células. Nesta categoria aqueles que encontraram aplicação prática são compostos celulares que sejam fontes de energia ou de poder redutor, por serem aqueles que existem em quantidades apreciáveis na célula e que existem sistematicamente, se existir metabolismo activo. Neste campo, a determinação do ATP (adenosina tri-fosfato) e do NADH (nicotinamida-dinucleótido sob a forma reduzida) são os únicos métodos que até à data têm tido aplicação na indústria cervejeira.

Por fim, os métodos que envolvem a avaliação do potencial da membrana celular baseiam-se em determinações de impedância de radio-frequência e de condutividade de suspensões de levedura, uma vez que as células mortas, não possuindo potencial de membrana, não reduzem a condutividade das suspensões como as células vivas. Na tabela III-2 são indicados alguns dos métodos utilizados para a medição de viabilidade.

Tabela III-2. Principais métodos utilizados para a medição da viabilidade de levedura.

Base do Método	Tipo de Detecção	Método	Interpretação	Referências
Replicação celular	Microscópio	Técnica de contagem em slide	Vivas– Cél. divididas Mortas– Cél. Isoladas	2; 37; 69; 155
	Visual/Lupa	Contagem de colónias em placa	Vivas– Formam colónias	1; 37; 67
	Microscopia de campo claro	Azul de metileno	Mortas – Cél. Azuis Vivas– Cél. incolores	1; 62; 37; 69; 137
		Violeta de metileno	Mortas – Cél. Azuis Vivas– Cél. Incolores	143
		Safranina O + Azul de metileno	Vivas- de cél. azul purpura Mortas – a cél. vermelhas	1; 143; 41
		Corante de Wolford	Vivas- Cél. Vermelhas Mortas – Cél. Incolores	35
	Microsocopia de fluorescência/ citometria de fluxo	Primulina	Vivas- Cél. incolores Mortas- Cél. Verdes/Amarelas	42
		ANSA/ MgANS	Vivas- Cél. Incolores Mortas- Cél. Verdes	2; 84; 74
		Azul de Anilina	Vivas- Membrana Fluorescente Mortas- Citoplasma Fluorescente	75
		Laranja de acridina	Vivas- Cél. Verdes Mortas- Cél. Vermelhas	46; 138; 148; 134; 114
		Roxo de Bromocresol	Vivas- Cél. Incolores Mortas- Cél. Amarelas	77
		Fluoresceína Diacetato	Vivas- Cél. Verdes Mortas- Cél. Incolores	22; 28
Medição de metabolitos	Fotométrica	ATP	Vivas- Com ATP Mortas- Sem ATP	27; 55; 86
		NADH	Vivas- Sem NADH Mortas- Com NADH	81; 67; 78; 68
Outros Métodos	Electroquímicos	Impedância-RF/ Condutividade	Vivas- Diminuem condutividade	19; 20; 25

2.5.2. Métodos de determinação de vitalidade

Os métodos de determinação de vitalidade, ao contrário dos anteriores, reflectem a alteração progressiva do estado fisiológico de uma população de levedura. Seja qual for o método, o que interessa aos cervejeiros é que ele tenha uma boa correlação com o desempenho fermentativo, dado que este é na realidade o padrão que se pretende aferir. Os métodos actualmente existentes de medições de vitalidade baseiam-se em diferentes princípios reflectindo, portanto, diferentes factores de actividade celular. Há métodos baseados na actividade metabólica, no uso de corantes de vitalidade, na medição de componentes celulares, no fluxo glicolítico, no desempenho fermentativo, entre outros [47]. Na tabela III-3 são indicados os principais métodos de determinação de vitalidade de levedura existentes na literatura, bem como os respectivos fundamentos.

Tabela III-3. Principais métodos utilizados para a medição da vitalidade de levedura.

Método	Fundamento	Interpretação	Referências
Teste de fermentação	Avaliação da performance fermentativa	Quanto maior a vitalidade da levedura semeada mais rápida é a fermentação.	31; 71; 64; 80; 120
Corantes de vitalidade (fluorescência e fotometria)	Coloração diferenciada consoante a vitalidade das células - Medição de uma porção de levedura	Variações da Intensidade e/ou do espectro consoante a vitalidade da população de leveduras	35; 47; 141; 40; 35; 52
Citometria de fluxo (corantes de vitalidade)	Coloração diferenciada consoante a vitalidade das células – Possibilidade de medição de leveduras uma a uma		149; 58; 30; 35; 50; 51; 54; 4; 14; 32; 10; 97; 154
Microcalorimetria	Medição da produção de energia celular	Quanto maior a vitalidade maior a produção de calor	101; 115; 116
Redução de VDK's	A incorporação e redução intracelular de diacetilo de uma solução padrão é tanto maior quanto maior a actividade enzimática.	Quanto maior a vitalidade mais rápida a redução de dicetonas vicinais	13
Actividade de proteases	Uma levedura em que a membrana celular esteja em mau estado permite a libertação de proteases, que degradam uma proteína padrão colocada no meio	Quanto maior a vitalidade menor a taxa de degradação de uma proteína padrão adicionada ao meio.	89; 93; 129; 92
Teste de libertação de Magnésio	Uma levedura com membrana celular em mau estado liberta uma quantidade superior de magnésio para o meio	Quanto maior a vitalidade maior a taxa de libertação de ião magnésio	88; 89; 91; 87;
QO_2 (Oxygen Uptake rate)	Quando presente no meio, as leveduras incorporam o oxigénio a uma velocidade tanto maior quanto mais activo o seu metabolismo aeróbico	Quanto maior a vitalidade maior a taxa de consumo de oxigénio	31; 70; 113; 152
Acidification Power Test (AP)	Mede a actividade da ATP_{ase} celular, por diminuição do pH devido à extrusão de iões H^+ quando adicionada glucose a uma suspensão com levedura	Quanto maior a vitalidade maior a queda de pH após a adição de glucose	38; 30; 71
Cumulative acidification power (CAP)	Mede a actividade de ATP_{ase}, por quantificação do consumo de HO^- adicionado para manter um pH de 7 durante um determinado período de tempo.	Quanto maior a vitalidade maior a quantidade de OH- adicionado para manter o pH	63; 111; 112
Intracellular pH (ICP)	Determina-se o pH intracelular por via de um corante, medindo a capacidade das células se auto regularem após terem sido colocadas em condições de pH adversas.	Quanto maior a vitalidade maior é o valor do pH intracelular	58; 57; 59; 60; 14
ATP	Uma célula metabolicamente mais activa produz mais ATP	Quanto maior a vitalidade maior é a quantidade de ATP	31; 78; 80; 27; 77; 15; 34
Adenylate energy charge (AEC)	A AEC reflecte a razão entre a quantidade de ATP/ ADP produzido na célula, existindo maior carga energética celular se a célula estiver mais activa.	Quanto maior a vitalidade maior é a AEC	31; 67; 78; 56; 21
NADH	A quantidade de NADH reflecte a actividade celular	Quanto maior a vitalidade maior é a quantidade de NADH	78; 98; 147
Nível de glicogénio	O glicogénio é uma fonte de reserva energética	Quanto maior a vitalidade maior a quantidade de glicogénio	90; 122; 123; 104; 8; 18; 11; 110; 53
Nível de trealose	A trealose é uma fonte de reserva energética e um protector contra o "stress"	Quanto maior a vitalidade maior a quantidade de trealose	110; 11; 104; 95; 43; 105

Tabela III-3. Principais métodos utilizados para a medição da vitalidade de levedura (continuação).

Método	Fundamento	Interpretação	Referências
Nível de ergosterol e ácidos gordos insaturados	O nível de ácidos gordos insaturados e de ergosterol é indicador do estado em que se encontra a membrana celular	Quanto maior a vitalidade maior a quantidade de ergosterol e de ácidos gordos insaturados	11; 47; 124; 105
Taxas de fluxo glicolítico	Medição da actividade da via de glicólise, que indica o grau de actividade celular	Quanto maior a vitalidade maior a taxa de fluxo glicolítico	47
Produção de CO_2	Quanto mais activo está o metabolismo da levedura maior é a produção de CO_2.	Quanto maior a vitalidade maior é a produção de CO_2.	31; 82
GAG (fermentation activity apparatus)	Mede o aumento de pressão de um sistema com levedura num determinado período de tempo, devido à libertação de CO_2, que é produto da actividade metabólica.	Quanto maior a vitalidade maior o aumento da pressão do manómetro	96
Testes de fermentação rápida	A levedura em boas condições efectuará a redução do extracto do mosto a um valor limite dentro de um determinado período de tempo.	Quanto maior a vitalidade menor a diferença entre o extracto atingido e o extracto limite.	80
"Stress" Test	Uma levedura em bom estado resistirá melhor quando colocada numa determinada situação de "stress" com etanol.	Quanto maior a vitalidade menor o numero de células mortas por unidade de tempo.	5
Taxa de Autólise	A levedura ao autolisar faz subir o pH do meio, para valores mais próximos do valor padrão de 6,5, valor superior ao pH da cerveja (4 - 4,5)	Quanto maior a vitalidade maior a diferença entre o pH da cerveja e o pH da massa de levedura recolhida	89; 34
"Vitaltitration"	Dá-nos uma medida da produção de CO_2, da extrusão de protões (H^+), que irão titular uma determinada quantidade de HO^- adicionado à suspensão de levedura, e ainda das reservas internas de energia.	Quanto maior a vitalidade de titulação do HO^- adicionado maior a vitalidade da levedura	131; 132; 133

Como se vê na tabela III-3, verifica-se que existem inúmeros métodos publicados para determinação da vitalidade de leveduras [47; 78; 12; 57]. Apesar disto, a maioria destes métodos têm apenas usos específicos, usualmente aplicados para optimização de processos não havendo, até à data, nenhum usado rotineiramente para controlo de qualidade da levedura na indústria cervejeira. Esta situação é tanto mais preocupante para os cervejeiros, quando se sabe que a determinação de viabilidade pelo azul de metileno, utilizada praticamente em todas as empresas, é um método que carece de rigor e fiabilidade para satisfazer os actuais critérios de qualidade [47; 102; 143].

3. DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO DE BIOMARCAÇÃO DE VITALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO DE LEVEDURA – "VITALTITRATION" (VT')

3.1. Bases do desenvolvimento do método

Na génese do novo método de determinação de vitalidade desenvolvido neste trabalho está a necessidade de se encontrar uma metodologia que possa ser acessível para uso em rotina na generalidade das empresas cervejeiras, independentemente da sua dimensão. Neste método conjuga-se a utilização da medição potenciométrica de pH, que é uma técnica instrumental disponível em qualquer laboratório, com a determinação da actividade metabólica da levedura.

Sabe-se que o principal produto do metabolismo celular é o CO_2, pelo que este é tanto mais produzido quanto mais activa é a célula, e portanto maior a sua vitalidade. Existe, assim, uma relação entre a quantidade de CO_2 produzida e a vitalidade da levedura, este princípio, aliás também rege outros métodos de determinação de vitalidade. A determinação de CO_2 é ainda o método mais utilizado para determinação de actividade metabólica (taxa de respiração) em fisiologia quer animal, vegetal e mesmo em seres humanos.

Um outro fenómeno que também é contemplado no presente método é a extrusão de protões pelas células, que se sabe também ser um factor dependente do estado fisiológico da levedura, servindo também este principio como base de outros métodos de determinação de vitalidade de levedura como o "acidification power test" (ver tabela III-3).

A detecção potenciométrica do CO_2 produzido e do H^+ extrudido, baseia-se no facto de estas espécies reagirem rapidamente com OH^- em meio alcalino. A titulação por retorno de soluções de hidróxido é, aliás, um método muito utilizado para determinação do CO_2 em métodos de quantificação das, já referidas, taxas de respiração em fisiologia. Nestes métodos força-se a passagem do ar com o CO_2 produzido pelos animais, por uma "trap" contendo uma solução de hidróxido que o recolhe, reduzindo proporcionalmente a

quantidade de CO_2 a titular. No presente método procurou-se simplificar os procedimentos, alcalinizando o meio directamente na presença de levedura dado que desta forma se poderia utilizar também a capacidade de extrusão de H^+ das células para determinação da vitalidade. As leveduras com maior vitalidade reduzem mais rapidamente o pH pois produzem mais CO_2 e H^+ por unidade de tempo. Como se pode verificar, um método com estas características requer apenas instrumentação e reagentes simples e acessíveis.

O método, embora simples no seu principio, necessitou, como é lógico, de algumas optimizações. Por exemplo, a definição do pH inicial igual a 10 e o estudo do perfil de queda do pH até este atingir o valor 6,5. Estes valores foram definidos como o melhor compromisso entre a duração, sensibilidade e reprodutibilidade da determinação. As leveduras utilizadas nas optimizações foram recolhidas da secção industrial e utilizadas para determinações no próprio dia.

3.2. Lavagem da levedura

No passo de preparação da amostra para a análise de vitalidade, a generalidade dos métodos actualmente existentes tem um procedimento de lavagem da massa de levedura que é recolhida. De facto, a levedura quando é recolhida no fundo das cilindrocónicas de fermentação apresenta-se suja com restos de material não solúvel que assentam no fundo da cuba durante este processo. Este material proveniente do mosto, chamado "trubb", é uma massa sólida não solúvel constituída por proteínas precipitadas (coaguladas), lípidos, dextrinas, fibras e outros carbohidratos não solúveis, entre muitos outros compostos. Devido precisamente à complexidade e à quantidade apreciável em que a "trubb" pode aparecer é necessário eliminá-la, pois na generalidade interfere com as determinações de vitalidade.

A lavagem da levedura é, portanto, uma forma de eliminar a "trubb" e, para além desta, dos restos de células autolisadas que também se acumulam ao longo do tempo. Para o passo de lavagem da massa de levedura recolhida ("slurry") foi utilizado o procedimento padrão usualmente utilizado pela maioria dos restantes métodos e que consiste suspensão da levedura em agua a 4°C, seguida de sucessivas centrifugações e re-suspensão, mantida sempre à temperatura de 4°C. Após a quarta centrifugação, a levedura apresenta-se livre da "trubb" podendo então ser pesada para a determinação da

vitalidade. Na figura III-6 está representado o perfil de queda de pH para duas massas distintas de levedura com e sem lavagem. Verifica-se claramente que existe interferência, dada a presença de uma série de compostos com capacidade tampão e que, uma vez colocado o meio a pH de 10 constituem uma reserva básica ao longo da descida de pH, modificando a velocidade a que se dá esta queda. A não lavagem da levedura acrescenta, portanto, uma maior morosidade à esta fase de detecção, para além de diminuir substancialmente a reprodutibilidade do método.

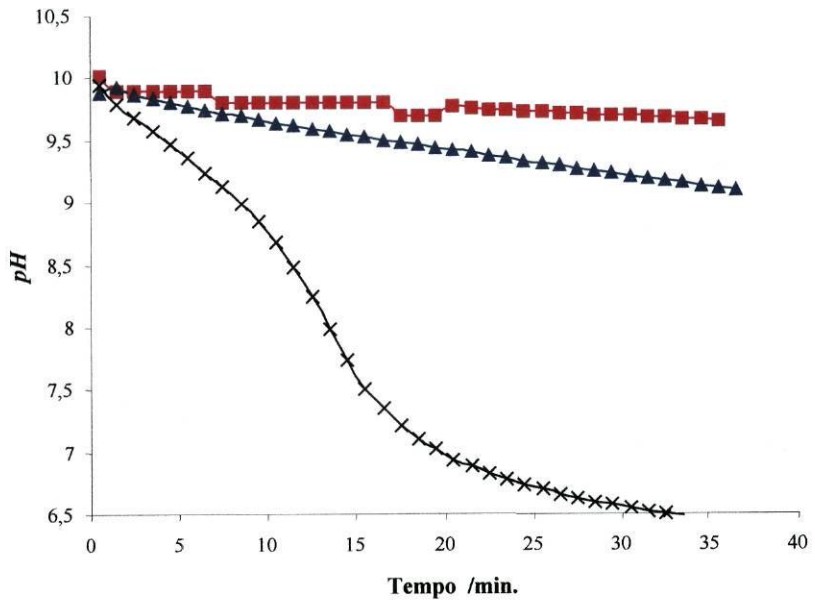


Figura III-6. Variação do perfil de queda de pH em função da quantidade de levedura não lavada e para uma levedura lavada. ■ - 2,50g de levedura não lavada, ▲ - 5,00g de levedura não lavada, ×- 2,50g de levedura lavada.

3.3. Quantidade de levedura

Como é natural, a quantidade de levedura utilizada na determinação é um factor que afecta a análise, pelo que foi necessário optimizar a quantidade de levedura a utilizar no teste de queda de pH. Para o efeito foi mantido constante e igual a 250mL o volume de solução no qual se dissolveu a levedura e variou-se a massa de levedura adicionada. O controlo da quantidade de levedura por volume foi à partida eliminado, uma vez que a levedura ao longo da sua idade vai aumentando o seu volume celular, tendo-se geralmente um maior volume para uma população de células mais velha do que para uma mais nova, factor este que não é facilmente controlável, e que poderia causar alterações à medição.

Como já se tinha observado para levedura não lavada, o perfil da queda de pH depende muito da quantidade, mesmo no caso da levedura lavada, como se pode observar na figura III-7A. Na figura III-7B está representada a variação do tempo de queda do pH de 10 para 6,5 em função da quantidade de levedura.

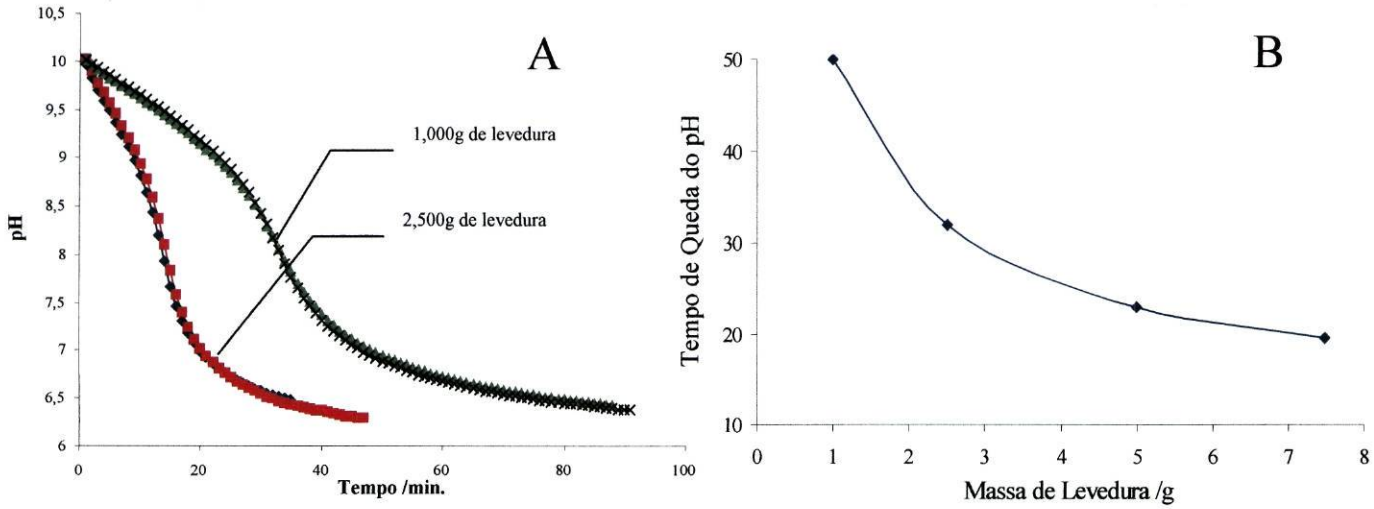


Figura III-7. Efeito da quantidade de levedura adicionada no perfil queda do pH. A: Perfis de queda de pH, em duplicado, para diferentes quantidades de levedura, respectivamente 2,500g e 1,000g; B: Efeito da quantidade de levedura no tempo de queda do pH de 10 para 6,5.

Como se observa na figura III-7B, existe uma zona entre os 2-4g de levedura em que a queda não é nem demasiado rápida nem demasiado lenta. Para uma quantidade de levedura maior as diferenças entre leveduras esbatem-se pois as quedas de pH são muito rápidas. Pelo contrário, para massas demasiado pequenas de levedura, as diferenças aumentam mas a realização do teste pode tornar-se excessivamente morosa. Neste último caso, quando se usam quantidades demasiado baixas, como por exemplo abaixo dos 1-1,5g verifica-se inclusive que, para determinados casos, a levedura é mesmo incapaz de colocar o pH do meio abaixo dos 6,5, provavelmente devido ao facto de não possuir reservas internas de energia para sustentar o metabolismo suficientemente activo por tempo suficiente, entrando em "stress" prematuramente.

A quantidade de levedura optimizada para a realização do teste de vitalidade desenvolvido foi de 2,500g, por ser aquela que apresenta o melhor compromisso entre sensibilidade e duração da determinação.

3.4. Efeito da temperatura e da agitação

A actividade metabólica celular das leveduras depende da temperatura do meio, aumentando em função da temperatura até esta atingir o valor ideal, geralmente de 28ºC para as leveduras "lager", a partir da qual volta a diminuir.

Como a produção de CO_2 e a extrusão de H^+, dependem desta actividade metabólica celular, é preciso garantir que a temperatura se mantenha o mais constante possível durante a realização do teste. Por esta razão o vaso onde se efectua a metodologia "vitaltitration" é um vaso isotérmico isolado com poliestireno, que permite manter a temperatura durante o teste. Adoptou-se uma temperatura da solução em que se suspende a levedura de 27ºC, por ser próximo da temperatura ideal das leveduras "lager" e porque estas soluções poderiam ser facilmente pré-acondicionadas e armazenadas nas estufas de microbiologia de temperatura constante a 27ºC, existentes em todas as fabricas de cerveja.

O teste de queda de pH, é feito com agitação uniforme de modo a permitir uma dispersão e suspensão uniformes antes da adição do hidróxido e durante o teste. Se não houvesse uma agitação permanente, a levedura voltaria a flocular e sedimentar inviabilizando a análise; no entanto, é preciso cuidado para que a agitação não se torne turbulenta formando um fuso de ar. A velocidade de agitação optimizada foi de 1500rpm, utilizando um agitador magnético e uma barra de 15mm.

3.5. Meio de análise

Quanto à composição da solução, verificou-se que o uso de uma solução isotónica de 0,9% de NaCl era preferível ao uso de água simples pois reduzia o número de células plasmolizadas devido ao choque osmótico que sofrem quando colocadas na água. Verificou-se ainda uma maior reprodutibilidade das análises em meio isotónico, que se poderá explicar por redução de factores de variabilidade devidos ao "stress" osmótico não controlável.

Ainda relativamente ao meio de análise resolveu-se não o complementar com fontes de energia para as células pois, desta forma, procura-se que este método também reflicta a existência de reservas internas de energia nas células das leveduras. Este aspecto permite dar ao teste um carácter adicional de selectividade do grau de vitalidade, uma vez que o estado fisiológico é tanto melhor quanto maiores estas reservas internas de

energia; de facto, nas primeiras horas depois da sementeira da levedura (fase "lag") a única fonte de energia são precisamente os hidratos de carbono intracelulares, em especial o glicogénio e a trealose. É, aliás, por esta razão que a determinação da quantidade de glicogénio e de trealose existente em leveduras podem ser utilizadas para avaliar a vitalidade.

3.6. pH limite

Um dos princípios do teste consiste em elevar o pH da levedura lavada e suspendida em NaCl 0,9% a pH alcalino, de modo que o CO_2, comportando-se como um ácido, reaja com o HO^-. O pH ao qual a suspensão da levedura é colocada antes de se iniciar a cronometragem do tempo de queda do pH até 6,5 foi sujeito a optimização. Neste estudo foram testados quatro valores de pH inicial: 9,5, 10, 11 e 12. Na figura III-8 são apresentados os perfis de queda de pH obtidos para uma mesma levedura, colocada nos diferentes valores iniciais de pH. O tempo de queda do pH varia com o pH inicial, aumentado, naturalmente, à medida que este é mais elevado.

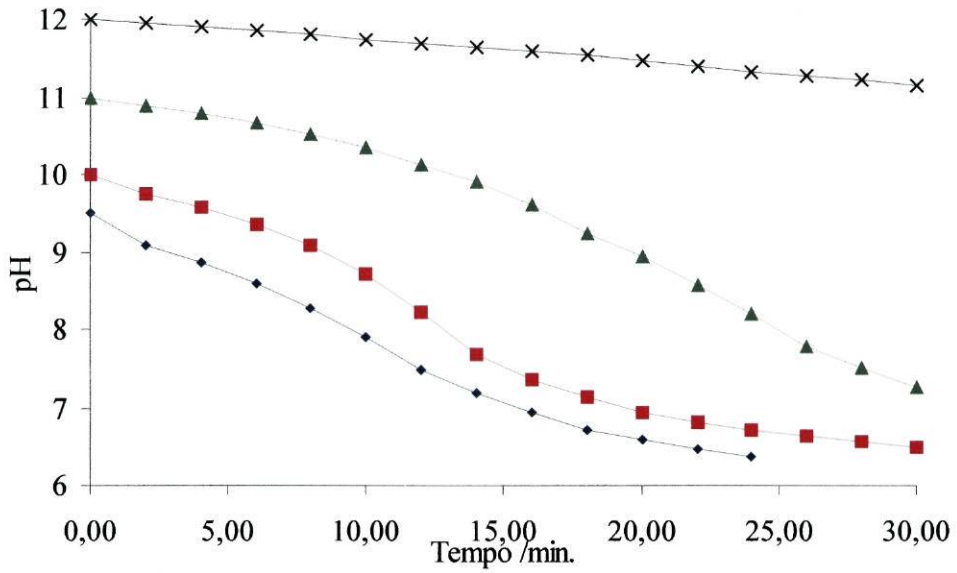


Figura III-8. Efeito do pH de inicial no perfil de queda de pH para uma mesma levedura e utilizando uma quantidade de 2,50g.

No caso do pH inicial ser 9,5 existe uma dificuldade adicional na adição da base devido ao facto de a queda de pH já ser muito rápida neste ponto. Relativamente aos valores de

pH de 11 e de 12, o tempo de análise prolonga-se em demasia, tornando o método moroso. O valor inicial de pH de 10 é aquele que se apresenta como o melhor compromisso, tendo sido o valor adoptado. Em termos de estabilidade, é conhecida a resistência das levedura a períodos curtos de exposição a pH elevados como, por exemplo, durante processos industriais de lavagem da parede celular. No decurso da realização dos teste estudou-se a queda de viabilidade da população de levedura pelo método do azul de metileno, tendo-se verificado que apenas as leveduras colocadas a pH de 12 sofriam uma queda significativa de viabilidade e não se observando diferenças nas leveduras colocadas a pH de 10.

3.7. Valor da vitalidade (VT') no método de "vitaltitration"

O cálculo do valor indicativo de vitalidade utilizando o método desenvolvido, denominado "vitaltitration", baseia-se em dois parâmetros: a quantidade de hidróxido adicionado para elevar a suspensão de levedura a pH 10 e o tempo que demora o pH a cair de 10,000 até 6,500. De uma forma geral, e se a levedura for bem lavada, a quantidade de HO^- adicionado é praticamente similar para uma determinada estirpe de levedura, o que torna o tempo de queda do pH o verdadeiro denominador do grau de vitalidade.

Embora vários tratamentos tenham sido estudados para definir a vitalidade recorrendo a este método, a expressão utilizando o número de moles de HO^- tituladas por unidade de tempo (VT'), foi considerada a mais adequada. Na fórmula apresentada na figura III-9, o número de moles de hidróxido adicionadas surge fundamentalmente como um factor uniformizador da medida que nos permite ter o valor de vitalidade expresso como VT' numa escala ascendente, e por isso mais facilmente perceptível pelo utilizador. Esta forma de cálculo sendo simples e dependendo apenas do tempo e da quantidade de hidróxido permite simplificar ainda mais a análise evitando a necessidade de controlo e de anotação de valores intercalares.

$$VT' = \frac{\text{Conc. NaOH x Vol. NaOH x } 10^6}{\text{Tempo de queda do pH}}$$

Figura III-9. Fórmula de cálculo do valor de vitalidade VT', determinado pelo método de "vitaltitration".

4. DETERMINAÇÃO DA VITALIDADE DA LEVEDURA POR "VITALTITRATION"

4.1. Princípios do método

A vitalidade da levedura pode ser estimada pela sua actividade metabólica. Quanto mais activa a levedura, melhor o seu estado fisiológico. A queda de pH pelo método "vitaltitration" é uma consequência da produção de CO_2 e da extrusão de iões H^+, reflexos da actividade metabólica celular mantida pelas reservas de energia intracelulares e que está relacionada com a vitalidade da levedura. O teste pode desta forma reflectir, ainda que de uma forma indirecta, o nível dessas reservas na célula.

4.2. Âmbito e campo de aplicação

A qualidade da levedura é um dos factores chave que afectam a consistência da qualidade e as características organolépticas da cerveja [36; 43 ;118]. Para ultrapassar as limitações das determinações de viabilidade como as existentes no método do azul de metileno, a vitalidade é introduzida como uma forma mais apropriada para definir a condição fisiológica da levedura. As determinações de vitalidade têm, no entanto, encontrado uma aplicação restrita, justificada pelas técnicas e equipamentos bastante exigentes que usualmente são necessários. Como forma de ultrapassar estas dificuldades foi desenvolvido um novo método mais simples para a avaliação da vitalidade, denominado "vitaltitration", aplicável a qualquer levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae*.

O método "vitaltitration" pode ser utilizado em quaisquer aplicações em que é necessário o controlo do estado fisiológico da levedura, quer de laboratório ou proveniente do processo industrial, como por exemplo, em análise de rotina da levedura de sementeira, no controlo e desenvolvimento de procedimentos de gestão e manuseamento de levedura, na avaliação do impacto de processos ou da composição do mosto na qualidade da levedura.

4.3. Descrição sumária

Neste método a levedura, após ser recolhida dos fermentadores ou dos tanques de fermentação, sofre um processo de lavagem de forma a eliminar toda a "trubb" e restos de células autolisadas que se encontram misturados.

A levedura lavada é suspensa numa solução salina isotónica e o pH do meio elevado a 10,00 com uma solução padrão de hidróxido de sódio. A levedura reage às condições impostas fazendo descer o pH do meio em que se encontra. O tempo necessário para que o pH do meio baixe até ao valor 6,50 é então registado. A determinação da vitalidade é posteriormente calculada a partir do número de moles de hidróxido de sódio adicionadas e do tempo da queda de pH. A vitalidade da levedura é tanto maior quanto maior for o valor VT' determinado, o que corresponde à quantidade de hidróxido de sódio (μmoles) consumida por minuto.

4.4. Instrumentação e material

Para o desenvolvimento deste trabalho a instrumentação necessária é básica e pode ser encontrada em qualquer laboratório de controlo de qualidade. O uso de um medidor de pH com aquisição automática de dados por PC permitiu a automatização da fase de titulação, facilitando ainda mais a execução da análise. O equipamento e material utilizado encontram-se descritos na tabela III-4.

Tabela III-4. Equipamento e material utilizados para o desenvolvimento e aplicação dos estudos envolvendo o método "vitaltitration" para determinação de vitalidade de levedura

Vortex	Breda Scientific, 34525-200
Centrifuga Refrigerada	Heraus Sepatech Megafugge 1.0r, ajustada a 3500 r.p.m. e 4°C
Balança Analítica	Mettler-Toledo AG 204
Potenciómetro (com sonda de temperatura)	Hanna pH 213, Applikon, ADI 1030
Eléctrodo de pH	Hanna HI 1131, Applikon pH probe
Software de Aquisição Automática de Dados[1]	Hanna HI9200, BioXpert versão 1.11.057
Cronómetro[2]	-
Tubos de Centrifugação	Nalgene, 50 mL "universals"
Vaso Isotérmico	Nalgene, fraco plástico de 250mL isolado com poliestireno
Agitador Magnético	Heindolph, ajustado a 1500 r.p.m.
Barra Magnética	Nalgene, 15 mm
Bureta Digital	Brand, Bürette Digital 50mL
Microscópio de Campo Claro	Nikon, Eclipse E600
Microscópios de Campo Claro/Fluorescência	Nikon, Labophot Fluorescence Microscope; Leitz, Labovert
Vaso da Armazenamento	Applikon, fermentador de 2L camisa de termostatização.
Contador de Células	Coulter Counter, Model ZM
Analisador de Cerveja	SCABA Analyzer
Medidor digital de densidades	Kyoto Electronics DA 300
Tubos de Fermentação	2L EBC tall tubes

[1] Aquisição automática de pH em função do tempo; [2] na ausência de aquisição automática de pH

4.5. Reagentes

O conjunto de reagentes necessários também é muito simples, conforme se pode verificar na tabela III-5.

Tabela III-5. Soluções e reagentes utilizados no método "vitaltitration"

Água Ultra-pura (condutividade inferior a 0,1μS.cm^{-1})	Pré-acondicionada 4ºC e a 27ºC
Solução de Cloreto de Sódio	NaCl, 4,5%, pré-condicionada a 27ºC
Solução de Hidróxido de Sódio	NaHO 0,3M.

4.6. Procedimento

O procedimento de execução da análise está dividido em duas fases. A primeira é a lavagem da levedura, que é um procedimento comum à quase totalidade dos métodos de determinação de vitalidade existentes. A segunda é a execução da determinação da vitalidade da levedura pelo método "vitaltitration" que foi desenvolvido.

A – Lavagem da levedura

1- Recolher a levedura, para frascos "Schott" de 2L esterilizados, garantindo previamente o máximo de homogeneidade possível dentro dos tanques de armazenamento.
2- Pesar cerca de 6-8g de levedura para tubos universais de centrifugação de 50mL.
3- Adicionar água ultra-pura a 4ºC até à marca de 45mL, e de seguida agitar num Vortex até obter uma suspensão uniforme da levedura.
4- Centrifugar 7 minutos a 3500 rpm, numa centrifuga refrigerada a 4ºC.
5- Desprezar o sobrenadante e manter a levedura compactada no fundo (deverá existir neste momento 4-5mL de levedura no fundo)
6- Repetir os passos 3 a 5 mais três vezes (num total de 4 ciclos completos de lavagem).

B- Determinação da vitalidade da levedura utilizando o método "vitaltitration".

1- Pesar 2,500 ±0,01g de levedura para um vaso isotérmico de 250 mL.
2- Adicionar 50 mL da solução de NaCl 4,5%, mantida a 27ºC.
3- Adicionar 200 mL de água ultra-pura mantida a 27ºC.

4- Agitar a suspensão a 1500 rpm, durante 4 min.

5- Adicionar NaHO 0,300M, até o pH de 10,03 com um intervalo de ±0.02, e registar o volume gasto.

6- Quando o pH atingir o valor de 10,00, iniciar o registo do tempo ou da aquisição automática de dados.

7- Registar o tempo que o pH demorou a atingir o valor de 6,50[3].

4.7. Expressão dos resultados

Sabendo o volume de NaHO padrão necessário para alcalinizar a suspensão de levedura, e o tempo que a levedura demora a baixar o pH de 10,000 até 6,500, é possível calcular o valor de vitalidade VT', que corresponde ao número de μmoles de NaHO adicionado que é titulado por minuto:

$$VT' = \frac{\text{Conc. NaOH (mol.L}^{-1}\text{) x Vol NaOH (L) x } 10^6}{\text{Tempo de queda do pH (min.)}}$$

4.8. Características do método VT'

O que caracteriza este método é velocidade da queda do pH, que depende do estado fisiológico da levedura. Dois perfis típicos de variação de pH podem ser observados na figura III-10, e que correspondem à análise de vitalidade de duas leveduras (I e II) em estados fisiológicos reconhecidamente distintos.

A levedura retirada na fase exponencial de crescimento é uma levedura que metabolicamente está muito activa dando origem a uma queda de pH muito rápida, figura (III-10D e III-10D'), confirmando a elevada vitalidade da levedura nesta fase. A levedura recolhida das cilindrocónicas (III-10a, III-10E e III-10E') já se encontra em fase estacionária, mais ou menos activa consoante a sua vitalidade, a qual baixa durante o armazenamento que usualmente é sujeita posteriormente, como se observa na figura III-10b. Por fim, uma levedura sujeita a um tratamento térmico que a mata, tendo por

[3] O vaso isotérmico ou termostático deve manter a temperatura durante o teste em 27±1°C.

isso uma vitalidade praticamente nula, dá origem a um perfil sem queda de pH com o tempo, como o da figura III-10c.

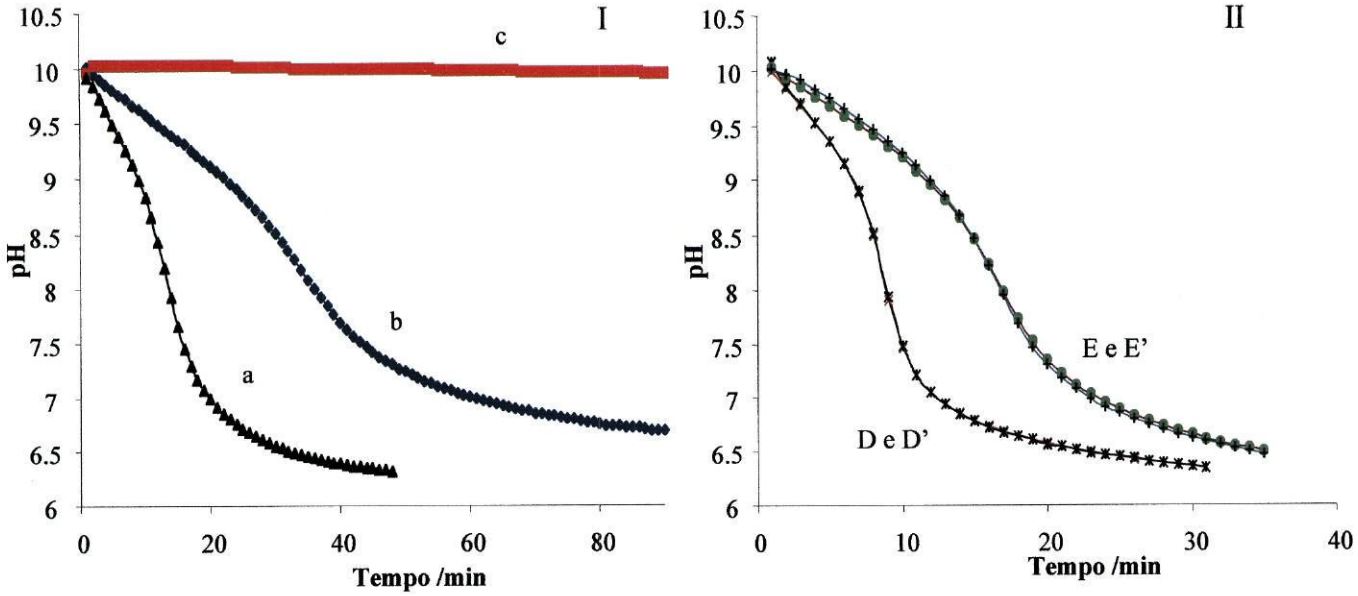


Figura III-10. Exemplos de diferentes perfis de queda de pH obtidos com o método "vitaltitration". I – Levedura 1; a) levedura recém recolhida, b) levedura "envelhecida" (armazenada dois dias à temperatura ambiente), c) levedura "morta"[3] (20 min. a 60ºC). II – Levedura 2; D/D') levedura em fase exponencial de fermentação (replicados), E/E') levedura recém recolhida (replicados).

Os erros relativos obtidos em estudos de repetibilidade do método situam-se entre o 1 e os 4%.

Relativamente aos valores de referência de VT', a tabela III-6 contém os resultados das observações coligidas dos dados referentes a leveduras utilizadas em fermentações industriais.

Tabela III-6. Referência de vitalidade com escala de VT'

VT'	Vitalidade	Observações
0-3	Vitalidade má	A levedura causa dificuldades frequentes na fermentação.
3-5	Vitalidade regular	A levedura causa problemas esporádicos na fermentação.
5-8	Vitalidade boa	Dificuldades na fermentação só raramente poderão ser causadas pela levedura.
8-10	Vitalidade muito boa	A levedura afecta positivamente a fermentação. Muito baixa probabilidade de a levedura causar problemas de fermentação.
>10	Vitalidade excelente	A levedura afecta positivamente a fermentação. Problemas na fermentação devem-se a outras razões que não a levedura.

[3] Com um valor de viabilidade inferior a 5%, determinado por azul de metileno

5. VALIDAÇÃO LABORATORIAL DO MÉTODO "VITALTITRATION"

Ao contrário dos métodos de viabilidade em que existe uma característica diferenciadora quantificável de forma absoluta, nas medições de vitalidade não existem padrões de referência, sendo apenas possível verificar o estado fisiológico da levedura semeada depois de esta ter efectuado a fermentação. Por este motivo, foi necessário efectuar um estudo de biomarcação que permite verificar a validade destes biomarcadores (e do método de os determinar), como um processo de avaliação da vitalidade da levedura. Neste estudo de biomarcação, para se obter uma mesma levedura em diferentes e progressivos estados de vitalidade que se pudessem analisar, procedeu-se a um teste de "stress" nutricional, mais conhecido como teste de envelhecimento. Este tipo de teste constitui um procedimento de referência para validação de métodos de vitalidade tendo, por isso, sido utilizado para avaliar virtualmente todos os métodos até à data propostos. Em suma, ao longo do tempo deste ensaio a levedura vai diminuindo a sua vitalidade pois fica sujeita a "stress" ambiental e carência nutricional que lhe leva ao esgotamento das suas reservas internas de energia. Este esgotamento resulta do facto de a levedura não parar completamente o seu metabolismo, o qual pode ser reduzido com a diminuição da temperatura, pelo que esta permanece activa gastando os seus recursos intracelulares. Neste estudo efectuado para validação do método "vitaltitration", utiliza-se duas temperaturas de armazenamento distintas, uma mais elevada que induz uma degradação mais rápida da levedura e uma outra mais baixa em que a vitalidade é mais preservada.

Independentemente da queda de vitalidade que se espera observar com o ensaio de envelhecimento, o segundo passo é a confrontação dos valores de vitalidade da levedura determinados com o desempenho de fermentação dessas leveduras após terem sido semeadas. Os valores da vitalidade deverão correlacionar-se com o desempenho nas fermentações, quer em laboratório, quer em ambiente industrial.

5.1. Parte experimental

5.1.1. Levedura

Neste trabalho foi utilizada uma levedura "lager" com o código NCYC 1324, recolhida assepticamente de um tanque de fermentação cilindrocónico da instalação piloto de

produção de cerveja da "Brewing Research International" (BRI). Esta levedura era de 1ª geração, o que quer dizer que tinha acabado de realizar a sua 1° fermentação em escala piloto. O armazenamento da levedura foi feito em frascos "Schott" de 1L, previamente esterilizados, e mantidos em câmaras climatizadas a 4°C e 12°C. A levedura para análise foi recolhida assepticamente destes frascos após terem sido agitados para homogeneização do conteúdo.

5.1.2. Fermentações

Os ensaios de fermentação foram feitos, em tubos de fermentação padrão, "EBC tall tubes", com 2L de capacidade, idênticos aos apresentados na figura III-11. Os tubos foram cheios com 1,5L de mosto "lager" 100% malte, com extracto primitivo de 15°P.
O mosto foi inoculado com uma taxa de sementeira de 15±1 milhões de células/mL (corrigida para a viabilidade). Todas as fermentações foram feitas em duplicado a 12°C. As contagens de levedura e a densidade (extracto) da cerveja foram monitorizadas diariamente, utilizando respectivamente a contagem ao microscópio com câmara de hemocitometria e um medidor digital de densidades. Todos os testes de vitalidade e viabilidade do ensaio de envelhecimento foram efectuados imediatamente antes de a levedura ser semeada nos tubos de fermentação. Todo o processo desde a preparação da levedura, do mosto e dos tubos, passando pelo enchimento e inoculação dos tubos até à recolha das amostras de cerveja para análise foi efectuado em condições assépticas.

Figura III-11. Tubos de fermentação de 2L do tipo "EBC tall-tubes", para colocação em sala climatizada.

5.1.3. Métodos utilizados para determinação da vitalidade

Para a determinação de vitalidade utilizaram-se dois métodos; o "vitaltitration" desenvolvido nesta tese, e que é aquele que se pretende validar e o "acidification power test" (AP), que foi realizado de acordo com o método proposto por Kara et al [71]. A escolha do AP como referência deve-se ao facto de ser até à data o método de determinação de vitalidade mais utilizado na indústria cervejeira. Todas as determinações de vitalidade foram feitas em triplicado.

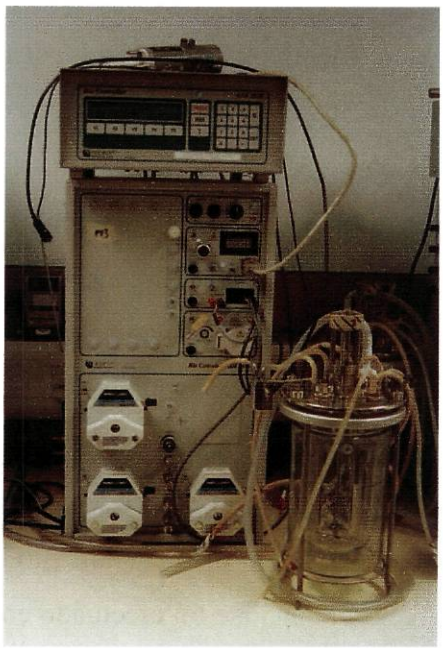


Figura III-12. Fermentador e respectivo módulo de controlo utilizado no BRI para o desenvolvimento do método "vitaltitration".

5.1.4. Métodos de determinação de viabilidade utilizados

Para a determinação da viabilidade da levedura ao longo do teste de envelhecimento, foram utilizados os dois métodos de referência actualmente existentes, o método do azul de metileno executado de acordo com o procedimento descrito pelo IOB Methods of Analysis [62], e o método com o corante fluorescente ácido 8-Anilino-1-naftalenosulfónico (ANSA/MgANS) executado de acordo com o procedimento descrito pelo ASBC [2] e por McCaig [84]. Todas as determinações de viabilidade foram feitas em triplicado.

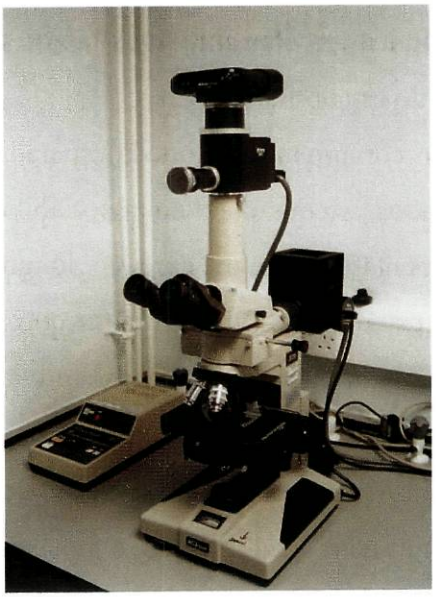


Figura III-13. Foto do microscópio óptico/fluorescência utilizado para as determinações de viabilidade.

5.2. Projecto do ensaio de "stress" nutricional - envelhecimento de levedura

Para validar um método de vitalidade é necessário ter levedura para ser analisada que esteja garantidamente em distintos e progressivos valores de vitalidade, o que neste caso não é fácil de garantir ou controlar, dado que apenas os ensaios de desempenho da fermentação nos podem garantir o estado fisiológico da levedura. É precisamente para ultrapassar esta incerteza que se utilizam os testes de biomarcação, em que existe uma forma de induzir uma alteração conhecida da vitalidade, como os ensaios de envelhecimento ou outro qualquer ensaio de "stress", durante o qual a levedura vai diminuindo a sua vitalidade. O grau com que esta degradação da vitalidade ocorre ao longo deste tempo de armazenamento (envelhecimento), depende não apenas do tipo e estado fisiológico da levedura antes do teste, mas também de outros factores externos que introduzem outros tipos de "stress" adicional como a temperatura ambiente, o teor de oxigénio ou a existência de xenobióticos. No caso em estudo foi projectado um ensaio de envelhecimento em que foram utilizadas duas temperatura de armazenamento, de 12ºC e de 4ºC respectivamente, sem que à levedura fosse adicionado qualquer nutriente. Durante o teste a vitalidade da levedura irá diminuir de forma constante e progressiva, sendo mais rápida no ensaio a 12ºC do que a 4ºC dado que a levedura não consegue abrandar tanto o seu metabolismo. Num ambiente de "stress" nutricional, um

metabolismo mais activo implica um consumo mais rápido das reservas internas e, por isso, uma maior diminuição do estado fisiológico.

Em todo o caso é necessário comprovar esta queda esperada de vitalidade da levedura tendo, por isso, sido efectuados estudos paralelos de viabilidade, de vitalidade e ainda testado o desempenho fermentativo da levedura ao longo do tempo deste teste de envelhecimento. Com estes estudos é possível garantir que a levedura de facto baixa a sua vitalidade ao longo do tempo, o que pode ser definitivamente comprovado com os ensaios de desempenho da fermentação que confirmam se alterações de vitalidade observada têm ou não repercussão em termos da produção de cerveja. Para tal diferentes alíquotas de levedura são retiradas ao longo do tempo e analisadas relativamente à vitalidade e à viabilidade, sendo simultaneamente semeadas em tubos de fermentação. Na figura III-14 é apresentado um esquema dos ensaios de envelhecimento realizados.

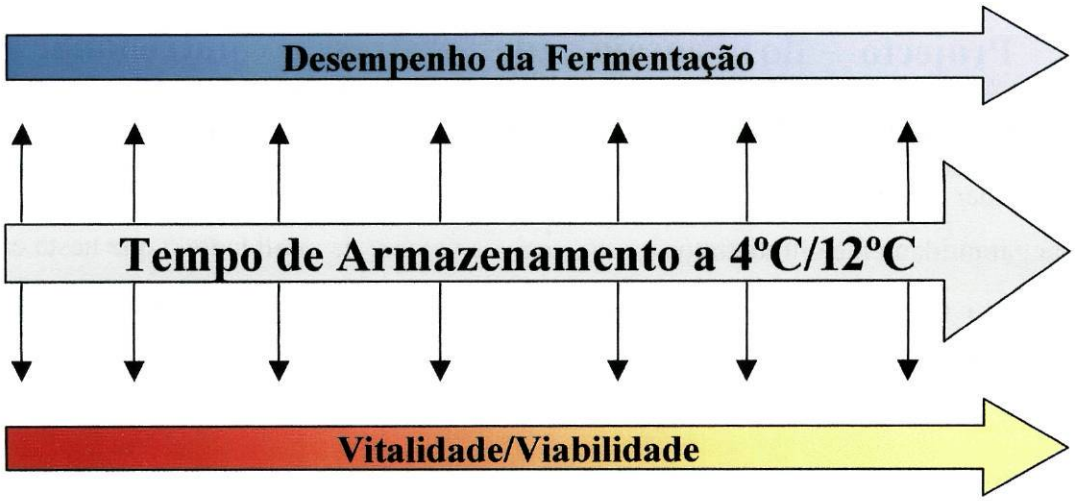


Figura III-14. Esquema dos ensaios de envelhecimento em laboratório de levedura, e utilizados para a validação do método "vitaltitration" desenvolvido.

A análise da vitalidade da levedura ao longo do tempo é feita obviamente pelo método "vitaltitration", que se pretende validar. O outro método, o AP, fornecerá o valor de vitalidade AP20, o qual se espera que baixe ao longo do tempo como consequência de uma diminuição da capacidade da levedura de extrudir iões H^+ para o meio devido à queda da sua vitalidade.

Como é de esperar que uma parte da população da levedura morra ao longo do tempo denotando uma degradação do estado fisiológico da levedura, a viabilidade deverá baixar no decurso do ensaio. Para a análise da viabilidade foram utilizados dois

métodos, pelo facto de a determinação por azul de metileno apresentar grandes limitações [47, 102, 143], muito embora seja para a grande maioria das empresas o único método utilizado e por isso a única referência de análise de qualidade de levedura que pode ser comparado com os seus procedimentos de rotina. Dadas as limitações do método do azul de metileno têm vindo a ser divulgados métodos alternativos, dos quais se destaca outro método por microscopia de fluorescência no qual se utiliza o corante MgANS/ANSA e que é também um método de referência para os cervejeiros; este método foi, por isso, também utilizado para seguir a viabilidade ao longo deste ensaio de envelhecimento para confirmação dos resultados obtidos pelo azul de metileno.

Por fim, os ensaios de desempenho na fermentação da levedura vêm demonstrar se a queda da vitalidade da levedura ao longo do tempo se observa em termos práticos. Para os cervejeiros este é o único teste importante pois permite verificar se as diferenças na vitalidade correspondem a diferenças na fermentação, possibilitando a construção de escalas de efeito da levedura na fermentação. Em geral, nestas escalas as leveduras são classificadas como boas, aceitáveis ou não aceitáveis. No ensaio de envelhecimento, regista-se o desempenho da fermentação em termos do tempo de fermentação que demora para a levedura reduzir o extracto do mosto, desde o seu extracto primitivo até um extracto de 5,12°P (massa específica, μ=1,020), o qual geralmente é considerado o valor de referência neste tipo de teste, ou então, até a um extracto de 2,58°P (μ de 1,010) que corresponde geralmente ao fim da fermentação, valor que contudo vulgarmente não é tão utilizado.

5.3. Validação laboratorial do método "vitaltitration" com um ensaio de armazenamento de levedura

O primeiro passo da validação foi verificar se o método "vitaltitration" desenvolvido, era sensível à queda da vitalidade de levedura ao longo do ensaio de armazenamento. Numa segunda fase foram comparados os valores de VT' com os resultados de viabilidade e vitalidade obtidos por outros métodos para este mesmo ensaio de envelhecimento. Por fim foi verificada a queda de vitalidade de levedura ao longo do tempo com ensaios de fermentação laboratorial, os quais permitem confirmar a esperada queda do desempenho da fermentação.

5.3.1. Variações da vitalidade VT' e AP20 ao longo do tempo

A vitalidade de uma mesma levedura foi monitorizada ao longo de armazenamento a 12ºC e a 4ºC, utilizando o método "vitaltitration" e o "acidification power test". Como se pode observar nas figuras III-15 e III-16, verifica-se, tal como era esperado, uma queda da vitalidade ao longo do tempo de armazenamento utilizando ambos os métodos. Na figura III-15 é apresentada a variação da vitalidade determinada pelo método "vitaltitration" ao longo do tempo para levedura armazenada a 4ºC e a 12ºC.

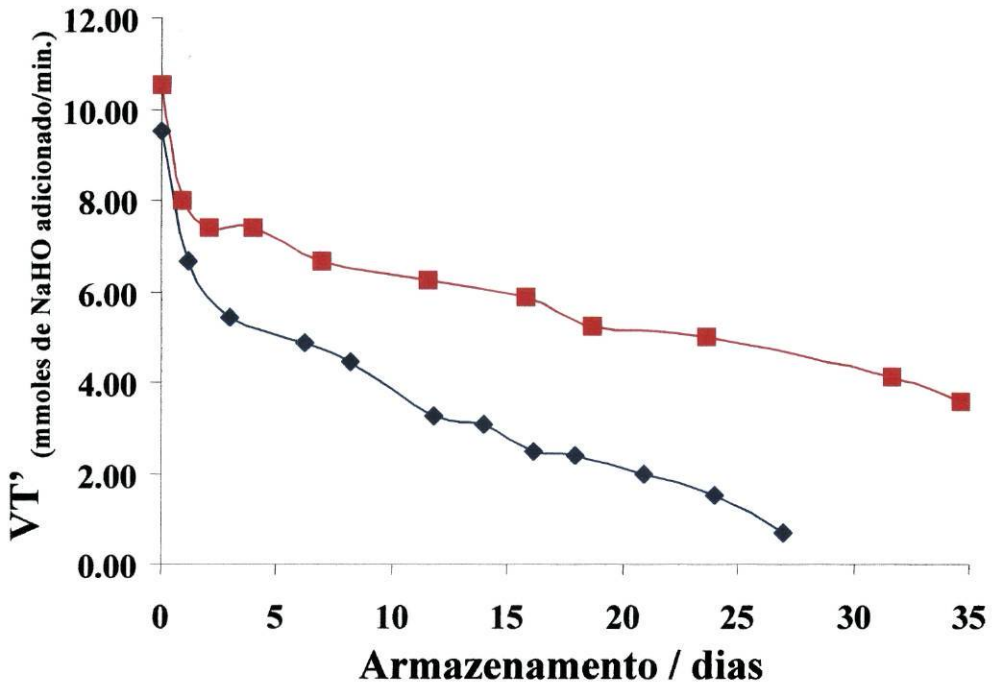


Figura III-15. Variação da vitalidade de levedura ao longo do tempo de armazenamento, determinada utilizando o método "vitaltitration". ◆ - armazenamento a 12ºC; ■ - armazenamento a 4ºC.

Na figura III-16 é apresentada a variação da vitalidade determinada pelo "acidification power test", ao longo do armazenamento da levedura a 4ºC e a 12ºC.

É importante notar que no método "vitaltitration" é possível observar uma queda relativa de vitalidade muito maior do que com o AP20, o que torna VT' mais sensível. Considerando, por exemplo, a levedura envelhecida a 12ºC e um armazenamento de 20 dias, enquanto que o valor VT' teve uma diminuição superior a quatro vezes (de cerca de 9 para cerca de 2), o valor AP20 apenas diminuiu 20% (de 2,7 para 2,1). Este aspecto será confirmado mais adiante durante o estudo das alterações ao desempenho da

fermentação. O índice VT' apresenta ainda um menor erro médio relativo do que o AP20 (respectivamente de ±3% e ±5%).

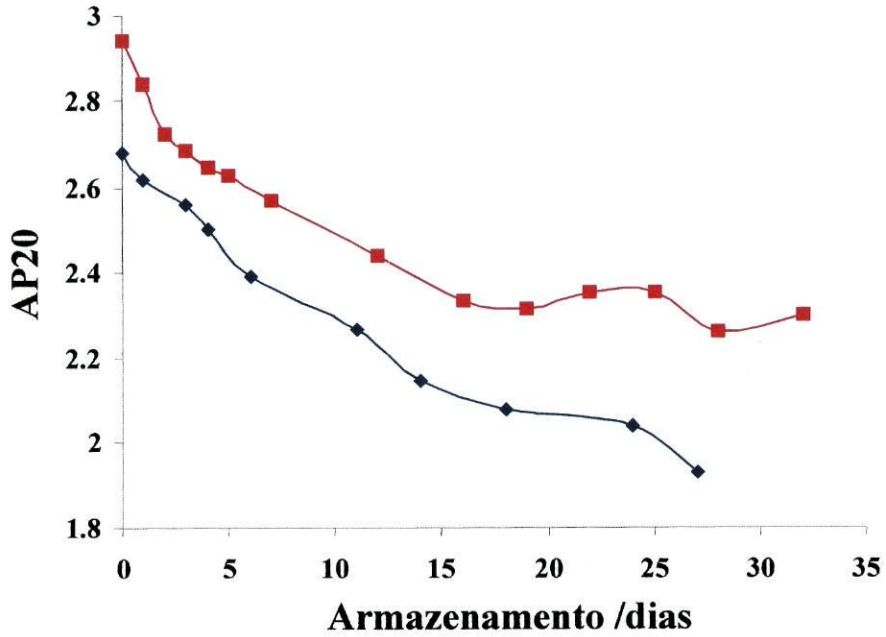


Figura III-16. Variação da vitalidade de levedura ao longo do tempo de armazenamento, determinada utilizando o acidification power test. ◆ - armazenamento a 12ºC. ■ - armazenamento a 4ºC.

Tal como esperado, ambos os métodos de determinação de vitalidade confirmam que a levedura mantida a 4ºC mantém a sua vitalidade mais elevada do que a levedura mantida a 12ºC, o que é muito mais evidente na "vitaltitration", dada a sua maior sensibilidade. Por fim, é bem visível na figura III-15 que com o método "vitaltitration" é fácil detectar mudanças na vitalidade durante os primeiros dias do armazenamento, o que pode vir a ser muito útil para seguir mudanças e aferir melhoramentos na gestão e manuseamento da levedura como, por exemplo, nas condições de armazenamento.

5.3.2. Variações da viabilidade ao longo do ensaio de armazenamento

No caso da viabilidade foi apenas utilizada a temperatura de armazenamento de 12ºC. Para as determinações foram utilizados dois métodos distintos: o método do azul de metileno e o que usa o corante fluorescente ANSA. Na figura III-17 é possível observar a queda de viabilidade ao longo do tempo de armazenamento da levedura a 12ºC, utilizando ambos os métodos. Embora não sejam significativas as diferenças entre os métodos, verificou-se que o método do ANSA apresenta um perfil de queda da

vitalidade mais regular, como aliás era de esperar dada a maior fiabilidade deste método. A reprodutibilidade das contagens foi muito similar em ambos os métodos, com erros relativos de ±4,3% para o ANSA e de ±4,2% para o azul de metileno, respectivamente.

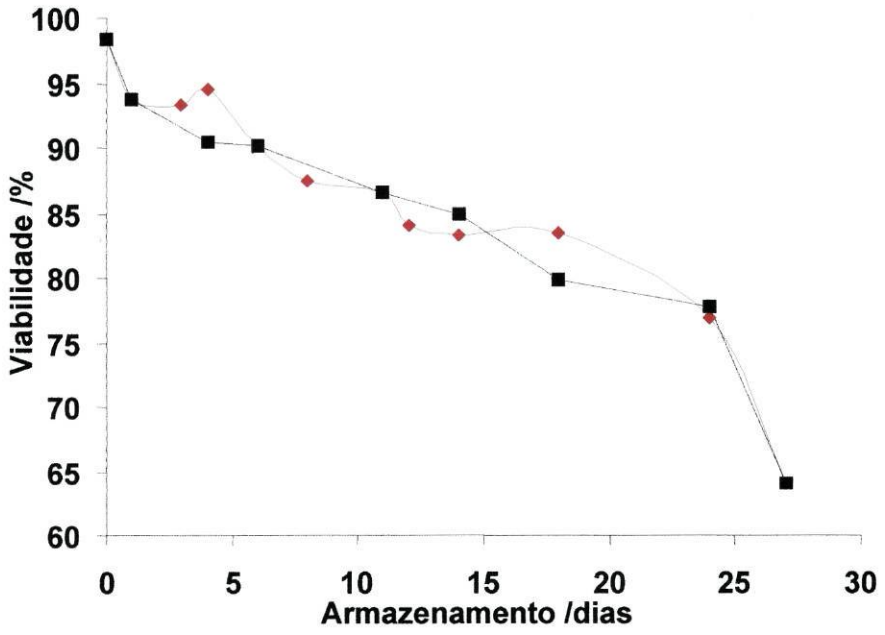


Figura III-17. Variação da viabilidade da levedura ao longo do tempo de armazenamento a 12ºC, determinada utilizando os métodos de: ◆ - azul de metileno. ■ - fluorescência com o ANSA

Como se vê na figura III-17, ocorre uma forte perda de viabilidade ao longo do ensaio de envelhecimento, o que permite indicar que o "stress" nutricional contribuiu para efectivamente deteriorar a condição fisiológica da levedura, devendo-se contudo ter em atenção os erros que se sabe estarem associados a este tipo de medições de viabilidade.

5.3.3. Validação do método de VT' para determinação de vitalidade por comparação com o desempenho da fermentação.

A levedura armazenada a 12ºC foi periodicamente inoculada em mosto fresco para avaliação da sua performance fermentativa. Como se pode ver na figura III-18, o tempo de fermentação aumenta ao longo do tempo de armazenamento da levedura utilizada.

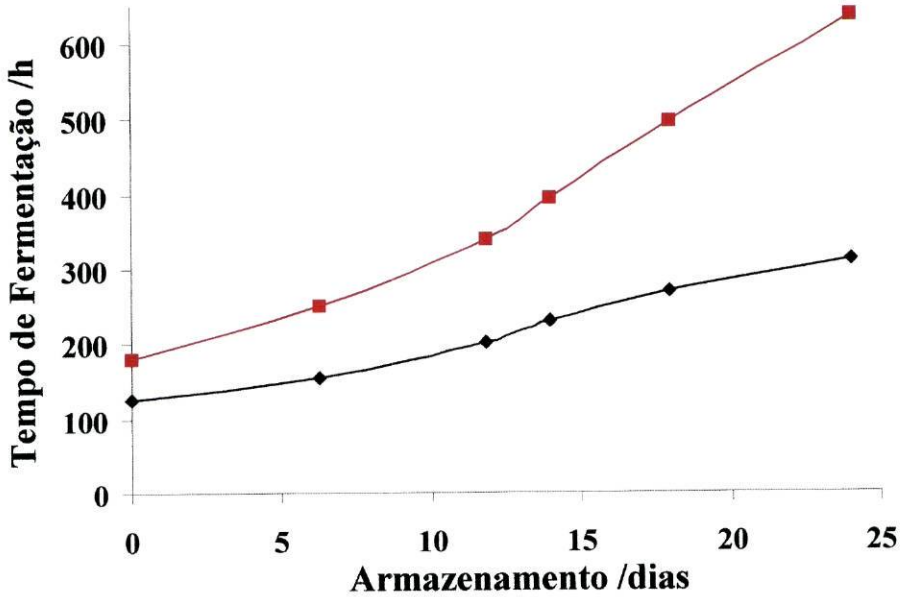


Figura III-18. Variação do desempenho fermentativo da levedura ao longo do seu armazenamento a 12ºC. ◆ - tempo de fermentação necessário para a cerveja atingir o extracto de 5,12ºP; ■ - tempo de fermentação necessário para a cerveja atingir um extracto de 2,58ºP.

Portanto, e como seria de esperar, o desempenho da fermentação da levedura é tanto pior quanto maior o tempo que esta esteve armazenada a 12ºC. Este resultado é bastante encorajador em termos de validação do método "vitaltitration", tanto mais que este se apresentou muito sensível mesmo para pequenas variações de vitalidade. De facto, as pequenas alterações de vitalidade que foram observadas pelo método "vitaltitration" e que se traduziram desde o início do teste de envelhecimento em alterações no desempenho fermentativo, não foram traduzidos de igual forma pelos outros métodos que se mostraram menos sensíveis, falhando onde o novo método e o seu índice VT' conseguem detectar alterações.

Existe, portanto, uma clara relação ente o valor de VT' e o tempo de fermentação, como pode ser observado na figura III-19, o que permite concluir que o índice VT' de vitalidade da levedura inoculada pode ser utilizado como um bom indicador do desempenho da fermentação em laboratório.

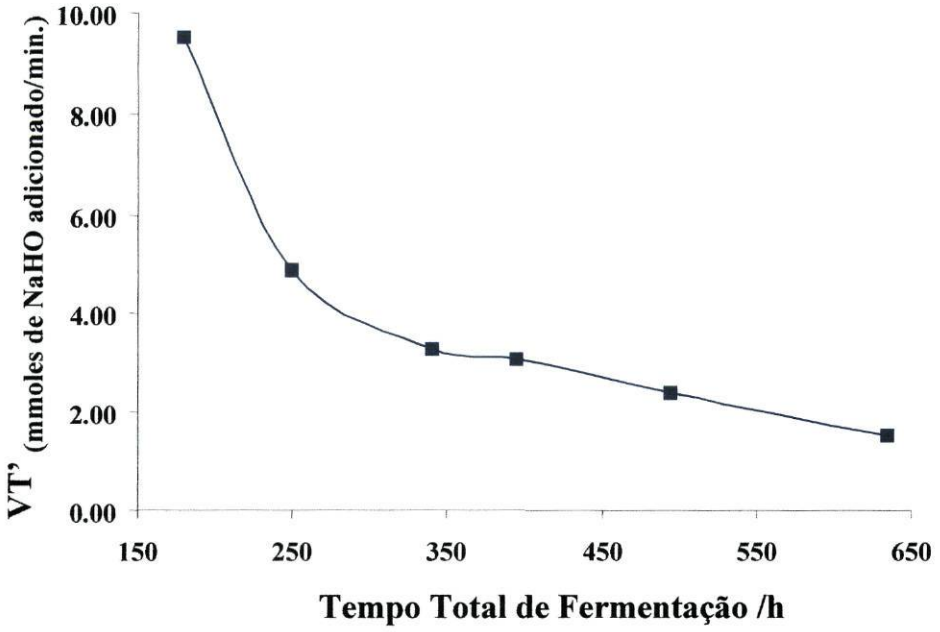


Figura III-19. Efeito da vitalidade (VT') da levedura no tempo total de fermentação da cerveja (tempo até um extracto de 2,58ºP).

5.3.4. Conclusão

Em conclusão, os resultados anteriormente apresentados permitiram validar o método "vitaltitration" para a determinação de alteração do estado de vitalidade de uma população de levedura submetida a um ensaio de envelhecimento. Este método demonstrou ainda ser muito sensível a perdas de vitalidade da levedura, parecendo bastante apropriado para ser utilizado para prever um decréscimo no desempenho da fermentação.

O método provou ser uma inovadora e simples alternativa para a biomonitorização da vitalidade de levedura, requerendo apenas material regular de laboratório, o que permite que seja facilmente executado em virtualmente qualquer empresa cervejeira. Está, assim, aberto o caminho para o seu uso alargado como ferramenta para melhorias na gestão e manuseamento de levedura ou para o simples controlo de rotina da qualidade da levedura semeada.

6. VALIDAÇÃO INDUSTRIAL DO MÉTODO "VITALTITRATION"

Neste capítulo foram estudadas as possibilidades do uso do método "vitaltitration" para uma biomonitorização de factores que afectam a qualidade de levedura e para aplicação na previsão do desempenho de levedura em fermentações industriais. Foram ainda efectuados estudos para determinação de factores que causem alteração da vitalidade de levedura no ciclo industrial, procurando determinar se as leveduras perdendo a vitalidade a podem vir a recuperar posteriormente ou se o seu estado fisiológico fica permanentemente comprometido.

Todo este trabalho foi efectuado tendo como base o processo industrial de fabrico da cerveja Super-Bock, tendo sido realizado na UNICER- Bebidas de Portugal, SGPS, no centro de produção de Leça do Balio.

6.1. Parte experimental

6.1.1. Levedura

Neste trabalho foi utilizada uma única estirpe de levedura "lager", de código US II (Unicer "Strain" II), tendo as leveduras utilizadas completado pelo menos uma fermentação industrial. A levedura recolhida foi armazenada em tanques de 40 HL, refrigerados a 4ºC. As determinações de vitalidade e viabilidade foram efectuadas na levedura retirada dos tanques de armazenamento, ou após para aí ter sido recolhida das cilindrocónicas no caso da levedura de fim de fermentação, ou menos de 4 horas antes de vir a ser inoculada no caso da levedura de sementeira.

6.1.2. Análise da vitalidade e viabilidade de levedura

A levedura analisada após fermentação foi retirada dos tanques de armazenamento logo após ter sido totalmente recolhida, tendo sido analisada dentro das primeiras 4 horas. A levedura analisada antes da fermentação, foi previamente homogeneizada pelo menos 30 minutos antes da amostragem, tendo sido recolhida e analisada menos de 4 horas antes de ser inoculada.

Todas as determinações de vitalidade e de viabilidade foram efectuadas em duplicado para cada amostra de levedura recolhida dos tanques de armazenamento.

As determinações de vitalidade de levedura foi feita pelo método "vitaltitration" de acordo com o procedimento descrito no capítulo 4. As medições de pH e de temperatura no teste "vitaltitration", foram adquiridas automaticamente para um PC acoplado ao medidor de pH Hanna 213 pelo software HI9200.

As determinações de viabilidade da levedura foram efectuadas por microscopia de campo claro utilizando o método do azul de metileno, conforme o procedimento descrito no IOB – Methods of analysis [62].

6.1.3. Mosto

Neste trabalho foram utilizados dois tipos distintos de mosto (Mosto I e mosto II), os quais foram produzidos em duas salas de fabrico de mosto diferentes existentes neste centro de produção da Unicer. Ambos os mostos são mostos "lager" com a mesma base de malte-gritz de milho, mas possuem extractos primitivos (EP) distintos. O mosto I tem um EP de 14,3°P, e o mosto II um EP de 13,2°P. A composição típica de ambos os mostos é igualmente diferente entre si como pode ser observado na tabela III-7.

Nos ensaios de fermentação o mosto utilizado em todos os processos estudados foi o mosto I.

Tabela III-7. Composição típica dos dois mostos utilizados neste trabalho, provenientes de duas salas de fabrico de mosto distintas.

		Mosto I	Mosto II
Extracto Primitivo /°P		14,3	13,2
Azoto α-aminado (FAN) /mgL^{-1}		235	180
Atenuação Limite do Mosto $_{Média}$ /%		72,0	69,8
Atenuação Real Final da Cerveja $_{Média}$ /%		70,3	67,9
Açúcares Fermentáveis /% total	DP1 (Glucose/Frutose)	13,6	Não disponível
	DP2 (Maltose/sacarose)	71,5	
	DP3 (Maltotriose)	14,8	
Ácidos Gordos /mg.L^{-1}	Total	4,47	4,63
	Saturados	2,21	2,66
	Insaturados	2,26	1,97
	Rácio Insat./Sat.	1,02	0,74
Minerais /mg.L^{-1}	Cálcio	67	64
	Magnésio	120	104
	Manganês	0,21	0,21
	Zinco	0,07*	0,12
	Sódio	69	86
	Potássio	617	533
	Ferro	0,23	0,10

*Esta concentração é corrigida posteriormente com $ZnCl_2$.

6.1.4. Fermentações

Os ensaios industriais de fermentação foram efectuados em cubas de fermentação cilindrocónicas de 3000HL, tendo sido utilizado o mosto I. As fermentações seleccionadas para este trabalho tinham como pré-requisito terem características iguais no que respeita à taxa de sementeira, oxigenação do mosto e diagrama de temperaturas de fermentação.

A sementeira foi controlada por contagem das células de levedura utilizando o contador automático de células Coulter-Counter, Model ZM.

6.1.5. Análises

O extracto (°P), o álcool (etanol) e a fermentabilidade/atenuação (%) foram sendo determinadas ao longo da fermentação utilizando o analisador SCABA.

A velocidade de fermentação foi calculada em °P/dia, partindo do extracto primitivo do mosto e do tempo de fermentação até o extracto real da cerveja atingir o valor de 5,12°P.

A atenuação limite do mosto foi determinada seguindo o procedimento de referência, descrito no Analytica – EBC [3]. A atenuação real final da cerveja foi calculada no final da fermentação quando a queda de extracto é inferior a 0,1°P/dia. A diferença de fermentabilidade (distância ao limite) foi calculada pela subtracção entre a atenuação limite do mosto e a atenuação real final da cerveja. De referir que quanto maior a atenuação real final da cerveja ou menor a diferença entre este valor e a fermentação limite do mosto, mais eficientemente a levedura transforma os açúcares em etanol, aumentando, portanto, o rendimento do processo de fermentação.

Para a determinação da estabilidade da espuma foi utilizando o aparelho Haffmans, Foam Stability Meter, utilizando-se CO_2 na purga da cerveja. Os resultados expressos em NIBEM /seg, denotam uma maior estabilidade de espuma quanto maior for este índice.

6.2. Efeito da vitalidade da levedura de sementeira, determinada por VT', no desempenho de fermentações industriais

No capítulo anterior foi estudada a correlação entre o factor de vitalidade da levedura e o desempenho de fermentação em laboratório, utilizando fermentadores EBC de 2L, tendo-se verificado que existe uma clara dependência do tempo de fermentação em relação à vitalidade da levedura semeada.

Como anteriormente já foi referido, diferenças na vitalidade determinada por estes métodos de laboratório têm, de facto, de ser confirmadas por diferenças no desempenho da fermentação, pois só desta forma se demonstra a importância dos métodos de vitalidade para a produção de cerveja. A determinação deste tipo de dependência com as fermentações laboratoriais foi possível de estabelecer para a maioria dos métodos, mas o mesmo não sucede com as fermentações industriais. Na realidade, acontece que a maioria dos testes de vitalidade já desenvolvidos falha quando são feitos ensaios de correlação com fermentações industriais. O trabalho que se segue corresponde precisamente aos estudos realizados no sentido de verificar se o método "vitaltitration" pode ser correlacionado com o desempenho de fermentações industriais.

Para os ensaios de fermentação industrial foi analisada a vitalidade VT' da levedura imediatamente antes de ser inoculada, estudando-se o seu desempenho industrial em termos de velocidade de fermentação e na atenuação real final da cerveja (%). Como facilmente se pode deduzir, estes dois parâmetros são de vital importância no processo pois têm um efeito directo não apenas nas características organolépticas e na consistência da qualidade mas, também, uma grande influência em termos económicos.

Neste estudo foram analisadas leveduras do processo industrial, imediatamente antes de serem semeadas. Estas leveduras, com valores aleatórios de vitalidade correspondentes a amostras com diferentes estados fisiológicos, foram sendo inoculadas em fermentações industriais como parte normal do processo produtivo, tendo as fermentações sido acompanhadas para a determinação do desempenho fermentativo dessas leveduras.

Nas figuras III-20 e III-21 podem ser observadas as correlações obtidas entre o valor de vitalidade VT' das leveduras inoculadas e a performance das fermentações industriais. Verificou-se que quanto maior o valor de VT' maior era a velocidade de fermentação (figura III-20) e maior era a atenuação real final da cerveja (figura III-21) confirmando

que a levedura inoculada com maior vitalidade pode fermentar mais rapidamente e com maior eficiência (com maior rendimento).

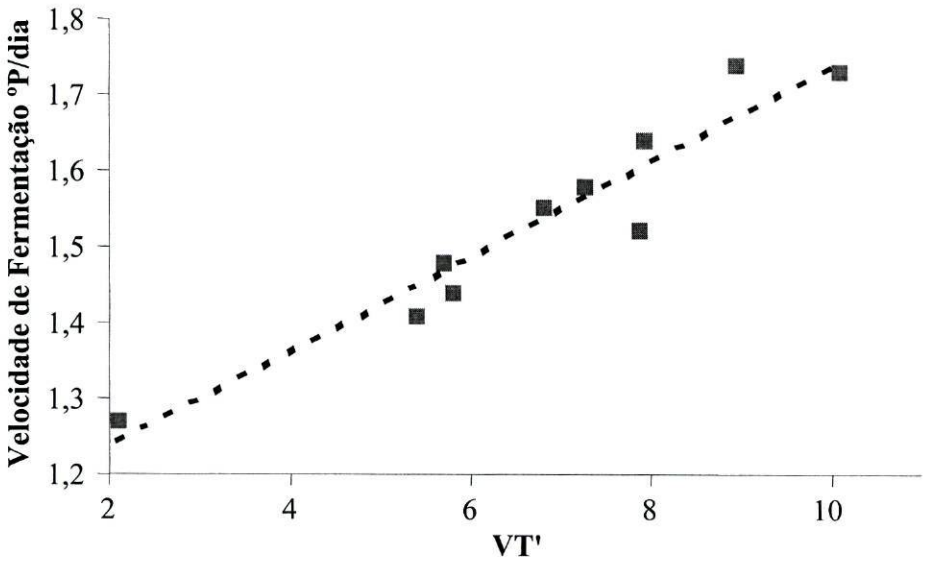


Figura III-20. Efeito da vitalidade VT' da levedura inoculada na velocidade de fermentação em ensaios industriais.

Estes resultados vêm demonstrar que o método "vitaltitration" pode ser utilizado para prever não só a qualidade da levedura, como o desempenho da fermentação. A biomonitorização da vitalidade da levedura nos tanques de fermentação utilizando este método pode, portanto, ser aplicada na selecção da levedura saudável para a inoculação, após ter sido definido o valor de VT' correspondente ao limite de qualidade para rejeição respeitante à levedura que se pretende controlar. Confirma-se, portanto, que o método "vitaltitration" é útil para a previsão de fermentações industriais.

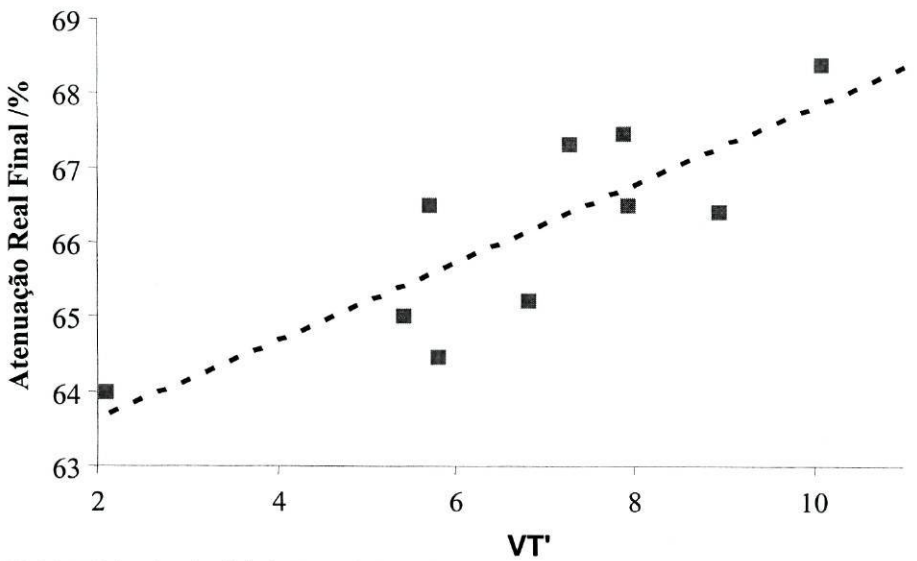


Figura III-21. Efeito da vitalidade VT' da levedura inoculada na atenuação real final da cerveja em ensaios industriais de fermentação.

6.3. Aplicações do método "vitaltitration" em estudos de biomonitorização para avaliação e melhoria de processos

6.3.1. Estudo de biomonitorização do efeito do tipo de mosto e do processo de fabrico na qualidade da levedura recolhida

A qualidade da levedura que existe no processo é afectada por uma série de factores, sendo a qualidade do mosto um dos mais importantes [16, 26, 46, 94, 103, 106, 127, 128, 146]. Como qualquer ser vivo, a levedura tem determinados requisitos nutricionais que obviamente condicionam o seu desenvolvimento mas igualmente o seu estado fisiológico. Por vezes existem condicionalismos e limitações no rendimento de processos de fermentação cujas causas não são fáceis de determinar, não sendo possível traduzir os resultados de análises físico-químicas convencionais em termos de desempenho da fermentação. Neste contexto a biomonitorização da vitalidade de levedura poderá servir como um importante indicador de limitações no processo. Assim, é de esperar que factores que prejudiquem a levedura baixando a sua vitalidade tenham um efeito negativo quer no produto quer no processo de fermentação, como por exemplo a composição do mosto. É natural que um mosto menos completo do ponto de vista nutricional possa ser um factor limitante, fazendo baixar a vitalidade da levedura. Para evidenciar a importância que este tipo de estudos de biomonitorização de vitalidade pode ter para a resolução de problemas industriais, foi feito um estudo do efeito do tipo de mosto e do seu processo de fabrico na qualidade da levedura recolhida. Para estas experiências foram usados dois tipos de mosto distintos produzidos cada um deles numa sala de fabrico diferente, e representados por I e II.

Estes dois tipos de mosto embora produzidos a partir de uma mesma base de ingredientes, foram produzidos em dois locais distintos, o que lhes confere não apenas uma composição base distinta (tabela III-7), mas, mais importante ainda, características de fermentação bastante diferentes, como se pode ver na figura III-22, o que constitui claramente um sério problema em termos de consistência da qualidade. Os mostos do tipo I possuem uma maior fermentabilidade e as cervejas apresentam uma atenuação real final superior sendo caracteristicamente cervejas mais leves do que as produzidas com o mosto II. Verifica-se ainda que as cervejas produzidas a partir do mosto I têm um

rendimento superior nas fermentações industriais pois é menor a distância entre a atenuação real final da cerveja e a atenuação limite do mosto, o que quer dizer que no caso I existem no final menos açúcares que poderiam tecnicamente ainda ser fermentáveis.

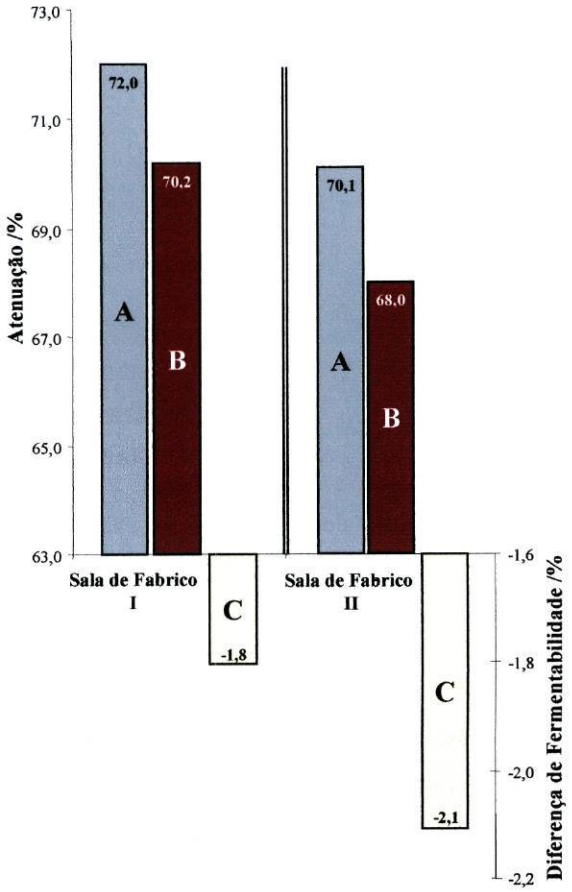


Figura III-22. Diferenças de fermentabilidade encontradas nos mostos do tipo I e II, produzidos em duas salas de fabrico distintas. A – Atenuação limite do mosto; B – atenuação real final das cervejas, C – diferença de fermentabilidade (distância ao limite).

Embora à primeira vista este problema de atenuação pareça dever-se apenas a diferenças no processo de sacarificação durante o fabrico do mosto, verificou-se por ensaios de biomonitorização que este não é o único factor, dadas as diferenças encontradas no estado fisiológico das leveduras que foram recolhidas no final das fermentações e que se apresentam na figura III-23. Os dados apresentados na figura correspondem às análises de vitalidade, pelo método "vitaltitration", e de viabilidade, pelo método do azul de metileno, efectuadas a um total de 37 leveduras distintas recolhidas no final de fermentações industriais, em que 25 provêm de mostos do tipo I e as restantes 12 de mostos do tipo II.

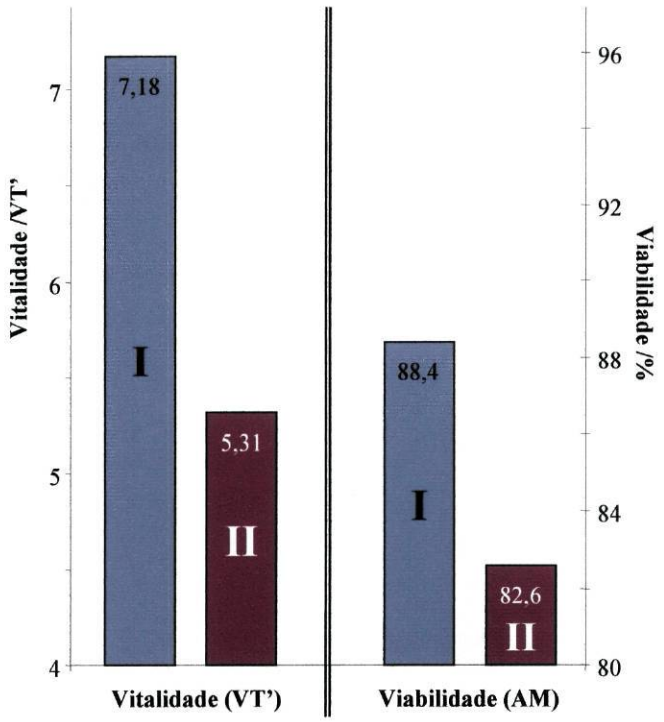


Figura III-23. Efeito de dois tipos distintos de mosto, I e II, na vitalidade e viabilidade da levedura recolhida, determinadas respectivamente pelo método "vitaltitration" e pelo método do azul de metileno. I – Mosto/Sala de Fabrico I; II – Mosto/Sala de Fabrico II.

As determinações de vitalidade VT' apresentam uma maior sensibilidade para avaliar diferenças na qualidade da levedura recolhida do que o método de viabilidade pelo azul de metileno, como já se tinha indicado anteriormente e se pode observar na tabela III-8. A título de conclusão deste estudo é ainda possível afirmar que a biomonitorização da vitalidade da levedura permite determinar o efeito que o mosto pode ter na qualidade da levedura, detectando limitações fisiológicas que mostos de composição menos equilibrada induzem na levedura e que, por isso, afectam negativamente o desempenho da fermentação. Estes resultados sugerem ainda que a vitalidade da levedura pode ser afectada não apenas pelas condições de gestão e manuseamento, mas também pelo processo de fermentação e composição do mosto.

Tabela III-8. Diferenças encontradas na vitalidade e viabilidade entre a levedura recolhida após fermentar cada um dos dois tipos de mosto.

	Mosto/Sala de Fabrico I	Mosto/Sala de Fabrico II	Variação
n (amostras)	**25**	**12**	
Vitalidade (VT')	**7,18**	**5,31**	**26%**
Viabilidade (Azul de metileno)	**88,4**	**82,6**	**7%**

6.3.2. Estudo de biomonitorização do efeito da vitalidade da levedura recolhida na estabilidade de espuma da cerveja

Os estudos de biomonitorização da levedura recolhida, para além de poderem servir para indicar alterações do processo a montante do fim da fermentação, como se verificou no caso anterior, também podem ser utilizados para explicações de alterações que ocorrem a jusante do final da fermentação, como se procura demonstrar ao estudar o efeito da vitalidade da levedura na estabilidade de espuma.

A estabilidade de espuma da cerveja é considerada um factor crítico no controlo de qualidade da cerveja dado que, para além de afectar directamente as sua propriedades organolépticas, possui igualmente um papel fulcral na apresentação do produto, pelo que o seu controlo se encontra definido em qualquer plano de inspecção e ensaio e de auditoria das empresas cervejeiras.

Entre os muitos parâmetros que podem provocar alteração da estabilidade da espuma os mais importantes são o teor em CO_2, o tipo de malte, o processo de fabrico do mosto e a qualidade da levedura. A estabilidade de espuma está, portanto, intimamente ligada á vitalidade da levedura, dado que leveduras em mau estado fisiológico existe uma maior libertação de proteases para a cerveja, as quais degradam as proteínas do meio, responsáveis pela estabilidade da espuma da cerveja [23, 33, 36, 76, 107, 109, 117, 129, 135, 156].

Por isso, a avaliação da vitalidade, e mesmo da viabilidade da levedura recolhida, pode revelar-se muito importante, uma vez que pode ser associada com a tendência da levedura autolisar e com o nível de protease libertada para a cerveja.

Na tabela III-9 são apresentados os valores de vitalidade VT' e, de viabilidade, de duas leveduras com diferente estado fisiológico recolhidas de dois tanques de fermentação. Por sua vez, na figura III-24 são apresentados os valores de estabilidade de espuma das cervejas correspondentes às fermentações obtidas com essas leveduras.

Tabela III-9. Diferenças de viabilidade e vitalidade das leveduras recolhidas dos dois tanques de fermentação.

	Levedura A	**Levedura B**
Vitalidade /VT'	**3,9**	**7,9**
Viabilidade /%	**68**	**92**

Comparando a tabela III-9 com a figura III-24, é evidente a correlação entre a vitalidade e a estabilidade de espuma, o que deverá estar relacionado, conforme se referiu atrás, com uma diferente libertação de proteases para a cerveja pela levedura, maior no caso A.

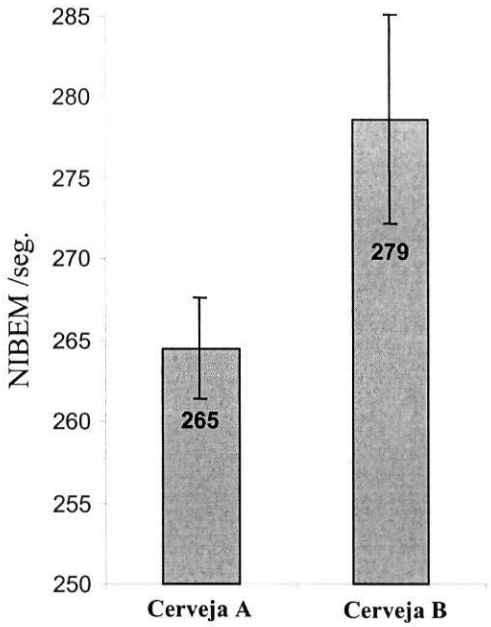


Figura III-24. Valores de estabilidade de espuma obtidos das fermentações correspondentes às leveduras A e B. As barras denotam o erro das determinações (n = 5). Cerveja A – Correspondente à levedura em pior estado fisiológico; Cerveja B – Correspondente à levedura em melhor estado fisiológico

Estes resultados indiciam que a qualidade fisiológica da levedura recolhida é um parâmetro implicado na estabilidade da espuma, que no caso particular da cerveja A pode ter sido afectada por um excessivo tempo de residência da levedura no cone do tanque de fermentação antes de ser recolhida.

6.4. Alteração da vitalidade na fermentação e armazenamento industrial de levedura – considerações sobre vitalidade metabólica e resistência ao "stress"

A determinação de factores que alterem a vitalidade da levedura é de extrema importância para a industria cervejeira; contudo, dadas as dificuldades em determinar a vitalidade, é um campo ainda muito pouco explorado. Tomando o exemplo da fermentação, sabe-se que a levedura sofre "stress" ambiental ao longo deste processo; contudo, não é líquido que no final não possa estar em melhor estado fisiológico do que quando foi semeada, pois se sabe que pelo menos o seu metabolismo foi activado durante este processo, dando-lhe a possibilidade de recuperar a sua vitalidade. Este é um

ponto muitas vezes descurado e mal interpretado, pois existe uma confusão ainda muito grande entre a vitalidade, o nível de "stress" celular e a actividade metabólica. Estes indicadores podem denotar sentidos distintos de estado fisiológico. Neste ponto tenta-se esclarecer um pouco esta confusão, evidenciando, por experiências, diferenças naquilo que actualmente se denota como vitalidade. Propõe-se um modelo ligeiramente distinto de vitalidade, a qual poderá, num futuro próximo, passar a ser avaliada do ponto de vista de actividade metabólica da levedura e da sua capacidade de resistência ao "stress".

Actualmente é referido, na generalidade da bibliografia sobre levedura, que a sua vitalidade decresce em más fermentações e quando é deficientemente gerida e manuseada; contudo, pouco é referido quanto à alteração da vitalidade quando estas condições são boas. Na figura III-25, apresenta-se a alteração do estado fisiológico de duas leveduras ao longo da fermentação, onde é visível que a levedura também pode aumentar a sua vitalidade metabólica. De facto, a levedura II possuía um vitalidade muito baixa antes da inoculação (B), mas passou a apresentar uma vitalidade muito maior no final das fermentações (B' e B''). É ainda importante notar que o método de vitalidade reflecte de uma forma mais rigorosa a melhoria da qualidade desta levedura do que o método de viabilidade pelo azul de metileno, dado que não é afectado pela presença de células mortas da sementeira.

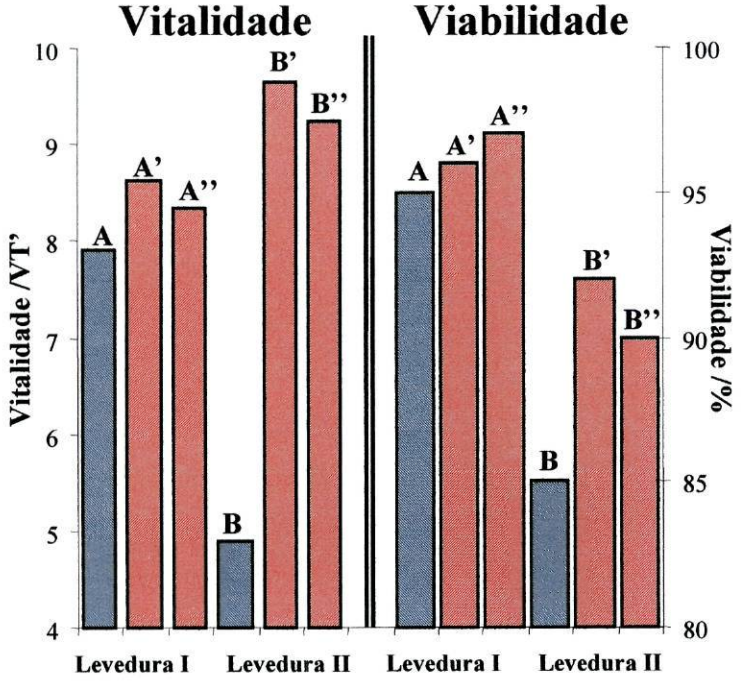


Figura III-25 – Alteração da vitalidade e viabilidade de duas leveduras durante a fermentação. A- levedura I semeada; A' e A'' – Leveduras recolhidas de duas fermentações distintas em que tinha sido inoculada a levedura I; B- levedura II semeada; B' e B'' – Leveduras recolhidas de duas fermentações distintas em que tinha sido inoculada a levedura II.

Embora o método "vitaltitration", como qualquer outro método de determinação de vitalidade baseado na actividade metabólica de levedura, seja de grande utilidade para determinação da vitalidade com que a levedura se encontra num determinado momento, convém frisar que não pode ser utilizado para estimar o nível de "stress" da levedura ou de resistência a condições de "stress". Desta forma, não é possível pela análise do VT', que indica a vitalidade metabólica, prever como se comportará a levedura durante a recolha e armazenamento, como denotam os resultados apresentados na figura III-26. De facto, a levedura com a vitalidade inicial mais elevada (B') no início do teste de armazenamento, vê decair mais rapidamente a sua vitalidade do que a levedura A'', que inicia o teste com uma vitalidade inferior. Este resultado, está de acordo com o que era esperado em termos de capacidade de resistência ao "stress", que se previa ser menor na levedura B', do que na levedura A'', dado que a primeira que foi sujeita a mais ciclos de fermentação (gerações), tendo ainda previamente passado pelo menos por uma situação de adversidade com perda da sua vitalidade metabólica, o que naturalmente terá elevado os seus níveis de "stress" celular. Estes resultados vão ainda ao encontro do que é esperado em termos de decréscimo da vitalidade da levedura com o número de ciclos de fermentação/re-inoculação [24, 65, 99, 106, 144].

Este dados vêm ainda permitir fazer desde logo uma distinção em termos de estado fisiológico, o qual se pode definir de duas forma distintas: pela vitalidade metabólica e pelo nível de "stress" celular ou capacidade de resistência ao "stress". A vitalidade metabólica, que pode ser determinada pelo método "vitaltitration", é um índice que pode ser aplicado para determinar a actividade metabólica da levedura como, por exemplo, para prever o desempenho na fermentação. O nível de "stress", que não pode ser determinado por muitos dos métodos de vitalidade, entre os quais o "vitaltitration", não parece condicionar directamente o desempenho da fermentação, mas afecta a capacidade da célula resistir aos procedimentos de gestão e de manuseamento de levedura.

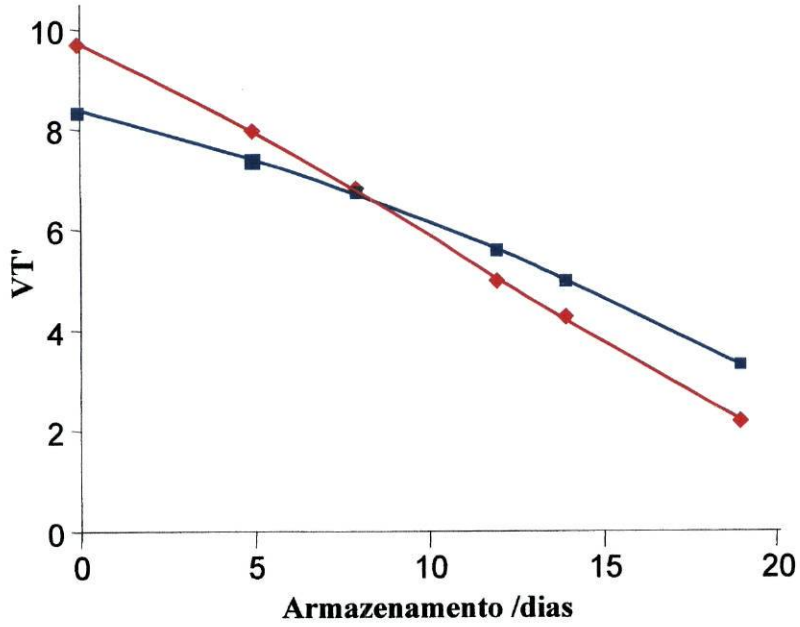


Figura III-26. Queda da vitalidade de duas leveduras durante um ensaio de armazenamento a 4ºC, determinada utilizando o método "vitaltitration". ■ - Levedura A'' (da figura III-25) – 1ª geração; ◆ - Levedura B' (da figura III-25) – 4ª geração.

6.5. Conclusões e considerações sobre a utilização de métodos de vitalidade na gestão e manuseamento industrial de levedura

A vitalidade da levedura pode ser determinada estimando a sua actividade metabólica através do método "vitaltitration", que demonstra ter vantagens em relação ao método de referência de viabilidade com o azul de metileno, para o controlo de qualidade de levedura na indústria cervejeira.

O método "vitaltitration" pode ser utilizado para a monitorização de vitalidade metabólica, sendo útil para fermentação industrial, podendo prever o desempenho da levedura nestes processos. Através do seguimento de largas dezenas de fermentações industriais, cujas leveduras tinham sido previamente controladas em termos de vitalidade VT', foi possível desenhar uma escala funcional de vitalidade para o controlo de qualidade de levedura. Esta escala permite correlacionar o índice VT' com o estado fisiológico da levedura "lager" da estirpe USII, como se pode observar na figura III-27, bem como também permite obter um limite de qualidade de rejeição e uma interpretação de qualidade de levedura para uso prático.

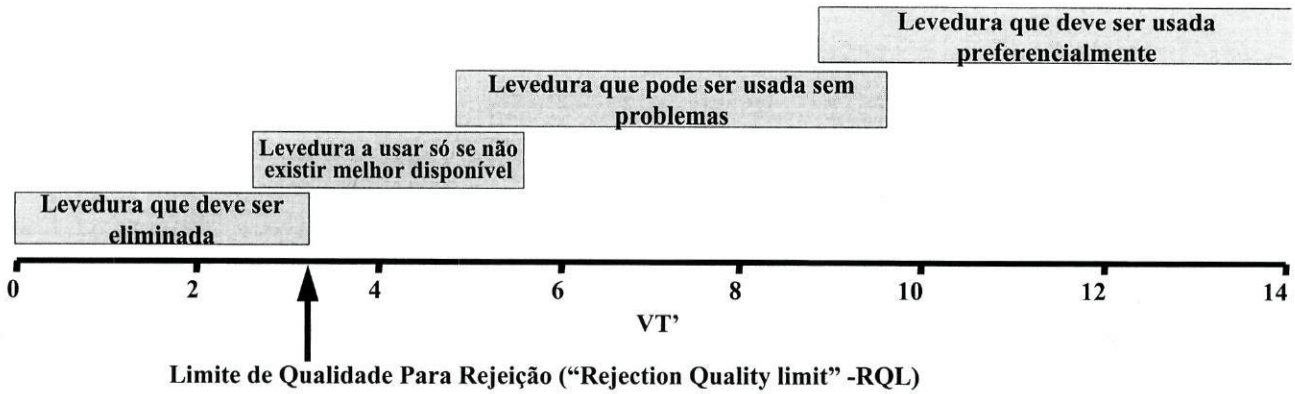


Figura III-27. Escala funcional de vitalidade utilizando o índice VT' obtido para a levedura da estirpe USII.

O controlo por VT' da levedura recolhida no final da fermentação pode ainda ser utilizado para determinar variações de vitalidade durante este processo. Este tipo de biomonitorização da vitalidade pode se importante, por exemplo, se se verificar uma constante queda de vitalidade ao longo de fermentações, o que pode indicar a necessidade de encontrar medidas correctiva para melhorar a composição do mosto, ou o processo fermentativo, ou ainda a recolha e sementeira da levedura. A qualidade da levedura pode ainda ser um dos parâmetros implicados na estabilidade de espuma da cerveja, pelo que o controlo da vitalidade da levedura poderá servir como meio de diagnóstico ou mesmo de prevenção para o controlo deste parâmetro.

O uso do método "vitaltitration", tal como de outros métodos que medem a vitalidade metabólica da levedura, permite satisfazer as mais importantes tarefas para o cervejeiro, como a previsão de desempenho de fermentação e servir para detecção do estado fisiológico instantâneo que a levedura possui no momento da análise. Contudo, estes métodos não nos dão informação relativamente ao nível de "stress" da levedura ou à sua capacidade de resistência, não podendo ser utilizados para a previsão de queda de vitalidade.

A única forma de solucionar este problema em termos industriais passa pelo desenvolvimento de programas de controlo e rastreabilidade de levedura, assumindo mau comportamento a condições de "stress", como o armazenamento, para as leveduras que tenham no passado tido fases de quebra de vitalidade ou uma má gestão e manuseamento da levedura. Na figura III-28, apresenta-se um esquema tipo com alguns dos factores envolvidos na alteração da vitalidade da levedura utilizada industrialmente, e qual o impacto que têm em termos de produção de cerveja.

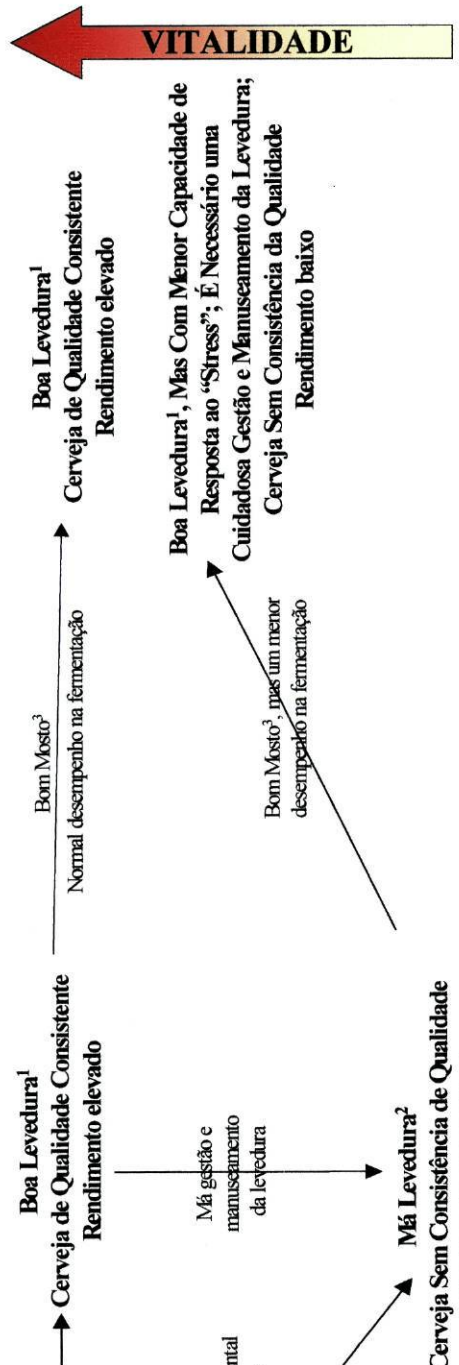


Figura III-28. Esquema com as principais causas determinadas neste trabalho de alteração do nível de vitalidade da levedura no ciclo industrial e suas consequências na fermentação e no produto final. [1] levedura com vitalidade boa/aceitável; [2] levedura com vitalidade má/não aceitável; [3] mosto nutricionalmente equilibrado para a levedura; [4] mosto nutricionalmente deficiente para a levedura.

Referências Bibliográficas:

1 American Soc. Brew. Chem., (1980). Report of sub-committee on microbiology, J. Am. Soc. Brew. Chem., 38: 109-110.

2 American Soc. Brew. Chem., (1981). Report of sub-committee on microbiology, J. Am. Soc. Brew. Chem., 39: 86-89.

3 Analytica EBC, (1997). Method 4.11.2 - Fermentability, final attenuation of laboratory wort from malt: rapid method.

4 Attfield PV, Kletsas S, Veal DA, van Rooijen R, Bell PJ, (2000). Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts, J. Appl. Microbiol., 89(2): 207-214.

5 Axcell, BC and O'Conner-Cox, E.S.C., (1996). The Concept of yeast vitality - an alternative approach, Proc. 24th Conv. Inst. Brew. (Asia - Pacific Sect.): 64-71.

6 Back, W,Imai, T, Forster, C, Narziss, L, (1998). Yeast vitality and beer quality, Mon.schr. Brauwiss., 51 (11-12): 189-195.

7 Barker, MG, Smart, KA, (1996). Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain, J. Am. Soc. Brew. Chem., 54 (2): 121-126.

8 Becker, J.U., (1978). A method for glycogen determination in whole yeast cells, Anal. Biochem., 86: 56-64.

9 Boswell, CD, Nienow, AW, Hewitt, CJ, (2002). Studies on the effect of mechanical agitation on the performance of brewing fermentations: fermentation rate, yeast physiology, and development of flavour compounds, J. Am. Soc. Brew. Chem., 60 (3): 101-106.

10 Bouix, M, Leveau, J, (2001). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation, J. Inst. of Brew., 107 (4): 217-225.

11 Boulton, C, (2000). Glycogen, Trehalose and sterol, Brewing Yeast Fermentation Performance: 10-18. Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, Oxford, UK.

12 Boulton, C. A. (1996). A critical assessment of yeast vitality testing. Ferment, 9: 222-226.

13 Boulton, C. A., Box, W.G., Quain, D.E., Molzahn, S.W. (2001). Vicinal diketone reduction as a measure of yeast vitality. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am., 38: 89-93.

14 Breeuwer P, Drocourt JL, Rombouts FM, Abee T., (1994). Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from Saccharomyces cerevisiae allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry, Appl Environ Microbiol, 60(5): 1467-1472.

15 Burkhardt, L, Linh, VH, Woinar, K, Annemuller, G, (1997). ATP measurement in yeast cells during the initial fermentation of beer wort in cylindroconical fermenters, Mon.schr. Brauwiss., 50 (5-6): 100-107.

16 Cahill, G, Murray, DM, Walsh, PK, Donnelly, D, (2000). Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance, J. Am. Soc. Brew. Chem., 58 (1): 14-20.

17 Cahill, G, Walsh, PK, Donnelly, D, (1999). Improved control of brewery yeast pitching using image analysis, J. Am. Soc. Brew. Chem., 57 (2): 72-78.

18 Cahill, G. Walsh, P., Donnelly, D., (2000). Determination of yeast glycogen content by individual cell spectroscopy using image analysis, Biotechnology and Boengineering, 69 (3): 1-11.

19 Carvell, J., (1994). Automatic yeast pitching control using a yeast sensor, the brewer, Fev.: 57-59.
20 Carvell, JP, Austin, G, Matthee, A, Van de Spiegle, K, Cunningham, S, Harding, C, (2000). Developments in using off-line radio frequency impedance methods for measuring the viable cell concentration in the brewery, J. Am. Soc. Brew. Chem., 58 (2): 57-62.
21 Chapman, A.G. Atkinson, D.E., (1977). Adenine nucleotide concentrations and turnover rates: their correlation with biological activity in bacteria and yeast, Adv. Microb. Physiol., 15: 253-300.
22 Chilver, M.J., Harrison, J., Webb, T.J.B., (1978). Use of immunofluorescence and viability stains in quality control, J. Am. Soc. Brew. Chem., 36: 13-18.
23 Cooper, DJ, Stewart, GG, Bryce, JH, (2000). Yeast proteolytic activity during high and low gravity wort fermentations and its effect on head retention, J. Inst. Brew., 106 (4): 197-201.
24 Cunningham, S, Stewart, G, (2000). Acid washing and serial repitching a brewing ale strain of Saccharomyces cerevisiae in high gravity wort and the role of wort oxygenation conditions, J. Inst. Brew., 106 (6): 389-402.
25 Cunningham, S., (2000). Comparison of yeast growth profiles of fermentation pitched on the basis of off-line capacitance with those pitched using traditional methods, Brewing Yeast Fermentation Performance: 67-73. Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, Oxford, UK.
26 da Cruz, SH, Cilli, EM, Ernandes, JR, (2002). Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation, J. Inst. Brew., 108 (1), 54-61.
27 Davis, W.M., White, D.C., (1980). Fluorometric determination of adenosine nucleotide derivatives as measures of the microfouling, detrial, and sedimentary microbial biomass and physiological status, Appl. Environ. Microb., 40: 539-548.
28 Deere, D., Shen, J., Vesey, G., Bell, P., Bissinger, P., Veal, D., (1998). Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection, Yeast, 14: 147-160.
29 D'Hautcourt, O, Smart, KA, (1999). Measurement of brewing yeast flocculation, J. Am. Soc. Brew. Chem., 57 (4): 123-128.
30 Dinsdale, M.G., and Lloyd, D. (1995). Yeast vitality during cider fermentation: Two approaches to the measurement of membrane potential. J. Inst. Brew., 101: 453-458.
31 Dinsdale, M.G., Lloyd, D., McIntyre, P., and Jarvis, B. (1999). Yeast vitality during cider fermentation: Assessment by energy metabolism, Yeast, 15: 285-293.
32 Donhauser, S, Eger, C., Hubl, T., Schmidt, U., Winnewisser, W, (1993). Weihenstephan, Tests to determine the vitality of yeasts using flow cytometry, Brauwelt International, III: 221-224.
33 Dreyer, T, Biedermann, K, Ottesen, M, (1983). Yeast proteinase in beer, Carlsberg Research Communications, 48 (3): 249-253.
34 Driscoll, M, Ramsay, CM, Hulse, G, Simpson, WJ, (2002). A method of detecting autolysis of brewers' yeast by measurement of extracellular adenylate kinase activity, J. Am. Soc. Brew. Chem., 60 (4): 176-180.
35 Edwards, C., Porter, J., and West, M. (1996). Fluorescent probes for measuring physiological fitness of yeast. Ferment, 9: 288-293.

36 Eils, H.-G., Eidtmann, A., and Back, W. (2001). Steps to improve and use yeast technology commercially. Brauwelt Int., 19: 112-116.
37 European Brewing Convention: Yeast Group, (1962). Estimation of yeast viability, J. Inst. Of Brew., 68: 14-20.
38 Fernández, S., Gonzáles,G., and Sierra, A. (1991). The acidification power test and the behaviour of yeast in brewery fermentations. Tech. Quarterly Master Brew. Assoc. of the Americas, 28: 89-95.
39 Fernández, S, Gonzalez, M, Guadalupe, S, Antolin, J, (1993). Evaluation of the effect of acid washing on the fermentative and respiratory behaviour of yeasts by the acidification power test, Tech. Quarterly Master Brew. Assoc. of the Americas, 30: 1-8.
40 Fukudome, K, Sato, M, Takata, Y, Kuroda, H, Watari, J, Takashio, M, (2002). Evaluation of yeast physiological state by alcian blue retention, J. Am. Soc. Brew. Chem., 60 (4): 149-152.
41 Glenister, P.R., (!970). Some useful staining techniques for the study of yeast, beer and beer sediments, Proc. Am. Soc. Brew. Chem., 28: 161-167.
42 Graham, R.K., (1970). The basis of the determination of cell viability with the fluorochrome primuline, J. Inst. Brew, 76: 16-21.
43 Guldfeldt, L.U., and Arnebourg, N. (1998). The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations, J. Inst. Brew., 104: 37-39.
44 Hammond, J.R.M., (1999). Yeast in perspective, Brewers' Guardian, 10: 48-51.
45 Harrison, S.T.L., Basson, L., Robinson, A., Godfrey, T.A., O'Connor-Cox, E., Axcell, B, (1997). Mechanical handling on brewer's yeast during cropping and its effect on yeast quality, Proc. 6th Conference C & SA Sect. of the Inst. Brew, Durban: 55-60.
46 Heggart, A. M., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R. J., Dowhanick, T. M., Russel, I., (1999). Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review, Tech. Quarterly Masters Brew. Ass. of the Americas, 36 (4): 383-406.
47 Heggart, H., Margaritis, A., Stewart, R.J., Pilkington, H., Sobczac, J., and Russell, I. (2000). Measurement of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. Tech. Quarterly Master Brew. Assoc. of the Americas, 37 (4): 409-430.
48 Hodgson, J., Deans, K., (1999). Effect of cone cropping and serial re-pitching on the distribition of cell ages in brewery yeast, Tech. Quarterly Master Brew. Assoc. of the Americas, 36(2): 175-177.
49 Hori, T., Imai, T., Yasuda, Y., Takeushi, T., Ohkochi, M., (2000). The relationship between yeast vitality and yeast handling, Tech. Quarterly Master Brew. Assoc. of the Americas, 37 (1): 31-35.
50 Hutter, K,-J, Graben-Neudorf, (2001). Fermentation - Process transparency and control using flow cytometry, Brauwelt International, 19 (2): 124-127.
51 Hutter, K.-J, (2001). Flusszytometriche prozesskontrolle obergariger betriebshefen, Monatsschrift fur Brauwissen, 54 (3): 48-54.
52 Hutter, KJ, Borek, M, Remor, M, (2001). Biomonitoring of brewery yeasts by fluorescent optical methods in practice, Mon.schr. Brauwiss., 54 (7-8): 165-173.
53 Hutter, KJ, (2002). Flow cytometric determinations of glycogen content of yeast during fermentation, J. Inst. Brew., 108 (1): 52-53.

54 Hutter, KJ, (2001). Process control of bottom fermentable beer yeasts by flow cytometry, Mon.schr. Brauwiss., 54 (1-2): 13-19.
55 Hysert, D.W., Kovecses, F., Morrison, N.M, (1976). A firefly bioluminescence ATP assay method for rapid detection and enumeration of brewery microorganisms, J. Am. Soc. Brew. Chem., 34 (4): 145-150.
56 Hysert, D.W., Morrison, N.M., (1977). Studies on ATP, ADP, and AMP concentrations in yeast and beer, J. Am. Soc. Brew. Chem., 35 (4): 160-167.
57 Imai, T. (1999). The assessment of yeast vitality - the past and the future. Brew. Guard., 128 (6): 20-27.
58 Imai, T., Nakajima, I., and Ohno, T. (1994). Development of a new method for evaluation of yeast vitality by measuring intracellular pH, J. Am. Soc. Brew. Chem., 52: 5-8.
59 Imai, T., Ohno, T., (1995). Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase, J. Biotechnol., 38: 165-172
60 Imai, T., Ohno, T., (1995). The intracellular relationship between viability and intracellular pH in the yeast Saccharamyces cerevisiae, Appl. Environ. Microbiol., 61 (10): 3604-3608.
61 Imai, Takeo, (1996). Recent advances in the determination of yeast vitality, Proc. 24th. Conv. Inst. Brew. (Asian-Pacific Sector), Singapore: 60-63.
62 Institute of Brewing (1997). Methods of Analysis, Vol. 2, Microbiological, method 21.33.
63 Iserentant, D., Geenens, W., and Verachtert, H. (1996). Titrated acidification power: A simple and sensitive method to measure yeast vitality and its relation to other vitality measurements. J. Am. Soc. Brew. Chem., 54: 110-114.
64 James, TC, Campbell, S, Donnelly, D, Bond, U, (2003). Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions, J. Appl. Microbiol., 94 (3): 432-448.
65 Jenkins, CL, Kennedy, AI, Hodgson, JA, Thurston, P, Smart, KA, (2003). Impact of serial repitching on lager brewing yeast quality, J. Am. Soc. Brew. Chem., 61 (1), 1-9.
66 Jones, H., (1998). The contribution of yeast quality assurance to fermentation control and capacity, Proc. Aviemore Conf. Malt. Brew. Distill., Aviemore: 78-90.
67 Jones, R.P., (1987). Measurement of yeast death and deactivationant their meaning, Part I, Process Biochem. 22:118-128.
68 Jones, R.P., Greenfield, P.F., (1985). Replicative inactivation and metabolic inhibition in yeast ethanol fermentations, Biotech. Lett., 7: 223-228.
69 Jones, R.P., Pamment, N., Greenfield, P.F., (1981). Alcohol fermentation by yeast - the effect of environmental and other variables, Process Bioch., 16 (3): 42-49.
70 Kara, B.V., Daoud, I., and Searle, B. (1987). Assessment of yeast quality, Proc. 21st Eur. Brew. Conv. Congr., Madrid: 409-416. IRL Press Oxford, UK.
71 Kara, B.V., Simpson, W.J., and Hammond, J.R.M. (1988). Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. J. Inst. Brew., 94: 153-158.
72 Kenedy, A., (2000). Yeast handling in the brewery, Brewing Yeast Fermentation Performance: 129-134. Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, Oxford, UK.

73 Kennedy, A, (1999). Vitality testing of pitching yeast: does it add value, The Brewer, 9: 441-443.

74 King, L.M., Schisler, O.D., Ruocco, J.J., (1981). Epifluorescent method for detection of non-viable yeast, J. Am. Soc. Brew. Chem., 39: 52-54.

75 Koch, H.AS., Bandler, R., Gibson, R.R., (1986). Fluorescence microscopy procedure for quantification of yeasts in beverages, App. Environ. Microbiology, 52 (3): 599-601.

76 Kogin, A., Fukui, N., FuruKubo, S., Yomo, H, Kondo, H., Isoe, A., Katimi, Y., (1999). Regulation of protease activity in beer, Tech. Quarterly Master Brew. Assoc. of the Americas, 36 (1): 67-70.

77 Kurzweilová, H., Sigler, K., (1993). Fluorescent staining with bromocresol purple: A rapid method for determining yeast cell dead count development as an assay of killer toxin activity, Yeast, 9: 1207-1211.

78 Lentini, A. (1993). A review of the various methods available for monitoring the physiological status of yeast: Yeast viability and vitality, Ferment, 6: 321-327.

79 Lloyd, D., Dinsdale, G, (2000). From bright field to fluorescence and confocal microscopy, Brewing Yeast Fermentation Performance: 3-8. Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, Oxford, UK.

80 Manson, D.H., and Slaughter, J.C., (1986). Methods for predicting yeast fermentation activity. Proc. 2nd Aviemore Conf. Malt., Brew. and Dist.: 295-303. Aviemore, Inverness-Shire, Inst. Brew., Campbell, I.,Ed., London, UK.

81 Maric, V, Einsele, A., (1980). The influence of low dissolved oxygen levels in fermentors on ethanol production by Candida Tropicalis, Adv. Biotechnol., 1: 335-338.

82 Masini, A, Batani, D, Previdi, F, Milani, M, Pozzi, A, Turcu, E, Huntington, S, Takeyasu, H, (1999). Yeast cell metabolism investigated by CO_2 production and soft X-ray irradiation, Eur. Phys. J. Appl. Phys, 5 (1): 101-109.

83 Masschelein, CA, Carlier, A, Ramosjeunehomme, C, Abe, I, (1985). The effect of immobilization on yeast physiology and beer quality in continuous and discontinuous systems, J. Inst. Brew., 91 (3): 123-124

84 McCaig, R. (1990). Evaluation of the fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid for yeast viability determination, J. Amer. Soc. Brew. Chem., 48: 22-25.

85 McDonald, V.R., (1963). Direct microscopic technique to detect viable yeast cells in pasteurized orange drink, J. Food Science, 28: 135-139.

86 Miller, L.F., Mabee, M.S., Gress, H.S., Jangaard, N, (1977). An ATP bioluminescence method for the quantification of viable yeast for fermenter pitching, J. Am. Soc. Brew. Chem., 36: 59-62.

87 Mochaba, F, OConnorCox, ESC, Axcell, BC, (1996). Effects of yeast quality on the accumulation and release of metals causing beer instability, J. Am. Soc. Brew. Chem., 54 (3): 164-171.

88 Mochaba, F, OConnorCox, ESC, Axcell, BC, (1996). Metal ion concentration and release by a brewing yeast: Characterization and implications, J. Am. Soc. Brew. Chem., 54 (3): 155-163

89 Mochaba, F., O'Connor-Cox E.S.C., and Axcell, B.C. (1998). Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. J. Am. Soc. Brew. Chem., 56: 1-6.

90 Mochaba, F., Torline P., and Axcell, B. (1994). A novel and rapid method for the determination of glycogen in pitching yeasts, J. Am. Soc. Brew. Chem., 52: 145-147.

91 Mochaba, F.M., O'Connor-Cox, E.S.C., and Axcell B.C. (1997). A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release, J. Inst. Brew., 103: 99-102.

92 Mochaba, F.M., O'Connor-Cox, E.S.C., and Axcell B.C., (1995). Practical Implications of yeast protease activity, Proc. 5th Conv. Inst. Brew.: 152-158. (C & SA sect.), Victoria Falls.

93 Mochaba, F.M., Torline, P.A., Axcellm B.C., (1993). Resorufin-labelled casein as a substrate for protease activity in beer, Proc. 24th Eur. Brew. Conv.: 533-541, IRL Press, Oxford, UK.

94 Moonjai, N, Verstrepen, KJ, Delvaux, FR, Derdelinckx, G, Verachtert, H, (2002). The effects of linoleic acid supplementation of cropped yeast on its subsequent fermentation performance and acetate ester synthesis, J. Inst. Brew., 108 (2): 227-235

95 Moonsamy, N., Mochaba, F., Majara, M., O'Connor-Cox, E.S.C., and Axcell, B.C. (1995). Rapid yeast trehalose measurement using near infrared reflectance spectrometry, J. Inst. Brew. 101: 203-206.

96 Mück, E., and Narziss, L. (1988). The fermentation activity apparatus- A means for determining yeast vitality, Brauwelt Int., 6: 61-68.

97 Muller, S, Losche, A, Schmidt, M, Babel, W, (2001). Optimisation of high gravity and diet beer production in a German brewery by flow cytometry, J. Inst. Brew., 107 (6): 373-382.

98 Müller, W., Wehnert,G., and Scheper, T. (1988), Fluorescence monitoring of immobilized microorganisms in cultures. Analytica Chimica Acta, 213: 47-53.

99 Nishikawa, N., Noruma, B., (1974). Numerical evaluation of yeast deterioration caused by repeated fermentation, Proc. 13th Conv. Inst. Brew.: 105-112. (Austr. And N.Zealand Sect.), Surfers Paradise, Queensland.

100 Norton, S, Damore, T, (1994). Physiological effects of yeast-cell immobilization - Applications for brewing, Enzyme Microb. Technol., 16 (5), 365-375.

101 O'Toole, D.K., (1983). Methods for the direct and indirect assessment of the bacterial content of milk, J. Appl. Bacteriol., 55: 187-201.

102 O'Connor-Cox, E., Mochaba F.M., Lodolo, E.J., Majara, M. & Axcell B.C., (1997). Methylene blue staining: use at your own risk, Tech. Quarterly of the Master Brew. Ass. of the Americas, 34: 306-312.

103 O'Connor-Cox, ESC, Paik, J, Ingledew, WM, (1991). Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen, J. Indust. Microbiol., 8 (1): 45-52.

104 O'Connor-Cox, Majara, M.M., Lodolo, E.J., Mochaba F.M., Axcell B.C., (1996). The use of yeast glycogen and trahalose contents as indicators for process optimisation, Ferment, 9 (6): 321-328.

105 Odumeru, JA, Damore, T, Russell, I, Stewart, GG, (1993). Alterations in fatty-acid composition and trehalose concentration of saccharomyces brewing strains in response to heat and ethanol shock, J. Indust. Microbiol., 11 (2): 113-119.

106 Odumeru, JA, Damore, T, Russell, I, Stewart, GG, (1992). Effects of heat-shock and ethanol stress on the viability of a saccharomyces-uvarum (carlsbergensis) brewing yeast-strain during fermentation of high gravity wort, J. Indust. Microbiol., 10 (2): 111-116.

107 Ogrydziak, DM, (1993). Yeast extracellular proteases, Crit. Rev. Biotechnol., 13 (1), 1-55.
108 Olesen, K, Felding, T, Gjermansen, C, Hansen, J, (2002). The dynamics of the Saccharomyces carlsbergensis brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation, FEMS Yeast Res., 2 (4): 563-573.
109 Ormrod, IHL, Lalor, EF, Sharpe, FR, (1991). The release of yeast proteolytic-enzymes into beer, J. Inst. Brew., 97 (6), 441-443.
110 Parrou, J.L., Francois, J., (1997). A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole cells, Anal. Biochem., 49: 87-92.
111 Patino, H., Edelen, C., and Miller, J. (1993). Alternative measures of yeast vitality: Use of cumulative acidification power test and conductance, J. Am. Soc. Of Brew. Chem., 51: 128-132
112 Patino, H., Edelen, C., and Miller, J. (1993). Practical new measurements of yeast vitality using pH and conductance probes. Tech. Quarterly Master Brew. Assoc. Americas, 30: 98-103.
113 Peddie, F.L., Simpson, W.J., Kara, B.V., Robertson, S.C., and Hammond, J.R.M. (1991). Measurement of endogenous oxygen uptake rates of brewers' yeasts. J. Inst. Brew., 97: 221-25.
114 Peladin, F. And Leitz R. (1991). New method for the differential staining of dead and living cells of yeasts and bacteria, Proc. 23rd Eur. Brew. Conv. Congress, Lisbon: 481-487. IRL Press, Oxford UK.
115 Perry, B.F., Beezer, A.E., Miles, R.J., (1979). Flow microcalorimetry studies of yeast growth: fundamental aspects, J. Appl. Bacteriol., 47: 527-537.
116 Perry, B.F., Beezer, A.E., Miles, R.J., (1983). Characterization of commercial yeast strains by flow microcalorimetry, J. Appl. Bacteriol. 54: 183-189.
117 Philpott, J, Taylor, DM, Williams, DR, (1997). Use of microcalorimetry for assay of beer protease activity, J. Am. Soc. Brew. Chem., 55 (3): 99-102.
118 Pickerell, A.T.W., Hwang, A., and Axcell, B.C. (1991). Impact of yeast-handling procedures on beer flavour development during fermentation. J. Am. Soc. Brew. Chem., 49: 87- 92.
119 Pierce, JS. (1970). Institute of Brewing: Analysis Committee of the measurement of yeast viability, J. Inst. Brew., 76: 442-443.
120 Powell CD, Quain DE, Smart KA, (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation, FEMS Yeast Res., 3 (2): 149-157.
121 Powell, C.D., van Zandyke, D.E., Quain, K.E., Smart, K.A., (2000). Replicative ageing and senescence in s. cerevisiae and its impact on brewing fermentations, Microbiology, 146: 1023-1034.
122 Quain, D.E., (1981). The determination of glycogen in yeasts. J. Inst. Brew., 87: 289-291.
123 Quain, D.E., and Tubb, R.S. (1983). A rapid and simple method for the determination of glycogen in yeast. J. Inst. Brew., 89: 38-40.
124 Quain, D.E., (1988). Studies on yeast physiology-impact on fermentation performance and product quality, J. Inst. of Brew, 95: 315-323.
125 Quilliam, W, Hulse, G., Cameron-Clarke, A., (2000). Yeast management and fermentation performance: a brewer's perspective, Brewing Yeast Fermentation Performance: 189-199. Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, Oxford, UK.

126 Quilliam, W.R., (1997). Yeast handling and subsequent fermentation performance in a large modern brewery, Proc. 6th Conference: 61-66. C & SA Sect. Of the Inst. Brew, Durban.

127 Rees, EMR, Stewart, GG, (1999). Effects of magnesium, calcium and wort oxygenation on the fermentative performance of ale and lager strains fermenting normal and high gravity worts, J. Inst. Brew., 105 (4): 211-217.

128 Rees, EMR, Stewart, GG, (1997). The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts, J. Inst. Brew., 103 (5): 287-291.

129 Reicheneder, E., Narziss, L., (1987). Studies of damage to beer foam by yeast proteinases, Brauwelt Int., 2: 146-150.

130 Rhymes, MR, Smart, KA, (2001). Effect of storage conditions on the flocculation and cell wall characteristics of an ale brewing yeast strain, J. Am. Soc. Brew. Chem., 59 (1), 32-38.

131 P. Rodrigues, A. Barros, J. Rodrigues, A.A.Ferreira, C. Gonçalves, JRM Hammond, Yeast quality control in industrial brewing process, using vitaltitration a new method for vitality determination, Proceedings of the 29th International EBC Congress, Dublin, Ireland, no prelo.

132 Rodrigues, P.G, Barros, A.A., Rodrigues, J.A., Ferreira, A.A., Gonçalves, C. Gonçalves & Hammond, J.R.M., Poster nº 9, 115th MBAA Convention, October 18-20, 2002, Austin, Texas.

133 Rodrigues, P.G, Barros, A.A., Rodrigues, J.A., Ferreira, A.A., Gonçalves, C. Gonçalves & Hammond, J.R.M., Vitaltitration, a new method for assessment of yeast vitality status, Tech. Quarterly Master Brew. Ass. of the Americas, aceite para publicação no ano de 2003.

134 Rodrigues, U.M., Kroll, R.G., (!986). Use of direct epifluorescent filter technique for the enumeration of yeasts, J. Appl. Bactrerology, 61: 139-144.

135 Runkel, UD, Niemsch, K, (1981). The effect of yeast viability on the head retention of beer, Monatsschrift Fur Brauerei, 34 (5): 147.

136 Sablayrolles, JM, Ball, CB, (1995). Fermentation kinetics and the production of volatiles during alcoholic fermentation, J. Am. Soc. Brew. Chem., 53 (2), 72-78.

137 Sami, M, Ikeda, M, Yabuuchi, S, (1994). Evaluation of the alkaline methylene-blue staining method for yeast activity determination, J. Ferment. Bioeng., 78 (3), 212-216.

138 Schwartz, D.S., Larsh, H.W., Bartels, P.A., (1977). Enumerative fluorescent vital staining of live and dead pathogenic yeast cells, Stain Technology, 52 (4): 203-210.

139 Sendra, JM, Todo, V, Pinaga, F, Izquierdo, L, Carbonell, JV, (1994). Evaluation of the effects of yeast-strain and fermentation conditions on the volatile concentration profiles of pilot-plant lager beers, Mon.Schr. Brauwiss., 47 (10): 316-321.

140 Smart, K, (2000). The death of yeast cell, Brewing Yeast Fermentation Performance: 105-113. Ed. Katherine Smart, Blackwell Science, Oxford, UK.

141 Smart, K.A., (2001). Yeast Quality: Live and let dye, Brewers Guardian, 3: 24-28 .

142 Smart, KA, Boulton, CA, Hinchliffe, E, Molzahn, S, (1995). Effect of physiological stress on the surface-properties of brewing yeasts, J. Am. Soc. Brew. Chem., 53 (1): 33-38.

143 Smart, KA, Chambers, KM, Lambert, I, Jenkins, C, Smart, CA, (1996). Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality, J. Am. Soc. Brew. Chem., 57 (1): 18-23.

144 Smart, KA, Whisker, S, (1996). Effect of serial repitching on the fermentation properties and condition of brewing yeast, J. Am. Soc. Brew. Chem., 54 (1): 41-44.

145 Stoupis, T, Stewart, GG, Stafford, RA, (2002). Mechanical agitation and rheological considerations of ale yeast slurry, J. Am. Soc. Brew. Chem., 60 (2): 58-62.

146 Suihko, ML, Home, S, Linko, M, (1993). Wort sugars, yeast sugar uptake and beer quality, Mon.Schr. Brauwiss., 46 (5): 185-192.

147 Teass Jr., H.A., Valentine, A., (2000). Analysis of yeast data as to its live and total concentration cell count using a new optical method suitable for beer fermentation and cropping optimisation. Poster presented at the Word Brewing Congress, July 29-August 2, Orlando, Florida, USA.

148 Trevors, J.T., (1983). A note of viability measurements in Saccharomyces spp, Biotechnol. Lett, 5 (5): 363-364.

149 Vincent, S., Boyd, A., Attfield, P., Rogers, P., and Veal, D. (2000). Flow cytometry in the brewery, Proceedings, 26th Conv. Inst. Brew. (Asia-Pacific Sect.): 79-81.

150 Wackerbauer, K, Bechmann, M, (2003). Preservation of Brewers Yeast Part 2: The influence of preservation on yeast vitality and beer quality, Brauwelt International, 21 (2): 98-108.

151 Wackerbauer, K, Ludwig, A, Mohle, J, (2002). Improvement of long term stability in main fermentations with immobilized yeast - II. Trials in MPI-reactor and evaluation of yeast vitality in the immobilized system, Mon.schr. Brauwiss., 55 (9-10), 172-181.

152 Wheatcroft, R., Lim, Y.H., Hawthorne, D.B., Clarke, B.J., Kavanagh, T.E. (1988). An assessment of the use of specific oxygen uptake measurements to predict the fermentation performance of brewing yeasts, Proc. 20th Conv. Inst. Brew.: 193-199. (Austr. & N.Zealand Sector), Brisbaine.

153 Whitear, AL, (1991). The impact of scientific measurement on the brewing process, J. Inst. Brew., 97 (1), 47-51.

154 Willetts, J.C., Seward, R, Dinsdale, M.G., Suller, T.E., Hill, B, Lloyd,D., (1997). Vitallity of cider yeast grown micro-aerobically with added ethanol, butal-1-ol or isso-butanol, J. Inst. of Brew., 103: 79-84.

155 Yeast viability by slide culture, Microbiology, Yeast - 6, Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists, 8th Ed., 1992, St. Paul, Minesota, USA.

156 Yokoi, S, Shigyo, T, Tamaki, T, (1996). A fluorometric assay for proteinase A in beer and its application for the investigation of enzymatic effects on foam stability, J. Inst. Brew., 102 (1): 33-37.

PARTE IV

METALOTIONEÍNAS COMO BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL DE PEIXES A METAIS PESADOS

Nas últimas décadas tem-se assistido a um considerável crescimento da atenção e preocupação dos efeitos da actividade humana sobre o meio ambiente. No que respeita particularmente à poluição química, tem-se descoberto muitos dos efeitos que este tipo de agressão pode ter sobre organismos vivos, sobre populações e mesmo sobre ecossistemas, o que tem levado ao aparecimento de muita legislação restritiva e até mesmo proibitiva do fabrico e utilização de muitos produtos químicos.

Presentemente, a maioria da informação sobre os níveis de poluição ambiental provém da análise química convencional, aplicada directamente à quantificação de poluentes. Embora de grande utilidade, este tipo de informação tem um carácter limitado, uma vez que o uso destas metodologias não permite prever os efeitos da exposição a médio-longo prazo dos poluentes em organismos vivos, mesmo quando estes se encontram presentes a nível moderado. Como complemento, o recurso a estudos de biomonitorização permite-nos obter informação de conjunto que, uma vez integrada, fornece informações sobre o impacto e alterações que a exposição aos agentes tóxicos tem nos organismos vivos.

Como anteriormente referido, a biomonitorização consiste no estudo de um biomarcador que se forma como resposta biológica a uma dada indução. Os efeitos biológicos que os poluentes químicos do ambiente podem causar em organismos vivos podem, desta forma, servir de indicador do grau de poluição e quantificar as alterações que o agente tóxico induz.

Entre estes indicadores biológicos encontramos as metalotioneínas, que são proteínas de baixo peso molecular, ricas em grupos sulfidrilo e que, presumivelmente, estão envolvidas na homeostase do Cu e do Zn em condições metabólicas normais. Uma das suas características mais conhecidas é o facto de a sua síntese e acumulação ser induzida "in vivo" quando os organismos são expostos a níveis excessivos de catiões de metais pesados incorporados do meio ambiente. Os organismos vivos sintetizam as metalotioneínas como uma forma de se defenderem dos efeitos perniciosos da exposição aos metais pesados. É, portanto, esta função biológica particular que faz das metalotioneínas compostos ideais para uso como biomarcadores para a avaliação da exposição de seres vivos a metais pesados.

Devido à importância da determinação destas proteínas em amostras biológicas tornou-se necessário desenvolver metodologias simples, fiáveis, especificas e sensíveis para a determinação de metalotioneínas, como alternativas vantajosas em relação a outros métodos já existentes, como a incorporação de isótopos e os métodos imunulógicos.

Os métodos electroquímicos, em especial a polarografia diferencial por impulsos, tem sido uma das alternativas propostas, dada a sua simplicidade e sensibilidade. Neste trabalho é proposto um método de determinação de metalotioneínas baseado na voltametria de redissolução catódica com adsorção, que permite baixar substancialmente os limites de detecção e reduzir factores de interferência, para além de ser de execução mais rápida e simples do que o método polarográfico.

No método desenvolvido é utilizado um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa e adiciona-se catião cobre (II) à solução de análise. Os complexos MT-Cu (II) formados em solução adsorvem à superfície do eléctrodo de mercúrio, reduzindo-se reversivelmente durante o varrimento de potencial em onda quadrada. Este método voltamétrico foi aplicado à determinação de metalotioneínas em amostras biológicas extraídas de fígados de trutas e percas, previamente submetidos a testes toxicológicos sub-letais, respectivamente com cádmio (II) e cobre (II). No caso das percas o estudo de biomarcação permitiu verificar a potencialidade do uso deste animal, comum no rio Douro, para uma futura aplicação no controlo da sua exposição ambiental ao CuSO4, usualmente utilizado na Primavera/Verão para sulfatagem das vinhas no vale do Douro.

1. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE AS METALOTIONEÍNAS

1.1. Metalotioneínas - estrutura e funções

As metalotioneínas constituem uma superfamília de metaloproteínas e metalopéptidos de baixo peso molecular, com um conteúdo em enxofre e metais muito elevado. Estas encontram-se disseminadas, virtualmente, em todos os tipos de organismos vivos, o que as torna potenciais biomarcadores universais, revelando que a sua função permanece importante e inalterada provavelmente desde os primórdios da vida.

Nas plantas as metalotioneínas adquirem geralmente um nome particular, sendo geralmente mais conhecidas como fitoquelatinas; nos animais, dada a sua maior complexidade, as metalotioneínas não se encontram uniformemente distribuídos pelos tecidos aparecendo principalmente nos tecidos parênquimatosos como o fígado, o rim, o pâncreas e o intestino. A concentração das metalotioneínas nos organismos varia de acordo com alguns factores como a idade, o estado de desenvolvimento, o regime dietético, a história de exposição a metais e a presença de alguns outros factores. Embora estas proteínas possuam uma acção marcadamente de âmbito intracelular podem, em casos particulares, também encontrar-se no plasma, urina e bílis, sob forma de produtos de excreção corporal, quando os seus valores de concentração se encontram acima dos valores críticos, como por exemplo, para a excreção de metais pesados em excesso.

Através da análise da sequência de setenta amino-ácidos de metalotioneínas de diferentes espécies de animais vertebrados e invertebrados, deduziu-se a existência de uma relação filogenética entre elas, o que indica que estas proteínas foram separadas antes do aparecimento dos mamíferos. Os estudos filogenéticos da superfamília de metalotioneínas existente na biosfera mostram a existência de cerca de 260 estruturas deste tipo de proteínas nos eucariotas (células com núcleo).

A descoberta deste importante grupo de proteínas deu-se em 1957 por Margoshes e Vallee [84], quando no córtex de um rim de um cavalo foi descoberta uma proteína ligada ao cádmio. Inicialmente, considerou-se que a presença desta proteína estava relacionada com um mecanismo de desintoxicação do cádmio acumulado no tecido renal dos animais; actualmente sabe-se que é responsável pela acumulação natural de

metais no organismo. Estas proteínas devem o seu nome de metalotioneínas ao seu elevado conteúdo relativo de enxofre (4.1%/g peso seco) e de metais (2.9% Cd e 0.6% Zn) [93].

Desde então o estudo das metalotioneínas tem vindo a ser aprofundado, verificando-se particularmente nos últimos 15 anos um aumento substancial de estudos publicados, o que veio revelar que estas proteínas possuem vários papeis biológicos fundamentais, como: a fixação de micronutrientes essenciais como o cobre e o zinco, o controle das concentrações dos iões livres destes elementos e a regulação do seu fluxo para distintos destinos celulares, a protecção contra o "stress" celular e, ainda, como mecanismo de defesa contra concentrações excessivas de elementos tóxicos como os catiões metálicos, entre outros [1, 31].

Tabela IV-1. Algumas propriedades características particulares das metalotioneínas [93].

Peso Molecular: 6000-7000 Da
Mais de 20 Cisteínas, todas na forma reduzida
Presença de amino-ácidos não comuns: N-acetilmetionina, C-alanina
Ausência de amino-ácidos aromáticos e de histidina
Estrutura ternária com centros de complexação de metais
Conteúdo metálico: Cd, Zn, Cu, Hg representando 4-10 % peso da proteína
Absorção a 250 nm(Cd), 225 nm (Zn), 275 nm (Cu), 300 nm (Hg)
Síntese induzida por metais pesados
Ausência de ligações dissulfureto
Estabilidade térmica

1.1.1. Características e estrutura das metalotioneínas

As metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular, 6000 e 7000 Da, ricas em cisteínas, todas na sua forma reduzida, que lhe conferem a capacidade de se ligar a um total de 7 iões metálicos bivalentes. A sua estrutura é caracterizada pela existência de dois domínios (domínio-α e domínio-β) perfeitamente independentes, que não possuem entre si quase nenhum contacto à excepção da região de ligação entre ambos como se pode observar na figura IV-1.

Nos mamíferos, as metalotioneínas contêm entre 60 a 68 resíduos de amino-ácidos, dos quais 20 são cisteínas (Cys), geralmente numa razão de 1:3, onde raramente estão presentes amino-ácidos aromáticos. Estas proteínas têm a capacidade de se ligar tanto a metais essenciais (zinco e cobre), como a metais não essenciais (mercúrio, ouro, chumbo, cádmio, etc.), metais que, ao ligarem-se à proteína, se agrupam nos seus dois domínios. Estes não interagem entre si e contêm diferente número de cisteínas (ligandos), pelo que são capazes de formar agregados organometálicos com distinta estabilidade termodinâmica e labilidade cinética. O domínio α (C-terminal) das metalotioneínas contem 11 Cys capazes de fixar quatro átomos do metal; por sua vez o domínio β (N-terminal) possui 9 Cys que fixam mais três átomos do metal. Os iões divalentes, como o zinco e o cádmio, coordenam-se tetraedricamente com as quatro cisteínas.

A ligação de iões monovalentes à metalotioneína apresenta uma estequiometria bastante diferente da estequiometria existente para iões divalentes. Cada molécula de metalotioneína é neste caso capaz de se ligar a 12 iões metálicos monovalentes.

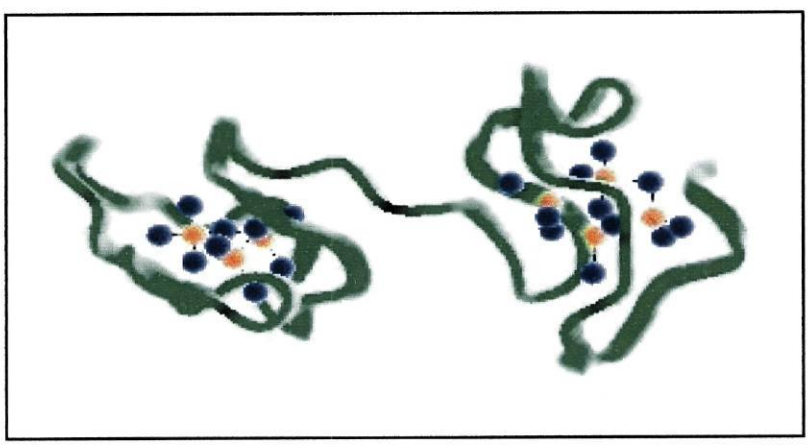


Figura IV-1. Estrutura terciária de metalotioneína complexando 7 catiões metálicos divalentes (cor laranja). A azul apresentam-se as cisteínas envolvidas na complexação nos dominios α (direito) e β (esquerdo) [67].

As metalotioneínas possuem três diferentes tipos de estrutura: primária, secundária, ternária, não possuindo neste caso estrutura do tipo quaternária [34, 66, 49, 107, 132].

ESTRUTURA PRIMÁRIA

A proteína é constituída por uma única cadeia polipeptídica, cuja sequência de amino-ácidos, a chamada estrutura primária, tem sido altamente conservada através da evolução, com mudanças conservativas, quer no que diz respeito à estrutura dos amino-

ácidos, quer às propriedades químicas e de preenchimento dimensional que originam. Por este motivo é possível encontrar nas diferentes isoformas de metalotioneínas motivos estruturais constantes envolvendo cisteínas, como Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys, Cys-X-Cys-Cys, onde X é outro amino-ácido que não a cisteína [73].

Só em mamíferos conhecem-se 37 metalotioneínas em que 56 % de todos os resíduos de amino-ácidos são conservados, entre os quais todas as cisteínas e quase todas as lisinas e argininas. Quase todas as substituições de amino-ácidos são conservadas no que diz respeito às características químicas dos resíduos. A existência de apenas uma cadeia polipeptídica inviabiliza desde logo a existência de estrutura quaternária.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA

As metalotioneínas apresentam apenas uma estrutura secundária (estrutura resultante de uma primeira conformação básica da cadeia polipeptídica) significativa em toda a molécula, que é uma pequena α-hélice que é formada no domínio-α aquando da ligação dos iões bivalentes, e que permite dar à proteína uma configuração tal que facilita a união dos restantes iões à proteína.

ESTRUTURA TERNÁRIA

A apo-proteína[1] existe como um polipéptido com forma de espiral aleatória, a qual apenas adopta a sua forma estruturalmente activa após complexação dos metais, adquirindo então uma estrutura tridimensional com uma conformação típica das metalotioneínas (estrutura ternária).

Embora a sequência de amino-ácidos possa variar entre as diferentes isoformas de metalotioneínas quer dentro das mesmas espécies quer entre espécies diferentes, estas possuem estruturas ternárias mesmo muito similares. Toda as metalotioneínas apresentam, portanto, dois domínios proteicos, designados de α e β, contendo no seu interior respectivamente quatro e três unidades tetraédricas no caso de os iões serem divalentes (M^{2+}), como se pode observar na figura IV-2 para o caso do Cd^{2+}. Embora estruturalmente similares os locais de ligação do domínio α são cerca de 30 vezes mais estáveis do que os do domínio β.

Estes dois domínios apresentam pouca interacção entre si uma vez formados os complexos, de tal forma que se comportam como pseudo-dímeros nesta situação. No

[1] Polipéptido sem qualquer metal complexado

entanto, quando se inicia a complexação existe um certo grau de interacção entre ambos ocorrendo alterações na estrutura ternária de forma a facilitar a ligação de outros iões, segundo um mecanismo sequencial e cooperativo [41].

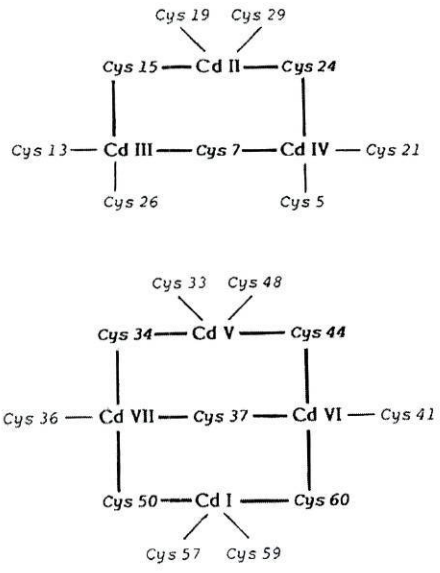


Figura IV-2. Coordenação Cd–Cys numa Cd_7-MT de fígado humano [73].

1.1.2. Funções biológicas das metalotioneínas

Existe um grande número de factores que estimulam a biossíntese das metalotioneínas, tal como se pode constatar na tabela IV-3, o que indica que estas não possuem uma única função especifica mas antes muitas funções [97, 101, 120]. Contudo, a ideia mais difundida é que as metalotioneínas actuam de uma forma protectora limitando as concentrações intracelulares dos iões metálicos reactivos e protegendo as estruturas celulares das influências de metais tóxicos como o cádmio, o mercúrio, a platina, o bismuto, a prata, o ouro, entre outros [44, 51, 52, 57, 61, 126]. Verifica-se, no entanto, que existem outras evidências que indicam que, provavelmente, as metalotioneínas possuem também outros papeis específicos a nível celular, como a conservação da estrutura das metalotioneínas ao longo da evolução biológica, a redundância dos genes e, ainda, a síntese programada de metalotioneínas durante o desenvolvimento, regeneração e reprodução celulares.

Na realidade, em condições normais a sua principal função é a regulação dos níveis de micronutrientes metálicos essenciais, como por exemplo o zinco e o cobre, através da fixação intracelular de metais essenciais (como micronutrientes), do controle da

concentração de iões livres desses elementos e, ainda, regulando a corrente de metais pesados para diferentes destinos celulares [123, 24]. Verifica-se, portanto, que as metalotioneínas constituem um reservatório destes micronutrientes que, "*in vivo*", se envolvem directamente na passagem e recolha de metais para activação ou desactivação de metaloproteínas e metaloenzimas, actuando como metaloreguladores. Embora seja este papel regulador a mais destacada das suas funções celulares, as metalotioneínas ganharam notoriedade como agentes de resposta celular contra agressões, dado que existe um aumento da sua produção como resposta a vários agentes tóxicos (ver tabela IV-3), contribuindo para a redução da toxicidade desses agentes.

Também foi sugerido um papel das metalotioneínas na aptotose (morte celular) evidenciado pela observação de que a presença de metalotioneínas nas células induz efeitos anti-apoptóticos, enquanto que a ausência de metalotioneínas nas células leva a um aumento da susceptibilidade para a morte celular [109, 129].

Ainda que indirectamente, foram várias as patologias às quais foram associadas as metalotioneínas e onde existe interesse de as utilizar como biomonitores de vários estados patológicos.

Tabela IV-2. Patologias humanas relacionadas com a desregulação dos níveis de metalotioneínas.

Agente Directamente Envolvido	Órgão	Patologia
Cádmio	Rins	Proteinúria, calciúria
Cobre	Fígado	Wilson
Cobre	Placenta	Menke
Cobre	Fígado	Cirrose indiana
GIF	Cérebro	Alzheimer
Desconhecido	Fígado	Diabetes melllitus

1.1.3. Factores de indução da síntese de metalotioneínas.

A síntese de metalotioneínas é facilmente induzida por uma enorme quantidade de factores intrínsecos e extrínsecos, capazes de influenciar a extensão da indução quer quantitativamente quer ao longo do tempo. De entre os factores intrínsecos aos próprios indivíduos refiram-se o tipo de organismo, o tecido, a idade, o estado de desenvolvimento, o regime dietético, o historial de exposição a agentes indutores [5, 29]. De entre os factores extrínsecos, a indução por níveis excessivos de catiões metálicos é o mais conhecido, mas há outros como se observa na tabela IV- 3.

Relativamente à aplicação que vai ser desenvolvida em peixes, verifica-se que a indução das metalotioneínas nestes animais ocorre em especial no fígado, rins e brânquias [36, 59]. O fígado, por ser o tecido onde ocorre maior síntese proteica, é o local onde a concentração destas proteínas é maior e onde é mais sensível o aumento das metalotioneínas por indução pelos catiões metálicos [108, 124], sendo por este motivo utilizado nas análises que se desenvolvem nesta tese.

Tabela IV-3. Factores que induzem a síntese de metalotioneínas.[2]

Iões metálicos	**Vitaminas**
Cd, Zn, Cu, Pb, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi	Ac. ascórbico
Hormonas e mensageiros secundários	Retinoato
Glucocorticóides	1,25-dihidroxivitamina D_3
Progesterona	**Outros compostos orgânicos**
Estrogénios	Etanol
Catecolaminas	Isopropanol
Glucagon	Formaldeído
Angiotensina II	Ácidos gordos
Vasopressina	Butirato
Adenosina	Clorofórmio
cAMP	Tetracloreto de carbono
Diacilglicerol	Bromobenzeno
Cálcio	Iodoacetato
Factores de crescimento	Etionina
Insulina	2,3-dimercaptoetanol
Agentes de inflamação e citoquinas	2,3-dimercaptosuccinato
Lipopolissacarídeos (LPS)	EDTA
Endotoxinas	**Condições produtoras de "stress"**
Interleucina-1	Fome
Interleucina-6	Infecção
Interferão-α	Inflamação
Interferão-χ	Laparotomia
Promotores de tumores e oncogenes	"Stress" físico
Antibióticos	Radiação X
Agentes Citotóxicos	Radiação ultravioleta
	Elevada tensão de O_2

1.2. Metalotioneínas como biomarcadores de exposição a catiões pesados

Alguns metais pesados são considerados elementos essenciais pois constituem co-factores de diversas metaloenzimas e metaloproteínas; contudo, há outros que não possuem qualquer relevância biológica sendo, pelo contrário, elementos tóxicos perigosos. Apesar desta distinção dos metais pesados segundo a sua relevância biológica, na realidade todos eles são tóxicos, embora com níveis de toxicidade diferentes. Destacam-se, ainda, aqueles que são bioacumuláveis e que, por isso, quando presentes em quantidade superior à de capacidade de depuração dos organismos, aumentam a sua concentração de forma crónica. Precisamente por serem fortemente bioacumulados, o cádmio, o mercúrio, o chumbo e o arsénio são considerados muito tóxicos.

Apesar de reconhecida a toxicidade dos metais pesados quando presentes em concentrações elevadas, as células possuem mecanismos de protecção contra a acção nociva destes elementos, dos quais se destaca a produção das metalotioneínas. Estas complexam os catiões destes metais reduzindo a sua toxicidade relativa, na medida em que nesta forma não livre os catiões ficam inibidos de induzir maiores danos [74, 75, 94]. Está hoje em dia perfeitamente estabelecido que a produção de metalotioneínas é tanto maior quanto maior a exposição a metais pesados, o que tem permitido o seu uso como biomarcadores de exposição de indivíduos a concentrações excessivas destes agentes tóxicos [3, 6, 9, 13, 14, 17, 22, 27, 28, 53, 54, 62, 69, 79, 82, 96, 125, 127].

No que diz respeito ao uso de metalotioneínas como biomarcadores de exposição de peixes a metais pesados, estas têm sido principalmente utilizadas para estudos de qualidade de cursos de água e mesmo de água de mar [35, 81, 98, 99, 128]. Recorrendo às metalotioneínas tem sido possível determinar a poluição aquática proveniente da actividade industrial e de contaminação urbana[15, 18, 50, 121], bem como avaliar a biodisponibilidade relativa dos catiões metálicos em diversos locais[8, 56, 103, 115], permitindo contornar os problemas associados com a análise físico-química simples dos metais pesados no meio ambiente.

1.3. A voltametria na quantificação de metalotioneínas

1.3.1. Métodos de determinação das metalotioneínas

Têm sido desenvolvidos vários métodos de determinação de metalotioneínas que, contudo, por vezes nos dão informações distintas quanto à sua concentração e isoformas quantificadas [32, 76, 122, 133]. As diferenças por vezes encontradas suscitam a necessidade de uma harmonização dos métodos de quantificação utilizados, quer quanto à detecção, quer quanto à preparação de amostras. Este último factor é muito importante na medida em que o efeito de matriz pode ser muito variável consoante o tipo de tecido, de indivíduo, de estado nutricional, idade, entre muitos outros factores [11, 65, 102].

Os métodos actuais de quantificação de metalotioneínas em material biológico utilizam uma das cinco seguintes abordagens: a quantificação do mRNA/DNA das metalotioneínas, que reflecte o nível de expressão genética da informação para a produção destas proteínas; a quantificação de metais nos complexos com as metalotioneínas; a determinação da parte proteica da metaloproteína por métodos imunulógicos; a determinação espectroscópica; e, por fim, a determinação dos grupos – SH por métodos voltamétricos.

A determinação do nível de expressão genómica da informação para a produção das metalotioneínas tem sido desenvolvida nos últimos anos, sendo actualmente possível a sua determinação por via de técnicas de PCR/PCR-inversa ("Polimerase Chain Reaction") [43, 70, 77, 116]. O uso destas técnicas tem sido apontado como bastante promissor para determinação e quantificação de picos de indução revelando-se, contudo, bastante limitado na quantificação dos níveis totais destas proteínas na célula, na medida em que não reflecte o grau de transcrição nem de "turn-over" das proteínas "*in vivo*".

Os métodos imunológicos podem ser realizados recorrendo a vários dos anticorpos comerciais existentes para as diferentes isoformas de metalotioneínas MT-I, MT-II e MT-III. Dadas as limitações de especificidade destes anticorpos monoclonais, verifica-se que este tipo de análise sofre de falta de especificidade, dado o baixo grau de reactividade inter-espécies que pode ocorrer. De entre estes métodos imunulógicos os mais utilizados são o radioimunoensaio (RIA) e os ensaios imunoadsorventes ligados à enzima (ELISA) [2, 7, 10, 16, 23, 39, 64, 68, 91].

Como as metalotioneínas não possuem actividade enzimática, não é possível determinar a sua quantidade por acção de uma determinada actividade; contudo, podem ser quantificadas indirectamente por avaliação dos metais que a elas estão complexados [7, 71, 91, 100]. Embora bastante utilizada, esta aproximação sofre de falta de especificidade e faz uma suposição questionável da estequiometria, para além de dar origem, frequentemente, a erros sistemáticos, por ser difícil quantificar o conteúdo em metais que já existiam inicialmente.

Os métodos que recorrem à quantificação espectroscópica (espectrofotométrica e espectrofluorimétrica), após separação por cromatografia líquida [19, 20, 21, 45, 71, 85, 87, 92, 114, 131] ou electroforese capilar [4, 86], têm encontrado grandes limitações de uso em tecidos biológicos dada a sua baixa sensibilidade, muitas vezes incapaz de detectar estas proteínas.

A determinação de metalotioneínas por voltametria utilizando o eléctrodo de gota de mercúrio, em especial recorrendo à polarografia diferencial por impulsos, tem sido uma técnica usada por vários autores e que tira partido do elevado conteúdo destas moléculas em cisteínas [33, 37, 38, 89, 90, 95, 96, 100, 105, 113, 135]. A polarografia diferencial por impulsos parece ser um método muito aceitável para quantificar metalotioneínas em amostras biológicas; no entanto, alguns aspectos podem ser melhorados com a utilização de outros métodos voltamétricos, em especial no que diz respeito aos limites de detecção.

Independentemente do processo de determinação é sempre necessário o tratamento das amostras, segundo diferentes processos de purificação [55, 88]. Entre estes, os mais utilizados são a centrifugação e a desnaturação, aproveitando duas características particulares destas proteínas, respectivamente: o seu baixo peso molecular e a sua elevada estabilidade térmica. Com este processo é possível obter extractos em que as únicas proteínas termoestáveis que permanecem em solução e que possuem actividade electroquímica são as metalotioneínas [22, 42, 96].

1.3.2. Voltametria das metalotioneínas na gota de mercúrio

Devido à falta de uma actividade biológica quantificável, a determinação das metalotioneínas tem sido problemática e os investigadores vêm-se forçados a considerar apenas aspectos estruturais da molécula no estabelecimento dos procedimentos analíticos.

É, precisamente, através da quantificação dos grupos SH das cisteínas existentes nas metalotioneínas que se baseia a detecção electroquímica destas. Estes grupos sulfidrilo podem ser determinados com vários tipos de eléctrodos; contudo, o uso de eléctrodos sólidos é bastante problemático pois fácil e rapidamente se contaminam, sendo extremamente difícil a sua limpeza. Por esta razão, o eléctrodo de gota de mercúrio tem sido o único a ser utilizado com assinalável sucesso; para além da facilidade de renovação do eléctrodo em cada análise (uma nova gota), verifica-se que o mercúrio é especialmente reactivo em relação a estes grupos SH, possuindo elevada sensibilidade.

A determinação polarográfica de grupos SH foi primeiro descrita por Brdicka em 1933 [12], com base na formação de ondas catalíticas duplas de proteínas contendo SS/SH num electrólito de suporte de cloreto de hexaminocobalto [104]. Contudo, a potenciais adequados, o próprio mercúrio é exigido e reage com os grupos SH-, sendo possível a determinação directa das proteínas por redução dos aductos mercúrio-cisteínato assim formados [112]. O uso de voltametria com adsorção baseada em complexos de cobre com grupos SH das cisteínas tem sido também usada na determinação de proteínas, pequenos péptidos e mesmo cisteína simples [46, 47, 48, 78, 106, 118, 119, 130].

O uso de técnicas voltamétricas com pré-acumulação permite o aumento da sensibilidade da análise sendo neste trabalho explorada a determinação de metalotioneínas baseadas em duas técnicas distintas; a voltametria de redissolução catódica (CSV) e a voltametria com adsorção. Os mecanismos de pré-acumulação das metalotioneínas no eléctrodo de mercúrio ainda não se encontram perfeitamente estabelecidos, embora se admite um comportamento similar a outros compostos sulfurados electroquimicamente activos cujos mecanismos são já perfeitamente conhecidos.

Os grupos electroactivos das metalotioneínas são os mesmos que estão envolvidos nos mecanismos de pré-acumulação e correspondem aos seus resíduos de cisteína. Independentemente do mecanismo de pré-acumulação, forma-se um filme à superfície da gota de mercúrio que é prontamente redissolvido quando se aplica um varrimento catódico.

Com a presença em solução de catião cobre (II), os mecanismos de pré-acumulação e redução das metalotioneínas são distintos, verificando-se a formação prévia de um complexo Cu-MT, o qual adsorve à superfície do eléctrodo de mercúrio. Neste caso, durante a redução, dá-se a decomposição deste complexo, libertando-se a

metalotioneína na sua forma reduzida e ficando o cobre amalgamado na gota de mercúrio.

A adição de catião cobre (II) permite a obtenção de um sinal voltamétrico a um potencial diferente do da metalotioneína simples, para além de substituir todos os outros catiões nos complexos com a proteína. De facto, a afinidade do catião cobre (II) para a metalotioneína é a maior de entre os catiões de metais pesados mais comuns, sendo cerca de 100 vezes maior do que a do catião cádmio (II) e 100.000 vezes maior que a do catião zinco (II). Nestas condições, adicionando-se catião cobre (II) em excesso forma-se, preferencialmente, o complexo Cu–tioneína (Cu-MT), o que permite ter todas as metalotioneínas sob uma única forma complexada e electroquimicamente activa.

Nos mecanismos seguidamente apresentados, cada um dos grupos de metalotioneína indicados como (SH) correspondem a diferentes resíduos de cisteína.

Propostas de mecanismos de pré-concentração:

→ **sem cobre em solução** [60, 72, 83, 117, 118, 119, 134] (voltametria de redissolução catódica com oxidação do eléctrodo de mercúrio)

Mecanismo 1

$$MT(SH)_2\ (sol) + Hg\ (M) \longleftrightarrow [HgMT(S)_2]\ (s) + 2H^+ + 2e^-$$

Mecanismo 2

$$MT(SH)_2\ (sol) \longleftrightarrow [MT(SH)_2]_{ads}$$

$$[MT(SH)_2]_{ads} + Hg\ (M) \longleftrightarrow [HgMT(S)_2]\ (s) + 2H^+ + 2e^-$$

→ **com cobre em solução** [48] (adsorção do complexo de catião cobre (II)

$$Cu(II) + MT(SH)_2\ (sol) \longleftrightarrow [CuMT(S)_2]_{sol} + 2H^+$$

$$[CuMT(S)_2]_{sol} \longleftrightarrow [CuMT(S)_2]_{ads}$$

Propostas de mecanismos de redução no eléctrodo de mercúrio

→ **sem cobre em solução** [78, 119]

$$[HgMT(S)_2]\ (s) + 2H^+ + 2e^- \longleftrightarrow MT(SH)_2 + Hg\ (M)$$

→**com cobre em solução** [48, 78]

$$[CuMT(S)_2]_{ads} + Hg\ (M) + 2H^+ + 2e^- \longleftrightarrow MT(SH)_2 + CuHg\ (amalgama)$$

2. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO VOLTAMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS

Neste trabalho foi desenvolvido um método para a análise de metalotioneínas usando voltametria de redissolução catódica com adsorção. O método foi ensaiado na determinação de metalotioneínas em extractos de fígado de peixe para posterior utilização como biomarcadores de exposição ambiental a catiões de metais pesados.

O trabalho baseou-se nos estudos publicados por Scarano e Morelli [110], nos quais se faz uma primeira abordagem à possibilidade de se utilizar voltametria de adsorção para a determinação de metalotioneínas na presença de catião cobre (II) em solução. Utilizaram-se à partida, o mesmo meio tampão e o mesmo pH propostos nesse estudo os quais, posteriormente, vieram a confirmar-se como sendo as condições mais adequadas para a análise. Ainda no decurso deste trabalho foi estudada a possibilidade de quantificação de metalotioneínas por voltametria de redissolução catódica; contudo o facto de diferentes formas de complexos MT-M^{n+} possuírem distintos potenciais de redução [25, 26, 89], torna complexa a quantificação do total de metalotioneínas, pois seria necessário quantificar e somar todos os picos individualmente e posteriormente somar os valores respectivos.

Neste trabalho é utilizado um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, usando varrimento de potencial de onda quadrada em vez do varrimento diferencial por impulsos. Deste modo exploraram-se características electroquímicas da metalotioneínas como a rapidez da reacção no eléctrodo e a sua reversibilidade, o que possibilita um aumento da sensibilidade e da velocidade de análise.

A optimização do novo método de análise de metalotioneínas é feita primeiro em soluções modelo padronizadas e, posteriormente, em soluções contendo extracto de fígado, de modo a aferir a capacidade de uso do método para estudos de biomarcação.

2.1. Instrumentação, reagentes e soluções

2.1.1. Instrumentação

O trabalho foi realizado utilizando um sistema voltamétrico Autolab® PGSTAT 10 da (Eco Chimie®), controlado via PC através do software GPES® para Windows® - versão 4.7. O posto de voltametria Metrohm® 663 VA Stand estava equipado com um eléctrodo de gota de MME da Metrohm® ajustado em modo SMDE, com tamanho de gota 3. O sistema potenciostático de três eléctrodos é completado com eléctrodo auxiliar de carbono vítreo e um eléctrodo de referência de AgCl/Ag (3M KCl).

Tabela IV-4. Equipamentos utilizados na preparação das várias soluções utilizadas.

Medidor de pH	Metrohm® 605 com eléctrodo de pH
Micropipetas	Gilson® (P200, P1000)
Balança Analítica	Mettler® AE50
Balança Ultra-Analítica	Mettler® PE2000

2.1.2. Reagentes, soluções e padrões

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de elevada pureza ("analytical grade"), e a água utilizada para a preparação de soluções é ultra-pura obtida de um sistema de purificação Millipore® Simplicity System. A solução tampão borato 0,02M utilizada, é preparada semanalmente a partir de ácido bórico (Panreac®), e o pH é ajustado a 8,10 com hidróxido de sódio 1M.

As soluções padrão de metalotioneína com uma concentração de $2x10^{-5}$M foram preparadas por dissolução em água de metalotioneína I de fígado de coelho (Sigma), assumindo um peso molecular de 6500, cuja massa é previamente pesada na balança ultra-analítica. A solução padrão de metalotioneína após ser preparada é dividida em alíquotas de 1,0mL e congelada em *"eppendorfs"* a –21°C. Cada porção uma vez retirada do congelador e descongelada não voltou a ser congelada.

As soluções padrão de catião cobre (II) utilizadas para posterior adição à célula voltamétrica são preparadas por diluição em água, da quantidade adequada de uma

solução padrão comercial de catião cobre (II) de 1000mg/L em 1M HNO_3, Reagecon®, Irlanda.

Tabela IV-5. Reagentes utilizados na preparação das várias soluções necessárias para o trabalho experimental.

Reagente		Pureza	Marca
2-Mercaptoetanol	C_2H_5OSH	Puro (99 %)	Merck®
Ácido Bórico	BO_3H_3	Ultrapuro	Panreac®
Ácido clorídrico	HCl	pro analysis	Merck®
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	pro analysis	Merck®
Cloreto de sódio	NaCl	pro analysis	Merck®
Hidróxido de sódio	NaOH	pro analysis	Merck®
Solução de catião cádmio (II)	Cd^{2+}	pro analysis	Reagecon®
Solução de catião cobre (II)	Cu^{2+}	pro analysis	Reagecon®
O6Solução de catião zinco (II)	Zn^{2+}	pro analysis	Reagecon®
Cisteína	-	Puro	Aldrich®
Cistina	-	Puro	Aldrich®
Glutationa (reduzida)	-	Puro	Sigma®
Metalotioneina I de coelho	-	-	Sigma®

2.2. Optimização da técnica voltamétrica e dos parâmetros instrumentais

2.2.1. Efeito do catião cobre (II) em solução no sinal voltamétrico das metalotioneínas

Como foi referido anteriormente, quando presente em solução o catião cobre (II) altera o mecanismo da reacção electroquímica das metalotioneínas no eléctrodo de mercúrio. Quer com as metalotioneínas livres quer com as complexadas com catiões são fixadas pelo catião Cu (II), pelo que se admite que a forma MT-Cu passa a ser a única existente. Nestas condições, apenas um sinal voltamétrico é obtido correspondendo ao total de

metalotioneína em solução, evitando a necessidade de somar todos os resultados individuais correspondentes a diferentes sinais (a diferentes potenciais) de distintos complexos de MT com diversos catiões metálicos [89].

De notar ainda que o sinal do complexo MT-Cu é maior e mais bem definido do que o sinal da forma simples da MT sem cobre, como se pode observar na figura IV-3. Os benefícios do uso de cobre (II) em solução, também apontados por outros autores, são portanto atribuídos a uma melhor resposta instrumental bem como a uma menor interferência de outras formas complexométricas de metalotioneínas.

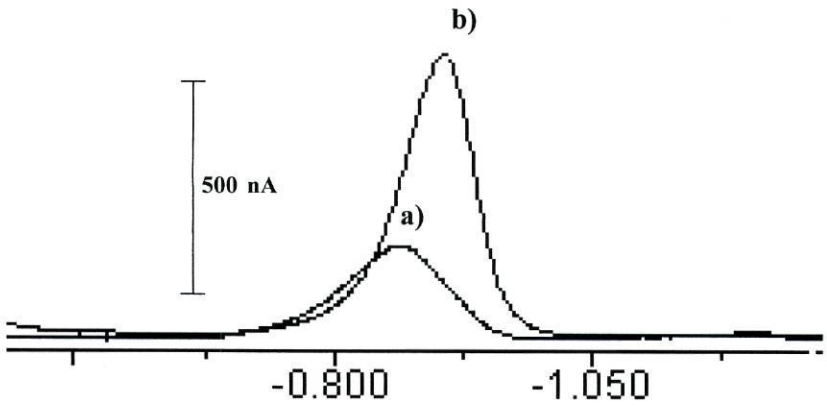


Figura IV-3. Análise voltamétrica por voltametria de onda quadrada de uma solução de metalotioneína $1x10^{-7}$ M em tampão borato 0,02M, NaCl 0,5M, pH 8,1: a) sem adição de Cu^{2+} ; b) com adição de $2,5x10^{-6}$M de Cu^{2+}. Os resultados foram obtidos utilizando uma frequência de 200Hz e um tempo de adsorção de 120s.

Como se pode observar na figura IV-4A, nos voltamogramas apresentados para concentrações de metalotioneína mais elevadas, num meio sem catião cobre (II), surge um 2º pico voltamétrico mais anódico que se vai tornando cada vez maior. À medida que se aumenta a concentração de cobre (II) em solução, figuras IV-4B, IV-4C e IV-4D, o pico mais anódico característico da apo-proteína deixa de ser tão importante, em detrimento do pico correspondente ao complexo MT-Cu. Pode-se concluir, portanto, que o pico a potenciais mais anódicos, correspondente à MT, só começa a aparecer quando a concentração de catião metálico se torna insuficiente para complexar toda a metalotioneína em solução, passando a existir então MT livre.

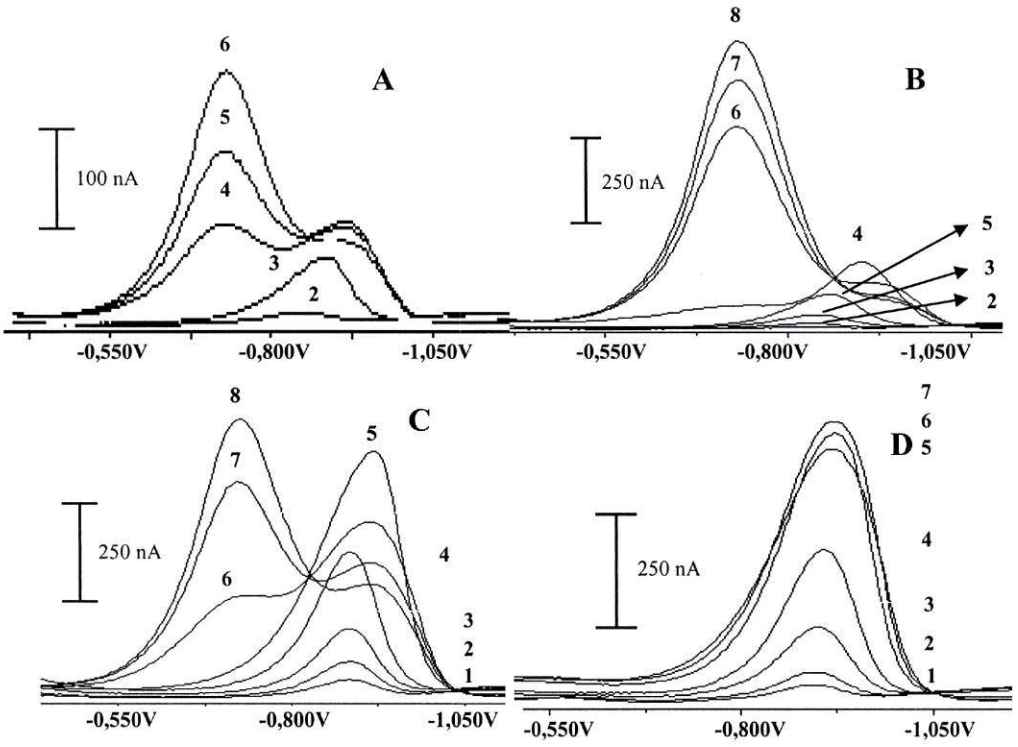


Figura IV-4. Voltamogramas correspondentes à adição metalotioneína padrão: 1- $2,5x10^{-9}$M; 2- $5x10^{-9}$ M; 3- $1x10^{-8}$ M; 4- $2,5x10^{-8}$ M; 5- $5x10^{-8}$ M; 6- $1x10^{-7}$ M; 7- $2,5x10^{-7}$ M; 8- $5x10^{-7}$ M; em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5M, pH8.1. Concentrações de catião cobre (II). A– 0; B– $1x10^{-7}$ M; C– $1x10^{-6}$ M; D– $2,5x10^{-6}$ M. Ensaios realizados por voltametria de onda quadrada a 200Hz com 120 s de pré-acumulação.

2.2.2. Optimizações das condições de análise utilizando voltametria diferencial por impulsos

As técnicas voltamétricas usualmente utilizadas para a determinação de compostos sulfurados são a voltametria de varrimento linear e a voltametria diferencial por impulsos.

Na optimização dos parâmetros instrumentais estudou-se a variação da intensidade de corrente da metalotioneína padrão em função do tempo de impulso para diferentes tempos de acumulação. Nestes estudos foi usada uma solução de metalotioneína padrão de concentração na célula de 1 x 10^{-7} M em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 na ausência e na presença de catião cobre (II) ($2,5x10^{-6}$M). Verificou-se em todos os casos um aumento da intensidade de corrente de redução das metalotioneínas com a diminuição do tempo de impulso. Em relação ao tempo de acumulação verifica-se que, numa primeira fase, a isotérmica de adsorção tem um comportamento linear, aumentando os valores da intensidade de corrente com o aumento do tempo de

acumulação. Posteriormente existe um nivelamento da intensidade de corrente que se deverá, possivelmente, a fenómenos de saturação do eléctrodo.

Na figura IV-5 podemos observar as curvas de calibração obtidas para dois tempos de impulso distintos. O aumento da sensibilidade com a diminuição deste período confirma que a velocidade de reacção é bastante elevada pelo que tempos de aquisição de dados mais curtos permitem um aumento da sensibilidade.

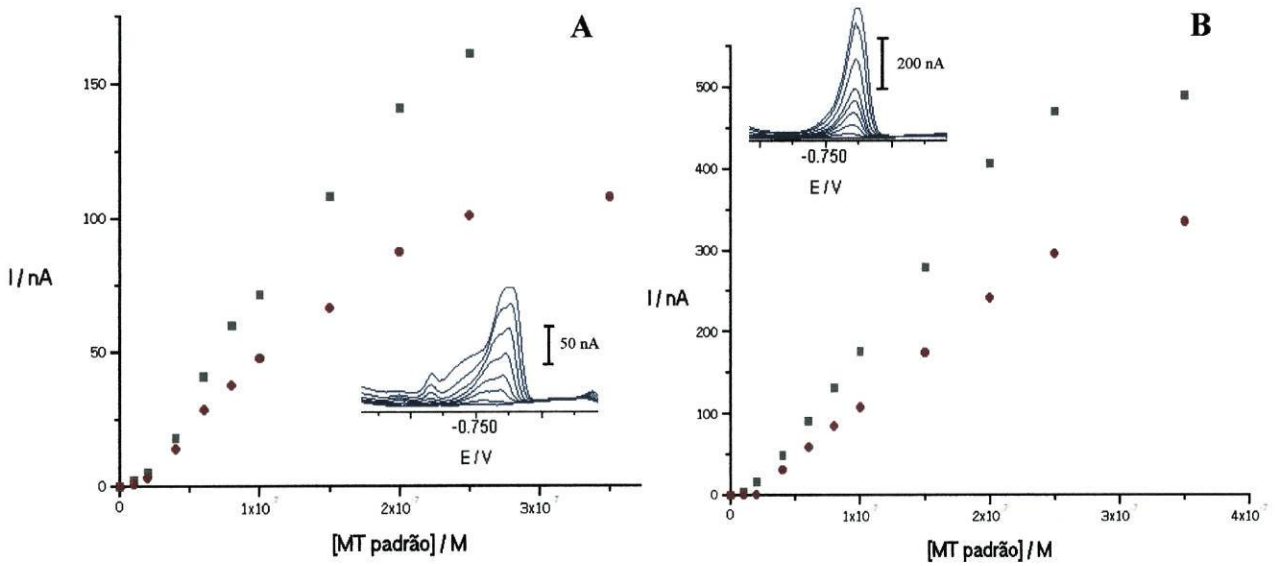


Figura IV-5. Curvas de calibração de metalotioneína em tampão borato 0.02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1: A) sem catião cobre (II); B) com catião cobre (II) $2{,}5 \times 10^{-6}$M. Os ensaios foram realizados por voltametria diferencial por impulsos com acumulação de 60s e diferentes tempos de impulso: ■ - 5 ms, ● - 10 ms. Os voltamogramas apresentados correspondem ao tempo de impulso de 5ms.

É importante notar que há uma maior sensibilidade e melhor definição dos picos na análise efectuada na presença de cobre (II), confirmando o que se disse anteriormente.

2.2.3. Optimização das condições de análise utilizando voltametria de onda quadrada

A reacção electroquímica das metalotioneína no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa é extremamente rápida [111] e reversível [58], pelo que o uso da voltametria de onda quadrada de elevada frequência se apresenta "*à priori*" como uma boa possibilidade para o aumento da sensibilidade da análise. Com o uso de pré-acumulação ainda se podem obter menores limites de detecção. Nos ensaios que se apresentam seguidamente foi usada uma solução de metalotioneína padrão de concentração na célula de 1×10^{-7} M em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 na ausência e na presença de catião cobre (II).

Foram efectuados estudos por voltametria de onda quadrada variando o tempo de pré-acumulação e a frequência de varrimento do potencial.

Os valores de amplitude do impulso e de incremento do potencial de escada foram previamente optimizados, respectivamente em 25mV e 2mV, utilizando uma solução de metalotioneína de $1x10^{-7}$M. O potencial de deposição optimizado, para o passo de pré-acumulação no eléctrodo de mercúrio, foi de –0,4V e o varrimento feito entre os -0.4 V os –1.3 V.

Dado que o uso de elevadas frequências de onda quadrada no varrimento permite ultrapassar o passo de remoção do oxigénio, este passa apenas a ser utilizado para frequências abaixo de 200Hz.

Tal como no caso anterior, as optimizações foram feitas para ambos os meios, com cobre (II) e sem cobre, verificando-se que existem vantagens claras no uso deste metal.

A influência da frequência de onda quadrada e do tempo de adsorção no sinal da metalotioneína na presença de cobre podem ser observados na figura IV-6. Tal como era esperado, a altura do pico aumenta quer com a frequência quer com o tempo de acumulação, embora o pico se torne progressivamente menos definido para frequências elevadas. Foi considerado conveniente um tempo de adsorção de 120s, o qual permite obter uma elevada sensibilidade e uma ampla gama de calibração sem aumentar em demasia o tempo de análise.

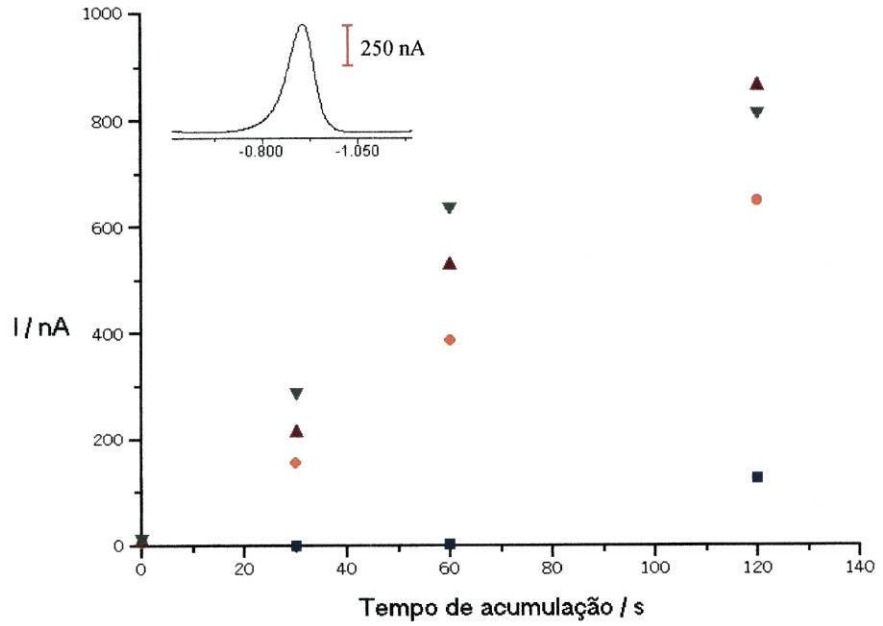


Figura IV-6. Variação da altura de pico em função do tempo de acumulação utilizando voltametria de onda quadrada na análise de uma solução $1x10^{-7}$M de metalotioneínas em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 com 2,5 x 10^{-6} M de catião cobre (II). Frequências de varrimento: ■ - 25 Hz, ● - 100 Hz, ▲ -200 Hz, ▼ – 400 Hz. No canto superior esquerdo apresenta-se o voltamograma obtido a 100 Hz e 120s de adsorção.

Na figura IV-7 são apresentadas as curvas de calibração de metalotioneínas obtidas a diferentes frequências, com um tempo de adsorção de 120s e utilizando como electrólito suporte tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 com 2,5 x 10^{-6} M de catião cobre (II). Muito embora se verifique uma resposta linear em todas as frequências utilizadas, decidiu-se escolher a de 200Hz pois é a que apresenta o melhor compromisso entre a sensibilidade (pior a frequências baixas) e a definição dos picos e qualidade da linha de base (piores a frequências elevadas). A frequências baixa, para além da menor sensibilidade é preciso ter em atenção que é necessário um tempo de desoxigenação superior, o que constitui um obstáculo adicional.

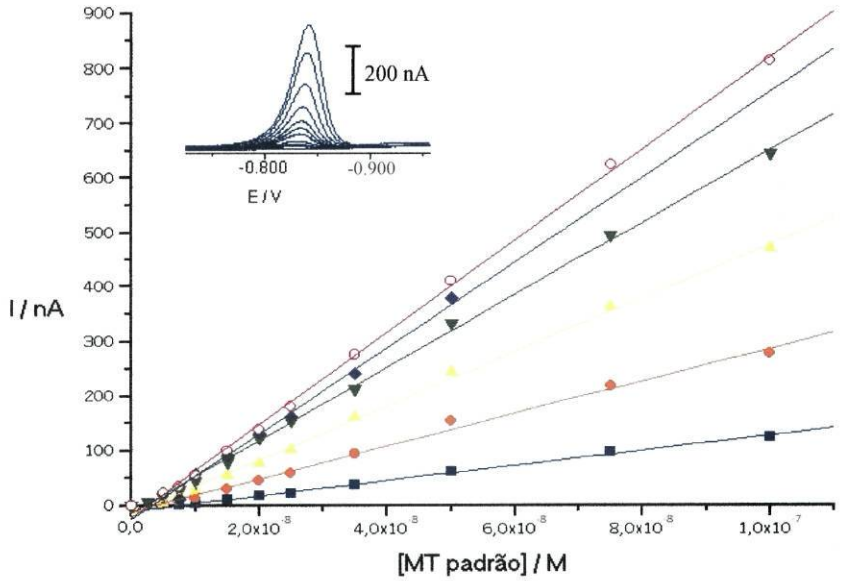


Figura IV-7. Curvas de calibração para a metalotioneína usando um tempo de adsorção de 120s a diferentes frequências de onda quadrada, em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 com 1x10^{-6}M de catião cobre (II). Frequência de onda quadrada: ■- 10 Hz, ●- 25 Hz, ▲-100 Hz, ▼- 200 Hz, ◆- 300 Hz, ○- 400 Hz. Os voltamogramas correspondentes à calibração obtida a 100 Hz com 120 s de acumulação, encontram-se no canto superior esquerdo.

Na figura IV-8, apresenta-se um estudo idêntico mas sem a presença de cobre (II) em solução. É possível observar diferenças de sensibilidade e definição do pico, que se apresentam piores neste caso, confirmando que mais uma vez que o uso de uma concentração de 2,5x10^{-6}M de catião cobre (II) apresenta vantagens.

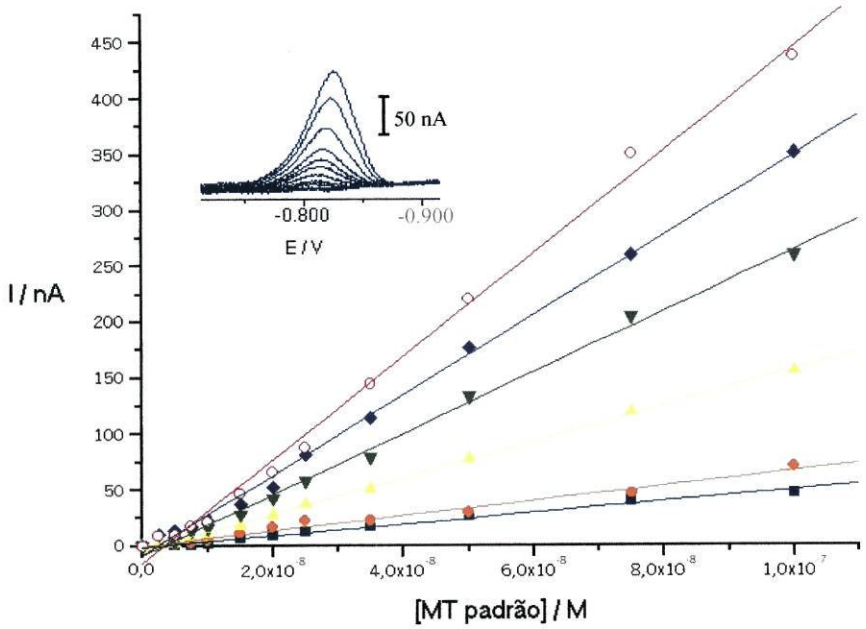


Figura IV-8. Curvas de calibração para a metalotioneína usando um tempo de adsorção de 120s a diferentes frequências de onda quadrada, em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 sem catião cobre (II). Frequência de onda quadrada: ■ - 10 Hz, ● - 25 Hz, ▲ -100 Hz, ▼ - 200 Hz, ◆ - 300 Hz, ○ - 400 Hz. Os voltamogramas correspondentes à calibração obtida a 100 Hz com 120 s de acumulação, encontram-se no canto superior esquerdo.

Em conclusão, a comparação de duas técnicas voltamétricas para a análise de metalotioneínas, a voltametria de impulsos diferencial e a voltametria de onda quadrada, mostra que a segunda é mais vantajosa, uma vez que apresenta uma sensibilidade superior, para além de um menor tempo de varrimento do potencial e de uma gama de calibração mais ampla. A voltametria de onda quadrada permite ainda reduzir drasticamente a interferência do oxigénio quando se usam frequências de varrimento elevadas. Por estas razões a técnica voltamétrica seleccionada foi a voltametria de onda quadrada. Por outro lado, verificou-se que a presença de catião Cu (II) também apresentava vantagens, quer em termos de sensibilidade, quer em termos de definição dos picos voltamétricos.

As condições instrumentais optimizadas para a análise de metalotioneínas em tampão borato 0,02M, NaCl 0,5M e pH 8,1 na presença de $2,5x10^{-6}$M de Cu^{2+}, encontram-se apresentadas na tabela IV-6.

Tabela IV-6. Condições instrumentais optimizadas para a análise de metalotioneínas em tampão borato 0,02M, NaCl 0,5M e pH 8,1 na presença de $2,5x10^{-6}$M de Cu^{2+}.

Técnica voltamétrica : voltametria de onda quadrada com adsorção	
Amplitude do impulso	25 mV
Incremento de Potencial	2 mV
Potencial de deposição	- 0,4 V (-0,7V)*
Tempo de deposição	120s
Frequência	200Hz
Potencial inicial	- 0,4 V
Potencial final	-1,3 V
Velocidade de agitação	3 (1500 rpm)
Tamanho da gota	3
Tempo de purga	300 s
Tipo de gota	Suspensa

* Potencial que deve ser aplicado no caso de existir em solução interferência da glutationa. Deve ser usado na análise de amostras biológicas.

2.2.4. Optimização da concentração de catião cobre (II) em solução

A concentração de cobre (II) em solução é um factor importante a considerar na análise, na medida que a sua presença afecta a intensidade e potencial do pico correspondente às metalotioneínas. Para averiguar este efeito foram adicionadas diferentes concentrações de cobre (II) a uma solução de $2x10^{-8}$M de metalotioneína. Como se pode observar na figura IV-9, a intensidade de corrente de pico correspondente aos complexos MT-Cu aumenta com a concentração de Cu^{2+} em solução até um certo ponto a partir do qual se inverte a situação.

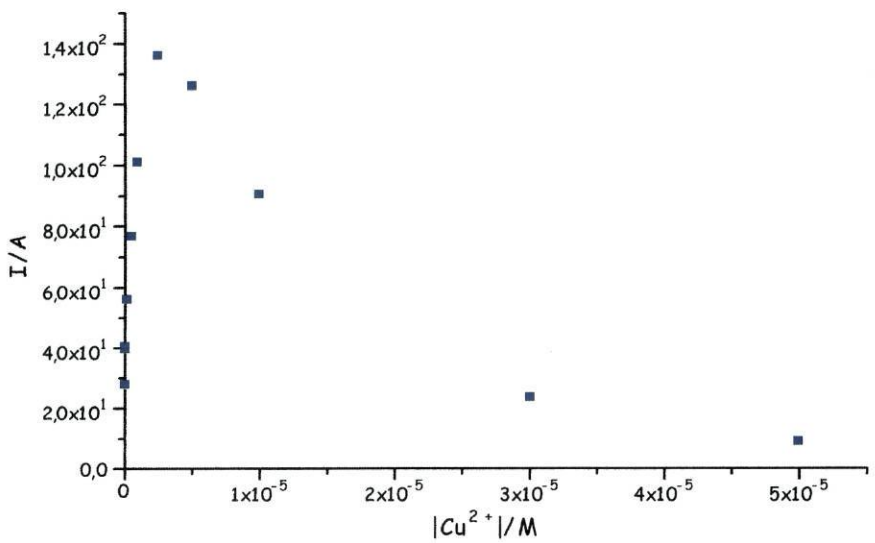


Figura IV-9. Variação da intensidade de corrente de pico em função da concentração de catião cobre(II) em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5M, pH8.1, num meio com solução padrão de metalotioneína $2x10^{-8}$M. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada com acumulação de 120s a 200Hz.

Este efeito verifica-se para diferentes concentrações de metalotioneínas, como se pode observar na figura IV-10, em que estão representadas curvas de calibração para diferentes concentrações de cobre (II) em solução. Conclui-se, portanto, que a concentração deste ião tem de ser cuidadosamente controlada, uma vez que os resultados apenas podem ser comparados se forem obtidos em soluções contendo a mesma concentração de Cu^{2+}.

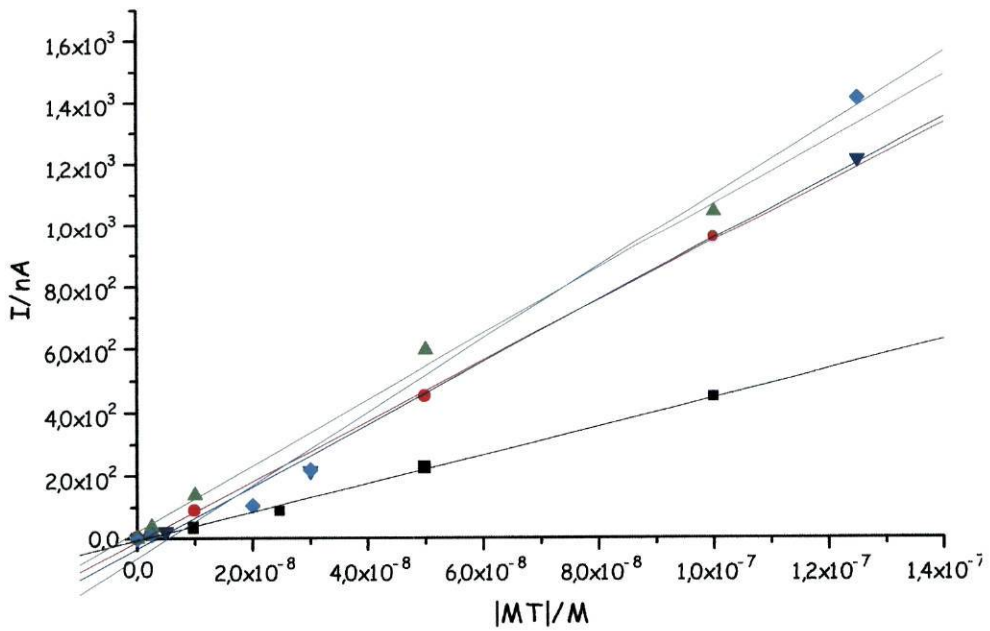


Figura IV-10. Curvas de calibração de metalotioneína padrão em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5M, pH8.1, para diferentes concentrações de catião cobre(II): ■ - $1.0x10^{-7}$ M, ● - $2.5x10^{-7}$ M, ▲ - $1.0x10^{-6}$ M, ▼ - $2.5x10^{-6}$ M, ◆ - $5.0x10^{-6}$ M. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada a 100Hz e com 120s de adsorção.

2.2.5. Optimização do meio de análise e estudo de interferências

O meio utilizado neste método baseou-se no utilizado por G. Scarano & Morelli [110] (tampão borato 0,02M, pH8,1m NaCl 0,5M). No entanto, fizeram-se ensaios com outros meios, nomeadamente: o borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 10; o fosfato 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 12; e o fosfato 0,1M , NaCl 0,5M, pH 7. Relativamente a este último verificou-se que o sinal voltamétrico obtido era muito inferior ao que se obtém a pH 8,1, pelo que foi colocado de parte. Os outros dois meios estudados também são piores do que o tampão borato 8,1, como se pode observar na figura IV-11.

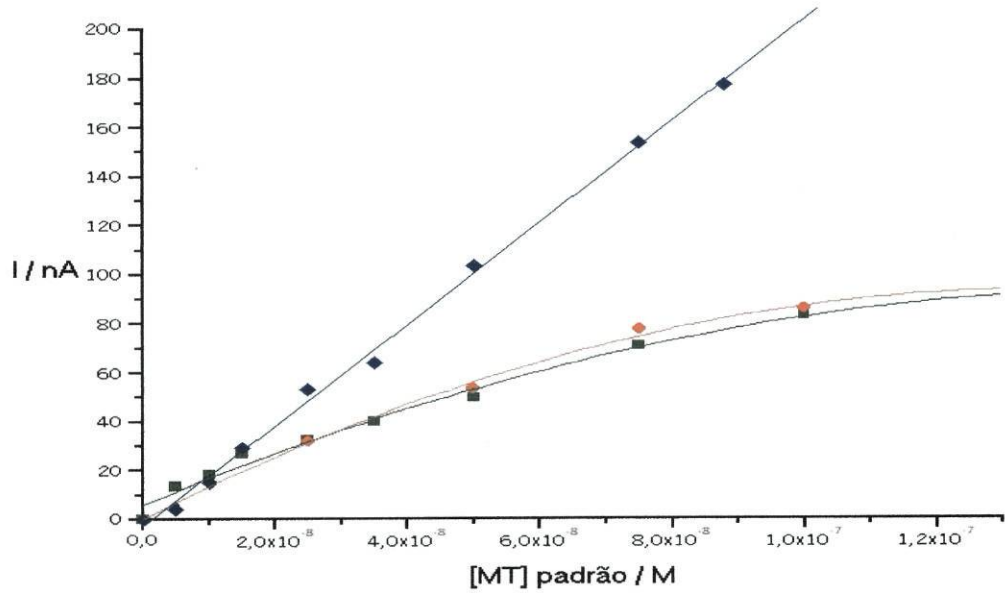


Figura IV-11. Curvas de calibração de padrões de metalotioneína em 3 tampões diferentes: ■ - tampão fosfato pH 12, ● - tampão borato pH 10, ◆ - tampão borato pH 8,1. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada a 100 Hz com acumulação de 120 e com $2{,}5 \times 10^{-6}$ M de catião cobre (II).

Relativamente às interferências foram equacionadas aquelas que poderiam ser mais prováveis em condições normais de análise de extractos de peixe. As interferências estudadas dividem-se em dois grupos: no primeiro estudou-se a interferência de outros catiões metálicos, o que permite verificar até que ponto existe competição para a ligação às metalotioneínas na presença de cobre (II); no segundo grupo estudou-se a interferência de compostos contendo grupos SH que possam, igualmente, responder electroquimicamente.

Relativamente aos catiões de metais pesados foram estudados dois, o Zn^{2+} que é aquele que geralmente aparece em maior concentração tanto na água como nos tecidos animais, e o Cd^{2+} para representar o grupo de catiões metálicos bioacumuláveis. Na tabela IV-7 são indicadas as concentrações de cada um destes catiões metálicos a partir das quais há interferência na análise de $2{,}5 \times 10^{-8}$M de metalotioneínas, com uma redução de cerca de 5% do sinal do complexo MT-Cu. Note-se desde já que as concentrações destes catiões de metais pesados a partir das quais há interferência na análise são demasiado elevadas para constituir um problema real na determinação de metalotioneínas em amostras biológicas, na medida em que os extractos são muito diluídos e a sua concentração em catiões metálicos é, comparativamente, bastante baixa.

Tabela IV-7. Valores de concentração limite de catião zinco (II) e cádmio (II) a partir da qual constitui uma interferência superior a 5%.

Composto	Concentração na célula voltamétrica	Grau de Interferência (diminuição do sinal)
Zn^{2+}	$4X10^{-7}$ M	5%
Cd^{2+}	$2x10^{-7}$ M	5%

No que respeita ao outro grupo de interferências estudadas, constituído por espécies com grupos tiol livres, destaca-se o 2-mercaptoetanol, que é adicionado no processo de purificação da amostra de extracto de fígado como elemento redutor para conservar a amostra e, a cistina, a cisteína e a glutationa que representam a quase totalidade dos restantes compostos com grupos SH livres provenientes da amostra biológica e que conseguem permanecer no extracto purificado. Relativamente a estes compostos verifica-se que todos eles dão sinal voltamétrico nas condições anteriormente optimizadas, como se pode observar na figura IV-12 para o caso do mercaptoetanol. Contudo, o potencial de pico é diferente em todos eles e diferente do complexo MT-Cu: –0,45V para o mercaptoetanol; -0,57V para a cisteína e para a cistina; -0,69V para a glutationa; e, -0,87 para a MT-Cu. De todos estes, o único que poderá constituir uma interferência significativa com as condições já optimizadas é a glutationa, pois o seu potencial de redução encontra-se demasiado próximo do potencial de pico do complexo MT-Cu. Contudo, é possível ultrapassar esta interferência recorrendo a um artificio instrumental, aproveitando o facto de a forma reduzida da glutationa neste meio não se acumular no eléctrodo. Assim, colocando o potencial de deposição ao potencial de redução deste composto é possível reduzi-lo à medida que chega ao eléctrodo evitando a sua acumulação. Como a MT-Cu ainda não se reduz a este potencial, a sua deposição decorre normalmente.

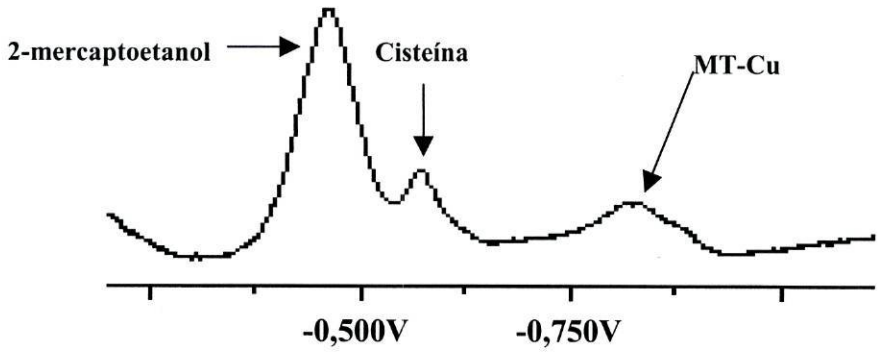


Figura IV-12. Análise voltamétrica de uma solução de metalotioneína $2.5x10^{-8}$ M, na presença de $2x10^{-8}$ M 2-mercaptoetanol, em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5 M, pH 8.1 e $2.5x10^{-6}$ M de Cu^{2+}. Ensaio realizado por voltametria de onda quadrada a 200 Hz com acumulação de 120s.

Portanto, o estudo da interferência de outros compostos com grupos SH originou uma única alteração nas condições instrumentais previamente optimizadas, com o potencial de deposição a passar a ser de -0,70V em vez de –0,4V. Esta alteração não teve efeito significativo em termos de sensibilidade e outras características da análise.

2.2.6. Estabilidade das metalotioneínas em solução e o efeito do 2-mercaptoetanol

A estabilidade do analito em solução é essencial para a sua determinação precisa. Embora na generalidade as metalotioneínas sejam proteínas extremamente estáveis, é necessário ter algumas precauções comuns ao manuseamento de qualquer péptido. Por exemplo, é necessário adicionar, como inibidor de proteases, o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), logo no início da preparação da amostra, para evitar a degradação enzimática das metalotioneínas. O mercaptoetanol é um outro agente adicionado nessa fase e que protege as metalotioneínas da oxidação, conferindo um ambiente redutor à solução onde se encontram.

Embora estes dois compostos sejam adicionados aos extractos biológicos foi estudada a estabilidade da própria metalotioneína em solução, para verificar se era também nesse caso necessário a adição de agentes de estabilização. Na tabela IV-8 é apresentada a variação do sinal voltamétrico dos complexos MT-Cu em solução ao longo do tempo. Observa-se que os complexos são bastante estáveis durante os primeiros 85 min., que é um período suficiente para efectuar a análise.

Tabela IV-8. Variação do sinal voltamétrico de uma solução metalotioneína $5x10^{-8}$ M ao longo do tempo, em tampão borato 0.02M, NaCl 0.5 M, pH 8.1 e $2.5x10^{-6}$ M de Cu^{2+}. Os ensaios foram realizados por voltametria de onda quadrada a 200 Hz com acumulação de 120s.

Tempo /min.	0	5	10	15	20	25	35	45	65	85	100	115	145	175	205	235
% Sinal	100,0	99,0	100,4	100,8	102,4	99,7	96,7	91,4	94,0	95,0	89,8	84,1	79,8	82,0	86,2	79,1

3. BIOMONITORIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE PEIXES A CATIÕES DE METAIS PESADOS.

3.1. Parte experimental

3.1.1 Instrumentação, reagentes e espécies animais

A instrumentação utilizada para a realização desta parte do trabalho foi a já referida na tabela IV-4, à qual se acrescentou a que se apresenta na tabela IV-9.

Tabela IV-9. Instrumentação utilizada.

Balança	Mettler Ae50
Balança	Mettler Um3
Banho de Aquecimento	Julabo
Centrifugadora	Kubota
Homogeneizador	Jenway PCLM 3
Ultracentrifugadora	Beckman 100M

Os reagentes utilizados para a exposição dos peixes e preparação dos respectivos extractos de fígado são indicados na tabela IV-10.

Tabela IV-10. Reagentes utilizados para a preparação de amostra de peixe

Reagentes		**Pureza**	**Marca**
2-Mercaptoetanol	C_2H_5OSH	99%	Merck
Cloreto de Cádmio II	$CdCl_2$	99%	Sigma
Sulfato de Cobre	$CuSO_4$	99%	Sigma
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil	99%	Sigma
Tris-HCl	Solução pré-preparada	-	Merck

As espécies de peixe utilizadas nos estudos de biomarcação são apresentadas na tabela IV-11.

Tabela IV-11. Espécies de peixe utilizadas neste trabalho

Nome da espécie
Perca-Sol (*Lepomus Gibbosus)*
Truta Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss)*

3.1.2 Condições e meios de exposição dos peixes

Foram utilizadas duas espécies de peixe, a truta e a perca, sujeitas respectivamente à exposição a Cd (II) e a Cu (II).

Os animais usados foram, portanto, expostos a dois tipos de catiões metálicos para indução da síntese e acumulação de metalotioneínas. O fígado sendo o órgão metabolicamente mais activo é, também, aquele onde a indução da síntese e acumulação das metalotioneínas é maior. Por isso, as metalotioneínas são extraídas do fígado, uma vez que os níveis aí encontrados são várias vezes superiores aos existentes em outros tecidos e órgãos do peixe.

O peixes escolhidos para estes estudos foram a perca e a truta por serem peixes de água doces habituais em cursos de água portugueses, e que já foram utilizados em vários estudos de biomonitorização de exposição a metais pesados [30, 40, 50, 63, 80].

A experiência de indução de metalotioneínas por exposição a metais pesados constitui um teste toxicológico de exposição sub-letal, conduzido num sistema experimental em circuito fechado, na estação de aquacultura da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), a uma temperatura constante de 15°C e com fotoperíodo controlado de 12h no escuro e 12h com luz (12D:12L). Todos os peixes utilizados eram adultos não tendo sido considerados para este trabalho factores e critérios de selecção dos peixes para extracção das amostras. Os tanques utilizados tinham 500L de capacidade, tendo sido cheios com água sem qualquer cloro e contendo a concentração adequada dos catiões dos metais pesados.

As trutas foram expostas a $40\mu gL^{-1}$ de catião cádmio (II), por adição aos tanques da quantidade adequada de $CdCl_2$, tendo os peixes permanecido expostos durante 15 dias. O cádmio (II) é o catião metálico com mais forte poder indutor da síntese e acumulação de metalotioneínas sendo, portanto, de esperar que no final existam metalotioneínas nas amostras a analisar. Foram, ainda, mantidas trutas sem qualquer exposição a catião cádmio (II), de forma a constituir animais de controlo, sendo utilizados como "brancos" de exposição.

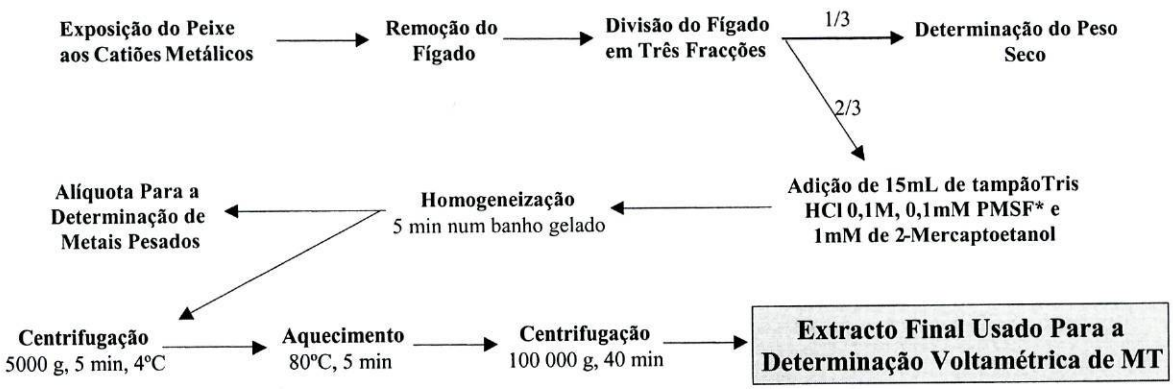
As percas foram, por seu turno, expostas a cobre, por adição de sulfato de cobre. Neste casos fez-se um estudo com duas concentrações de cobre distintas: 2,5mg/L e 5mg/L de Cu (II), tendo os peixes permanecido nestas condições durante 21 dias. A escolha deste metal deveu-se a razões distintas. Procurou-se verificar se existia resposta de biomarcação nestes animais ao cobre, com o objectivo de usar estes peixes, comuns no

rio douro, na biomonitorização do efeito ambiental da sulfatagem das vinhas do douro durante o período da primavera, uma vez que o sulfato de cobre (calda bordalesa) é muito utilizado para tratamento de infestações da vinha.

Outras percas foram ainda mantidas durante 21 dias nas mesmas condições mas sem adição de qualquer agente indutor de metalotioneínas constituindo "brancos" de exposição, posteriormente utilizados na avaliação do estudo de biomarcação.

3.1.3 Preparação das amostras de extracto de fígado de peixe para análise

As amostras foram preparadas no Laboratório de Fisiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Após recepção dos animais transportados vivos até este local, procedeu-se à sua dissecação para extracção dos fígados e à preparação dos extractos a partir destes. O procedimento seguido na preparação das amostras e extracção das metalotioneínas, baseia-se na técnica descrita por De Conto Cinier [22]. Após o período de exposição, os fígados são removidos e divididos em três porções, seguindo-se posteriormente o procedimento esquematizado na figura IV-13, após o qual a amostra de extracto de fígado de peixe para análise de metalotioneínas é congelada a – 21°C e aí mantida até ser analisada. Durante a purificação, as metalotioneínas permanecem sempre em suspensão no sobrenadante após as centrifugações, sendo portanto essas as fracções aproveitadas para o passo seguinte.



* PMSF – Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride (inibidor de proteases)

Figura IV-13. Esquema do protocolo utilizado para a preparação de amostras para análise de metalotioneínas a partir de fígado de peixes, adaptado de DeConto Cinier [22].

O fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) é adicionado para evitar a acção de proteases que poderiam quebrar as ligações peptídicas das cadeias das metalotioneínas, e o 2-mercaptoetanol é adicionado para manter as condições redutoras do meio, evitando a oxidação das metalotioneínas.

As tabelas IV-12 e IV-13 contêm os dados referentes ao tipo de exposição, à composição dos fígados e ao volume dos extractos obtidos para a determinação voltamétrica das metalotioneínas.

Tabela IV-12. Amostras de extracto de fígado de truta utilizadas na determinação voltamétrica de metalotioneínas.

	Fígado Controlo	*Fígado T1*	*Fígado T2*
[Cd Cl_2] /μg.L^{-1}	0	40	40
Tempo de exposição /dias	-	15	15
Vol. de extracto /mL	3,65	3,85	3,65
Peso do fígado fresco /g	2,17	2,78	2,62
Peso seco /g	0,74	0,91	1,13

Tabela IV-13. Amostras de extracto de fígado de perca utilizadas na determinação voltamétrica de metalotioneínas.

	Fígado P0	*Fígado P1*	*Fígado P2*	*Fígado P3*	*Fígado P4*	*Fígado P5*
[CuSO4] /mgL^{-1}	0	2.5	2.5	2.5	2.5	5
Tempo de exposição /dias	-	21	21	21	21	21
Vol. de extracto/mL	3.90	3.75	3.90	3.75	3.75	3.70
Peso fresco utilizado /g	0.6471	0.4803	0.7839	0.5410	0.6342	0.6471
Peso seco utilizado /g	0.2142	0.1676	0.3308	0.2018	0.2771	0.2142

3.2. Características do método e aplicação à análise em amostras de extracto de fígado de peixe

3.2.1. Procedimentos de análise optimizados

Para a análise quantitativa de metalotioneínas em amostras de peixes, podem ser utilizados o método da curva de calibração e o método das adições de padrão. Por

razões apontadas adiante optou-se pelo método das adições de padrão, em que é necessária apenas a adição suplementar de padrão de metalotioneína à célula voltamétrica após a análise da amostra. O procedimento experimental usado na determinação de metalotioneínas nos extractos finais pelo método das adições de padrão está descrito em seguida.

***Procedimento experimental*:**

1. Adição de 15,00 mL de tampão para a célula voltamétrica.
2. Registo voltamétrico do "branco".
3. Adição de catião cobre (II) numa concentração na célula de 2,5 x 10^{-6} M.
4. Novo registo voltamétrico.
5. Adição de um volume conhecido do extracto de fígado de peixe.
6. Registo do voltamograma.
7. Adições sucessivas do padrão.
8. Registo sucessivo dos voltamogramas.

3.2.2. Características do método voltamétrico de determinação de metalotioneínas

A determinação de metalotioneínas nos fígados de peixe pode ser efectuada pelo método da curva de calibração ou pelo método das adições de padrão. Verifica-se contudo que o método da curva de calibração é mais problemático, por apenas poder ser utilizado nos casos em que não ocorre uma interferência significativa da matriz. Na figura IV-14 é apresentada uma curva de calibração obtida para a metalotioneína em tampão borato 0,02M, pH 8,1, NaCl 0,5M e Cu^{2+} 2,5x10^{-6}M. Existe uma gama de comportamento linear entre os 1x10^{-9}M e os 1X10^{-7}M de metalotioneína, mas estes limites podem variar na presença de matriz.

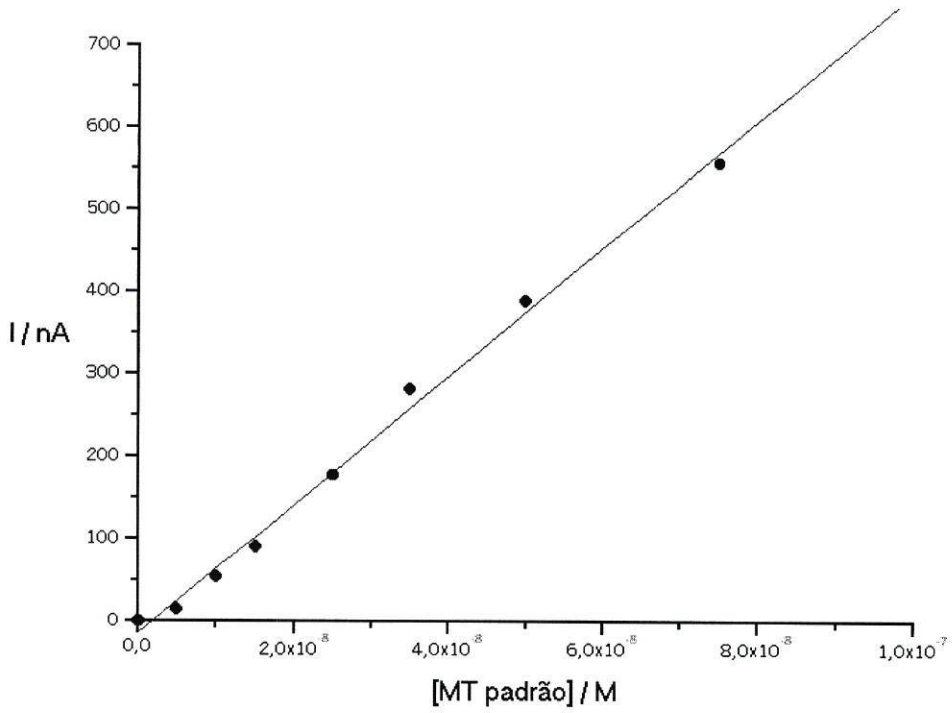


Figura IV-14. Curva de calibração de metalotioneína em tampão borato 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8,1 num meio com catião cobre (II) (2,5 x 10^{-6} M). A análise voltamétrica foi feita por voltametria de onda quadrada com 200Hz de frequência e com um tempo de adsorção de 120 s.

A reprodutibilidade do método é muito boa quando comparada com a obtida com outras técnicas até agora disponíveis. Podem ser analisadas até 12 amostras por hora com um desvio padrão relativo inferior a 2%. O limite de detecção estimado é de 2,8X10^{-9} M e o limite de quantificação estimado é de 9,3X10^{-9}M. Estes valores são muito menores do que os obtidos com qualquer outra técnica desenvolvida até ao momento, para a determinação desta proteína.

3.2.3. Aplicação do método voltamétrico desenvolvido à análise de metalotioneínas em trutas

O principal objectivo deste trabalho foi a investigação da possibilidade de se utilizar a voltametria na determinação do nível de metalotioneínas em peixes, o que permitirá abrir novas perspectivas para o uso desta proteína como biomarcador para exposição de peixes a metais pesados. A adequação do método para este efeito foi testada comparando os resultados obtidos na análise de metalotioneínas em extractos de fígado de peixes submetidos a um teste toxicológico sub-letal com cádmio (II) com os resultados obtidos na análise de fígados de peixes de controlo não submetidos a este "stress" ambiental.

Os extractos obtidos a partir de fígados de trutas foram preparados usando os protocolos de exposição e purificação já descritos, tendo as metalotioneínas sido determinadas pelo método voltamétrico previamente desenvolvido. Os extractos são adicionados à célula voltamétrica sem qualquer tratamento adicional. O sinal correspondente às metalotioneínas foi imediatamente identificável pelo seu potencial de pico e foi, subsequentemente confirmado por adição de metalotioneína padrão. A confirmação da sua natureza veio ainda a ser corroborada pela ausência do pico no caso de extractos de peixes não sujeitos à indução por catiões pesados.

O melhor modo de determinação das metalotioneínas neste caso foi recorrendo ao método das adições de padrão, atendendo ao efeito de matriz. Na figura IV-15 estão representadas as curvas de adição de padrão, utilizadas para a determinação de metalotioneínas em duas trutas submetidas a indução por Cd^{2+}. Nestas curvas verifica-se uma boa relação entre os declives das duas rectas demonstrando que o efeito de matriz deve ser similar em ambas. Os coeficientes de correlação são satisfatórios mostrando que o método pode ser aplicado à determinação de metalotioneínas na gama dos 10^{-9} e 10^{-8}M, presentes na célula voltamétrica.

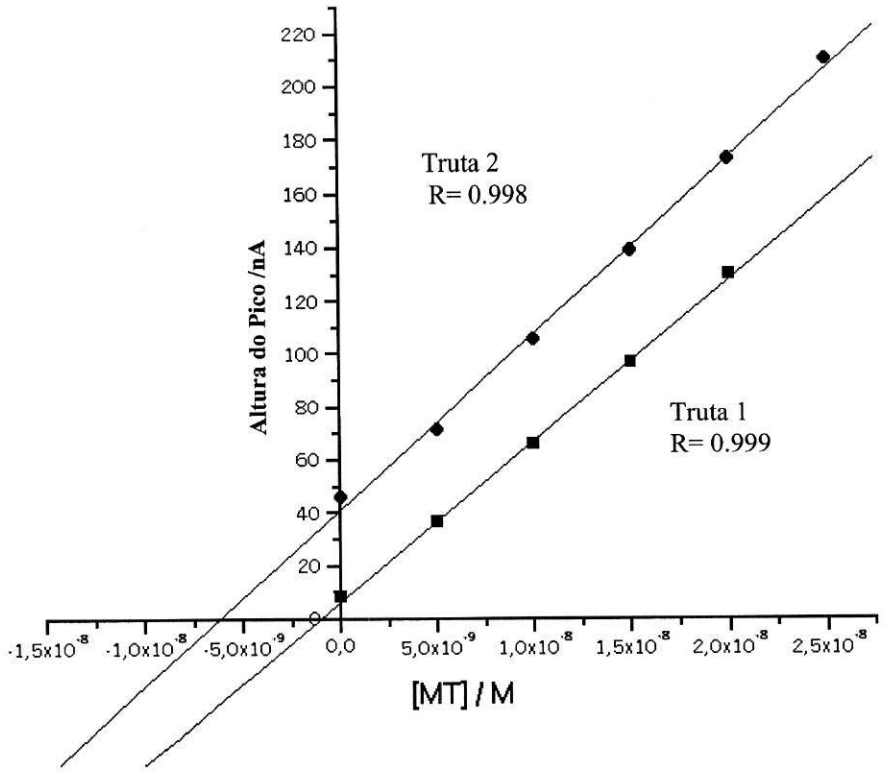


Figura IV-15. Determinação voltamétrica de metalotioneínas, pelo método das adições de padrão, em trutas que tinham sido submetidas a um teste toxicológico sub-letal com 40 ppb de $CdCl_2$. Adição à célula voltamétrica de 20µl de extracto de fígado e de 15mL de tampão borato 0,02M, NaCl 0,5 M, pH 8,1, com $2,5x10^{-6}$ M Cu^{2+}. Análise por voltametria de onda quadrada a 200 Hz com 120s de adsorção.

Os resultados obtidos encontram-se na tabela IV-14. A diferença encontrada entre os animais poderá ser explicada, principalmente pelo facto de a indução não ter sido muito elevada, podendo ser maior o efeito das diferenças fisiológicas na resposta à exposição a catiões de metais pesados. A formação das metalotioneínas pela exposição a cádmio (II), foi confirmada pelos resultados obtidos com trutas que não foram submetidas a estes testes toxicológicos com $CdCl_2$.

Pode-se concluir, portanto, que o método voltamétrico de análise de metalotioneínas tem boas potencialidades para ser utilizado com bastante sensibilidade na biomarcação de Cd (II).

Tabela IV-14. Concentração das metalotioneínas na célula voltamétrica e no fígado.

Trutas	[MT] na célula voltamétrica /M	$[MT]_{no\ fígado}$ /$\mu g.g^{-1}$	
		Peso Fresco	Peso Seco
1	$1,14 \times 10^{-9}$	2,74	8,34
2	$6,28 \times 10^{-9}$	18,8	43,6

3.3. Determinação da adaptabilidade de percas para estudos de biomonitorização de exposição a $CuSO_4$

Na continuação do trabalho, expuseram-se percas a duas concentrações diferentes de cobre (II), com a finalidade de induzir a síntese e acumulação de metalotioneínas nos seus órgãos.

O grau de indução será portanto dado pela diferença entre os níveis médios de metalotioneína encontrados em cada um dos grupos expostos e subtrair o nível residual (nível basal) de metalotioneínas existente na perca de controlo.

O método utilizado para a quantificação de metalotioneínas em percas foi o método das adições padrão, tendo os ensaios sido efectuados por voltametria de onda quadrada com adsorção de acordo com o procedimento já descrito. O volume de extracto de fígado adicionado à célula voltamétrica foi de 100μL, dado que o uso de volumes inferiores aproximava a determinação do limite de detecção para as condições voltamétricas utilizadas.

Os resultados de concentração metalotioneínas obtidos nas percas após este teste toxicológico sub-letal com cobre (II), encontram-se na tabela IV-15. A forma de expressar o resultado final está expresso em μg de metalotioneína por g de peso seco, por ser a medida usualmente utilizada para expressar estes resultados, tendo sido assumida uma massa molecular de 6500 para estas proteínas.

Tabela IV-15. Concentração das metalotioneínas em fígado de peixes submetidos ao estudo de biomarcação de exposição ambiental de percas a CuSO4. Quantificação pelo método das adições de padrão utilizando 100 μL de extracto de fígado. Ensaios realizados por voltametria de onda quadrada a 200Hz com tempo de acumulação de 120 s, em tampão borato 0.02 M, NaCl 0.5 M, pH8.1 com $2.5x10^{-6}$M de catião cobre (II) no meio de análise.

Perca	*[Cu (II)] usada /mg.L^{-1}*	*[MT] célula voltamétrica /10^{9} M*	*[MT] no fígado Peso Seco /μg MT.g fígado^{-1}*	
			MT-Total	MT-Total$_{média}$
P0	0	4,2	76	76
P1	2,5	6,9	149	203
P2		23,2	267	
P3		8,7	158	
P4		18,1	239	
P5	5,0	19,0	320	320

* A concentração de metalotioneína induzida pode ser calculada pela diferença entre o valor de MT encontrado na perca e o da perca de controlo P0.

Tomando como comparação a amostra P0 que é de um peixe que não sofreu qualquer tratamento com sulfato de cobre, podemos dizer que todos os peixes que foram tratados com sulfato de cobre durante 21 dias apresentam uma maior concentração de metalotioneínas no seu fígado.

O peixe que apresenta maior concentração de metalotioneína é o peixe da amostra P5 , tal como era inicialmente esperado, uma vez que foi exposto a uma solução de sulfato de cobre de maior concentração.

Para a concentração de 2,5mg/L de $CuSO_4$, foram utilizadas várias percas no teste toxicológico, o que permitiu avaliar a variabilidade existente entre as amostras. Estas amostras P1, P2, P3, P4, têm todas uma concentração de metalotioneína superior à da amostra P0, sendo as amostras P2 e P4 as que apresentam os valores mais elevados. Embora os valores da concentração desta proteína nestas amostras varie bastante, todas elas são consideravelmente inferiores ao valor obtido para a perca P5 submetida à exposição com 5,0 mg/L de $CuSO_4$. Esta variabilidade pode atribuída ao facto de o metabolismo das metalotioneínas variar com factores fisiológicos dos animais, como o sexo e a idade do animal, e esses dados não foram considerados nem para a selecção dos peixes neste posteriormente na análise dos resultados, muito embora sejam notórias

diferenças na retenção de água, no volume e na histologia dos fígados, entre as percas P1 e P3 e as que se observaram para as percas P2 e P4. Essa diferenciação poderá ajudar a compreender as diferenças de metalotioneínas encontradas em cada um dos peixes tratados em condições de exposição idênticas. Estas diferenças encontradas entre os animais, indica porém que esta metodologia de determinação de metalotioneínas é sensível a alterações dos níveis desta proteínas entre diferentes indivíduos, o que poderá ser vir a ser muito útil para utilização em estudos de fisiologia aplicada.

Utilizando os valores médios de metalotioneína induzida pode-se, no entanto, observar a existência de uma relação com o aumento da concentração de $CuSO_4$ utilizada na exposição.

Verifica-se, portanto, que as metalotioneínas poderão funcionar como biomarcadores da exposição de peixes ao catião cobre (II), dentro dos limites que é usual encontrar em estudos similares de fisiologia aplicada, embora o uso de mais pontos de biomarcação e de numa gama mais abrangente possa no futuro dar-nos uma ideia mais perfeita desta relação de biomarcação.

3.4. Conclusão

Como conclusão pode-se afirmar que o método voltamétrico desenvolvido para a determinação de metalotioneínas tem vantagens relativamente a outros correntemente utilizados, nomeadamente em termos de sensibilidade, simplicidade e tempo de análise. O limite de detecção voltamétrico estimado é de $2{,}8 \times 10^{-9}$ M, com uma gama de resposta linear até 1×10^{-7} M e com um bom coeficiente de correlação linear.

O método foi aplicado com sucesso na determinação de metalotioneínas em trutas, por analise directa de extractos de fígado, utilizando o método das adições de padrão. Os resultados obtidos indicam que o método pode vir a ser usado para estabelecer uma correlação de biomarcação entre a biomonitorização de metalotioneínas e a exposição dos peixes a metais pesados. Embora fora do âmbito desta dissertação, foi testada a análise de metalotioneínas pelo método voltamétrico em estudos de biomarcação de tainhas do rio Douro, tendo sido encontradas relações interessantes entre os níveis destas proteínas e diferentes características fisiológicas e níveis de "stress" dos animais, o que abre ainda mais perspectivas para o uso do método para estudos de fisiologia aplicada.

Referências Bibliográficas:

1. Andrews, GK, (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions, Biochem. Pharmacol., 59 (1): 95-104.
2. Apostolova, M, Nachev, C, Koleva, M, Bontchev, PR, Kehaiov, I, (1998). New competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of metallothionein in tissue and serum, Talanta, 46 (2): 325-333.
3. Aspholm, O., Hylland, K., (1998). MT in green sea urchins (Strongylountrotus droebachiensis) as a biomarker for metal exposure, Marine Enviromental Reserch, 46: 537-540.
4. Beattie, JH, Richards, MP, Self, R, (1993). Separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis, J. Chromatography, 632 (1-2): 127-135.
5. Bebianno, MJ, Cravo, A, Miguel, C, Morais, S, (2003). Metallothionein concentrations in a population of Patella aspera: variation with size, Sci. Total Environ., 30 (1-3): 151-161.
6. Bebianno, Mj, Langston, WJ, (1991). Metallothionein induction in mytilus-edulis exposed to cadmium, Marine Biology, 108 (1): 91-96
7. Bienengraber, M, Forderkunz, S, Klein, D, Summer, KH, (1995). Determination of cu-containing metallothionein - comparison of AG saturation assay, thiomolybdate assay, and enzyme-linked-immunosorbent-assay, Analytical Biochemistry, 228 (1): 69-73.
8. Bontidean, I,, Lloyd, JR,, Hobman, JL, Wilson, JR, Csoregi, E, Mattiasson, B,Brown, NL, (2000). Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals, J. Inorg. Biochem., 79 (1-4): 225-229.
9. Bonwick, GA, Fielden, PR, Davies, DH, (1991). Hepatic metallothionein levels in roach (rutilus-rutilus l) continuously exposed to water-borne cadmium, Comparative Bioch. and Phys. C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology, 99 (1-2): 119-125.
10. Boutet, I, Tanguy, A, Auffret, M, Riso, R, Moraga, D., (2002). Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: Characterization of a metal exposure bioindicator, Environ. Toxicol. Chem., 21 (5): 1009-1014.
11. Bragigand, V, Berthet, B, (2003). Some methodological aspects of metallothionein evaluation, Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr., 134(1): 57-63.
12. Brdicka, R., (1933). Collect. Czech Chem. Commun., 5: 112-128.
13. Bremner, I, Morrison, JN, (1986). Assessment of zinc, copper and cadmium status in animals by assay of extracellular metallothionein, Acta Pharmacologica Et Toxicologica, 59: 502-509.
14. Burger, J, Lord, CG, Yurkow, EJ, McGrath, L, Gaines, KF, Brisbin, IL, Gochfeld, M, (2000). Metals and metallothionein in the liver of raccoons: Utility for environmental assessment and monitoring, Journal Of Toxicology And Environmental Health-Part A, 60 (4): 243-261.
15. Burkhardt-Holm, P, Bernet, D, Hogstrand, C, (1999). Increase of metallothionein-immunopositive chloride cells in the gills of brown trout and rainbow trout after exposure to sewage treatment plant effluents, Histochem.J., 31 (6): 339-346.
16. Butcher, H, Kennette, W, Collins, O, Demoor, J, Koropatnick, J, (2003). A sensitive time-resolved fluorescent immunoassay for metallothionein protein, Journal Of Immunological Methods, 272 (1-2): 247-256.
17. Castano, A, Carbonell, G, Carballo, M, Fernandez, C, Boleas, S, Tarazona, JV, (1998). Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on

rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), Ecotoxicology And Environmental Safety, 41 (1): 29-35.

18. Chan, KM, (1995). Metallothionein: Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong, Marine Pollution Bulletin, 31 (4-12): 411-415
19. Chassaigne, H, Lobinski, R, (1998). Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS and reversed-phase HPLC-electrospray MS, Analyst, 123 (10): 2125-2130.
20. Chassaigne, H, Lobinski, R, (1999). Detection of artefacts and peak identification in reversed-phase HPLC of metallothioneins by electrospray mass spectrometry, Talanta, 48 (1): 109-118.
21. Chassaigne, H, Lobinski, R, (1999). Rapid analysis for cadmium metallothionein complexes by HPLC using microparticulate stationary phases, Fresenius J. Anal. Chem., 363 (5-6): 522-525.
22. Cinier, CD, Petit-Ramel, M, Faure, R, Bortolato, M, (1998). Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in Cyprinus carpio tissues, Bull. Environ. Contam. Toxicol, 61 (6): 793-799.
23. Clements, BD, Cousins, RJ, (1986). Radioimmunoassay for rat metallothionein - assessment of plasma-levels, Federation Proceeding, 45 (4): 1085.
24. Colombres, E.B., Zarain, P.L., (2000), Metalotioneina, bioquímica y funciones propuestas, Boletin Educacion Bioquimica, 18 (1): 21-27.
25. Consuelo, R., Mendieta, R.J., Rodriguez, A., (1995). The electrochemical behaviour of Cd,Zn thioneins depending on the solution pH using differential pulse polarography, Analytica Chimica Acta, 305: 285-294.
26. Consuelo, R., Rodriguez, A., (1996). Study of additions of cadmium and zinc to the cadmium, zinc metallothioneins using differential pulse polarography influence pH, Analytica Chimica Acta, 325: 43-51.
27. Cope, WG, Wiener, JG, Atchison, GJ, (1994). Hepatic cadmium, metal-binding proteins and bioaccumulation in bluegills exposed to aqueous cadmium, Environmental Toxicology And Chemistry, 4: 553- 562
28. Cosson, RP, (2000). Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: Limits and perspectives, Cell. Mol. Biol., 46 (2): 295-309
29. Cosson, RP, (1994). Heavy-metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the liver of carp after contamination by silver, cadmium and mercury following or not pretreatment by zinc, Biometals, 7 (1): 9-19.
30. Couture, P, Rajotte, JW, (2003). Morphometric and metabolic indicators of metal stress in wild yellow perch (Perca flaveseens) from Sudbury, Ontario: A review, Journal Of Environmental Monitoring, 5 (2): 216- 221.
31. Coyle, P, Philcox, JC, Carey, LC, Rofe, AM, (2002). Metallothionein: The multipurpose protein, Cellular And Molecular Life Sciences, 59 (4): 627- 647
32. Dabrio, M, Rodriguez, AR, Bordin, G, Bebianno, MJ, De Ley, M, Sestakova, I, Vasak, M, Nordberg, M, (2002). Recent developments in quantification methods for, metallothionein, Journal Of Inorganic Biochemistry, 88 (2): 123-134.
33. Dabrio, M, Rodriguez, AR, (1999). Characterisation of zinc metallothioneins by electroanalytical techniques, Anal. Chim. Acta, 38 (1-3): 295-306.
34. Dallinger, R, Berger, B, Gruber, C, Hunziker, P, Sturzenbaum, S, (2000). Metallothioneins in terrestrial invertebrates: Structural aspects, biological

significance and implications for their use as biomarkers, Cell. Mol. Biol, 46 (2): 331-346

35. de Lafontaine, Y, Gagne, F, Blaise, C, Costan, G, Gagnon, P, Chan, HM, (2000). Biomarkers in zebra mussels (Dreissena polymorpha) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada), Aquat. Toxicol, 50 (1-2), 51-71.
36. De Smet, H, De Wachter, B, Lobinski, R, Blust, R, (2001). Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp Cyprinus carpio during cadmium exposure, Aquatic Toxicology, 52 (3-4): 269-281.
37. Diaz-Cruz, MS, Mendieta, J, Monjonell, A, Tauler, R, Esteban, M, (1999). Zinc-binding properties of the C-terminal hexapeptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala from mouse metallothionein: Analysis by differential pulse polarography and multivariate curve resolution, Analytica Chimica Acta, 385 (1-3): 353-363.
38. Diaz-Cruz, SM, Mendieta, J, Esteban, A, (2002). Combined use of differential pulse polarography and multivariate curve resolution: As applied to the study of metal mixed complexes of the metallothionein related hexap-tide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala, Electroanalysis, 14 (1): 50-56.
39. Dincer, Z, Haywood, S, Jasani, B, (1999). Immunocytochemical detection of metallothionein (MT1 and MT2) in copper-enhanced sheep brains, Journal Of Comparative Pathology, 120 (1): 29-37.
40. Eastwood, S, Couture, P, (2002). Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (Perca flavescens) from a metal-contaminated environment, Aquatic Toxicology, 58 (1-2): 43-56.
41. Ejnik, J, Robinson, J, Zhu, JY, Forsterling, H, Shaw, CF, Petering, DH, (2002). Folding pathway of apo-metallothionein induced by Zn^{2+}, Cd^{2+} and Co^{2+}, Journal of Inorganic Biochemistry, 88 (2): 144-152.
42. Erk, M, Ivankovic, D, Raspor, B, Pavicic, J, (2002). Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins, Talanta, 57 (6), 1211-1218.
43. Evans, CW, Wilson, DA, Mills, GN, (2001). Quantitative competitive (qc) RT-PCR as a tool in biomarker analysis, Biomarkers, 6 (1): 7-14.
44. Evering, W., Haywood, S, Bremner, I, Trafford, J., (1991). The protective role of metallothionein in copper overload. 1. Differential distribution of immunoreactive metallothionein in copper-loaded rat-liver and kidney, Chem.-Biol. Interact., 78 (3): 283-295.
45. Ferrarello, CN, de la Campa, MDF, Carrasco, JF, Sanz-Medel, A, (2000). Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel Mytilus edulis at basal levels by chromatographic separations coupled to quadrupole and double-focusing magnetic sector ICPMS, Analytical Chemistry, 72 (24): 5874-5880.
46. Florence, T.M., (1979). Cathodic stripping voltammetry. Part I. Determination of organic sulfur compounds, flavines and porphyrines at the submicromolar level, J. Electroanal. Chem., 97: 219-236.
47. Forsman, U, (1980). Cathodic stripping voltammetric of peniciline in the absence and presence of cupric ions ; J. Electroanal. Chem., 111: 325-335.
48. Forsman, U., (1981). Cathodic stripping voltammetric behaviour of cysteine and cystine in the presence of cupric ions, J. Electroanal. Chem., 172: 215-231.
49. Furey, W, Robbins, AH, Stout, CD, (1984). Progress report on the structure determination of cd, zn metallothionein, Acta Crystallographica Section A, 40: C11-C11.

50. Gagne, F, Blaise, C, (1997). Evaluation of cell viability, mixed function oxidase activity, metallothionein induction, and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes exposed to industrial effluents. 2. Validation of the rainbow trout hepatocyte model for ecotoxicity testing of industrial wastewater, Environmental Toxicology And Water Quality, 14 (4): 305-314.
51. Galvez, F, Hogstrand, C, McGeer, JC, Wood, CM, (2001). The physiological effects of a biologically incorporated silver diet on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), Aquatic Toxicology, 55 (1-2): 95-112.
52. Galvez, F, Hogstrand, C, Wood, CM, (1998). Physiological responses of juvenile rainbow trout to chronic low level exposures of waterborne silver, Comparative Biochemistry And Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology, 119 (2): 131-137.
53. George, S.G., (1989). Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxication systems: dose-response, Aquatic Toxicology, 15: 303-310.
54. Geret, F, Jouan, A, Turpin, V, Bebianno, MJ, Cosson, RP, (2002). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (Crassostrea gigas) and the mussel (Mytilus edulis), Aquatic Living Resources, 15 (1): 61-66.
55. Geret, F, Rainglet, F, Cosson, RP, (1998). Comparison between isolation protocols commonly used for the purification of mollusc metallothioneins, Marine Environmental Research, 46 (1): 545-550.
56. Guerrero, NRV, Nahabedian, DE, Wider, EA, (2000). Analysis of some factors that may modify the bioavailability of cadmium and lead by Biomphalaria glabrata, Environmental Toxicology And Chemistry, 19 (11): 2762-2768.
57. Hall, JL, (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, Journal Of Experimental Botany, 53: 1- 11.
58. Harlyk, C, Nieto, O, Bordin, G, Rodriguez, AR, (1998). Electrochemical study of metallothioneins using cyclic voltammetry, J. of Electroanal. Chem., 458 (1): 199-208.
59. Hermesz, E, Abraham, M, Nemcsok, J, (2001). Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock, Comparative Bioch. and Physiology C - Toxicology & Pharmacology, 128 (3): 457-465.
60. Heyrovský, M, Mader, P., Vaselá, V., Fedurco, M., (1994). The Reactions of cystine at mercury electrodes, 369: 53-70.
61. Hogstrand, C, Galvez, F, Wood, CM, (1996). Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts, Environmental Toxicology And Chemistry, 15 (7): 1102-1108.
62. Hogstrand, C, Haux, C, (1990). Metallothionein as an indicator of heavy-metal exposure in 2 subtropical fish species, J. of Exp. Marine Biol. and Ecology, 138 (1-2): 69-84.
63. Hogstrand, C, Lithner, G, Haux, C, (1991). The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, perca-fluviatilis, Pharmacology & Toxicology, 61 (6): 492-501.
64. Hogstrand, C, Olsson, PE, Haux, C, (1989). A Radioimmunoassay for metallothionein in fish, Marine Environmental Research, 28 (1-4): 183-186.
65. Hollis, L, Hogstrand, C, Wood, CM, (2001). Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout, Archives of Environmental Contamination And Toxicology, 41 (4): 468- 474.

66. Hong, YH, Schartl, M, (1992). Structure of the rainbow-trout metallothionein-A, Gene, 120 (2): 277-279.
67. Http://Www.Unizh.Ch/~Mtpage/Intro.Html Retirado A 2 De Agosto De 2001 Às 22horas E 52 Min.
68. Hylland, K, Haux, C, Hogstrand, C, (1995). Immunological characterization of metallothionein in marine and fresh-water fish, Marine Environmental Research, 29 (1-4): 111-115.
69. Hylland, R., Haux, C., Hogstrand, C., (1992). Hepatic MT and heavy metals in dab limanda limanda from the german bight, Marine Ecology Progress Series, 91: 89-96.
70. Jesseneller, K, Picozza, E, Crivello, JF, (1994). Quantitation of metallothionein messenger-RNA by RT-PCR and chemiluminescence, Biotechniques, 17 (5): 962.
71. Jin, Nz, Kimura, M, Yokoi, K, Itokawa, Y., (1993). A gel-filtration high-performance liquid-chromatographic method for determination of hepatic and renal metallothionein of rat and in comparison with the cadmium-saturation method, Biological Trace Element Research, 36 (2): 183-190.
72. Jin, W., Xin., Z, Xiao., L, (2000). Mechanism of the electrochemical reaction of glutathione at a mercury electrode, Electroanalysis, 12 (11): 858-862
73. Kagi, R.R., (1991). Overview of metallothionein, Methods in Enzimology, 205: 613-626.
74. Kito, H, Ose, Y, Sato, T, Ishikawa, T, Tazawa, T, (1980). Formation of metallothionein in fish, Journal Of Pharmacobio-Dynamics, 3 (4): S23- S23.
75. Kito, H, Tazawa, T, Ose, Y, Sato, T, Ishikawa, T., (1982). Formation of metallothionein in fish, Comparative Biochemistry And Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology, 73 (1): 129-134.
76. Lacorn, M, Lahrssen, A, Rotzoll, N, Simat, TJ, Steinhart, H., (2001). Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implications for biomonitoring, Environmental Toxicology And Chemistry, 20 (1): 140-145.
77. Lafaurie, M, (1995). PCR at the service of environment, Biofutur, 142: 22-26.
78. Legall A.C., Van Den Berg, C.M.G., (1993). Cathodic stripping voltammetry of glutathione in natural waters, Analyst, 118: 1411-1415.
79. Leung, KMY, Furness, RW, (1999). Induction of metallothionein in dogwhelk nucella lapillus during and after exposure to cadmium, Ecotoxicology And Environmental Safety, 43 (2): 156-164.
80. Linde, AR, Sanchez-Galan, S, Klein, D, Garcia-Vazquez, E, Summer, KH, (1999). Metallothionein and heavy metals in brown trout (Salmo trutta) and European eel (Anguilla anguilla): A comparative study, Ecotoxicology And Environmental Safety, 44 (2): 168-173.
81. Linde, AR, Sanchez-Galan, S, Valles-Mota, P, Garcia-Vazquez, E, (2001). Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout, Ecotoxicology And Environmental Safety, 49 (1): 60-63.
82. Lionetto, MG, Giordano, ME, Caricato, R, Pascariello, MF, Marinosci, L, Schettino, T, (2001). Biomonitoring of heavy metal contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in Mytilus galloprovincialis and Mullus barbatus, Aquatic Conservation-Marine And Freshwater Ecosystems, 11 (4): 305-310.
83. Mairesse-Ducarmois, C.A., Patriarche, G.J., Vandenbalck, J.L., (1974). Contribution a l' électrochimie des thiols et dissulfures. Partie I: cysteine et cystine, Analytica Chimica Acta, 88 : 165-174.

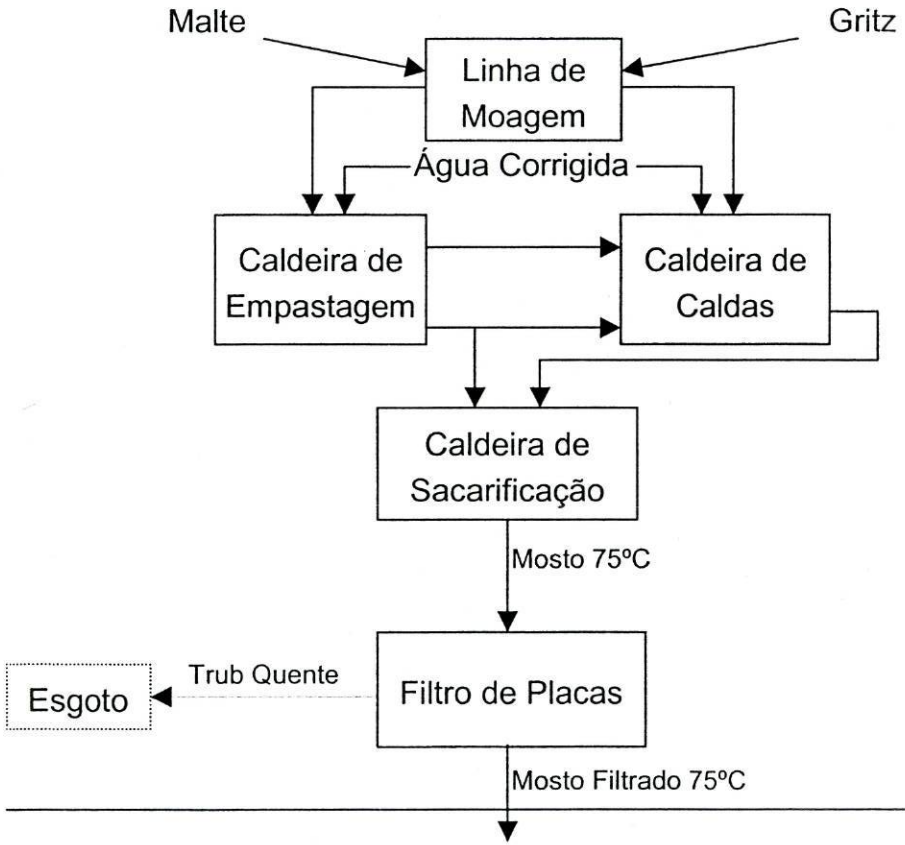
84. Margoshes, M., Vallee, B.L., (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex, J. Am. Chem. Soc., 79: 4813.
85. Mazzucotelli, A, Viarengo, A, Canesi, L, Ponzano, E, Rivaro, P, (1991). Determination of trace amounts of metalloprotein species in marine mussel samples by high-performance liquid-chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection, Analyst, 116 (6): 605- 608.
86. Minami, T, Ichida, S, Kubo, K, (2002). Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis, Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences, 78 (1-2): 303- 311.
87. Miyairi, S, Shibata, S, Naganuma, A, (1998). Determination of metallothionein by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system, Analytical Biochemistry, 25 (2): 168-75
88. Mullins, JE, Fredrickson, RA, Fuentealba, IC, Markham, RJF, (1999). Purification and partial characterization of a cadmium-binding protein from the liver of rainbow trout (Onchorynchus Mykiss), Canadian Journal Of Veterinary Research, 63 (4): 225-229.
89. Munoz, A, Rodriguez, AR, (1995). Quantitative determination of cadmium, zinc thioneins using differential-pulse polarography, Analyst, 120 (2): 529-532.
90. Nieto, O, Hellemans, G, Bordin, G, De Ley, M, Rodriguez, AR, (1998). Characterisation of human adult kidney Cd, Zn-metallothioneins by differential pulse polarography, Bioelectrochemistry And Bioenergetics, 146 (1): 45- 54.
91. Nolan, CV, Shaikh, ZA, (1986). Determination of metallothionein in tissues by radioimmunoassay and by cadmium saturation method, Analytical Biochemistry, 154 (1): 213-223.
92. Nomiyama, K, Nomiyama, H, (1982). High-performance liquid-chromatographic determination of tissue metallothionein in monkeys chronically exposed to cadmium, J. of Chrom., 228: 285- 291.
93. Nordberg, M, (1998). Metallothioneins: historical review and state of knowledge, Talanta, 46 (2): 243-254.
94. Ochial, EI, (1995). Toxicity of heavy-metals and biological defense - principles and applications in bioinorganic chemistry, J. of Chem. Educ., 72 (6): 479-484.
95. Olafson, R.W., Olsson, P.E., (1991). Electochemical determination of MT, Methods in Enzimology, 205: 205-213.
96. Olafson, RW, (1981). Differential pulse polarographic-determination of murine metallothionein induction kinetics, J. of Biological Chemistry, 25 (3): 1263-1268.
97. Oliver, C, Porta, A, (1998). Environmental toxicology: metallothioneins and cellular metabolism, Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana, 32 (3): 363-368.
98. Olsvik, PA, Gundersen, P, Andersen, RA, Zachariassen, KE, (2000). Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, salmo trutta, exposed to different natural water environments during a run-off episode, Aquatic Toxicology, 50 (4): 301-316.
99. Olsvik, PA, Hindar, K, Zachariassen, KE, Andersen, R, (2001). Brown trout (Salmo Trutta) metallothioneins as biomarkers for metal exposure in two norwegian rivers, Biomarkers, 6 (4): 274- 288.
100. Onosaka, S, Cherian, MG, (1982). Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods, Toxicology And Applied Pharmacology, 63 (2): 270-274.
101. Palmiter, RD, (1998). The elusive function of metallothioneins, Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (15): 8428-8430.

102. Perkins, EJ, Griffin, B, Hobbs, M, Gollon, J, Wolford, L, Schlenk, D, (1997). Sexual differences in mortality and sublethal stress in channel catfish following a 10 week exposure to copper sulfate, Aquatic Toxicology, 37 (4): 327- 339.
103. Rainbow, PS, (1995). Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment, Marine Pollution Bulletin, 3 (4-12): 183-192.
104. Raspor, B, Paic, M, Erk, M, (2001). Analysis of metallothioneins by the modified brdicka procedure, Talanta, 55 (1), 109-115.
105. Raspor, B, Pavicic, J, (1996). Electrochemical methods for quantification and characterization of metallothioneins induced in Mytilus galloprovincialis, Fresenius Journal Of Analytical Chemistry, 354 (5-6): 529-534.
106. Rodriguez, AR, Esteban, M, (2000). Application of electroanalytical methods to the characterization of metallothioneins and related molecules, Cellular And Molecular Biology, 46 (2): 237-256.
107. Romero-Isart, N, Vasak, M, (2002). Advances in the structure and chemistry of metallothioneins, Journal Of Inorganic Biochemistry, 88 (3-4): 388- 396.
108. Rotchell, JM, Clarke, KR, Newton, LC, Bird, DJ, (2001). Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in european flounders (Pleuronectes flesus) from the severn estuary and bristol channel, Marine Environmental Research, 52 (2): 151-171.
109. Saito, T, Kurasaki, M, (2000). Apoptosis and endocrine disrupters, Biomed. Res., 21 (6): 353-359.
110. Scarano, G., Morelli, E., (1996). Cathodic stripping voltametric determination of MT, Electroanalysis, 8 (4): 396-398.
111. Sestakova, I, Kopanica, M, Havran, L, Palecek, E, (2000). Constant current chronopotentiometric stripping analysis of Cd-metallothionein on carbon and mercury electrodes. Comparison with voltammetry, Electroanalysis, 12 (2): 100-104.
112. Sestakova, I, Miholova, D, Vodickova, H, Mader, P, (1995). Electrochemical-behavior of metallothioneins at mercury and carbon electrodes, Electroanalysis, 7 (3): 237-246.
113. Sestakova, I, Vodickova, H, Mader, P, (1998). Voltammetric methods for speciation of plant metallothioneins, Electroanalysis, 10 (11): 764-770.
114. Shinogi, M, Nishinaga, K, Yokoyama, I, (1996). Measurement of metallothionein in rat tissues by a chromatographic method using the fluorometry of thiol groups, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 19 (7): 911-914.
115. Shugart, LR, Adams, SM, Jiminez, BD, Talmage, SD, Mccarthy, JF, (1989). Biological markers to study exposure in animals and bioavailability of environmental contaminants, ACS Symposium Series, 382: 85-97.
116. Sogawa, N, Sogawa, CA, Oda, N, Fujioka, T, Onodera, K, Furuta, H, (2000). Induction of metallothionein mrna expression in the mouse liver after cadmium injection as measured by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction method, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 22, 9: 663-666.
117. Song, FY, Briseno, AL, Zhou, FM, (2001). Redox reactions of and transformation between cysteine-mercury thiolate and cystine in metallothioneins adsorbed at a thin mercury film electrode, Langmuir, 17 (13): 4081-4089.
118. Stankovich, M.T, (1977). The electrochemistry of proteins and related substances. Part II: insulin, J. Electroanal. Chem., 5: 173-183.

119. Stankovich,M.T., Bard, A.J., (1977). The electrochemistry of proteins and related substances. Part I: Cystine and Cystein at the mercury electrode, J. Electroanal. Chem., 75: 487-505.
120. Stillman, MJ, Suzuki, KT, Shaw, CF, (2002). Thematic issue on metallothioneins – preface, Journal of Inorganic Biochemistry, 88 (2): V.
121. Sulaiman, N, George, S, Burke, MD, (1991). Assessment of sublethal pollutant impact on flounders in an industrialized estuary using hepatic biochemical indexes, Marine Ecology-Progress Series, 68 (3): 207-212.
122. Summer, KH, Klein, D, (1991). Determination of metallothionein in biological-materials, Methods In Enzymology, 205: 57-60.
123. Tapia, L, Gonzalez, M, (2002). Metallothioneins regulate intracellular copper traffic and storage, Biometals, 26 (1): 236-236.
124. Teigen, SW, Andersen, RA, Daae, HL, Skaare, JU, (1999). Heavy metal content in liver and kidneys of grey seals (halichoerus grypus) in various life stages correlated with metallothionein levels: some metal-binding characteristics of this protein, Environmental Toxicology And Chemistry, 18 (10): 2364-2369.
125. Temara, A, Warnau, M, Dubois, P, Langston, WJ, (1997). Quantification of metallothioneins in the common asteroid asterias rubens (echinodermata) exposed experimentally or naturally to cadmium, Aquatic Toxicology, 31 (1-3): 17- 34.
126. Templation, D.M., Cherian, M.G., (1991). Toxicologic significance of metallothionein, Methods in Enzimology, 205: 11-24.
127. Tessier, C, Blais, JS, (1996). Determination of cadmium-metallothioneins in zebra mussels exposed to subchronic concentrations of Cd^{2+}, Ecotoxicology And Environmental Safety, 33 (3): 246-252.
128. Triebskorn, R, Adam, S, Casper, H, Honnen, W, Pawert, M, Schramm, M, Schwaiger, J, Kohler, HR, (2002). Biomarkers As diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms, Ecotoxicology, 11 (6): 451-465.
129. Tsangaris, GT, Vamvoukakis, J, Politis, I, Kattamis, AC, Tzortzatou-Stathopoulou, F, (2000). Metallothionein expression prevents apoptosis. II: evaluation of the role of metallothionein expression on the chemotherapy- induced apoptosis during the treatment of acute leukemia, Anticancer Research, 20 (6b): 4407-4411.
130. van den Berg, C.M.G., Househam, B.C., Riley, J. P., (1988). Determination of cystein and cystein in sea water using cathodic stripping voltammetry in the presence of Cu(II), J. Electroanal. Chem., 239: 137-148
131. van Vyncht, G, Bordin, G, Rodriguez, AR, (2000). Rabbit liver metallothionein subisoform characterisation using liquid chromatography hyphenated to diode array detection and electrospray ionisation mass spectrometry, Chromatographia, 52 (11-12): 745-752.
132. Vasak, M., Hasler, D.W., (2000). MT: new functional and structural insights, Current opinion in Chemical Biology, 4: 177-183
133. Vodickova, H, Pacakova, V, Sestakova, I, Mader, P, (2001). Analytical methods for determination of metallothioneins, Chemicke Listy, 95 (8): 477- 483.
134. White, P.C., Lawrence, N.S., Davis, J., Compton, RG, (2002). Electrochemical determination of thiols: a Perspective, Electroanalysis, 14 (2): 89-98.
135. Yang, JH, Cao, YG, Yang, MS, (1998). Hepatocyte research report - Determination of metallothionein content in hepatoma cells by differential pulse polarography, Chemico-Biological Interactions, 115 (2): 109-116.

ANEXOS

ANEXO I

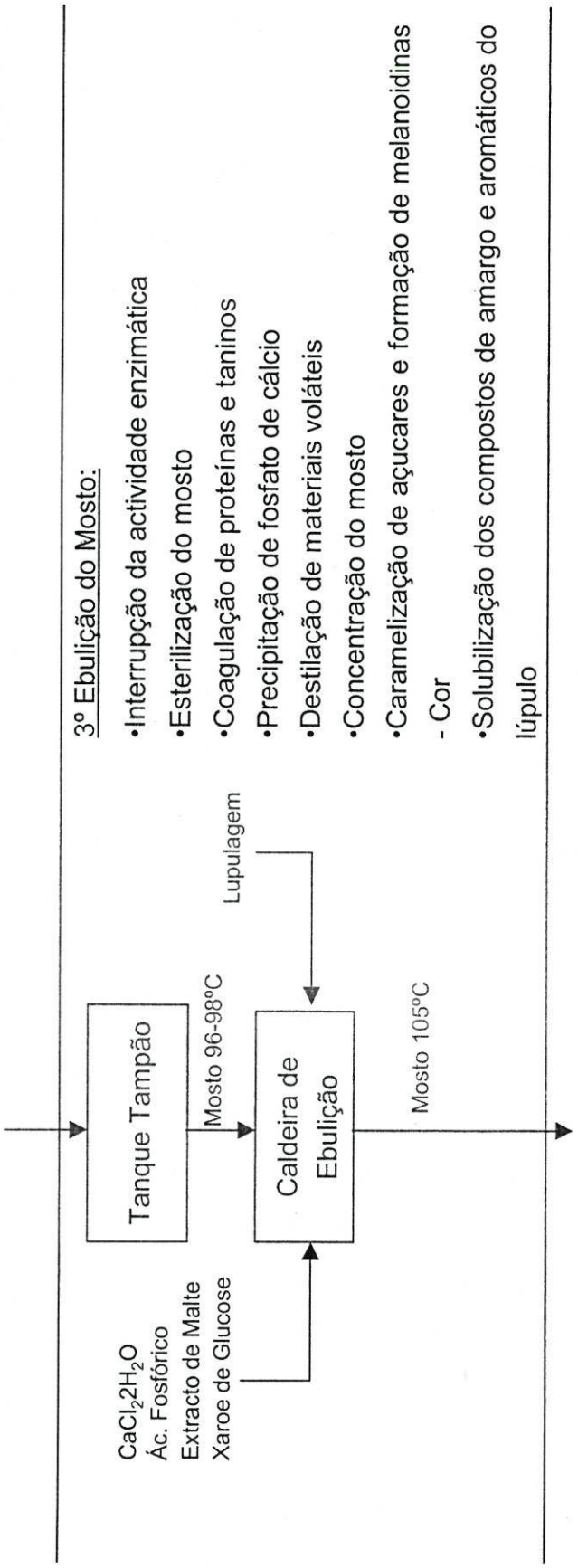


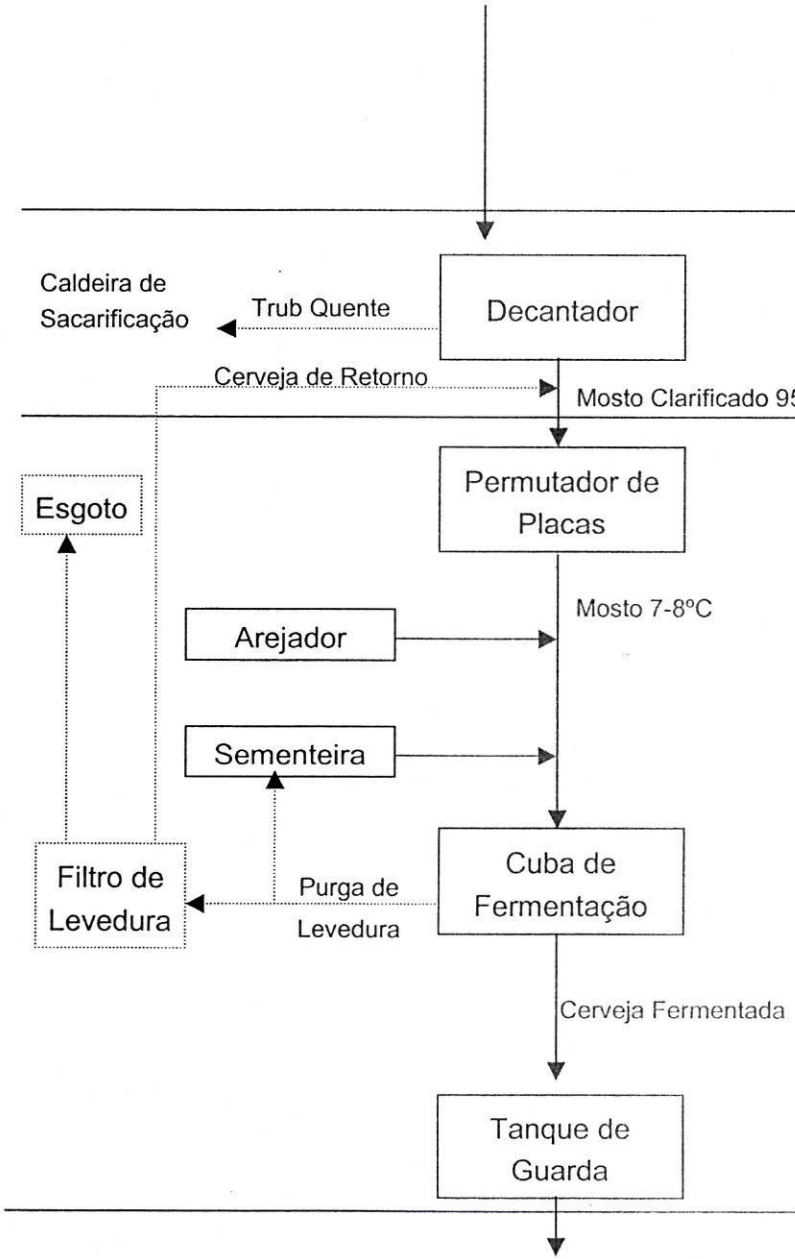
1º Hidratação e Empastagem

Mistura da Farinha com água tépida e estacionamento a diferentes temperaturas para que as reacções enzimáticas necessárias se dêem obtendo-se assim o desejado teor em açucares fermentescíveis e dextrinas.

2º Filtração

Separação da parte líquida, composta pelos açucares fermentáveis, e a parte sólida, insolúvel – Trub Quente. ou Dreches.


3º Ebulição do Mosto:
•Interrupção da actividade enzimática
•Esterilização do mosto
•Coagulação de proteínas e taninos
•Precipitação de fosfato de cálcio
•Destilação de materiais voláteis
•Concentração do mosto
•Caramelização de açucares e formação de melanoidinas - Cor
•Solubilização dos compostos de amargo e aromáticos do lúpulo
Tanque Tampão
Mosto 96-98ºC
Lupulagem
Caldeira de Ebulição
Mosto 105ºC
$CaCl_2 2H_2O$
Ác. Fosfórico
Extracto de Malte
Xaroe de Glucose



4º - Clarificação do Mosto

Separação da matéria precipitada durante a ebulição.

5º - Arrefecimento do Mosto

Arrefecimento do mosto a 7-8ºC, de forma a tornar possível a fermentação.

6º - Arejamento do Mosto

Injecção controlada de ar estéril para optimizar a metabolização do mosto pela levedura.

7º Injecção de Levedura

8º Processo de Fermentação

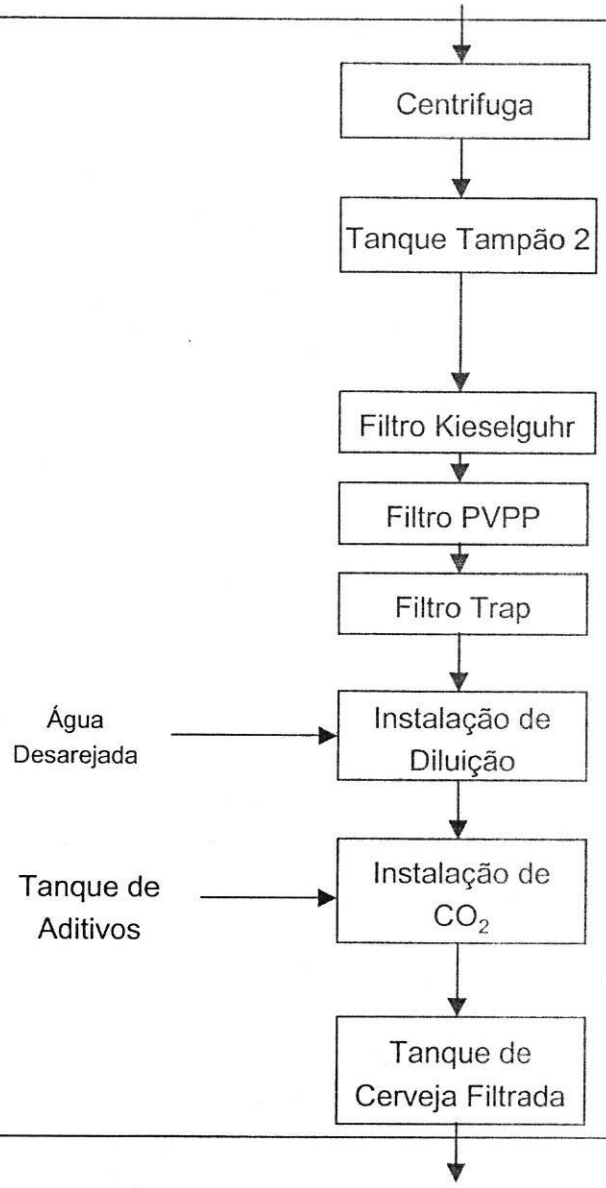
É a etapa chave de todo o processo de fabrico de cerveja:

Fermentação e Maturação - Cilindrocónica

Estabilização coloidal a -1,5ºC - Tanques de Guarda.

Tempo Total do Ciclo - 16 – 19 dias

O factor limitante é sempre o teor em diacetilo total.



9º - Centrifugação

A Cerveja é submetida a centrifugação para retirar a maior parte da levedura restante, de forma a evitar um rápido entupimento dos filtros.

10º - Filtração

•*Filtro kieselguhr* - clarificação por filtração com um filtro de placas com Kieselguhr.

•*Filtro PVPP* (polivinilpolipirrolidona) -adsorção de polifenois da cerveja sendo o seu doseamento feito de acordo com o teor antocianogénico da cerveja

•*Filtro Trap* - filtro de cartaxos, capaz de realizar uma filtração rigorosa e de remover todos os microorganismos da cerveja.

11º - Diluição

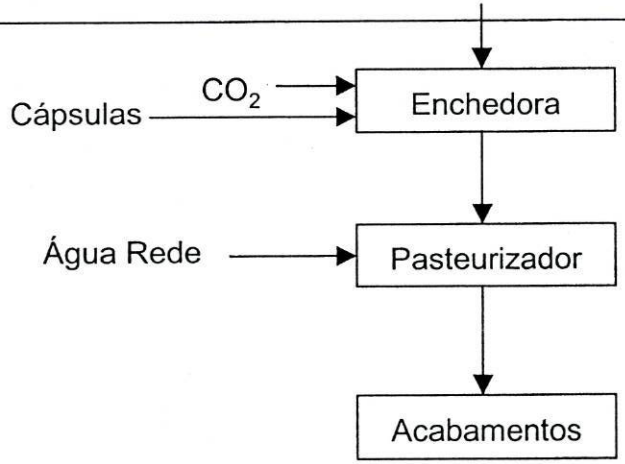
Medição do extracto e calculado o volume da água desarejada a adicionar de forma a obter o valor de extracto pretendido.

12º Instalação de CO_2 e Aditivos

- Saturação com CO_2; Acerto da Coloração com extracto de malte; Junção de aditivos para conservar as propriedades da cerveja: metassulfito, ácido ascórbico

13º Detenção no Tanque de Cerveja Filtrada (TCF)

Entre 2 e 72 horas , para se conhecerem os seus parâmetros analíticos e verificar a necessidade ou não de ajustes



Cerveja pronta para Comercialização

14º Enchimento

Garrafas de tara perdida ou retornável, Latas ou Barris

- pré-vácuo em contra pressão com CO_2
- Temperatura: 4ºC

15º Pasteurização

Passagem das garrafas por túnel onde são submetidas a banhos com temperaturas progressivamente superiores até a cerveja atingir os 60-62ºC de temperatura.

16º Acabamentos

Rotuladora; Inspector de Cheio; Engradadora; Inspector de Garrafas, Paletizadora, Atadora e Etiquetador.

ANEXO II

9.24.1
Vicinal Diketones in Beer: Spectrophotometric Method

Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

1 Scope

The determination of vicinal diketones in beer by ultraviolet spectrophotometry.

2 Field of Application

The method can be applied to all filtered beers. In unmatured beers, the precursors of vicinal diketones are also measured.

3 References

3.1 International Standard, Water for Analytical Laboratory Use, Specification and Test Methods, ISO 3696, 1987 (E).

3.2 EBC Method 9.24.2 (Beer: Vicinal Diketones in Beer, Gas Chromatographic Method).

4 Principle

4.1 The vicinal diketones are distilled from the beer. The distillate is mixed with a solution of o-phenylenediamine to form derivatives of quinoxaline.

4.2 After acidification, the amount of reaction products is measured spectrophotometrically. The concentration of vicinal diketones is calculated with the help of a calibration factor.

5 Reagents

5.1 During the analysis, unless otherwise stated, use water of at least grade 3 as defined in ISO 3696, 1987.

5.2 Hydrochloric acid c(HCl) = 4 mol/litre.

5.3 o-Phenylenediamine, 10 g/litre in hydrochloric acid, 4 mol/litre. Prepare freshly on the day of use and keep the solutions in a dark place. o-Phenylenediamine is toxic and may cause allergic reactions; it must be handled carefully and with rubber gloves.

5.4 Diacetyl stock solution, 5 g/litre in water. The solution should be stored in a brown bottle in a refrigerator. Stability: 6 months.

5.5 Diacetyl standard solution, 250 mg/litre. Dilute 5 ml of the stock solution with water to 100 ml in a volumetric flask. Stability: 6 months.

6 Apparatus

6.1 Parnas or Markham still, appropriate for the steam distillation of 100 ml samples.

6.2 Measuring cylinder, 25 ml, 100 ml.

6.3 Spectrophotometer, covering the ultraviolet range.

6.4 Silica cells, optical path length 10 mm.

7 Preparation of Samples

Samples containing yeast, should be clarified by centrifugation or filtration.

8 Procedure

8.1 Test Portion

Measure 100 ml of the sample in a measuring cylinder and add to the distillation flask.

8.2 Determination

8.2.1 Distil the sample to give 25 ml of distillate in the measuring cylinder. The heating period must be at least 6 min.

8.2.2 The distillation time is 8 to 10 min.

8.2.3 Mix the distillate.

8.2.4 Pipette 10 ml of the distillate into a dry test tube.

8.2.5 Pipette 0,5 ml o-phenylenediamine solution in the test tube.

8.2.6 Mix the 2 solutions.

8.2.7 Allow the mixture to stand in a dark place for 20 to 30 min.

8.2.8 Add 2 ml of hydrochloric acid (4 mol/litre) to the reaction mixture with a pipette.

8.2.9 Measure the absorbance at 335 nm against water in the spectrophotometer (A_{335}).

8.3 Blank Test

8.3.1 Parallel to the determination carry out a blank test, using water instead of distillate.

8.3.2 Proceed as described in the subclause "Determination", from paragraph (8.2.5) to (8.2.8) inclusive.

8.3.3 Measure the absorbance at 335 nm against water in the spectrophotometer (A_{bl}).

8.4 Calibration

8.4.1 Pipette 9,9 ml of water into a dry test tube.

8.4.2 Add 0,10 ml of the diacetyl standard solution and mix.

8.4.3 Proceed as described in the subclause "Determination", from paragraph (8.2.5) to (8.2.8) inclusive.

8.4.4 Measure the absorbance at 335 nm against water in the spectrophotometer (A_{st}).

9 Expression of Results

9.1 Calculation

9.1.1 The content of vicinal diketones expressed in mg/litre, is given by the formula:

$$VDK = \frac{A_{335} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \cdot 0{,}625 \text{ (mg/litre)}$$

A_{335} : sub clause 8.2.9
A_{bl} : sub clause 8.3.3
A_{st} : sub clause 8.4.4

If the denominator of the formula (Ast - Abl) deviates considerably from 0,230, the reason should be investigated by making a new solution of freshly distilled diacetyl.

9.1.2 Express the results to 2 decimal places.

9.1.3 Comparison with the gas chromatographic EBC Method 9.24.2
The spectrophotometric determination of vicinal diketones is not directly comparable to the gas chromatographic determination of total diacetyl and total 2,3-pentanedione for the following reasons: The pentanedione is calculated as diacetyl (relative molecular mass 100 and 86 respectively). An amount of 5 to 10% of the pentanedione is not distilled. Considering these two factors, the following equation holds:

vicinal diketones (9.24.1) =
= diacetyl + 0,8 · pentandione (9.24.2)

9.2 Precision
Precision values (mg/litre) were determined from the data of a collaborative trial carried out by the EBC Analysis Committee in 1998. Seven laboratories participated and beer samples were analyzed at five levels.

Range	r_{95}	R_{95}
0,06 to 0,13	0,02	0,06

9.3 Special case

In samples with high contents of precursors (i.e. samples taken during fermentation or at early stages of maturation) the transformations of precursors into vicinal diketones may not be quite complete.
If values similar to those by gas chromatographic analysis are wanted, the samples must be treated before distillation.
The beer is poured 5 times as a narrow stream between two beakers and then placed in a water bath at 60 °C for 90 min.

10 Bibliography

10.1 Gjersten, P., Undstrup, S. and Trolle, B., Monatsschrift für Brauerei, 1964, 17, 232.

10.2 Haukeli, A.D. and Lie, S., Journal of the Institute of Brewing, 1971, 77, 538.

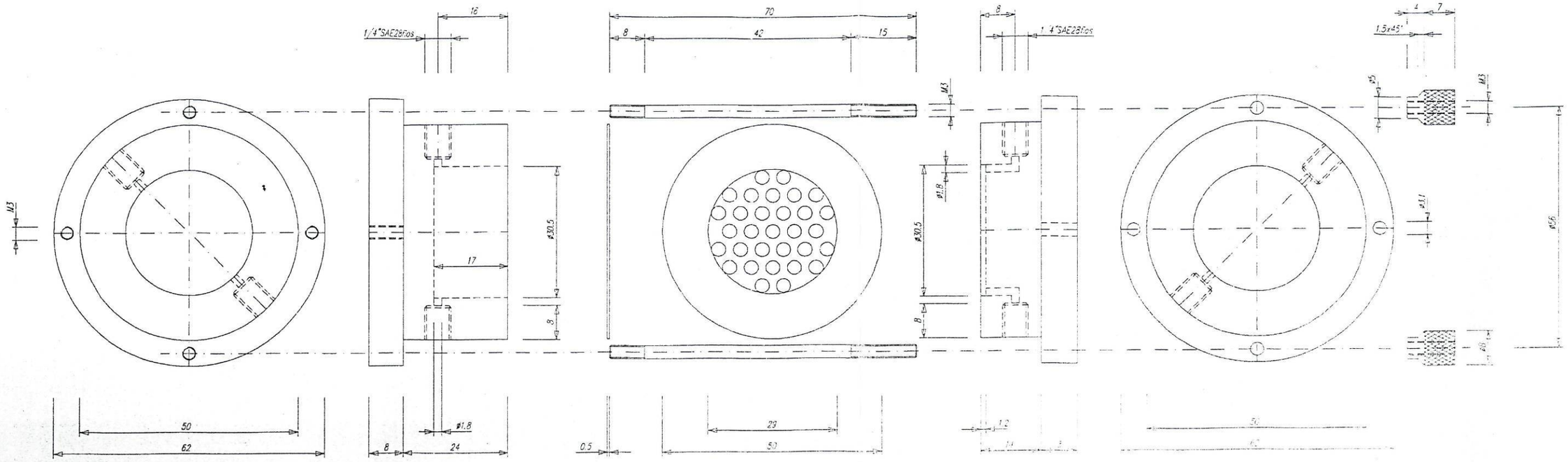
10.3 Markham, R., Journal of Biochemistry, 1942, 36, 790.

10.4 Esser, K.D. and Kremkow, C., Monatsschrift für Brauerei, 1970, 23, 11.

10.5 Zürcher, C. and Gruss, R., Monatsschrift für Brauerei, 1977, 30, 13.

10.6 Bénard, M., Journal of the Institute of Brewing, 2000, 106, 135.

ANEXO III



REV	DESCRIÇÃO	DATA	DES	VERIF

DESENHO Nº

UNICER

DESCRIÇÃO

MÓDULO DE PERVAPORAÇÃO

CENTRO: LEÇA DO BALIO

AREA: AREA

ESPECIA.: ESPECIA

DESENHO Nº

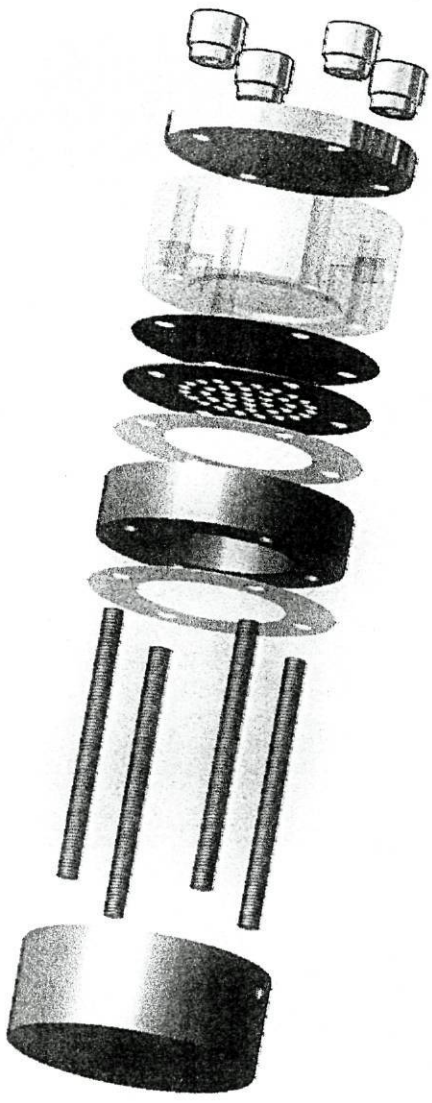
00 . 00 . 00 . 00

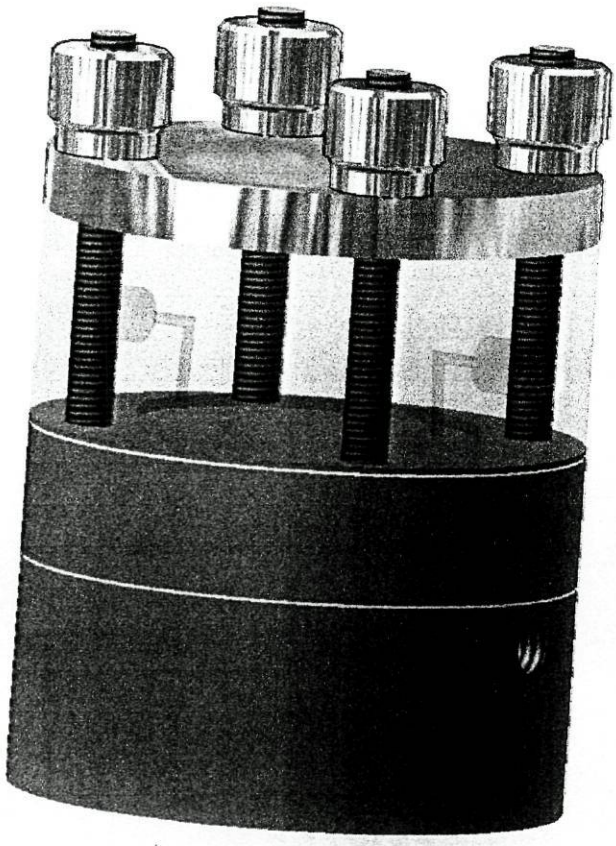
data	escala	desenhou	verificou	aprovou
07.01.00	1:1	Alves		

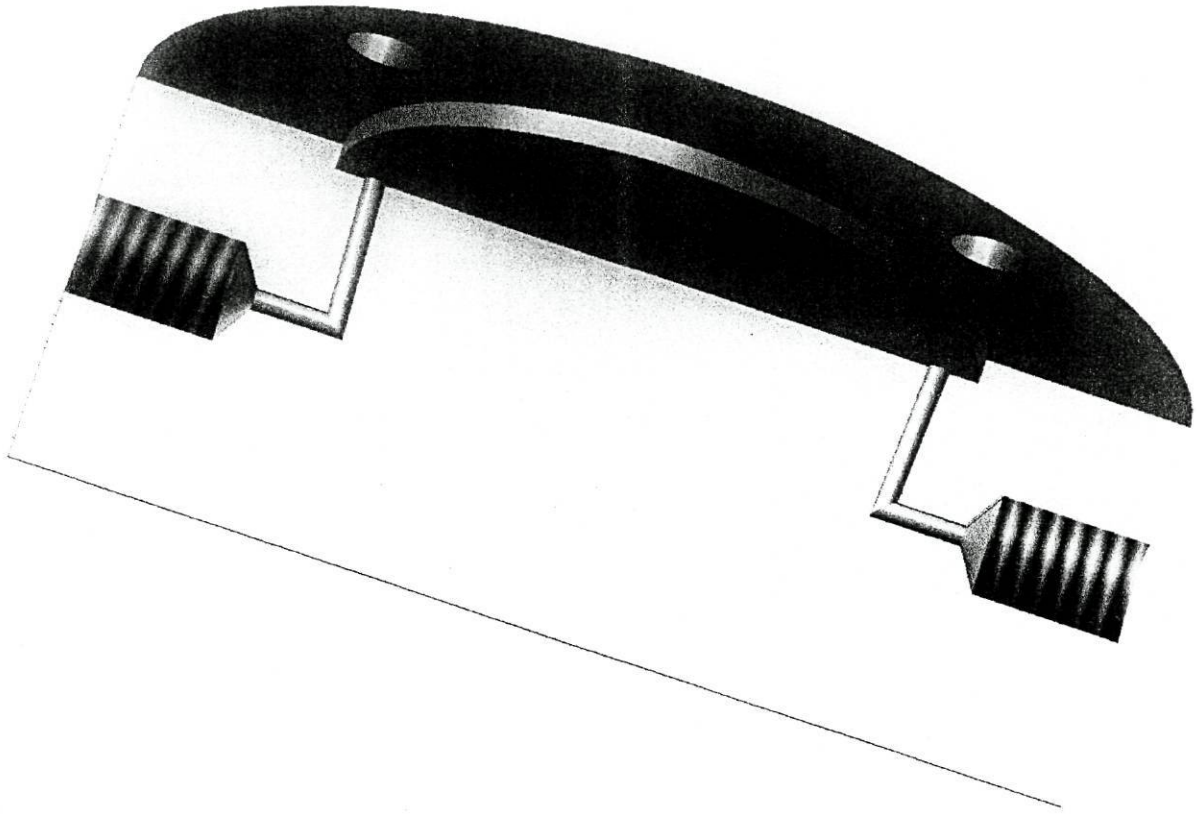
substitui	
substituido	

UNICER

ANEXO IV







ANEXO V

9.24.2
Vicinal Diketones in Beer: Gas Chromatographic Method

Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

1 Scope

Determination of the vicinal diketones, 2,3-butanedione (diacetyl), 2,3-pentanedione and their precursors in fermenting worts and beers by gas chromatography using a capillary column.

2 Field of Application

2.1 The method can be applied to all beers and fermenting worts.

2.2 Chlorinated organic compounds, often present in laboratory water, interfere in the analysis.

2.3 Sulphur dioxide present at a concentration of more than 10 mg/litre binds the diketones as non-volatile adducts.

2.4 The precursors of vicinal diketones can be determined by inclusion of an incubation step to convert them to diacetyl and 2,3-pentanedione.

3 Reference

International Standard, Water for Analytical Laboratory Use, Specification and Test Methods, ISO 3696, 1987 (E).

4 Principle

4.1 An aliquot of the sample is saturated with ammonium sulphate in a vial and an internal standard of 2,3-hexanedione is added. The vial is held at 35 °C for 40 min to establish an equilibrium between the sample and headspace.

4.2 A sample of the headspace is injected into a gas chromatograph fitted with a capillary column and an electron capture detector.

4.3 Diacetyl and 2,3-pentanedione are separated and their respective concentrations calculated from their peak area ratios to the internal standard, 2,3-hexanedione, with respect to the calibrated standards. A standard additions technique is employed for calibration.

4.4 Precursors present in a sample may be transformed into the corresponding diketones by aeration and treatment at 60 °C for 90 min and their concentrations determined in a similar manner.

5 Reagents

5.1 Ensure that the water used for the preparation of solutions is free from halocarbons which give a strong response to an electron capture detector. Remove halocarbons by boiling the water to give half of the bulk or alternatively use bottled mineral water. Use only reagents of recognised analytical grade and water of at least grade 2 as defined in ISO 3696, 1987.

5.2 Diacetyl (2,3-butanedione), minimum purity 99 %.

5.3 2,3-Pentanedione, minimum purity 97 %.

5.4 2,3-Hexanedione, minimum purity 90 %.

5.5 Ethanol, absolute.

5.6 Ammonium sulphate.

5.7 2,3-Hexanedione stock solution. Weigh out 0,250 g of 2,3-hexanedione and make up to 100 ml with absolute ethanol in a volumetric flask and store at 0 to 2 °C. This solution is stable for 1 week.

5.8 2,3-Hexanedione internal standard solution. Dilute 5,0 ml of the 2,3-hexanedione stock solution (5.7) to 250 ml with water in a volumetric flask. Prepare daily.

5.9 Diacetyl stock solution (10000 mg/litre). Weigh 1,000 g diacetyl and make up to 100 ml with absolute ethanol in a volumetric flask. Store at 0 to 2 °C. This solution is stable for 1 week.

5.10 Diacetyl working solution (100 mg/litre). Dilute 10,0 ml of diacetyl stock solution (5.9) to 1 litre with water in a volumetric flask. Prepare daily.

5.11 2,3-Pentanedione stock solution (10000 mg/litre). Weigh out 1,000 g 2,3-pentanedione and make up to 100 ml with absolute ethanol in a volumetric flask. Store at 0 to 2 °C. This solution is stable for 1 week.

5.12 2,3-Pentanedione working solution (100 mg/litre). Dilute 10,0 ml of 2,3-pentanedione stock solution (5.11) to 1 litre with water in a volumetric flask. Prepare daily.

5.13 Lager beer. Lager beer with an ethanol content of approximately 4,0% V/V and a vicinal diketone concentration of less than 0,05 mg/litre.

6 Apparatus

6.1 Gas chromatograph fitted with an electron capture detector. Set up the instrument according to the instructions given by the manufacturer.

6.1.1 Recommended operating conditions:

Injector	105 °C
Detector	110 °C
Column	55 °C
Nitrogen carrier gas	0,7 ml/min
Split ratio	15:1
Detector make up gas	60 ml/min

6.2 Autosampler for the gas chromatograph or alternatively a 5 ml glass, gas tight syringe if the sample is to be injected manually.

6.3 Computing integrator or chart recorder and integrator.

6.4 Chromatography column, 60 m x 0,25 mm i.d., fused silica, CP-WAX57CB, film thickness 0,4 micron, coating efficiency greater than 80 % (Chrompack).

6.5 Water bath, for sample attemperation at 35 °C (if autosampler is not available).

6.6 Vials, glass, 20 ml capacity.

6.7 Seals for the glass vials, coated with a layer of PTFE.

6.8 Water bath for sample preincubation at 60 °C.

6.9 Volumetric flasks, 100 ml, 250 ml, 1 litre.

6.10 Pipettes 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml.

6.11 50 microlitre positive displacement auto pipette.

6.12 If an autosampler is used the following conditions are given as a guideline:

Sample temperature	35 °C
Needle temperature	60 °C
Transfer temperature	60 °C
Thermostat time	40 min
Pressurisation time	0,5 min
Injection time	0,2 min
Withdrawal time	0,1 min
Vent number	1

7 Sample Preparation

7.1 Remove excess yeast from actively fermenting wort by chilling to less than 10 °C followed by centrifuging.

7.2 Decarbonate about 100 ml of sample by gentle swirling in a 400 ml beaker.

7.3 If a measure of total vicinal diketones is required (i.e. vicinal diketones plus precursors), aerate the sample from 7.2 by pouring six times between two beakers in a narrow stream on the side of the beaker. Incubate the sample in a stoppered vial at 60 °C ± 1 °C in a water bath for 90 min. Cool to room temperature.

7.4 Dispense the following into a glass autosampler vial:
3,5 g ammonium sulphate
5,0 ml sample 7.2 or 7.3.
50 microlitres 2,3-hexanedione internal standard 5.8.

7.5 Seal the vial using a PTFE coated septum.

7.6 Agitate the sample for 1 min on a vortex mixer or by placing on a shaker for 15 min. Ensure that the underside of the septum is not contaminated by liquid.

7.7 Place the vial in the autosampler.

7.8 If an autosampler is not available inject the sample manually.

7.9 If flasks or vials other than that described in the method are used, the liquid to total volume ratio should be adhered to as closely as possible. Adjust the quantity of ammonium sulphate in proportion.

Treat the sample according to either instruction 7.6 or by attemperating in a water bath at 35 ± 1 °C for 40 min. To facilitate the withdrawal of the sample of headspace with a syringe, the vial may be pressurised with nitrogen e.g. to 5 lb/sq in, immediately prior to sampling.

8 Procedure

8.1 Calibration

8.1.1 Take six 100 ml volumetric flasks and add the following quantities of solutions (ml):

Flask number	1	2	3	4	5	6
Vicinal diketone conc. mg/litre	nil	5	10	15	20	25
Hexandione stock soln. (5.7)	2	2	2	2	2	2
Diacetyl standard (5.10)	0	5	10	15	20	25
2,3-pentanedione standard (5.12)	0	5	10	15	20	25

Make up to volume with water.

8.1.2 Prepare 12 autosampler vials as follows:

Vial number	1 + 7	2 + 8	3 + 9	4 + 10	5 + 11	6 + 12
VDK addition rate (mg/litre)	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
Ammonium sulphate (g)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Lager (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Standard addition:						
Amount (µl)	50	50	50	50	50	50
Flask No. (from 8.1)	1	2	3	4	5	6

8.1.3 Treat the calibration solutions according to instructions 7.6 and 7.7 or 7.8.

8.2 Determination

8.2.1 Place the autosampler vials prepared in 7 for the samples and 8.1.2 for the standards in the autosampler and perform the gas chromatographic analysis.

8.2.2 If manual injection is being carried out, inject accurately between 1 and 3 ml of headspace into the gas chromatograph.

8.2.3 Record the peak areas of the detector response to diacetyl, 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione.

9 Expression of Results

9.1 Calculation

9.1.1 Calculate the relative peak areas (RPA) for diacetyl and pentanedione to that of the 2,3-hexanedione internal standard for each of the standards and each of the samples as follows:

$$\text{RPAd} = \frac{\text{Diacetyl peak area}}{\text{2,3-hexanedione peak area}}$$

$$\text{RPAp} = \frac{\text{Pentanedione peak area}}{\text{2,3-hexanedione peak area}}$$

9.1.2 Determine the calibration factors for diacetyl and pentanedione from the analysis of the calibration solutions as follows:

Plot a graph of RPAd (x axis) versus added diacetyl (y axis).
Use all 12 points, do not average duplicates.
Calculate the coefficient of correlation (r) and the slope of the curve.
Provided that $r > 0{,}99$, then:

$$\text{Slope} = \text{Fd}.$$

Plot a graph of RPAp (x axis) versus added pentanedione (y axis).
Use all 12 points, do not average duplicates.
Calculate the coefficient of correlation (r) and the slope of the graph.
Provided that $r > 0{,}99$, then:

$$\text{Slope} = \text{Fp}.$$

9.1.3 Calculate the concentration of diacetyl and pentanedione in the samples as follows:

$$\text{Diacetyl mg/litre} = \text{RPAd} \cdot \text{Fd}$$

$$\text{Pentanedione mg/litre} = \text{RPAp} \cdot \text{Fp}$$

where Fd and Fp are the calibration factors for diacetyl and pentanedione respectively.

RPAd and RPAp are the relative peak areas for diacetyl and pentanedione, respectively as calculated in the samples.

9.1.4 Report the results in mg/litre to two decimal places.

9.2 Precision

9.2.1 Precision values (mg/litre) were determined by the IOB Analysis Committee in a collaborative trial where 6 laboratories analysed 4 samples of beer in duplicate (Buckee and Mundy, 1994).

Range	r_{95}	R_{95}
diacetyl		
0,04 to 0,19	0,028	0,032+0,68 m
2,3-pentanedione		
0,02 to 0,07	0,009	0,037

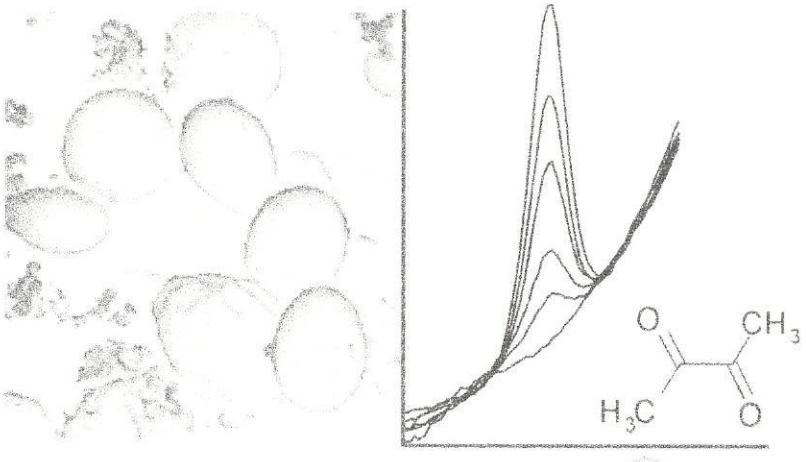
where m is the mean value

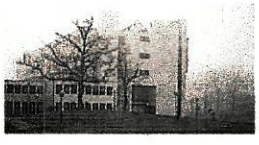
10 Notes

10.1 Sulphur dioxide forms an addition compound with diketones which is non-volatile. At levels greater than 100 mg/litre, sulphur dioxide will completely suppress diacetyl at a concentration of 0,2 mg/litre. If it is suspected that sulphur dioxide is present in the sample, then acetaldehyde should be added to both the standards and the samples to give a final concentration of 1000 mg/litre. This will liberate the diketones.

11 Bibliography

11.1 Buckee, G.K. and Mundy, A.P., Journal of the Institute Brewing, 1994, 100, 247.





Departamento de Química
FCUP