

Gabriela Maria Couto Carvalho Peres
Licenciada em Química

**Desenvolvimento de um sistema em fluxo para a
análise do SO₂ na cerveja acoplando um módulo
de pervaporação e detecção voltamétrica**

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



**Departamento de Química
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto**

Gabriela Maria Couto Carvalho Peres
Licenciada em Química

Desenvolvimento de um sistema em fluxo para a análise do SO₂ na cerveja acoplado um módulo de pervaporação e detecção voltamétrica

Dissertação para Mestrado em Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Departamento de Química
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

2003

À Sofia e a meus pais

Agradecimentos

Ao meu orientador, Doutor José António Maia Rodrigues, pelos seus valiosos conhecimentos e orientações na concretização desta dissertação, contribuindo e estimulando o meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Professor Doutor Aquiles Araújo Barros, a oportunidade que me concedeu em poder integrar o seu grupo de investigação.

Aos professores do programa de mestrado que incentivaram e contribuíram para o desenvolvimento de capacidades e conhecimentos científicos.

A todos os colegas de trabalho pelos bons momentos de camaradagem.

À Sara, pela sua dedicação e amizade.

A todas as pessoas que de algum modo contribuíram para a concretização deste trabalho.

À minha filha, Sofia, pelo carinho e apoio que sempre me deu, apesar das longas horas em que não estive disponível.

À minha família

Obrigada

Índice Geral

Agradecimentos	III
Índice Geral	V
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	XII
Resumo	XV
Abstract	XVII

Parte I – Fundamentação Teórica

1 - O dióxido de enxofre na cerveja	3
1.1 - Características físico-químicas da espécie do dióxido de enxofre.....	3
1.2 - O dióxido de enxofre como aditivo alimentar	6
1.3 - Fontes de dióxido de enxofre na cerveja	9
1.4 - Papel do dióxido de enxofre na cerveja.....	10
2 - Metodologias para a análise do dióxido de enxofre	17
2.1 - Métodos não voltamétricos.....	17
2.2 - Voltametria	20
2.2.1 - Comportamento electroquímico do dióxido de enxofre.....	20
2.2.2 - Método voltamétrico para a determinação do dióxido de enxofre.....	21
3 - Pervaporação Analítica	23
3.1 – Introdução	23
3.2 - Pervaporação em sistemas de análise em fluxo	24
4 - Detecção em sistemas de análise em fluxo	31
4.1 – Introdução	31
4.2 - Célula voltamétrica de fluxo baseada no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa	33
4.3 - Detecção voltamétrica em sistemas de análise em fluxo	38

Parte II – Desenvolvimento Metodológico

1 – Introdução	43
2 – Equipamento e reagentes utilizados	45
2.1 - Equipamento e reagentes	45
2.2 - Preparação de soluções	47
3 - Otimização das condições voltamétricas de fluxo para a determinação de dióxido de enxofre em solução aquosa	49
3.1 – Introdução	49
3.2 - Estudo voltamétrico do dióxido de enxofre em sistema fluxo	49
3.3 - Estudo da influência da frequência no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre.	57
4 - Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em soluções aquosas integrando a técnica de pervaporação	59
4.1 – Introdução	59
4.2 – Influência do caudal da amostra no sinal analítico	63
4.3 - Otimização da temperatura de pervaporação do dióxido de enxofre.....	64
4.4 - Efeito do tempo de pervaporação no sinal analítico	67
4.5 - Influência do pH da amostra no sinal analítico do dióxido de enxofre.....	68
4.6 - Estudo do sinal voltamétrico do dióxido de enxofre em condições de acidulação em linha da solução a analisar	72
5 - Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em cerveja integrando a técnica de pervaporação	75
5.1 – Introdução	75
5.2 - Efeito da presença de etanol no sinal analítico	76
5.3 - Influência do teor em acetaldeído na determinação do dióxido de enxofre.....	80
5.4 - Estudo da capacidade do acetaldeído para sofrer pervaporação nas condições de análise em fluxo do dióxido de enxofre.....	84

5.5 - Estratégia para a remoção do acetaldeído em soluções modelo binárias de dióxido de enxofre e acetaldeído	86
5.6 - Optimização das condições de meio ácido adicionado em linha para análise em fluxo da cerveja	89
5.7 - Optimização das condições de meio alcalino conducentes a uma hidrólise quantitativa dos aductos em ceveja.....	90
5.8 - Efeito do tempo de pervaporação no sinal analítico	91
6 – Aplicação da metodologia desenvolvida à cerveja.....	93
6.1 - Descrição detalhada da metodologia desenvolvida e optimizada para a determinação do teor em dióxido de enxofre “livre” e “total” existente na cerveja	93
6.2 - Aplicação do método das adições de padrão para a determinação do teor em SO ₂ “ livre “ e “total” na cerveja	96
6.3- Estudo comparativo de métodos	101
7 - Considerações finais e propostas de trabalho futuro	105
Referências Bibliográficas	107

Índice de figuras

Parte I – Fundamentação Teórica

1 - O dióxido de enxofre na indústria cervejeira

Figura 1.1 – Variação da composição de uma solução de sulfito em função do pH.....	5
Figura 1.2 – Reacção de adição do anião hidrogenossulfito ao grupo carbonilo com formação de α -hidroxissulfonatos.....	11
Figura 1.3- Perda de SO_2 total na cerveja. Estudo efectuado em cerveja comercial armazenada a 25°C e analisada usando o método da p-rosalina . A escala referente ao tempo traduz o número de dias de armazenamento.....	14

2 - Metodologias propostas para a análise do SO_2

Figura 2.1– Esquema genérico de um sistema de análise por injeção em fluxo em que os reagentes são incorporados em fluxo	18
Figura 2.2 - Esquema exemplificativo de um eléctrodo selectivo para detecção do ião sulfito	19
Figura 2.3 – Montagem para a separação e determinação voltamétrica do dióxido de enxofre em cerveja	22

3 - Pervaporação Analítica

Figura 3.1 – Representação genérica de um sistema de fluxo acoplado à técnica de difusão gasosa em membrana tubular concêntrica: S, amostra; R1, solução ácida; R2, solução aceitadora; R3, reagente ; Rc, tubo reactor; B1, B2, B3, linhas de transmissão; Linha a tracejado, banho termostático; D, detector.....	26
Figura 3.2 – Representação genérica de uma montagem de um sistema de fluxo acoplado à técnica de pervaporação: S, amostra; DS, solução dadora; R1 e R2, reagentes; AS, solução aceitadora; PP, bomba peristáltica; IV, válvula de injeção; SV, válvula interruptora; RC, loop reactor; PM, módulo de pervaporação; WB, banho termostático; D, detector; W, esgoto.....	27
Figura 3.3 – Módulo de pervaporação convencional: AC, câmara accitadora; AI e AO, entrada e saída da câmara aceitadora; M, membrana; AG, espaço gasoso; DC, câmara dadora; DI e DO, entrada e saída da câmara dadora; AS, suporte de alumínio.....	28

4 - Detecção em sistemas de análise em fluxo

Figura 4.1 – Diagrama esquemático de um processo de remoção de O_2 em linha usando uma membrana semi-permeável.....	32
Figura 4.2. – A – Detector polarográfico com o eléctrodo DME posicionado verticalmente : (1) eléctrodo indicador; (2) entrada; (3) eléctrodo de referência; (4) eléctrodo auxiliar. B – Detector polarográfico com o eléctrodo DME posicionado horizontalmente : (1) entrada; (2) eléctrodo indicador	

; (3) reservatório de mercúrio; (4) tubo de acesso ao reservatório de mercúrio	35
Figura 4.3. - Representação esquemática de uma célula para análise em fluxo com detecção voltamétrica (A) vista lateral; (B) vista de topo	36
Figura 4.4. - Representação esquemática da célula de fluxo proposta por Larry R. Taylor	37
Figura 4.5 - Representação esquemática da célula de fluxo adaptada do modelo proposto por Larry R. Taylor (31) : 1, injector; 2, cavidade interna do injector; 3, suporte para o tubo de transporte; 4, cavidade para remoção da gota desalojada; 5, capilar; 6, gota de mercúrio; 7, suporte da célula em vidro, 8, tubo de transporte	38

Parte II – Desenvolvimento Metodológico

3 - Optimização das condições voltamétricas de fluxo para a determinação de dióxido de enxofre em solução aquosa	49
Figura 3.1. – Esquema do sistema de injeção em fluxo: D – Detector voltamétrico;; R ₀ -Solução injectada; R ₃ - Electrólito de transporte (Tampão acetato 0,1 M pH 4,0); E – Esgoto	50
Figura 3.2 – Variação da intensidade do sinal voltamétrico com o tempo após injeção da amostra para uma solução de diacetilo 1x10 ⁻⁵ M	51
Figura 3.3 - Voltamograma obtido na análise de uma solução aquosa de SO ₂ , 5 ppm. Determinação em sistema de análise em fluxo com injeção de 500µL de amostra; velocidade do fluxo do electrólito de transporte, 1,33 ml min ⁻¹ ; frequência de onda quadrada, 300 Hz	53
Figura 3.4. – Curva de calibração obtida para a determinação do SO ₂ em solução aquosa utilizando o sistema de fluxo com injeção de 500µL de amostra; caudal do electrólito de transporte, 1,33 ml min ⁻¹ ; frequência de onda quadrada, 300 Hz	55
Figura 3.5. – Curva de calibração obtida para a determinação do SO ₂ em solução aquosa utilizando o sistema de fluxo com injeção de 500µL de amostra; caudal do electrólito de transporte, 1,33 ml min ⁻¹ ; frequência de onda quadrada, 300 Hz . I) análise efectuada com injeção de soluções de concentração sucessivamente crescentes ; II) análise efectuada com injeção de soluções de concentração sucessivamente decrescentes	56
Figura 3.6 – Voltamogramas obtidos no estudo da influência da frequência de onda quadrada no sinal voltamétrico resultante da análise de uma solução aquosa de SO ₂ , 5 ppm, (___) 200Hz; (___) 300Hz; (___) 400Hz; (___) 500Hz; (___) 600Hz.....	58

4 - Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em soluções aquosas integrando a técnica de pervaporação	59
Figura 4.1 – Fotografia do módulo de pervaporação	60
Figura 4.2 – Fotografia da célula voltamétrica de fluxo	60
Figura 4.3 – Esquema do sistema de injeção em fluxo: D – Detector voltamétrico; UP – Unidade de pervaporação; T ₁ - tubo de reacção, 50 cm; V1, válvula de injeção manual; V2 e V3 , válvulas	

controladas pelo sistema automático; R0–Amostra ou solução-modelo; R3 –Electrólito de transporte, Tampão acetato 0,1 M pH 4,0 (1,33mLmin ⁻¹); E – Esgoto	61
Figura 4.4. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função do caudal da amostra. Pervaporação de uma solução de SO ₂ , 10 ppm em tampão acetato 0,1M pH 3,5; temperatura do banho, 70°C ; tempo de pervaporação, 300s; caudal do electrólito de transporte, 1,33 mLmin ⁻¹ ; electrólito de transporte, tampão acetato 0,1 M pH 4,0.....	63
Figura 4.5. – Voltamogramas obtidos no estudo da influência da temperatura do banho no sinal voltamétrico do SO ₂ resultante da pervaporação durante 320 s de uma solução de SO ₂ , 8 ppm, em meio acetato 0,1M pH 3,5, a diferentes temperaturas do banho termostático, (___) 40°C; (___) 60°C, (___) 80°C; (___) 90°C; (___) branco.....	65
Figura 4.6. – Representação gráfica da intensidade de corrente em função da temperatura do banho. Os sinais voltamétricos obtidos resultam da pervaporação, durante 320 s, de uma solução aquosa de SO ₂ , 8 ppm, a diferentes temperaturas do banho termostático, 40°C, 60°C, 80°C e 90°C.....	65
Figura 4.7. – Curvas de calibração para o SO ₂ em meio acetato 0,1 M pH 3,5, resultantes de pervaporação durante 320 s a diferentes temperaturas do banho termostático, 40°C, 60°C e 80°C.....	66
Figura 4.8. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função do tempo de pervaporação. Os sinais voltamétricos obtidos são resultantes da pervaporação de uma solução de SO ₂ a 70°C e a diferentes intervalos de tempo de pervaporação, 3 min, 5 min, 8 min, 10 min e 12 min; solução A, 10 ppm de SO ₂ em meio acetato 0,1 M pH 4,0; solução B, 20 ppm de SO ₂ em meio acetato 0,1M pH 3,5.....	68
Figura 4.9. – Curva de calibração para soluções modelo de SO ₂ em meio acetato 0,1M pH 4,0, sujeitas a pervaporação a 70°C e durante 300 s, caudal da solução dadora e aceitadora, 1,33 mL/min, electrólito de transporte, tampão acetato 0,1M pH 4,0.....	70
Figura 4.10. – Voltamogramas obtidos no estudo do efeito do pH da solução de SO ₂ no sinal voltamétrico. Valores obtidos a partir da pervaporação de soluções de SO ₂ 5 ppm, em três meios distintos, a 70°C durante 300 s, ___ pH = 4,0; ___ pH = 3,5; ___ pH = 1.....	70
Figura 4.11 – Esquema do sistema de injeção em fluxo: D – Detector voltamétrico; UP – Unidade de pervaporação; T1– tubo de reacção, 50 cm; V1, válvula de injeção manual; V2 e V3 , válvulas controladas pelo sistema automático; R1–Solução aquosa do ácido adicionado em linha (1,33 mL min ⁻¹); R0–Amostra ou solução-modelo (1,33 mLmin ⁻¹); R ₃ –Electrólito de transporte, Tampão acetato 0,1 M pH 4,0 (1,33mLmin ⁻¹); E – Esgoto	71
Figura 4.12 – Curva de calibração para soluções aquosas de SO ₂ de concentração 1ppm, 3 ppm, 5 ppm, aciduladas em linha com solução aquosa de HCl 0,4 M e sujeitas a pervaporação a 90°C durante 360s ; caudal da solução dadora e aceitadora, 1,33 mL/min, electrólito de transporte, tampão acetato 0,1M pH 4,0	73
5 - Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em cerveja integrando a técnica de pervaporação	
Figura 5.1 - Representação gráfica dos valores médios dos sinal voltamétrico do SO ₂ nas condições da tabela 5.1.....	77

Figura 5.2 - Voltamogramas obtidos na presença (B) e ausência (A) de etanol, resultantes da pervaporação de uma solução 20 ppm de SO ₂ : A, solução aquosa; B, solução etanólica a 5% (v/v)...	77
Figura 5.3 – Voltamogramas obtidos no estudo da influência da temperatura do banho termostático no sinal voltamétrico do SO ₂ resultante da pervaporação de uma solução 20 ppm, em meio etanólico a 5% v/v : () 60°C; () 70°C; () 80°; () 90°C.....	79
Figura 5.4. – Representação gráfica da intensidade de corrente em função da concentração do ácido clorídrico adicionado em linha. Pervaporação de uma solução de SO ₂ , 20 ppm, em meio etanólico, a 5% (v/v).....	80
Figura 5.5. – Representação gráfica do sinal voltamétrico do SO ₂ em função da razão molar [acetaldéido]/[SO ₂]. Os valores obtidos resultam da análise no sistema de fluxo de soluções binárias de sulfito e acetaldéido, nas quais se incrementou sucessivamente a concentração de acetaldéido.....	82
Figura 5.6. – Perfil da variação da intensidade da corrente resultante da análise de uma solução de SO ₂ na presença e na ausência de acetaldéido.....	84
Figura 5.7 – Fotografia da montagem laboratorial para a determinação voltamétrica do SO ₂ em cerveja – Método Voltamétrico.....	86
Figura 5.8. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função da concentração do ácido. Pervaporação de uma amostra de cerveja à qual se extraiu previamente o acetaldéido.....	89
Figura 5.9. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função do tempo de pervaporação.....	92
 6 – Aplicação da metodologia desenvolvida	
Figura 6.1 – Fotografia da montagem laboratorial do sistema de fluxo desenvolvido	96
Figura 6.2. – Voltamogramas obtidos na análise do SO ₂ total na cerveja, () branco, () cerveja; () () adição de 10 ppm de SO ₂ ; () adição de 20 ppm de SO ₂ ; () adição de 30 ppm de SO ₂	97
Figura 6.3. – Representação gráfica da aplicação do método da adição de padrão na determinação do SO ₂ “total” na cerveja	98
Figura 6.4. – Voltamogramas obtidos na análise do SO ₂ livre na cerveja, () branco, () cerveja; () adição de 10 ppm de SO ₂ ; () adição de 20 ppm de SO ₂ ; () adição de 30 ppm de SO ₂	99
Figura 6.5. – Representação gráfica da aplicação do método da adição de padrão na determinação do SO ₂ “livre” na cerveja	100
Figura 6.6. – Gráfico de comparação entre os resultados obtidos pelo método voltamétrico (CV) e pelo método de análise em sistema de fluxo (CF) na determinação do SO ₂ “total” na cerveja.....	103

Índice de tabelas

Parte I – Fundamentação Teórica

1 - O dióxido de enxofre na indústria cervejeira

Tabela 1.1 – Algumas características físico-químicas do SO ₂	4
Tabela 1.2 – Solubilidade de alguns gases em água, P _{gás} = 1 atm.....	5
Tabela 1.3. – Aditivos alimentares usados como fontes de dióxido de enxofre	7
Tabela 1.4 – Valores de constantes de equilíbrio para a reacção de adição do anião hidrogenossulfito a aldeídos e cetonas (valores obtidos a 0°C)	12
Tabela 1.5 – Alguns compostos relacionados com alteração do aroma/sabor da cerveja. Limites de percepção e características organolépticas associadas	13

Parte II – Desenvolvimento Metodológico

2 – Equipamento e reagentes utilizados

Tabela 2.1 – Reagentes utilizados na preparação das soluções utilizadas.....	46
Tabela 2.2 – Técnicas de preparação das soluções utilizadas no trabalho experimental	47

3 - Otimização das condições voltamétricas de fluxo para a determinação de dióxido de enxofre em solução aquosa.

Tabela 3.1 – Valores obtidos na determinação voltamétrica do SO ₂ em sistema de fluxo, utilizando soluções modelo de concentrações, 200 ppb, 400 ppb, 500 ppb, 600 ppb, 700 ppb, 800 ppb, 900 ppb, 1000 ppb	53
Tabela 3.2 - Valores obtidos na determinação voltamétrica do SO ₂ em sistema de fluxo, utilizando soluções modelo de concentrações, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, e 5 ppm	54
Tabela 3.3. – Estudo da influência da frequência no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre.....	57

4 - Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em soluções aquosas integrando a técnica de pervaporação

Tabela 4.1 – Parâmetros referentes às curvas de calibração representadas no gráfico	66
Tabela 4.2. –Valores obtidos no estudo do efeito do pH da solução de dióxido de enxofre no sinal voltamétrico	69
Tabela 4.3. – Valores dos sinais voltamétricos obtidos resultantes da pervaporação de soluções de dióxido de enxofre em meio acetato 0,1M , pH 4,0.	69

5 - Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em cerveja integrando a técnica de pervaporação

Tabela 5.1. – Valores obtidos no estudo comparativo da eficiência da pervaporação do SO ₂ em solução aquosa e em solução etanólica	76
Tabela 5.2. – Valores obtidos no estudo da eficiência da pervaporação do SO ₂ , a partir de uma solução 20 ppm em meio etanólico a 5%(v/v), a diferentes temperaturas do banho termostático.....	78
Tabela 5.3. – Valores obtidos no estudo da variação do sinal voltamétrico do SO ₂ provocada pela adição de acetaldeído a soluções aquosas de SO ₂	81
Tabela 5.4. – Valores obtidos no estudo da cinética da reacção de formação do aducto hidrogenossulfito-acetaldeído	83
Tabela 5.5. – Valores obtidos no estudo da capacidade do acetaldeído para sofrer pervaporação nas condições de análise voltamétrica do SO ₂ em sistema de injeção em fluxo integrando a pervaporação analítica	85
Tabela 5.6 – Composição das soluções A, B e C preparadas	87
Tabela 5.7. – Valores obtidos no estudo das condições de temperatura óptimas para a remoção quantitativa do acetaldeído em misturas binárias de dióxido de enxofre e acetaldeído	88
Tabela 5.8. – Valores obtidos no estudo das condições de meio alcalino da amostra de cerveja	90
Tabela 5.9. –Valores obtidos no estudo do efeito do tempo de pervaporação no sinal voltamétrico do SO ₂ resultante da pervaporação de uma amostra de cerveja.....	91

6 – Aplicação da metodologia desenvolvida

Tabela 6.1. – Valores obtidos na determinação do SO ₂ “total” na cerveja utilizando o método de adição de padrão.....	97
Tabela 6.2. – Valores resultantes da aplicação do método das adições de padrão à determinação da quantidade de SO ₂ “total” existente na cerveja.....	98
Tabela 6.3. – Valores obtidos na determinação do SO ₂ “livre” na cerveja pelo método de adição de padrão.....	99
Tabela 6.4. – Aplicação do método das adições de padrão à determinação da quantidade de SO ₂ “livre” existente na cerveja.....	100
Tabela 6.5. – Valores obtidos na determinação do teor de SO ₂ “total” existente em amostras de cerveja de diferentes lotes pelo método da adição de padrão.....	102
Tabela 6.6. –Teor de SO ₂ “total” existente em amostras de cerveja de diferentes lotes obtido pelo método de adição de padrão.....	102
Tabela 6.7. – Comparação dos resultados obtidos na determinação do SO ₂ “total” em amostras de cerveja de diferentes lotes usando a metodologia desenvolvida e o método de referência.....	103
Tabela 6.8. – Parâmetros da equação $C_F = C_0 \times SC_V$, para a comparação dos resultados obtidos com a metodologia proposta e o método voltamétrico.....	104

Resumo

O dióxido de enxofre é normalmente usado como aditivo na indústria alimentar e de bebidas, com o objectivo de proteger os produtos da oxidação e de ataques microbiológicos, atendendo às suas características anti-oxidantes e anti-sépticas. O teor máximo de dióxido de enxofre permitido é limitado por lei e sujeito a controlo, já que acima de determinado nível apresenta perigo de toxicidade para o ser humano. O dióxido de enxofre na cerveja pode apresentar-se em duas formas: livre e combinado, na forma de aductos.

Várias metodologias têm sido propostas com o objectivo de determinar a quantidade de dióxido de enxofre existente em alimentos e bebidas, nomeadamente métodos envolvendo processos de amostragem, baseados na prévia separação gasosa de SO_2 , acoplados a sistemas com detecção espectrofotométrica e electroquímica.

Este trabalho visa desenvolver um sistema de análise de dióxido de enxofre acoplado a uma câmara de pervaporação a um sistema de detecção voltamétrica em fluxo. O sistema proposto alia as vantagens da análise em contínuo, com a automação, a rapidez, a simplicidade e a possibilidade de realização de análises directamente sobre a amostra real. O método envolve um pré-tratamento alcalino da amostra de cerveja, uma posterior acidulação em linha para converter todo o SO_2 na forma volátil, a passagem por uma câmara de pervaporação, onde se dá a difusão da espécie gasosa através de uma membrana hidrofóbica de Teflon e a recolha do SO_2 num fluxo contínuo de tampão acetato 0,1M pH 4,0, que é depois dirigido para a célula voltamétrica. A unidade de pervaporação incorporada no sistema serve para separar o analito da matriz, prevenindo deste modo interferências.

O sistema proposto revelou-se muito simples e rápido, necessitando de reagentes de baixo custo e de fácil aquisição.

Abstract

Sulphur dioxide is normally used as additive in the food and beverages industries, to protect those products of oxidation and of microbiological attacks, due to its antioxidant and anti-septic characteristics. The level of sulphur dioxide is limited by law and subject to control since it presents toxicity to the human being. The sulphur dioxide in beer can be presented in two forms: free and combined, in the form of adducts.

Some methodologies have been developed to determine sulphur dioxide in foods and beverages, specially methods involving processes of sampling based in the previous gaseous separation of SO_2 , connected to spectrophotometric or electrochemical detection systems.

This work aims to develop a analysis system for sulphur dioxide determination based on a pervaporation module connected to a voltammetric detection system in flow. The proposed system integrates the advantages of continuous analysis with the automation, the speed, the simplicity and the possibility of doing the analyses directly on the real sample. The method involves an alkaline pre-treatment of the beer sample, an on-line acidulation to convert all SO_2 into the volatile form, the passage through the pervaporation module, where the diffusion of the volatile species occur through the Teflon hydrophobic membrane and the capture of the SO_2 in a continuous flow of acetate buffer 0,1M pH 4,0 that is directed for the voltammetric flow cell. The pervaporation module in the system allows the separation to the analyte from the matrix, preventing interferences.

The proposed system is very simple and allows fast analysis. It needs only simple and low cost reagents.

Parte I – Fundamentação Teórica

1 - O dióxido de enxofre na cerveja

1.1 - Características físico-químicas do dióxido de enxofre

1.2 - O dióxido de enxofre como aditivo alimentar

1.3 - Fontes de dióxido de enxofre na cerveja

1.4 – Papel do dióxido de enxofre na cerveja

1.1 - Características físico-químicas do dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre, SO_2 , é um gás tóxico, não inflamável, incolor, apresentando um odor irritante característico, cujo limite de percepção é da ordem de 3 ppm [1]. É um dos mais comuns poluentes atmosféricos sendo a sua proveniência em parte de origem natural e em parte de fontes antropogénicas. A emissão antropogénica de compostos de enxofre, principalmente na forma de SO_2 , resulta essencialmente da queima de combustíveis fósseis e de certas actividades industriais nomeadamente, da refinação do petróleo, da indústria cimenteira, da indústria metalúrgica, etc. Em algumas zonas do planeta, principalmente nos trópicos, a combustão de biomassa contribui, igualmente, para a dispersão de SO_2 na natureza. A actividade vulcânica é, claramente, a principal fonte natural da emissão de SO_2 [2].

Industrialmente o dióxido de enxofre pode ser obtido por combustão de enxofre em fornos, por calcinação em condições oxidantes de sulfuretos naturais (pirites, sulfuretos de zinco naturais, etc.) ou por calcinação de sulfatos naturais.

Por oxidação, o SO_2 dá origem a trióxido de enxofre, SO_3 , produto intermediário no processo de fabrico do ácido sulfúrico. Como ligando é utilizado na preparação de sulfitos e ditionitos.

O SO₂ produzido industrialmente é na sua maioria utilizado na produção de ácido sulfúrico, no entanto é ainda aplicado como agente branqueador, desinfectante, aditivo alimentar e solvente não aquoso. A tabela 1.1 apresenta algumas características físico-químicas deste composto.

Tabela 1.1 – Algumas características físico-químicas do SO₂ (adaptado da Ref^a 1)

Características físico-químicas do SO ₂
Temperatura de solidificação: -75,5 °C
Temperatura de liquefacção: -10,0°C
Temperatura crítica: 157,5°C
Pressão crítica: 77,7 atm
Massa específica (a -10°C): 1,46 kgdm ⁻³
Massa específica (sob a forma gasosa): 2,927 gdm ⁻³
Condutividade eléctrica: < 10 ⁻⁸ ohm ⁻¹ cm ⁻¹
Constante dieléctrica (0°C): 15,4
Momento dipolar: 1,62 D
Ângulo O-S-O : 119°
Distância r (S-O) : 143,1 ppm
ΔH ^{of} (g): -296,9 kJmol ⁻¹

O dióxido de enxofre é solúvel em água apresentando uma solubilidade da ordem de 3927 cm³ de SO₂ por 100g de H₂O a 20°C, bastante elevada quando comparado com outros gases (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Solubilidade de alguns gases em água, P gás= 1 atm. (adaptada da refª 2)

Substância gasosa	Solubilidade em água (gL ⁻¹)		
	10°C	20°C	25°C
Oxigênio O ₂	0,0545	0,0443	0,0406
Ozono O ₃	0,802	0,610	—
Dióxido de enxofre SO ₂	153,9	106,6	94,1
Monóxido de azoto NO	0,0770	0,0630	0,0577
Dióxido de carbono CO ₂	—	1,69	1,45

A solubilidade deste gás em água depende do pH do meio, diminuindo com a acidez. Em solução aquosa e de acordo com a acidez do meio, diferentes espécies irão predominar em solução aquosa: SO₂. H₂O (pH < 1,5), HSO₃⁻ (pH 1,5-6,5) e SO₃²⁻ (pH > 6,5).

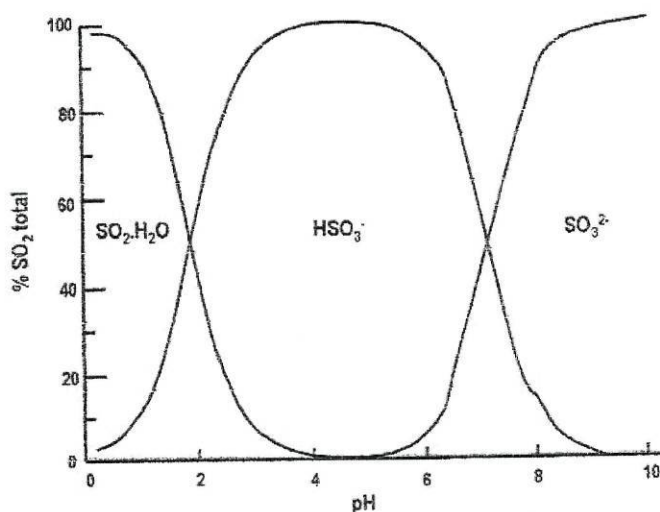
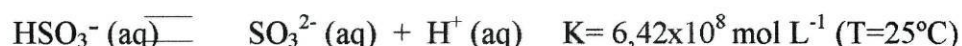
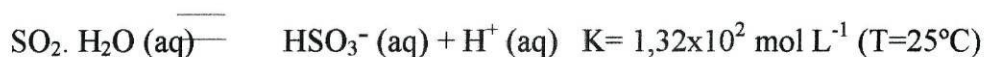


Figura 1.1 – Variação da composição de uma solução de sulfite em função do pH (extraído da refª24)

A variação da composição da solução de sulfito com o pH depende dos seguintes equilíbrios:



1.2 - O dióxido de enxofre como aditivo alimentar

O dióxido de enxofre é um dos aditivos alimentares com maior tradição. Obtido por combustão do enxofre, os primórdios da sua utilização remontam à Grécia antiga e à Roma Clássica onde era usado na desinfecção das casas; os romanos e os egípcios empregavam-no na esterilização de recipientes destinados ao armazenamento de vinhos.

Como conservante alimentar, a sua utilização foi iniciada no século XVII, existindo registos de aprovação legal da sua utilização no início de 1800 nos EUA. Em 1958 o “*Federal Food, Drug and Cosmetic Act*”, entidade responsável à época nos EUA pela regulamentação legislativa dos conservantes e aditivos alimentares, considerou os sulfitos como aditivos alimentares seguros, atribuindo-lhes a sigla GRAS (*generally recognized as safe*).

Na tabela 1.3 encontram-se listados alguns dos aditivos alimentares utilizados como fontes de SO₂.

Tabela 1.3. – Aditivos alimentares usados como fontes de dióxido de enxofre (adaptação de tabela da refº 24)

Designação	Composto
E 220	Dióxido de enxofre
E 221	Sulfito de sódio
E 222	Hidrogenossulfito de sódio
E 223	Metabissulfito de sódio
E 224	Metabissulfito de potássio
E 226	Sulfito de cálcio
E 227	Hidrogenossulfito de cálcio
E 228	Hidrogenossulfito de potássio

Nos alimentos, o SO₂ pode encontrar-se sob três formas: livre, reversivelmente ligado e irreversivelmente ligado. Ao somatório dos dois primeiros tipos dá-se o nome de SO₂ total e são essas formas que possuem as características que protegem os alimentos.

O dióxido de enxofre é um composto com características redutoras que tem elevada aplicabilidade como aditivo na indústria alimentar e de bebidas, porque:

- i. inibe o processo oxidativo e os restantes processos associados, por exemplo, previne ou reduz a perda de cor;
- ii. retarda as reacções enzimáticas pois o seu poder redutor inibe a síntese de quinonas, além de poder exercer uma acção inibidora sobre a própria enzima;
- iii. exerce uma acção antimicrobiana sobre diversos fungos, leveduras e bactérias;
- iv. aumenta a estabilidade organoléptica na medida em que bloqueia certos compostos carbonilo responsáveis por gostos e aromas indesejáveis.

Este aditivo tem elevada importância na indústria vitivinícola na medida em que exerce diferentes acções sobre a qualidade do vinho:

- a) actua como branqueador, eliminando colorações escuras indesejáveis;
- b) é um agente redutor e actua como antioxidante removendo os radicais livres e certos compostos resultantes da oxidação, transformando-os em compostos menos activos;
- c) apresenta acção antimicrobiana.

Na indústria cervejeira, o sulfito é o antioxidante mais utilizado. Na cerveja assume um papel importante na estabilidade organoléptica devido:

- a) à acção antioxidante, na medida em que reage com o oxigénio e radicais livres, atrasando a evolução oxidativa;
- b) à formação de aductos com compostos carbonílicos, alguns dos quais apresentam baixo limiar de percepção. Estes compostos, produzidos continuamente pela matriz, na forma de aductos com o SO₂ aumentam drasticamente o seu limiar de percepção.

A acção anti-microbiana do SO₂ torna-o útil no processo de desinfecção de recipientes para alimentos e cubas de fermentação, já que reduz e previne a deterioração dos alimentos por contaminação microbiana e actua como inibidor selectivo de microorganismos durante o processo fermentativo.

Nos anos 70 foram registados alguns episódios de hipersensibilidade humana relacionada com o uso de sulfitos. Em 1985 a “*Federation of American Societies for Experimental Biology*”, FASEB, avaliou a correlação entre certas manifestações alérgicas e os sulfitos, concluindo que os mesmos eram seguros para a maioria da população. No entanto verificaram que podiam ocasionar reacções de gravidade imprevisível em asmáticos e pessoas hipersensíveis a estes compostos. Os efeitos no ser humano dos agentes sulfitantes não estão, assim, completamente definidos, no entanto na literatura é referida sintomatologia relacionada com a ingestão de tais compostos:

vermelhidão, urticária, pressão sanguínea baixa, problemas respiratórios, distúrbios gastrointestinais, dermatite, náusea, diarreia, choque anafilático, ataque asmático agudo e perda de consciência. Os sulfitos não revelaram possuir propriedades cancerígenas nem teratogénicas em estudos epidemiológicos.

No organismo humano o sulfito ingerido através dos alimentos é convertido em sulfato por acção enzimática em alguns órgãos, nomeadamente, nos rins, no fígado e no coração.

Visando a protecção à saúde humana e de modo a minimizar os riscos para o organismo, foram estabelecidas normas regulamentares sobre aditivos em alimentos [9]. No caso de sulfitos encontra-se proibido o seu uso para a manutenção da cor e consistência de frutas e vegetais crus, e em alimentos reconhecidos como fontes de vitamina B1, já que eliminam a actividade de certas vitaminas. Os conservantes contendo sulfito foram também proibidos em carnes, pois ao serem capazes de restaurar e manter a cor vermelha, dão a esta um falso aspecto de carne fresca, enganando o consumidor. Esta contra-indicação é ainda reforçada pelo facto da carne vermelha ser uma fonte de vitamina B1. No Reino Unido, os sulfitos são autorizados em alguns enchidos e em hambúrgueres até um limite de 450 ppm. No Canadá são permitidos na conservação de carnes de aves.

Actualmente, é obrigatório a inclusão nos rótulos de alimentos e bebidas a referência à adição de sulfitos, quando a sua concentração no produto final for igual ou superior a 10 ppm.

A ingestão diária de dióxido de enxofre recomendável para o ser humano é de 0,7 mg/kg de massa corporal. Estima-se, contudo, que em termos médios a ingestão diária seja da ordem de 180 mg, claramente acima do valor recomendável [20].

1.3 - Fontes de dióxido de enxofre na cerveja

A cerveja pode ser descrita de forma simplista como uma solução aquosa obtida como resultado da fermentação alcoólica do mosto de malte de cevada, por acção da levedura cervejeira, e da adição de lúpulo ou seu extracto, podendo parte do malte ser substituído por cereais maltados ou não, ou por hidratos de carbono de origem vegetal. O teor de álcool na cerveja varia entre 3 a 8%. Como produtos das transformações

químicas inerentes à sua preparação podemos encontrar nesta mistura complexa, CO₂, álcool etílico, inúmeros sais inorgânicos e cerca de 800 compostos orgânicos diversos. A selecção das matérias-primas, as operações a que são sujeitas e o modo como é realizada a fermentação vão determinar as características organolépticas da cerveja.

A maioria das estirpes da levedura *Saccaromyces cerevise*, normalmente utilizada na fermentação alcoólica da cerveja e do vinho, produz sulfito como resultado do seu metabolismo durante o processo fermentativo. A concentração do composto está directamente relacionada com a produção de aminoácidos, já que, assume um papel de intermediário nesse processo. Apesar da produção do SO₂ estar intimamente ligada às características da levedura utilizada, é possível regular a sua formação durante a fermentação, controlando alguns parâmetros, nomeadamente, temperatura, oxigenação, etc. O nível de SO₂ produzido pela levedura varia, em geral entre 2-9 mg/L, sendo inferior ao teor máximo legalmente permitido na cerveja.

O lúpulo, ingrediente chave no processo de fabrico da cerveja, pode ser utilizado na forma de lúpulo sulfitado o que vai incrementar o teor de SO₂ entre 3 a 4 mg/L, no entanto na etapa de ebulição do mosto a maior parte do composto proveniente por esta via é perdido.

A principal fonte de SO₂ na cerveja é, então, a adição deliberada. A adição é feita em geral na forma de metabissulfito e é normalmente efectuada após determinação da quantidade de SO₂ endógeno, ou seja, da que se formou como resultado da fermentação.

O interesse na determinação do teor de SO₂ na cerveja resulta, por um lado da existência de legislação que estabelece os valores máximos autorizados e, por outro lado, do interesse em monitorizar o desaparecimento do SO₂ durante o armazenamento da cerveja, já que este composto desaparece com o armazenamento, e correlacioná-lo com a estabilidade organoléptica da bebida.

1.4 - Papel do dióxido de enxofre na cerveja

O anião hidrogenossulfito apresenta capacidade para reagir com diversos compostos presentes na cerveja, particularmente com compostos carbonílicos, destacando-se entre os compostos com maior afinidade para a formação destes aductos,

o diacetilo, o acetaldeído e carbonilos saturados e insaturados de cadeia linear [23] [24]. No entanto podem-se formar compostos de adição com outros compostos como o ácido pirúvico, o ácido 2-cetoglutárico, o ácido galacturónico e a glucose; contudo o produto de adição resultante é menos estável.

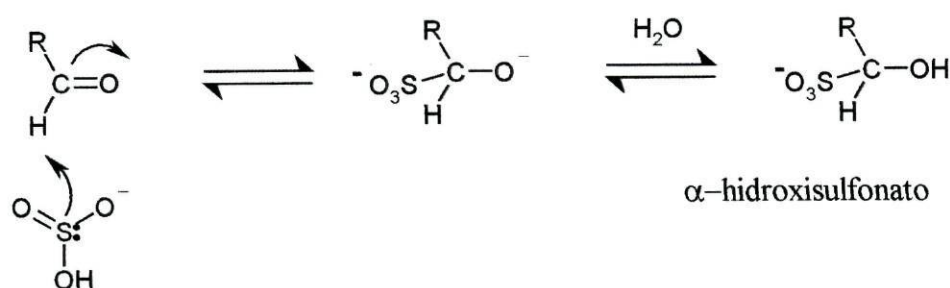


Figura 1.2 – Reacção de adição do anião hidrogenossulfito ao grupo carbonilo com formação de α -hidroxissulfonatos

Os α -hidroxissulfonatos resultantes da formação de aductos apresentam uma acentuada diminuição de estabilidade em meio alcalino. Esta característica é aproveitada aquando do doseamento da fracção combinada de SO_2 .

A reacção de adição que conduz à formação do aducto entre o anião hidrogenossulfito e o grupo carbonilo é descrita como sendo rápida, reversível e relativamente extensa para aldeídos de cadeia curta. Saliente-se que esta reacção é usada em larga escala para a purificação de aldeídos e cetonas, dado que os aductos formados são cristalinos e facilmente separáveis da mistura [25].

A extensão da formação destes compostos é condicionada estereoquimicamente. O anião hidrogenossulfito é um anião relativamente volumoso, e se os grupos R e R' adjacentes ao carbono do grupo funcional forem igualmente volumosos, a reacção será apreciavelmente menos extensa, dado que a aproximação do nucleófilo ao átomo de carbono do grupo carbonilo é dificultada. A influência que os grupos volumosos na vizinhança do grupo carbonilo exercem sobre a reacção de adição nucleófila é

confirmada pelos valores das constantes de equilíbrio para a reacção de adição do anião hidrogenossulfito a alguns aldeídos e cetonas conforme se pode ver na tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Valores de constantes de equilíbrio para a reacção de adição do anião hidrogenossulfito a aldeídos e cetonas (valores obtidos a 0°C) (extraído e adaptado da ref^a 29)

Composto carbonílico RCOR'	$K = \frac{[RR'C(OH)SO_3^-]}{[RCOR'] \times [HSO_3^-]}$
CH ₃ CHO	800
CH ₃ COCH ₃	200
CH ₃ COC ₂ H ₅	40
CH ₃ COC(CH ₃) ₃	1,6

Durante a fase de fermentação do mosto, os compostos carbonílicos sofrem redução por acção da levedura cervejeira, originando os álcoois respectivos. Se aqueles se encontrarem na forma de aducto, esta reacção pode não ocorrer e, conseqüentemente aqueles compostos irão aparecer no produto final sob a forma de α -hidroxisulfonatos. Alguns autores [23] defendem que durante o envelhecimento da cerveja, com a diminuição da concentração de SO₂ livre, os aductos vão-se dissociando, resultando na libertação dos compostos carbonílicos e conseqüente alteração das propriedades organolépticas do produto.

A formação endógena de sulfito durante o processo de fermentação da cerveja tem sido objecto de estudo por parte de vários investigadores que procuram estabelecer os factores que afectam a formação do sulfito durante esse processo. Narziss e colaboradores [44] mostraram que o sulfito produzido durante a fermentação intervém na estabilidade organoléptica da cerveja e concluíram que a presença na cerveja final de níveis de dióxido de enxofre de 8 a 9 ppm ocasiona um aumento da estabilidade da cerveja durante o seu armazenamento. Assim, a presença de SO₂ possibilita maior resistência a influências exteriores que possam provocar alterações no aroma e sabor original do produto, tais como, temperatura, luminosidade e a presença de oxigénio. A

nível da produção industrial da cerveja a necessidade de manter um nível de qualidade previsível e a falta de conhecimento dos factores responsáveis pelo envelhecimento da cerveja, implicam que exista um rigoroso controlo de todo o processo de fabrico, desde a selecção rigorosa de matérias-primas até ao engarrafamento e armazenamento, de forma a estabilizar as características do produto produzido.

Para preencher esta lacuna inúmeros estudos têm sido efectuados na tentativa de esclarecer os factores responsáveis por alterações organolépticas na cerveja durante o armazenamento (“vulgo” envelhecimento da cerveja”). Esses estudos apontam para a existência de uma correlação entre as características típicas do envelhecimento e o aumento da concentração de certos compostos carbonilo, nomeadamente aldeídos. (Tabela 1.5)

Tabela 1.5 – Alguns compostos relacionados com alteração do aroma/sabor da cerveja. Limites de percepção e características organolépticas associadas. (extraído e adaptado da refª 30)

Composto	Limite de percepção/ppm	Aroma/sabor na cerveja
5-hidroximetilfurfural	1000	aldeído,velho,óleo vegetal
formaldeído	400	frutado,queimado,adstringente
furfural	150	papel,casca
acetaldeído	25	maçasverdes,frutado
5-metilfurfural	20	amêndoas,queimado,fenólico
n-butanal	1	melão,folhas verdes,verniz
n-hexenal	0,3-0,4	amargo,aldeído
n-heptenal	0,05-0,1	amargo aldeído
cis-4-hexenal	0,0003-0,0005	amargo,aldeído,papel
trans-2-octenal	0,0003-0,0005	amargo,aldeído,oxidado
trans-2-nonenal	0,00011	papel,cartão,oxidado,velho

As reacções associadas à formação dos compostos atrás referidos a partir de precursores têm sido objecto de estudo com vista a controlar tecnologicamente a formação dos mesmos, nomeadamente a degradação oxidativa de isohumulonas, a

degradação de aminoácidos, a oxidação de ácidos gordos e derivados, certas condensações aldólicas, a oxidação de álcoois, etc. Podemos associar aos fenómenos referidos alguns parâmetros como tempo, pH temperatura e a presença de espécies oxidantes na matriz com incidência na presença de oxigénio. Alguns investigadores têm proposto mecanismos envolvendo radicais livres, como por exemplo, o radical hidroxilo – HO[•], formado por interacção entre O₂ e H₂O sob a acção catalítica da luz e temperatura que, por serem altamente reactivos, podem induzir alterações progressivas na matriz inicial da cerveja [22].

Na indústria cervejeira o embalamento é efectuado em atmosfera “isenta” de O₂, para tal a embalagem é saturada com CO₂, antes do fecho, de forma a garantir que o teor de oxigénio após embalagem seja muito pequeno.

Estudos efectuados permitiram seguir a evolução da perda do SO₂ total durante o armazenamento. Concluiu-se que essa perda era quase exponencial, o que revela que a cinética da reacção entre o SO₂ e os componentes da cerveja é de pseudo primeira ordem em relação ao tempo [26] (gráfico da figura 1.3). Assim, é sugerida a adição de agentes sulfitantes após a fermentação de modo a reduzir a concentração de aldeídos presentes. De acordo com o exposto e atendendo ao elevado limite de percepção sensorial dos aductos carbonilo-hidrogenossulfito e ao facto de serem não voláteis, o SO₂ assume um papel essencial na estabilidade organoléptica do produto

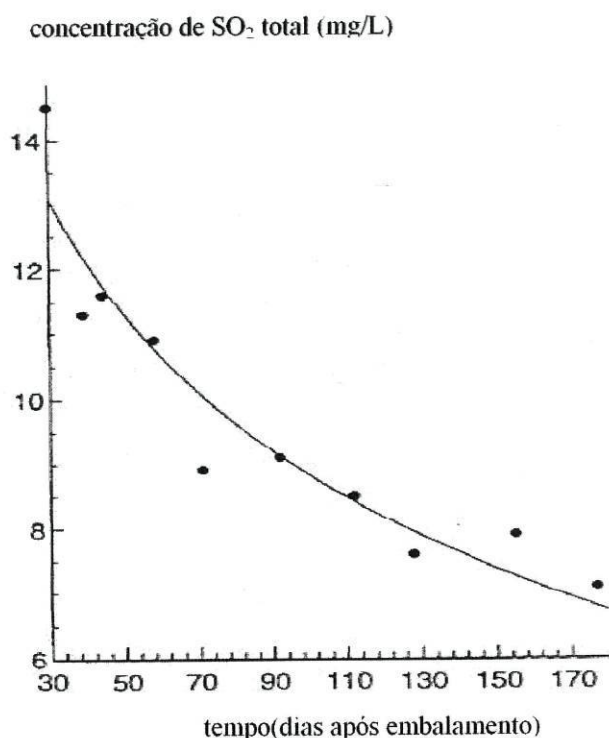


Figura 1.3 - Perda de SO₂ total na cerveja. Estudo efectuado em cerveja comercial armazenada a 25°C e analisada usando o método da p-rostanilina (ref^o19). A escala referente ao tempo traduz o número de dias de armazenamento. (adaptado da ref^o 26)

A oxidação do SO₂ em solução aquosa tem sido objecto de estudo de vários investigadores mas tendo em conta as dificuldades experimentais inerentes ao estudo deste tipo de reacções, os resultados obtidos têm sido objecto de controvérsia. Estas dificuldades prendem-se com a presença de iões metálicos como impurezas na água ou nos reagentes que são capazes de catalisar a oxidação do SO₂. Também a presença de compostos orgânicos como impurezas, que podem actuar como inibidores, tendem a causar dificuldades experimentais.

Têm sido propostos vários mecanismos para a acção catalítica de certos iões de metais de transição, no processo de oxidação do SO₂. Neste sentido, três tipos de mecanismos têm sido propostos: 1) envolvendo radicais livres; 2) não envolvendo radicais livres; 3) combinação dos dois mecanismos anteriores. A maior parte dos estudos publicados sobre o assunto explica o processo através do mecanismo de radical livre proposto pela primeira vez por Backstrom [2][24].

O controlo do processo de envelhecimento da cerveja tem-se apresentado como um dos maiores desafios para a indústria cervejeira. Na verdade, a identificação e quantificação de compostos responsáveis pela estabilidade do aroma/sabor da cerveja bem como os mecanismos inerentes a todo este processo têm constituído um desafio para a investigação nesta área.

Como vimos, o SO₂ pode reagir reversivelmente com compostos carbonilo, formando aductos na forma de α -hidroxissulfonatos. Os aductos formados não são voláteis e, portanto, como fazem diminuir a concentração de compostos carbonilos livres, o seu efeito no gosto e cor da cerveja não é tão acentuado.

Resumindo, as transformações químicas do sulfito na cerveja estão associadas à:

- formação de aductos com compostos carbonilo, estáveis e de carácter reversível;
- sua actuação como inibidor de reacções radicalares, sendo esta uma característica que parece manter-se mesmo na forma de aducto [22].

2 - Metodologias para a análise do dióxido de enxofre

2.1 - Métodos não voltamétricos

2.2 - Voltametria

2.2.1 - Comportamento electroquímico do dióxido de enxofre

2.2.2 - Método voltamétrico para a determinação do dióxido de enxofre

2.1 – Métodos não voltamétricos

Com o propósito de avaliar os teores de SO_2 em alimentos e bebidas, várias metodologias analíticas encontram-se desenvolvidas. Muitas dessas metodologias são essencialmente oriundas de adaptações do procedimento de Monier-Williams [19], desenvolvido em 1927.

Métodos adaptados da metodologia desenvolvida por Monier-Williams têm ainda hoje ampla utilização na análise do SO_2 em alimentos e bebidas. Estes métodos utilizam a destilação como técnica de separação do composto da matriz após conversão do ião hidrogenossulfito na forma volátil, SO_2 , e na posterior oxidação do SO_2 recolhido a ácido sulfúrico utilizando peróxido de hidrogénio. A quantificação do analito é feita por titulação ácido-base. A simplicidade e boa precisão são características deste método, no entanto a sua morosidade é a principal desvantagem. O controlo da temperatura de destilação é um factor extremamente importante na prevenção da evolução de co-destilados, como por exemplo aldeídos voláteis com capacidade para se combinarem com o SO_2 , o que ocasiona resultados errados.

Um outro método de análise do SO_2 muito utilizado baseia-se numa titulação iodométrica na qual, por adequado ajuste do valor do pH, consegue-se a quantificação do SO_2 total e livre. Este método tem grande aplicabilidade na análise de bebidas e alimentos de cor ténue ou descorados, realçando-se a aplicação na análise de vinhos

brancos. Refira-se que a detecção do ponto final da titulação é difícil para concentrações inferiores a 32mg/L, o que inviabiliza a aplicação do método à matriz cerveja, onde os níveis de SO₂ habituais são muito menores.

Outra metodologia muito aplicada na quantificação do dióxido de enxofre baseia-se na determinação espectrofotométrica, após conversão do analito num complexo corado, por reacção com o reagente p-rosanilina, que apresenta um máximo de absorção a 550nm – vulgarmente conhecido por método da p-rosanilina. Neste método recorre-se à propriedade que os iões tetracloromercurato possuem de ligar-se ao sulfito, prevenindo interacções do sulfito com o oxigénio ou a recombinação com os grupos carbonilo. Para a determinação do dióxido de enxofre total a amostra é previamente alcalinizada de modo a destruir os aductos formados entre o hidrogenossulfito e compostos carbonílicos. A elevada toxicidade dos reagentes envolvidos no procedimento analítico e alguma morosidade apresentam-se como as desvantagens principais do método.

As técnicas de análise em fluxo têm baseado o seu desenvolvimento em adaptações dos métodos tradicionais. Estas técnicas têm como base a injeção da amostra numa corrente transportadora que se pode fundir ou não com outras onde circulam os reagentes. Os produtos da reacção são quantificados num detector instalado em linha no sistema.

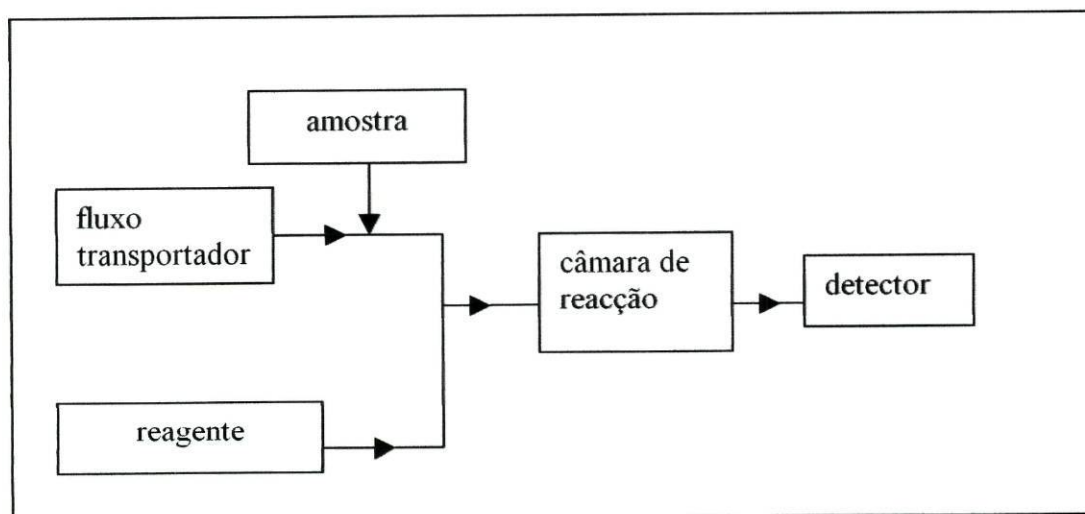


Figura 2.1– Esquema genérico de um sistema de análise por injeção em fluxo em que os reagentes são incorporados em fluxo (adaptado da ref^o 24)

A injeção em fluxo apresenta inúmeras vantagens quando comparada com as técnicas tradicionais. Nesta técnica, em geral há uma grande redução do contacto do operador com os reagentes, é possível um grande número de análises em período de tempo curto e são sistemas de elevada automação do processo. Também para o dióxido de enxofre foi desenvolvido um sistema FIA [24]. A amostra é injectada num fluxo transportador contendo NaOH de modo a liberar o sulfito do aducto, em seguida é adicionado em linha solução de ácido sulfúrico que provoca uma diminuição drástica do pH sendo o hidrogenossulfito convertido a SO_2 . O SO_2 é permutado através de uma membrana de difusão gasosa e, por reacção com o reagente p-rosanilina, o analito é convertido num composto corado e analisado espectrofotometricamente [24]. Todo este processo decorre em linha, no sistema de fluxo, de forma automatizada.

Um eléctrodo selectivo enzimático para a determinação do SO_2 foi desenvolvido. Este eléctrodo baseia-se na oxidação de sulfito a sulfato catalisada pela enzima sulfito-oxidase (figura 2.2). Fassnidge e Van Engel desenvolveram um sistema de detecção amperométrica envolvendo um eléctrodo de oxigénio dissolvido contendo a enzima sulfito-oxidase imobilizado na membrana [24]. A quantidade de sulfito na amostra é determinada indirectamente. A presença na amostra de sistemas consumidores de oxigénio por via metabólica ou reaccional interfere na detecção.

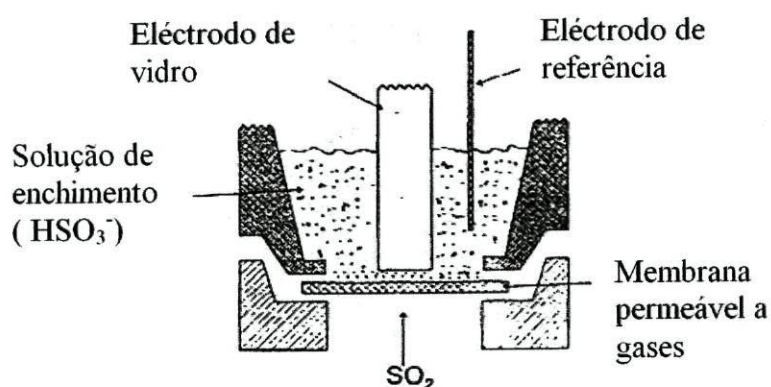


Figura 2.2 - Esquema exemplificativo de um eléctrodo selectivo para detecção do ião sulfito (extraído e adaptado da refª 24)

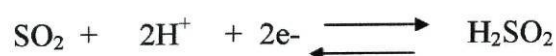
Vários trabalhos têm sido publicados relativos ao desenvolvimento de metodologias envolvendo diversas técnicas cromatográficas, aliadas a diferentes tipos de detectores, nomeadamente espectrofotométricos, condutimétricos, electroquímicos e quimioluminescentes.

Apesar das várias metodologias desenvolvidas, a selecção do método analítico mais adequado para a determinação do dióxido de enxofre na cerveja tem envolvido alguma discussão no que respeita à fiabilidade dos resultados obtidos. Como corolário desta controvérsia, os principais organismos oficiais associados à indústria cervejeira nos EUA e na Europa têm perspectivas diferentes na identificação do método conveniente. A EBC – *European Brewery Convention*, recomenda a utilização de três métodos alternativos: método de Monier-Williams, [19] [21], desenvolvido em 1927 e optimizado em 1986 para níveis $\geq 10\text{ppm}$, o método enzimático da sulfito-reductase e o método espectrofotométrico do ácido ditiobisnitrobenzóico. A ASBC – *American Society of Brewing Chemists*, recomenda o método da p-rosanilina. O IOB – *Institute of Brewing*, recomenda em alternativa o método de Monier-Williams e o método da p-rosanilina.

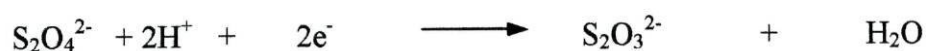
2.2 - Voltametria

2.2.1 - Comportamento electroquímico do dióxido de enxofre

Na década de 40, Kolthoff e Miller, desenvolveram estudos que mostraram a inexistência de sinal de redução do sulfito no eléctrodo gotejante de mercúrio, em meio neutro ou alcalino. No entanto, os mesmos investigadores observaram um sinal analítico bem definido aquando da acidulação da solução. O sinal observado, cuja intensidade aumenta à medida que a solução fica mais ácida, foi associado à redução do ácido sulfuroso (dióxido de enxofre hidratado), de acordo com a equação:



O aparecimento de duas ondas a pH 6, localizadas a $-0,67$ e $-1,23$ V (vs. ESC), foram associadas pelos autores acima referidos como à redução do iões hidrogenossulfito e hipossulfito, respectivamente, de acordo com as equações seguintes:



Neste mecanismo o composto HSO_2 , produto da reacção de redução do ião hidrogenossulfito, por polimerização dá origem ao ião ditionito, $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, que por redução posterior forma o ião tiosulfato, podendo ser esta a razão do aparecimento da segunda banda observada.

Kolthoff e Miller [46], defendem que o facto da segunda onda não ser observável a pH inferior a 4 se deve à rápida dismutação, nessas condições de pH, do ácido ditionoso.



2.2.2 - Método voltamétrico para a determinação do dióxido de enxofre

Um dos métodos voltamétricos para a determinação do dióxido de enxofre foi desenvolvido neste laboratório e nele é feito o tratamento da amostra de forma a separar o analito para posterior quantificação voltamétrica [29][30]. Nesse tratamento prévio, a

amostra é, em primeiro lugar, condicionada em meio alcalino num tubo colector de gases, para promover a ruptura dos aductos. Os aldeídos mais voláteis são depois extraídos através da passagem de um fluxo de azoto, controlado por um medidor de fluxo, em meio alcalino. Numa segunda fase é feita a adição de ácido clorídrico ao tubo que contém a amostra de forma a permitir a conversão de todo o sulfito à forma gasosa, SO_2 , sendo depois arrastado pelo fluxo de azoto e recolhido na célula voltamétrica, em solução tampão acetato com pH cerca de 4. Na figura 2.3 encontra-se representada a montagem para a separação e determinação voltamétrica do dióxido de enxofre na cerveja.

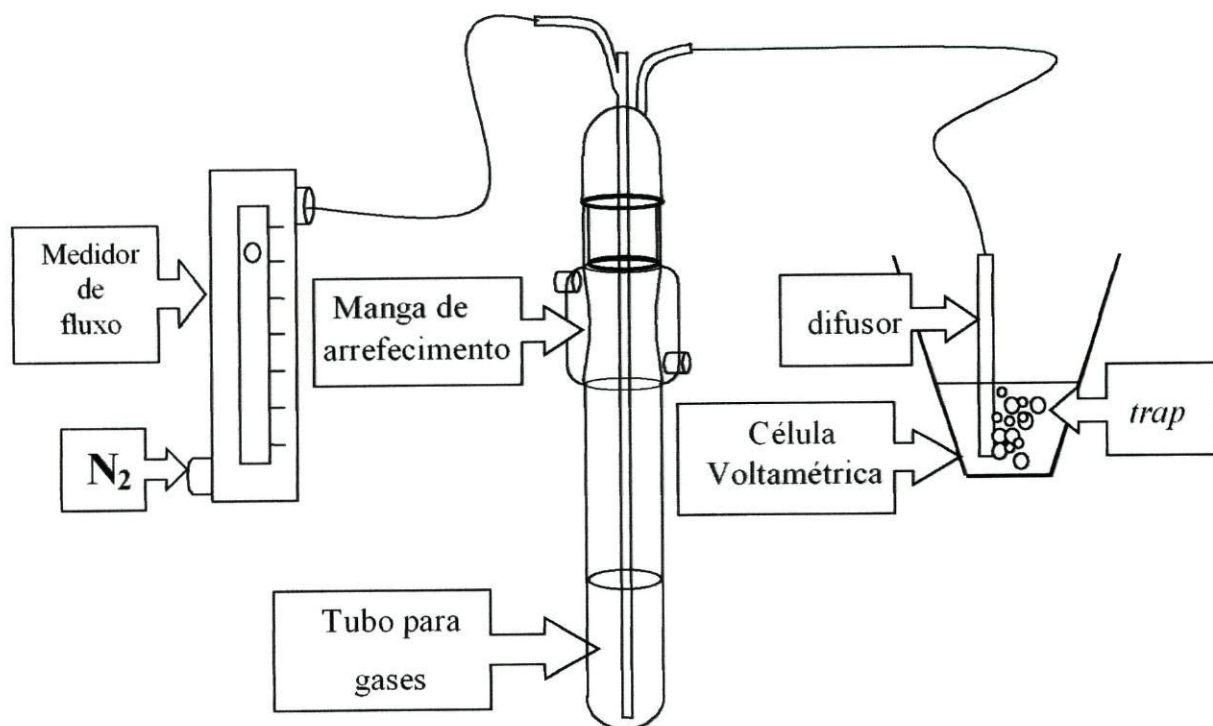


Figura 2.3 – Montagem para a separação e determinação voltamétrica do dióxido de enxofre em cerveja (extraída da ref^o 30)

3 - Pervaporação Analítica

3.1 - Introdução

3.2 – Pervaporação em sistemas de análise em fluxo

3.1 - Introdução

A complexidade da matriz, o grau de diluição ou mesmo a incompatibilidade com o sistema analítico são alguns aspectos que inviabilizam a determinação analítica de alguns compostos directamente das amostras. Técnicas de separação ou remoção de interferentes e de pré-concentração do analito são frequentemente necessárias antes da determinação analítica. As etapas de pré-tratamento de amostras, além de morosas, suportam algum risco de contaminação sobretudo quando se trabalha em análise vestigial. Nos últimos tempos têm vindo a ser desenvolvidos esforços para o aperfeiçoamento de técnicas de separação não-cromatográficas envolvendo mecanismos de transferência de massa. Deste ponto de vista, técnicas de difusão gasosa e pervaporação são importantes no sentido de substituir processos de separação mais convencionais, já que apresentam baixo custo e possibilidade de automatização.

A pervaporação analítica pode ser entendida como a conjugação da volatilização com a difusão gasosa num único módulo. Esta técnica pode ser dividida em duas etapas: a primeira compreende a volatilização de espécies voláteis da amostra sólida ou da solução que atravessa a parte inferior do módulo de pervaporação. Uma vez no estado gasoso as espécies têm a possibilidade de se difundirem através de uma membrana hidrofóbica. Na etapa subsequente, as espécies volatilizadas transitam para a solução que se encontra estacionária ou em movimento no lado superior da membrana, na parte superior do módulo. A força impulsionadora que determina o fluxo de uma espécie

através da membrana pode ser grandemente aumentada se a solução existente na câmara superior reagir quimicamente com os solutos voláteis.

Neste trabalho o hidrogenossulfito existente na cerveja é transformado em SO₂ por acidificação e determinado num sistema de fluxo, após separação por pervaporação.

Este tipo de pervaporação analítica tem sido utilizada com sucesso na determinação em contínuo de analitos voláteis ou produtos de reacção voláteis de amostras complexas líquidas ou sólidas em diferentes áreas de análise, nomeadamente, em análises clínicas, farmacêuticas, alimentares, ambientais e industriais, competindo com outras técnicas de separação analíticas convencionais, tais como a destilação, extracção e adsorção. A pervaporação tem igualmente grande aplicação a nível industrial como contra-partida a outros métodos de separação convencionais.

Foi Luque de Castro e colaboradores, que em 1995 iniciaram os estudos sobre a aplicação analítica da técnica de pervaporação [10][12][16].

3.2 - Pervaporação em sistemas de análise em fluxo

São os novos problemas tecnológicos, industriais, ambientais, clínicos e sociais que têm actuado como motores no desenvolvimento de novos métodos físicos de análise para a determinação de elementos e compostos a um nível de concentração cada vez menor. Esta necessidade de incorporar novas estratégias de análise de vestígios, na especificação, na redução de custos por análise e no aumento do número de análises a efectuar por intervalo de tempo, justifica o crescente interesse pela automatização do processo analítico. Neste contexto, o desenvolvimento do conceito de análise em fluxo apresenta-se como revolucionador, estabelecendo um elo de ligação entre os problemas tecnológicos e sociais e os meios técnicos apropriados para os resolver.

Com intuito de adaptar as técnicas de determinação rotineiras, normalmente executadas de forma manual, a sistemas automatizados, foram desenvolvidos vários tipos de tratamentos da amostra automatizados e adaptados a sistemas de fluxo, tais como a difusão gasosa, a destilação e a extracção líquido-líquido, encontrando-se na bibliografia vários trabalhos desenvolvidos sobre aplicação de técnicas de injeção em fluxo contínuo e sequencial integrando processos de tratamento da amostra em linha daquela natureza [15] [17].

O conceito de análise por injeção em fluxo (FIA) surgiu em 1975 e foi proposto originalmente por J. Ruzicka [43]. Consistia na injeção de pequenos volumes de amostra, medidos rigorosamente, num fluido transportador. Neste sistema de FIA, a amostra arrastada através de um sistema de fluxo não-segmentado pode sofrer transformações físico-químicas, incluindo, diluições, reacções químicas, extracções, em unidades modulares intercaladas em linha. Esta técnica oferece, assim, grandes potencialidades e grande versatilidade de aplicação. Na realidade, apesar de relativamente recente, são inúmeras as aplicações desenvolvidas nos mais diversos campos que incluem a análise de analitos inorgânicos, orgânicos, iões, macromoléculas, desde quantidades vestigiais a concentrações elevadas, podendo ser usada em meios aquosos ou em meios não-aquosos.

Numerosas aplicações têm sido desenvolvidas com o recurso à integração de unidades de separação por intermédio de membranas, cuja função é permitir a passagem selectiva de uma ou várias substâncias. Foram propostos sistemas onde são utilizadas unidades modulares contendo membranas permeáveis a gases, hidrofóbicas e microporosas, de dimetilsilicone ou Teflon. Nestas unidades o processo de difusão processa-se por diferença de pressão parcial dos dois lados da membrana, entre o canal dador e o aceitador, podendo ou não ser acompanhado por diferenças de solubilidade do gás nas soluções que circulam nos dois canais. Com o auxílio da técnica de “stopped-flow” no canal aceitador obtém-se um efeito de pré-concentração do analito, resultando em elevados níveis de sensibilidade. Estas unidades, onde existe contacto da solução amostra com a membrana semipermeável, são conhecidas como módulos de difusão gasosa. Foram desenvolvidos vários sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de dióxido de enxofre em vinho e em cerveja envolvendo a conversão do analito em SO₂ e difusão gasosa através de uma membrana semi-permeável [40] [41].

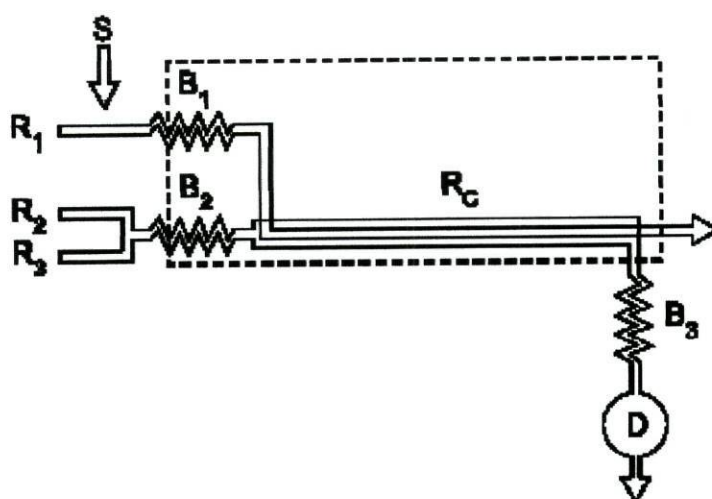


Figura 3.1 – Representação genérica de um sistema de fluxo acoplado à técnica de difusão gasosa em membrana tubular concêntrica: S, amostra; R₁, solução ácida; R₂, solução acetadora; R₃, reagente; R_c, tubo reactor; B₁, B₂, B₃, linhas de transmissão; Linha a tracejado, banho termostático; D, detector. (extraído e adaptado da ref^a 40)

A técnica de difusão gasosa permite bons resultados no que diz respeito a selectividade e sensibilidade, contudo alguns problemas podem estar associados, tais como: obstrução dos poros da membrana por partículas em suspensão ou substâncias de elevado peso molecular presentes na amostra e deterioração da membrana devido ao contacto com a solução-amostra. Os problemas mencionados traduzem desvantagens na utilização desta técnica de separação. Estes problemas podem ser ultrapassados recorrendo à pervaporação.

Um esquema genérico do acoplamento de um módulo de pervaporação num sistema de análise por injeção em fluxo está representado na figura 3.2.

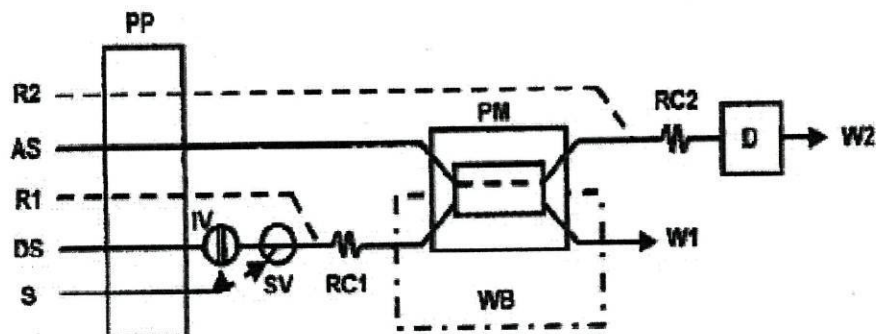


Figura 3.2 – Representação genérica de uma montagem de um sistema de fluxo acoplado à técnica de pervaporação: S, amostra; DS, solução dadora; R₁ e R₂, reagente; AS, solução aceitadora; PP, bomba peristáltica; IV, válvula de injeção; SV, válvula interruptora; RC, loop reator; PM, módulo de pervaporação; WB, banho termostático; D, detector; W, esgoto. (extraído da ref^a 14)

No sistema representado na figura 3.2, a amostra é injectada num fluxo transportador auxiliada por um sistema de bombeamento peristáltico e entra em contacto com o reagente (R₁), a existência no circuito de um loop, com alguma capacidade, vai favorecer a mistura dos reagentes (RC₁). A solução contendo o analito entra na câmara inferior do módulo de pervaporação que se encontra termostaticada a uma temperatura conveniente para produzir volatilização do analito. O analito na forma gasosa, difunde através da membrana hidrofóbica e é recolhido por uma solução apropriada na câmara superior do módulo. A saída da câmara superior do módulo pode conduzir a solução directamente ao detector ou promover a mistura com outro reagente (R₂) que, após reacção adequada produza uma substância detectável pelo sistema de detecção. Colocando uma válvula de injeção após a saída da câmara superior é possível estabelecer intervalos de tempo durante os quais ocorre pervaporação/concentração do analito na solução aceitadora (na câmara superior). O sistema descrito torna-se mais simples se não houver adição de solução reagente no fluxo. Em muitos sistemas a introdução no fluxo transportador de um reagente torna-se necessário para converter o composto a analisar numa substância volátil, capaz de sofrer pervaporação, ou para

aumentar a sensibilidade ou selectividade da determinação. A movimentação da amostra líquida na câmara inferior do módulo é conseguida recorrendo a uma bomba peristáltica, quer trabalhando em contínuo ou através de uma válvula de injeção, ou usando uma seringa hipodérmica adaptada no orifício de entrada da câmara. Tratando-se de uma amostra no estado sólido, uma determinada massa de material é introduzida na câmara inferior e através de uma adaptação apropriada, colocada na entrada da câmara, é adicionada a quantidade de reagente necessária para o tratamento da amostra [10][11][12].

A versão do módulo de pervaporação usado por Luque de Castro et al. está representada na figura 3.3.

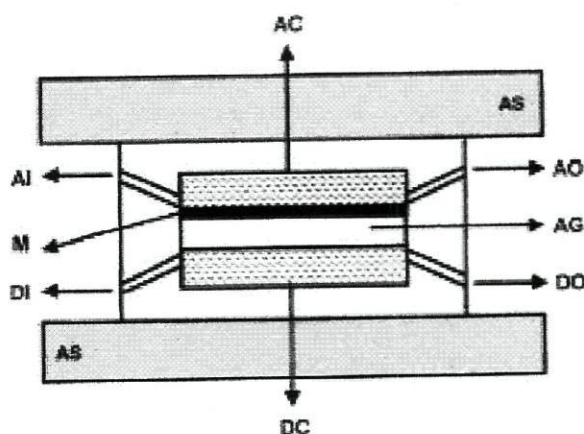


Figura 3.3 – Módulo de pervaporação convencional: AC, câmara aceitadora; AI e AO, entrada e saída da câmara aceitadora; M, membrana; AG, espaço gasoso; DC, câmara dadora; DI e DO, entrada e saída da câmara dadora; AS, suporte de alumínio. (extraído da ref^o 14)

O sistema é constituído por uma câmara inferior onde é introduzida a amostra por injeção ou por aspiração contínua ou por pesagem directa quando se trata de uma amostra sólida; uma membrana fina de PTFE; e uma câmara superior, a câmara aceitadora, com orifícios de entrada e de saída, por onde flui uma solução apropriada que recebe os compostos voláteis. O módulo de pervaporação é construído em metacrilato, o que permite observar se o sistema se encontra a funcionar correctamente. Ambas as câmaras, a aceitadora e a dadora, o suporte da membrana, os espaçadores são alinhados com a ajuda de parafusos metálicos e o contacto entre os vários elementos é

conseguido e ajustado hermeticamente através de dois suportes de alumínio. A câmara dadora é termostatzada, em geral, por imersão num banho de água. A estrutura da unidade de pervaporação pode ser adaptável à análise de amostras líquidas e sólidas por variação do volume da câmara inferior do módulo e da camada de ar existente no interior do mesmo. Um dos aspectos importantes a realçar na estrutura do módulo de pervaporação é a existência de uma camada de ar entre a solução-dadora e a membrana hidrofóbica. Como a solução amostra não entra em contacto directo com a membrana reduzem-se os problemas associados com a obstrução da membrana pelo material da matriz. Outro efeito a considerar, está associado à modificação das propriedades fisico-químicas da membrana pelo facto de conter soluto dissolvido, fenómeno denominado de plastificação, que assume um papel coadjuvante no processo de difusão das espécies através da membrana.

O estado de agregação da amostra a analisar e a complexidade ou propriedades físicas da matriz não apresentam impedimento para a utilização do módulo de pervaporação dada a versatilidade de “design” que o mesmo possibilita. Na realidade e como já se referiu pequenas alterações estruturais, reaccionais ou da própria configuração da montagem, permitem um elevado leque de aplicabilidade da técnica de pervaporação, particularmente para aplicações na área alimentar e bebidas.

A possibilidade de sequenciar a formação de compostos voláteis de uma dada amostra na unidade de pervaporação permite a multideterminação analítica como é ilustrado no estudo desenvolvido para a determinação de amónia e ureia em fluidos biológicos, envolvendo reacções de derivatização distintas para os referidos compostos [13]. A multideterminação é possível através de alterações nos parâmetros que envolvem todo o sistema, por exemplo, variações programadas de temperatura durante a pervaporação foi o método proposto para a especiação do mercúrio em amostras sólidas [12].

Resumindo, a pervaporação é uma técnica que pode ser implementada em sistema de fluxo para a separação de certos analitos em linha, sendo um meio de fazer uma interface entre um sistema em fluxo de preparação da amostra e um sistema em fluxo de detecção.

4 - Detecção em sistemas de análise em fluxo

4.1 - Introdução

4.2 - Célula voltamétrica de fluxo baseada no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa

4.3 - Detecção voltamétrica em sistemas de análise em fluxo

4.1 - Introdução

No que diz respeito à detecção, os mais variados tipos de detectores já foram incorporados em sistemas de análise em fluxo. Numa primeira fase, os estudos realizados nesta área contemplavam o uso de detectores espectrofotométricos, no entanto, a inserção de sensores electroquímicos, potenciométricos e voltamétricos, sugeriu o desenvolvimento de novos sistemas de controlo analítico que se apresentaram como alternativa às metodologias tradicionais.

Os eléctrodos a utilizar em detectores de fluxo devem responder a certos requisitos, de modo a garantir os melhores resultados experimentais, tais como: elevada velocidade de resposta, reduzido ruído eléctrico, repetibilidade da resposta, compatibilidade com os vários componentes da montagem e facilidade de acoplamento à mesma.

A conjugação de detectores electroquímicos com sistemas de análise em fluxo permite obter bons resultados nas operações analíticas, nomeadamente, a reprodutibilidade do sinal analítico, a velocidade de resposta, a selectividade analítica e o elevado nível do ritmo de amostragem. A versatilidade da forma de acoplamento de detectores electroquímicos na montagem de sistemas de análise em fluxo contribuiu para a investigação e desenvolvimento de mecanismos que permitiram a determinação múltipla e simultânea de várias espécies analíticas [45].

A aplicabilidade de sistemas de análise em fluxo usando detectores electroquímicos é vasta dada a diversidade de eléctrodos existentes e a facilidade de adaptação dos mesmos aos sistemas de fluxo. Quando a detecção directa não é viável, por inexistência de eléctrodo apropriado, aquela pode ser efectuada por via indirecta, por titulação ou por análise diferencial, ou promovendo reacções químicas entre o analito e um reagente, com posterior análise do produto da reacção ou por decréscimo da quantidade de reagente utilizado como titulante. A integração de detectores electroquímicos e os problemas associados à selectividade dos mesmos impôs a procura de soluções para problemas específicos.

A análise em fluxo com detecção voltamétrica usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa implica a resolução de alguns aspectos técnicos, tais como: o problema da interferência do oxigénio dissolvido nas amostras, o desenvolvimento de técnicas de varrimento de potencial adaptado à medição da intensidade de corrente em condições de fluxo e a adaptação da célula voltamétrica à detecção em fluxo contínuo. Tradicionalmente, a desoxigenação é efectuada por purga com azoto puro. Taylor [34] propôs o recurso a uma membrana semi-permeável que permitia a difusão do O_2 pela membrana quando a pressão de vapor do O_2 na atmosfera exterior da membrana é muito baixa (figura 4.1). Tal sistema permitia a desoxigenação em linha da solução. Para o arrastamento da amostra, o mesmo autor propôs a utilização de bombas peristálticas.

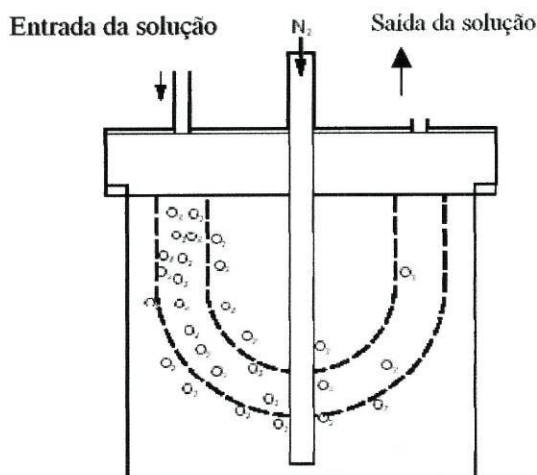


Figura 4.1 – Diagrama esquemático de um processo de remoção de O_2 em linha usando uma membrana semi-permeável. (extraída da ref^a 34)

4.2 - Célula voltamétrica de fluxo baseada no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa

Detectores polarográficos, voltamétricos e coulométricos são os mais comuns de entre os detectores electroquímicos dada a elevada sensibilidade, rapidez de resposta e vasta gama de aplicabilidade a substâncias orgânicas e inorgânicas. Contudo, a detecção electroquímica tem algumas limitações nomeadamente: a necessidade de electrólito de suporte, a necessidade de remoção do oxigénio dissolvido quando se trabalha na zona de redução, a dependência do sinal analítico com a temperatura, uma vez que uma variação da ordem de 1°C implica flutuação de sinal da ordem dos 3%. Quando associada a sistemas de análise em fluxo, a detecção electroquímica depende ainda, das condições hidrodinâmicas do sistema, com conseqüente dependência do caudal do fluxo transportador.

O processo de construção e aplicação de detectores electroquímicos, quando usados na detecção de sistemas de análise em fluxo, deve responder a alguns requisitos, nomeadamente [37]:

- 1) o material do eléctrodo de trabalho deve ser seleccionado de modo a possuir uma gama operacional de potencial adequada, apresentando valores satisfatórios de corrente residual e nível de ruído e reprodutibilidade da superfície onde ocorre a reacção electroquímica;
- 2) o detector deve ser construído com um volume morto tão pequeno quanto possível de acordo com as condições hidrodinâmicas do sistema de propulsão, de modo a permitir níveis elevados de sensibilidade e reprodutibilidade na medição do sinal analítico.

O nível de sucesso dos resultados analíticos obtidos está associado à configuração e geometria da célula de fluxo. O modo como o sistema de detecção é acoplado aos restantes elementos da montagem pode resultar em consequências adversas na resposta analítica, salientando-se o aparecimento de volumes mortos, formação e retenção de bolhas de ar, alteração de estabilidade, falta de reprodutibilidade, variação no tempo de resposta e elevada dispersão da amostra.

A arquitectura da célula de fluxo deve permitir obter um reduzido volume morto. Por outro lado, as condições hidrodinâmicas, o posicionamento e alinhamento do sistema constituídos por três eléctrodos devem ser definidos de modo a permitir níveis reduzidos de impedância. Os materiais usualmente utilizados em eléctrodos de trabalho são o mercúrio e várias formas de carbono e platina. Em particular, os eléctrodos de mercúrio, apresentam algumas características “*sui generis*”, nomeadamente, o valor elevado da sobretensão para a libertação de hidrogénio, possibilitando a sua utilização em gamas extensas de potencial na zona de redução. Como eléctrodo de trabalho, o eléctrodo de mercúrio gotejante apresenta vantagens sobre os eléctrodos de metais sólidos, como a platina, essencialmente porque a renovação periódica da superfície do eléctrodo minimiza fenómenos de passivação e porque a intensidade de corrente residual é muito baixa para esse eléctrodo .

No processo de automatização da análise com detecção voltamétrica, a utilização de uma célula de fluxo recorrendo ao eléctrodo de mercúrio, de reduzido volume morto e de baixo ruído, apresenta algumas dificuldades de concepção podendo-se associar às referidas atrás, a necessidade de estabilização da gota de mercúrio, a manutenção de uma queda óhmica reduzida e a necessidade das soluções serem desoxigenadas.

As primeiras células de fluxo com eléctrodos de mercúrio, surgiram na década de 60, no entanto, o seu desempenho apresentava alguns problemas relativos ao nível de volume morto e ao funcionamento do eléctrodo. A figura 4.2 representa duas células de fluxo com diferente posicionamento do eléctrodo de mercúrio – DME.

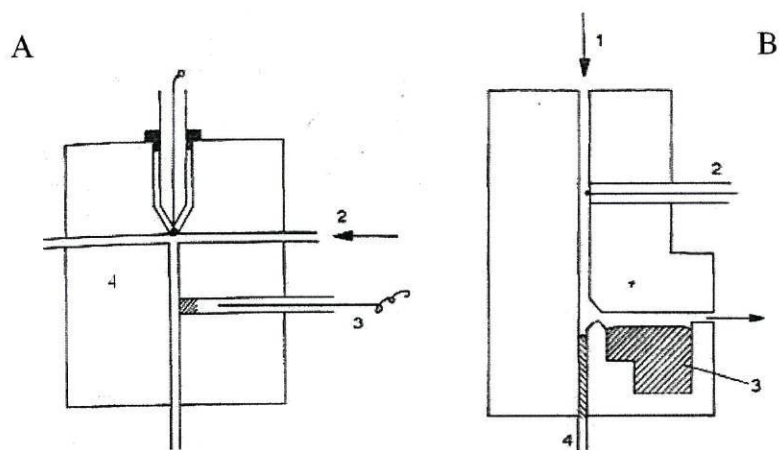


Figura 4.2. – A – Detector polarográfico com o eléctrodo DME posicionado verticalmente: (1) eléctrodo indicador; (2) entrada do fluxo; (3) eléctrodo de referência; (4) eléctrodo auxiliar. B – Detector polarográfico com o eléctrodo DME posicionado horizontalmente: (1) entrada; (2) eléctrodo indicador; (3) reservatório de mercúrio; (4) tubo de acesso ao reservatório de mercúrio (extraído e adaptado da refª 37)

Na década de 90, Colombo e seus colaboradores [36], desenvolveram uma célula para análise em fluxo com detecção voltamétrica usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, HMDE, com vista à determinação em linha de cobalto, usando a técnica voltamétrica de redissolução catódica, CSV. Essa célula encontra-se representada na figura 4.3.

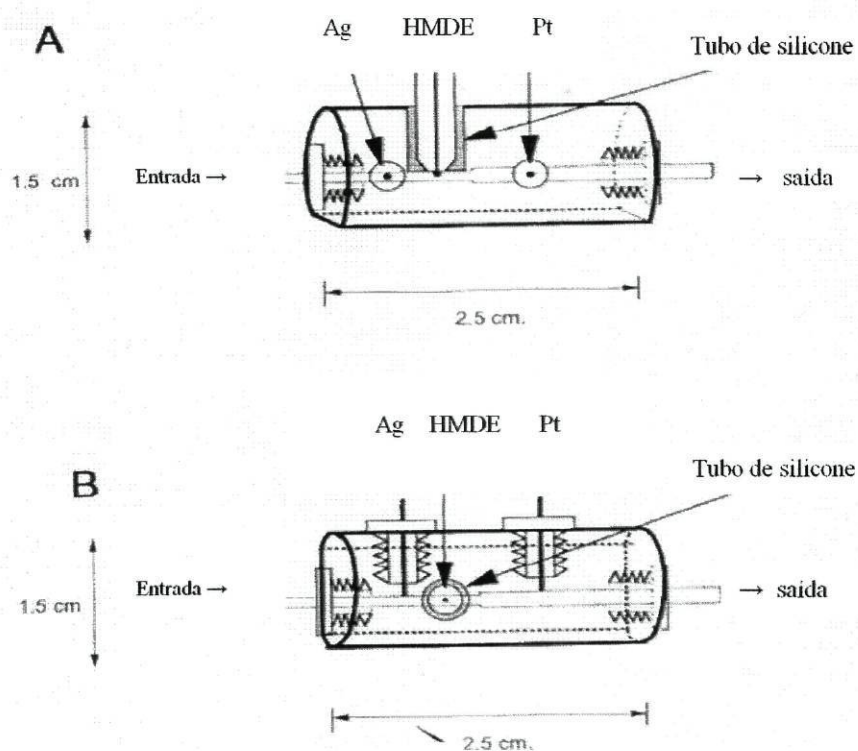


Figura 4.3. - Representação esquemática de uma célula para análise em fluxo com detecção voltamétrica (A) vista lateral; (B) vista de topo (adaptado da ref^a 32)

Também nos anos 90, Taylor [33][34], propôs uma célula de fluxo com uma arquitectura inovadora. Nessa célula, o eléctrodo era colocado numa cabeça de adaptação que por sua vez se encontrava imersa em electrólito. Esta configuração de célula permitia responder com êxito a muitos problemas existentes nas células em que a gota é confinada em células de baixo volume (figura 4.4).

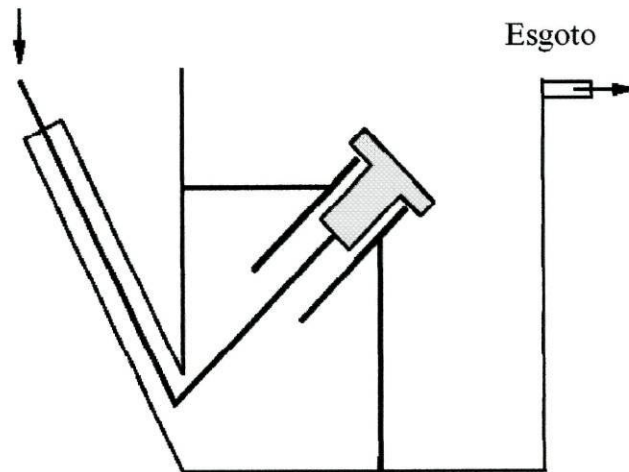


Figura 4.4. - Representação esquemática da célula de fluxo proposta por Larry R. Taylor [33]

Na célula de Taylor, a amostra/electrólito entra na célula fluindo por um tubo impermeável a gase , posicionado do modo ilustrado na figura 4.4. A célula deve conter um electrólito de suporte de elevada condutividade e de características similares ao que arrasta a amostra. Uma saliência tubular que comunica com o exterior permite manter constante o nível de líquido no interior da célula. Apesar de não estar ilustrado na representação esquemática o posicionamento do eléctrodo de trabalho é comandado por um mecanismo de elevação que permite que aquele fique completamente banhado pela amostra que flui, mas isolado do electrólito contido na célula. Um fluxo contínuo impede que a solução contida na célula de fluxo interfira com o processo que ocorre no eléctrodo de trabalho.

A figura 4.5 representa a célula de fluxo, adaptada do modelo proposto por L.Taylor, construída no Centro de Investigação em Química do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Esta célula contém uma

adaptação de PTFE com uma cavidade onde se insere o capilar de vidro na extremidade do qual se forma a gota de mercúrio. O sistema formado pela adaptação de PTFE, o eléctrodo de referência e o contra eléctrodo, está inserido numa célula de vidro que contém uma solução electrolítica com as mesmas características da solução utilizada como fluxo transportador [39].

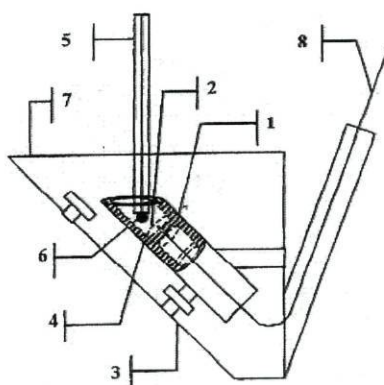


Figura 4.5 - Representação esquemática da célula de fluxo adaptada do modelo proposto por Larry R. Taylor [34] : 1, injetor; 2, cavidade interna do injetor; 3, suporte para o tubo de transporte; 4, cavidade para remoção da gota desalojada; 5, capilar; 6, gota de mercúrio; 7, suporte da célula em vidro, 8, tubo de transporte.

4.3 - Detecção voltamétrica em sistemas de análise em fluxo

O desenvolvimento de técnicas voltamétricas de análise e o aparecimento de instrumentação que permite varrimentos rápidos de potencial e de leitura da intensidade da corrente eléctrica vulgarizou a aplicação da técnica de voltametria de onda quadrada com fins analíticos (“square-wave voltametry, SWV”).

Uma das desvantagens da técnica voltamétrica na determinação de espécies redutíveis é a necessidade da remoção do oxigénio. Diversas técnicas de desoxigenação têm sido propostas associadas a células de fluxo que utilizam o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Em sistemas de análise em fluxo um dos processos de desoxigenação propostos e já referido, consiste na passagem da solução através de um tubo feito de uma membrana semi-permeável selectiva, que permite a difusão do oxigénio dissolvido [31]. Um outro modo para minimizar ou mesmo eliminar a interferência do oxigénio dissolvido, sem necessidade de recorrer a técnicas de remoção, é aumentar a frequência de aplicação dos pulsos de potencial na voltametria de onda quadrada [38][39]. De facto, dado o carácter irreversível e cineticamente lento da reacção de redução do oxigénio, o aumento do sinal com a frequência não é significativo quando se trabalha com valores de frequências elevadas e pode mesmo ser desprezável quando comparado com a resposta do analito [35].

Parte II – Desenvolvimento metodológico

1 - Introdução

O trabalho experimental que se descreve a seguir teve por objectivo o desenvolvimento de um sistema de fluxo integrando a técnica de pervaporação e um detector voltamétrico de fluxo, recorrendo ao eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, para a determinação do dióxido de enxofre em cerveja. Este trabalho surge na sequência de estudos realizados neste laboratório de investigação [29][30] que mostraram ser possível identificar o dióxido de enxofre livre e total em cerveja a partir de uma metodologia baseada na técnica voltamétrica, que consistia: (1) condicionamento da amostra de cerveja em meio alcalino para cissão dos aductos; (2) remoção da fracção volátil dos aldeídos pela passagem de um fluxo de azoto (nestas condições o SO_2 transforma-se em anião sulfito que é não volátil); (3) acidulação da amostra de modo a converter todo o anião sulfito existente em SO_2 , que é volátil; (4) passagem de um fluxo de azoto pela amostra e recolha do SO_2 na célula voltamétrica.

A determinação do SO_2 por análise em fluxo integrando um módulo de pervaporação surge na sequência de um trabalho desenvolvido neste laboratório que consistiu no desenvolvimento de um sistema de análise em fluxo para a determinação do teor de diacetilo em cerveja com detecção voltamétrica usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa [35].

Neste trabalho procurou-se adaptar as metodologias acima descritas. Numa primeira fase, desenvolveram-se estudos com soluções modelo de sulfito, avaliando-se a resposta do sistema de detecção voltamétrica. De seguida verificou-se a eficiência do sistema de pervaporação na extracção do SO_2 , optimizando-se os parâmetros inerentes a esse processo. Estabeleceram-se, ainda, as consequências da interferência do acetaldeído na determinação. Numa segunda fase, estudou-se a aplicabilidade da metodologia desenvolvida a amostras de cerveja, tendo-se comparado os valores obtidos com o sistema de fluxo desenvolvido com os resultados analíticos obtidos através da metodologia desenvolvida neste laboratório para análises não contínuas – Método Voltamétrico - [30].

2 - Equipamento e reagentes utilizados

2.1 - Equipamento e reagentes

2.2 - Preparação de soluções

2.1- Equipamento e reagentes

Durante a realização experimental deste trabalho recorreu-se à seguinte instrumentação no que respeita à preparação de soluções: balança analítica *Mettler*, modelo AE50, para pesagem rigorosa dos reagentes; balança *Mettler*, modelo PE2000, para pesagem gerais; banho de ultra-sons *Bandelin Sonorex*, modelo TK30, para a homogeneização/desgaseificação das soluções; e um medidor de pH *Metrohm*, modelo 605, equipado com um eléctrodo de vidro combinado *Metrohm*, Ref.: 6.02.02.000.

Para a medição de volumes de solução inferiores ou iguais a 1000 μL utilizaram-se micropipetas *Gilson Pipetman* (P1000 – capacidade máxima de 1000 μL ; P200 – capacidade máxima de 200 μL). Para a medição de volumes superiores a 1,00 mL utilizaram-se pipetas volumétricas.

O sistema de análise em fluxo desenvolvido utiliza uma unidade de pervaporação, bombas peristálticas *Gilson Minipuls 3*, válvula de injeção manual, *Rheodyne*, de baixa pressão, com seis vias, célula voltamétrica de fluxo, posto polarográfico contendo o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, computador equipado com “software” de controlo do sistema de fluxo. As membranas de PTFE utilizadas (*Gelman Sciences*, Ann Arbor, MI) possuíam 47 mm de diâmetro e poros de calibre 5,0 μm .

A célula voltamétrica de fluxo utilizada foi projectada/fabricada neste laboratório de investigação (ponto 4.2 da Parte I).

A detecção voltamétrica foi conseguida recorrendo a um sistema de controlo voltamétrico Autolab PGSTAT 10 (EcoChimie, Utrecht, Netherlands) controlado por computador através do software GPES 4.8 para Windows 98. O posto polarográfico Metrohm® 663VA foi utilizado em conjunto com o eléctrodo de mercúrio multimodo da Metrohm programado no modo SMDE, com o indicador do tamanho da gota de mercúrio na posição 2. O conjunto de eléctrodos utilizado era constituído por três eléctrodos: i) eléctrodo de trabalho-eléctrodo de mercúrio multimodo da Metrohm; ii) eléctrodo de referência-eléctrodo de AgCl/Ag, KCl 3M; iii) eléctrodo auxiliar-eléctrodo de carbono vítreo.

As ligações entre as várias partes do sistema foram efectuadas através de tubos de PTFE, com um diâmetro interno de 0,8 mm, que possuem elevada resistência química ao ataque por ácidos e bases e têm baixo índice de permeabilidade a gases.

As medições voltamétricas foram efectuadas à temperatura ambiente.

Os reagentes utilizados na preparação de soluções utilizadas ao longo do trabalho e as suas características gerais estão indicadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1. – Reagentes utilizados na preparação das soluções utilizadas

Reagente	Marca	Grau de pureza
Metabissulfito de potássio	Riedel-deHaën	96%
Ácido clorídrico conc.	Pronalab	p.a. (37%)
Hidróxido de sódio	Merck	p.a.
Dihidrogenofosfato de sódio	Merck	p.a.
Acetato de sódio	Merck	p.a.
Etanol	Pronalab	99,8%
Acetaldeído	Sigma-Aldrich	p.a.
Silicone	Merck	—
Azoto	Ar líquido	99,995%

A água utilizada na preparação de soluções foi em primeiro lugar purificada, através da passagem por resinas permutadoras de leito misto, de seguida foi destilada num sistema *Autostill* Ref. 951075 e por fim a água era colocada num sistema de purificação de água "*Simplicity*" da Millipore®. Essa água apresentava uma resistividade de 18,8 MΩ /cm.

2.2 – Preparação de soluções

As soluções-mãe dos compostos utilizados foram preparadas a partir dos respectivos reagentes comerciais. As soluções de menor concentração foram preparadas por diluição das soluções mais concentradas.

As cervejas utilizadas ao longo deste trabalho foram gentilmente cedidas pela empresa Unicer, Bebidas de Portugal, S.A.

Tabela 2.2. - Técnicas de preparação das soluções utilizadas no trabalho experimental

Solução	Quantidade medida	Volume de solução
Metabissulfito de potássio, 1000 mgL ⁻¹	0,1736 g	100mL
Acetaldeído, 1000 mgL ⁻¹	128µL	100mL
Tampão acetato, 0,1 M, pH 4	8,2 g de acetato de sódio Nota: O pH da solução foi ajustado com HCl, 6 M	1000mL
Ácido clorídrico, 2,5 M	21 mL	100 mL
Hidróxido de sódio, 0,1M	2 g	500 mL

3 - Optimização das condições voltamétricas de fluxo para a determinação de dióxido de enxofre em solução aquosa

3.1 - Introdução

3.2 - Estudo voltamétrico do dióxido de enxofre em sistema de fluxo

3.3 - Estudo da influência da frequência no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre

3.1– Introdução

O SO₂ pode ser determinado na cerveja através de um método que envolve o tratamento da amostra de forma a extrair o SO₂ e posterior recolha na célula voltamétrica para quantificação [30]. A utilização de técnicas voltamétricas usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, HMDE, está associada a alguns inconvenientes, estando o mais relevante relacionado com a demora das análises, atendendo a que o processo exige alguma manipulação laboratorial e necessita de desoxigenação da amostra a analisar durante um intervalo de tempo razoável [33].

Nesta parte do estudo, descreve-se a aplicação em soluções modelo de sulfito de uma metodologia já optimizada para o diacetilo [35], que utiliza um sistema automatizado de análise voltamétrica baseado num sistema de fluxo. A célula de fluxo [35] utilizada nesse sistema, permite a automatização das análises obtendo-se respostas com boa repetibilidade. A interferência do oxigénio é eliminada usando a técnica voltamétrica de onda quadrada com frequência elevada (> 100 Hz) [38][39].

3.2 - Estudo voltamétrico do dióxido de enxofre em sistema de fluxo

O estudo voltamétrico realizado teve por objectivo avaliar a aplicabilidade do sistema voltamétrico de fluxo [34] como método de detecção do dióxido de enxofre em solução

aquosa. Esta fase de avaliação da resposta do sistema voltamétrico com célula de fluxo decorreu por injeção directa de amostra, sem recurso a etapas de separação analítica.

Na figura 3.1 encontra-se representado o sistema de fluxo utilizado neste estudo preliminar. O sistema é constituído por uma válvula de injeção manual de seis vias provida de alça de amostragem de 500 μL , bomba peristáltica, tubos de transmissão de PTFE e detector voltamétrico baseado no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

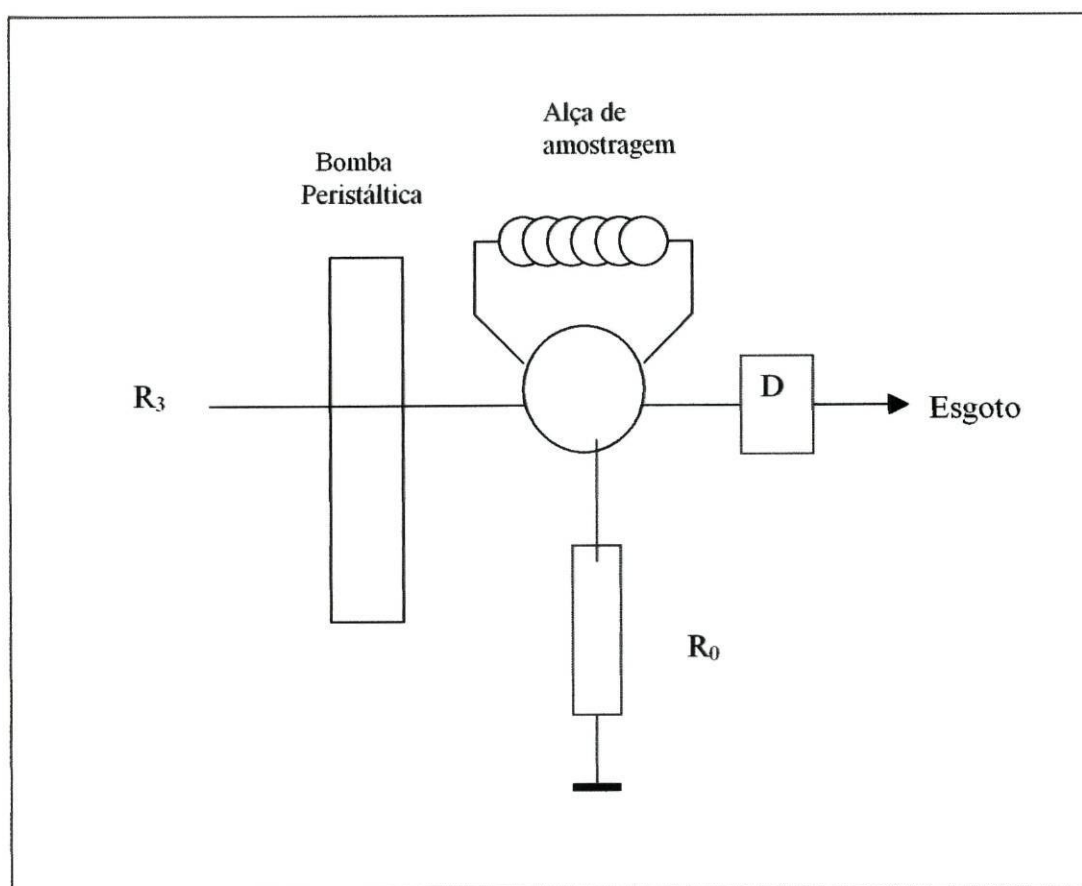


Figura 3.1. – Esquema do sistema de injeção em fluxo: D – Detector voltamétrico; R_0 –Solução injectada; R_3 – Electrólito de transporte (Tampão acetato 0,1 M pH 4,0); E - Esgoto

Neste sistema, a amostra é inserida na alça de amostragem e intercalada no fluxo transportador. A válvula quando orientada para a posição de injeção vai permitir o arrastamento da amostra, inserida na alça de amostragem, para o detector. O comprimento do tubo de ligação entre a válvula de injeção e o detector foi mantido o mais curto possível de modo a minimizar a dispersão da amostra injectada [38]. O intervalo de tempo para o qual é possível observar uma zona em que a concentração da amostra injectada é constante foi avaliado experimentalmente. De acordo com os resultados obtidos, o sistema voltamétrico foi programado de modo a que a formação da nova gota de mercúrio ocorresse 27 segundos após a injeção da amostra, atendendo a que esse instante estava compreendido no intervalo de tempo correspondente a uma concentração de sulfito no detector praticamente constante e, assim, permitiu que a medição voltamétrica fosse realizada em condições de concentração constante de SO_2 . Houve necessidade que este estudo precedesse todos os demais pois a largura do patamar referente à zona em que a concentração da amostra é constante depende do volume da alça de amostragem de injeção e do caudal do fluxo imposto ao sistema [38] (figura 3.2).

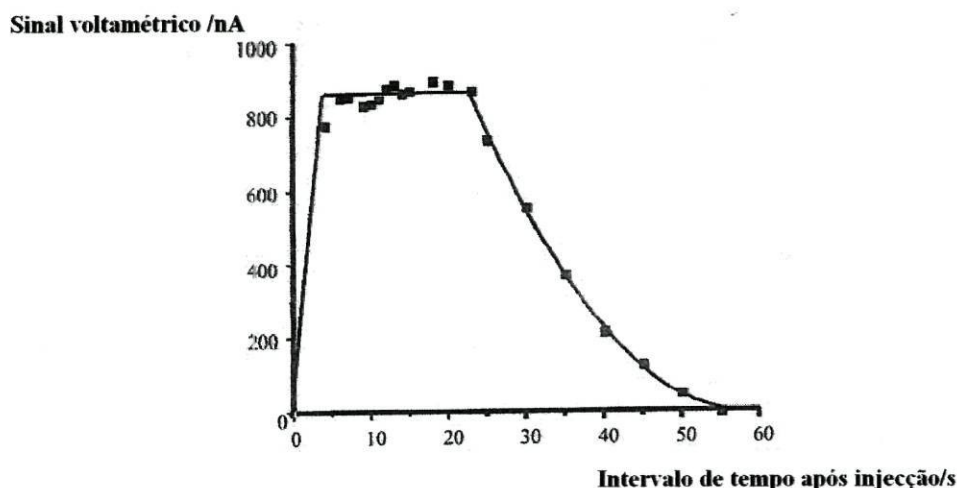


Figura 3.2. – Variação do sinal voltamétrico com o tempo, após injeção de 500 μL de solução de diacetilo, $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ (extraído e adaptado da ref^a 39)

As características do electrólito de transporte utilizado, composição, concentração e pH foram adoptados do método de análise voltamétrica em “batch” [30]. A detecção voltamétrica usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa em sistema de fluxo é dependente de determinadas condições dinâmicas, nomeadamente, o caudal da solução do electrólito de transporte que conduz o analito ao detector. O valor deste parâmetro foi optimizado em estudos anteriormente desenvolvidos neste laboratório [34] [38] e fixado em 1,33 mL/min.

As condições voltamétricas de partida utilizadas na determinação do dióxido de enxofre em fluxo utilizadas encontram-se resumidas no quadro 3.1.

Quadro 3.1

Condições voltamétricas utilizadas para a determinação do dióxido de enxofre:

- Voltametria de onda quadrada
- Potencial inicial, -0,5V
- Potencial final, -0,8V
- Incremento de potencial, 2,55mV
- Amplitude do impulso, 25,05mV
- Frequência de onda quadrada, 300 Hz

A análise de soluções aquosas com diferentes concentrações de dióxido de enxofre permitiu a construção de curvas de calibração. Os valores obtidos das alturas dos picos voltamétricos do dióxido de enxofre bem como a concentração das soluções analisadas estão indicados nas tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 – Valores obtidos na determinação voltamétrica do SO₂ em sistema de fluxo, utilizando soluções modelo de concentrações, 200 ppb, 400 ppb, 500 ppb, 600 ppb, 700 ppb, 800 ppb, 900 ppb e 1000 ppb.

Frequência = 300 Hz ; caudal do electrólito de transporte= 1,33 mL min⁻¹

c (SO ₂)/ppb	Electrólito de transporte	Sinal voltamétrico/nA (média ± desvio padrão)*
200	tampão acetato 0,1M pH 4,0	12,67 ± 0,36
400		20,80 ± 3,01
500		22,61 ± 1,64
600		26,64 ± 1,72
700		33,39 ± 1,82
800		34,91 ± 1,91
900		41,20 ± 1,14
1000		47,01 ± 3,23

* 3 determinações

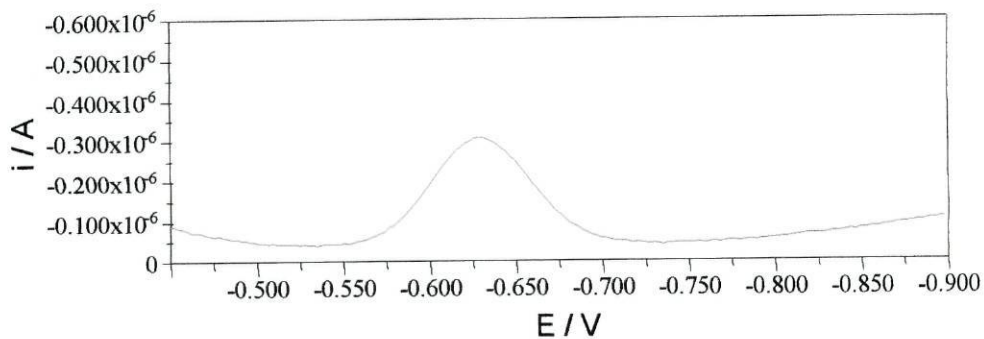


Figura 3.3 - Voltamograma obtido na análise de uma solução aquosa de SO₂, 5 ppm. Determinação em sistema de análise em fluxo com injeção de 500µL de amostra; caudal do electrólito de transporte, 1,33 ml min⁻¹; frequência de onda quadrada, 300 Hz.

Tabela 3.2 - Valores obtidos na determinação voltamétrica do SO₂ em sistema de fluxo, utilizando soluções modelo de concentrações, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, e 5 ppm

Frequência = 300 Hz ; caudal do electrólito de transporte= 1,33 mL min⁻¹

c (SO ₂)/ppm	Electrólito de transporte	Sinal voltamétrico/nA (média ± desvio padrão)*
1	tampão acetato 0,1M pH 4,0	49,17 ± 2,96
2		100,6 ± 3,5
3		150,3 ± 5,6
4		214,5 ± 5,6
5		263,3 ± 5,4
4		208,1 ± 7,9
3		153,4 ± 1,7
2		101,3 ± 2,3
1		48,07 ± 1,64

* 3 determinações

A representação gráfica dos sinais voltamétricos do dióxido de enxofre em função da concentração do composto permitiu verificar a existência de uma correlação linear entre estes dois parâmetros (figura 3.3). O sinal voltamétrico apresenta uma correlação linear razoável para a gama de concentrações entre 0 e 1000 ppb. Para concentrações superiores, entre 1 e 5 ppm verificou-se a existência de uma boa correlação linear.

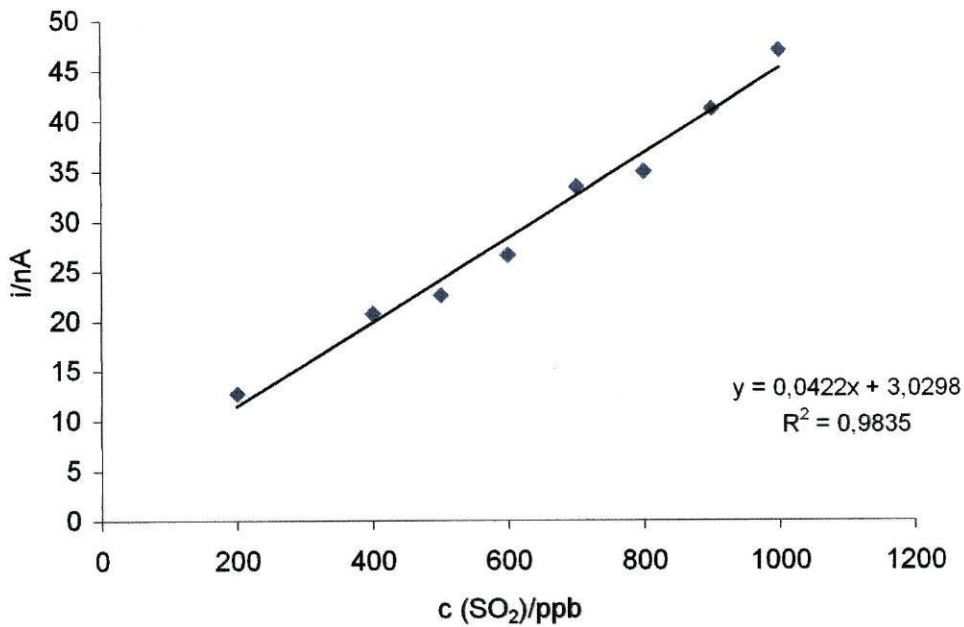
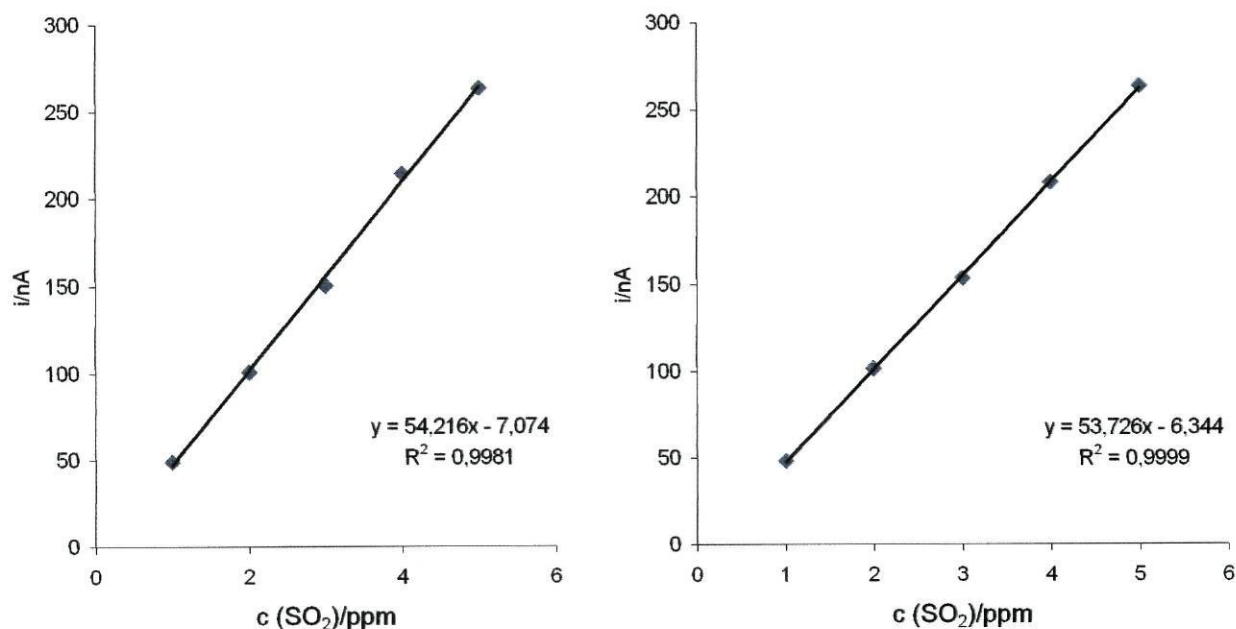


Figura 3.4. – Curva de calibração obtida para a determinação do SO₂ em solução aquosa utilizando o sistema de fluxo com injeção de 500µL de amostra; caudal do electrólito de transporte, 1,33 ml min⁻¹; frequência de onda quadrada, 300 Hz.

Para a gama de concentração de 1 a 5 ppm, as análises foram efectuadas de dois modos distintos: a) concentrações sucessivamente crescentes; b) concentrações sucessivamente decrescentes. Este procedimento visou testar o sistema de detecção de forma a avaliar se esta era afectada por efeitos de memória das análises anteriores.

Pela análise dos resultados obtidos verifica-se que o detector voltamétrico em sistema de análise em fluxo não parece ser afectado pelos ensaios anteriores.



I

Figura 3.5. – Curva de calibração obtida para a determinação do SO₂ em solução aquosa utilizando o sistema de fluxo com injeção de 500µL de amostra; velocidade do fluxo do electrólito de transporte, 1,33 ml min⁻¹; frequência de onda quadrada, 300 Hz . I) análise efectuada com injeção de soluções de concentração sucessivamente crescentes ; II) análise efectuada com injeção de soluções de concentração sucessivamente decrescentes

A representação gráfica dos sinais voltamétricos do dióxido de enxofre em função da concentração deste composto nas soluções ensaiadas permitiu confirmar a existência de uma boa correlação linear entre aqueles dois parâmetros para a gama de concentração 1ppm a 5 ppm.

O tratamento matemático dos dados experimentais obtidos na análise II, permitiu a determinação do limite de detecção para o dióxido de enxofre nas condições de análise tendo-se obtido o valor de 0,18 ppm [42].

3.3 - Estudo da influência da frequência no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre

A influência da frequência de onda quadrada no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre foi avaliada tendo em conta as condições de fluxo descritas no ponto anterior.

Este estudo foi realizado para cinco valores de frequência distintos, 200 Hz, 300 Hz, 400 Hz, 500 Hz e 600 Hz. Os ensaios foram realizados injectando no sistema uma solução modelo de SO₂, 5 ppm. Para cada valor de frequência efectuaram-se três injeções de amostra distintas, com o volume de 500 µL cada.

Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Estudo da influência da frequência no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre

c (SO ₂)= 5 ppm ; Electrólito de transporte, tampão acetato 0,1M pH 4,0	
Frequência/ Hz	Sinal voltamétrico/nA (média ± desvio padrão)*
200	214,1 ± 5,1
300	263,3 ± 5,4
400	317,8 ± 14,5
500	330,6 ± 11,1
600	364,5 ± 3,7

* 3 determinações

Nas condições de análise utilizadas, a amostra chega ao detector sem ter sido submetida a desoxigenação. No entanto, nos voltamogramas não se encontraram sinais apreciáveis da redução do O₂, o que ilustra bem a possibilidade de realizar esta determinação voltamétrica na presença de O₂, desde que a frequência de onda quadrada seja elevada. Como seria de esperar, ocorreu um aumento da intensidade do sinal voltamétrico com o aumento da

frequência aplicada; no entanto o pico voltamétrico torna-se mais largo e a linha de base pior definida quando a frequência de onda quadrada aumenta. Como escolha decidiu-se ajustar uma situação de compromisso entre um sinal mais intenso mas um pico voltamétrico mais largo. A frequência adoptada foi de 300 Hz.

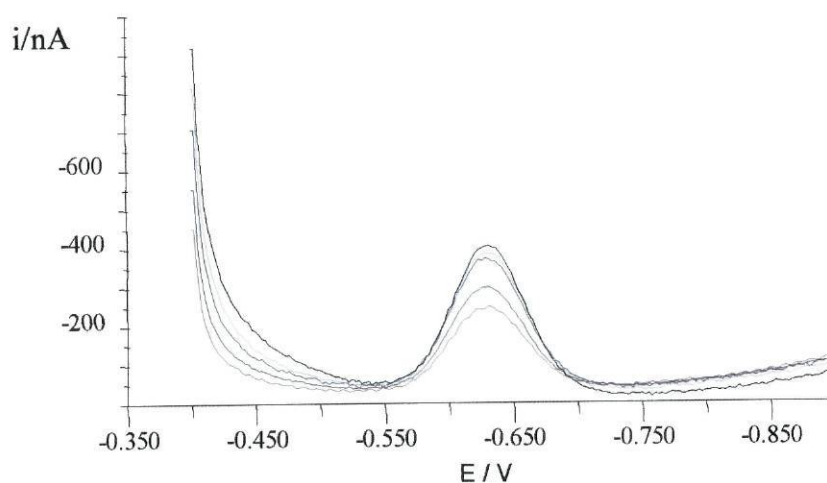


Figura 3.6 – Voltamogramas obtidos no estudo da influência da frequência de onda quadrada no sinal voltamétrico resultante da análise de uma solução aquosa de SO₂ 5 ppm, (—) 200Hz; (—) 300Hz; (—) 400Hz; (—) 500Hz; (—) 600Hz.

4 - Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em soluções aquosas integrando a técnica de pervaporação

4.1 - Introdução

4.2 - Influência do caudal da amostra no sinal analítico

4.3 – Otimização da temperatura de pervaporação do dióxido de enxofre

4.4 - Efeito do tempo de pervaporação no sinal analítico

4.5 - Influência do pH da amostra no sinal analítico do dióxido de enxofre

4.6 - Estudo do sinal voltamétrico do dióxido de enxofre em condições de acidulação em linha da solução a analisar

4.1 – Introdução

A determinação do diacetilo na cerveja é possível através de um método de análise em fluxo que envolve a separação analítica do composto da matriz, através da inclusão no sistema de um módulo de pervaporação, derivatização com solução de o-fenilenodiamina na câmara superior do módulo e detecção voltamétrica usando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Esta metodologia envolve um sistema de análise em fluxo, com recurso à automatização de válvulas que permite o funcionamento quer em modo contínuo, quer em modo descontínuo. O sistema prevê um processo consecutivo automatizado de limpeza, separação e detecção [35].

A inclusão de um passo de separação analítica utilizando uma unidade de pervaporação é essencial em muitos processos analíticos para a remoção de interferentes [14] [15].

Neste capítulo descreve-se a aplicação de um sistema em fluxo para a análise de SO_2 integrando a pervaporação como etapa de separação analítica. Este estudo iniciou-se pela optimização de vários parâmetros relacionados com a metodologia, em soluções modelo.

O sub-sistema de extracção do analito, advém da impossibilidade de determinação voltamétrica directa do dióxido de enxofre na cerveja devido a problemas associados à complexidade da matriz e interferências. A unidade de pervaporação utilizada no desenvolvimento desta metodologia é constituída por duas câmaras distintas separadas por uma membrana hidrofóbica permeável a gases (figura 4.1).

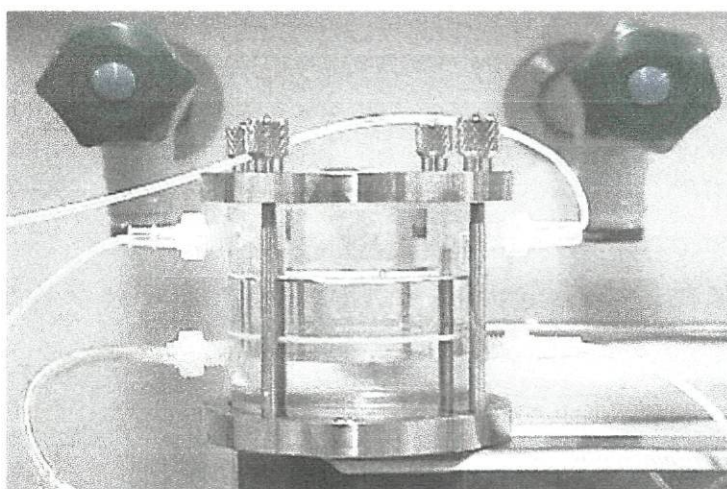


Figura 4.1 – Fotografia do módulo de pervaporação

A célula voltamétrica de fluxo utilizada é idêntica à descrita no ponto 4.2 da Parte I.

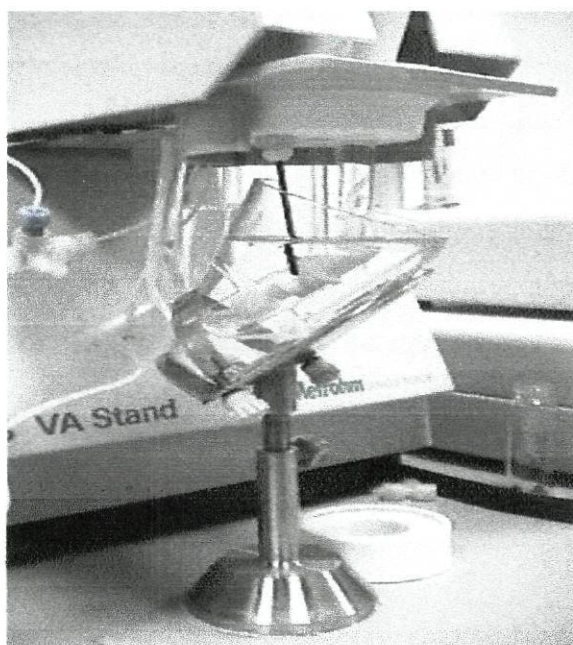


Figura 4.2 – Fotografia da célula voltamétrica de fluxo

A figura 4.3 representa esquematicamente o sistema de fluxo inicialmente utilizado neste estudo. Este sistema é composto por duas partes: a primeira correspondendo à extracção do SO₂ da solução amostra, na unidade de pervaporação, e a segunda integra a determinação voltamétrica ao nível da célula de fluxo.

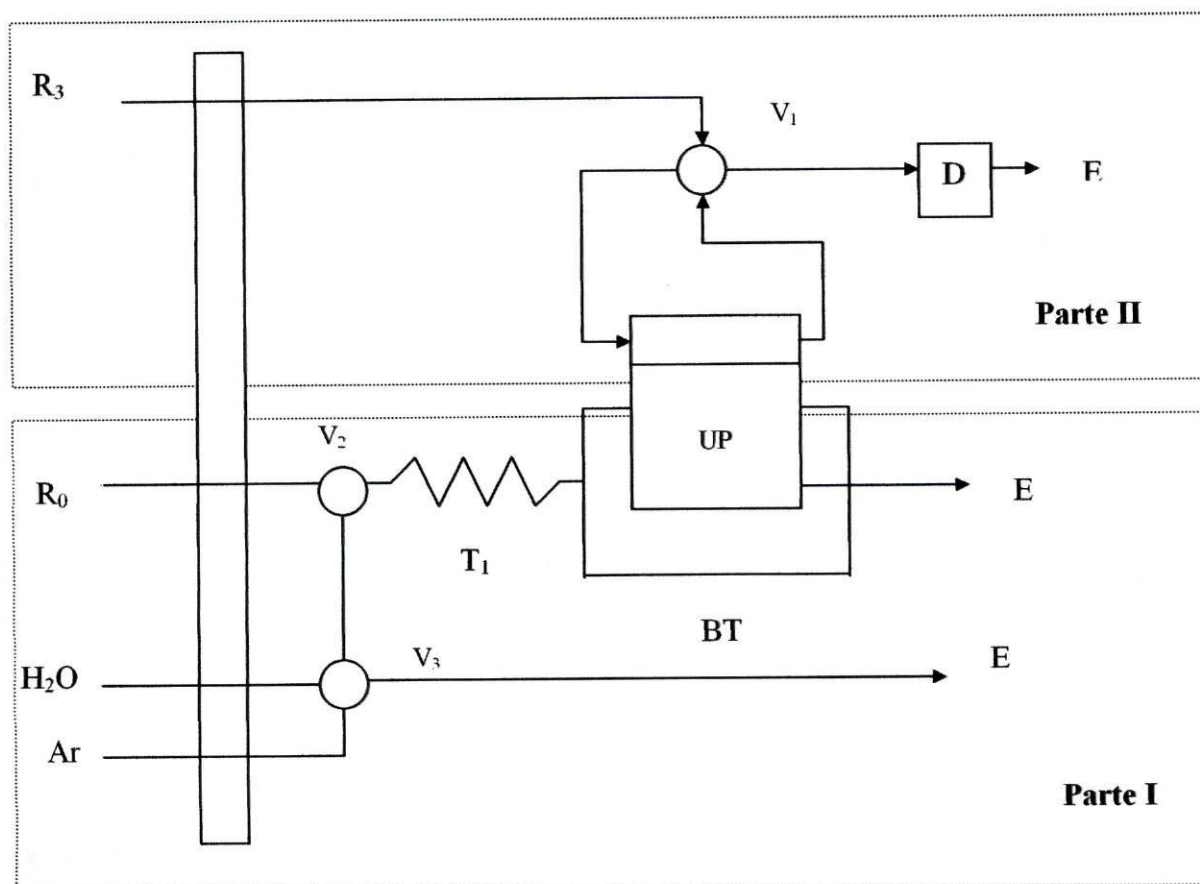


Figura 4.3 – Esquema do sistema de injeção em fluxo: D – Detector voltamétrico; UP – Unidade de pervaporação; BT, Banho termostático; T₁– tubo de reacção, 50 cm; V₁, válvula de injeção manual; V₂ e V₃ , válvulas controladas pelo sistema automático; R₀– Amostra ou solução-modelo; R₃ –Electrólito de transporte, Tampão acetato 0,1 M pH 4,0 (1,33mLmin⁻¹); E – Esgoto.

Impulsionada pela bomba peristáltica, a solução-amostra é movimentada através do sub-sistema inferior (aquele que alimenta a câmara inferior do módulo de pervaporação). Essa solução é direccionada para a câmara inferior do módulo de pervaporação que se encontra inserido parcialmente num banho termostático. Ao atravessar a câmara inferior da unidade de pervaporação, a solução forma um filme contínuo facilitando a libertação do analito. O SO_2 liberado da solução atravessa a membrana hidrofóbica e é capturado pela solução aceitadora que percorre a câmara superior do módulo. Movendo a válvula V_1 , é possível manter a solução aceitadora retida durante um certo intervalo de tempo na câmara superior do módulo, promovendo-se, assim, acumulação do SO_2 nessa solução aceitadora e aumentando-se a sensibilidade do método. Após decorrer um certo intervalo de tempo de pervaporação, a válvula V_1 é colocada na posição de injeção e a solução aceitadora é levada para o detector, onde é feita a detecção voltamétrica. O movimento simultâneo e sincronizado das válvulas V_2 e V_3 , vai permitir a limpeza da câmara inferior do módulo de pervaporação. O processo de limpeza foi conseguido através da passagem alternada de ar e água na câmara inferior da unidade de pervaporação. Refira-se, no entanto, que na optimização do processo de amostragem suprimiu-se todo o processo de limpeza da câmara inferior com água e ar sendo aquela efectuada pela própria solução a analisar. Assim, a solução amostra ao percorrer a câmara inferior da unidade de pervaporação procede à limpeza da mesma, iniciando-se a análise assim que se verifique a estabilização do sinal analítico. Verificou-se experimentalmente que o intervalo de tempo necessário para a estabilização do sinal quando se inicia a análise a uma nova solução é de cerca de 5 min. Com esta alteração simplificou-se significativamente o sistema de injeção em fluxo, evitando-se o controlo automático de abertura e fecho de válvulas. As válvulas V_2 e V_3 foram suprimidas.

No intervalo entre injeções, a cabeça da célula de fluxo é automaticamente limpa pelo electrólito de transporte, que permanentemente a atravessa. Para cada determinação uma nova gota de mercúrio é dispensada.

Os estudos realizados tiveram como objectivo optimizar as seguintes variáveis: a) caudal da amostra na câmara inferior; b) temperatura do banho onde se encontra inserido o módulo de pervaporação; c) tempo de pervaporação.

4.2 - Influência do caudal da amostra no sinal analítico

O estudo do processo de separação analítica usando um módulo de pervaporação, necessita da avaliação das variáveis associadas às condições dinâmicas do sistema, nomeadamente, o caudal da amostra que transporta o analito a pervaporar. O caudal da amostra até à câmara de pervaporação, tem grande influência no desempenho do sistema, na medida em que, determina o tempo durante o qual a solução a analisar permanece no módulo de pervaporação.

Com este estudo pretendeu-se avaliar a influência do caudal da amostra no sinal analítico obtido. O gráfico da figura 4.4 traduz os resultados obtidos na análise de uma solução de SO₂ de concentração 10 ppm, preparada em meio acetato 0,1 M pH 3,5 e movimentada no sistema de fluxo a diferentes velocidades.

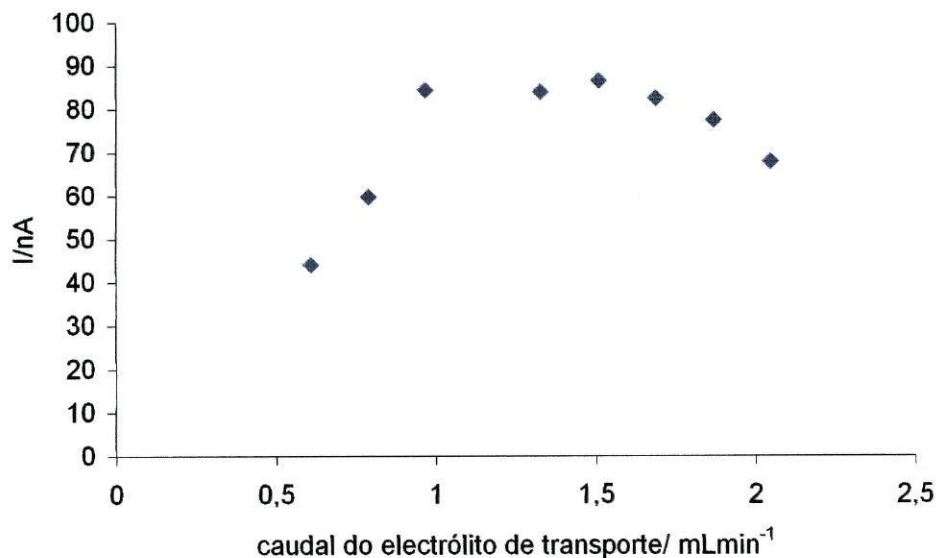


Figura 4.4. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função do caudal da amostra. Pervaporação de uma solução 10 ppm em SO₂, em tampão acetato 0,1M pH 3,5; temperatura do banho, 70°C; tempo de pervaporação, 300s; electrólito de transporte, tampão acetato 0,1 M pH 4,0.

De acordo com os resultados obtidos determinou-se que um valor de velocidade do fluxo transportador dador compreendido entre 1,00 mL/min e 1,50 mL/min podia ser considerado óptimo no que diz respeito à eficiência do processo de pervaporação.

Por outro lado, e atendendo que o caudal na câmara superior foi pré-definido de acordo com estudos anteriormente desenvolvidos [34], a selecção de valores elevados do caudal da amostra em relação ao caudal da solução aceitadora conduz a tempos de residência da amostra reduzido, baixo nível de eficiência no processo de transferência de massa e aumento do grau de dispersão do analito na solução de eluente acarretando uma diminuição na altura do pico voltamétrico. Um bom nível de desempenho da unidade de pervaporação verifica-se quando o caudal dador e aceitador se aproxima estabelecendo-se um compromisso entre o tempo de permanência da amostra na câmara dadora, os níveis de eficiência do transporte de massa através da membrana e a altura do pico voltamétrico.

4.3 - Optimização da temperatura de pervaporação do dióxido de enxofre

Para o estudo do efeito da temperatura do banho, onde se encontra inserido o módulo de pervaporação, na extracção de SO₂, realizaram-se dois conjuntos de ensaios distintos: no primeiro preparou-se uma solução aquosa de SO₂, 8 ppm em meio acetato 0,1 M pH 3,5 que foi bombeada para a câmara de pervaporação, termostaticada a diferentes temperaturas, 40°C, 60°C, 80°C e 90°C. O intervalo de tempo de pervaporação foi de 320 s. No segundo conjunto de ensaios, prepararam-se soluções aquosas de SO₂ em meio acetato 0,1 M pH 3,5, de concentração, 1 ppm, 5 ppm, 8 ppm, 12 ppm e 20 ppm, que foram bombeadas para a unidade de pervaporação termostaticada a 40°C, 60°C e 80°C e sujeitas a um tempo de pervaporação de 320 s. O método de volatilização baseou-se na captura de SO₂ numa solução tampão de acetato de sódio 0,1 mol dm⁻³, pH 4,0, na câmara superior do módulo de pervaporação. As figuras 4.6 e 4.7, ilustram os resultados obtidos.

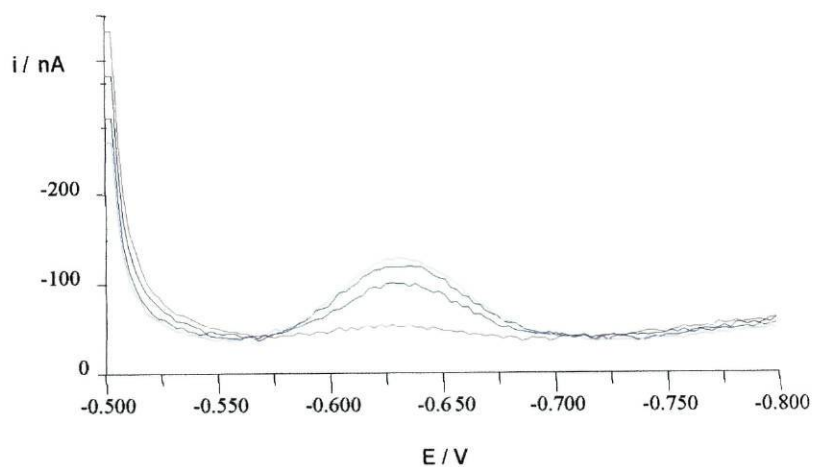


Figura 4.5. – Voltamogramas obtidos no estudo da influência da temperatura do banho no sinal voltamétrico do SO_2 resultante da pervaporação durante 320 s de uma solução de SO_2 , 8 ppm, em meio acetato 0,1M pH 3,5, a diferentes temperaturas do banho termostático, () 40°C; () 60°C, () 80°C; () 90°C.

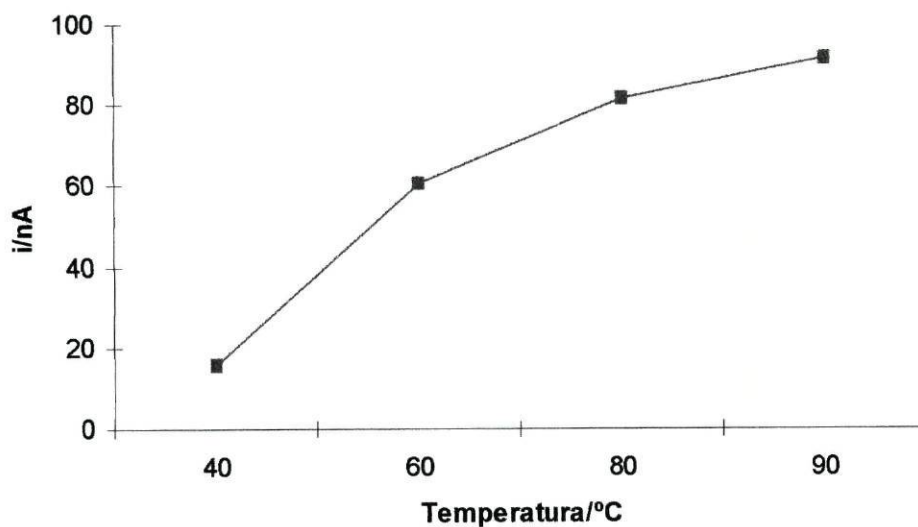


Figura 4.6 – Representação gráfica da intensidade de corrente em função da temperatura do banho. Os sinais voltamétricos obtidos resultam da pervaporação, durante 320 s, de uma solução aquosa de SO_2 , 8 ppm, a diferentes temperaturas do banho termostático, 40°C, 60°C, 80°C e 90°C.

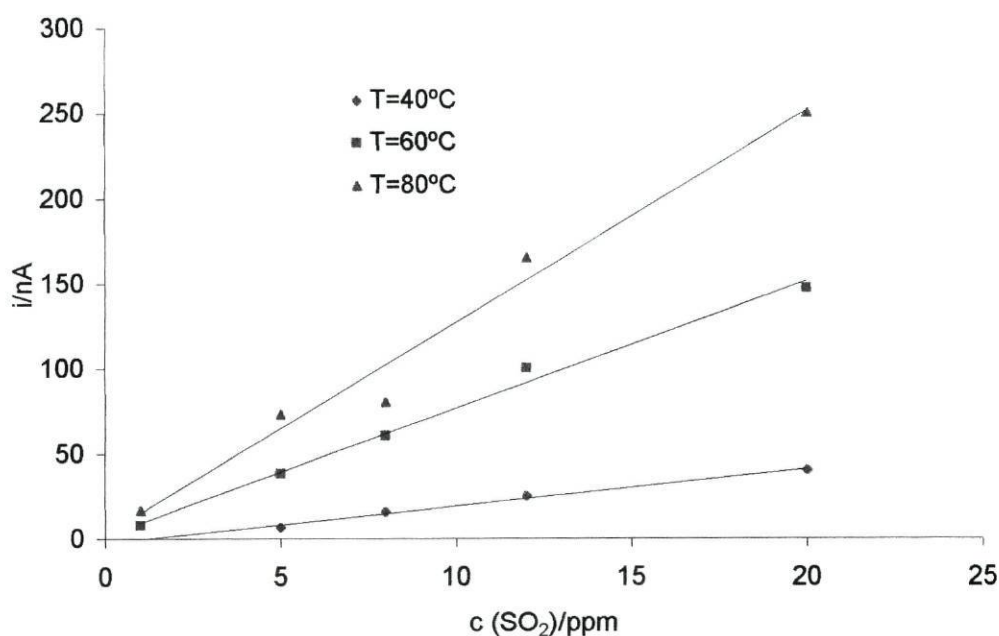


Figura 4.7. – Curvas de calibração para o SO₂ em meio acetato 0,1 M pH 3,5, resultantes de pervaporação durante 320 s, a diferentes temperaturas do banho termostático, 40°C, 60°C e 80°C.

Tabela 4.1 – Parâmetros referentes às curvas de calibração representadas no gráfico

Temperatura(°C)	Declive(nA/ppm)	Ordenada na origem/nA	Coefficiente de correlação linear
40	2,197	-2,658	0,990
60	7,457	2,226	0,992
80	12,441	2,675	0,978

Da análise dos resultados obtidos verifica-se um aumento do sinal analítico com a temperatura. Os resultados podem ser interpretados como reflectindo o aumento da velocidade de libertação do composto volátil e o aumento da difusão através da membrana de pervaporação com a temperatura. Tal facto, acontece devido a uma maior transferência de massa através da membrana, como resultado de um aumento da pressão de vapor no interior da câmara de pervaporação. Este estudo não foi alargado a temperaturas superiores a 90° C pois estudos anteriormente realizados neste laboratório [34] permitiram concluir que estes níveis de temperatura não são recomendáveis por provocarem uma rápida degradação da membrana de pervaporação, por aumentarem a formação de bolhas gasosas na câmara superior e induzirem a formação de espuma na câmara inferior quando se analisa cerveja.

4.4 - Efeito do tempo de pervaporação no sinal analítico

O tempo de pervaporação está associado com o volume de amostra que atravessa a câmara inferior do módulo de pervaporação, mantendo-se retida na câmara superior a solução do electrólito aceitador. Neste estudo verificou-se a influência daquele parâmetro no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre. Assim, foram preparadas soluções com duas concentrações diferentes em meios distintos: solução A, solução de SO₂, 10 ppm, preparada em meio acetato 0,1M pH 4,0; solução B, solução de SO₂, 20 ppm, preparada em meio acetato 0,1M pH 3,5. As soluções foram submetidas a pervaporação à temperatura de 70°C durante diferentes intervalos de tempo, 3 min, 5min, 8 min, 10 min e 12 min. Na câmara superior passava uma solução tampão acetato 0,1M pH 4,0 que arrastava o analito até ao detector. Os resultados obtidos para as duas soluções analisadas estão representados no gráfico da figura 4.8.

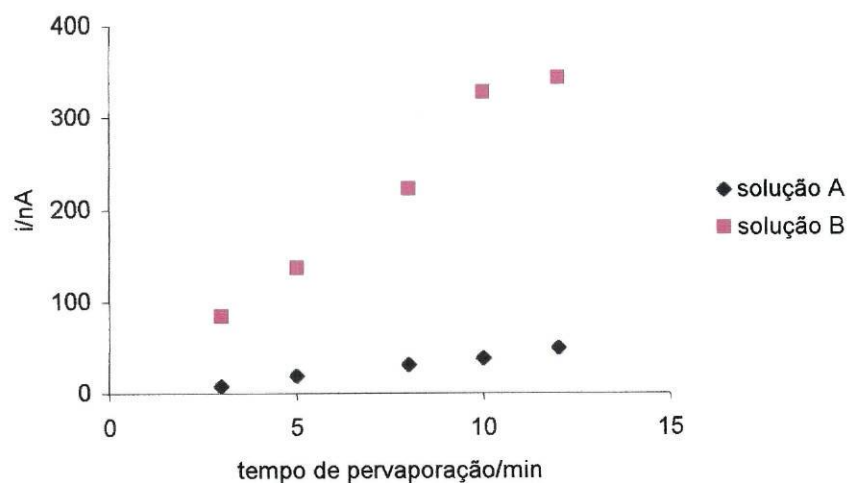


Figura 4.8. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função do tempo de pervaporação. Os sinais voltamétricos obtidos são resultantes da pervaporação de uma solução de SO_2 a 70°C e a diferentes intervalos de tempo de pervaporação, 3 min, 5 min, 8 min, 10 min e 12 min; solução A, 10 ppm de SO_2 em meio acetato 0,1 M pH 4,0; solução B, 20 ppm de SO_2 em meio acetato 0,1M pH 3,5.

A representação gráfica do sinal voltamétrico do dióxido de enxofre em função do tempo de pervaporação para as duas soluções preparadas permitiu verificar a existência de uma correlação entre estes dois parâmetros, que aparenta ser linear.

4.5 - Influência do pH da amostra no sinal analítico do dióxido de enxofre

Atendendo ao equilíbrio ácido-base do ião sulfito em solução aquosa e conseqüente variação das concentrações relativas das espécies envolvidas no mesmo, que se traduz num aumento da fracção da espécie SO_2 para valores de pH inferiores a 4,0, procedeu-se ao estudo da influência do pH da solução de sulfito no sinal voltamétrico.

Este estudo foi realizado para três soluções de SO_2 de concentração de 15 ppm em tampão acetato 0,1 M, com valores de pH distintos, respectivamente, 3,5, 4,0 e 4,5. Numa

segunda fase do estudo, para avaliar a linearidade da resposta analítica, ensaiaram-se quatro concentrações distintas de dióxido de enxofre na solução a pervaporar, respectivamente, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm e 20 ppm, em meio acetato, 0,1M, pH 4,0.

Tabela 4.2. – Valores obtidos no estudo do efeito do pH da solução de dióxido de enxofre no sinal voltamétrico

T(banho) = 70°C ; t(per) = 300s;

Electrólito de transporte na câmara superior: tampão acetato 0,1M pH 4,0;

c (SO₂) = 15 ppm

pH da solução	Sinal voltamétrico/nA
3,5	110,1
4,0	34,47
4,5	36,18

Tabela 4.3. – Valores dos sinais voltamétricos obtidos resultantes da pervaporação de soluções de dióxido de enxofre em meio acetato 0,1M, pH 4,0.

T(banho) = 70°C ; t(per) = 300s;

Electrólito de transporte na câmara superior: tampão acetato 0,1M pH 4,0.

c (SO ₂)/ppm	Sinal voltamétrico/nA
5	10,92
10	24,76
15	34,30
20	43,36

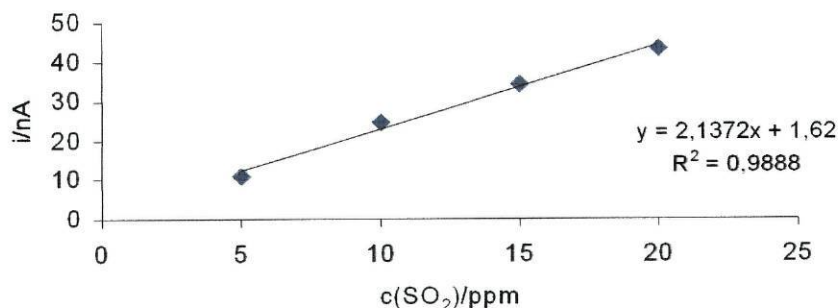


Figura 4.9 – Curva de calibração para soluções modelo de SO₂ em meio acetato 0,1M pH 4,0, sujeitas a pervaporação a 70°C e durante 300 s, velocidade do fluxo dador e aceitador, 1,33 mL/min, electrólito de transporte, tampão acetato 0,1M pH 4,0.

Ensaíram-se ainda, três soluções de SO₂, 5 ppm, em três meios diferentes: meio acetato 0,1 M pH 3,5, meio acetato 0,1 M pH 4,0 e meio clorídrico pH 1. Os resultados obtidos estão ilustrados nos voltamogramas da figura 4.10.

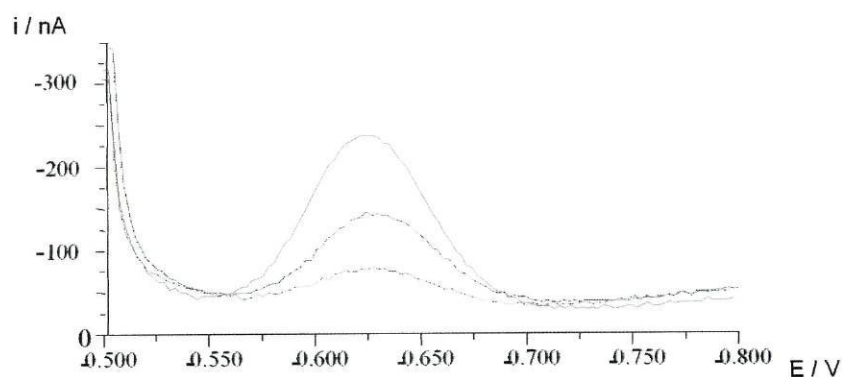


Figura 4.10 – Voltamogramas obtidos no estudo do efeito do pH da solução de SO₂ no sinal voltamétrico. Valores obtidos a partir da pervaporação de soluções de SO₂, 5 ppm, em três meios distintos, a 70°C durante 300 s, ____ pH = 4,0; ____ pH = 3,5; ____ pH = 1

De acordo com os resultados obtidos neste estudo e atendendo ao incremento do sinal analítico aquando da diminuição do pH da solução de sulfito, optou-se por acidular a solução em linha evitando assim possíveis perdas de SO_2 durante a análise e contribuindo para a simplificação da metodologia.

A alteração introduzida no sistema traduz-se na adição em linha de uma solução ácida (HCl) que misturada com a solução aquosa de sulfito, no reactor T_1 , permita que o HSO_3^- seja quantitativamente convertido na forma volátil, SO_2 .

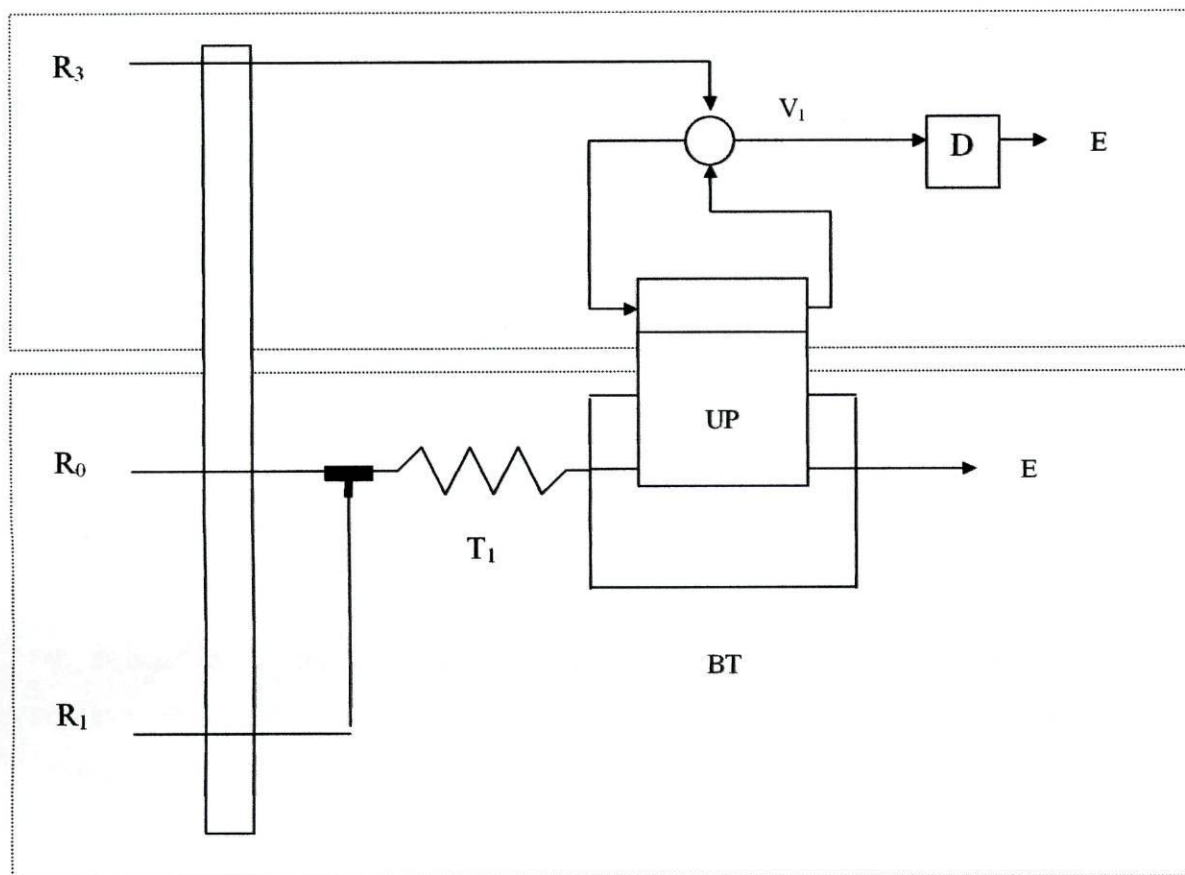


Figura 4.11 – Esquema do sistema de injeção em fluxo: D – Detector voltamétrico; UP – Unidade depervaporação; BT– Banho termostático; T_1 – tubo de reacção, 50 cm; V_1 , válvula de injeção manual; R_1 –Solução aquosa do ácido adicionado em linha ($1,33 \text{ mLmin}^{-1}$); R_0 –Amostra ou solução-modelo ($1,33 \text{ mLmin}^{-1}$); R_3 –Electrólito de transporte, Tampão acetato 0,1 M pH 4,0 ($1,33 \text{ mLmin}^{-1}$); E – Esgoto.

O aumento significativo da sensibilidade do método quando se diminui o pH da solução a analisar, permitiu analisar esta de modo contínuo. Deste modo, não é efectuada acumulação do analito na solução aceitadora da câmara superior. Nesta nova configuração, o electrólito de transporte percorria continuamente a câmara superior e a análise era feita em contínuo. Para tal manteve-se a válvula de injeção manual, V_1 , em posição “aberta”. Para concentrações mais baixas, a realização de acumulação continuou no entanto a ser possível e necessária.

4.6 - Estudo do sinal voltamétrico do dióxido de enxofre em condições de acidulação em linha da solução a analisar

A concentração do ácido clorídrico a utilizar, 0,4 M, foi seleccionada de modo a permitir que em T_1 a solução mistura adquirisse um pH que permitisse a conversão quantitativa do ião hidrogenossulfito em dióxido de enxofre de acordo com os resultados obtidos no estudo anterior e atendendo ao facto de que na mistura em linha da solução-amostra com o ácido decorre uma diluição de aproximadamente 1:1. Outro factor considerado relacionou-se com o tempo necessário para que ocorresse a conversão quantitativa do sulfito a SO_2 uma vez que este parâmetro está relacionado com o caudal e este já havia sido definido. Assim, para avaliar a linearidade da resposta analítica quando se adiciona em linha uma solução de HCl 0,4 M, prepararam-se três soluções aquosas de SO_2 com diferentes concentrações, respectivamente, 1 ppm, 3 ppm e 5 ppm que foram sujeitas a pervaporação a $90^\circ C$ durante 360 s, sendo o analito recolhido em tampão acetato 0,1M pH 4,0.

A representação gráfica dos sinais voltamétricos do SO_2 obtidos na análise das soluções preparadas em função da concentração permitiu verificar a existência de uma boa correlação linear entre estes dois parâmetros (figura 4.11), quando é efectuada acidulação em linha com HCl 0,4 M.

O tratamento matemático dos dados experimentais permitiu a determinação do limite de detecção para o dióxido de enxofre nas condições de análise tendo-se obtido o valor de 0,35 ppm [42].

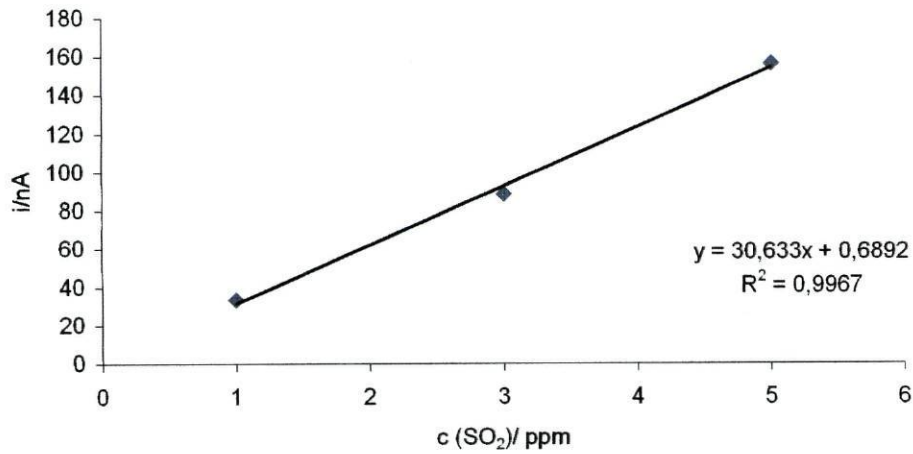


Figura 4.12 – Curva de calibração para soluções aquosas de SO_2 de concentração 1ppm, 3 ppm, 5 ppm, aciduladas em linha com solução aquosa de HCl 0,4 M e sujeitas a pervaporação a 90°C durante 360s; velocidade do fluxo dador e aceitador, 1,33 mL/min, electrólito de transporte, tampão acetato 0,1M pH 4,0.

A metodologia aplicada mostrou-se, assim, adequada para a separação em linha e quantificação do SO_2 em soluções modelo.

5 – Desenvolvimento da metodologia para a determinação em fluxo de dióxido de enxofre em cerveja integrando a técnica de pervaporação

- 5.1 - Introdução
 - 5.2 - Efeito da presença de etanol no sinal analítico
 - 5.3 - Influência do teor em acetaldeído na determinação do dióxido de enxofre
 - 5.4- Estudo da capacidade do acetaldeído para sofrer pervaporação nas condições de análise em fluxo do dióxido de enxofre
 - 5.5 - Estratégia para a remoção do acetaldeído em soluções modelo binárias de dióxido de enxofre e acetaldeído
 - 5.6 - Optimização das condições de meio ácido adicionado em linha para análise em fluxo da cerveja
 - 5.7 - Optimização das condições de meio alcalino conducentes a uma hidrólise quantitativa dos aductos em cerveja
 - 5.8 - Efeito do tempo de pervaporação no sinal analítico
-

5.1 - Introdução

No desenvolvimento deste sistema de análise em fluxo para a determinação voltamétrica de dióxido de enxofre em cerveja, envolvendo a conversão do analito a SO_2 , pervaporação usando uma membrana hidrofóbica de Teflon e recolha num fluxo de tampão acetato 0,1 M pH 4,0 foram estudados vários aspectos relacionados com a presença de interferentes presentes na matriz, as condições de meio ácido para a evolução do SO_2 e o tempo de pervaporação.

5.2 - Efeito da presença de etanol no sinal analítico

Uma vez que a cerveja é uma solução alcoólica, a avaliação da influência do etanol no processo de pervaporação e acumulação do dióxido de enxofre na solução, que integra o fluxo transportador da câmara superior da unidade de pervaporação até ao detector, carece de estudo, devido ao facto do etanol ser volátil e, como tal, será de esperar que seja co-pervaporado com o analito. Pretendeu-se assim, verificar se a presença de etanol numa solução-modelo de sulfito influenciava o processo de pervaporação do SO₂ e o respectivo sinal analítico.

Este estudo foi realizado para soluções aquosas de SO₂ com concentrações de 8 ppm, 10 ppm, 15 ppm e 20 ppm em meio etanólico 5% v/v, de forma a simular a percentagem de etanol existente na cerveja. Simultaneamente fez-se a análise de soluções aquosas de SO₂ com concentrações de 8 ppm, 10 ppm, 15 ppm e 20 ppm, para comparação de resultados.

A concentração do ácido clorídrico adicionado em linha para a conversão quantitativa do sulfito em SO₂ foi de 0,4 M. A análise foi efectuada em contínuo e a temperatura de pervaporação foi de 90°C.

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5.1.e o tratamento gráfico encontra-se registado na figura 5.1.

Tabela 5.1. – Valores obtidos no estudo comparativo da eficiência da pervaporação do SO₂ em solução aquosa e em solução etanólica

[HCl]_{linha} = 0,4 M ; T(per) = 90°C ;

Electrólito de transporte na câmara superior = tampão acetato 0,1M pH4,0

c (SO ₂) /ppm	Sinal voltamétrico do analito /nA (média ± desvio padrão)*	
	Solução aquosa	Solução etanólica
8	18,16 ± 0,31	55,91 ± 3,51
10	20,10 ± 1,55	70,28 ± 2,12
15	28,98 ± 0,89	113,5 ± 4,4
20	40,35 ± 1,04	139,6 ± 3,4

* 6 determinações

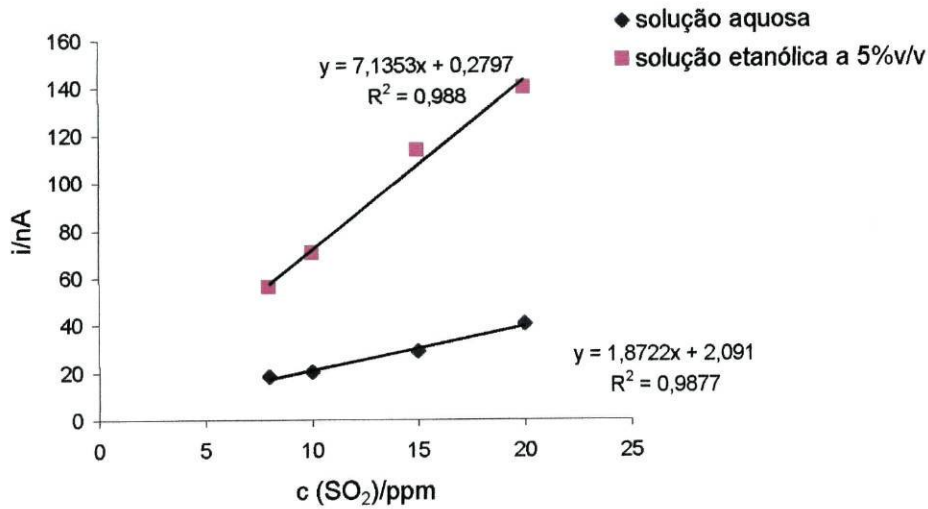


Figura 5.1 - Representação gráfica dos valores médios dos sinais voltamétricos do SO₂ nas condições da tabela 5.1.

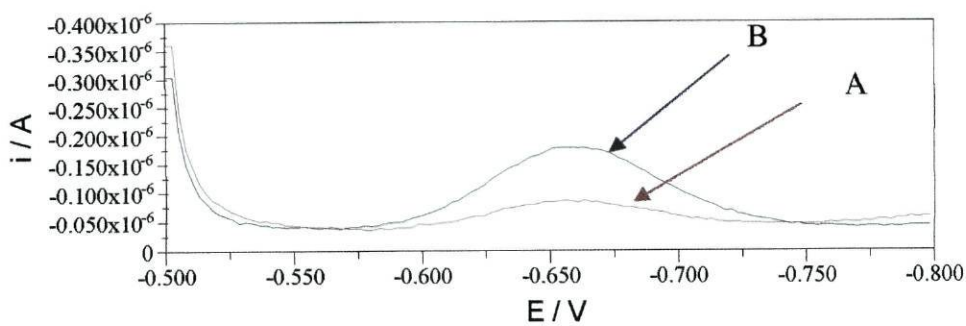


Figura 5.2 – Voltamogramas obtidos na presença (B) e ausência (A) de etanol, resultantes da pervaporação de uma solução 20 ppm de SO₂: A, solução aquosa; B, solução etanólica a 5% (v/v).

A partir dos resultados obtidos para os ensaios realizados em meio aquoso e em meio água/etanol, 5% (v/v) podemos concluir que o álcool ajuda à extração do SO₂ da solução-amostra, contribuindo assim, para uma maior eficiência do processo de pervaporação.

Perante estas novas condições de operação, ensaiou-se de novo a influência da temperatura de pervaporação no sinal analítico, mas nas condições estabelecidas: adição do ácido em linha, solução de dióxido de enxofre em meio etanólico a 5% (v/v) e pervaporação em modo contínuo. Os resultados obtidos estão ilustrados na tabela 5.2.

Tabela 5.2. – Valores obtidos no estudo da eficiência da pervaporação do SO₂, a partir de uma solução 20 ppm em meio etanólico a 5% (v/v), a diferentes temperaturas do banho termostático.

[HCl]_{linha} = 0,4 M;

Electólito de transporte na câmara superior = tampão acetato 0,1M pH 4,0

c (SO ₂) /ppm	Temperatura/°C	Sinal voltamétrico* /nA (média ± desvio padrão)*
20	60	20,11 ± 0,84
	70	36,95 ± 1,26
	80	84,53 ± 3,91
	90	139,6 ± 3,3

* 6 determinações

Uma análise comparativa dos dois estudos efectuados, para avaliar a influência da temperatura de pervaporação no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre, permite inferir que a sensibilidade do método aumenta com o aumento da temperatura de pervaporação, a presença de etanol e a adição do ácido em linha actuam como co-adjuvantes no processo de pervaporação.

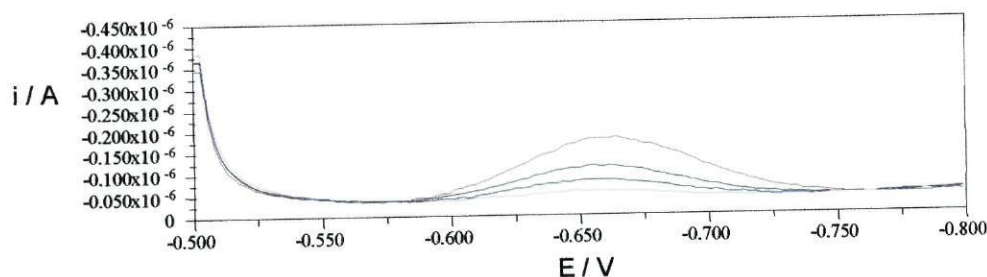


Figura 5.3 – Voltamogramas obtidos no estudo da influência da temperatura do banho termostático no sinal voltamétrico do SO_2 resultante da pervaporação de uma solução, 20 ppm, em meio etanólico a 5% v/v : (—) 60°C; (—) 70°C; (—) 80°C; (—) 90°C.

De seguida, procedeu-se ao estudo da influência da concentração do ácido clorídrico, adicionado em linha, no sinal voltamétrico do SO_2 tendo em conta as novas condições de meio da solução dadora e o modo de análise em contínuo. Assim, ensaiou-se uma solução 20 ppm em SO_2 , meio etanólico 5% (v/v), que foi bombeada para o sistema e acidulada em linha através da confluência com uma solução de ácido clorídrico. As concentrações de ácido clorídrico estudadas foram: 0,1M, 0,4 M, 0,7M, 1,1 M e 1,4 M. A solução-mistura foi sujeita a pervaporação em unidade de pervaporação termostaticada a 90°C e o analito recolhido numa solução de tampão acetato 0,1M pH 4,0.

Os resultados obtidos estão representados no gráfico da figura 5.4. e revelam um incremento no sinal analítico do dióxido de enxofre com o aumento da concentração do ácido adicionado em linha. No entanto, parece atingir-se um nível de concentração do ácido para o qual a conversão do sulfito na forma volátil é máxima deixando de aumentar o sinal a partir daí, como se depreende do gráfico.

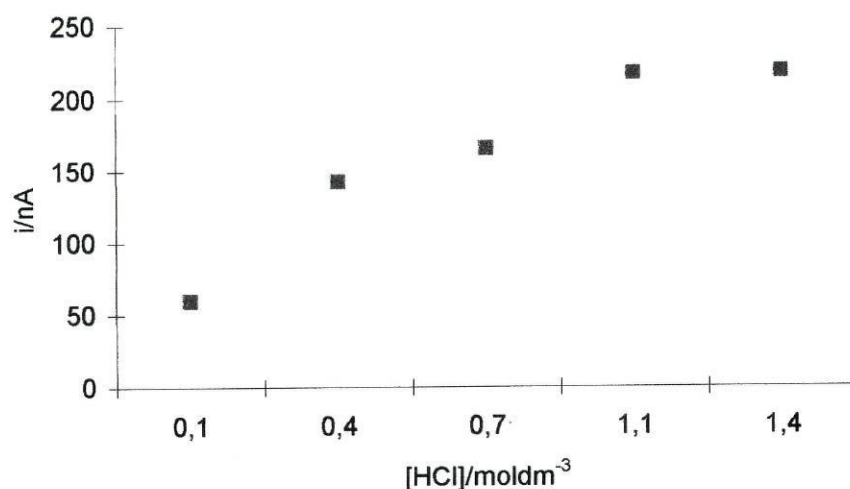


Figura 5.4. – Representação gráfica da intensidade de corrente em função da concentração do ácido clorídrico adicionado em linha. Pervaporação de uma solução de SO₂, 20 ppm, em meio etanólico, a 5% (v/v).

5.3 - Influência do teor em acetaldeído na determinação do dióxido de enxofre

Para além do etanol, a cerveja contém compostos carbonilo como o acetaldeído. Conforme se referiu na primeira parte, a elevada reactividade deste composto para com o anião hidrogenossulfito fez com que se tivesse estudado a influência do acetaldeído na determinação em fluxo do dióxido de enxofre em soluções modelo.

Para este estudo, prepararam-se cinco soluções de sulfito, $3,1 \times 10^{-4}$ M em meio etanólico (5% v/v), contendo cada uma delas, respectivamente, uma concentração de acetaldeído de $0,77 \times 10^{-5}$ M, $1,5 \times 10^{-4}$ M, $3,1 \times 10^{-4}$ M e $6,2 \times 10^{-4}$ M. Estas soluções foram ensaiadas em modo contínuo, nas condições indicadas na tabela 5.3.

Refira-se que os níveis de concentração de sulfito testados são aproximados aos existentes na cerveja. O aumento da concentração de acetaldeído, traduzir-se-à num aumento do SO₂ ligado e diminuição do SO₂ livre.

Os resultados obtidos e o respectivo tratamento gráfico estão representados, respectivamente, na tabela 5.3 e no gráfico da figura 5.5.

Tabela 5.3. – Valores obtidos no estudo da variação do sinal voltamétrico do SO₂ provocada pela adição de acetaldeído a soluções aquosas de SO₂

[HCl]_{linha} = 1,4 M ; T(perv)=90°C; t(perv) = 0s ;
 Electrólito de transporte na câmara superior = tampão acetato 0,1M pH 4,0

[acetaldeído]/M	[SO ₂]/M	razão molar [acetaldeído]/[SO ₂]	Sinal voltamétrico/nA
0	3,1x10 ⁻⁴ (20 ppm)	0:1	219,1
7,7x10 ⁻⁵ (3 ppm)		0,25:1	166,9
1,5x10 ⁻⁴ (6 ppm)		0,5:1	117,2
3,1x10 ⁻⁴ (12 ppm)		1:1	29,0
6,2x10 ⁻⁴ (24 ppm)		2:1	12,38

Interpretando os resultados obtidos, pode-se inferir que o aducto que se forma entre o hidrogenossulfito e o acetaldeído vai impedir a pervaporação do SO₂. Por outro lado, e apesar de a pH inferior a 2, a estabilidade do aducto ser reduzida, dada a fraca capacidade de SO₂.H₂O como nucleófilo, a reacção entre o sulfito e o acetaldeído para a gama de concentrações estudada é extensa, bastando duplicar a concentração de acetaldeído em relação à de sulfito para converter 94,3% do sulfito na forma de aducto.

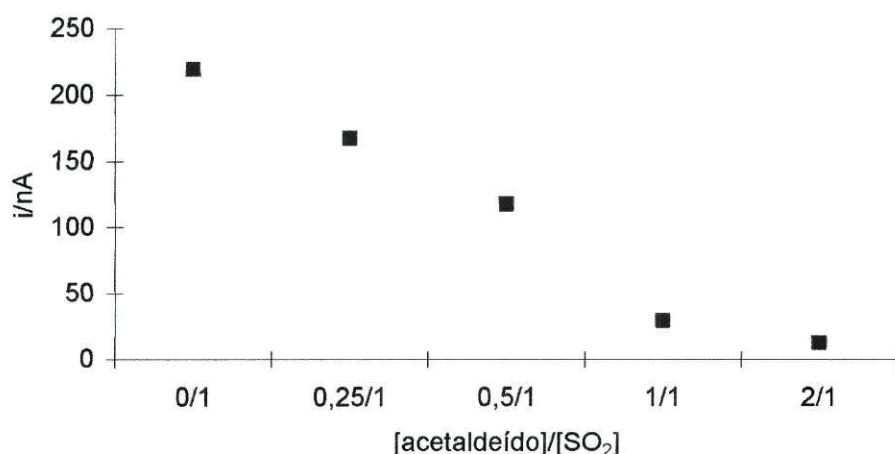


Figura 5.5. – Representação gráfica do sinal voltamétrico do SO₂ em função da razão molar [acetaldeído]/[SO₂]. Os valores obtidos resultam da análise no sistema de fluxo de soluções binárias de sulfito e acetaldeído, nas quais se incrementou sucessivamente a concentração de acetaldeído.

De forma a compreender melhor este fenómeno, avaliou-se a cinética de formação do aducto nas condições de análise. Para tal prepararam-se quatro soluções de SO₂ em meio etanólico a 5% (v/v) de concentrações, respectivamente, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm e 20 ppm. As soluções foram submetidas a pervaporação nas condições indicadas na tabela 5.4. O parâmetro alterado foi a composição da solução do electrólito de transporte na câmara superior. Numa primeira situação, o SO₂ foi capturado em tampão acetato 0,1M pH 4,0. Numa segunda fase do estudo, uma solução de acetaldeído 20 ppm em meio acetato 0,1M pH 4,0, actuava como electrólito de transporte (R₃).

Os resultados obtidos estão esquematizados na tabela 5.4.

Tabela 5.4. – Valores obtidos no estudo da cinética da reacção de formação do aducto hidrogenossulfito-acetaldeído

$[HCl]_{linha} = 0,4 M ; T(perv) = 90^{\circ}C;$

velocidade do fluxo do electrólito de transporte = $1,33 mLmin^{-1}$

c (SO ₂)/ppm em solução etanólica a 5%	Electrólito de transporte	Sinal voltamétrico/nA (média ± desvio padrão)*
5	tampão acetato 0,1M pH 4,0	38,99 ± 2,08
	Solução de acetaldeído 20 ppm em meio acetato 0,1M pH 4,0	17,44 ± 1,00
10	tampão acetato 0,1M pH 4,0	68,24 ± 0,67
	Solução de acetaldeído 20 ppm em meio acetato 0,1M pH 4,0	17,57 ± 0,58
15	tampão acetato 0,1M pH 4,0	100,8 ± 1,8
	Solução de acetaldeído 20 ppm em meio acetato 0,1M pH 4,0	23,41 ± 1,63
20	tampão acetato 0,1M pH 4,0	140,5 ± 3,0
	Solução de acetaldeído 20 ppm em meio acetato 0,1M pH 4,0	36,48 ± 1,71

* 4 determinações

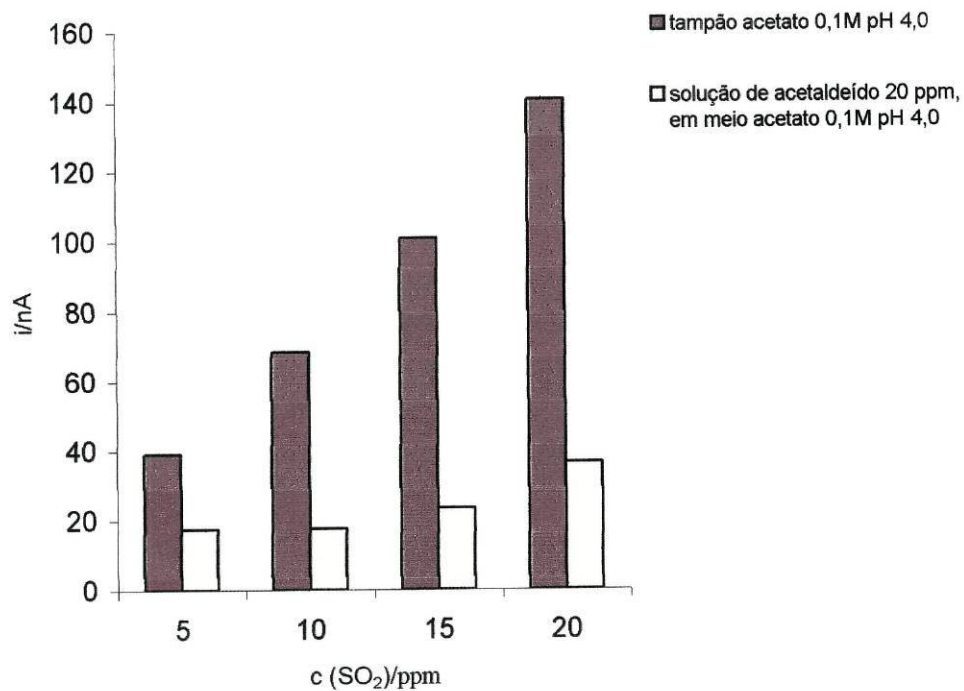


Figura 5.6. – Perfil da variação da intensidade da corrente resultante da análise de uma solução de SO_2 , na presença e na ausência de acetadeído.

Os resultados dos ensaios demonstram que o intervalo de tempo que decorre entre a captação do analito na solução da câmara superior do módulo de pervaporação e a chegada dessa solução ao detector é suficiente para a formação do aducto entre o hidrogenossulfito e o acetaldeído, afectando assim o sinal voltamétrico obtido.

5.4 - Estudo da capacidade do acetaldeído para sofrer pervaporação nas condições de análise em fluxo do dióxido de enxofre

Neste estudo pretendeu-se avaliar a capacidade do acetaldeído para pervaporar nas condições de análise impostas. Para isso prepararam-se duas soluções: solução de acetaldeído em meio etanólico 5% v/v de concentração 40 ppm e solução 5 ppm de SO_2 em meio acetato

0,1 M pH 4,0, que actuou como electrólito de transporte. A análise foi efectuada em duas etapas: em primeiro lugar a câmara inferior do módulo de pervaporação foi atravessada pela solução resultante da mistura em linha de uma solução aquosa de etanol a 5% v/v (R1) e de uma solução de HCl 0,4 M (R2) enquanto a câmara superior do módulo era atravessada por uma solução de dióxido de enxofre em meio acetato; posteriormente substituiu-se a solução aquosa de etanol pela solução de acetaldeído em meio etanólico 5% v/v, mantendo-se as condições anteriores. Os resultados obtidos estão indicados na tabela 5.5.

Tabela 5.5. – Valores obtidos no estudo da capacidade do acetaldeído para sofrer pervaporação nas condições de análise voltamétrica do SO₂ em sistema de injeção em fluxo integrando a pervaporação analítica

[HCl]_{linha} = 0,4 M; T(perv)=90°C; velocidade do fluxo do electrólito de transporte= 1,33 mL min⁻¹

Câmara inferior do módulo (solução mistura)	Câmara superior do módulo (Electrólito de transporte)	Sinal voltamétrico* /nA (média ± desvio padrão)*
solução aquosa de etanol a 5% (R1) + HCl 0,4 M (R2)	tampão acetato 0,1M pH 4,0 com 5 ppm de SO ₂	100,3 ± 6,4
acetaldeído 40 ppm em meio etanólico 5% v/v (R1) + solução de HCl 0,4 M (R2)		99,30 ± 6,14

* 5 determinações

Atendendo aos resultados obtidos pode concluir-se que nas condições de análise o acetaldeído parece não sofrer pervaporação apreciável.

5.5 - Estratégia para a remoção do acetaldeído em soluções modelo binárias de dióxido de enxofre e acetaldeído

Na determinação voltamétrica do SO_2 “total” em cerveja num sistema de análise em fluxo é fundamental a separação quantitativa do acetaldeído porquanto os aductos acetaldeído-hidrogenossulfito inviabilizam a pervaporação do SO_2 e posterior quantificação.

O acetaldeído pode ser removido de soluções binárias de sulfito e acetaldeído através de uma metodologia que consiste em inserir a amostra num tubo de gases termostaticado, condicioná-la em meio hidróxido de modo a promover a rotura dos aductos e posterior evolução dos aldeídos mais voláteis por passagem de um fluxo de azoto [30].

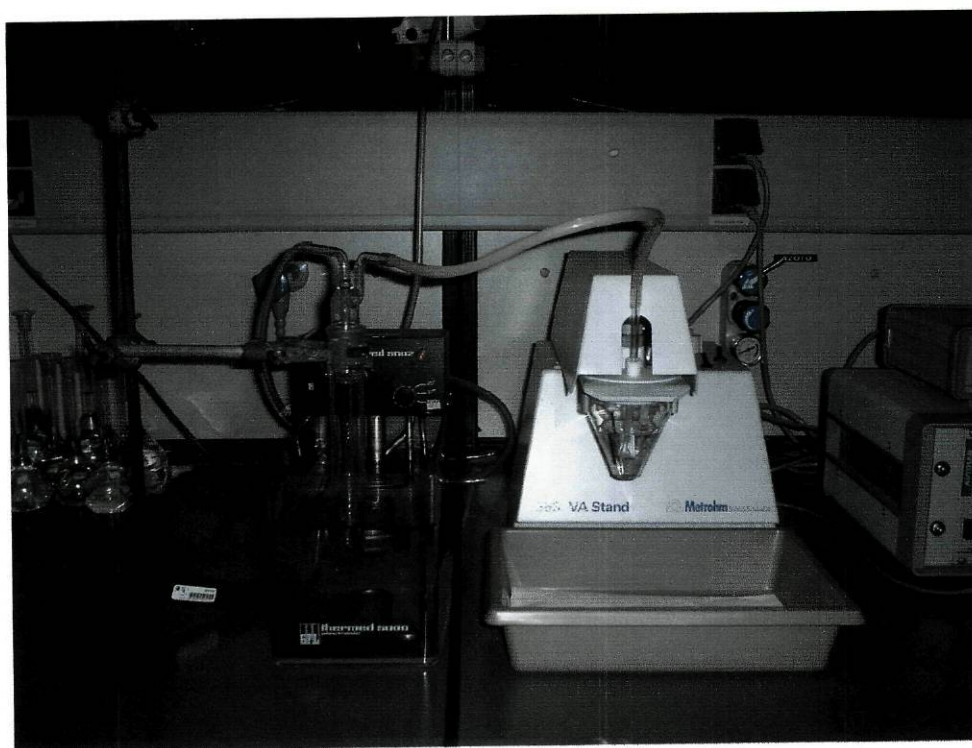


Figura 5.7. – Fotografia da montagem laboratorial para a determinação voltamétrica do SO_2 em cerveja – Método Voltamétrico [30].

Neste estudo pretendeu-se otimizar as condições de meio conducentes à remoção do acetaldeído de uma solução binária de dióxido de enxofre e acetaldeído. O meio hidróxido foi previamente ensaiado de modo a garantir a rotura dos aductos e permitir a remoção do aldeído, tendo-se verificado que a adição de 100 μL de solução de NaOH 2M a 20 mL da solução binária de dióxido de enxofre e acetaldeído satisfazia essas condições.

Prepararam-se três soluções aquosas, A, B e C, distintas em meio etanólico a 5% (v/v), cujos níveis de concentração de reagentes estão indicados na tabela 5.5.

Tabela 5.6. – Composição das soluções A, B e C preparadas.

Solução A	Solução B	Solução C
$c(\text{SO}_2) = 20 \text{ ppm}$ $(3,1 \times 10^{-4} \text{ M})$	$c(\text{SO}_2) = 20 \text{ ppm}$ $(3,1 \times 10^{-4} \text{ M})$ $c(\text{acet.}) = 10 \text{ ppm}$ $(2,6 \times 10^{-4} \text{ M})$	$c(\text{SO}_2) = 20 \text{ ppm}$ $(3,1 \times 10^{-4} \text{ M})$ $c(\text{acet.}) = 20 \text{ ppm}$ $(5,2 \times 10^{-4} \text{ M})$

A partir da solução A preparou-se uma amostra de 20 mL, à qual se adicionou 100 μL de solução aquosa de NaOH 2M.

A partir da solução B prepararam-se duas amostras de 20 mL às quais se adicionou 100 μL de solução aquosa de NaOH, 2M. Uma das amostras foi inserida no tubo de gases e termostatzada a 50°C. Durante 15 minutos fez-se passar um fluxo de azoto de 0,5 litros por minuto pela solução contida no tubo de gases de modo a remover os aldeídos voláteis.

A partir da solução C prepararam-se duas amostras de 20 mL às quais se adicionou 100 μL de solução aquosa de NaOH, 2M. Uma das amostras foi inserida no tubo de gases e termostatzada a 50°C. Durante 15 minutos fez-se passar um fluxo de azoto de 0,5 litros por minuto pela solução contida no tubo de gases.

Após este procedimento as cinco amostras foram sujeitas a pervaporação em modo contínuo, a 90°C, após acidulação em linha com ácido clorídrico 0,4 M, sendo o analito recolhido em tampão acetato 0,1 M pH 4,0.

Os resultados obtidos estão indicados na tabela 5.7.

Tabela 5.7. – Valores obtidos no estudo das condições ótimas para a remoção quantitativa do acetaldeído em misturas binárias de dióxido de enxofre e acetaldeído

$[HCl]_{incha} = 0,4 M ; T(banho)=90^{\circ}C; \text{caudal do electrólito de transporte}= 1,33 \text{ mL min}^{-1}$

Solução-amostra etanólica a 5% (v/v)	Volume da solução-amostra/mL	V(NaOH) adicionado/ μL	Temperatura/ $^{\circ}C$	Tempo de purga com azoto/min	Sinal Voltamétrico /nA
(A) c (SO ₂) =20 ppm (3,1x10 ⁻⁴ M)	20	100	ambiente	0	145,8
(B) c (SO ₂) =20 ppm (3,1x10 ⁻⁴ M) c (acet.) =10 ppm (2,6x10 ⁻⁴ M)	20	100	50	15	133,6
			ambiente	0	143,2
(C) c (SO ₂) =20 ppm (3,1x10 ⁻⁴ M) c (acet.)=20 ppm (5,2x10 ⁻⁴ M)	20	100	50	15	103,6
			ambiente	0	125,8

Os resultados obtidos permitem concluir que é possível prescindir da etapa de remoção do acetaldeído no tubo de gases, por passagem de um fluxo de azoto, na medida em que, quando uma solução binária de dióxido de enxofre e acetaldeído, nas condições de meio hidróxido impostas, é impulsionada para o sistema de análise em fluxo, o sinal analítico do dióxido de enxofre não é significativamente afectado pela presença do acetaldeído, para os níveis de concentração das misturas binárias analisadas.

5.6 - Optimização das condições de meio ácido adicionado em linha para análise em fluxo da cerveja

Para a análise de uma amostra de cerveja, a concentração de ácido clorídrico adicionado em linha deve ser suficiente para neutralizar o hidróxido adicionado para a quebra do aducto hidrogenossulfito-acetaldeído e para promover o meio ácido para a conversão do analito na forma gasosa, SO_2 .

Este estudo foi desenvolvido sobre uma amostra de cerveja à qual se extraiu previamente o acetaldeído com recurso à técnica de tratamento prévio da amostra referida no método voltamétrico para a determinação do dióxido de enxofre (ponto 2.2.2 da Parte I).

Durante a preparação das amostras de cerveja, decorrente da formação de espuma, tornou-se necessário recorrer ao uso de um anti-espumante à base de silicone, que testado nas condições de análise do dióxido de enxofre, não respondeu voltametricamente.

Assim, após a prévia extracção do acetaldeído a cerveja foi acidulada (R_1) em linha, impulsionada em direcção à câmara inferior do módulo de pervaporação, termostaticado a 90°C , e o analito recolhido numa solução tampão acetato $0,1\text{M}$ pH $4,0$ na câmara superior e detectado voltametricamente na célula de fluxo.

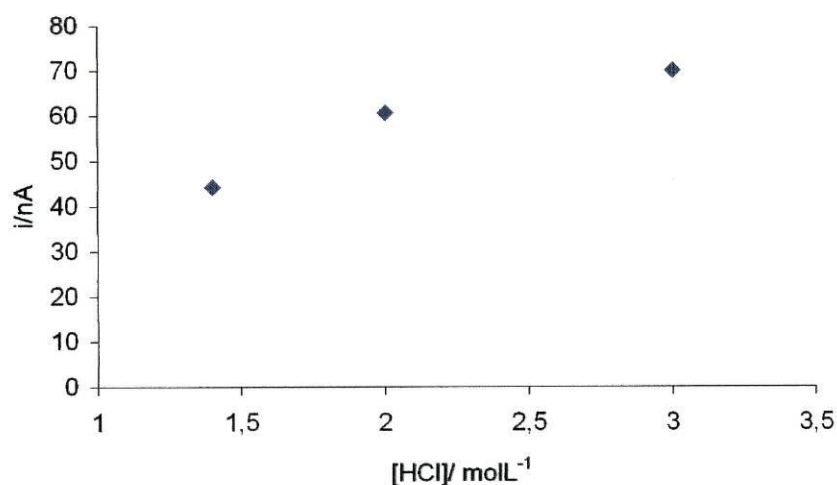


Figura 5.8. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função da concentração do ácido. Pervaporação de uma amostra de cerveja à qual se extraiu previamente o acetaldeído.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que uma concentração de HCl da ordem dos 2,0 M é suficiente para atingir o objectivo pretendido. No entanto, ao trabalhar com estes níveis de concentração do ácido começam a surgir alguns problemas relacionados com corrosão do material de construção da unidade de pervaporação que afectam o desempenho da membrana de Teflon por acumulação de impurezas à sua superfície.

5.7 - Optimização das condições de meio alcalino conducentes a uma hidrólise quantitativa dos aductos em cerveja

Na análise de cerveja, e de modo a promover uma hidrólise quantitativa dos aductos, tornou-se necessário que o meio fosse suficientemente alcalino, atendendo à capacidade tampão da mesma. No desenvolvimento deste estudo, prepararam-se sete amostras de cerveja de 20 mL cada e a seis delas adicionaram-se, respectivamente, 100 µL, 200 µL, 400 µL, 1mL, 2 mL e 3 mL NaOH, 2M, permanecendo a amostra restante como controlo do ensaio.

As amostras foram ensaiadas em modo contínuo, pervaporadas à temperatura de 90°C após confluência com uma solução HCl 1,4 M e o analito recolhido numa solução tampão acetato 0,1 M pH 4,0 que circulava pela câmara superior do módulo de pervaporação.

Tabela 5.8. – Valores obtidos no estudo das condições de meio alcalino da amostra de cerveja

[HCl] _{linha} = 1,4 M ; T(perv)=90°C; fluxo acetador = tampão acetato 0,1M pH 4,0		
Volume da amostra	V(NaOH) adicionado	Sinal Voltamétrico /nA
20 mL	0 µL	16,17
	100 µL	19,58
	200 µL	19,82
	400 µL	22,39
	1 mL	59,88
	2 mL	68,10
	3 mL	65,96

De acordo com os resultados obtidos, pode concluir-se que 2,0 mL de solução de hidróxido de sódio, 2 M, num volume de cerveja de 20 mL, são suficientes para garantir a rotura do aducto e a retenção do acetaldeído na solução dadora permitindo uma recuperação quantitativa do dióxido de enxofre total. O sinal voltamétrico obtido - 16,17 nA - na análise directa de cerveja poderá ser indicativo da aplicabilidade desta metodologia na determinação do SO₂ “livre” presente na cerveja.

5.8 - Efeito do tempo de pervaporação no sinal analítico

Operando no modo “stopped flow”, ou seja com a válvula de injeção manual, V₁, em posição “off”, o tempo de pervaporação está associado com o volume de amostra que atravessa a câmara inferior do módulo de pervaporação e conseqüentemente com um processo de acumulação do analito na solução de electrólito retida na câmara superior. Assim, mantendo constante o fluxo transportador dador, estudou-se a influência daquele parâmetro no sinal voltamétrico do dióxido de enxofre, a partir da análise de uma amostra de cerveja previamente desgaseificada, e para a qual se sabia que o teor em SO₂ era muito baixo. A amostra de cerveja foi impulsionada para o sistema sem qualquer pré-tratamento, além do referido anteriormente. Os resultados obtidos para cada um dos ensaios realizados estão descritos na tabela 5.9.

Tabela 5.9. –Valores obtidos no estudo do efeito do tempo de pervaporação no sinal voltamétrico do SO₂ resultante da pervaporação de uma amostra de cerveja.

[HCl] _{linha} = 1,4 M ; T(pervaporação) = 90°C ; Eluente : tampão acetato 0,1M pH 4,0	
tempo de pervaporação/min	Sinal voltamétrico/nA
0	não mensurável
1	17,01
2	32,70
4	47,46
6	57,60
10	70,52
18	79,99

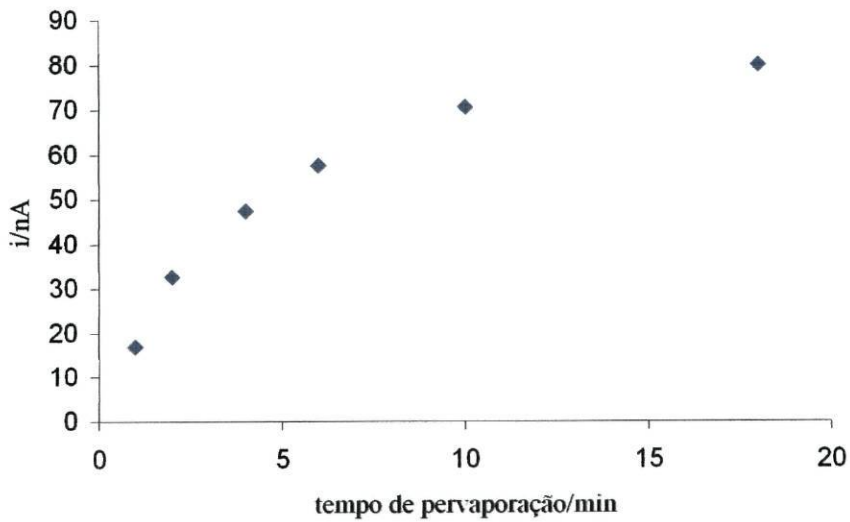


Figura 5.9. – Representação gráfica da intensidade da corrente em função do tempo de pervaporação.

O gráfico da figura 5.9 revela um aumento no sinal voltamétrico com os tempos de pervaporação considerados. No entanto para tempos de pervaporação superiores a 6 min, o aumento de sinal deixa de ser tão intenso. Assim, a necessidade e a selecção de um intervalo de tempo de pervaporação vai depender dos níveis de SO₂ na amostra de cerveja.

6 – Aplicação da metodologia desenvolvida à cerveja

-
- 6.1 - Descrição detalhada da metodologia desenvolvida e otimizada para a determinação do teor em SO₂ “livre” e “total” existente na cerveja
 - 6.2 - Aplicação do método das adições de padrão para a determinação do teor em SO₂ “livre” e “total” na cerveja
 - 6.3- Estudo comparativo de métodos
-

6.1 - Descrição detalhada da metodologia desenvolvida e otimizada para a determinação do teor em SO₂ “livre” e “total” existente na cerveja

O método proposto para a determinação do SO₂ “total” na cerveja compreende duas etapas. A primeira consiste na alcalinização da amostra de cerveja, de modo a promover a dissociação dos aductos carbonilo-HSO₃⁻. Numa segunda fase, a amostra alcalinizada é bombeada para o sistema, arrastada por um fluxo transportador, que acidula a amostra e que promove a conversão do sulfito na forma ácida, e é conduzida até à câmara inferior da unidade de pervaporação. Atravessando a membrana hidrofóbica, o analito é conduzido pelo fluxo transportador aceitador até à célula voltamétrica de fluxo onde é detectado e quantificado.

Na determinação do SO₂ “livre”, a amostra de cerveja é directamente bombeada para o sistema sem o tratamento alcalino prévio.

A metodologia desenvolvida e que foi aplicada para a análise do SO₂ “total” e SO₂ “livre” na cerveja e as condições voltamétricas utilizadas encontram-se descritas no quadros seguintes.

Quadro I

Metodologia para a determinação do SO₂ “total” na cerveja

A - Condições experimentais otimizadas no processo de amostragem

Volume de cerveja – 20 mL

Volume de NaOH – 2 mL de NaOH, 2M

Concentração de HCl (adicionado em linha) – 1,4 M

Caudal da amostra – 1,33 mL/min

Caudal do ácido (adicionado em linha) – 1,33 mL/min

Temperatura do banho termostático – 90°C

A formação de espuma pela amostra durante este processo é contrariada pela adição de uma gota de um agente anti-espumante à base de silicone.

A₁ – Medição de 20,0 mL de cerveja para uma ampola; adição de 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio, 2 M, à amostra de cerveja e homogeneização da solução.

A₂ – Análise da amostra pelo sistema de análise em fluxo desenvolvido.

B - Condições experimentais otimizadas no processo de detecção

Electrólito de transporte – Tampão acetato 0,1 M pH 4,0

Caudal do electrólito de transporte – 1,33 mL/min

Condições voltamétricas

- Voltametria de onda quadrada
- Potencial inicial, -0,5V
- Potencial final, -0,8V
- Incremento de potencial, 2,55mV
- Amplitude do impulso, 25,05mV
- Frequência de onda quadrada, 300 Hz

Quadro II

Metodologia para a determinação do SO₂ “livre” na cerveja

A - Condições experimentais optimizadas no processo de amostragem

Volume de cerveja – não aplicável

Concentração de HCl (adicionado em linha) – 1,4 M

Caudal da amostra – 1,33 mL/min

Caudal do ácido (adicionado em linha) – 1,33 mL/min

Temperatura do banho termostático – 90°C

A formação de espuma pela amostra durante este processo é contrariada pela adição de uma gota de um agente anti-espumante à base de silicone.

A₁ – Análise da amostra pelo sistema de análise em fluxo desenvolvido.

B - Condições experimentais optimizadas no processo de detecção

Electrólito de transporte – Tampão acetato 0,1 M pH 4,0

Caudal do electrólito de transporte – 1,33 mL/min

Condições voltamétricas

- Voltametria de onda quadrada
- Potencial inicial, -0,5V
- Potencial final, -0,8V
- Incremento de potencial, 2,55mV
- Amplitude do impulso, 25,05mV
- Frequência de onda quadrada, 300 Hz

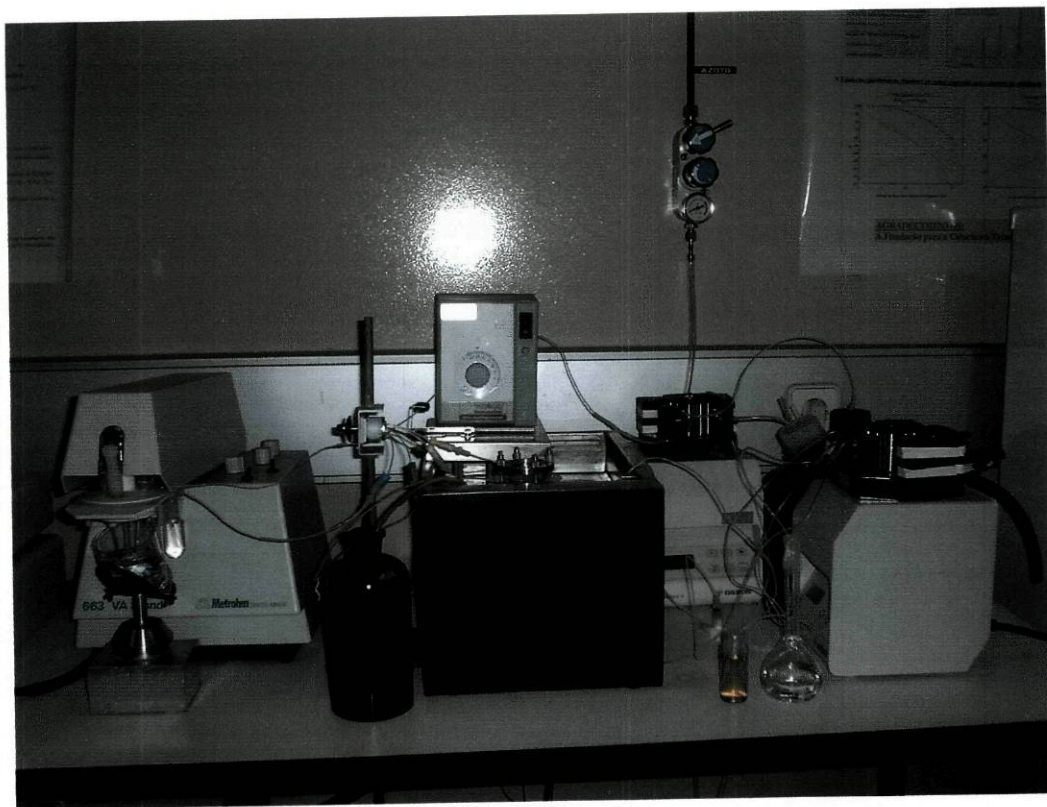


Figura 6.1. – Fotografia da montagem laboratorial do sistema de fluxo desenvolvido.

6.2 - Aplicação do método das adições de padrão para a determinação do teor em

Para avaliar a eficiência do método proposto recorreu-se ao método das adições de padrão. Esta avaliação do procedimento, otimizado na cerveja, consistiu na preparação de várias amostras de cerveja de volume rigorosamente medido, às quais se adicionou uma quantidade rigorosa de uma solução padrão de metabissulfito de potássio. As amostras de cerveja pertenciam a diferentes lotes de fabrico, embora fossem do mesmo tipo.

Para a realização deste estudo, mediram-se quatro volumes de 20 mL de cerveja e a cada um deles adicionou-se quantidades diferentes de uma solução padrão de metabissulfito de potássio, 1000 ppm, como se descreve na tabela 6.1.

Posteriormente, procedeu-se à determinação da concentração de SO₂ em cada amostra pela metodologia mencionada.

Tabela 6.1. – Valores obtidos na determinação do SO₂ “total” na cerveja utilizando o método de adição de padrão.

[HCl]_{linha} = 1,4 M ; T(per vaporação) = 90°C ; t(per) = 0s ;
Electrólito de transporte na câmara superior : tampão acetato 0,1M pH 4,0

Amostra	Volume de padrão adicionado/ μ L	c (SO ₂)/ppm	Sinal voltamétrico/nA	
			Lote I	Lote II
1	0	x	45,65	22,21
2	200	x+10	73,28	34,20
3	400	x+20	107,0	60,99
4	600	x+30	139,2	83,24

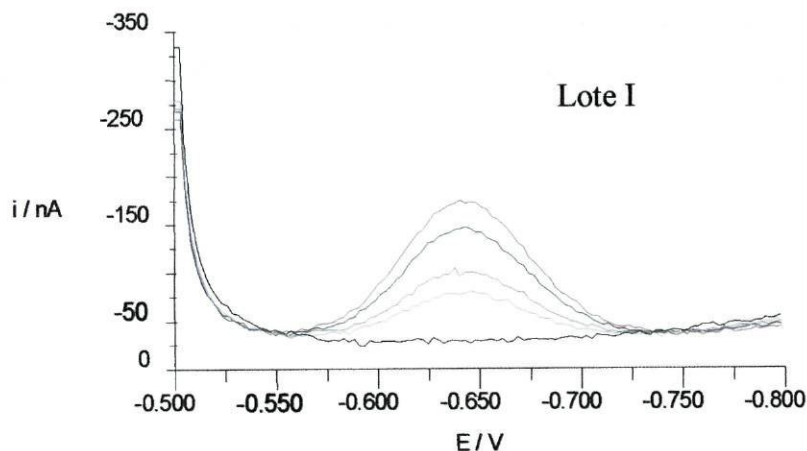


Figura 6.2. – Voltamogramas obtidos na análise do SO₂ total na cerveja, (___) branco, (___) cerveja; (___) adição de 10 ppm de SO₂; (___) adição de 20 ppm de SO₂; (___) adição de 30 ppm de SO₂.

A representação gráfica do sinal analítico do dióxido de enxofre em função da

concentração de dióxido de enxofre adicionado à cerveja revela uma boa correlação entre estes dois parâmetros (fig 6.3).

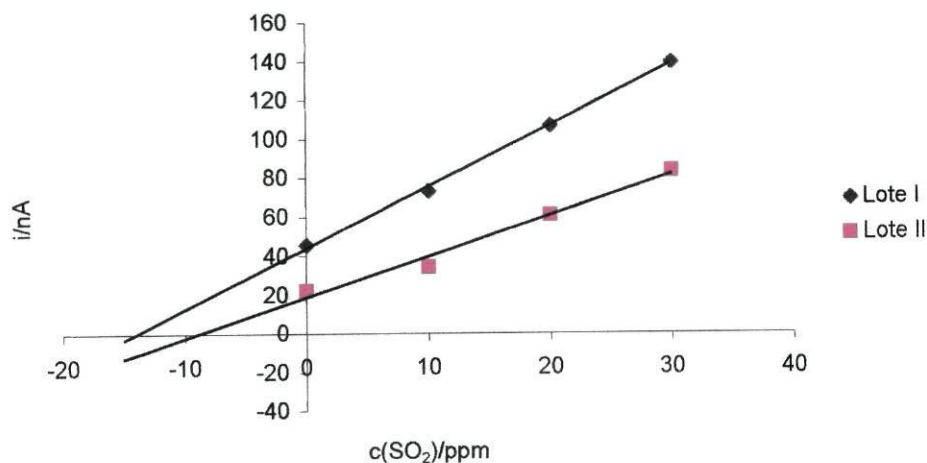


Figura 6.3. – Representação gráfica da aplicação do método da adição de padrão na determinação do SO₂ “total” na cerveja .

Na tabela 6.2 encontram-se registadas as equações das curvas de calibração, obtidas pelo método das adições de padrão, bem como os respectivos coeficientes de correlação linear e a concentração de SO₂ “total”, encontrada nas duas amostras de cerveja analisadas.

Tabela 6.2. – Valores resultantes da aplicação do método das adições de padrão à determinação da quantidade de SO₂ “total” existente na cerveja.

Lote	Equação da curva (Y = bX + a)	Coefficiente de correlação linear	c (SO ₂)/ppm
I	Y = 3,1437X + 44,127	0,9984	14,0
II	Y = 2,0988X + 18,678	0,9800	8,9

(a – ordenada na origem; b – declive)

Para a determinação do SO₂ “livre”, a amostra de cerveja é impulsionada para o sistema sem qualquer pré-tratamento (excluindo o processo de decarbonatação).

Tabela 6.3. – Valores obtidos na determinação do SO₂ “livre” na cerveja pelo método de adição de padrão.

[HCl]_{linha} = 1,4 M ; T(per vaporação) = 90°C ; t(per) = 120s ;
Electrólito de transporte na câmara superior: tampão acetato 0,1M pH 4,0

Amostra	Volume de padrão adicionado/ μ L	c (SO ₂)/ppm	Sinal voltamétrico/nA	
			Lote I	Lote II
1	0	x	10,74	9,192
2	200	x+10	17,09	20,53
3	400	x+20	28,49	não realizado
4	600	x+30	40,36	45,47

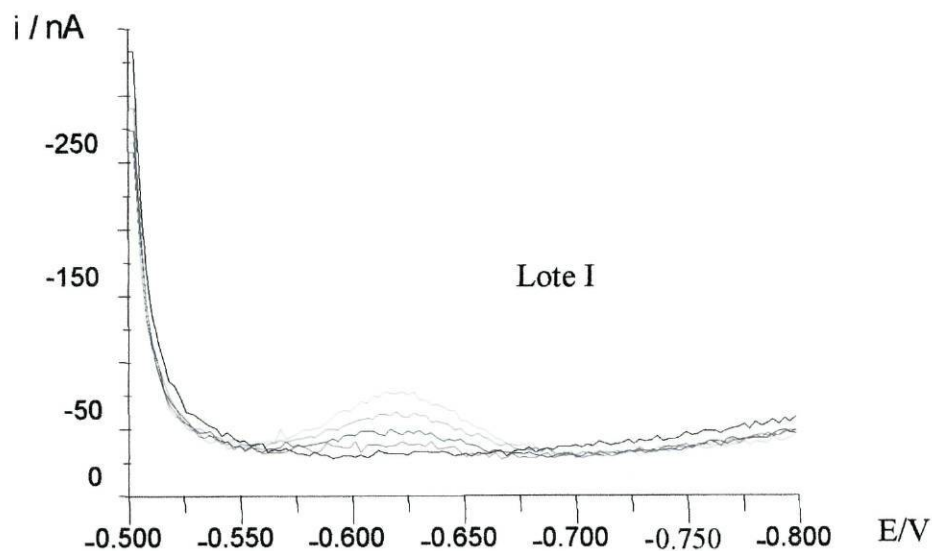


Figura 6.4. – Voltamograma obtido na análise do SO₂ “livre” na cerveja, (___) branco, (___) cerveja; (___) adição de 10 ppm de SO₂; (___) adição de 20 ppm de SO₂; (___) adição de 30 ppm de SO₂.

Na figura 6.5 apresenta-se o gráfico resultante da aplicação do método das adições de padrão a amostras de cerveja, onde se verifica que foi possível estabelecer uma correlação linear entre o sinal voltamétrico lido e as diferentes quantidades de dióxido de enxofre adicionadas em cada amostra.

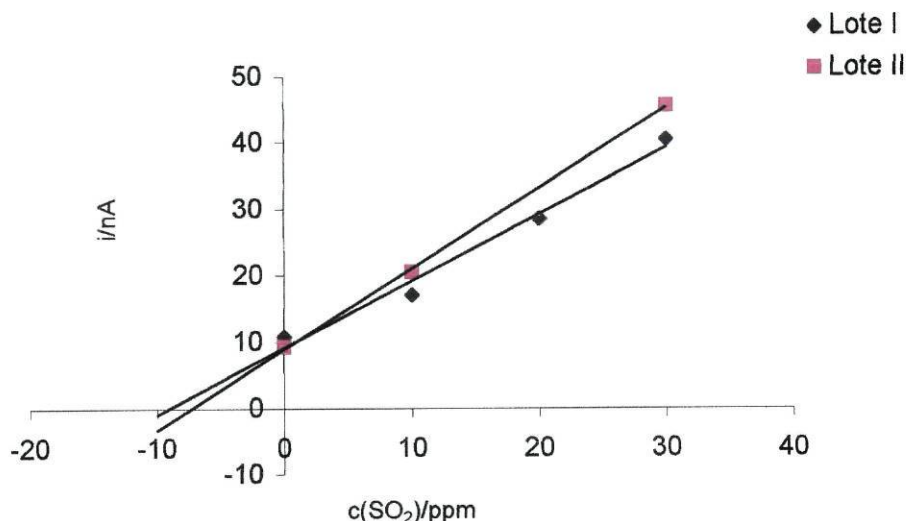


Figura 6.5. – Representação gráfica da aplicação do método da adição de padrão na determinação do SO_2 “livre” na cerveja.

As equações das curvas de calibração, obtidas pelo método das adições de padrão, bem como os respectivos coeficientes de correlação linear e a concentração de SO_2 “livre” encontrada nas duas amostras de cerveja analisadas, estão referenciados na tabela 6.4.

Tabela 6.4. – Aplicação do método das adições de padrão à determinação da quantidade de SO_2 “livre” existente na cerveja.

Lote	Equação da curva ($Y = bX + a$)	Coefficiente de correlação linear	$c(\text{SO}_2)/\text{ppm}$
I	$Y = 1,0026X + 9,131$	0,983	9,1
II	$Y = 1,2147X + 8,8686$	0,9995	7,3

(a – ordenada na origem; b – declive)

Os valores encontrados para a concentração de SO₂ “total” nas cervejas estudadas encontram-se dentro da ordem de grandeza habitualmente encontrada para este composto em cerveja (aproximadamente entre 10 e 25 ppm, contudo algumas cervejas apresentam níveis inferiores a 10 ppm [24]). No entanto, o valor encontrado para a concentração de SO₂ “livre” nas cervejas analisadas é significativamente superior ao normalmente encontrado nesta bebida.

A acentuada diminuição da estabilidade do aducto em meio ácido pode ser responsável por esta situação e assim, nas condições de meio ácido impostas ao sistema na etapa de amostragem, aquando da determinação do SO₂ “livre”, poderá ocorrer cissão parcial dos aductos.

Atendendo a que, como já foi referido, o acetaldeído é o composto carbonílico mais abundante na cerveja e como tal é lícito assumir que o SO₂ que se encontra na forma de aducto, só está ligado a esse aldeído, a determinação do teor de SO₂ “livre” pode ser efectuada por diferença entre a concentração de acetaldeído e do teor de SO₂ “total” existentes na cerveja, ou seja, recorrendo ao método voltamétrico [30].

6.3 - Estudo comparativo de métodos

Para avaliar a reprodutibilidade do método desenvolvido e demonstrar a sua aplicabilidade realizou-se um estudo comparativo com o método voltamétrico - metodologia de análise do SO₂ desenvolvido neste laboratório de investigação [30], que assenta no tratamento da amostra de cerveja de modo a extrair o dióxido de enxofre e posterior quantificação.

Este estudo comparativo incidiu na determinação do SO₂ “total”, uma vez que a aplicação da metodologia desenvolvida para a determinação do SO₂ “livre” deve ser objecto de um estudo mais detalhado.

Os teores de SO₂ “total” de 6 amostras de cervejas de diferentes lotes foram determinados pelo método proposto e comparados com os obtidos pelo método usado como referência (tabelas 6.5 , 6.6 e 6.7).

Tabela 6.5. – Valores obtidos na determinação do teor de SO₂ “total” existente em amostras de cerveja de diferentes lotes pelo método da adição de padrão.

[HCl]_{líquida} = 1,4 M ; T(pervaporação) = 90°C ; t(per) = 0s ;
 Electrólito de transporte na câmara superior: tampão acetato 0,1M pH 4,0

Amostra	Volume de padrão adicionado/ μ L	c (SO ₂)/ppm	Sinal voltamétrico/nA					
			Lote					
			A	B	C	D	E	F
1	0	x	33,25	35,69	17,30	37,99	32,73	44,95
2	200	x+10	58,61	81,85	31,01	50,26	47,11	64,78
3	400	x+20	100,6	138,7	59,90	67,69	63,52	100,6
4	600	x+30	128,9	185,2	82,29	85,00	82,55	135,9

Tabela 6.6. –Teor de SO₂ “total” existente em amostras de cerveja de diferentes lotes obtido pelo método de adição de padrão.

Lote	Equação da curva (Y = bX + a)	Coefficiente de correlação linear	c (SO ₂)/ppm
A	Y = 3,2894x + 30,999	0,9912	9,4
B	Y = 5,0538x + 34,553	0,9983	6,8
C	Y = 2,2392x + 14,052	0,983	6,3
D	Y = 1,5846x + 36,466	0,9939	23,0
E	Y = 1,6587x + 31,597	0,9961	19,0
F	Y = 3,0866x + 40,286	0,9849	13,0

(a – ordenada na origem; b – declive)

Tabela 6.7. – Comparação dos resultados obtidos na determinação do SO₂ “total” em amostras de cerveja de diferentes lotes usando a metodologia desenvolvida e o método de referência utilizado.

Lote	c (SO ₂)/ppm	
	Método voltamétrico	Método de análise em fluxo
A	9,2	9,4
B	7,3	6,8
C	5,4	6,3
D	22,6	23,0
E	21,9	19,0
F	12,4	13,0

A figura 6.6 mostra a correlação entre os dois métodos de determinação do SO₂ “total” na cerveja.

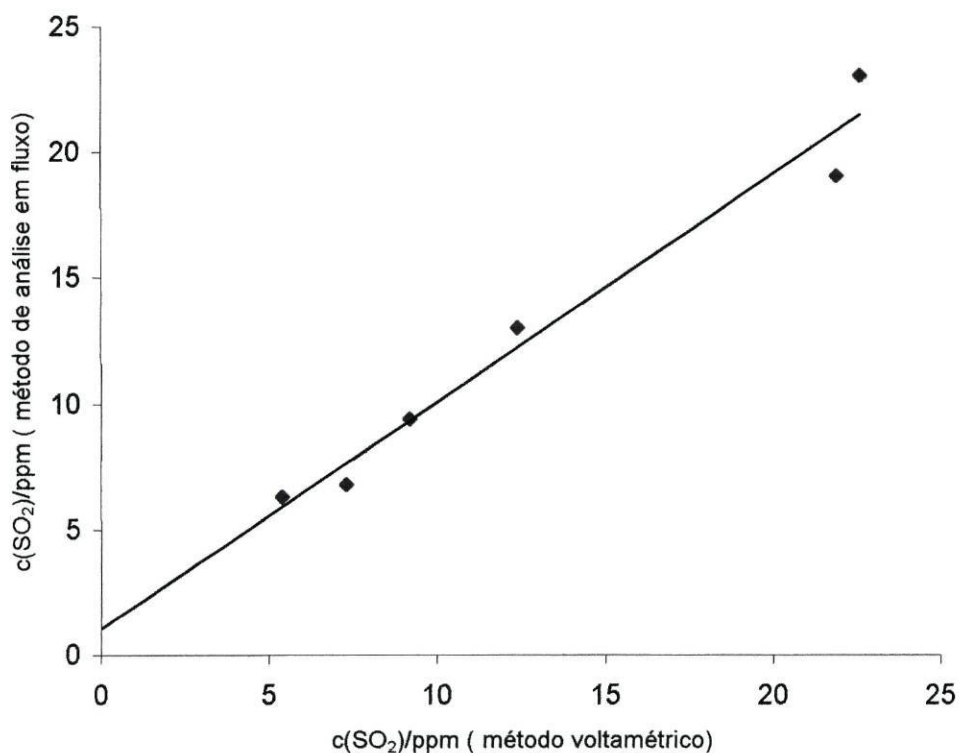


Figura 6.6. – Gráfico da comparação entre os resultados obtidos pelo método voltamétrico (C_v) e pelo método de análise em sistema de fluxo (C_f) na determinação do SO₂ “total” na cerveja.

Os parâmetros relativos à equação de regressão linear ($C_F = C_0 \times SC_V$), com um limite de confiança de 95% estão indicados na tabela 6.8.

Tabela 6.8. – Parâmetros da equação $C_F = C_0 \times SC_V$, para a comparação dos resultados obtidos com a metodologia proposta e o método voltamétrico.

	C_0	S
SO ₂ “total”	1,1±3,0	0,9±0,2

O tratamento estatístico dos resultados obtidos para os dois métodos de análise comparados permite afirmar, com um grau de confiança de 95%, que os valores modelo 0 e 1 estão incluídos nos intervalos de confiança, 1,1±3,0 (ordenada na origem) e 0,9±0,2 (declive), respectivamente [42].

Assim, não se reconhece evidência estatística para diferenças sistemáticas entre os resultados obtidos para os dois métodos de análise [42], ou seja, não podemos dizer que, para um grau de confiança de 95%, os dois métodos difiram significativamente.

7 – Considerações finais e propostas de trabalho futuro

A metodologia desenvolvida em soluções modelo de SO₂ mostrou-se aplicável à determinação deste composto na cerveja. Verificou-se, contudo, ser necessário rever as condições de meio para a determinação do SO₂ “livre” na cerveja, já que, as condições de análise em meio ácido parecem proporcionar a quebra dos aductos existentes na matriz.

O recurso a uma unidade de pervaporação para a separação do analito da matriz cerveja mostrou ser um método de separação analítica efectivo para a separação do SO₂.

A aplicação do método das adições de padrão a amostras de cerveja, para a determinação de SO₂ “total”, mostrou que é possível obter uma boa correlação linear entre a quantidade adicionada/existente de SO₂ na cerveja e o sinal medido.

A metodologia descrita para a determinação do SO₂ apresenta como principais vantagens, em relação a outras metodologias existentes (ver ponto 2. Parte I), a simplicidade de instrumentação, o baixo tempo de análise, a economia no consumo de amostras/reagentes, a simplicidade de execução, velocidade de processamento e o baixo potencial poluidor e de risco químico associado ao tipo de reagentes utilizados. O tempo de análise poderá ainda ser melhorado se a alcalinização da cerveja for efectuada em linha, automatizando-se totalmente o processo de amostragem.

Por outro lado, o desgaste dos tubos flexíveis quando expostos ao rotor das bombas peristálticas no processo de movimentação dos fluidos vai provocar alterações de pulsação do fluxo impelido, factor com particular relevância quando o processo de amostragem é dependente do caudal da solução dadora do analito e quando se trabalham com detectores voltamétricos em sistema de fluxo, afectando assim, a sensibilidade. Ao nível da célula de fluxo, verificou-se que o posicionamento e alinhamento do capilar – eléctrodo de trabalho mostrou afectar a resposta voltamétrica e subsequentemente a reprodutibilidade. Refira-se contudo, que ao ser detectada, esta interferência foi minimizada mantendo-se a posição do capilar fixa ao longo de todo o procedimento experimental.

Uma outra proposta de trabalho futuro será tentar adaptar o sistema para a

determinação do acetaldeído após derivatização com hidrazina, na câmara superior do módulo de pervaporação, e deste modo recorrer ao mesmo tipo de solução usada no método voltamétrico desenvolvido neste laboratório para a determinação do SO₂ “livre”.

O estudo de novas condições a impor ao sistema poderá tornar esta metodologia aplicável à identificação e quantificação de outros compostos voláteis existentes na cerveja.

Resumindo, esta técnica possibilita a automação da análise do SO₂ em amostras de cerveja, minimiza o uso de reagentes, reduz efeitos de contaminação além da economia de tempo e de custos, sendo particularmente indicada para determinações rotineiras de SO₂ “total” em amostras de cerveja.

Referências Bibliográficas

- [1] - Guido, L. F., Determinação voltamétrica do dióxido de enxofre total na cerveja, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, **2001**
- [2] - Martins, C. R., Bittencourt de Andrade, J., Química atmosférica do enxofre (IV) : emissões, reações em fase gasosa e impacto ambiental, *Quim. Nova*. Vol. 25, Nº 2, **2002** 259-272.
- [3] - Federation of American Societies: re-examination of the GRAS status of sulfiting agents. NTIS PB 85-164044. Experimental biology for the Food and Drug Administration, **1985**; Washington DC.
- [4] - Taylor SL, Bush RK. Sulfites: a technical and scientific review. *International Food Additives Council*, **1983**.
- [5] - Mc Weeney DJ, Knowles ME, Hearne FJ. The chemistry of nono enzymic browning in foods and its control by sulphites. *J Sci Food Agric* 25, **1974**; 735.
- [6] - Simon RA, Stevenson DD. Reacciones adversas inducidas por sulfitos. *Alergia*. Cap 67. pág 1446-49.
- [7] - Fisher AA. Reactions to sulfites in foods: delayed eczematous and immediated urticarial, anaphylactoid and asthamatic reactions. Part III. *Cutis* 44, **1989**; 187-90
- [8] - Papazian R. Sulfites: safe for most, dangerous for some. *FDA Consumer Magazine*, **1996**
- [9] - Directiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Fevereiro de **1995**
- [10] - Izquierdo-Ferrero, J.M.; Fernandez Romero, J.M. ; Luque de Castro, M.D. On-line Flow Injection-Pervaporation of Beer Samples for the Determination of Diacetyl. *Analyst* **1997**, 122,119
- [11] - Mataix, E.; Luque de Castro, M.D.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 381,23.
- [12] - Mattos, I. L., & Luque de Castro, M.D. Study of mass-transfer efficiency in pervaporation process. *Analytica Chimica Acta*, 298, **1994**. 159-165
- [13] - Papaefstathiou, I., & Luque de Castro, M. D.. Approaches for improving the precision and sensivity of coninuous pervaporation processes. *Analytical Letters*, 28, **1995**, 2063-2076

- [14] - Amador-Hernández. J. , Luque de Castro, M.D. Pervaporation: a useful tool in food analysis, *Food Chemistry* 68, **2000**, 387-394,
- [15] - Bryce, D. W., Izquierdo, A., & Luque de Castro, M.D. Continuous microwave assisted pervaporation/atomic fluorescence detection: an approach for speciation in solid sample. *Analytica Chimica Acta* 324, **1996**, 69-75
- [16] - Cañizares, P., & Luque de Castro, M.D. Determination of urea and ammonia in biological fluids based on the use of enzyme-pervaporation-potenciometry. *Química Analítica* **1997**, 15, 239-244
- [17] - Papaefstathiou, I., & Luque de Castro, M. D. Simultaneous determination of chemical oxygen demand/inorganic carbon by flow injection-pervaporation. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 66, **1997** b, 107-117.
- [18] - Mataix E., & Luque de Castro, M.D. (in press) Simultaneous determination of carbon dioxide and free sulfur dioxide in wine by flow injection-pervaporation with in series potentiometric detection. *Talanta*
- [19] - AOAC. Association of Official Analytical Chemists . Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 14th, **1984**
- [20] - Behre, L.M. Sulfite food additives: to ban or not to ban? *Dairy Food Sanit* **1986** , 6(9):386-90.
- [21] - Warner, C.R. et al. T. Reevaluation of Monier-Williams method for determining sulfite in food. *J. Assoc. Of. Anal. Chem.* **1986**, 69(1):3-5.
- [22] - Fortunato, N. A., Estudo voltamétrico de compostos relacionados com o envelhecimento da cerveja, Porto, **1999**
- [23] - Kaneda, H., Osawa, T., Contribution of carbonyl-bisulfite adducts to beer stability, *J. Agric. Food Chem.* Vol 42, **1994**, Nagoya, pág 2428-2432.
- [24] - Ilett, D.R. Aspects of the analyses, role and fate of sulphur dioxide in beer-a review, *MBAA Technical Quarterly* Vol.32, **1994**, nº 4, pág 213.
- [25] - Guido, L.F., Envelhecimento da Cerveja: O Estado da Arte, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, **2001**
- [26] - Ilett, D. R.; Simpson Bill, Loss of sulphur Dioxide during Storage of Beer *BRFI QUARTERLY*, **1994**.
- [27] - Dufour, J.-P., Baxter, A. J., Characterization of the reaction of bisulfite with unsaturated aldehydes in a beer model system using NMR spectroscopy, *Amer. Soc. Brew. Chem.* Vol.57(4), **1988**, pág.138-144.

- [28] - E.Mataix and M.D. Luque de Castro, Determination of total and free sulfur dioxide in wine by pervaporation-flow injection, *Analyst*, 123, **1998**, 1547-1549
- [29] - Guido, L.F., Determinação voltamétrica do dióxido de enxofre total na cerveja, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, **2001**
- [30] - Santos, J.R.S. Determinação voltamétrica do sulfito total em cerveja, tema de Seminário em Química Analítica de Licenciatura em Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, **2000**
- [31] - Holak, W., Specchio, J., Determination of sulfites in foods by simultaneous nitrogen purging and differential pulse polarography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, New York, Vol. 72, n.º3, **1989**, pág. 476-480.
- [32] - Holak, W., Patel, B., Differential pulse and polarographic determination of sulfites in foods: collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, New York, Vol.70, n.º3, pág.572-578, **1987**
- [33] - Taylor, L. R. Voltammetry Made Easy. *Chemtech* **1994**, 24, 38-44
- [34] - Taylor, L. R. Automating Voltammetry with Flow, *Current Separations* 16:2 , 1997
- [35] - Rodrigues, P.G.; Rodrigues, J.A.; Barros, A.A.; Lapa, R.A.S.; Lima, J.L.F.C.; Cruz, J.M.M.; Ferreira, A.A. Automatic Flow System with Voltammetric Detection for Diacetyl Monitoring during Brewing Process. *J. Agric. Food Chem.* 50, **2002**, 3647-3653.
- [36] - Colombo, C., van den Berg, C.M.G., Daniel, Anne, A flow cell for on-line monitoring of metals in natural waters by voltammetry with a mercury drop electrode, *Analytica Chimica Acta*, 346, **1997**, 101-111
- [37] - Stulik, K., Pacakova, V., Electrochemical Detection Techniques in High-performance Liquid Chromatography, *J. Electroanal. Chem.*, 129, **1981** , 1-24
- [38] - Barros, A.A.; Rodrigues, J.A.; Almeida, P.J.; Rodrigues, P.G.; Fogg, A.G. Voltammetry of compounds confined at hanging mercury drop electrode surface. *Anal. Chim. Acta* 365, **1999**, 315-323
- [39] - Rodrigues, J.A.; Barros, A.A.; Almeida, P.J.; Rodrigues, P.G.; Fogg, A.G. 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* **2001**, 449, 119-127

- [40] - Melo, Denise; Zagatto, A.G.; Mattos, Ivanildo L.; Maniasso, Nelson. Spectrofotometric Flow-Injection Determination of Sulphite in White Wines Involving Gas Diffusion through a Concentric Tubular Membrane. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol 14, No. 3, **2003**, 375-379.
- [41] - Bendtsen, A.B., Jorgensen, S.S., Determination of total and free sulfite in unstabilized beer by flow injection analysis, *Journal of AOAC International* **1994**, Vol.77. N° 4
- [42] - J.C.Miller, J.N. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th Edition, Pearson eEducation Limited, England, **2000**
- [43] - Ruzicka, J., & Hansen, E.H. in *Flow Injection Analysis*, Wiley-Interscience Publications **1988**, New York, NY, p. 20
- [44] - Narziss, L. Centenary review, technological factors of flavor stability. *J.Inst.Brew.* **1986**, 92, 346-353
- [45] - Silva, J.A.F., Detecção Electroquímica em electroforese capilar, *Quim. Nova.* Vol.26.N°1, **2003**, 56-64
- [46] - Kolthoff, I. M., Lingane, J.J., *Polarography*, 2ª Ed., Interscience publishers, New York, pág. 558-564, **1952**