



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**Um microanalisador em fluxo batelada para
determinação fotométrica de sulfitos em bebidas**

Márcio Rennan Santos Tavares

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

**Um microanalizador em fluxo batelada para
determinação fotométrica de sulfitos em bebidas**

Márcio Rennan Santos Tavares*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida

*** Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**

João Pessoa – PB - Brasil

Agosto/2014

T231u Tavares, Márcio Rennan Santos.

Um microanalisador em fluxo batelada para determinação fotométrica de sulfitos em bebidas / Márcio Rennan Santos Tavares.-- João Pessoa, 2014.

72f. : il.

Orientador: Luciano Farias de Almeida

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Química analítica. 2. Microanalisador fluxo batelada. 3. Resina de uretano-acrilato. 4. Espectrofotometria. 5. Sulfito total - bebidas.

UFPB/BC

CDU: 543(043)

Um microanalizador em fluxo batelada para determinação fotométrica de sulfitos em bebidas.

Dissertação de Mestrado de Márcio Rennan Santos Tavares
aprovada pela banca examinadora em 29 de agosto de 2014:



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Ridvan Nunes Fernandes
Examinador



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcante de Lima
Examinador



**“Sofremos demais pelo pouco que nos falta
e alegremo-nos pouco pelo muito que temos”.**

William Shakespeare.

**Dedico este trabalho a minha
família, em especial Maria José dos
Santos (em memória).**

Agradecimentos

- À Deus por tudo.
- A minha mãe, Maria do Carmo, meu pai, Francisco de Assis e meu irmão, Alexandre Tavares, minha namorada, Andréa Karlla e todos os familiares, em especial, minha Vó Maria José dos Santos (em memória) por todo companheirismo, incentivo e carinho.
- Ao professor Luciano Farias de Almeida pela valiosa orientação, ensinamentos e ajuda ao longo dos dois anos de mestrado.
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo por ceder gentilmente às instalações do LAQA.
- Aos companheiros do grupo de microfabricação Marcelo Lima, Inakã Barreto, Eduardo Lima, Julys Pablo e Stéfani Iury, pela amizade e auxílio significativo prestado na elaboração desse trabalho.
- Aos Companheiros do LAQA Sóflacles, Ivson Nino, Helton Jader, Dayvson Ribeiro, Cleison Eloi, Francisco, Hebert, Sófacles, Danielle Nascimento, Karla Daniele, Valéria Visani, Aline, Pedro, Adenilton Camilo, Israel Filho, Maurício Monteiro, Flaviano, Willy Castro, Welma Vilar e Urijatan por toda amizade, ajuda e momentos de descontração.
- A todos os demais membros do LAQA.
- A CAPES pela bolsa concedida para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas e Abreviaturas

Resumo

Abstract

Capítulo 1 Introdução	17
1 Introdução	18
1.1 Caracterização da problemática	18
1.2 Objetivos	20
1.2.1 Geral	20
1.2.2 Específicos	20
1.3 Fundamentação teórica	20
1.3.1 Sulfitos em bebidas	20
1.3.2 Legislação – Controle e Fiscalização	21
1.3.3 Métodos para determinação de sulfitos	23
1.3.4 Métodos espectrofotométricos UV-Visível	25
1.3.5 Análises fotométricas	27
1.3.6 Sistemas automáticos de análise	28
1.3.7 Miniaturização de sistemas automáticos	31
1.3.8 Microfabricação em uretana-acrilato	33
1.3.9 Microanalisador em fluxo-batelada	35
Capítulo 2 Experimental	37
2.1 Preparação de reagentes, amostras e soluções	38
2.2 Determinação de sulfitos	38
2.3 Método de avaliação da performance analítica	39
2.4 Construção do μ FBA	39
2.5 Funcionamento do μ FBA	41
2.6 Programa de gerenciamento	43
2.7 Método de referência	48

2.8 Teste de recuperação	49
Capítulo 3 Resultados e Discussão	51
3.1 Otimização dos parâmetros do μ FBA	52
3.2 Determinação de sulfitos em bebidas	54
3.3 Teste de recuperação	58
3.4 Comparação do μ FBA proposto com outros sistemas	59
Capítulo 4 Considerações finais e perspectivas	61
4.1 Conclusão	62
4.2 Perspectivas	62
Referências	64

Lista de Figuras

Figura 1.1	Destilação Monier-Williams otimizado pela FDA (a) funil de adição, (b) entrada de gás nitrogênio, (c) balão de 3 vias, (d) condensador de bolas, (e) borbulhador e frasco coletor de SO ₂ .	22
Figura 1.2	Representação esquemática dos principais componentes de instrumentos espectrofotométricos: (1) fontes de radiação, (2) seletores de onda, (3) câmara amostras, (4) sistemas de detecção e (5) sistema resposta do sinal analítico. Fonte: (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).	25
Figura 1.3	Representação da relação absorbância e transmitância em analito.	26
Figura 1.4	LEDs comerciais.	27
Figura 1.5	Diagrama esquemático de um analisador fluxo-batelada: CR: câmara reacional (câmara de mistura); Vt: válvula do titulante; Vs: válvula da amostra; Vi: válvula do indicador; Vw: válvula da água; W: descarte; D: detector.	29
Figura 1.6	Fórmula estrutural do oligômero de uretano-acrilato.	32
Figura 1.7	Esquema geral simplificado para microfabricação em uretana-acrilato. (a) montagem do molde, (b) deposição da resina, (c) fixação da resina, (d) polimerização pela radiação ultravioleta.	33
Figura 2.1	Reação do sal de sulfito com reagente cloridrato de pararosanilina originando o complexo de cor violeta de absorbância máxima em 565nm.	38
Figura 2.2	Representação do micronalisador fluxo batelada para a análise de sulfitos em bebidas: (a) interface USB, (b) acionador de válvulas, (c) frascos das soluções e (d) microbombas solenoides.	40
Figura 2.3	Projeto da confecção do μ FBA. (a) montagem dos moldes e da camada, (b) polimerização da resina nas camadas, (c) canais gravados, (d) selagem do sistema e (e) microcâmara μ FBA	41

confeccionado.

Figura 2.4	Microcâmara μ FBA em uretana-acrilato.	41
Figura 2.5	Diagrama do μ FBA: μ C = microcâmara; microbombas solenóides= μ B ₁ , μ B ₂ , μ B ₃ , μ B ₄ , μ B ₅ ; FT = fototransistor; motor drive, haste de nylon e LED.	42
Figura 2.6	Acionamento das microbombas μ B ₁ e μ B ₂ e homogeneização representados pelas etapas 1 e 2.	44
Figura 2.7	Acionamento das microbombas μ B ₃ e μ B ₄ e homogeneização representados pelas etapas 3 e 4.	44
Figura 2.8	Leitura do sinal analítico, representado pela etapa 5.	45
Figura 2.9	Descarte da solução após análise da amostra, representado pela etapa 6.	45
Figura 2.10	Limpeza da microcâmara com água deionizada, representado pela etapa 7.	46
Figura 2.11	Representação da interface construída em ambiente LabView.	47
Figura 3.1	Efeito das concentrações dos reagentes sobre o sinal analítico. (a) Solução de Pararosanilina (mg L ⁻¹), (b) Volume da amostra (μ L), (c) Volume de Cloridrato de Pararosanilina (μ L) e (d) Volume da Solução de Formaldeído (μ L).	53
Figura 3.2	Curva de calibração μ FBA	53
Figura 3.3	Gráfico dos resíduos para o modelo de calibração de sulfitos para o método μ FBA	54

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Acionamento das microbombas para determinação de sulfitos em bebidas no μ FBA ^a .	43
Tabela 3.1	Parâmetros selecionados do μ FBA proposto para a determinação sulfitos em amostras de bebidas.	51
Tabela 3.2	Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração de sulfitos a um nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$).	54
Tabela 3.3	Resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão para um nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$).	55
Tabela 3.4	Resultados dos testes de significância dos coeficientes linear e angular do modelo para um nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$).	55
Tabela 3.5	Valores médios e incertezas das concentrações das amostras de bebidas (n=3 para vinhos , whisky, e cerveja) para a determinação de sulfitos (mg L^{-1}) usando o μ FBA proposto e o método de referência.	56
Tabela 3.6	Resultados LOD e LOQ (mg L^{-1}) para a determinação de sulfitos em amostras de bebidas no instrumento proposto (μ FBA).	57
Tabela 3.7	Teste de recuperação de sulfitos em amostras de bebidas.	58
Tabela 3.8	Comparação das características analíticas do μ FBA proposta e outros procedimentos de fluxo a partir da determinação de sulfito em bebidas.	59

Lista de Siglas e Abreviaturas

μ-TAS	<i>Miniaturized total chemical analysis system</i> – sistema miniaturizado de análise química total
μFBA	<i>Micro flow-batch analyser</i> – microanalizador em fluxo-batelada
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
Dpi	<i>Dots per inch</i> – pontos por polegada
FBA	<i>Flow-batch analyser</i> – analisador em fluxo-batelada
FIA	<i>Flow injection analyser</i> – analisador por injeção em fluxo
IDA	Índice Diário Aceitável
LED	<i>Light emitting diode</i> – diodo emissor de luz
LIGA	<i>Lithography, galvo and abformung</i> – litografia, eletroformação e moldagem
LOD	<i>Limit of detection</i> – limite de detecção
LOQ	<i>Limit of quantitation</i> – limite de quantificação
MFA	<i>Multicommutation in flow analyser</i> – analisador em fluxo multicomutado
MSFA	<i>Monosegmented flow analyser</i> – analisador em fluxo monossegmentado
OPA	Orto-ftaldeído
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Poliestireno

PMMA	Polimetilmetacrilato
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Policloreto de vinila
REM	Radiação eletromagnética
SFA	<i>Segmented flow analysis – analisador em fluxo segmentado</i>
TAS	<i>Total chemical analysis system – sistema de análise química total</i>
UA	Uretana-acrilato
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível

Resumo

Título: um microanalisador fluxo batelada para determinação fotométrica de sulfitos em bebidas.

Os sulfitos são aditivos químicos com grande atuação na indústria de bebidas, entretanto o uso desses aditivos em excesso podem causar patologias e seu limite encontra-se no máximo de 0,7 mg/kg de SO₂ peso corpóreo por dia. Esse estudo propõe um microanalisador em fluxo batelada (μ FBA) para determinação fotométrica de sulfitos em bebidas. A microcâmara do μ FBA foi construído a partir da resina comercial uretana-acrilato e polimerizado em fotoexpositora de radiação ultra-violeta. O método fotométrico para determinação de sulfitos em bebidas baseou-se na reação dos sais de sulfitos, em meio ácido, com solução de formaldeído que posteriormente reagiu com a solução de cloridrato de pararosanilina originando, por fim, um complexo de cor violeta com absorção máxima em 565 nm. O modelo linear da curva analítica foi validada através da ANOVA, gráfico dos resíduos e teste *F* deixados pelo modelo. O limite de detecção foi de 0.08 mg L⁻¹ e o desvio padrão relativo inferior a 1,5% (*n* = 3). Foi realizado um teste de precisão avaliada através do teste de recuperação (96,8% a 102,6%). O μ FBA é potencialmente útil como uma alternativa para determinações fotométricas de sulfitos como parâmetros de qualidade de bebidas e rendimento de 240 amostras por hora, gerando baixo consumo de amostra e reagentes. Os resultados obtidos pelo μ FBA proposto comparado ao método convencional, não apresentou diferenças estatisticamente significativas na aplicação do teste *t* pareado com nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: portátil; microanalisador fluxo batelada; resina de uretano-acrilato; espectrofotometria; sulfito total; bebidas.

Abstract

Title: **A micro-flow-batch analyser for photometric determination of sulphites in beverages.**

Sulfites are chemical additives major role in the beverage industry, however, the excessive use of these additives can cause disease and its limit is a maximum of 0,7 mg/kg of body weight per day SO₂. This study proposes a micro-batch-flow analyser (μFBA) for photometric determination of sulphites in beverages. The μFBA was built from the commercial urethane-acrylate resin and polymerized exhibiting photo of ultra-violet radiation. The photometric method for the determination of sulfites in beverages based on the reaction of salts of sulfites in an acid medium with formaldehyde solution subsequently reacted with pararosaniline hydrochloride solution giving finally, a complex of violet color with maximum absorption at 565 nm. The linear model of the calibration curve was validated by ANOVA, residual plot and left by the F test model. The detection limit was 0,08 mg L⁻¹ and the relative standard deviation less than 1,5% (n = 3). A test precision assessed by recovery test (96,8% to 102,6%) was performed. The μFBA is potentially useful as an alternative to sulfites photometric determinations as parameters of quality of beverage and yield of 240 samples per hour, producing low consumption of sample and reagents. The results obtained by the proposed μFBA compared to the conventional method, no statistically significant differences in applying paired with a confidence level of 95% t-test.

Keywords: Portable; micro-flow-batch analyser; urethane-acrylate resin; spectrophotometry; total sulphite; beverages.

Capítulo 1

Introdução

1 Introdução

1.1 Caracterização da Problemática

Os aditivos alimentares são compostos químicos amplamente utilizados nas indústrias de bebidas e são encontrados, comumente, na forma de dióxido de enxofre (SO₂) e em sais inorgânicos como sulfitos de sódio, potássio e de cálcio. (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986).

Os sulfitos são considerados agentes inibidores da deterioração do produto ocasionada por bactérias, fungos e leveduras. Dessa maneira, os aditivos atuam como agentes antioxidantes evitando o escurecimento enzimático (LIU; PILONE, 2000; RIBERA et al 2001) do produto causado por ação desses microorganismos. Assim, a utilização desses aditivos na indústria de alimentos e bebidas é imprescindível para aumentar significativamente o prazo de validade dos produtos sem perda de sua qualidade (RIBERA et al 2001).

Entretanto, esses aditivos em excesso podem ocasionar danos à saúde humana, pois ingestões acima do índice diário aceitável (IDA), que corresponde a 0,7 mg/kg peso corpóreo/dia expressas na forma de SO₂, provocam sérios problemas, como por exemplo, broncoespasmos em pessoas asmáticas sensíveis a sulfitos (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986; YANG; PUCHASE, 1985; ANIBARRO et al, 1992; PERONI; BONER, 1985; VALLY; THOMPSON, 2003; WHO, 2000). Além disso, alguns casos de distúrbios neurológicos foram constatados em população com reduzida atividade da enzima sulfito oxidase. Tal enzima exerce a função redutora de sulfito a sulfato, o qual é excretado pelo organismo via renal (KISKER et al 1997; EDWARDS; JOHNSON; MARRIAGE; GRAF; COYNE; RAJAGOPALAN; MACDONALD, 1999).

Para o controle e monitoramento desses aditivos em bebidas é recomendado pela AOAC (Association of Analytical Communities) (AOAC, 1997) o método baseado na destilação Monier-Williams. Contudo, esse método apresenta algumas desvantagens, tais como o tempo total de

análise, o qual, para cada destilação, corresponde a aproximadamente 2 horas; é muito laborioso, pois envolve a execução de várias etapas, aumentando a possibilidade da ocorrência de erros; de difícil automação; e requer um consumo elevado de reagentes e amostras, elevando o custo por análise e a quantidade de resíduos gerados.

O desempenho analítico dos métodos usados para determinação de sulfitos em bebidas pode ser sensivelmente melhorado através da automação dos mesmos.

Uma alternativa proposta por Honorato e colaboradores são os denominados analisadores em fluxo-batelada (FBA – *Flow-Batch Analyser*). Por se tratarem de analisadores híbridos, agregam características vantajosas de analisadores em fluxo e de analisadores discretos (em batelada) (HONORATO et al, 1999). Recentemente, Monte e colaboradores (MONTE FILHO, 2010) propuseram a miniaturização do analisador FBA, culminando no desenvolvimento do microanalisador em fluxo-batelada (μ FBA – *micro-Flow-Batch Analyser*), que apresenta como principal característica a redução significativa da quantidade de resíduos, mantendo a velocidade analítica e a confiabilidade das análises de maneira similar ao FBA.

Sendo assim, a proposta de trabalho é o desenvolvimento de um microanalisador em fluxo batelada para determinação de sulfitos em bebidas alcóolicas fermentadas e fermento-destiladas. Como resultados esperados, o microanalisador desenvolvido deve proporcionar análises confiáveis, com baixo consumo de reagentes e de amostras, instrumentação e operação simples e elevada frequência analítica.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Desenvolver um microanalisador em fluxo batelada (μ FBA) para determinação de sulfitos em bebidas com detecção fotométrica.

1.2.2 Específicos

- Projeto e montagem do microanalisador proposto;
- Desenvolvimento de um programa computacional para gerenciamento do microanalisador;
- Levantamento dos parâmetros operacionais do μ FBA e de seu desempenho analítico;
- Validação do microanalisador proposto e aplicação do mesmo na determinação de sulfitos em amostras reais de bebidas.

1.3 Fundamentação teórica

1.3.1 Sulfitos em bebidas

Os agentes sulfitantes ou sulfitos são utilizados como ingredientes adicionais em bebidas e alimentos na forma de sais inorgânicos de sulfitos ou de dióxido de enxofre (SO_2) (TAYLOR, HIGLEY, BUSH, 1986; LECLERCQ, MOLINARO, PICCINELLI, BALDINI, ARCELLA, STACCHINI P., 2000). Além disso, tais compostos também podem resultar da ação de leveduras durante a fermentação de bebidas, principalmente de cervejas e vinhos (LECLERCQ et al 2000).

Os sulfitos inibem reações enzimáticas que favorecem o escurecimento em alimentos, principalmente por sua atuação como agentes redutores (LECLERCQ, MOLINARO, PICCINELLI, BALDINI, ARCELLA, STACCHINI, 2000; RIBERA; JONKER; NARBONNE; O'BRIEN; ANTIGNAC, 2001). Por tais razões, os sulfitos são largamente utilizados

em bebidas e alimentos (LECLERCQ et al 2000). Entretanto, em concentrações não controladas, os sulfitos podem acarretar efeitos nocivos à saúde, principalmente em relação à sua ingestão por indivíduos que apresentam crises asmáticas, além de outros problemas respiratórios (YANG; PURCHASE, 1985; FAZIO; WARNER, 1990; ANIBARRO; CABALLERO; GARCÍA-ARA; DÍAZ-PENA; OJEDA, 1992; WÜTHRICH B., KAGI M.K., HAFNER, 1993; PERONI; BONER, 1995; WARNER; DIACHENKO; BAILEY, 2000; VALLY; THOMPSON, 2003). Pessoas com distúrbios neurológicos também podem ser afetados pela toxicidade dos sulfitos. Outro exemplo está relacionado a um estudo populacional, em que foi observado que parte da amostra estudada possuía alteração na atividade enzimática de sulfito oxidase, ou seja, a conversão de sulfito a sulfato ficou comprometida não ocorrendo a excreção de sulfito (KISKER; SCHINDELIN; PACHECO; WEHBI; GARRETT; RAJAGOPALAN; ENEMARK; REES, 1997; EDWARDS; JOHNSON; MARRIAGE; GRAF; COYNE; RAJAGOPALAN; MACDONALD, 1999).

Essas ações patológicas ainda são bastante controversas devido aos mecanismos de intolerância presentes nos seres vivos, sendo a vertente mais aceita a que define tais ações como processos múltiplos em conjunto e explicados nas diferentes observações entre os casos registrados de sensibilidade aos agentes sulfitantes (ANIBARRO; CABALLERO; GARCÍA-ARA; DÍAZ-PENA; OJEDA, 1992; PERONI; BONER, 1985; VALLY; THOMPSON, 2003).

1.3.2 Legislação – Controle e Fiscalização

Os aditivos sulfitantes possuem legislação específica dependendo do país em que são utilizados. As quantidades adicionadas às bebidas durante o processo de produção ou estocagem das mesmas devem ser limitadas, considerando a menor concentração adicionada para obter o efeito desejado (BRASIL 1997).

O consumo de sulfitos deve apresentar valores de ingestão abaixo da Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é de 0,7 mg /kg de SO₂ por peso corpóreo/dia (WHO, 2000).

Nos países europeus a ingestão desses agentes foi questionada e pesquisas foram elaboradas para avaliar o uso indiscriminado dos sulfitos, sobretudo em bebidas alcoólicas. Tais estudos mostraram que a ingestão de vinhos pode aumentar a concentração de sulfitos para valores acima da IDA (MARESCHI; FRANÇOIS-COLLANGE; SUSCHETE, 1992; VERGER; CHAMBOLLE; BABAYOU; BRETON; VOLATIER, 1998).

Em muitos países, inclusive no Brasil, o controle e a fiscalização de aditivos, em especial sulfitos, seguem como referência as recomendações do JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) para ao uso seguro desses compostos em bebidas e alimentos (BRASIL, 1997). No Brasil a responsabilidade é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo a qual a concentração máxima de sulfitos permitida é de 350 mg L⁻¹ (BRASIL, 2002).

Por outro lado, na Europa exige-se que a quantidade desses aditivos não ultrapasse os valores de 160 mg L⁻¹ e de 210 mg L⁻¹ para vinhos tintos e brancos, respectivamente, estando a Comunidade Econômica Européia (CEE) responsável pelo controle e fiscalização (EUROPEAN COMMISSION, 2001).

Na América do Norte o órgão responsável, a Administração de Drogas e Alimentos (FDA – *Food and Drug Administration*), obriga informar concentração de sulfitos acima de 10 mg L⁻¹ em seus rótulos (FDA, 1996).

Diante do exposto, justifica-se a necessidade e o controle da concentração de sulfitos em bebidas e alimentos, sobretudo com o uso de técnicas analíticas na determinação de tais aditivos, já que alguns procedimentos analíticos apresentam dificuldades em decorrência da elevada reatividade desses compostos (MACHADO, 2007; WEDZICHA, 1997).

1.3.3 Métodos para determinação de sulfitos

Diversos métodos são empregados para determinação de sulfitos em bebidas utilizando como princípio a conversão das variadas formas de sulfitos em SO_2 (WARNER; DIACHENKO; BAILEY, 2000).

O sistema de destilação Monier-Williams otimizado (figura 1.1) para a determinação analítica de sulfitos é considerado o método oficial pela FDA.

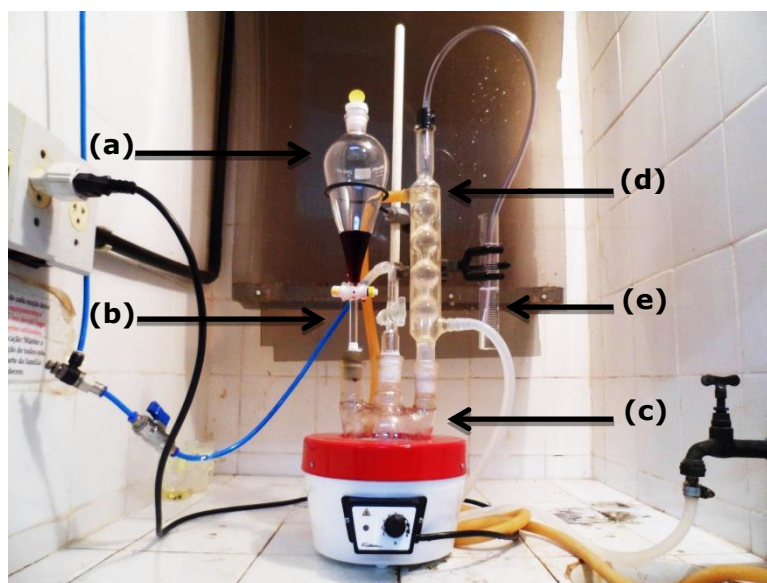
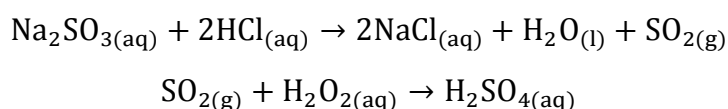


Figura 1.1: Destilação Monier-Williams otimizado pela FDA (a) funil de adição, (b) entrada de gás nitrogênio, (c) balão de 3 vias, (d) condensador de bolas, (e) borbulhador e frasco coletor de SO_2 .

Entre as décadas de 80 e 90, a FDA propôs, nos Estados Unidos, possíveis alterações no método Monier-Williams de destilação, já que esse método não detectava satisfatoriamente sulfitos com concentrações superiores a 10 mg L^{-1} em matrizes de alimentos (AOAC, 1995). O método Monier-Williams otimizado pela FDA foi utilizado para a determinação de SO_2 em vários tipos de alimentos, desde frutas secas a bebidas comercializadas nos Estados Unidos (FDA, 1996).

Esse método corresponde ao processo Monier-Williams, também conhecido como destilação de Monier-Williams (ANIBARRO; CABALLERO; GARCÍA-ARA; DÍAZ-PENA; OJEDA, 1992; WARNER; DIACHENKO; BAILEY,

2000). O mesmo fundamenta-se em separar o SO₂ de sua matriz pelo seu aquecimento em meio ácido durante duas horas. Em seguida, o SO₂ formado é transportado através de um fluxo de nitrogênio e, ao entrar em contato com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sofre oxidação transformando-se em ácido sulfúrico (reação 1). Finalmente, o ácido formado pode ser determinado por titulação ácido-base com solução de hidróxido de sódio (NaOH).



Reação 1: Oxidação do sulfito de sódio (aditivo) a dióxido de enxofre e originando ácido sulfúrico na presença de peróxido de hidrogênio.

Assim, a concentração encontrada de SO₂ é diretamente proporcional à quantidade de ácido sulfúrico (H₂SO₄) formado (HILLERY; ELKINS; WARNER; DANIELS; FAZIO, 1985; LÜCK; JAGER, 1986).

Outro procedimento utilizado na indústria é o método Ripper, uma titulação iodométrica com a finalidade de monitorar os sulfitos livres diretamente relacionados à produção de vinhos. (OUGH, 1996; WILLIAMS; SCUDAMORE-SMITH; NOTTINGHAM; PETROFF, 1992; BRASIL, 2005). Esse método consiste na quantificação direta de SO₂ presente na amostra. Para isso adiciona-se solução de H₂SO₄ à amostra com o objetivo de liberar o SO₂ e diminuir a oxidação de polifenóis presentes na mesma pela adição de iodo. Quanto menor o pH do meio, maior a concentração de SO₂ liberada e por tal motivo a titulação subsequente deve ser realizada o mais rápido possível para evitar perdas significativas (ZOECKLEIN et al., 2001). O método Ripper possui como desvantagens a baixa precisão e elevados erros sistemáticos devido à dificuldade de visualização do ponto de viragem em matrizes como vinho tinto, nas quais ocorrem variações devido a presença de adutos formados pela ligação entre antocianinas e íons hidrogenossulfito (HSO₃⁻). Tais adutos dissociam-se com grande facilidade em meio ácido e o SO₂ liberado é titulado como sulfito livre,

motivo pelo qual não é recomendado como método de referência pela AOAC (VAHL; CONVERSE, 1980).

Outros métodos são propostos para determinação de sulfitos em bebidas objetivando a substituição da titulação. Entre eles a CLAE (WILLIAMS; SCUDAMORE-SMITH; NOTTINGHAM; PETROFF, 1992) com detector eletroquímico, adotada por algumas indústrias na determinação de SO₂ total em vinhos. Uma vantagem do método cromatográfico é a simplicidade na preparação da amostra e o tempo de análise, em média de 10 a 12 minutos. A principal desvantagem desse método está relacionada à demora na estabilização do detector eletroquímico, tempo médio de 10 a 12 horas, além do elevado custo desde o equipamento à coluna utilizada (WILLIAMS; SCUDAMORE-SMITH; NOTTINGHAM; PETROFF, 1992).

1.3.4 Métodos espectrofotométricos UV-Visível

A Espectrofotometria de Absorção Molecular no Ultravioleta-Visível é baseada na absorção da radiação eletromagnética por espécies moleculares, sendo utilizada como instrumento analítico na determinação de espécies orgânicas e inorgânicas (PATNAIK, 2004).

Os instrumentos espectrofotométricos utilizados nas regiões do Ultravioleta-Visível (figura 1.2) apresentam, basicamente, cinco componentes: uma fonte estável de radiação (figura 1.2(a)), um seletor de comprimento de onda para limitar o espectro da medida (figura 1.2(b)), um recipiente para armazenar a amostra (figura 1.2(c)), um detector que faz a conversão da energia radiante em sinal analítico (figura 1.2(d)) e um software que realiza o processamento do sinal através de um computador (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

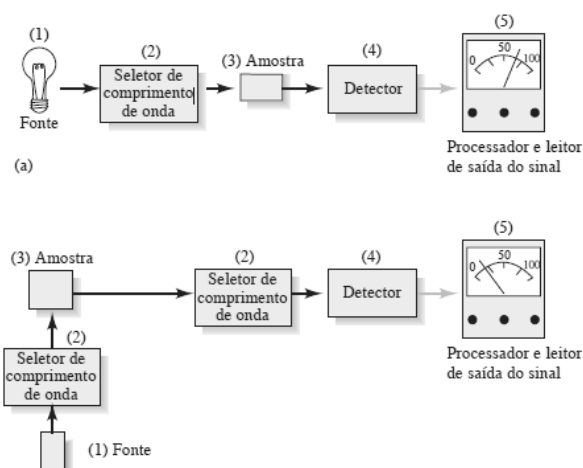


Figura 1.2: Representação esquemática dos principais componentes de instrumentos espectrofotométricos: (1) fontes de radiação, (2) seletores de onda, (3) câmara amostras, (4) sistemas de detecção e (5) sistema resposta do sinal analítico. Fonte: (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

A Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível utiliza radiação eletromagnética com comprimentos de onda variando de aproximadamente 190 a 780 nm. Os espectrofotômetros e fotômetros são instrumentos ópticos empregados em meio científico, industrial e clínico para medidas quantitativas nessa região espectral (FRENZEL; MCKELVIE; PHOTOMETRY; KOLEV; MCKELVIE, 2008).

A lei de Beer informa que a absorbância medida depende da concentração das espécies absorventes e da extensão do caminho através do qual ocorre o fenômeno de absorção, mais conhecido como caminho óptico (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

A absorbância de uma solução está relacionada matematicamente com a transmitância de maneira logarítmica (equação 1.1).

$$A = -\log T = A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (1.1)$$

Portanto, a absorbância de um analito quando aumenta, em contrapartida sua transmitância decresce (figura 1.3) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

Solução Absorvente

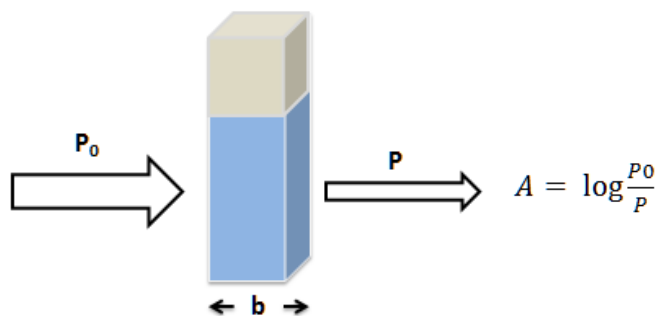


Figura 1.3: Representação da relação absorbância e transmitância em analito.

1.3.5 Análises fotométricas

As análises fotométricas ou fotometria estão associados as medidas realizadas em instrumentos para análises quantitativas desde o Ultravioleta-Visível ao Infravermelho próximo, designados fotômetros (FRENZEL; MCKELVIE, 2008).

Um fotômetro basicamente é composto de uma fonte de energia estável, recipiente para a amostra, seletor de radiação, fototransdutor e um processador de sinal (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; UGUCIONE; CARDOSO, 2007).

Frequentemente são utilizados lâmpadas de tungstênio como fonte de radiação, além de filtros e lentes ópticas, que são todos componentes de custo elevado. Uma alternativa eficiente foi a utilização de diodos emissores de luz, conhecidos com LEDs (*light-emitting diode*) (figura 1.4), como fonte estável de energia radiante. As principais vantagens do uso dos LEDs estão principalmente no baixo consumo de energia, custo de aquisição, boa estabilidade e elevada vida útil (UGUCIONE; CARDOSO, 2007).



Figura 1.4: LEDs comerciais.

Fonte: <http://www.greenprophet.com/2012/09/led-lights-health-hazard/>

Muitos sistemas que usam os LEDs na parte óptica são bastantes relatados na literatura desde meados da década de 1970. Essa utilização está devido às características de fácil operação dos LEDs serem combinados com detectores de luz de forma simples e econômica na confecção de instrumentos fotométricos ou espectrofotométricos.

Por não precisar de circuitos eletrônicos bem elaborados para seu controle, os LEDs podem trabalhar de modo contínuo ou através de pulsos. Também são empregados como fonte de radiação semi-monocromática ou unido a filtros de interferência para se obter uma faixa de radiação mais estreita (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; DASGUPTA, 2003).

1.3.6 Sistemas automáticos de análise

Os sistemas automáticos de análises apresentam grande empregabilidade em laboratórios de pesquisas e, principalmente, em laboratório clínicos, dada a demanda diária de diagnósticos precisos e rápidos (VALCÁRCEL; CÁRDENAS, 2000).

Esses analisadores automáticos apresentam vantagens como, alta frequência analítica, menor taxa de erro operacional devido à baixa interferência do operador e baixo consumo de reagentes e amostras (KOLEV; MCKELVIE, 2008).

O primeiro analisador em fluxo surgiu na década de 50 (SKEGGS, 1957) e até hoje inúmeros outros têm sido propostos. Assim, várias combinações foram anexadas aos analisadores em fluxo como aspiração ou bombeamento de amostras, tipo de confluência, segmentação de amostras, tudo isso para melhor adaptação do sistema visando o método desejado.

Um dos primeiros analisadores em fluxo foi o analisador em fluxo contínuo (CFA), também denominado como analisador em fluxo segmentado (SFA – *Segmented Flow Analyser*) (SKEGGS, 1957).

Ruzicka propôs na década de 70 o analisador por injeção em fluxo (FIA), nesse analisador a amostra injetada é carregada por um líquido transportador não segmentado (RUZICKA; HANSEN, 1975). No FIA as determinações podem ser realizadas sem a necessidade de atingir o equilíbrio químico.

O analisador em fluxo monossegmentado (MSFA – *Monossegmented Flow Analyser*) surgiu na década de 80. Nesse sistema, idealizado por Pasquini e colaboradores, a amostra é introduzida por um fluido carregador e o segmento é originado por meio de duas bolhas de ar, cujo conjunto é denominado monossegmento (PASQUINI; OLIVERIA, 1985). O monossegmento é formado pela amostra e reagente, ocorrendo nele a reação química. Este posteriormente é transportado ao detector que pode ser fotométrico, potenciométrico, etc... (PASQUINI; OLIVERIA, 1985). As principais vantagens desse analisador são a elevada frequência analítica, baixa dispersão da amostra, maior sensibilidade, baixo consumo de amostra e reagentes, além disso, o mesmo pode ser utilizado para reações de cinética lenta.

Em 1990, Ruzicka e Marshall propuseram o analisador por Injeção Sequencial (SIA) que funciona com uso de uma válvula principal chamada *multi-port*, responsável pela seleção do reagente, amostras ou tampões que serão aspirados em sequência para um reator em que ocorre a homogeneização e reação. Posteriormente o volume presente no reator é bombeado para o sistema de detecção (RUZICKA; MARSHALL, 1990). O

analisador SIA é muito utilizado em diversas aplicações devido às multitarefas realizadas, além das vantagens como baixo consumo de reagentes e amostras e alta reprodutibilidade. Todavia, a frequência analítica é muito baixa, cujo motivo pode estar relacionado à aspiração sequencial quando em contraste com os demais analisadores em fluxo (LENEHAN; BARNETT; LEWIS, 2000).

Em 1994 Reis e colaboradores desenvolveram o analisador em fluxo com multicomutação (MFA – *Multicommutation in Flow Analyser*). Nele utilizam-se válvulas e minibombas solenóides para fins de comutação entre os fluidos aumentando assim a versatilidade do sistema (REIS, 1994). A principal particularidade do MFA é a inclusão de alíquotas da amostra e de reagente de forma binária, permitindo a formação de zonas reacionais que são transportadas por fluxo carregador. A origem dessas zonas reacionais beneficia o processo de homogeneização entre a amostra e o reagente, não afetando na frequência analítica (ROCHA, 2002).

Em 1999 surgiu um novo analisador proposto por Honorato e colaboradores (HONORATO, 1999) denominado de analisador fluxo batelada (FBA – *Flow-Batch Analyser*). O FBA traz todas as características vantajosas dos outros analisadores automáticos em fluxo preservando as características de modelos convencionais em batelada. O diagrama do FBA proposto por Honorato et al. (HONORATO, 1999) está apresentado ilustrativamente na figura 1.5.

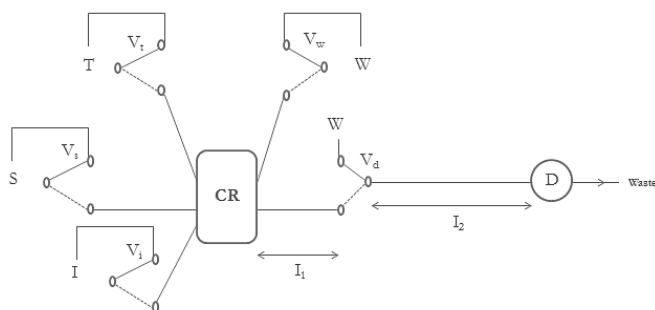


Figura 1.5: diagrama esquemático de um analisador fluxo-batelada: CR: câmara reacional (câmara de mistura); Vt: válvula do titulante; Vs: válvula da amostra; Vi: válvula do indicador; Vw: válvula da água; W: descarte; D: detector.

A câmara de mistura (CM) representa a principal vantagem do analisador FBA, pois nessa câmara ocorre a maior parte dos procedimentos laboratoriais como homogeneização, adição dos reagentes e amostras pelas válvulas, diluições, além da possibilidade de acoplar o sistema de detecção à mesma. A câmara possui formato cilíndrico e é composta de politetrafluoreto de etila (PTFE), um polímero de adição conhecido comercialmente por TEFLON® ou de uma resina acrílica, o polimetilmetacrilato (PMMA).

O FBA apresentou várias aplicações ao longo do tempo, como aplicações de titulação automática com uma frequência analítica de 20 amostras por hora e um consumo de 0,6 mL por amostra (HONORATO, 1999). Também foi utilizado o uso do FBA para determinação de ferro III em águas, a frequência analítica foi de 30 amostras por hora (CARNEIRO, 2002). Outra utilização do FBA foi para determinação de sódio em combustão etanol, o analisador proposto apresentou uma frequência analítica de 80 a 140 amostras por hora (ALMIDA, 2003) entre outras aplicações (DINIZ, 2012).

1.3.7 Miniaturização de sistemas automáticos

A miniaturização de analisadores automáticos tornou-se uma tendência marcante nos últimos anos. A Química Analítica, em especial, beneficiou-se com o surgimento de sistemas automáticos miniaturizados, substituindo equipamentos de detecção convencionais por equivalentes em escala menor, precisos e portáteis (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008). Outros fatores importantes como a redução no consumo de reagentes e amostras e a reduzida geração de resíduos, este último de grande relevância para as exigências da Química Verde (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008).

Na década de 90 Manz et al (MANZ; GRABER; WIDMER, 1990) propuseram o conceito de Microsistema de Análise Total (μ TAS – *Micro Total Analysis System*), no qual um pequeno chip possuindo estruturas

internas de escala ainda menor teria a função de realizar todo um procedimento analítico desde o preparo da amostra até a detecção da mesma.

Além disso, a área da microeletrônica trouxe grande contribuição para o avanço da miniaturização (SILVA, 2012). Materiais como quartzo, vidro e silício são utilizados rotineiramente para a fabricação de circuitos integrados (CIs) através de técnicas como a corrosão em meio aquoso ou em meio seco (FONSECA, 2008), nas quais regiões específicas do substrato são atacadas por um banho químico ou por plasma. Em seguida, nos CIs, a selagem é realizada juntando-se a placa com seus canais com outra placa de substrato em altas temperatura e pressões (WHITESIDES, 2008). Como resultado final os canais bem definidos resultam em materiais inertes a ataques químicos. Tais procedimentos necessitam de tecnologias de alto custo que requerem condições especiais de trabalho, como sala com elevado controle de limpeza e reagentes em altas concentrações, tornando os citados processos limitados para fins de pesquisa.

Para minimizar esses problemas, várias estratégias de microfabricação vem sendo empregadas como o uso de polímeros (FONSECA, 2008; WHITESIDES, 2008). Esses materiais apresentam vantagens do ponto de vista da resistência química e mecânica, além da relativa facilidade no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos a custos reduzidos quando comparados com as técnicas convencionais de fabricação de CIs. Os polímeros mais utilizados na microfabricação são os de características elásticas, denominados elastômeros, podendo-se citar como exemplos o policloreto de vinila (PVC), o copolímero estireno-butadieno-estireno (SBS) e o poliestireno (PS). Os polímeros elastômeros não necessitam de investimentos tecnológicos elevados para serem manipulados, o que os tornam bons materiais para a inovação da instrumentação analítica (WHITESIDES, 2008).

1.3.8 Microfabricação em uretana-acrilato

A microfabricação consiste no processo de gravação de minicanais utilizando como substrato comercial a resina poliuretana-acrilato e foi sugerido por Fernandes e Ferreira no início do século XXI (FERNANDES; FERREIRA, 2006). Comercialmente encontra-se disponível na forma de oligômeros (Cytec[®]), cuja fórmula estrutural está representada na figura 1.6, os quais são sensíveis à radiação ultravioleta, polimerizando-se pela ação desta (FERNANDES, 2006).

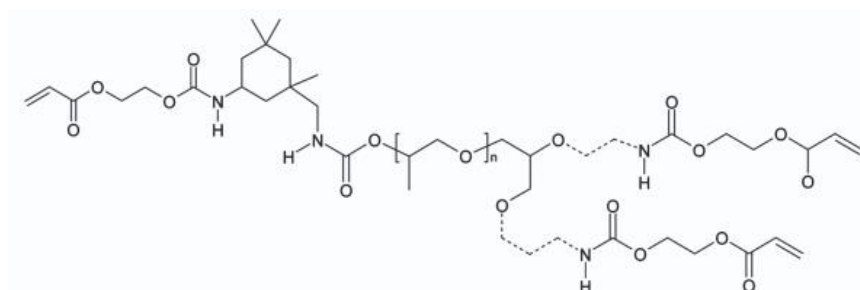


Figura 1.6: Fórmula estrutural do oligômero de uretano-acrilato.

Utilizando o referido oligômero é possível obter minicanais de até 0,25 mm de diâmetro, pois esse material é um elastômero com boa resolução dos canais e possui resistências física e química desejáveis para os procedimentos analíticos (FONSECA, 2007, 2008; FERNANDES, 2006).

Sua estrutura microscópica é composta por uma mistura homogênea de aglomerações do polímero poliácrlato disperso em um mar de cadeias do poliuretano fixas em ligações cruzadas e propriedades termorrígidas. A cobertura de *tonner* impede a polimerização nas áreas estabelecidas pelo *layout*, permitindo desse modo à formação dos canais (FONSECA, 2007, 2010).

O processo de miniaturização em uretana-acrilato tem início no projeto gráfico do *layout* dos minicanais, normalmente executado em *softwares* gráficos como o Corel Draw ou AutoCad (FONSECA, 2007; FILHO, 2010). Prossegue-se pela impressão do *layout* em películas de

transparência para retroprojektor utilizando-se uma impressora a *laser* (FERNANDES, 2010).

A figura 1.7 ilustra o processo de microfabricação em uretana-acrilato. A largura do dispositivo é determinada pela espessura da moldura da borracha utilizada. A base do protótipo é uma fina placa de acrílico, pois esse material não sofre influência da radiação ultravioleta empregada na polimerização (ANIBARRO; CABALLERO; GARCÍA-ARA; DÍAZ-PENA; OJEDA, 1992).

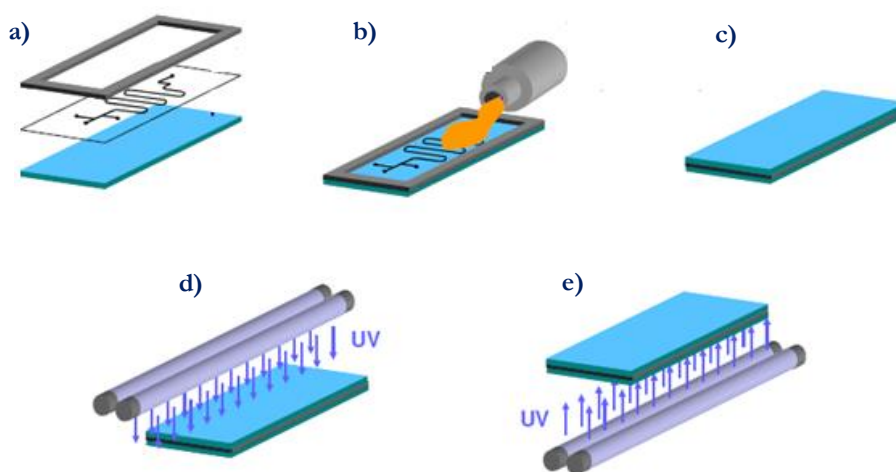


Figura 1.7: Esquema geral simplificado para microfabricação em uretana-acrilato. (a) montagem do molde, (b) deposição da resina, (c) fixação da resina, (d) polimerização pela radiação ultravioleta.

De acordo com a figura 1.7, a resina é depositada cuidadosamente sobre o protótipo visando preencher todo o volume e de modo a evitar a formação de bolhas de ar (figura 1.7(b)). Posteriormente, outra placa de acrílico é fixada sobre o protótipo com resina assegurando a uniformidade da mesma (Figura 1.7(c)). Em seguida o protótipo é levado para uma expositora fotolitográfica com fonte de radiação ultravioleta, podendo ser utilizado um equipamento para a confecção de carimbos vendido comercialmente. A incidência de raios ultravioleta resulta na polimerização (Figura 1.7(d)), cujo tempo depende da intensidade da radiação e da espessura do protótipo. Sendo assim, quanto menor o molde mais rápida e eficiente é a polimerização (FILHO, 2010). Após a polimerização do

material o mesmo deve ser removido cuidadosamente de seu molde para não haver danos aos canais formados. Geralmente, utiliza-se um banho de ultrassom com solução detergente para remover as partes não polimerizadas que originaram os canais (FONSECA, 2008).

1.3.9 Microanalisador em Fluxo-Batelada

Obversando as características de analisadores FBA, um novo analisador foi proposto apresentando mais vantagens e sendo denominado de microanalisador em fluxo batelada, do inglês (μ FBA – *micro-flow-batch analyser*). O mesmo foi desenvolvido por Monte Filho et al (2010) pelo processo de microfabricação descrito na seção 1.3.8 (MONTE FILHO, 2010). O novo microanalisador automático possui como principal característica uma câmara de mistura de tamanho bastante inferior quando comparado ao FBA convencional. Assim, menores são os volumes de amostras, de reagentes, de soluções de limpeza e de resíduos por análise. Adicionalmente, o sistema de detecção pode ser acoplado à microcâmara de mistura adequando este sistema para técnicas espectrofotométricas, fluorescentes, potenciométricas e voltamétricas (LIMA, 2010).

O analisador μ FBA foi adaptado para a determinação fotométrica (com tartarato ferroso) e turbidimétrica (com cobre (II) em meio tamponado) da quantidade de taninos totais em chás verdes e pretos (FERNANDES; FERREIRA, 2006). Os resultados obtidos mostraram uma alta velocidade analítica para os dois métodos ópticos: 300 análises por hora para o fotométrico e 200 análises por hora para o turbidimétrico. Para ambas os métodos os volumes de resíduos foram inferiores a 70 μ L.

Outra aplicação do μ FBA foi a determinação de fósforo em amostras de biodiesel utilizando azul de molibdênio. Medidas de absorvância foram feitas a 850 nm empregando um LED infravermelho integrado à microcâmara de mistura. Esse método apresentou frequência analítica de

cerca de 190 análises por hora e baixo consumo de reagente por análise (32 µL) (LIMA; BARRETO; ANDRADE; NETA; ALMEIDA; ARAÚJO, 2012a).

Capítulo 2

Experimental

2.1 Preparação de reagentes, amostras e soluções

As amostras e soluções utilizadas para determinação de sulfitos foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água recém deionizada ($\rho > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) pelo sistema Milli-Q Plus® (Millipore). Além disso, todas as soluções, padrões e amostras, após suas preparações, foram armazenadas em frascos âmbar.

Para o método de referência, a destilação Monier-Williams, foram preparadas: solução padrão aquosa de etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) a 5%, solução de ácido clorídrico (HCl , 4 mol L^{-1}), solução de H_2O_2 (30% v/v), solução do indicador vermelho de metila ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) a 0,25% v/v e solução de NaOH a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada com biftalato de potássio a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Também foram preparadas, para o método proposto: solução de formaldeído (0,2% v/v) e solução de cloridrato de pararosanilina ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3$) em HCl concentrado, $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 2$.

Foram preparadas amostras pela diluição de 1,0 mL de bebida (vinho branco, vinho tinto, cerveja e whisky) em 10,0 mL de água destilada totalizando 12 amostras: 3 de vinho tinto, 3 de vinho branco, 3 de cerveja e 3 de whisky. As bebidas foram adquiridas em supermercados locais da cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil).

2.2 Determinação de sulfitos

O método proposto baseou-se no processo de redução do ânion sulfito até formação do complexo ácido trifeniltriaminometanossulfônico de cor violeta, o qual apresenta absorvância máxima em 565 nm. Foram utilizadas soluções de formaldeído, de sulfito de sódio, em meio ácido e de cloridrato de pararosanilina originando, por fim, o complexo, a figura 2.1 representa essa reação.

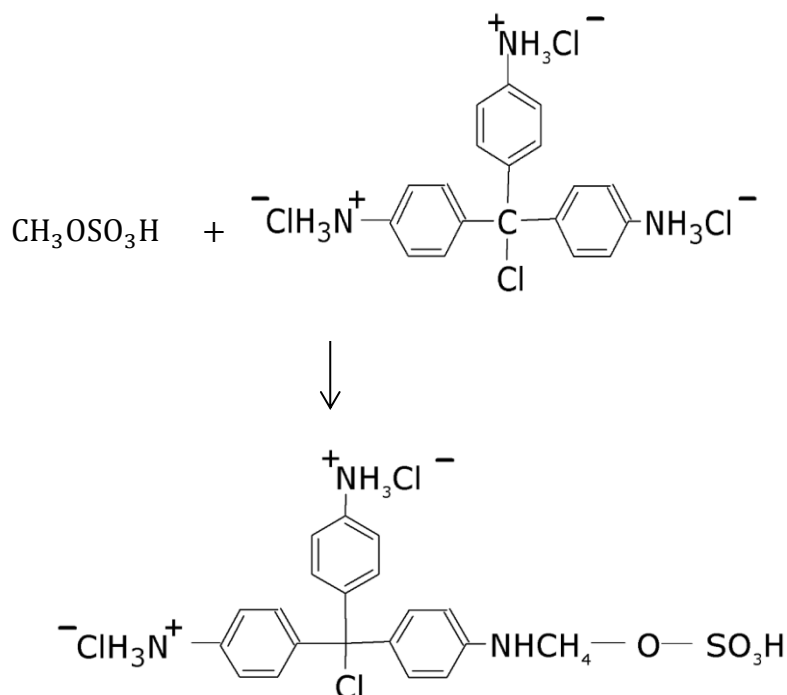


Figura 2.1: Reação do formaldeído, sulfito de sódio, em meio ácido, e cloridrato de pararosanilina originando o complexo de cor violeta de absorbância máxima em 565 nm.

2.3 Método de avaliação da performance analítica

Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para a avaliação dos modelos lineares baseados no Método dos Mínimos Quadrados (MMQ). Adicionalmente, alguns parâmetros de desempenho do μFBA proposto foram estimados, como o limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ) e a faixa de trabalho.

2.4 Construção do μFBA

O microanalisador é constituído de cinco microbombas solenóides (MLP-200TF, Takasago Fluidic System). As cinco microbombas solenóides foram calibradas em termos de volume para cada pulso operacional. As microbombas de um a quatro (μB_1 – μB_4), foram calibradas para operar

com 8 μL de volume por pulso. A quinta microbomba (μB_5) foi calibrada para operar com 20 μL de volume por pulso.

A condução dos fluidos ocorre através de tubos de Teflon[®] com 0,5 mm de diâmetro interno. A agitação no microanalisador foi realizada com a inserção de uma haste de nylon apresentando um diâmetro de 0,4 mm e um motor de driver de DVD foi acoplado, modelo MDN3GT3CPAC, com rotação de 2000 rpm e tensão 5 V. Para melhor acondicionamento dos dispositivos do microanalisador, uma caixa de montagem universal escura de tampa em U (100,0 x 80,0 x 40,0 mm) foi utilizada. O microanalisador apresenta uma fonte de alimentação de corrente contínua (CC) para o LED e fototransistor acoplado.

Um LED verde (565 nm) foi empregado como fonte de radiação para realização das análises químicas e para a detecção do sinal foi utilizado um fototransistor.

Para o acionamento das microbombas solenóides e do agitador utilizou-se um controlador de válvulas, além disso, a interconexão desses componentes ocorreu por meio de um microcomputador e uma interface USB da *National Instruments*[®], modelo USB6009. O software *LabVIEW*[®] 7.1 também da *National Instruments* foi utilizado no controle dos equipamentos.

Todos os equipamentos foram controlados via software através de um programa apropriado para o controle do microanalisador automático.

As medidas foram realizadas com o sistema fechado, isentando o detector de interferência da radiação externa do ambiente.



Figura 2.2: Representação do micronalisador fluxo batelada para a análise de sulfitos em bebidas: (a) interface USB, (b) acionador de válvulas, (c) frascos das soluções e (d) microbombas solenoides.

2.5 Confecção da microcâmara

Para o desenvolvimento da máscara de *layout* dos canais do microanalisador empregou-se o programa CorelDRAW® X5. A impressão dos *layouts* em transparência para impressoras a *laser* foram realizadas por uma impressora HP LaserJet P2014.

O polímero uretana-acrilato para a confecção da microcâmara foi adquirido no comércio de confecções de carimbos da Indústria de Carimbos Medeiros Ltda (*MacDermid, flex-light trademark* M050). Também foi empregada uma fotoexpositora, modelo *fotolight* MD2 A4, para a realização da fotolitografia no ultravioleta, também adquirida na indústria de Carimbos Medeiros. Para a reação de polimerização utilizou-se lâmpadas negras SCT, modelo T8 BLB de 15 Watts. Ao término da polimerização do substrato, foi utilizado um banho maria com ultrassom (Unique 800a) para remoção da resina não-polimerizada dando origem aos canais da microcâmara.

O processo de confecção do μ FBA proposto está ilustrado na figura 2.2. No protótipo para deposição da resina foram utilizadas duas transparências com o *layout* impresso do microanalisador (figura 2.2(a)), em seguida ocorrendo o depósito da resina (figura 2.2(b)). Utilizando as

lâmpadas negras observou-se que após cerca de 150 s houve polimerização da parte superior de ambas as peças e 350 s para a parte inferior das mesmas. Para a etapa final ou etapa de selagem, o tempo utilizado foi de 900 s para ambos os lados garantindo uma selagem suficiente e irreversível (Figura 2.2(d)) (PASQUINI; OLIVERIA, 1985).

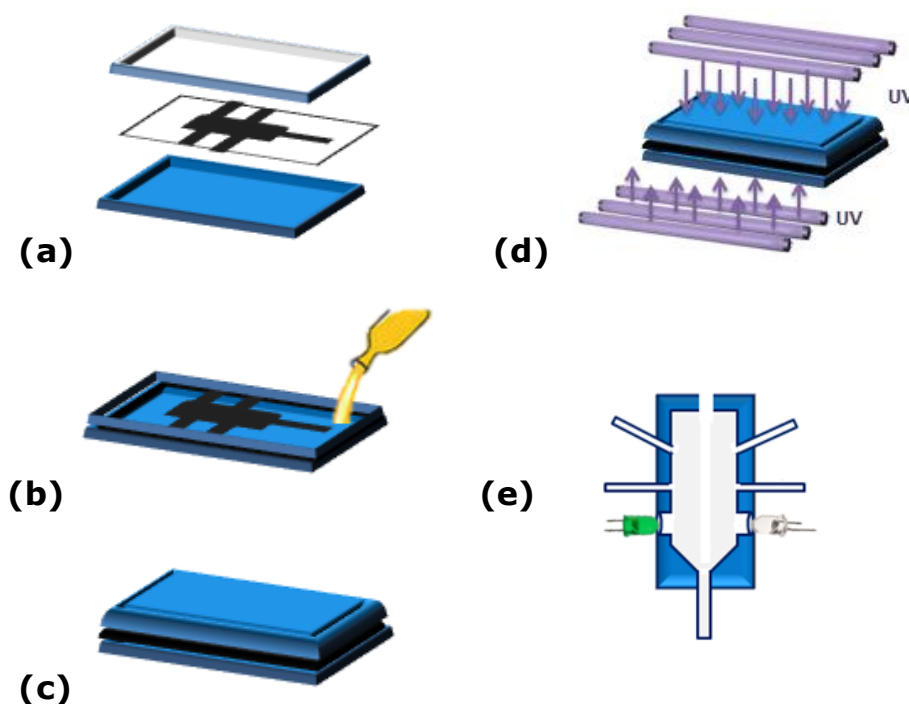


Figura 2.3: Projeto da confecção do μ FBA. (a) montagem dos moldes e da camada, (b) polimerização da resina nas camadas, (c) canais gravados, (d) selagem do sistema e (e) microcâmara μ FBA confeccionado.

Na microcâmara foram fixados tubos de vidro e de Teflon® com o sistema selado. A segunda etapa, a polimerização da resina por meio de radiação ultravioleta, foi realizada na fotoexpositora. Adicionou-se, ainda, uma pequena quantidade de resina com auxílio de um pincel na superfície de contato dos materiais com a finalidade de adesão irreversível dos tubos de vidro e de Teflon® à microcâmara. Em seguida procedeu-se à selagem da resina adicionada empregando o mesmo tempo utilizado na primeira selagem (900 s) (Figura 2.2(d)).

As dimensões finais da microcâmara foram 7,0 mm de câmara reacional, com uma largura 5,0 mm, sendo esse o comprimento do seu caminho óptico. O volume interno máximo da microcâmara corresponde a

aproximadamente 100 μL , porém com apenas 50 μL preenche-se completamente o caminho óptico.

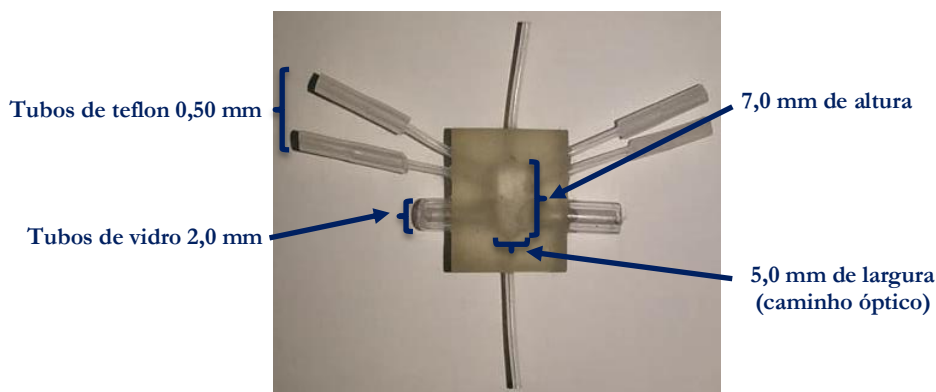


Figura 2.4: Microcâmara μFBA em uretana-acrilato.

2.6 Procedimento analítico

O diagrama do microanalisador automático para determinação fotométrica de sulfitos em amostras de bebidas é ilustrado na Figura 2.4.

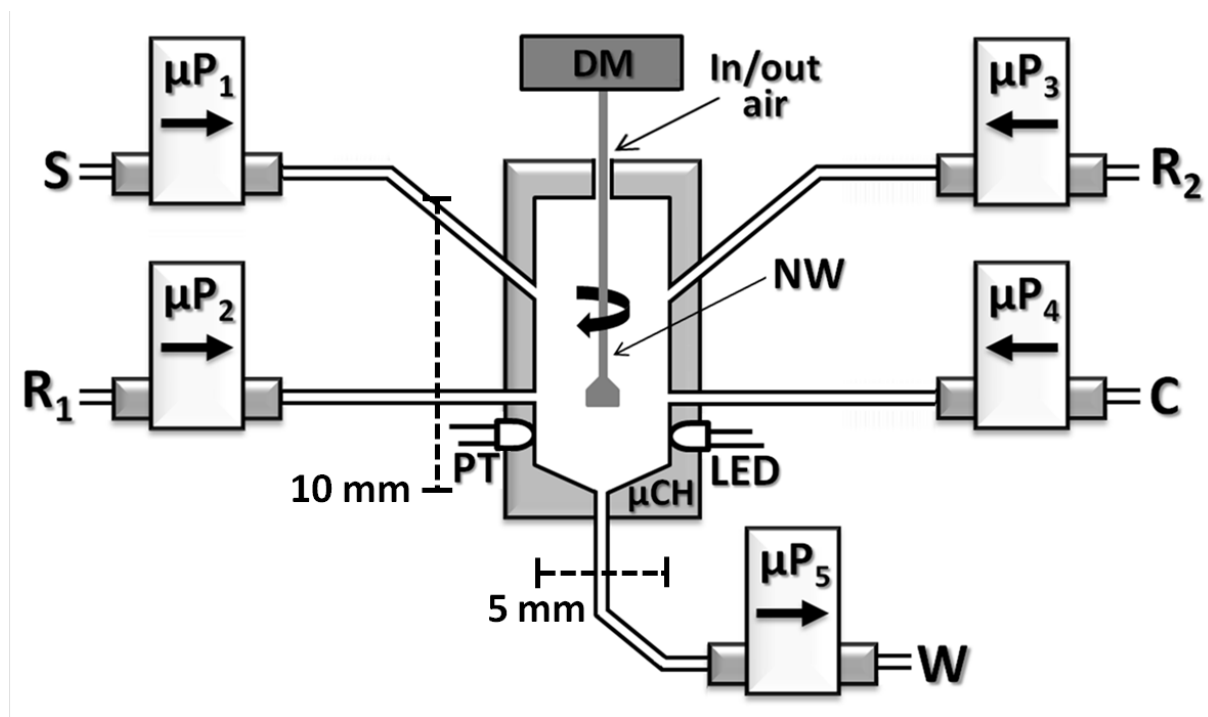


Figura 2.5: Diagrama do μFBA - μC = microcâmara; microbombas solenóides= μB_1 , μB_2 , μB_3 , μB_4 , μB_5 ; FT = fototransistor; motor drive, haste de nylon e LED.

As setas representadas no diagrama do μFBA indicam o movimento dos fluidos. Assim, as microbombas μB_1 , μB_2 , μB_3 , μB_4 injetam amostra,

reagentes e água. A microbomba μB_5 tem como função o descarte de todo material.

As etapas de operação do microanalisador para a determinação de sulfitos em bebidas encontram-se descritas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 Acionamento das microbombas para determinação de sulfitos em bebidas no μFBA^a .

Etapas	Descrição	μB_1	μB_2	μB_3	μB_4	μB_5	Pulsos^(b)	Tempo (s)
1	Adição da amostra e reagente (A e R1)	1/0	1/0	0	0	0	2	0,8
2	Homogeneização usando motor na microcâmara (μC)	0	0	0	0	0	0	2,0
3	Adição do reagente (R2)	0	0	1/0	1/0	0	2	0,8
4	Homogeneização usando motor na microcâmara (μC)	0	0	0	0	0	0	2,0
5	Leitura do sinal analítico	0	0	0	0	0	0	1,0
6	Descarte (D)	0	0	0	0	1/0	3	1,2
7	Limpeza com água deionizada (C)^c	0	0	0	1/0	0	6	2,4
8	Descarte de limpeza (D)^c	0	0	0	0	1/0	3	1,2

^aCódigo de 1/0 e 0 indicam respectivamente, acionamento e não acionamento das micro-bombas solenóides.

^b 2 pulsos para cada atuação da microbomba.

^c As etapas 7 e 8 são repetidas duas vezes para cada amostra.

A etapa 1 indica a configuração de pulsos das microbombas μB_1 e μB_2 (amostra e R1 – solução de formaldeído) em que são acionadas,

simultaneamente, para o enchimento de canais, em seguida na etapa 2 ocorre uma homogeneização da solução formada.

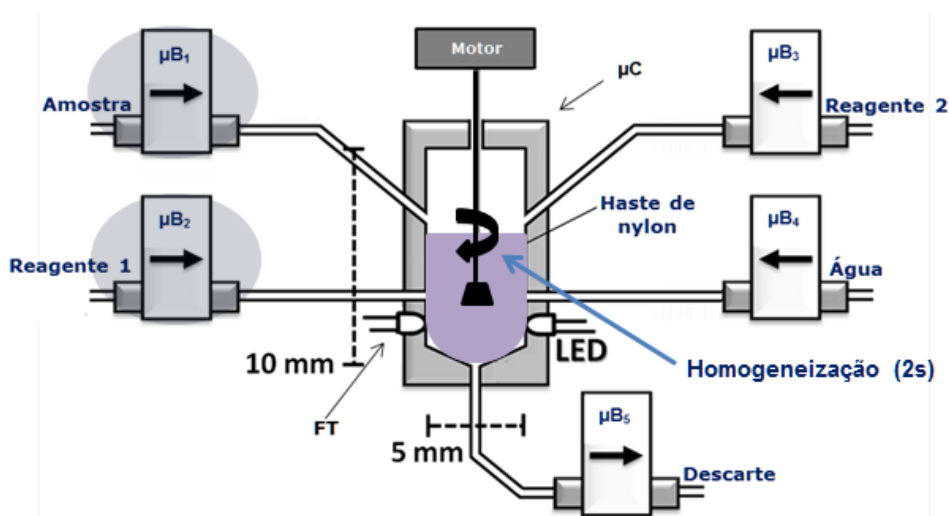


Figura 2.6: Acionamento das microbombas μB_1 e μB_2 e homogeneização, representados pelas etapas 1 e 2.

Na etapa 3 são acionadas as microbombas μB_3 e μB_4 (R2 – solução de cloridrato de pararosanilina e água) também para interior da microcâmara.

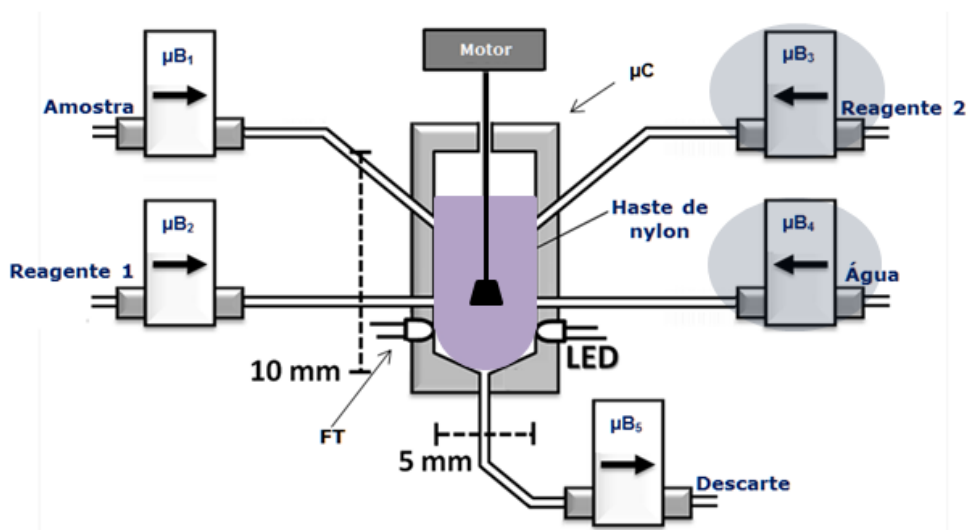


Figura 2.7: Acionamento das microbombas μB_3 e μB_4 e homogeneização representados pelas etapas 3 e 4.

Após outra homogeneização acionada pela etapa 4, a leitura do sinal analítico ocorre em um tempo de 1 s na etapa 5.

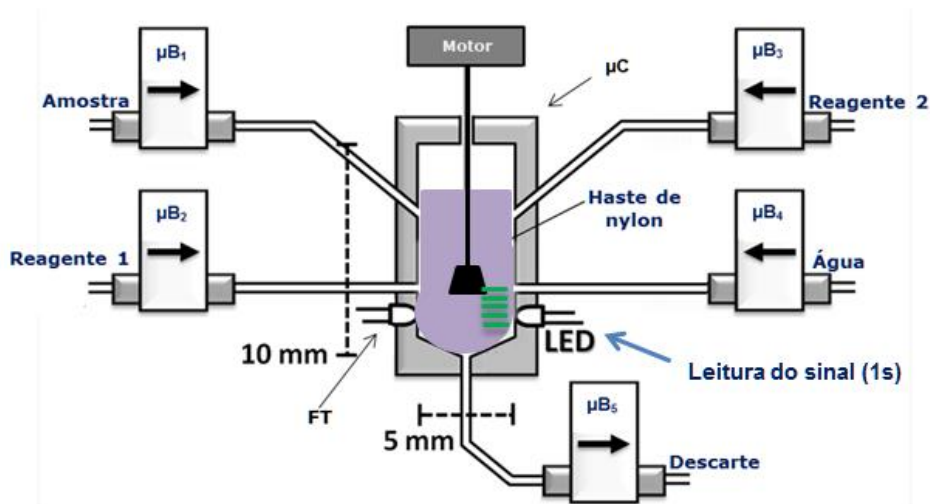


Figura 2.8: leitura do sinal analítico, representado pela etapa 5.

O descarte da solução presente na microcâmara é representada pela etapa 6, gasta um tempo de 1,2 s e realizado pela microbomba μB_5 .

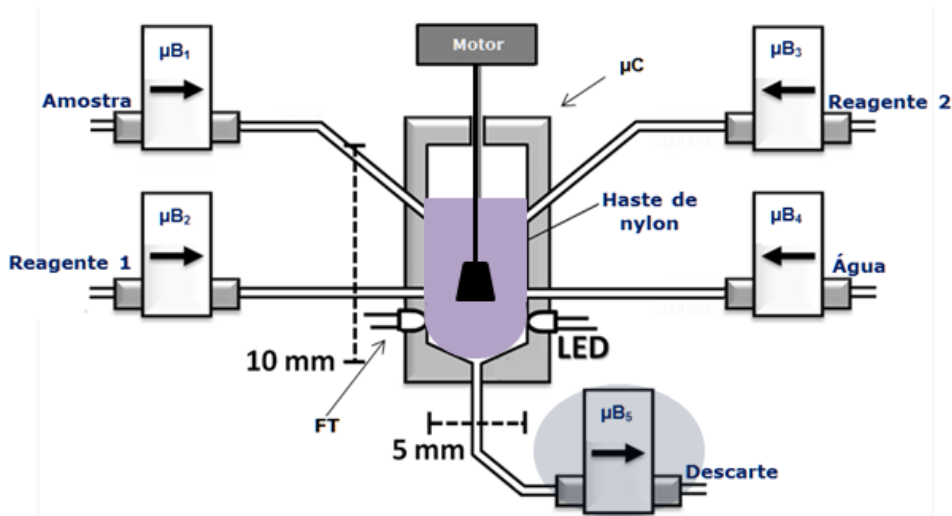


Figura 2.9: Descarte da solução após análise da amostra, representado pela etapa 6.

Após o descarte ocorrido na etapa 6, a microcâmara é preenchida com água deionizada para a limpeza. Essa adição de água é realizado pela microbomba μB_4 na etapa 7 em um tempo médio é de 2,4 s.

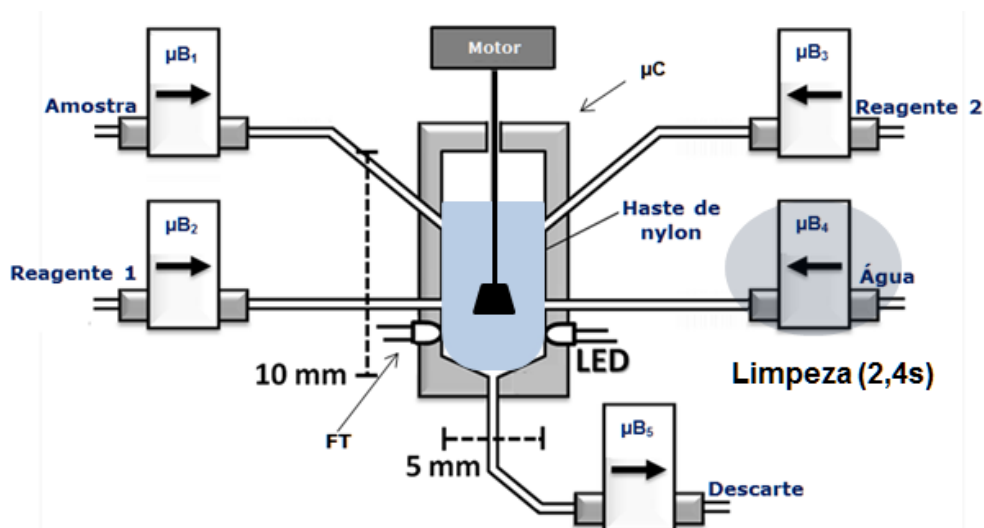


Figura 2.10: Limpeza da microcâmara com água deionizada, representado pela etapa 7.

O descarte final da microcâmara é realizado pela etapa 8, o tempo do gasto é de 1,2 segundos, realizado pela μB_5 .

É importante destacar que as etapas 7 e 8 ocorrem duas vezes por cada análise, dessa maneira o tempo médio por análise é de 15 s.

As microbombas solenóides são acionadas a uma frequência de 2,5 Hz. Além disso, cada microbomba foi calibrada para um determinado volume de acordo com o impulsionamento do fluido. As microbombas μB_1 , μB_2 , μB_3 , μB_4 foram calibradas para uma vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. A microbomba μB_5 foi calibrada a uma vazão de $9,0 \text{ mL min}^{-1}$ para o descarte.

É importante destacar que a leitura do branco é realizada de forma semelhante aos processos descritos anteriormente pela tabela 2.1. Entretanto, é adicionado água em vez da amostra para o interior da microcâmara.

Para a troca de amostra o volume morto existente no tubo da microbomba μB_1 é acionada simultaneamente com a etapa 7 no momento da limpeza, posteriormente o tubo da μB_1 é preenchida com a nova amostra. Os recipientes contendo as novas amostras são trocadas manualmente pelo operador. Em seguida são repetidos os procedimentos descritos na tabela 2.1 para uma nova leitura do sinal analítico.

2.7 Programa de gerenciamento

O programa para o controle e gerenciamento automático das microbombas solenóides, da homogeneização e da leitura do sinal analítico foi desenvolvido em ambiente LabView™ (National Instruments®), cuja a interface encontra-se na figura 2.5.

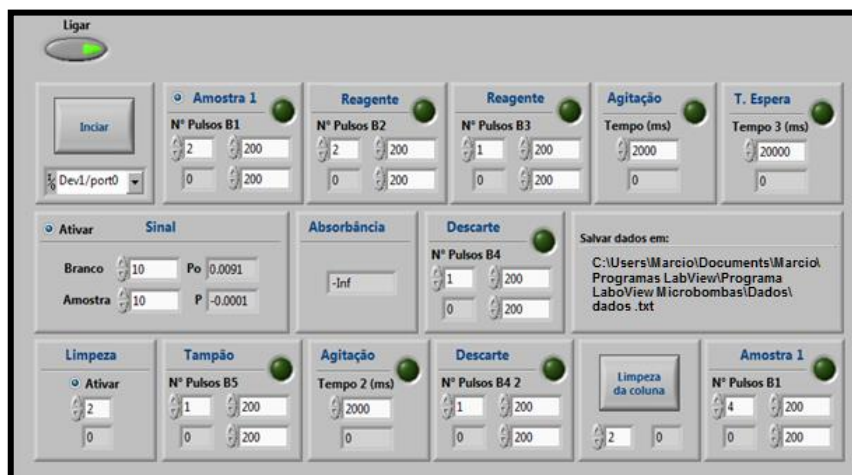


Figura 2. 11: Representação da interface construída em ambiente LabView.

Uma vez iniciado o programa, o operador deve inserir valores como número de pulsos e seu respectivo tempo de duração (para cada microbomba), tempo de agitação, tempo de espera e também selecionar a devida porta serial conectada ao NI-Daq (National Instruments®), o sistema de aquisição de dados. Os valores de tempo inseridos devem ser em milissegundos.

O acionamento dos componentes é administrado de acordo com a necessidade da análise e é diretamente condicionado ao tempo, que deve ser inserido em milissegundos pelo operador. A interface de controle para usuário do μ FBA foi desenvolvida exclusivamente para este trabalho.

2.8 Método de referência

O método utilizado para fins comparativos com o desempenho do μ FBA foi a destilação Monier-Williams. Esse procedimento é considerado um dos métodos oficiais de análise mais utilizados na determinação de sulfitos em bebidas (AOAC, 1997).

A metodologia para determinação desses aditivos é realizada adicionando 6,25 mL de amostra de bebida, 100 mL de água deionizada e 25 mL de solução aquosa de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ a 5% (v/v) em um balão de três vias, mantendo-o aquecida com o auxílio de uma manta aquecedora. Além disso, adiciona-se gás nitrogênio para manter o resfriamento no interior do balão de três vias, como também o ambiente livre de gás oxigênio, evitando a oxidação da amostra. Uma solução de HCl a 4 mol L^{-1} também é introduzida no balão pelo funil de adição, o tempo de destilação resulta um total de 2 horas, lembrando que o fluxo de nitrogênio, no interior do balão, é mantido durante todo o processo de destilação.

Dessa forma, a destilação da amostra ocorre com a liberação de SO_2 o qual é recolhido no frasco coletor contendo uma solução de H_2O_2 a 3% (v/v). O objetivo dessa solução é oxidar o SO_2 , resultando como produto final H_2SO_4 . É importante destacar que a concentração de SO_2 é diretamente proporcional a quantidade de H_2SO_4 produzido.

Após o processo de destilação, procedeu-se à titulação do H_2SO_4 formado com solução de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ até o ponto de viragem amarelo brilhante devido à presença do indicador vermelho de metila.

2.9 Teste de recuperação

A aplicação de um teste de recuperação é sugerido como um método para determinar a presença de interferentes e para avaliar a exatidão do método proposto (GAPPER; FONG; OTTER; INDYK; WOOLLARD, 2004). Esse procedimento consiste em adicionar quantidades

conhecidas de analito em amostras em triplicata. A taxa de recuperação (R) é calculada de acordo com a equação 1.2:

$$R = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \cdot 100\% \quad (1.2)$$

Onde c_1 é a concentração total do analito na amostra após adição de uma quantidade conhecida do mesmo analito; c_2 é a concentração original do analito sem adição e c_3 é a concentração do analito adicionada na amostra.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Otimização dos parâmetros do μ FBA

A concentração e o volume dos reagentes e amostras, como também, o tempo de residência da mistura no interior da microcâmara foram avaliados com objetivo de aperfeiçoar a sensibilidade e a reprodutibilidade do sinal analítico. A seleção dos valores para o μ FBA foi feita de modo univariado, os quais foram avaliados conforme estudos realizados anteriormente (GAPPER; FONG; OTTER; INDYK; WOOLLARD, 2004; PISTÓN; MOLLO; KNOCHEN, 2011). Esses valores são apresentados na tabela 3.1 e exibem esses parâmetros.

Tabela 3.1: Parâmetros selecionados do μ FBA proposto para a determinação de sulfitos em amostras de bebidas.

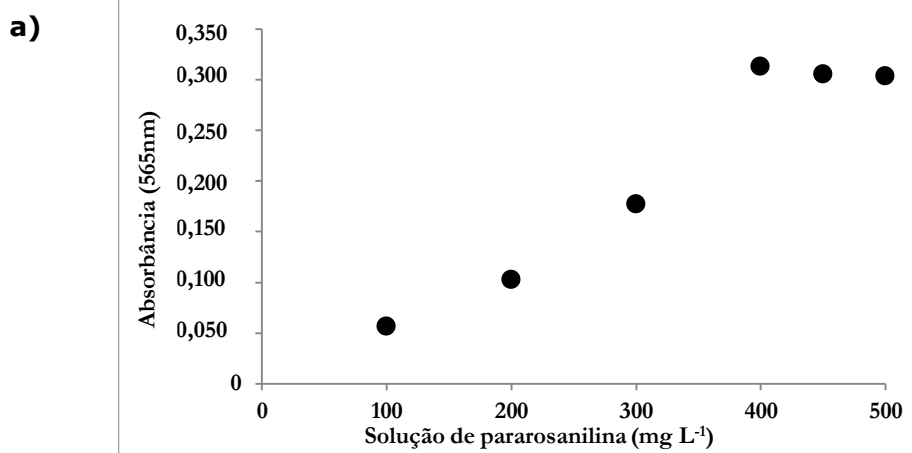
Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Solução de cloridrato de pararosanilina (mg L^{-1})	100 – 500	400
volume da amostra (μL)	8 – 32	16
Volume do reagente cloridrato pararosanilina volume (μL)	8 – 32	16
Volume do reagente formaldeído (μL)	8 – 32	16

O objetivo de avaliar esses parâmetros é o de minimizar, principalmente, o consumo de amostras, reagentes e a geração de resíduos provenientes das análises, bem como maximizar o sinal analítico.

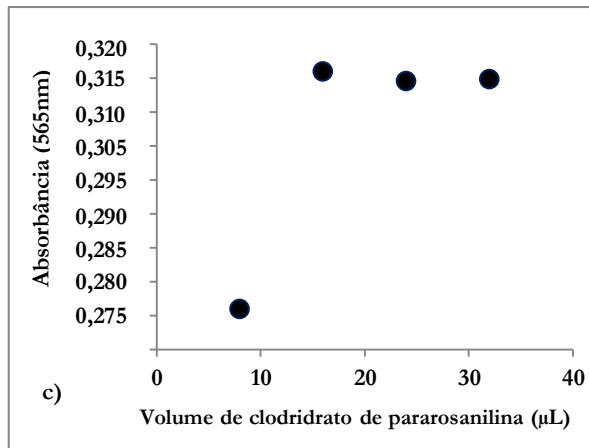
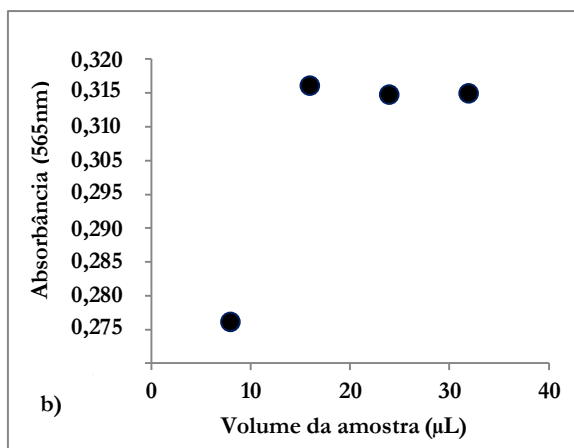
A figura 3.1 representa os gráficos do efeito das concentrações avaliadas de acordo com a intensidade do sinal analítico. Foi empregada uma solução padrão com concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de sulfito para todas as etapas de otimização (ABDEL-LATIF, 2006).

Com relação à solução de cloridrato de pararosanilina, foi verificado, figura 3.1(a), que a absorvância aumentou consideravelmente até a concentração de 400 mg L^{-1} , em que valores de concentrações maiores

não aumentavam o sinal analítico. Assim, o valor de 400 mg L⁻¹ da solução de pararosanilina foi selecionado como ótimo para o presente estudo.



Para os estudos da variação das concentrações da amostra, da solução de formaldeído e de cloridrato de pararosanilina, determinadas pelos respectivos volumes adicionados, não houve aumento do sinal analítico em valores de concentração para volumes maiores do que 16 µL (figura 3.1(b), figura 3.1(c), figura 3.1(d)).



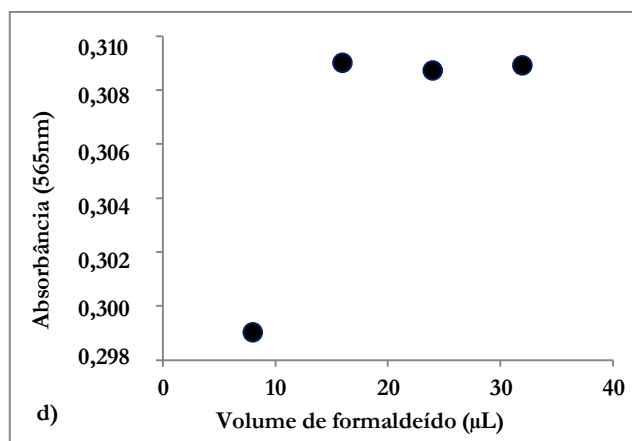


Figura 3.1: Efeito das concentrações dos reagentes sobre o sinal analítico. (a) solução de cloridrato de pararosanilina (mg L^{-1}), (b) volume da amostra (μL), (c) volume de cloridrato de pararosanilina (μL) e (d) volume da solução de formaldeído (μL).

3.2 Determinação de sulfitos em bebidas

A curva analítica foi construída de acordo com os seguintes níveis de concentração: 0,1; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 10,0 mg L^{-1} de sulfitos. A Figura 3.2 exibe um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração do analito em suas soluções de calibração.

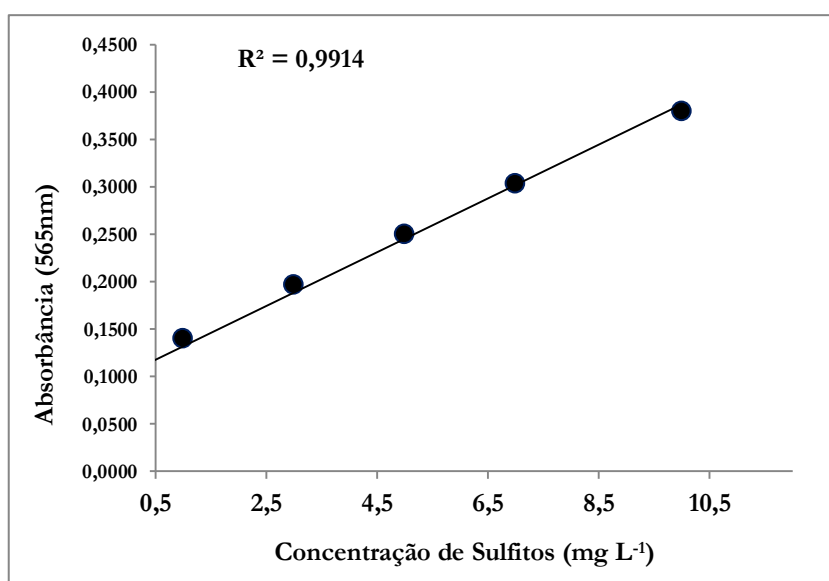


Figura 3.2: Curva de calibração µFBA.

A Figura 3.3 representa o gráfico dos resíduos deixado pelo modelo de calibração. É observado que os resíduos se distribuem de maneira aleatória, isto é, não exibem nenhuma estrutura sistemática que demonstre uma eventual falta de ajuste.

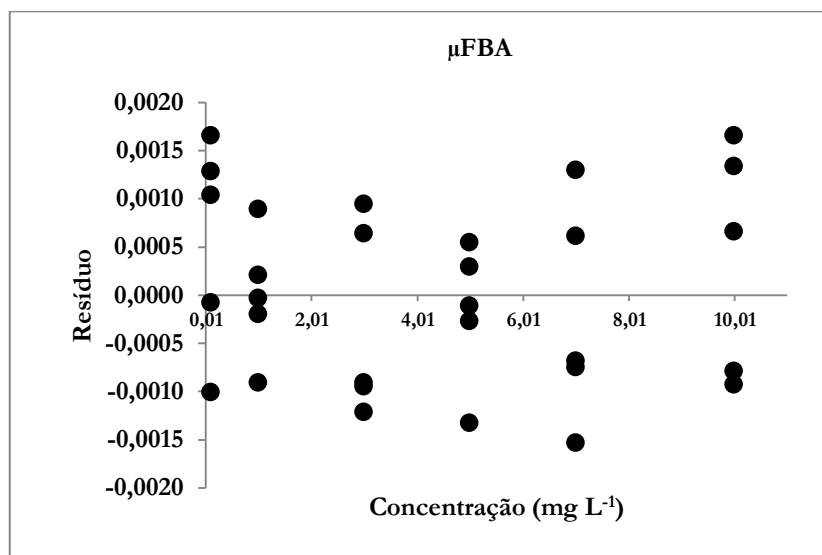


Figura 3.3: Gráfico dos resíduos para o modelo de calibração de sulfitos para o método μ FBA.

Na Tabela 3.2 são apresentados os resultados da ANOVA, utilizada para a validação do modelo de calibração proposto.

Tabela 3.2: Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração de sulfitos a um nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$).

Fonte	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = 0,0096$	1	$MQ_{reg} = 0,0096$
Resíduos	$SQ_r = 0,0110$	10	$MQ_r = 0,0008$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = 0,0077$	2	$MQ_{faj} = 0,0025$
Erro puro	$SQ_{ep} = 0,0032$	8	$MQ_{ep} = 0,0003$

O Teste F foi aplicado para a análise de falta de ajuste e para de significância de regressão, considerando o nível de confiança de 95% e os mesmos graus de liberdade, cujos estão na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão para um nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$).

Teste	F _{estatístico}	F _{crítico}	Valor-p
Falta de ajuste	$MQ_{faj}/MQ_{ep} = 2,6667$	$F_{3,10} = 3,7081$	$0,062 > 0,05$
Significância de regressão	$MQ_{reg}/MQ_r = 11,4284$	$F_{1,13} = 4,6667$	$0 < 0,05$

Conforme a Tabela 3.3 não houve falta de ajuste, pois $F_{estatístico} < F_{3,10}$ ou $Valor-p > 0,05$. Dessa maneira, não se rejeita a hipótese nula de que as variâncias associadas à falta de ajuste e ao erro puro decorrem da mesma variância populacional dos erros aleatórios que afetam o sinal analítico. Do mesmo modo, foi verificada a relação linear entre a variável resposta e a independente, pois $F_{estatístico} > F_{1,13}$ ou $Valor-p < 0$, rejeitando-se a hipótese nula de que $\beta_1 = 0$.

Além disso, os parâmetros do modelo obtido pela regressão pelos MMQ (Figura 3.2) estão apresentados na Tabela 3.4. Na mesma tabela estão os resultados dos testes de significância para os parâmetros e seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 3.4. Resultados dos testes de significância dos coeficientes linear e angular do modelo para um nível de 95% de confiança ($\alpha = 0,05$).

Teste	Modelo estimado $y_1 = b_0 + b_1x_1$	t _{estatístico}	Valor-p
Significância do coeficiente linear	$b_0 = 0,2625$	14,8711	$0 < 0,05$
Significância do coeficiente linear	$b_1 = 0,0178$	3,3515	$0,0052 < 0,05$
Intervalos limites a 95% de confiança	Erro-padrão	Modelo linear $Y = \beta_0 + \beta_1x + \epsilon$	
Coeficiente linear	$S_{b0} = 0,0176$	$\beta_0 = b_0 \pm t_{13} \cdot S_{b0}$ $\beta_0 = 0,5242 \pm 0,0007$	
Coeficiente angular	$S_{b1} = 0,0053$	$\beta_1 = b_1 \pm t_{13} \cdot S_{b1}$ $\beta_1 = 0,1598 \pm 0,0325$	

A curva analítica do μ FBA foi usada para a determinação de sulfitos em amostras reais. A Tabela 3.5 apresenta os resultados com os valores médios de três repetições para o μ FBA proposto. O desvio padrão relativo (DPR%) foi inferior a 1,5% para SO_2 .

Assim, observa-se uma aceitável precisão dos resultados para o microanalisador proposto, podendo ser observado de acordo com valores dos intervalos de confiança e de DPR (VERGER; CHAMBOLLE; BABAYOU; BRETON; VOLATIER, 1998).

Os resultados da avaliação da performance do microanalisador sugerido, no que concerne as análises de calibração univariada, apontam para a viabilidade prática e confiabilidade das medidas realizadas.

Tabela 3.5: Valores médios e incertezas das concentrações das amostras de bebidas (n=3 para vinho branco, vinho tinto, whisky e cerveja) para a determinação de sulfitos (mg L^{-1}) usando método de referência o μ FBA proposto.

Amostras	Referência		μ FBA	
	Concentração $\pm$ DP ^a	DPR % ^b	Concentração $\pm$ DP ^a	DPR % ^b
Vinho branco	5,71 $\pm$ 0,05	0,80	5,64 $\pm$ 0,03	0,56
	4,89 $\pm$ 0,04	0,72	4,85 $\pm$ 0,03	0,52
	4,38 $\pm$ 0,04	0,86	4,45 $\pm$ 0,04	0,92
Vinho tinto	5,98 $\pm$ 0,06	1,02	6,05 $\pm$ 0,05	0,81
	7,69 $\pm$ 0,06	0,76	7,55 $\pm$ 0,06	0,77
	4,76 $\pm$ 0,04	0,84	4,80 $\pm$ 0,04	0,80
Whisky	2,63 $\pm$ 0,03	0,96	2,56 $\pm$ 0,02	0,82
	2,38 $\pm$ 0,03	1,24	2,34 $\pm$ 0,01	0,47
	1,96 $\pm$ 0,02	0,99	2,03 $\pm$ 0,01	0,59
Cerveja	1,75 $\pm$ 0,02	1,17	1,69 $\pm$ 0,02	0,89
	3,67 $\pm$ 0,03	0,84	3,65 $\pm$ 0,02	0,68
	2,81 $\pm$ 0,02	0,78	2,87 $\pm$ 0,02	0,66

Também foi aplicado um teste *t* pareado e identificou-se que não houve diferença significativa entre os resultados apresentados na tabela 3.5 ao nível de 95% de confiança.

O μ FBA proposto teve seu desempenho avaliado em precisão e sensibilidade estimados pelo LOD e LOQ. Os resultados são mostrados na tabela 3.6 e seus valores analisados mostram que o instrumento proposto apresentam LOD e LOQ iguais a 0,08 e 0,29 mg L⁻¹, respectivamente.

Tabela 3.6: Resultados LOD e LOQ (mg L⁻¹) para a determinação de sulfitos em amostras de bebidas no instrumento proposto (μ FBA).

Analito	μ FBA	
	LOD	LOQ
SO ₂	0,08	0,29

3.3 Teste de recuperação

Os testes de recuperação também foram realizadas, e, neste caso, foram utilizadas duas amostras de vinho branco, vinho tinto, whisky e cerveja. O volume de 1,0 mL de solução padrão com concentrações conhecidas de sulfito no total de 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ foi adicionado a 1,0 mL das bebidas. Os valores de recuperação obtidos estão apresentados na Tabela 3.7. Como se pode ser visto, as recuperações obtidas por cada uma das amostras estavam dentro da faixa 96,8 a 102,6%.

Tabela 3.7: Teste de recuperação de sulfitos em amostras de bebidas.

Amostras	Recuperações			
	Concentração inicial (mg L ⁻¹)	0,5 (mg L ⁻¹)	1,0 (mg L ⁻¹)	2,0 (mg L ⁻¹)
Vinho branco	5,64	98,9 ± 2,3	99,3 ± 2,2	102,3 ± 2.5
	4,45	99,5 ± 2,5	101,6 ± 2,4	97,8 ± 2.3
Vinho tinto	7,55	97,5 ± 2,3	102,5 ± 1,9	101,6 ± 2.1
	4,80	99,8 ± 2,4	97,9 ± 2,2	102,4 ± 2.3
Whisky	2,56	97,6 ± 2,0	96,8 ± 2,1	102,6 ± 2.4
	2,03	101,8 ± 1,9	99,3 ± 2,3	101,5 ± 2.1
Cerveja	3,65	99,1 ± 2,2	98,5 ± 2,3	100,8 ± 2.5
	1,69	102,2 ± 2,4	98,9 ± 2,4	102,4 ± 2.1

3.4 Comparação do μ FBA proposto com outros sistemas

As características do μ FBA sugerido, com outros trabalhos utilizando análise por injeção em fluxo, FIA (ALAMO; TANGKUARAM; SATIENPERAKUL, 2010), e análise por injeção sequencial, SIA (TZANAVARAS; THIAKOULI; THEMELIS; HYBRID, 2009), para determinação de sulfitos em amostras de bebidas são apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8: Comparação das características analíticas do μ FBA proposta e outros procedimentos de fluxo a partir da determinação de sulfito em bebidas.

Parâmetros	μFBA	SIA (Tzanavaras et al. 2009)	FIA (Alamo et al. 2010)
Limite de detecção (mg L⁻¹)	0,08	0,3	0,40
Faixa de trabalho (mg L⁻¹)	0,1 – 10,0	1,0 – 40	0,5 – 50
Desvio padrão relativo (%)	< 1,4 (n = 5)	2,2 (n = 12)	< 2,2 (n = 3)
Frequência analítica (h⁻¹)	240	10	11
Consumo de amostra (μL)	16	50	300
Método	Pararosanilina	O-ftaladeído	CuHCF-CNT ^a
Detecção integrada	Presente	Ausente	Ausente
Fluido carregador	Ausente	Presente	Presente

^a Um eletrodo de pasta de carbono modificado com hexacianoferrato de cobre (CuHCF-CNT).

O analisador proposto apresentou uma frequência analítica de 240 amostras por hora para o método utilizado, com uma produção de resíduos de 64 μ L por análise. Apresentando então parâmetros satisfatórios, tais como limite de detecção, frequência analítica e ausência de fluido transportador.

Capítulo 4

Considerações Finais e Perspectivas

4.1 Conclusões

Nesse trabalho foi desenvolvido uma metodologia automática para determinação fotométrica de sulfitos em bebidas. Com isso, uma microcâmara para o microanalisador em fluxo batelada foi confeccionado com uma resina comercial de uretana-acrilato.

O método de determinação desses aditivos em bebidas baseou-se na reação dos sais de sulfitos com solução de formaldeído e solução de cloridrato de pararosanilina, em meio ácido, originando um complexo colorido de cor violeta com máxima absorção em 565 nm.

Todos os resultados das análises mostraram-se estatisticamente satisfatórios e foram devidamente ajustados e validados. O teste *t* pareado, com confiança estatística de 95%, tanto a ANOVA para falta de ajuste do modelo, além do teste de recuperação, não confirmaram desvios significativos com os resultados obtidos pelo microanalisador quando comparados ao método de referência.

O μ FBA proposto permitiu a determinação dos teores de sulfitos em amostras de bebidas com um consumo reduzido de reagentes e amostras e, conseqüentemente, gerando um volume mínimo de resíduos, com frequência analítica foi de 240 amostras por hora.

Dessa forma, μ FBA é potencialmente útil como uma alternativa para determinações fotométricas de sulfitos como parâmetros de qualidade em bebidas.

4.2 Perspectivas

Este trabalho tem como perspectivas futuras aplicações do μ FBA para determinação de outros aditivos como fosfatos, nitratos, sacarina e aclimato em bebidas não alcóolicas e alcóolicas destiladas.

Também pretende-se pesquisar avanços do μ FBA visando a implementação de uma etapa de pré-tratamento de amostras, principalmente para técnicas de microextrações.

Referências

Referências

ABDEL-LATIF M. S. New Spectrophotometric Method for Sulfite Determination. *Analytical Letters* **2006**.

ALAMO L.S.T., TANGKUARAM T., SATIENPERAKUL S., "Determination of sulfite by pervaporation-flow injection with amperometric detection using copper hexacyanoferrate-carbon nanotube modified carbon paste electrode", *Talanta*, vol. 81, pp. 1793-1799, **2010**.

ALMEIDA, L.F.; MARTINS, V.L.; SILVA, E.C.; MOREIRA, P.N.T.; ARAUJO, M. C. U. Um método padrão da adição automática de fluxo para determinação de sódio em álcool combustível por fotometria de chama. *J. Braz. Chem. Soc.* vol. 14, **2003**.

ANIBARRO B., CABALLERO M.T., GARCÍA-ARA M.C., DÍAZ-PENA J.M., OJEDA J.A.. Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **90:103-109, 1992**.

ANIBARRO, B.; CABALLERO, M. T.; GARCÍA-ARA, M. C.; DÍAZ-PENA, J. M.; OJEDA, J. A. Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **v. 90, n. 1, p. 103- 109, 1992**.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis, 14th ed, Arlington, **2: 284, 1997**.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M.; Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, **6: 27, 2008**.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition (Arlington, Virginia, USA: AOAC International), Chapter **47, 27-29, 1995**.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 24, de 08 de Setembro de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 de setembro, **2005**.

BRASIL. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União; Brasília, DF, 28 de outubro de **1997**.

CARNEIRO, J.M.T.; DIASA A.C.B.; ZAGATTO, E.A.G.; HONORATO, R.S. Determinação espectrofotométrica catalítica de Fe (III) em águas estuarinas usando um sistema fluxo batelada. *Analytica Chimica Acta* **455, 327–333, 2002**.

CORBO, D.; BERTOTTI, M. Use of a copper electrode in alkaline medium as an amperometric sensor for sulphite in a flow-through configuration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **v. 374, n. 3, p. 416-420, 2002**.

DECNOP-WEEVER, L. G.; KRAAK, J. C. Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection. *Analytica Chimica Acta*, **v. 337, p. 125-131, 1997**.

DINIZ, P.H.G.D.; ALMEIDA L. F.; HARDING, D. P.; M. C. U. ARAÚJO. Flow-batch analysis, **V. 35, 39–49, 2012**.

EDWARDS M.C., JOHNSON J.L., MARRIAGE B., GRAF T.N., COYNE K.E., RAJAGOPALAN K.V., MACDONALD I.M. 1999. Isolated sulfite oxidase deficiency – review of two cases in one family. *Ophthalmology* **106:1957-1961**.

EDWARDS, M. C.; JOHNSON, J. L.; MARRIAGE, B.; GRAF, T. N.; COYNE, K. E.; RAJAGOPALAN, K. V.; MACDONALD, I. M. Isolated sulfite oxidase deficiency – review of two cases in one family. *Ophthalmology*, **v. 106, n. 10, p. 1957-1961, 1999**.

FAZIO T., WARNER C.R.. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Additives and Contaminants* **7:433-454, 1990**.

FERNANDES, J.C.B E FERREIRA, L. O. S. Manufacturing of miniature fluidic modules for lab on a chip using UA photoresin from flexographic platemaking process. *J. Braz. Chem*, **17: 6, 2006**.

FERNANDES, J.C.B. Manufacturing of miniature fluidic modules for lab on a chip using UA photoresin from flexographic platemaking process. J. Braz. Chem. Soc. 4, **2006, Vol. 17.**

FILHO, S. S. M. Microfabricação de um analisador em fluxo-batelada (micro flow-batch) à base de polímero fotocurável uretano-acrilato. João Pessoa, Programa de pós-graduação em química, UFPB. Dissertação de mestrado, **2010.**

FONSECA, A microfluidic device integrated fluorimetric detection for flow injection analysis. Anal.Bioanal.Chem. **396, 2010.**

FONSECA, A. Construção e avaliação de microssistemas para análise em fluxo. Campinas, Programa de pós-graduação em química, Unicamp, Tese de doutorado, **2008.**

FONSECA, A. Construção e avaliação de microssistemas para análise em fluxo. Campinas, Programa de pós-graduação em química, Unicamp. Tese de doutorado, **2008.**

FONSECA, A. Construction and evaluation of a flow injection microanalyser based on urethane acrylate resin. Anal.Chim.Acta. **603, 2007.**

FRENZEL, W.; MCKELVIE, I. D. PHOTOMETRY. IN: S. D. KOLEV E I. D. MCKELVIE. Comprehensive analytical chemistry advancer in flow injection analysis and relater techniques. Elsevier, **2008.**

GAPPER, L.W.; FONG, B.Y.; OTTER, D.E.; INDYK, H.E.; WOOLLARD, D.C. Determination of nitrite and nitrate in dairy products by ion exchange LC with spectrophotometric detection. International Dairy Journal, **14: 881, 2004.**

HILLERY BR, Elkins ER, Warner CR, Daniels D, Fazio T.. Optimized Monier-Williams. Method for determination of sulfites in foods: collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists **72:470-475, 1989.**

HONORATO, R.S. et al. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search, Anal. Chim. Acta, **396:91, 1999.**

IÑÓN, F.A.; TUDINO, M.B. Theoretical Aspects of Flow Analysis em: TROJANOWICZ, M. (Ed.), Advances in Flow Analysis, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.

ISAAC, A.; LIVINGSTONE, C.; WAIN, A. J.; COMPTON, R. G.; DAVIS, J. Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages. Trends in Analytical Chemistry, **v. 25, n. 6, p. 589-598, 2006**.

KISKER C., SCHINDELIN H., PACHECO A., WEHBI W.A., GARRETT R.M., RAJAGOPALAN K.V., ENEMARK J.H., REES D.C.. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. Cell **91:973-983, 1997**.

KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; PACHECO, A.; WEHBI, W. A.; GARRETT, R. M.; RAJAGOPALAN, K. V.; ENEMARK, J. H.; REES, D. C. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. Cell, **v. 91, p. 973-983, 1997**.

KOLEV, S.D.; MCKELVIE, I.D. Comprehensive analytical chemistry advancer in flow injection analysis and relater techniques, Oxford, Elsevier, **2008**.

LECLERCQ C., MOLINARO M.G., PICCINELLI R., BALDINI M., ARCELLA D., STACCHINI P. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite containing foods and their combination into standard meals for adults and children. Food Additives and Contaminants **17:979-989, 2000**.

LENEHAN, C.E.; BARNETT, N.W.; LEWIS, S.W. Sequential injection analysis, Analyst, **27: 997, 2002**.

LIMA, M. B. Um micro flow-batch para determinação fotométrica e turbidimétrica de taninos em amostras de chás. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 115p, **2010**.

LIMA, M.B.; BARRETO, I.S.; ANDRADE, S.I.; NETA, M.S.; ALMEIDA L.F.; ARAÚJO, M.C. Photometric determination of phosphorus in mineralized biodiesel using a micro-flow-batch analyzer with solenoid micro-pumps, Talanta. **98: 118, 2012 a**.

LIU, S-Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, **v. 35, p. 49–61, 2000.**

LÜCK, E.; JAGER, M. Sulfur Dioxide, Chapter 12 in: *Antimicrobial Food Additives – characteristics, uses, effects*. 2nd Edition – Berlin: Springer-Verlag, **260p., 1997.**

MACHADO, R. M. G. Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão. Campinas, Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Unicamp. Tese de doutorado, **2007.**

MADOU, M. J., *Fundamentals of Microfabrication*, Boca Raton, 1st. Ed., CRC. Press, **1997.**

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M.; Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing. *Sens. Actuators*, **1: 244, 1990.**

MARESCHI, J. P.; FRANÇOIS-COLLANGE, M.; SUSCHETE, M. Estimation of sulphite in food in France. *Food Additives and Contaminants*, **v. 9, n. 5, p. 541-549, 1992.**

MONTE FILHO, S.S. Microfabricação de um analisador em Fluxo-Batelada (Micro Flow-Batch) à base de polímero fotocurável Uretano-Acrilato. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 95p, **2010.**

OUGH C.S. Determination of sulfur dioxide in grapes and wines. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **69:5-7, 1986.**

PASQUINI, C.; OLIVERIA, W.A. Monosegmented system for continuous flow analysis spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia, and phosphorous. *Anal. Chem.* **57:2575, 1985.**

PATNAIK, P. *Dean's analytical chemistry handbook*. 2. New York : McGraw-Hill, **2004.**

PERONI D.G., BONER A.L.. Sulfite sensitivity. *Clinical and Experimental Allergy* **25:680-681,1995.**

PERONI, D. G.; BONER, A. L. Sulfite sensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*, **v. 25**, p. **680-681**, **1995**.

PISTÓN, M.; MOLLO, A.; KNOCHEN, M. A simple automated method for the determination of nitrate and nitrite in infant formula and milk powder using sequential injection analysis, *J. Automat. Meth. Manager. Chemis*, **1**, **2011**.

REIS, B.F. et al. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digests. *Anal. Chim. Acta*, **293:129**, **1994**.

RIBERA, D.; JONKER, D.; NARBONNE, J. F.; O'BRIEN, J.; ANTIGNAC, E. Absence of adverse effects of sodium metabisulphite in manufactured biscuits: results of subacute (28-days) and subchronic (85-days) feeding studies in rats. *Food Additives and Contaminants*, **v. 18**, **n. 2**, p. **103-114**, **2001**.

RIBERA, D.; JONKER, D.; NARBONNE, J. F.; O'BRIEN, J.; ANTIGNAC, E. Absence of adverse effects of sodium metabisulphite in manufactured biscuits: results of subacute (28-days) and subchronic (85-days) feeding studies in rats. *Food Additives and Contaminants*, **v. 18**, **n. 2**, p. **103-114**, **2001**.

ROCHA, F.R.P. et al. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends, *Anal. Chim. Acta*, **468:119**, **2002**.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. *Anal. Chim. Acta*, "Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays.", **1990**, **329-34**.

RUZICKA J.; HANSEN E. H., *Anal. Chim. Acta*, **78 (1995)** 145-157.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, **781:145**, **1975**.

SÁDECKÁ, J.; POLONSKÝ, J. Determination of inorganic ions in food and beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **v. 834**, p. **401-417**, **1999**.

SILVA, J.C.B., Desenvolvimento e Avaliação de um Microssistema Fluídico com Unidade de Difusão Gasosa Integrada. Programa de Pós Graduação em Química. UNB, Dissertação de Mestrado, 82p, **2012**.

SKEGGS, L.T. An automatic method for colorimetric analysis. Amer. J. Clin. Pathol. **28: 311, 1957**.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Fundamentos de Química Analítica. 8. s.l.: Thomson, **2007**.

SULLIVAN, J. J.; HOLLINGWORTH, T. A.; WEKELL, M. M.; NEWTON, R. T.; LAROSE, J. E. Determination of sulfite in food by flow injection analysis. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, **v. 69, n. 3, p. 542-546, 1986**.

TAYLOR S.L., HIGLEY N.A., BUSH R.K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. Advances in food Research 30:1-76., **1986**.

TAYLOR, S. L.; HIGLEY, N. A.; BUSH, R. K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. Advances in Food Research, **v. 30, p. 1-76, 1986**.

TROJANOWICZ, M (editor). Advances in Flow Analysis. Weinheim: Wiley-VCH. **2008**.

TZANAVARAS, P. D., THIAKOULI, E., THEMELIS , D. G. HYBRID. Sequential injection–flow injection manifold for the spectrophotometric determination of total sulfite in wines using o-phthalaldehyde and gas-diffusion. Talanta **77: 2009**.

VAHL J.M., CONVERSE J.E. Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1980. **63:194-199**.

VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, M.S. Automatización y miniaturización en química analítica, Córdoba, Springer, **2000**.

VALLY H., THOMPSON P.J.. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. Addiction Biology **8:3-11, 2003**.

VERGER, P.; CHAMBOLLE, M.; BABAYOU, P.; BRETON, S.; VOLATIER, J. L. Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additives in France. Food Additives and Contaminants, **v. 15, n. 7, p. 759-766, 1998.**

WARNER C.R., DIACHENKO G.W., BAILEY C.J.. Sulfites: an important food safety issue. Food Testing & Analysis. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfit.html>. **2000.**

WEDZICHA, B. L. Chemistry of sulphiting agents in food. Food Additives and Contaminants, **v. 9, n. 5, p. 449-459, 1992.**

WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. Nature, **442, 2006.**

WILLIAMS, D. J.; SCUDAMORE-SMITH, P. D.; NOTTINGHAM, S. M.; PETROFF, M. A. Comparison of three methods for determining total sulfur dioxide in white wine. American Journal of Enology and Viticulture, **v. 43, n. 3, p. 227-229, 1992.**

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). 2000. Evaluation of certain food additives (Fiftyfirst report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, **Nº 891 (Geneva: WHO).**

WÜTHRICH B., KAGI M.K., HAFNER J.. Disulfite-induced acute intermittent urticaria with vasculitis. Dermatology **187:290-292, 1993.**

YANG W.H., PURCHASE E.C.R. Adverse reactions to sulfites, **2000.**

YANG W.H., PURCHASE E.C.R. Adverse reactions to sulfites. Canadian Medical Association Journal **133:865-867, 1985.**