

UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química

Karen Cristina Almeida Francisco

**Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de sulfito livre em
bebidas**

Araraquara

2015

Karen Cristina Almeida Francisco

Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de sulfito livre em bebidas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso

Colaborador: Juliano Passaretti Filho

Araraquara

2015

Karen Cristina Almeida Francisco

Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de sulfito livre em bebidas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso

Colaborador: Juliano Passaretti Filho

Araraquara, 12 de janeiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

DEDICATÓRIA

À minha avó Maria Marta,
tão perto no coração mesmo tão longe na distância.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda a força e coragem;

Aos meus pais, José Luis e Marcia, pelo esforço, dedicação e compreensão em todos os momentos dessa e de outras etapas de minha vida;

À toda a minha família pelo incentivo, cooperação e apoio;

Ao meu orientador Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso pela oportunidade de realizar esse trabalho e por toda orientação prestada;

Ao colaborador dessa pesquisa, Juliano Passaretti Filho, pela paciência e indispensável auxílio durante todo o desenvolvimento desse trabalho;

Aos colegas do Departamento de Química Analítica, em especial aos do Laboratório de Química Ambiental;

À banca por ter aceito o convite;

À República Pandora por ter se tornado uma família que compartilhou comigo os momentos de tristezas e de alegrias durante esses anos;

Aos funcionários da biblioteca por toda a atenção dedicada durante o curso;

Ao Instituto de Química de Araraquara, por ser esta instituição respeitada e competente que possibilitou a realização de todo o curso;

Expresso meus agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito desse trabalho.

*“Muitas das falhas da vida ocorrem quando não percebemos o quão próximos
estávamos do sucesso na hora em que desistimos.”*

(Thomas Edison)

“Você provavelmente terá de entrar em uma batalha mais de uma vez para vencê-la.”

(Margaret Thatcher)

RESUMO

O dióxido de enxofre é um conservante utilizado em alimentos por evitar o desenvolvimento de microrganismos e prevenir oxidações que provocam variações em suas propriedades organolépticas. O SO_2 tem efeitos prejudiciais à saúde e por essa razão a quantidade adicionada aos alimentos e bebidas é controlada pela legislações de cada país. O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação do sulfito é fundamental para assegurar a qualidade dos alimentos. Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos para a determinação de sulfito em vinho. O primeiro método consistiu na utilização de um sistema de microextração líquido-gás-líquido utilizando como barreira uma membrana de teflon para a difusão e pré-concentração de espécies gasosas. Uma alíquota de 2,00 mL da bebida analisada foi acidificada com ácido fosfórico (98%) para a liberação do SO_2 da amostra. O gás formado e liberado no processo permeia uma membrana de teflon resultando na pré-concentração do SO_2 e posterior oxidação a sulfato. O sulfato formado foi medido indiretamente através da reação com o sal de cloraniliato de bário (BaCLA) na região do UV gerando um produto com absorções máximas em 212 e 331 nm. O método apresentou um limite de detecção de $6,3 \text{ mg.L}^{-1}$, erro relativo de 7,5 % e coeficiente de variação de 6,0%. No segundo método foi construído um sensor de sulfito baseado na impregnação do reagente nitroprussiato de zinco em uma superfície de celulose de absorbance pads Milipore®. Nesta abordagem uma alíquota de 100,00 μL de vinho foi transferida diretamente para o sensor gerando uma cor avermelhada proporcional a concentração de sulfito presente na amostra. Após a reação, os papéis de suporte da reação foram digitalizados utilizando um scanner comercial usado em escritório. As imagens foram processadas no canal Blue do software ImageJ e convertidas em escala logarítmica, sendo os valores obtidos correlacionados com as concentrações de sulfito presentes nas amostras de análise. O método apresentou um limite de detecção de 48,00 mg.L^{-1} e desvio padrão de 0,0046 mg.L^{-1} para amostras de vinho branco. Ambos os métodos não diferem do método Ripper considerando um intervalo de confiança de 95% e mostraram vantagens frente aos métodos tradicionais pela simplicidade na execução e necessidade de pequeno volume de amostra para realização da medida.

Palavras-chave: Dióxido de enxofre. Sulfito. Vinho. Microextração líquido-gás-líquido. Imagens digitais.

ABSTRACT

Sulfur dioxide is an additive commonly used in food industry to prevent the growth of microorganisms and oxidation which can cause variations in the organoleptic properties of foods. The SO₂ has harmful effects on human health and therefore the amount of preservative added to foods and beverages is controlled by specific legislation in each country. The development of analytical methods for determination of sulfite is essential to ensure the quality of the food we eat. In this work, two different methods have been developed for the determination of free sulfite in wine. The first method consisted in using a system of liquid-gas-liquid microextraction with a teflon membrane used as barrier for diffusion and pre-concentration of gaseous species. An aliquot of 2,00 mL of the beverage analyzed was acidified with phosphoric acid (98%) for the release of SO₂ in the sample. The gas formed and released into the process permeates a Teflon membrane resulting in pre-concentration of SO₂ and subsequent oxidation in sulfate. The sulfate formed was measured indirectly by reaction with chloranilic barium salt (BaCLA) in the UV region generating a product with maximum absorbances in 212 and 331 nm. The method had a detection limit of 6.3 mg.L⁻¹, relative error of 7.5% and coefficient of variation of 6.0%. In the second method was built a sensor based on sulfite impregnation with zinc nitroprusside reagent in a cellulose surface absorbance pad Milipore®. In this approach, a rate of 100 uL of wine was transferred directly to the sensor generating a reddish color proportional with the concentration of sulfite present in the sample. After the reaction, the backing papers were scanned by a commercial scanner used in office. The acquired images were processed in "Blue" channel of ImageJ software and converted into logarithmic scale. The values were correlated with the concentrations of sulfite present in the analysis sample. The method showed a detection limit of 48.00 mg.L⁻¹ and standard deviation of 0.0046 mg.L⁻¹ for white wine samples. Both methods do not differ from method Ripper, considering a 95% confidence interval. The developed methods showed advantage over traditional methods for simplicity in implementation, reduced reagent consumption and need of small sample volume to perform the measurement.

Keywords: Sulphur dioxide. Sulfite. Wine. Liquid –gas-liquid microextraction. Digital images.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostrador de microextração líquido-gás-líquido montado sobre um agitador magnético.....	28
Figura 2 - Esquema geral de funcionamento do amostrador nas etapas de adição dos reagentes e disposição da solução extratora.	30
Figura 3 - Amostrador de micro extração líquido-gás-líquido montado sobre um agitador magnético.....	34
Figura 4 - a) Espectro de absorção cloraniliato de bário ácido após a adição de volumes conhecidos de uma solução padrão de sulfato de sódio $0,001583 \text{ molL}^{-1}$. b) Aumento gradual da variação de sinal absorção em 212 e 331 nm.....	35
Figura 5 - Correlação entre mol de sulfato adicionado e mol equivalente ao ácido cloranílico em solução medido em 331 nm.	36
Figura 6 - Curva analítica do método proposto.....	37
Figura 7 - imagem das soluções obtidas após a reação entre nitroprussiato de zinco e sulfito de sódio.	43
Figura 8 - curva analítica obtida para as imagens do produto da reação entre nitroprussiato de zinco e diferentes concentrações de sulfito.	44
Figura 9 - variação do sinal observado em comparação com o concentração real da amostra de sulfito.	44
Figura 10 - imagens dos papeis com diferentes concentrações de sulfito selecionadas e normalizadas em escala logarítmica no canal “Blue”.	45
Figura 11 - Curva analítica partindo de padrões de sulfito em água.	46
Figura 12 - amostras de vinho quantificadas e normalizadas em escala logarítmica no canal “Blue”.	46
Figura 13 - amostras de vinho preparadas pelo método da adição de padrão digitalizadas e convertidas em escala logarítmica pelo canal “Blue”.	47
Figura 14 - Construção da curva analítica com adição de padrão para as amostras de vinho branco.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores de SO ₂ livre recuperados de alíquotas de sal de sulfito de sódio.	33
Tabela 2 - Figuras de mérito analítico do método proposto.	37
Tabela 3 - Teores de sulfito livre encontrados nas bebidas analisadas.	38
Tabela 4 - valores obtidos pelo ImageJ para quantificação de sulfito nas amostras de vinho.	47
Tabela 5 - Figuras de mérito do método proposto.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BaCLA	Cloranillato de bário
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
SD	Desvio padrão
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Importância Econômica e Cultural do Vinho	16
1.2. Adição de sulfito ao vinho como conservante	17
1.3. Efeitos na saúde humana	17
1.4. Legislação e impacto na produção de alimentos	18
1.5. Propriedades Físico Químicas do SO ₂	19
1.6. Métodos para a determinação de SO ₂	20
1.7. Método de microextração líquido-gás-líquido	22
1.8. Reação entre cloraniliato de bário (BaCLA) e sulfato	23
1.9. Desenvolvimento de metodologias em papel	24
1.10. Amostragem para análise químico-bromatológica	25
2. OBJETIVOS	26
3. PARTE 1 – Desenvolvimento de um método para determinação de sulfitos em bebidas utilizando a técnica de microextração líquido-gás-líquido	27
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1.1. Equipamentos	27
3.1.2. Reagentes	28
3.1.3. Procedimento	29
3.1.3.1. Eficiência do processo de extração	29
3.1.3.2. Propriedade óticas do ácido cloranílico	30
3.1.3.3. Reação entre cloraniliato de bário e sulfato de sódio	30
3.1.3.4. Reação de derivação para as alíquotas coletadas	30
3.1.3.5. Etapa de avaliação analítica	31
3.1.3.6. Protocolo de análise para as bebidas	31
3.1.3.6.1. Procedimento para as amostras de vinho	31
3.1.3.6.2. Procedimento para as amostras de cerveja	32

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.2.1. Eficiência do processo de extração.....	33
3.2.2. Estudo das propriedades óticas do ácido cloranílico.....	34
3.2.3. A reação entre cloraniliato de bário e sulfato de sódio.....	34
3.2.4. Etapa de avaliação analítica	36
3.2.5. Aplicação em amostras de cerveja e vinhos.	37
3.3. CONCLUSÃO	39
4. PARTE 2 – Desenvolvimento de um método analítico para determinação de sulfito em vinhos brancos utilizando um scanner de escritório e análise das imagens digitalizadas	40
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1.1. Equipamentos	40
4.1.2. Reagentes.....	40
4.1.3. Procedimento	41
4.1.3.1. Teste qualitativo.....	41
4.1.3.2. Construção da curva analítica.....	41
4.1.3.3. Digitalização e processamento das imagens	41
4.1.3.4. Alíquotas de vinho para quantificação	42
4.1.3.5. Método da adição de padrão para as alíquotas de vinho	42
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.2.1. Teste qualitativo	43
4.2.2. Construção da curva analítica.....	45
4.2.3. Processamento e análise das imagens digitalizadas	45
4.2.4. Quantificação das amostras de vinho	46
4.2.5. Método da adição de padrão para as alíquotas de vinho.....	47
4.3. CONCLUSÃO	49
5. CONCLUSÕES GERAIS	50
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	51

REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância Econômica e Cultural do Vinho

Apesar de ser difícil definir o local e data do início do surgimento do vinho, sabe-se que essa bebida possui um grande valor histórico pois acompanhou grande parte do avanço econômico e sociocultural da humanidade (JOHNSON, 1989; POMARICI, 2005).

O mercado de vinhos possui grandes dimensões internacionais, comprovado pelos dados de sua produção que em 2014 chegou a 271 milhões de hectolitros. A França é atualmente a maioria produtora, responsável pela produção de cerca de 46 milhões de hectolitros desse total. Itália, França e Espanha são os países que mais produzem e exportam a bebida e juntos correspondem a 47% da produção mundial (ORGANISATION..., 2014).

No Brasil o mercado de vinhos ainda é pequeno em comparação com o internacional e ocupa a 13ª posição como maior produtor da bebida (EMPRESA..., 2014). No país, é produzido por grandes empresas, cooperativas agrícolas ou pequenos produtores rurais e concentra-se principalmente no estado do Rio Grande do Sul (CAPELLIN, 2008). Em 2012 esse estado produziu 579,31 milhões de litros de vinho (EMPRESA..., 2013), valor correspondente a mais de 90% da produção nacional. Com o desenvolvimento de novas técnicas agrícolas e industriais que melhoram a produção e qualidade da bebida a viticultura brasileira expandiu para outras regiões do país, porém devido principalmente a condições climáticas o vinho brasileiro ainda é pouco competitivo no mercado internacional e sua produção é voltada para abastecer o mercado interno (INSTITUTO..., 2010; CAPELLIN, 2008).

Para garantir a qualidade do produto final que chega ao consumidor são necessários controles rígidos na produção da bebida, o que inclui a adição de conservantes a fim de evitar deterioração e alterações no sabor e na cor de vinhos como acontece também com diversos outros alimentos e bebidas (GUMP, 1993).

1.2. Adição de sulfito ao vinho como conservante

Os métodos de conservação são destinados a preservar os alimentos e alongar sua vida útil, estando eles terminados ou ainda na matéria-prima alimentar, portanto um alimento conservado é aquele que foi tratado convenientemente para evitar a sua alteração por períodos mais prolongados de tempo (ASCAR, 1985).

As mudanças de sabor podem ocorrer no vinho ao longo do tempo devido ao oxigênio e a presença de microrganismos, comprometendo a qualidade e consistência da bebida (MACHADO et al., 2006). Para protegê-lo dessas alterações tem sido utilizado, desde o século XVII, o dióxido de enxofre. Trata-se de um aditivo frequentemente usado na indústria de alimentos por ser capaz de retardar ou prevenir processos de oxidação excessiva de compostos fenólicos e outros elementos que conferem aroma à bebida, provocados pelo oxigênio do ar ou por enzimas oxidativas (COMUZZO, et al., 2014). Outras funções do SO₂ no vinho são: inibir a ação e desenvolvimento de bactérias, fungos (JIANG et al., 2014) e leveduras e evitar reações de escurecimento enzimático e não-enzimático durante o processamento e a estocagem da bebida (POPOLIM, 2009; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; SANTOS, 1990).

Quando adicionado aos vinhos o SO₂ pode também ligar-se a acetaldeídos e cetonas, retirando o sabor característico desses compostos que poderia prevalecer na bebida. A fração de SO₂ que não se liga a outros compostos é denominada de SO₂ livre e somente nessa forma ele consegue atravessar as paredes celulares de leveduras e bactérias e pode prevenir a ação de microrganismos e as oxidações (MACHADO, 2007; POPOLIM, 2009).

Em caso de adições em excesso do conservante pode haver alterações nas propriedades organolépticas da bebida, conferindo ao vinho um aroma e sabor de fósforo queimado (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

1.3. Efeitos na saúde humana

Apesar da ampla utilização em alimentos, a aplicação do SO₂ pode implicar em efeitos adversos à saúde humana, principalmente em indivíduos alérgicos e asmáticos que podem apresentar quadros de urticárias ou broncoespasmos se o consumirem mesmo em baixas concentrações.

Outro problema quanto ao seu consumo diz respeito há distúrbios neurológicos diagnosticados em uma pequena parcela da população que apresenta reduzida atividade da enzima sulfito oxidase, responsável por converter o sulfito a sulfato para que possa ser excretado pelo organismo através da urina (MACHADO, 2007; POPOLIM, 2009; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

1.4. Legislação e impacto na produção de alimentos

O JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants), expressa o uso seguro de um aditivo em termos de sua IDA (Ingestão Diária Aceitável), que representa a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente sem afetar a saúde humana (MACHADO et al., 2006; POPOLIM, 2009).

O IDA de grupo para sulfitos estabelecida pelo JECFA é de 0,7 mg/kg de peso corpóreo (FOOD..., 2006), expressa como dióxido de enxofre. Em estudos realizados na França, constatou-se que os vinhos e as frutas secas são os principais responsáveis pela exposição humana ao dióxido de enxofre pela alimentação. Em outro estudo realizado na Itália, foi observado que alguns consumidores de vinho podem alcançar até 99% da IDA para sulfitos somente com a ingestão dessa bebida (MACHADO, 2007).

O uso de conservantes e outros aditivos alimentares são limitados por legislações específicas em diversos países, estabelecidas com base na segurança de uso e necessidade tecnológica (MACHADO et al., 2006). De acordo com a legislação brasileira, dióxido de enxofre pode ser utilizado como conservante químico em vinhos em uma concentração máxima de 350,00 mg.L⁻¹ (AGÊNCIA..., 2011).

Em outros países esse valor pode ser ainda mais restritivo. Na Austrália, o limite permitido para concentração de SO₂ em vinhos é de 250,00 mg.L⁻¹ (MINISTRY..., 2012), e na Europa 210,00 mg.L⁻¹ para vinhos brancos e 160,00 mg.L⁻¹ para vinhos tintos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Nos Estados Unidos, a agência reguladora FDA (Food and Drug Administration) determinou nos anos 70 que qualquer produto com uma concentração de sulfito superior a 10,00 mg.L⁻¹ tivesse essa informação expressa no rótulo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Para entender e controlar o uso do SO₂ como conservante de bebidas é necessário conhecer suas propriedades físico-químicas.

1.5. Propriedades Físico Químicas do SO₂

Na natureza o SO₂ é emitido por vulcões e pela decomposição da vegetação, entretanto também pode ser gerado por atividades antrópicas e entre elas pode-se destacar a emissão por indústrias e veículos e atividades que envolvam queima de compostos de enxofre. Além de ser amplamente utilizado como conservante em alimentos, também pode estar presente em alvejantes e desinfetantes e para produção de ácido sulfúrico. (SHRIVER; ATKINS, 2008; OHLWEILER, 1971).

O dióxido de enxofre é um gás incolor, sufocante e tóxico, com pontos de fusão e ebulição de respectivamente -75,46°C e 10,2°C, e pode ser facilmente liquefeito sob pressão. Em solução aquosa o gás é hidratável formando o H₂SO₃ (equação 1). O gás também pode ser formado a partir da dissolução, hidrólise e posterior acidificação de sais como de metabissulfito de potássio, sódio ou cálcio (OHLWEILER, 1971).

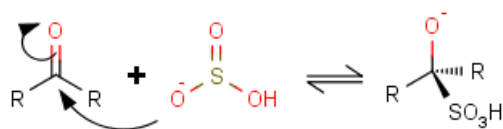


O dióxido de enxofre livre pode existir em solução sob diversas formas, de acordo com o equilíbrio. O pH do meio, a força iônica, a concentração não-eletrolítica e temperatura irão controlar o equilíbrio da reação e determinar qual será a espécie predominante em solução. Em pH entre 3,00 e 7,00 quem predomina em solução é o íon bissulfito, fora desses valores de pH o equilíbrio favorece a formação de SO₂ em pH menor que 3 e de sulfito em pH maior que 7,00. Os sulfitos constituem um grupo de compostos que incluem dióxido de enxofre (SO₂), sulfito de sódio (Na₂SO₃), bissulfito de sódio (NaHSO₃), metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅), entre outros. Todas as formas podem ser convertidas as mesmas espécies iônicas quando adicionadas aos alimentos e rapidamente a dióxido de enxofre molecular quando acidificados, são portanto quimicamente equivalente, o que permite a adição de sulfito em alimentos utilizando diferentes sais (MACHADO, 2007; POPOLIM, 2009; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Do ponto de vista de reações de transferência de elétrons, o dióxido de enxofre pode agir como agente oxidante ou redutor dependendo do meio o qual está

inserido. O enxofre presente na molécula SO_2 está no estado de oxidação +4, que é um valor intermediário entre os estados de oxidação que esse elemento pode ter que são +6, +5, +4, +2, 0 e -2. Entretanto mesmo com esse caráter redutor ou oxidante, geralmente a molécula atua reduzindo o oxigênio do ar e formando SO_3^{-2} (SHRIVER; ATKINS, 2008).

O sulfito possui a propriedade de atuar como nucleófilo em reações de adição ao grupo carbonila de aldeídos, cetonas e formaldeído. Após a reação de adição é formado em solução um aduto estável que pode regenerar o sulfito em solução após a adição de ácido e aquecimento (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).



R = H ou Alquil

(Equação 2)

Alguns adutos formados, principalmente da reação entre sulfito e alcanos ou compostos aromáticos, podem se ligar irreversivelmente e nesses compostos não é possível recuperar o sulfito em solução por acidificação ou alcalinização do meio (MACHADO et al., 2006).

Devido a seus efeitos benéficos à conservação e adversos a saúde humana é importante conhecer a concentração de sulfito presente em alimentos e bebidas que são fontes importantes de exposição a esse aditivo. A quantificação de dióxido de enxofre é um procedimento antigo e a maioria das reações consiste na conversão das várias formas de sulfito a dióxido de enxofre (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

1.6. Métodos para a determinação de SO_2

O método que tem sido utilizado como referência para determinação de sulfitos em alimentos e bebidas é o método de Monier-Williams. Reconhecido pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) como oficial (2006), esse foi o primeiro método analítico desenvolvido para essa finalidade e desde a sua criação sofreu diversas modificações a fim de torná-lo aplicável às diferentes matrizes, sendo ainda hoje utilizado como referência para novas metodologias (MACHADO et al., 2006).

O procedimento é realizado aquecendo-se e acidificando-se a amostra de vinho com HCl. A extração do SO₂ é feita através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela amostra que arrasta consigo o analito. O SO₂ é borbulhado em uma solução de peróxido de hidrogênio para que seja fixado e oxidado a ácido sulfúrico. A solução obtida é titulada com hidróxido de sódio, para que a quantidade de ácido sulfúrico gerado seja então relacionada à quantidade de dióxido de enxofre presente no vinho (DEMOLINER, 2008).

Um dos inconvenientes do método é que espécies ácidas voláteis presentes do vinho também podem ser fixadas e tituladas. Além disso as reações de adição do nucleófilo sulfito à moléculas orgânicas presentes no vinho, muitas vezes podem ser irreversíveis, tornando o analito indisponível para a titulação ácido-base (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Apesar do método de Monier-Williams ser o oficial para essa análise, no Brasil e em diversos outros países a indústria de vinhos utiliza o método Ripper para quantificar o sulfito devido a sua conveniência e rapidez. Esse método é pouco preciso e apresenta elevado erro sistemático, por conta disso apesar de ser amplamente utilizado não é adotado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) como método oficial (MACHADO et al., 2006). O método Ripper consiste em realizar uma titulação iodimétrica para controlar os níveis de sulfito livre e ligado durante a elaboração dos vinhos e utiliza amido como indicador do ponto de viragem da reação. O procedimento é realizado aquecendo-se a amostra e acidificando-a para liberação do SO₂, a solução é titulada com iodo na presença de amido formando um produto de coloração azul escura quando a reação se completa, conforme descrito na equação 3.



A baixa precisão desse método deve-se a dificuldade em visualizar o ponto de viragem em amostras de vinho tinto, pois o amido é responsável por conferir uma coloração azul escura à solução no ponto de viragem. Além disso, o custo com aparelhagem nesse método é alto caso utilize-se um titulador automático e as soluções de iodo se oxidam rapidamente, devendo a concentração do reagente ser regularmente verificada (DEMOLINER, 2008).

1.7. Método de microextração líquido-gás-líquido

O uso de técnicas baseadas em membranas é antigo e amplamente utilizado em processos industriais, a sua aplicação analítica porém é mais recente e normalmente está associada a sistemas de escoamento de reagentes (SEGUNDO; RANGEL, 2001). Existem diversas técnicas que utilizam a extração por membranas, incluindo entre elas filtração e diálise (PACHECO et al., 2010).

Pela técnica de difusão líquido-gás-líquido um analito pode ser separado da solução de uma determinada amostra por meio da passagem através de uma membrana permeável a gás e ser coletado em outra solução. As membranas criam um pequeno espaço de ar entre as duas soluções, servindo como uma terceira fase na extração, e a transferência de massa ocorre por difusão do analito na forma de vapor através da camada de ar que separa as duas fases. O volume da fase de extração utilizado é muito pequeno em comparação com o volume da amostra de vinho disponível, de forma que a extração do analito não é exaustiva e as análises de uma substância podem ser realizadas ao longo do tempo sem alterações significativas na matriz (PACHECO et al., 2010).

Como a técnica de microextração líquido-gás-líquido está relacionada à volatilidade dos componentes, a temperatura é um dos fatores mais importantes da extração e deve ser controlada e otimizada, assim como o tempo de extração e a agitação. Após um período de tempo pode ocorrer saturação da reação pois todo o analito já foi difundido para a solução extratora, porém não é necessário esperar que a reação se sature e sim que seja utilizado o mesmo tempo para realizar todas as extrações, dessa forma é criado um padrão e uma referência. A agitação é outro fator que influencia positivamente a extração principalmente no início, pois ao longo da reação ocorre a passagem das espécies analisadas da solução no invólucro do reator para a solução coletora e dessa forma a concentração da espécie de interesse torna-se cada vez menor na solução da amostra e maior na solução extratora (PACHECO et al., 2010).

A técnica de microextração líquido-gás-líquido se torna uma poderosa ferramenta analítica para quantificar compostos voláteis e semi-voláteis em vários tipos de matrizes quando combinada com a técnica de derivação. A derivação melhora a separação, detectabilidade e identificação dos compostos e é realizada com um

pequeno volume da solução extratora que contenha o analito de interesse após o tempo de reação ter se completado. Quando adicionado ao analito o agente de derivação produz um produto estável e visível para um instrumento de detecção, como um espectrofotômetro, que pode então ser quantificado (PACHECO et al., 2010).

Possíveis efeitos de memória estão relacionados ao uso de membranas, o que pode implicar no entupimento dos poros e necessidade de um passo adicional de limpeza após cada extração. Na microextração líquido-gás-líquido é possível descartar e trocar a membrana facilmente, o que elimina esses problemas, portanto desde que a membrana utilizada não tenha dimensões muito grandes e sua troca não interfira na repetitividade a técnica tem sido considerada economicamente viável (PACHECO et al., 2010).

Estudos mostrando a aplicabilidade da técnica para quantificação de sulfitos em vinhos e outras matrizes que também contenham esse aditivo, como sucos de fruta e cerveja, tem obtido resultados com boa repetitividade e precisão, para um período de tempo de extração definido, e mostrado vantagens em relação a outras metodologias analíticas (GONÇALVES et al., 2010).

1.8. Reação entre cloraniliato de bário (BaCLA) e sulfato

A reação entre o íon sulfato e o agente de derivação cloraniliato de bário já foi descrita diversas vezes na literatura como sendo satisfatória para a determinação desse analito em solução (CATANI, 1971; GLÓRIA et al., 1969; MONTRAVETA, 1974;). Ao reagir com o SO_4^{2-} em meio ácido, o cloraniliato desloca uma quantidade equivalente de íons cloranílico em função da formação do precipitado de sulfato de bário e esses íons podem ser quantificados por um espectrofotômetro. A leitura da absorbância na região do ultravioleta em 331 nm mostrou ter uma sensibilidade adequada para a realização dessa análise (CRNKOVIC; JACINTHO, 2002). A reação acontece como representado a seguir pela equação 4.



1.9. Desenvolvimento de metodologias em papel

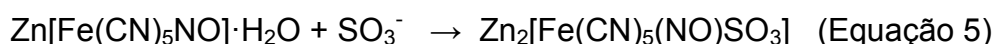
O papel é um material constituído por fibras de celulose e utilizado amplamente em diversas indústrias e segmentos da sociedade. A química do papel há muito tempo tem sido empregada como dispositivo para suporte, catálise e pré-concentração de espécies químicas na superfície desse material.

Uma das características das reações efetuadas nos suportes porosos é a formação de substâncias coloridas, que surgem no papel sob a forma de manchas. Esse é um método econômico pois emprega quantidades mínimas de reagentes e amostra, possui fácil e rápida execução e não requer aparelhagem especializada.

Trabalhos desenvolvidos por Fiegl na década de 40 já citavam o uso do papel como superfície ideal para o controle e separação de produtos oriundos de reações químicas qualitativas. A estabilidade de várias espécies químicas apresenta uma nova margem a reações químicas diferente daquelas que poderiam ser realizadas em meio aquoso (ESPINOLA, 2004; FIEGL, 1947).

Nos trabalhos que foram desenvolvidos durante a carreira de Fiegl, centenas de métodos qualitativos foram criados com o intuito de minimizar a geração de resíduos e promover reações químicas extremamente sensíveis e seletivas aliadas ao baixo custo de análise. Muitos dos métodos por ele desenvolvidos foram de alguma forma adaptados para diferentes técnicas instrumentais de análise, entretanto muitos deles já tinham um caráter quantitativo pois as espécies cromóforas formadas apresentavam uma intensidade de cor proporcional à quantidade de analito adicionada.

Dentre as reações desenvolvidas por Fiegl a reação do nitroprussiato de zinco tornou-se adequada para ensaios qualitativos de espécies de enxofre IV. Mais tarde o mesmo trabalho serviu como modelo para determinação quantitativa de sulfito em diversos outros trabalhos (MUSAGALA et al., 2013; VACEK et al., 2013).



Em trabalhos recentes desenvolvidos por Passaretti-Filho (2011), foi provado que dispositivos de imagens podem ser usados como sinal analítico para diversos tipos de determinação quantitativa e qualitativa.

Dessa forma, aliando o baixo custo do uso de sensores colorimétricos de dispositivos de aquisição de imagens e as ideias relacionadas a determinação dos analitos utilizando papel com a reação do nitroprussiato de zinco verificou-se a possibilidade de utilizar esse método para determinação quantitativa do sulfito em vinho branco.

1.10. Amostragem para análise químico-bromatológica

A amostragem para análise químico-bromatológica deve ser representativa da totalidade do alimento e não pode produzir prejuízo econômico. Os alimentos perecíveis, como o vinho, são possíveis de decompor-se ou deteriorar-se. Por isso para a análise dessa substância, as amostras de vinho utilizadas devem ser transferidas para recipiente adequado, como um frasco de vidro âmbar, vedadas e armazenadas em local refrigerado, para manter a conservação e integridade da amostra. Desse modo evita-se perdas do analito de interesse que pode ser oxidado quando em contato com o ar. (ASCAR, 1985).

2. OBJETIVOS

Dentro do plano de trabalho no desenvolvimento do método analítico proposto destaca-se como objetivo geral:

- Desenvolvimento de métodos analíticos de baixo custo para determinação de sulfito em bebidas.
- Estudo da viabilidade de utilização da técnica de microextração líquido-gás-líquido para determinação dos teores de sulfito livre em bebidas.
- Estudo da viabilidade de se utilizar papel como superfície para reações qualitativas e aquisição do sinal por scanner para a determinação quantitativa de enxofre IV.

3. PARTE 1 – Desenvolvimento de um método para determinação de sulfitos em bebidas utilizando a técnica de microextração líquido-gás-líquido

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Equipamentos

Medidas óticas: Para as medidas óticas das soluções foi empregado um espectrofotômetro Shimadzu UV prov 1800, duplo feixe, com cubetas de quartzo e caminho ótico de 1,00 cm.

Medidas cromatográficas: Foi utilizada para a cromatografia de íons capilar, ICS 500, Dionex, equipado com coluna de ânions íon pac® AS19 capilar 0,4 x 250 mm. O sistema de eluição adotado foi com gradiente de hidróxido de potássio com supressão auto regenerativa, detecção por condutividade e sistema de amostragem automático (Dionex-As-Ap).

Amostrador: Para realizar o procedimento de microextração líquido-gás-líquido foi utilizado um amostrador para extração de microvolumes conforme descrito por Gonçalves(PACHECO et al., 2010), montado sobre um agitador magnético IKA modelo RH Basic 2 mantendo a temperatura constante a 40 °C (Figura 1).

Figura 1- Amostrador de microextração líquido-gás-líquido montado sobre um agitador magnético.



3.1.2. Reagentes

Solução de cloraniliato de bário (BaCLA): 15,00 mg de cloraniliato ácido de bário (Sigma-Aldrich, USA) foram dissolvidos em metanol (SINC, Brasil) e avolumados em um balão volumétrico de 25,00 mL.

Solução extratora peróxido de hidrogênio: Foi preparada uma solução de peróxido de hidrogênio (Dinâmica, Brasil) diluída com aproximadamente $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Ácido fosfórico: O ácido fosfórico foi utilizado com título de 98% (Vetec, Brasil).

Solução de cloreto de sódio: 2,003 g de NaCl (J.T. Baker, USA) foram diluídos em balão de 1000,00 mL com água destilada.

Solução padrão de sulfato de sódio: O sulfato de sódio anidro (J.T.Baker, USA) foi preparado pesando 56,2 mg do sal e transferindo a massa para um balão volumétrico de 250,00 mL avolumado até o menisco com água destilada.

Solução padrão de ácido cloranílico: O ácido cloranílico (Fluka, USA), foi preparado pesando 32,0 mg do sal e transferindo a massa quantitativamente para um balão volumétrico de 100,00 mL, dissolvido e avolumado em metanol.

Sal de Sulfito de sódio: O sulfito de sódio (Mallinkrodt, USA) foi previamente titulado pelo método iodimétrico e apresentou um teor de 42,1% em SO_2 .

Solução padrão de sulfito de sódio: As soluções de sulfito de sódio foram preparadas em solução tampão Triplex de cloreto de sódio em pH 7.00 e concentração de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. As soluções foram preparadas nas concentrações de 15,00; 20,00; 30,00; 40,00; 50,00; 60,00; e 70,00 mg.L^{-1}

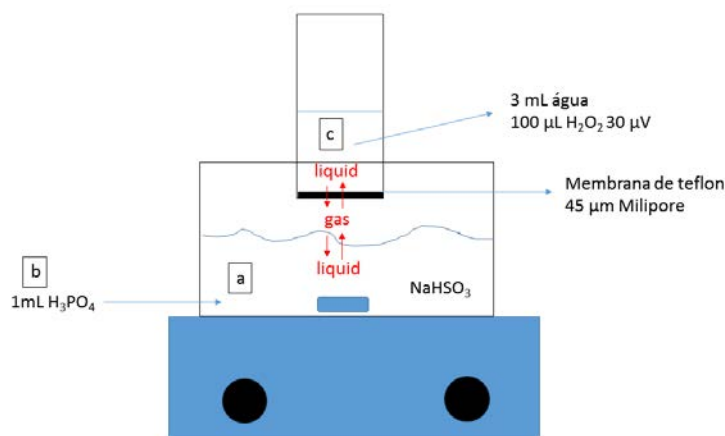
3.1.3. Procedimento

3.1.3.1. Eficiência do processo de extração

Para verificar a eficiência de coleta do SO_2 gerado após acidificação e aquecimento da amostra, o sistema de microextração foi montado adicionando-se quantidades conhecidas do sal de sulfito de sódio no invólucro do reator (Figura 2 (a)). Para conversão do sal a gás foi adicionado o ácido fosfórico 98% com auxílio de uma seringa (Figura 2(b)) promovendo o encontro entre os dois reagentes, conforme representado na Figura 2.

Para coletar o gás formado após a reação entre o sal e o ácido um volume de 3,1 mL de uma solução aquosa contendo peróxido de hidrogênio $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ foi utilizada para promover a captura do gás formado e sua conversão a sulfato (Figura 2(c)). Após coletado o gás, 100,00 μL da solução extratora foram diluídos em 50,00 mL de água destilada e submetido a uma análise de cromatografia de íons capilar para realizar a quantificação das alíquotas recolhidas e observar a eficiência do processo de extração do gás desprendido do reator. As amostras quantificadas foram comparadas com o teor de SO_2 total que poderia ser gerado após a reação de acordo com o teor de SO_2 encontrado na titulação do reagente. As reações foram realizadas adicionando-se massas de sulfito de sódio de: zero; 0,11; 0,036; 0,052 e 0,084 g.

Figura 2 - Esquema geral de funcionamento do amostrador nas etapas de adição dos reagentes e disposição da solução extratora.



3.1.3.2. Propriedade óticas do ácido cloranílico

Para verificar as propriedades óticas do ácido cloranílico foram adquiridos espectros de absorção na região do ultravioleta entre 190 e 440 nm. As soluções foram diluídas para as concentrações de zero; 0,00190; 0,01900; 0,09100; 0,3032; 0,5053 e 0,7580 mmol.L^{-1} .

3.1.3.3. Reação entre cloraniliato de bário e sulfato de sódio

Foi realizado um estudo a fim de observar a variação do espectro da solução de cloraniliato ácido de bário após a adição de uma solução padrão de sulfato de sódio. Em um balão 5,00 mL, foram adicionados 0,50 mL da solução de $\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e 20 μL da solução padrão de sulfato de sódio e o volume foi completado com metanol até o menisco. O mesmo procedimento foi realizado variando o volume de solução padrão de sulfato de sódio utilizada para os volumes de zero; 20,00; 100,00; 200,00; 300,00; 400,00; 500,00; 600,00; 700,00; e 800,00 μL respectivamente.

3.1.3.4. Reação de derivação para as alíquotas coletadas

Após completada a reação das amostras ocorrida no reator e realizado o procedimento de extração do analito, uma alíquota de 20 μL da solução extratora foi transferida para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Foi adicionado um volume de 0,50 mL de solução de $\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e o balão então avolumado com metanol. Após um tempo de 15 minutos foi feita a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro.

3.1.3.5. Etapa de avaliação analítica

Um volume de 5,00 mL de vinho foi transferido para balão volumétrico de 25,00 mL e avolumado com solução de cloreto de sódio. Com auxílio de uma pipeta volumétrica foram transferidos 2,00 mL da solução diluída de vinho às soluções padrão de sulfito de sódio no invólucro do reator. Após feita a vedação do amostrador, um volume de 1,00 mL de ácido fosfórico foi adicionado com uma seringa para promover, sob agitação e aquecimento, a liberação do gás. Para capturar o gás e convertê-lo a sulfato foi utilizada uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio (solução extratora). A solução permaneceu durante 30 minutos no amostrador sob agitação constante à 40°C. 20 μL da solução extratora foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Ao balão foi adicionado um volume de 0,50 mL de solução de $\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e o volume completado metanol. Após um tempo de 15 minutos foi feita a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro. Cada uma das análises foi feita em triplicata.

3.1.3.6. Protocolo de análise para as bebidas

3.1.3.6.1. Procedimento para as amostras de vinho

Para preparar as soluções de vinho uma alíquota de 5,00 mL de amostra foi diluída com solução de cloreto de sódio e avolumada em balão de 25,00 mL. Foram transferidos 2,00 mL da solução de vinho diluída para o reator com auxílio de uma pipeta volumétrica e após feita a vedação do amostrador um volume de 1,00 mL de ácido fosfórico foi adicionado com uma seringa para promover, sob agitação e

aquecimento, a liberação do gás. Para capturar o gás formado e convertê-lo a sulfato foi utilizada uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio (solução extratora). A solução permaneceu durante 30 minutos no reator sob agitação constante à 40°C. 20 µL da solução extratora foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Ao balão foi adicionado um volume de 0,50 mL de solução de $\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e o volume completado metanol. Após um tempo de 15 minutos foi realizada a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro. As amostras submetidas ao ensaio foram repetidas 5 vezes.

3.1.3.6.2. Procedimento para as amostras de cerveja

Uma alíquota de 2,00 mL de cerveja foi transferida para o reator com auxílio de uma pipeta volumétrica. Após feita a vedação do amostrador um volume de 1,00 mL de ácido fosfórico foi adicionado com o auxílio de uma seringa para promover a liberação do gás sob agitação e aquecimento. Para capturar o gás e convertê-lo a sulfato foi utilizada uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio. A solução permaneceu durante 30 minutos no reator sob agitação constante a 40°C. 20 µL da solução extratora foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Ao balão foi adicionado um volume de 0,50 mL de solução de $\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e o volume completado metanol. Após um tempo de 15 minutos realizou-se a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro. As amostras submetidas ao ensaio foram repetidas 5 vezes.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. Eficiência do processo de extração

Para verificar a influência da quantidade de amostra de sais de sulfito de sódio e eficiência do processo de extração, foi realizado um procedimento inicial no qual as alíquotas da solução extratora foram submetidas à análise cromatográfica para determinar a quantidade de SO₂ livre e assim verificar o fator de extração do amostrador. Diferentes massas do sal foram submetidas à extração e análise cromatográfica para verificar a congruência entre a massa de sal adicionada e a massa de sulfato recuperada após a oxidação na solução extratora. Os resultados estão dispostos na Tabela 1.

A massa de sulfato obtida na solução extratora, aumenta em função do aumento da massa de sulfito adicionada. Existe uma correção entre a massa coletada e a massa extraída calculada com base no teor de SO₂ encontrado na titulação do reagente, apresentando uma recuperação de 98,0% para o processo de extração realizado.

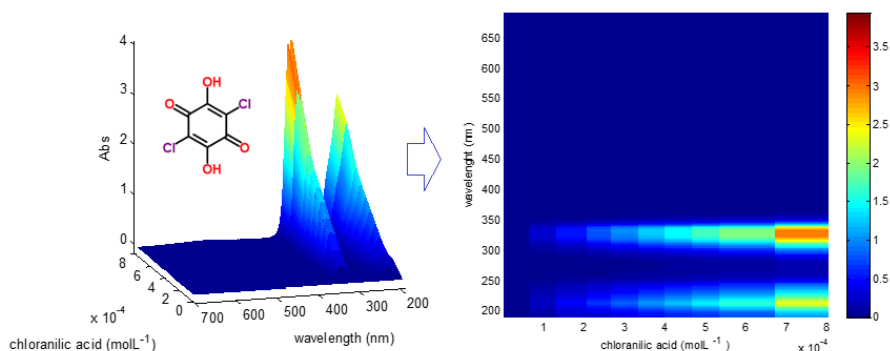
Tabela 1 - Teores de SO₂ livre recuperados de alíquotas de sal de sulfito de sódio.

NaHSO ₃ (g)	Área ($\mu\text{S}\cdot\text{min}^{-1}$)	50.00 mL	100 μL	SO ₄ ⁻² (g)	SO ₂ livre (g)	Teor % SO ₂ Livre
0	0,2271	0,0000	0	0,000	0	---
0,011	0,4264	0,1993	99,63	0,003	0,00643	47,996
0,036	0,5267	0,2996	149,7822	0,005	0,02106	22,048
0,052	0,9164	0,6893	344,6414	0,011	0,03042	35,121
0,084	2,1239	1,8967	948,3676	0,029	0,04914	59,828
Teor encontrado na titulação				42,1 %		41,248
						98,0%

3.2.2. Estudo das propriedades óticas do ácido cloranílico

Ao iniciar os estudos das propriedades óticas do ácido cloranílico foram investigados os comprimentos de onda de absorção máxima da molécula e seu comportamento em diferentes concentrações. O espectro de absorção revela que esse composto absorve intensamente na região do ultravioleta, apresentando absorções máximas nos comprimentos de onda de 212 e 331 nm, como representado na Figura 3.

Figura 3 - Amostrador de micro extração líquido-gás-líquido montado sobre um agitador magnético.



3.2.3. A reação entre cloraniliato de bário e sulfato de sódio

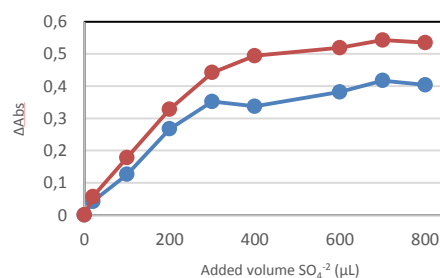
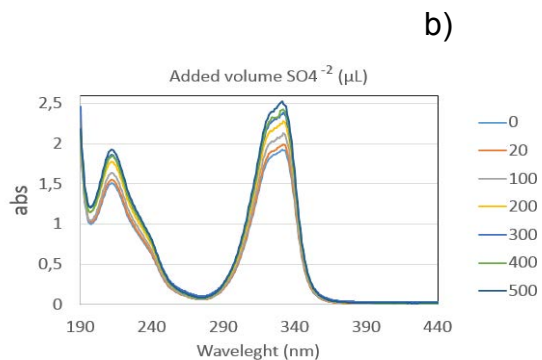
O cloraniliato ácido de bário apresenta um espectro de absorção na região do ultravioleta muito similar ao espectro do ácido cloranílico, com uma elevada absorção na região de 212 e 331 nm como representado na Figura 4(a). Após a adição de volumes conhecidos de SO_4^{2-} à solução de $\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ ocorre um aumento na absorção nas regiões de estudo no espectro do UV. Por se tratar de uma solução diluída os comprimentos de onda na região do ultravioleta foram escolhidos por serem mais convenientes para determinar o ácido cloranílico em concentrações inferiores à $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

O aumento da absorbância foi gradual e proporcional à quantidade de sulfato adicionado alcançando um patamar em $400 \mu\text{L}$ da solução padrão de sulfato de sódio,

do que se conclui que acima dessa concentração ocorre saturação da reação e não é mais possível determinar variações significativas no sinal de absorção.

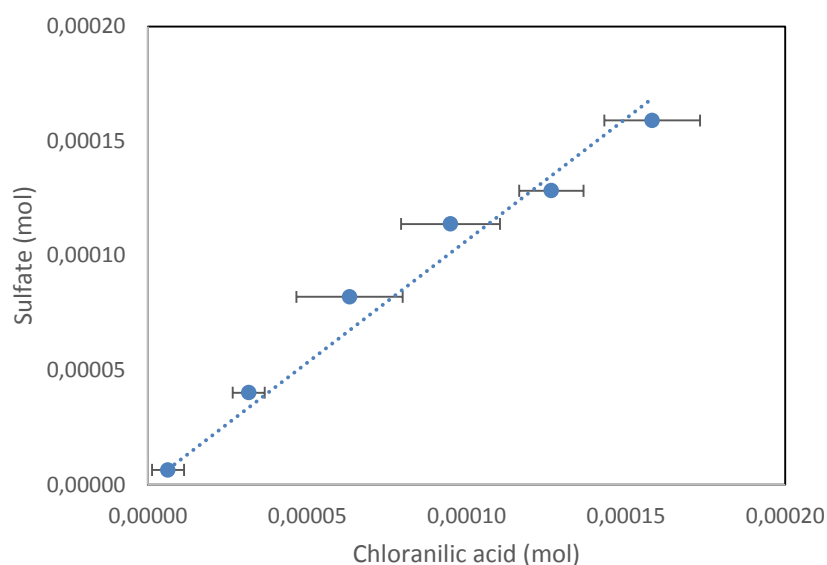
Figura 4 - a) Espectro de absorção cloraniliato de bário ácido após a adição de volumes conhecidos de uma solução padrão de sulfato de sódio $0,001583 \text{ molL}^{-1}$. b) Aumento gradual da variação de sinal absorção em 212 e 331 nm.

a)



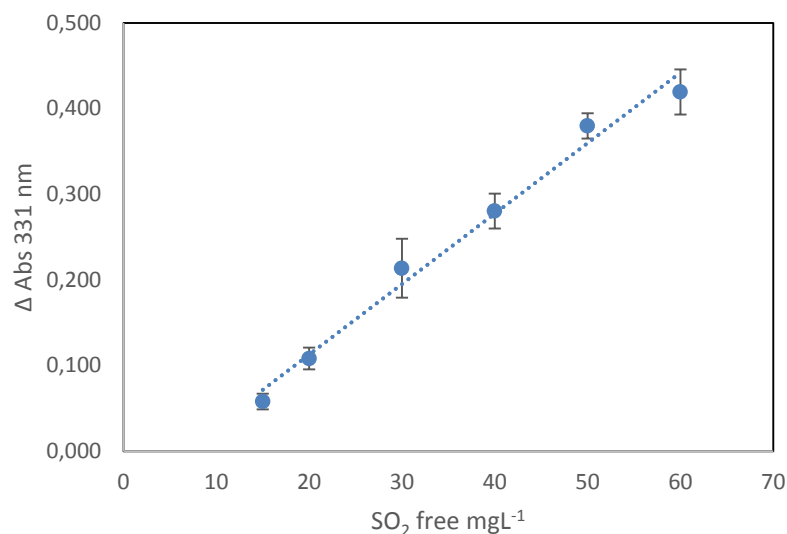
Os valores na variação de intensidade de absorção na região do UV foram convertidos em quantidade de mols de ácido cloranílico liberado pela reação, formados após a reação com uma quantidade molar conhecida de sulfato de sódio, conforme representado na Figura 5. A relação entre o número de mols de sulfato de sódio adicionado e de ácido cloranílico liberado após a reação revelou uma provável relação entre as espécies em uma proporção de 1:1 para uma absorção em 331 nm.

Figura 5 - Correlação entre mol de sulfato adicionado e mol equivalente ao ácido cloranílico em solução medido em 331 nm.



3.2.4. Etapa de avaliação analítica

Para a etapa de avaliação analítica foi feito o procedimento de extração do analito de interesse com soluções de 2,00 mL de vinho diluído e concentrações conhecidas das soluções padrão de sulfito e traçada uma curva em triplicada da variação da absorção observada em 331 nm para o complexo $BaC_6Cl_2O_4$ após a reação de derivação com a solução extratora. A curva analítica relativa ao sinal observado para diferentes concentrações de SO_2 aquoso está representado na Figura 6.

Figura 6 - Curva analítica do método proposto.

O limite de detecção foi calculado utilizando o critério do desvio de 20 soluções do branco ($X \pm s.t_{95\%/n}^{1/2}$) e os demais parâmetros analíticos estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Figuras de mérito analítico do método proposto.

PARÂMETROS	VALORES OBTIDOS
FAIXA LINEAR	15 – 60 mg.L ⁻¹
EQUAÇÃO DA RETA	$A_{331nm} = 0,00823(\pm 0,00049)[SO_2 \text{ mg.L}^{-1}] - 0,05155(\pm 0,01929)$
ERRO RELATIVO (%)	7,50
COEFICIENTE DE VARIÇÃO (%)	6,00
LIMITE DE DETECÇÃO*	6,3 mg.L ⁻¹
R ²	0,9859
SD	0,01918

Os parâmetros analíticos obtidos mostram que o método pode ser usado para quantificação de amostras líquidas contendo sulfito.

3.2.5. Aplicação em amostras de cerveja e vinhos.

As amostras de vinho e cerveja foram submetidas à ensaios quantitativos para a determinação de sulfito livre e os resultados foram posteriormente comparados com

os valores obtidos pelo método Ripper por ser esse um método de fácil aplicação e recomendado pela legislação brasileira.

As amostras de vinho tinto A e B foram escolhidas por apresentarem diferentes teores de sulfito livre e a cerveja foi analisada para determinar teores menores de sulfito em bebidas e testar uma matriz diferente para verificação da aplicabilidade do método.

A tabela 3 apresenta os valores de sulfito encontrados pelo método proposto e a comparação com os valores obtidos pela titulação pelo método Ripper.

Tabela 3 - Teores de sulfito livre encontrados nas bebidas analisadas.

Amostra	Método proposto (mg.L ⁻¹)	Titulação (Ripper) (mg.L ⁻¹)	Erro relativo (%)	CV (%)
Vinho tinto (A)	54,1 ± 1,1	57,5 ± 2,9	5,9	2,1
Vinho tinto (B)	112,5 ± 10,5	125,0 ± 5,0	9,9	8,3
Cerveja	33,2 ± 1,9	29,2 ± 3,6	13,7	5,6

***Valores de incerteza expressos com intervalo de confiança de 95%.**

Os resultados encontrados para os teores de sulfito livre nas bebidas pelos dois métodos não diferem significativamente entre si em um intervalo de confiança de 95%. O método apresentou-se adequado para a determinação de sulfito livre nas bebidas analisadas apresentando boa concordância com o método Ripper, tradicionalmente utilizado em vinícolas para testar a qualidade do vinho produzido e recomendado como comparativo para o desenvolvimento de novas metodologias.

3.3. CONCLUSÃO

O método desenvolvido apresentou uma alternativa dentro da literatura para a determinação de sulfito livre em vinhos utilizando a técnica de microextração líquido-gás-líquido.

Pela técnica empregada foi possível obter medidas sensíveis utilizando os sais de cloraniliato de bário em suspensão e métodos ópticos de análise para a determinação dos teores de sulfito extraídos das bebidas.

Esse estudo mostrou a viabilidade e a possibilidade de aplicação do método em diferentes alimentos e bebidas que contenham o mesmo tipo de aditivo alimentar ou em amostras cujos componentes gasosos podem ser extraídos da matriz e reabsorvidos por uma interface líquida pré-concentrada.

4. PARTE 2 – Desenvolvimento de um método analítico para determinação de sulfito em vinhos brancos utilizando um scanner de escritório e análise das imagens digitalizadas

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Equipamentos

Reações no papel: para as reações de impregnação de reagente em papel foi utilizado o papel de filtro Absorbant Pads 32 Milipore®.

Digitalização das imagens: para a digitalização das imagens dos papéis impregnados com os reagentes foi utilizado um scanner convencional de escritório Scanner HP Scanjet- G4050.

Obtenção do sinal analítico: para obter o sinal das imagens que será relacionado com a concentração de sulfito presente nas amostras foi utilizado o software de computador ImageJ.

4.1.2. Reagentes

Tampão Triplex: o tampão Triplex foi preparado com 1,880 g de trietanolamina dissolvidos em 500,00 mL de água destilada onde foram feitas adições de ácido e hidróxido para se obter pH 7 e uma concentração de $0,01\text{mol.L}^{-1}$.

Solução de nitroprussiato de zinco: para preparar a solução de nitroprussiato de zinco 0,211g de nitroprussiato de sódio (Merck 99%) foram dissolvidos em 2,00 mL de água destilada e misturados com 1,00 mL de solução de acetato de zinco dihidratado ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 99,5%) em concentração de $150,09\text{g.L}^{-1}$.

Solução padrão de sulfito de sódio: foi preparada uma solução padrão de bissulfito de sódio (Baker 58% dosado em SO_2) com 0,110 g do sal dissolvidos e avolumados com tampão Triplex em balão de 100,00 mL.

Soluções de sulfito de sódio: a partir das soluções padrão de sulfito de sódio foram preparadas 5 soluções de bissulfito de sódio nas concentrações 0; 0,11; 0,22; 0,33; 0,44 e $0,55\text{mol.L}^{-1}$

4.1.3. Procedimento

4.1.3.1. Teste qualitativo

Para o teste qualitativo a solução padrão de sulfito de sódio de concentração $0,011 \text{ mol.L}^{-1}$ foi diluída e transferida para o centro de papel micropad Milipore com o auxílio de uma pipeta, ao reagente no centro do papel foram adicionados $10,00 \mu\text{L}$ da solução preparada de nitroprussiato de zinco. O experimento foi realizado para soluções de sulfito nas concentrações de $0,011$; $0,007$; $0,004$ e $0,002$ e zero mol.L^{-1} . Os papéis foram digitalizados e o sinal obtido em escala logarítmica pelo no canal “Blue” do software ImageJ foi correlacionado com as concentrações de sulfito adicionadas ao papel.

O limite de detecção obtido nessa análise foi de $0,0019 \text{ mol.L}^{-1}$ e com essa concentração de sulfito foram preparadas outras 6 soluções, da mesma forma como descrito anteriormente, e repetido o procedimento de digitalização e processamento dos papéis para observar as variações no sinal detectado pelo software para uma mesma concentração do analito.

4.1.3.2. Construção da curva analítica

Para construir a curva analítica foi utilizada a solução padrão de sulfito de sódio de concentração $0,011 \text{ mol.L}^{-1}$ para preparar novas soluções com concentrações de $0,11$; $0,22$; $0,33$; $0,44$ e $0,55 \text{ mol.L}^{-1}$. Uma alíquota de $100,00 \mu\text{L}$ de cada solução foi transferida para o centro de um filtro de papel micropad Milipore com auxílio de uma pipeta. Ao reagente no centro do papel foram adicionados $100,00 \mu\text{L}$ da solução de nitroprussiato de zinco. Em seguida o papel foi submetido à uma atmosfera saturada com amônia para revelação da cor durante um intervalo de tempo de 1 minuto.

4.1.3.3. Digitalização e processamento das imagens

Após terem sido submetidos à atmosfera saturada com amônia, os papéis foram imediatamente digitalizados utilizando um scanner convencional de escritório HP Scanjet- G4050. As imagens foram processadas e segmentadas utilizando o software gratuito de processamento de imagens ImageJ. As quantidades de sulfito

adicionadas foram correlacionadas com a intensidade de cor normalizada em escala logarítmica no canal Blue do software.

4.1.3.4. Alíquotas de vinho para quantificação

Para a quantificação das alíquotas de vinho, 100,00 μL da solução de nitroprussiato de zinco foram transferidos para o centro de um filtro de papel micropad Milipore. Ao reagente no centro do papel foram adicionados 100,00 μL de soluções de vinho diluídas em água destilada na proporção de 1:1. Em seguida, o papel foi submetido à uma atmosfera saturada com amônia para revelação da cor durante um intervalo de tempo de 1 minuto. Os papéis foram imediatamente digitalizados utilizando um scanner convencional de escritório HP Scanjet- G4050. As imagens foram processadas e segmentadas utilizando o canal “Blue” do software ImageJ. A análise para a mesma concentração de vinho foi repetida 4 vezes e a intensidade dos sinais obtidos correlacionada com a concentração de sulfito.

4.1.3.5. Método da adição de padrão para as alíquotas de vinho

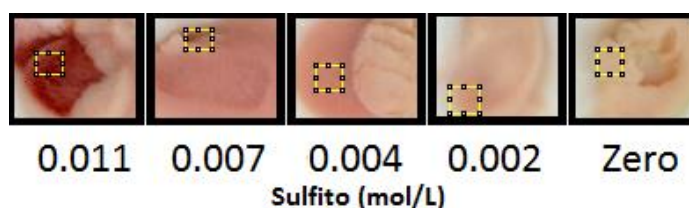
Para o método da adição de padrão foram preparadas 6 soluções contendo concentrações sulfito de sódio entre 55,00 e 330,00 mol.L^{-1} e padronizadas em tampão Triplex. O volume de 5,00 mL foi completado com vinho branco diluído em água destilada na proporção de 1:1. Em seguida, 100,00 μL de cada solução foram transferidos para o centro de papel de filtro micropad Milipore e foi adicionado 100,00 μL da solução de nitroprussiato de zinco. Os papéis foram imediatamente digitalizados utilizando um scanner convencional de escritório HP Scanjet- G4050. As imagens foram processadas e segmentadas utilizando o canal “Blue” do software ImageJ e a intensidade de cor foi normalizada em escala logarítmica para ser correlacionada com as quantidades de sulfito adicionadas.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1. Teste qualitativo

Nesse ensaio foi realizado o teste visual para observar a variação de cor na superfície do papel quando impregnado com reagente colorimétrico em relação a concentração de sulfito de sódio e a variação do sinal da imagem em comparação com uma concentração conhecida de sulfito. Para o teste qualitativo foram preparadas 5 soluções com concentrações de 0,011; 0,007; 0,004; 0,002 e zero mol.L⁻¹ de sulfito de sódio e as imagens dos papéis foram digitalizadas utilizando um scanner de mesa Scanjet- G4050. Visualmente foi observado que o aumento da concentração de sulfito foi proporcional ao aumento da intensidade de cor vermelha na superfície do papel.

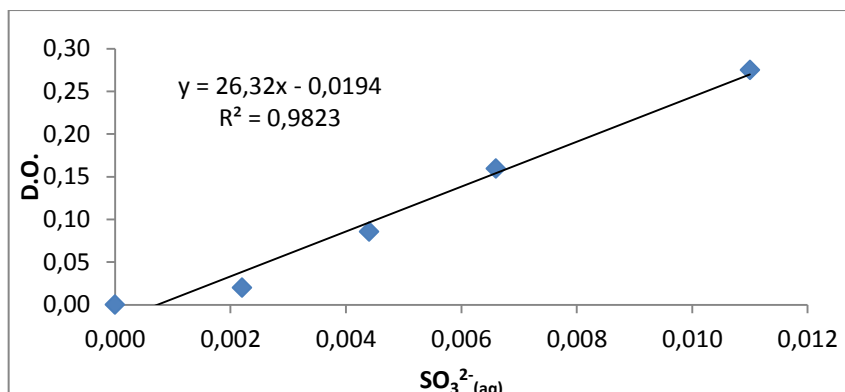
Figura 7 - imagem das soluções obtidas após a reação entre nitroprussiato de zinco e sulfito de sódio.



A intensidade de cor do produto formado foi medida através das informações de reflectância obtidas pela digitalização e processamento das imagens através do software ImageJ®. Para processá-las no programa, foi selecionada uma região da figura com coloração homogênea e os valores da intensidade de cor foram obtidos em uma escala de tons de azul. Essa escala de azul foi convertida em densidade ótica e os resultados encontrados correlacionados com a concentração de sulfito adicionado ao papel.

Como representado na Figura 8, o sinal observado para densidade ótica possui uma boa correlação linear com a concentração de sulfito adicionado ao papel:

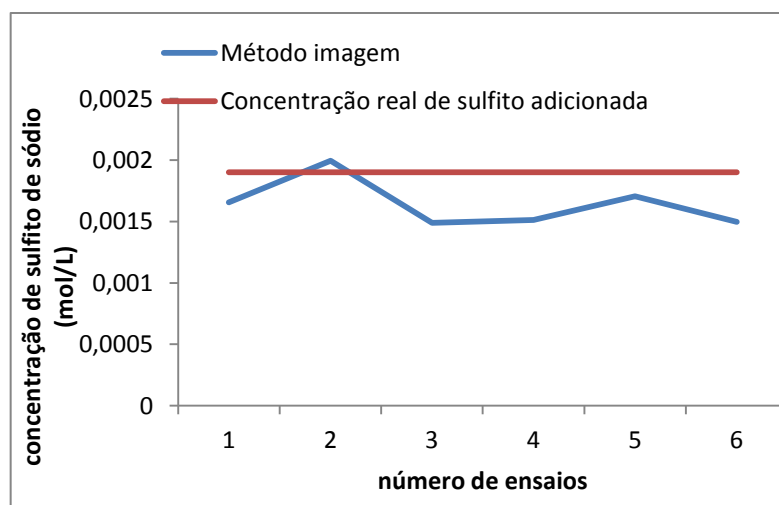
Figura 8 - curva analítica obtida para as imagens do produto da reação entre nitroprussiato de zinco e diferentes concentrações de sulfito.



Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando o método recomendado pela IUPAC para métodos espectrofotométricos. O limite de detecção foi calculado multiplicando-se o desvio padrão por 3 e o valor obtido foi de $0,0019 \text{ mol.L}^{-1}$. O limite de quantificação foi calculado multiplicando o desvio padrão por um fator de 10 e o valor obtido foi de $0,0065 \text{ mol.L}^{-1}$.

O método foi repetido utilizando uma concentração constante de sulfito de sódio ($0,0019 \text{ mol.L}^{-1}$) com 6 amostras, conforme representado na figura 9. O valor médio de concentração obtido para as amostras no método proposto foi de $0,0016 (\pm 0,0002) \text{ mol.L}^{-1}$ de sulfito apresentando um erro relativo de 13,6% e coeficiente de variação de 10,8%.

Figura 9 - variação do sinal observado em comparação com o concentração real da amostra de sulfito.



Esses valores observados para o erro relativo e o coeficiente de variação são devidos a baixa concentração de sulfito adicionada para os ensaios realizados. Outro fator que pode ter influenciado a análise é a instabilidade do sulfito em solução gerando como consequência uma diminuição do sinal observado.

4.2.2. Construção da curva analítica

A curva analítica foi construída impregnando 100,00 μL do reagente colorimétrico nas superfícies de papel milipore® com 100,00 μL de sulfito de sódio em diferentes concentrações e deixando os papéis em atmosfera saturada com amônia por 1 minuto. Foi observado um aumento gradual na tonalidade da cor vermelha em função da concentração de sulfito adicionada, como pode ser observado na Figura 10.

4.2.3. Processamento e análise das imagens digitalizadas

A intensidade de cor do produto formado foi medida através das informações de reflectância obtidas pela digitalização e processamento das imagens através do software ImageJ®. Para processá-las no programa, foi selecionada uma região da figura que apresentasse coloração homogênea e os valores da intensidade de cor foram obtidos em uma escala de tons de azul. Essa escala de azul foi convertida em escala logarítmica e os valores encontrados foram correlacionados com a concentração de sulfito adicionado ao papel, apresentando uma correlação linear, como apresentado na Figura 11.

Figura 10 - imagens dos papéis com diferentes concentrações de sulfito selecionadas e normalizadas em escala logarítmica no canal "Blue".

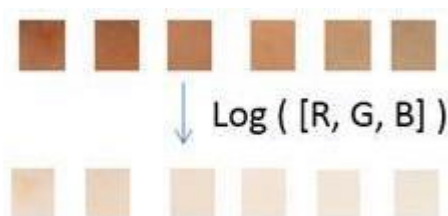
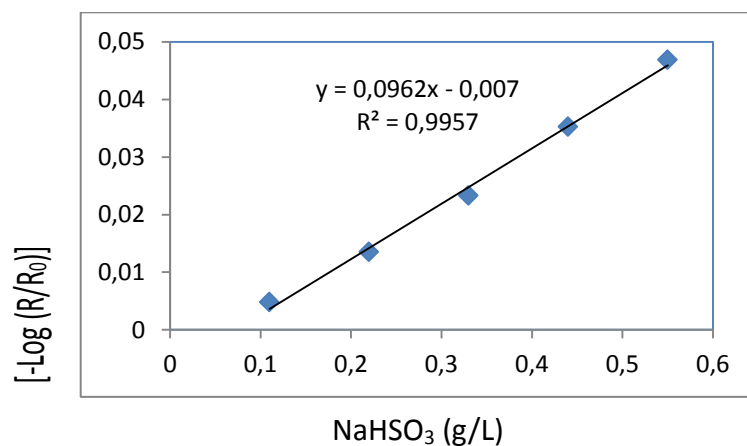


Figura 11 - Curva analítica partindo de padrões de sulfito em água.

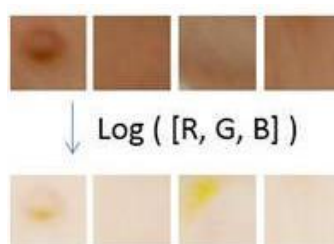


4.2.4. Quantificação das amostras de vinho

As amostras de vinho foram transferidas nas mesmas concentrações e volume para o filtro de papel micropad Milipore e digitalizadas pelo scanner para serem processadas e normalizadas em escala logarítmica pelo software ImageJ.

As imagens dos papéis de filtro mostraram-se visualmente parecidas em relação a intensidade de cor, como observado na figura 12.

Figura 12 - amostras de vinho quantificadas e normalizadas em escala logarítmica no canal "Blue".



Os valores encontrados para o sinal analítico pelo software e convertidos em escala logarítmica e correlacionados à concentração de sulfito estão dispostos na tabela 4. O desvio padrão observado é relativamente pequeno, a quantificação portanto apresentou boa precisão.

Tabela 4 - valores obtidos pelo ImageJ para quantificação de sulfito nas amostras de vinho.

Valor	R/Ro	[-Log (R/R0)]	[NaHSO ₃]
médio			
209.231	1.094299	0.016616	0.154473
210.361	1.100209	0.014276	0.127336
209.489	1.095648	0.01608	0.148264
209.963	1.098127	0.015099	0.136877
		média	0.141737
		s	0.012053

4.2.5. Método da adição de padrão para as alíquotas de vinho

A adição de padrão foi realizada a fim de se eliminar da análise erros relacionados a possíveis interferentes provenientes da matriz. Nesse ensaio foi realizado o teste para determinar a concentração de sulfito presente no vinho branco através da adição de padrões de sulfito de sódio às amostras de vinho. Como representado na Figura 14, o sinal observado possui uma boa correlação linear com a concentração de sulfito adicionado ao papel.

Figura 13 - amostras de vinho preparadas pelo método da adição de padrão digitalizadas e convertidas em escala logarítmica pelo canal "Blue".

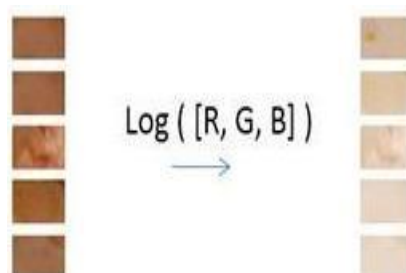
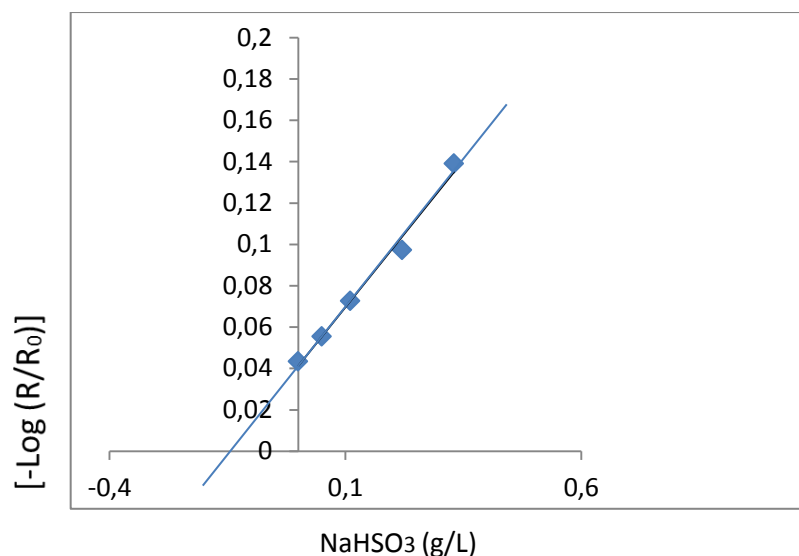


Figura 14 - Construção da curva analítica com adição de padrão para as amostras de vinho branco.



Os testes realizados com medidas diretas e pelo método da adição de padrão foram comparados com o método Ripper e as figuras de mérito analítico usando os dois diferentes ensaios são mostradas na tabela 5.

Tabela 5 - Figuras de mérito do método proposto.

Parâmetros analíticos	Medida direta	Adição de padrão
Faixa de linearidade (mg.L ⁻¹)	55-550	50 – 330
SD	0.0013	0.0046
R ²	0.9956	0.9890
LD (mg.L ⁻¹)	39	48
LQ (mg.L ⁻¹)	132	162
Método ripper (mg.L ⁻¹)		95 ± 10
Método direto (a)		142 ± 13
Método com adição de padrão (b)		149 ± 20

O método desenvolvido a partir da impregnação em papel apresentou boas figuras de mérito analítico quando comparado com o método Ripper.

4.3. CONCLUSÃO

O método de impregnação do reagente em papel mostrou-se de fácil aplicação e mais conveniente do que o convencional para determinação do sulfito em vinhos brancos. Outros ensaios devem ser realizados para validar e aplicar o método em outras matrizes que contenham sulfito.

Um inconveniente do método proposto é a impossibilidade de realizar a análise com amostras de vinho tinto pois como o produto da reação colorimétrica formado é vermelho há uma dificuldade em se observar visualmente variações de cor no produto formado, não podendo o vinho tinto então ser determinado quantitativamente pelo método de análise com nitroprussiato de zinco e processamento de imagens digitais.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Nesse trabalho foram desenvolvidos dois métodos analíticos para quantificação do conservante SO₂ livre em bebidas.

Os resultados obtidos pelos dois métodos para a concentração de sulfito presente nas amostras foram comparados com o valor encontrado na titulação realizada pelo método tradicional recomendado como referência para o desenvolvimento de novas metodologias.

Os métodos apresentaram bons resultados para desvio padrão e limite de detecção e os erros calculados podem ser considerados coerentes quando comparados com o método Ripper. Os métodos desenvolvidos mostraram vantagens em relação ao convencional por serem de fácil aplicação, baixo custo e utilizarem pouca quantidade de reagentes para a realização das medidas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar do sucesso inicial na utilização dos métodos propostos para a análise de sulfito em bebidas, novos ensaios devem ser realizados para melhorar o sistema de coleta de gás formado. Comparações com outras técnicas também são desejáveis para ampliar a gama de possibilidades de aplicação do amostrador líquido-gás-líquido.

Na técnica colorimétrica utilizando imagens digitais foi possível apenas fazer a quantificação de amostras incolores. Um passo futuro que pode ser realizado é a mescla da técnica de microextração líquido-gás-líquido ao sensores impregnados em papel.

Estudos prévios ainda serão necessários para dar corpo a esta proposta, entretanto as possibilidades deslumbradas neste trabalho podem em breve abrir caminho para o desenvolvimento de outras técnicas de baixo custo para a análise de sulfito em bebidas.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Consulta Pública CP nº 28, de 4 de maio de 2011. Dispõe a sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares com suas respectivas funções e limites máximos para bebidas alcoólicas (exceto as fermentadas). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 mai. 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6a8412804e9f764bb512b78a610f4177/Relat%C3%B3rio+Final+CP+28.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 15 nov. 2014

ASCAR, J. M. **Alimentos: aspectos bromatológicos e legais**. São Leopoldo: Unisinos, 1985. 327 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis: sulfites in foods**. Rockville, 2006. Disponível em: <<http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=9974>>. Acesso em 14 nov. 2014.

CAPPELLIN, P. Entre a Memória e o Mercado: o desenvolvimento da empresa de porte médio no Brasil. **Revista de Sociologia e Política**, v. 16, n. 31, p. 39-70, nov. 2008.

CATANI, R. A.; GLÓRIA, N. A.; VITTI, G. C. Adsorção de sulfato pelo solo. **Anais da E. S. A. Luiz de Queiroz**, v. 28, p. 235-345, Nov. 1971.

COMUZZO, P. BATTISTUTTA, F.; VENDRAME, M.; PÁEZ M. S.; LUISI, G.; ZIRONI, R. Antioxidant properties of different products and additives in white wine. **Food Chemistry**, v. 168, p. 107-114, jul. 2014.

CRNKOVIC, P. M.; JACINTHO, A. O. Emprego de reagente em suspensão em sistema de injeção em fluxo: determinação espectrofotométrica de sulfato em águas naturais. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 254-258, Mai. 2002.

DEMOLINER, F. **Avaliação de dois métodos analíticos de determinação de dióxido de enxofre livre**. 2008. 25 f. Monografia (Tecnólogo em Viticultura e Enologia) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECÁRIA UVA E VINHO. **Atuação do Brasil no mercado vitinícola mundial: panorama 2013.** Bento Gonçalves, 2014. 8 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECÁRIA UVA E VINHO. **Viticultura mundial: principais países e posição do Brasil.** Bento Gonçalves, 2013. 8 p.

ESPINOLA, A. Fritz Feigl: sua obra e novos campos tecno-científicos por ela originados. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 169-176, Jan. 2004.

FIEGL, F. **Qualitative Analysis by Spot Tests.** Inorganic and Organic Applications. 3. ed. Nova York: Elsevier Publishing Company, 1947. 574 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Food safety and quality: sulfur dioxide.** Roma, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>> Acesso em 14 nov. 2014.

GONÇALVES, L. M.; MAGALHÃES, P. J.; VALENTE, I. M.; PACHECO, J. G.; DOSTÁLEK, P.; SÝKORA, D.; RODRIGUES, J. A; BARROS, A. A. Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 24, p. 3717–3722, 2010.

GLORIA, N. A.; CATANI, R. A.; VITTI, G. C. Determinação do enxofre orgânico do solo pelo método colorimétrico do cloranilato de bário. **Anais da E. S. A. Luiz de Queiroz**, v. 26, p. 191-201, Dez. 1969.

GUMP, B. H. **Beer and Wine Production: Analysis, Characterization and Technological Advances.** Washington: American Chemical Society, 1993. 275 p. (Symposium series).

HARRIS D. **Análise Química Quantitativa.** 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012, 898 p.

HUGHES, P. S.; BAXTER, E. D. **Beer**: Quality, safety and nutritional aspects. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. 138 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **A viticultura brasileira**. Bento Gonçalves, 2010. Disponível em <<http://www.ibravin.com.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em 25 nov. 2014.

JIANG, C.; SHI, J.; CHEN, X.; LIU, Y. Effect of sulfur dioxide and ethanol concentration on fungal profile and ochratoxin a production by *Aspergillus carbonarius* during wine making. **Food Control**, v. 47, p. 656-663, Aug. 2014.

JOHNSON, H. **Vintage**: The History of Wine. London: Mitchell-Beazley, 1989. 480 p.

MACHADO, R. M. D. **Determinação dos níveis de sulfito em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão**. 2007. 121 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265–275, 2006.

MINISTRY FOR PRIMARY INDUSTRIES. **Sulphites and Labelling of Imported Wine**: imported foods monitoring programme. Wellington, 2012. 13 p.

MONTRAVETA, J. P. Método rápido de análisis de anhídrido sulfuroso. **Materiales de Construcción**, v. 24, n. 155, p. 91-103, Jul. 1974.

MUSAGALA, P.; SSEKAALO, H.; MBABAZI, J.; NTALE, M. A spectrophotometric method for quantification of sulphite ions in environmental samples. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 5, n. 4, p. 66–72, Apr. 2013.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN. **State of the vitiviculture world market**. Paris, 2014. Disponível em: <file:///C:/Users/Karen/Downloads/EN_Press_release_OIV_10_11_14.pdf>. Acesso 8 dez. 2014.

OHLWEILER, O.A. **Química Inorgânica**. São Paulo: Edgar Blücher, 1971. 428 p.

PACHECO, J. G.; VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Gas-diffusion microextraction. **Journal of separation science**, v. 33, n. 20, p. 3207–3212, 2010.

PASSARETTI FILHO, J.; NUNES, L. A. O.; CARDOSO, A. A. Construção e avaliação de um sensor fluorimétrico para a determinação de ozônio em ar. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 35, 2012, Águas de Lindóia.

PASSARETTI FILHO, J.; Cardoso, A. A. Desenvolvimento de método analítico para a determinação de NO₂ atmosférico utilizando processamento de imagens digitais. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE QUÍMICA ANALÍTICA, 5, 2012, Montevideo.

POMARICI, E. **Il mercato mondiale del vino: tendenze, scenario competitivo e dualismo tra vecchio e nuovo mondo**. 2005. 20 f. Dipartimento di Economia e Politiche Agrarie - Centro per la formazione in economia dello sviluppo rurale Centro per la Fomazione in Economia e Política dello Sviluppo Rurale, Università degli Studi di Napoli Federico II, 2005.

POPOLIM, W. D. **Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares**. 2009. 155 f. Tese (Doutorada em Nutrição Humana Aplicada) - FCF/FEA/FSP, Universidade de São Paulo, 2009.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006. v. 1.2 497 p.

SANTOS, P. J. F. C., **O dióxido de enxofre em enologia**. (Trabalho de síntese apresentado às provas de acesso à categoria de Assistente de Investigação) - Instituto Nacional de Investigação Agrária, Estação Vitinícola Nacional, Dois Portos, 1990.

SEGUNDO, M. A.; RANGEL, A. O. S. S. A gas diffusion sequential injection system for the determination of sulphur dioxide in wines. **Analytica Chemica Acta**, v. 427, n. 2, p. 279-286, Jan. 2001.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 848 p.

VACEK, T. P.; QIPSHIDZE, N.; TYAGI, S. C. Hydrogen sulfide and sodium nitroprusside compete to activate / deactivate MMPs in bone tissue homogenates. **Vascular Health and Risk Management**, v. 9, p. 117–123, Mar. 2013.

ANEXO

Método Ripper: o método Ripper é empregado pelas vinícolas brasileiras e também por outros países para realizar a quantificação de sulfito presente em vinhos por ser rápido e de fácil execução. Nesse trabalho, esse método foi realizado para comparação com os valores de concentração de sulfito encontrados pelas técnicas desenvolvidas. O procedimento para realização do método Ripper está descrito a seguir:

Materiais e métodos

1. Reagentes

Solução padronizada de tiosulfato: para preparar uma solução de tiosulfato com concentração de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ foram pesados 12,417 g de tiosulfato de sódio e avolumados em balão volumétrico de 1,00 L com água destilada. A solução foi transferida e armazenada em frasco âmbar.

Solução de iodeto de potássio: para preparar a solução de iodeto de potássio de concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, 4,154 g do sal foram dissolvidos e avolumados com água destilada em um balão volumétrico de 250,00 mL.

Solução de triiodeto de potássio: 0,06028 g de triiodeto de potássio foram dissolvidos e avolumados em balão volumétrico de 100,00 mL com água destilada.

Solução de carbonato de sódio: uma solução de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de carbonato de potássio foi preparada com 2,102 g de Na_2CO_3 em um balão de 250,00 mL de preenchido com água destilada.

Dicromato de potássio: 100,00 mL do padrão primário da titulação foram preparados com 0,2457 g do sal de dicromato de potássio e dissolvidos com água destilada.

2. Procedimento Experimental

Padronização de tiosulfato

Para a padronização do tiosulfato, 10,00 mL da solução de dicromato de potássio de título conhecido foram transferidos para um erlenmeyer, ao qual também foram adicionados 1,00 mL de ácido fosfórico, 10,00 mL da solução de iodeto de potássio de concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, 10,00 mL de solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de carbonato de sódio e 50,00 mL de água destilada. Após um tempo de cinco minutos iniciou-se a titulação com a solução de tiosulfato adicionada à bureta. Quando a solução adquiriu coloração levemente amarela a titulação foi interrompida e foram adicionadas 3 gotas de amido, tornando a solução azul escura. A titulação com tiosulfato foi retomada até que a solução adquirisse coloração esverdeada.

Titulação iodimétrica com as amostras de vinho

Para a análise com as amostras de vinho, foram adicionados ao erlenmeyer 10,00 mL da solução de triiodeto de potássio e 10,00 mL da solução de iodeto de potássio e deixou-se o recipiente reagindo no escuro por cerca de cinco minutos. Após esse tempo foram adicionado 2,00 mL de vinho, 0,50 mL de ácido fosfórico e 50,00 mL de água destilada. A solução foi titulada com a solução padronizada de tiosulfato de concentração $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ contida na bureta. Quando foi observada mudança na coloração escura da solução para tons esverdeados foi interrompida a titulação e adicionado amido, tornando a solução muito escura novamente. A titulação foi retomada até que a solução ficasse incolor. Foram realizadas três repetições para cada amostra e uma titulação foi feita com uma solução de branco, sem adição de vinho. A diferença entre o volume gasto na titulação com a solução de branco e com as soluções contendo vinho foi utilizado para calcular a concentração de sulfito presente na amostra.

Titulação iodimétrica com as amostras de cerveja

Para a análise com as amostras de cerveja, foram adicionados ao erlenmeyer 10,00 mL da solução de triiodeto de potássio e 10,00 mL da solução de iodeto de potássio e deixou-se reagir no escuro por cerca de cinco minutos. Após esse tempo

foram adicionados 5,00 mL de cerveja, 0,50 mL de ácido fosfórico e 50,00 mL de água destilada. A solução foi titulada com a solução padronizada de tiosulfato de concentração $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ contida na bureta. Quando foi observada mudança na coloração escura da solução para tons esverdeados foi interrompida a titulação e adicionado amido, tornando a solução muito escura novamente. A titulação foi retomada até que a solução ficasse incolor. Foram realizadas três repetições para cada amostra e uma titulação foi realizada para uma solução de branco, sem adição de vinho. A diferença entre o volume gasto na titulação com uma solução de branco e com as soluções contendo cerveja foi utilizado para calcular a concentração de sulfito presente na amostra.