

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS AUTOMÁTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE ETANOL, GLICEROL E ÁCIDO TARTÁRICO EM
VINHO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO**

ELIZABETH NUNES FERNANDES*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

* Bolsista CAPES

SÃO CARLOS – SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F363dp

Fernandes, Elizabeth Nunes.

Desenvolvimento de procedimentos automáticos para determinação de etanol, glicerol e ácido tartárico em vinho empregando multicomutação em fluxo / Elizabeth Nunes Fernandes. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

118 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Instrumentação. 2. Análise por injeção de fluxo. 3. Automação. 4. Vinho e vinificação. 5. Enzimas. 6. Quimiluminescência. I. Título.

CDD: 543.07 (20^a)

... fundamental é mesmo o amor. É impossível ser feliz sozinho...

Tom Jobim

Dedico este trabalho

*À minha querida e amada mãe, **Maria de Nazareth Nunes Fernandes** (in memorian). Mulher forte; exemplo de fé, luta, coragem e inefável empenho na educação dos seus filhos. Pelo amor incondicional que sempre dedicou aos seus filhos. MÃE no mais profundo significado da palavra. Exemplo eternamente presente em minha vida.*

*Ao meu amado pai, **Longuinho Leite Fernandes** (in memorian). Homem sábio e de visão. Pelos preceitos de vida que nos deixou e pela sua indubitável diligência na educação dos seus filhos.*

*Ao meu querido e amado filho, **Pedro**, presente de Deus em um momento tão difícil. Tu és o encanto de minha vida.*

*Ao meu amado **Aziz**, companheiro e amigo de todas as horas. Pelo amor, carinho, paciência, estímulo, compreensão. Por todo seu sacrifício para compartilhar de minhas conquistas e, principalmente, por nosso filho Pedro.*

*Aos meus queridos irmãos, **Ridvan, Selda, Margareth, Salvador, Rinaldo, Auricéa, Déa, Luciara, Rosicléa**. Pela amizade, carinho, estímulo, disponibilidade. Por tudo que passamos, por nossa união, e, sobretudo, pelo apoio inestimável nos bons e maus momentos. O grande legado de nossa mãe.*

Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço a Deus por cada dia, por cada momento, pelas oportunidades que a vida me reservou, pela minha família e pelos amigos que conquistei ao longo desta vida;

À minha família, sem ela, eu nada seria;

Ao Prof. Boaventura, pela amizade, incentivo, compreensão, confiança em meu trabalho. Pelo apoio irrestrito, e, especialmente, pelos ensinamentos e exemplo de vida transmitido nestes anos;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química Analítica da UFSCar;

Aos Professores Eduardo Neves, Eloísa Kronka, Jarbas Rohwedder e Orlando Fatibello, pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para redação final deste trabalho;

Às secretárias da Pós-Graduação, Cristina, Ariane e Luciani, pela atenção e presteza no atendimento aos alunos;

À CAPES, pela bolsa concedida;

À UFMA e UEMA pela liberação para realização deste trabalho;

Ao CENA, pela infra-estrutura, apoio técnico e pelo agradável ambiente de trabalho;

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamin Filho”, Professores Maria Fernanda Giné, Francisco Krug, Elias Zagatto, pelo convívio ao longo destes anos;

Às “irmãs-siamesas”, Sheila e Fátima, pelo carinho e apoio em quaisquer circunstâncias;

À Ana Lúcia, Cristiane Tumang, Eduardo, Gisele, Mariele, Marisa, Mário, Paula Paim, Socorro, pela amizade, companheirismo, colaboração e pelos momentos agradáveis e descontraídos que passamos juntos;

A todos os companheiros do café, pelos bate-papos alegres e generalizados; pelos momentos agradáveis, nos quais aprendi muito da vida e da ciência;

À Déa e Vinícius, pelo convívio, apoio e compreensão na difícil fase de adaptação;

Ao Rinaldo e Sandra, pelos momentos agradáveis, pelas visitas mútuas, sempre recheadas de muita alegria;

À Margareth, Ademar, Patrícia, Vanessa e Rodrigo, pela hospitalidade e disponibilidade com que sempre nos acolheram em nossas tumultuadas idas ao Maranhão;

À Vera Lúcia e Joaquim Júnior pelo apoio incondicional junto ao Departamento de Química e Biologia – CESI/UEMA para viabilizar a conclusão deste trabalho;

Aos amigos Aldaléa e Edmar pelo sincero apoio e amizade;

Aos amigos maranhenses, por nossos encontros alegres e descontraídos;

À amiga Luciane, pelo alegre convívio e ajuda nestes últimos meses;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram na elaboração deste trabalho.

Apresentação

Neste trabalho são propostos procedimentos analíticos empregando multicomutação em fluxo para a determinação de etanol, glicerol e ácido tartárico em amostras de vinho.

A tese é apresentada em capítulos, ordenados por assuntos e divididos em seções e sub-seções. No capítulo I, é feita uma introdução geral sobre vinho, enzimas e multicomutação.

Em seguida, no capítulo II, é proposto um sistema de análise em fluxo para determinação de etanol em vinhos empregando reação enzimática e detecção por quimiluminescência.

No capítulo III, é proposto o sistema para determinação de glicerol empregando reação enzimática e detecção por espectrofotometria.

Posteriormente, no capítulo IV, é proposto o sistema para determinação de ácido tartárico empregando reação com vanadato e detecção por espectrofotometria.

Por fim, no capítulo V, são apresentadas as conclusões gerais e as bibliografias utilizadas na elaboração e redação final deste trabalho, que se encontram citadas no decorrer da composição do trabalho estão apresentadas no capítulo VI.

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – Interferência apresentada pelo metanol, propanol-1, sulfito e ácido ascórbico -----	32
TABELA 2.2 – Seqüência das etapas para determinação de etanol em vinhos --	41
TABELA 2.3 – Comparação dos resultados do teor de etanol em amostras de vinhos -----	42
TABELA 3.1 – Seqüência das etapas para determinação de glicerol em vinhos -	69
TABELA 3.2 – Comparação dos resultados do teor de glicerol em amostras de vinhos -----	72
TABELA 4.1 – Seqüência das etapas para determinação de ácido tartárico em vinhos -----	96
TABELA 4.2 – Comparação dos resultados do teor de ácido tartárico em amostras de vinho -----	97

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 – Produção mundial de vinho, média 2000/2002..----- 4
- FIGURA 1.2 – Efeito da concentração do substrato (S) na velocidade (V) da reação. A – reação química; B – reação catalisada por uma enzima. ----- 7
- FIGURA 1.3 – Representação esquemática do efeito da concentração do substrato na atividade da enzima. I, II, III, IV, concentrações do substrato, baixa, $\frac{3}{4}$ saturante, saturante e em grande excesso, respectivamente. ----- 8
- FIGURA 1.4 - Diagrama de blocos de um sistema de análises em fluxo controlado por um microcomputador. ----- 11
- FIGURA 2.1 – Esquema simplificado das reações que ocorrem nos processos de fotossíntese (Equação 1) e fermentação (Equação 2).----- 13
- FIGURA 2.2 – Diagrama de fluxos do módulo de análise empregado para avaliação do desempenho do detector. **Ca** – solução transportadora (H_2O), 2 ml min^{-1} ; **A** – amostra, 2 ml min^{-1} **R₁** – solução $4,5\text{ mmol l}^{-1}$ de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** e **B₂** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **V₁**, **V₂**, **V₃** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂** e **T₃** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂** e **V₃**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente. ----- 18
- FIGURA 2.3 – Esquema simplificado das reações envolvidas no procedimento proposto. Equação 1: conversão enzimática do etanol, Equação 2: reação quimiluminescente com o luminol. cat – hexacianoferrato(III) de potássio. ----- 19
- FIGURA 2.4 – Diagrama de fluxos do módulo de análise usado na otimização da reação enzimática. **V₁**, **V₂** e **V₃** – válvulas solenóides; **AOD** – coluna enzimática; **Ca** – solução transportadora (solução $0,1\text{ mol l}^{-1}$ de tampão fosfato, pH 7,5), $2,0\text{ ml min}^{-1}$; **A** – amostra, $2,0\text{ ml min}^{-1}$ **R₁** – solução $4,5\text{ mmol l}^{-1}$ de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** e **B₂** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **V₁**, **V₂**, **V₃** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂** e **T₃** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂** e **V₃**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente. --- 21
- FIGURA 2.5 – Dispositivo empregado para medidas por quimiluminescência. **A** e **B** – fotodiodos OSD50-E; **C** – cela de vidro com superfície plana de 78 mm^2 e caminho óptico de $1,0\text{ mm}$. ----- 24

FIGURA 2.6 – Influência da vazão no desenvolvimento da reação. Sinais obtidos usando solução de referência de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ com medidas realizadas em triplicatas, empregando sistema de análise em fluxo descrito na Figura 2.4. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,0; volumes de amostra, luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 330, 323 e 425 μl , respectivamente.----- 25

FIGURA 2.7 – Influência da variação da concentração hidrogeniônica da solução transportadora na reação enzimática. Valores de pH e suas respectivas equações: ■pH 6,0: $y = 75,59 + 0,80x$ ($r=0,9542$); ●pH 6,5: $y = 86,36 + 0,91x$ ($r=0,9514$); ▲pH 7,0: $y = 94,31 + 1,15x$ ($r=0,9612$); ▼pH 7,5: $y = 32,73 + 1,67x$ ($r=0,9744$); ◆pH 8,0: $y = 29,02 + 1,68x$ ($r=0,9744$); ◆pH 8,5: $y = 25,46 + 1,68x$ ($r=0,9727$); ►pH 9,0: $y = 32,24 + 1,66x$ ($r=0,9696$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato; volumes de amostra, luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 330, 323 e 425 ml, respectivamente.----- 26

FIGURA 2.8 – Influência da variação da concentração da solução do tampão fosfato pH 7,5 na resposta do sistema proposto. Valores das concentrações e suas respectivas equações: ■5 mmol l^{-1} : $y = 24,01 + 0,36x$ ($r=0,998$); ●10 mmol l^{-1} : $y = 41,49 + 0,39x$ ($r=0,997$); ▲50 mmol l^{-1} : $y = 37,92 + 0,54x$ ($r=0,998$); ▼100 mmol l^{-1} : $y = 46,77 + 0,75x$ ($r=0,998$); ◆200 mmol l^{-1} : $y = 53,28 + 0,75x$ ($r=0,989$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato, pH 7,5; volumes de amostra, luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 330, 323 e 425 ml, respectivamente. ----- 27

FIGURA 2.9 – Influência da variação do volume de amostra. Volumes da amostra inseridos e suas respectivas equações: ■132 μl : $y = 22,65 + 0,30x$ ($r=0,994$); ●198 μl : $y = 19,61 + 0,36x$ ($r=0,996$); ▲264 μl : $y = 15,14 + 0,49x$ ($r=0,998$); ▼330 μl : $y = 19,64 + 0,46x$ ($r=0,998$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,5.; volumes de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 323 e 425 μl , respectivamente. ----- 28

FIGURA 2.10 – Influência da variação do volume de luminol. Volumes de luminol inseridos e suas respectivas equações:■220 μl : $y = 23,01 + 0,36x$ ($r=0,999$); ●255 μl : $y = 22,74 + 0,45x$ ($r=0,995$); ▲290 μl : $y = 17,50 + 0,52x$ ($r=0,998$); ▼325 μl : $y = 21,66 + 0,50x$ ($r=0,999$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,5.; volumes de amostra e hexacianoferrato (III) de potássio: 264 e 425 μl , respectivamente. ----- 29

FIGURA 2.11 – Influência da variação do volume de hexacianoferrato(III) de potássio. Volumes de hexacianoferrato(III) inseridos e suas respectivas equações:■289 μl : $y = 20,60 + 0,18x$ ($r=0,989$); ●325 μl : $y = 21,99 + 0,23x$

($r=0,993$); \blacktriangle 360 μl : $y = 20,96 + 0,43x$ ($r=0,996$); \blacktriangledown 390 μl : $y = 16,54 + 0,49x$ ($r=0,999$); \blacklozenge 425 μl : $y = 23,77 + 0,46x$ ($r=0,999$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,5.; volumes de amostra e luminol: 264 e 290 μl , respectivamente. ----- 31

FIGURA 2.12 – Diagrama de fluxos do módulo de análise para diluição em linha. **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l^{-1} de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min^{-1} ; **A** – amostra, 0,320 ml min^{-1} ; **R₁** – solução 4,5 mmol l^{-1} de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** – bobina de reação de 50 cm de Tubo de Teflon[®] (1,6 mm d.i.) **B₂** e **B₃** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃** e **T₄** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente. ----- 34

FIGURA 2.13 – Diagrama de fluxos do módulo de análise para diluição em linha baseado no conceito de reamostragem. **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l^{-1} de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min^{-1} ; **A** – amostra, 0,320 ml min^{-1} ; **R₁** – solução 4,5 mmol l^{-1} de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** – bobina de reação de 50 cm de Tubo de Teflon[®] (1,6 mm d.i.) **B₂** e **B₃** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄**, **V₅** e **V₆** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃**, **T₄**, **T₅** e **T₆** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄**, **V₅** e **V₆**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.--- 35

FIGURA 2.14 – Diagrama de fluxos do módulo de análise usando sistema híbrido para determinação de etanol. **I** - injetor comutador; **L** – alça de amostragem.; **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l^{-1} de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min^{-1} ; **A** – amostra, 0,320 ml min^{-1} ; **R₁** – solução 4,5 mmol l^{-1} de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** – bobina de reação de 50 cm de Tubo de Teflon[®] (1,6 mm d.i.) **B₂** e **B₃** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄**, – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃** e **T₄** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente. ----- 37

FIGURA 2.15 – Diagrama de fluxos do módulo de análise usando sistema híbrido para determinação de etanol. **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l^{-1} de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min^{-1} ; **A** – amostra, 0,320 ml min^{-1} ; **R₁** – solução 4,5 mmol l^{-1} de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** e **B₂** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄** e **V₅** – válvulas

solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃**, **T₄** e **T₅** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄** e **V₅**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.----- 39

FIGURA 2.16 – Sinais transientes obtidos com o sistema da FIGURA 2.15 empregando uma solução de referência 10% (v/v) etanol. Incremento do tempo de deslocamento: 3s. ----- 40

FIGURA 2.17 – Registro dos sinais transientes obtidos com o sistema da FIGURA 2.15. Da esquerda para a direita: sinais correspondem ao branco, soluções de referência de etanol a 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 % (v/v), seguidos de quatro amostras de vinho e de soluções de referência de etanol a 5,0; 10 e 15 % (v/v). Curva analítica apresentando seguinte equação: $y = 19,76 + 7,89x$, onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em % (v/v). 42

FIGURA 3.1 - Vista do artefato empregado para diluição da amostra. **C₁** and **C₂** = blocos de acrílico, dimensões 40 x 30 x 20 mm, **Lh** = furos de passagem dos parafusos, **I_s** and **O_s** = entrada e saída das soluções, respectivamente; **Sh** = folha de poliéster, dimensões 40 x 30 mm e 0.2 mm de espessura, **ch** = canal de amostragem, dimensão 10,0 mm de comprimento x 1,0 mm de largura.----- 49

FIGURA 3.2 – Esquema simplificado da reação de oxidação do glicerol na presença da enzima GDH e do cofator NAD⁺. Fórmula estrutural do NAD⁺.--- 50

FIGURA 3.3 – Diagrama de fluxos do sistema para determinação de glicerol. **Bp** - bomba peristáltica; **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄** - válvulas solenóides; **Sd** - diluidor da amostra; **x** -confluência; **B** – bobina de reação (50 cm); **GDH** - coluna enzimática; **Det** - espectrofotômetro a 340 nm; **Ca** -solução transportadora, 100 mmol l⁻¹ tampão carbonato (pH 9.5), 2.0 ml min⁻¹; **S** - amostra, 0,32 ml min⁻¹; **R** - solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺, 1.0 ml min⁻¹; **Sv₁**, **Sv₂**, **Sv₃** - recuperação das soluções da amostra e do NAD⁺, respectivamente; **D** - descarte; **ch** - canal de amostragem. **T₁**, **T₂**, **T₃** e **T₄** - diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóide **V₁**, **V₂**, **V₂**, **V₄**; **St**, - inserção da amostra, **dt** - tempo de diluição, **Rit** = inserção do reagente, **Rt** = leitura do sinal. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente. --- 52

FIGURA 3.4 – Esquema simplificado das reações enzimáticas envolvidas na determinação de glicerol usando kit comercial. ----- 54

FIGURA 3.5 – Influência das diferentes formas de inserção amostra/reagente. **A** – amostra; **R** – reagente. Modos de inserção e suas respectivas equações: ■ 1 ciclo: $y = 0,077 + 2,88 \times 10^{-4}x$ ($r=0,993$); ● 6 ciclos: $y = 0,0975 + 3,55 \times 10^{-4}x$ ($r=0,998$); ▲ Sanduíche R/A/R: $y = 0,0784 + 3,39 \times 10^{-4}x$ ($r=0,994$); ▼ Sanduíche A/R/A: $y = 0,105 + 2,48 \times 10^{-4}x$ ($r=0,984$) onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 50 mmol l⁻¹ de solução tampão carbonato, pH 9,0.; volumes da amostra e da solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺: 48 e 204 μl ,

respectivamente. ----- 57

FIGURA 3.6 – Influência da variação da vazão do sistema no desenvolvimento da reação. Valores das vazões e suas respectivas equações: ■ 1,0 ml min⁻¹: $y = 0,053 + 3,55 \times 10^{-4}x$ (r=0,996); ■ 1,5 ml min⁻¹: $y = 0,112 + 3,59 \times 10^{-4}x$ (r=0,988); ■ 2,0 ml min⁻¹: $y = 0,100 + 3,95 \times 10^{-4}x$ (r=0,996); ■ 2,5 ml min⁻¹: $y = 0,118 + 3,10 \times 10^{-4}x$ (r=0,989), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em µg ml⁻¹. Solução transportadora: 50 mmol l⁻¹ de solução tampão carbonato, pH 9,0.; volumes da amostra e da solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺: 48 e 204 µl, respectivamente, fracionados em 6 ciclos de amostragem. ----- 58

FIGURA 3.7 – Influência da variação da concentração hidrogeniônica da solução transportadora tampão carbonato 50 mmol l⁻¹, no desenvolvimento da reação enzimática. Valores de pH e suas respectivas equações: ■ pH 8,0: $y = 0,115 + 1,62 \times 10^{-4}x$ (r=0,995); ■ pH 8,5: $y = 0,139 + 2,17 \times 10^{-4}x$ (r=0,976); ■ pH 9,0: $y = 0,129 + 3,21 \times 10^{-4}x$ (r=0,985); ■ pH 9,5: $y = 0,136 + 5,74 \times 10^{-4}x$ (r=0,989); ■ pH 10,0: $y = 0,170 + 9,19 \times 10^{-4}x$ (r=0,992) onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em µg ml⁻¹. Volumes da amostra e da solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺: 48 e 204 µl, respectivamente, fracionados em 6 ciclos de amostragem. ----- 59

FIGURA 3.8 – Influência da concentração da solução tampão carbonato, pH 9,5 no desenvolvimento da reação. Valores das concentrações e suas respectivas equações: ■ 10 mmol l⁻¹: $y = 0,170 + 2,48 \times 10^{-5}x$ (r=0,997); ● 50 mmol l⁻¹: $y = 0,221 + 5,48 \times 10^{-4}x$ (r=0,983); ▲ 100 mmol l⁻¹: $y = 0,349 + 8,15 \times 10^{-4}x$ (r=0,983); ▼ 150 mmol l⁻¹: $y = 0,426 + 7,61 \times 10^{-4}x$ (r=0,967); ◆ 200 mmol l⁻¹: $y = 0,425 + 7,78 \times 10^{-4}x$ (r=0,974) onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em µg ml⁻¹. Volumes da amostra e da solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺: 48 e 204 µl, respectivamente, fracionados em 6 ciclos de amostragem. ----- 60

FIGURA 3.9 – Influência da variação do volume de amostra. Valores dos volumes e suas respectivas equações: ■ 18 µl: $y = 0,114 + 4,63 \times 10^{-4}x$ (r=0,983); ● 33 µl: $y = 0,227 + 4,19 \times 10^{-4}x$ (r=0,960); ▲ 48 µl: $y = 0,178 + 6,40 \times 10^{-4}x$ (r=0,973); ▼ 66 µl: $y = 0,181 + 6,54 \times 10^{-4}x$ (r=0,973), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em µg ml⁻¹. Solução transportadora: 100 mmol l⁻¹ de solução tampão carbonato, pH 9,5; volume da solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺: 204 µl. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem. ----- 62

FIGURA 3.10 – Influência da variação do volume da solução de NAD⁺ 6,0 mmol l⁻¹ inserido. Valores dos volumes e suas respectivas equações: ■ 51 µl: $y = 0,057 + 2,58 \times 10^{-4}x$ (r=0,981); ● 102 µl: $y = 0,108 + 3,18 \times 10^{-4}x$ (r=0,981); ▲ 150 µl: $y = 0,123 + 3,29 \times 10^{-4}x$ (r=0,991); ▼ 204 µl: $y = 0,153 + 3,11 \times 10^{-4}x$ (r=0,972), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em µg ml⁻¹. Solução transportadora: 100 mmol l⁻¹ de solução tampão carbonato, pH 9,5; volume da amostra 33 µl. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem. ----- 63

FIGURA 3.11– Influência da variação da concentração do NAD^+ no desenvolvimento da reação enzimática. Valores das concentrações e suas respectivas equações: ■ 4 mmol l^{-1} : $y = 0,146 + 4,70 \times 10^{-4}x$ ($r=0,973$); ● $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$: $y = 0,201 + 5,58 \times 10^{-4}x$ ($r=0,972$); ▲ $8,0 \text{ mmol l}^{-1}$: $y = 0,225 + 5,64 \times 10^{-4}x$ ($r=0,980$); ▼ $10,0 \text{ mmol l}^{-1}$: $y = 0,285 + 6,36 \times 10^{-4}x$ ($r=0,977$), onde $y = \text{Absorbância}$; $x = \text{concentração de glicerol em } \mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mmol l^{-1} de solução tampão carbonato, pH 9,5; volumes da amostra e da solução $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ : 33 e $150 \mu\text{l}$, respectivamente. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem. ----- 64

FIGURA 3.12 – Efeito da força iônica na reação enzimática. Curvas analíticas obtidas com uso da solução tampão carbonato 100 mmol l^{-1} , pH 9,5, sem e com adição de concentrações crescentes de sulfato de amônio. Solução transportadora com diferentes forças iônicas e suas respectivas equações: ● sem NH_4^+ : $y = 0,161 + 9,19 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$); ▲ NH_4^+ 1 mmol l^{-1} : $y = 0,170 + 9,19 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$); ▼ NH_4^+ 10 mmol l^{-1} : $y = 0,232 + 7,20 \times 10^{-4}x$ ($r=0,968$); ◆ NH_4^+ 100 mmol l^{-1} : $y = 0,256 + 7,69 \times 10^{-4}x$ ($r=0,980$), onde $y = \text{Absorbância}$; $x = \text{concentração de glicerol em } \mu\text{g ml}^{-1}$. Volumes da amostra e da solução $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ : 33 e $150 \mu\text{l}$, respectivamente. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem. ----- 66

FIGURA 3.13 – Influência da variação do número de ciclo de amostragem. Número de ciclos e suas respectivas equações: ■ 2 ciclos: $y = 0,045 + 2,35 \times 10^{-4}x$ ($r=0,936$); ● 4 ciclos: $y = 0,104 + 3,99 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$); ▲ 6 ciclos: $y = 0,162 + 5,32 \times 10^{-4}x$ ($r=0,986$); ▼ 8 ciclos: $y = 0,161 + 6,8 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$), ★ 10 ciclos: $y = 0,175 + 6,37 \times 10^{-4}x$ ($r=0,994$), onde $y = \text{Absorbância}$; $x = \text{concentração de glicerol em } \mu\text{g ml}^{-1}$. ----- 67

FIGURA 3.14 – Influência da variação do tempo de descarte (dt) da amostra na reação enzimática. Valores dos tempos e suas respectivas equações: ■ 1,0 s: $y = 0,130 + 0,034x$ ($r=0,960$); ● 2,0 s: $y = 0,120 + 0,026x$ ($r=0,996$); ▲ 3,0 s $y = 0,128 + 0,013x$ ($r=0,993$); onde $y = \text{Absorbância}$; $x = \text{concentração de glicerol em } \text{g l}^{-1}$. ----- 69

FIGURA 3.15 – Registro de 15 replicatas dos sinais transientes gerados pelo sistema proposto aplicado em uma amostra de vinho com $5,3 \text{ g l}^{-1}$ de glicerol. ----- 70

FIGURA 3.16 – Registro dos sinais. Da esquerda para a direita sinais transientes relativos ao branco e soluções de referência com 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e $10,0 \text{ g l}^{-1}$ de glicerol, seguido de três amostras de vinho, em triplicata. -- 71

FIGURA 4.1 – **a)** Diagrama de fluxos do sistema para determinação de ácido tartárico em vinhos; **b)** diagrama de tempo da etapa de amostragem; **c)** diagrama de tempo da etapa da troca da amostra. **Bp** - bomba peristáltica; **V₁, V₂, V₃** - válvulas solenóides; **B₁ e B₂** - bobinas de reação de 25 e 50 cm, respectivamente; **Det** - espectrofotômetro a 490 nm; **Ca** - solução transportadora, $0,7 \text{ mol l}^{-1}$ ácido acético, $1,0 \text{ ml min}^{-1}$; **A** - amostra, **R** - solução de reagente: $\text{NaVO}_3 - 8,2 \text{ mmol l}^{-1}$ + de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 - 0,54 \text{ mmol l}^{-1}$ + $\text{NaOH} - 0,4 \text{ mol l}^{-1}$; **D** - descarte; **T₁, T₂, T₃** - diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóide $\text{V}_1, \text{V}_2, \text{V}_3$. As linhas cheias e tracejadas

nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente. ----- 82

FIGURA 4.2 – Espectros de absorção de amostras de vinhos brancos e tintos. ----- 86

FIGURA 4.3 – Efeito da adição do analito na solução do reagente. **a** – curva analítica com solução do reagente contendo $\text{NaVO}_3 - 8,2 \text{ mmol l}^{-1} + \text{NaOH} - 0,4 \text{ mol l}^{-1}$; $y=0,094 + 0,019x$ ($r = 0,810$); **b** – curva analítica com solução do reagente contendo $\text{NaVO}_3 - 8,2 \text{ mmol l}^{-1} + \text{NaOH} - 0,4 \text{ mol l}^{-1}$ $y=0,164 + 0,055x$ ($r = 0,997$), onde y é absorvância e x é concentração de ácido tartárico em g l^{-1} . Volumes das soluções da amostra e do reagente inseridos: 17 e 544 μl . ----- 87

FIGURA 4.4 – Influência da variação do volume da solução do reagente. Volumes estudados e suas respectivas equações: \blacksquare 34 μl : $y = 0,157 + 0,067x$ ($r=0,995$); \bullet 51 μl : $y = 0,181 + 0,082x$ ($r=0,999$); \blacktriangle 68 μl : $y = 0,139 + 0,065x$ ($r=0,999$); onde $y = \text{Absorvância}$; $x = \text{concentração de ácido tartárico em g l}^{-1}$. Volume da amostra: 17 μl . Valores referentes a um ciclo de amostragem; número total de ciclos: 8 ciclos de amostragem. ----- 89

FIGURA 4.5 – Influência da variação do volume da solução da amostra. Volumes estudados e suas respectivas equações: \blacksquare 10 μl : $y = 0,183 + 0,039x$ ($r=0,997$); \blacksquare 14 μl : $y = 0,212 + 0,067x$ ($r=0,990$); \blacksquare 17 μl : $y = 0,181 + 0,081x$ ($r=0,999$); \blacksquare 20 μl : $y = 0,178 + 0,092x$ ($r=0,997$); onde $y = \text{Absorvância}$; $x = \text{concentração de ácido tartárico em g l}^{-1}$. Volume da solução do reagente: 408 μl , fracionados em 8 ciclos de amostragem. ----- 90

FIGURA 4.6 – Registro dos sinais transientes obtidos com amostra de vinho tinto. **A** - vinho tinto sem adição de reagente; **B** - vinho tinto com adição de reagente. ----- 91

FIGURA 4.7 – Comportamento cinético da reação empregando parada de fluxo. Solução de referência de ácido tartárico contendo 8,0 g l^{-1} de ácido tartárico. ----- 92

FIGURA 4.8 – Influência da variação do comprimento do percurso analítico. Comprimentos estudados e suas respectivas equações: \blacksquare 50 cm: $y = 0,179 + 0,065x$ ($r=0,998$); \blacksquare 100 cm: $y = 0,206 + 0,060x$ ($r=0,994$); \blacksquare 200 cm: $y = 0,193 + 0,056x$ ($r=0,995$); onde $y = \text{Absorvância}$; $x = \text{concentração de ácido tartárico em g l}^{-1}$. Volumes das soluções da amostra e do reagente: 10 e 408 μl , respectivamente. ----- 93

FIGURA 4.9 – Influência da variação do número de ciclos de amostragem. Número de ciclos estudados e suas respectivas equações: \blacksquare 2 ciclos: $y = 0,131 + 0,019x$ ($r=0,997$); \bullet 3 ciclos: $y = 0,147 + 0,020x$ ($r=0,997$); \blacktriangle 4 ciclos: $y = 0,169 + 0,020x$ ($r=0,994$); onde $y = \text{Absorvância}$; $x = \text{concentração de ácido tartárico em g l}^{-1}$. Volume da solução da amostra: 10 μl . ----- 94

FIGURA 4.10 – Influência da variação da concentração da solução de vanadato. Concentrações estudadas e suas respectivas equações: \blacksquare 6,6

mmol l^{-1} : $y = 0,127 + 0,032x$ ($r=0,989$); ● $7,4 \text{ mmol l}^{-1}$: $y = 0,172 + 0,035x$ ($r=0,995$); ▲ $8,2 \text{ mmol l}^{-1}$: $y = 0,171 + 0,044x$ ($r=0,998$); ▼ $11,0 \text{ mmol l}^{-1}$: $y = 0,241 + 0,038x$ ($r=0,999$); ◆ $16,0 \text{ mmol l}^{-1}$: $y = 0,357 + 0,041x$ ($r=0,985$); onde $y = \text{Absorbância}$; $x = \text{concentração de ácido tartárico em g l}^{-1}$. Volumes das soluções da amostra e do reagente: 10 e 153 μl , respectivamente. ----- 96

FIGURA 4.11 – Registro dos sinais. Da esquerda para a direita sinais transientes relativos ao branco e soluções de referência contendo 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10,0 g l^{-1} de ácido tartárico, seguidos de quatro amostras de vinho e soluções de referência contendo 0,50; 1,0; 2,0; 4,0 g l^{-1} de ácido tartárico. ----- 97

FIGURA 4.12 – Gráfico de correlação do método empregando multicomutação para determinação de ácido tartárico em função do método de referência ----- 98

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS AUTOMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ETANOL, GLICEROL E ÁCIDO TARTÁRICO EM VINHO EMPREGANDO MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO.

No presente trabalho são apresentados sistemas de análises em fluxo para a determinação de etanol, glicerol e ácido tartárico em vinho sem tratamento prévio da amostra. O sistema em fluxo foi baseado na multicomutação, controlados por um microcomputador, permitindo que todas as etapas do procedimento analítico fossem realizadas automaticamente sem a intervenção do operador. Para determinação de etanol o procedimento empregou detecção por quimiluminescência, usando um detector desenvolvido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura. O detector consistiu de uma cela de fluxo de vidro acoplada entre dois fotodiodos formando uma unidade compacta que foi acondicionada em uma caixa metálica. No procedimento para determinação de etanol foi baseado na reação enzimática usando *álcool oxidase*, produzindo acetaldeído e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com o luminol catalisado pelo hexacianoferrato(III) de potássio produzindo uma reação de quimiluminescente. O sistema permitiu análise de amostras de vinho sem tratamento prévio, apresentando resposta linear de 2,5 a 25% (v/v) de etanol caracterizada pela equação Sinal (mV) = $(20 \pm 1) + (7,8 \pm 0,3) \% \text{ de etanol}$ ($r = 0,997$), coeficiente de variação de 1,8% ($n = 10$), para uma amostra de vinho apresentando 11% (v/v) de etanol e frequência analítica de 25 determinações por hora. A determinação de glicerol foi baseada na reação com *glicerol desidrogenase* na presença do cofator NAD^+ , resultando na oxidação do NAD^+ para NADH , que foi monitorado a 340 nm. Após a otimização do sistema, obtiveram-se faixa de resposta linear de 2,0 a 10,0 g l^{-1} de glicerol caracterizada pela equação $\text{Abs} = (0,1320 \pm 0,003) + (149 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-4}) \text{ g l}^{-1} \text{ de glicerol}$ ($r = 0,998$), coeficiente de variação de 1,4% ($n = 15$) para uma amostra de vinho contendo 5,3 g l^{-1} de glicerol e frequência analítica de 33 determinações por hora. Para a determinação de ácido tartárico foi empregado um módulo de análise de linha única, baseado na reação com o vanadato e a detecção por espectrofotometria a 490 nm. O sistema proporcionou faixa de resposta linear de 0,50 a 10,0 g l^{-1} de ácido tartárico, apresentando uma equação $\text{Abs} = (0,206 \pm 0,001) + 0,0404 \pm 2,76 \times 10^{-4} \text{ g l}^{-1} \text{ de ácido tartárico}$ ($r = 0,999$), coeficiente de variação de 2,1% ($n = 18$) para uma amostra de vinho apresentando 1,84 g l^{-1} e uma frequência analítica de 28 determinações por hora. Comparando o consumo de reagente apresentado neste último sistema com os trabalhos anteriores observou-se uma redução em torno de 65%. Os três sistemas que compreendem este trabalho foram aplicados em análise de amostras de vinhos e os resultados apresentados obtidos foram comparados com os métodos oficiais e não apresentaram diferença significativa em nível de 90% de confiança.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AUTOMATIC PROCEDURES FOR THE DETERMINATION OF ETHANOL, GLYCEROL AND TARTARIC ACID IN WINE USING MULTICOMMUTATION IN FLOW.

In the present work, flow systems for the determination of ethanol, glycerol and tartaric acid in wine without previous sample treatment are described. The flow system were based on multicommutation and controlled by microcomputer allowing that the analytic procedures were accomplished automatically without the intervention of the operator. For ethanol determination the proposed procedure employed detection by chemiluminescence using equipment developed in the Centro de Energia Nuclear na Agricultura. The detection device comprised a glass flow cell that was installed between two photodiodes forming a compact unit that was packed into a metallic box. The procedure for ethanol determination was based on the enzymatic reaction using *alcohol oxidase* producing acetaldehyde and hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide reacted with luminol catalyzed by potassium hexacianoferrate (III) producing chemiluminescence. The luminescence intensity presented a direct relationship with ethanol concentration. The system allowed wine sample analysis without any prior treatment, presenting linear response between 2.5 and 25% (v/v) of ethanol characterized by the equation $\text{Signal (mV)} = (20 \pm 1) + (7.8 \pm 0.3) \% \text{ of ethanol}$ ($r = 0.997$), a coefficient of variation of 1.8% for a typical wine sample presenting 11 % (v/v) of ethanol and a sampling frequency of 28 determinations for hour. For glycerol determination it was based on the reaction with *glycerol dehydrogenase* in presence the cofactor NAD^+ , resulting in oxidation of NAD^+ to NADH that was monitored at 340 nm. After system optimization, a linear response between 2.0 and 10.0 g l^{-1} of glycerol characterized by the equation $\text{Abs} = (0.1320 \pm 0.003) + (149 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-4}) \text{ g l}^{-1} \text{ of glycerol}$ ($r = 0.998$), a coefficient of variation of 1.6% for a typical wine sample presenting 5.3 g L^{-1} of glycerol and a sampling frequency of 33 determinations for hour were obtained. For tartaric acid determination a single line module of analysis was designed, based on the reaction with vanadate and detection was carried out by spectrophotometry at 490 nm after reaction with sodium vanadate. The procedure presented a linear relationship between 0.50 and 10.0 g l^{-1} of tartaric acid characterized by the equation $\text{Abs} = (0.206 \pm 0.001) + 0.0404 \pm 2.76 \times 10^{-4} \text{ g l}^{-1} \text{ of tartaric acid}$ ($r = 0.999$), a coefficient of variation of 2.1% for a typical wine sample presenting 1.84 g L^{-1} of tartaric acid and a sampling frequency of 28 determinations for hour. Comparing the reagent consumption with earlier works it was observed that reduction about 65% was obtained. The three systems that comprise this work when applied to analysis wine samples presented results, which compared with results obtained using official methods no significant difference at 90 % confidence level were observed.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - VINHOS – ASPECTOS GERAIS	2
1.2 – ENZIMAS	5
1.3 – MULTICOMUTAÇÃO	9

CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE ETANOL EM VINHOS POR QUIMILUMINESCÊNCIA

2.1 – INTRODUÇÃO	13
2.2 - PARTE EXPERIMENTAL	16
2.2.1 - Reagentes e Soluções	16
2.2.2 - Materiais	17
2.2.2.1 - Equipamentos e acessórios	17
2.2.3 – Metodologia	17
2.2.4 – Procedimentos	19
2.2.4.1 - Imobilização da enzima	19
2.2.4.2 - Sistema de análise em fluxo	20
2.2.4.2.1 - Otimização dos parâmetros experimentais	22
2.2.4.3 – Método comparativo	23
2.5 -RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
2.5.2 - Efeito da Vazão	24
2.5.2 - Efeito do pH e da Concentração do Tampão	25
2.5.3 - Estudo do Volume da Amostra	28
2.5.4. Estudo do Volume de Luminol	29
2.5.5. Estudo do Volume do Hexacianoferrato (III) de Potássio	30
2.5.6. Estudo dos interferentes	30
2.5.7. Diluição em linha	33
2.5.8. Determinação de etanol em amostras de vinho	41
2.6. CONCLUSÃO	43

CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICEROL EM VINHOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

3.1 – INTRODUÇÃO	45
3.2 – PARTE EXPERIMENTAL	47
3.2.1 - Reagentes e Soluções	47
3.2.2 - Materiais	48
3.2.2.1 - Equipamentos e Acessórios	48
3.2.3 – Metodologia	49
3.2.4 – Procedimentos	50
3.2.4.1 - Imobilização da Enzima	50
3.2.4.2 - Sistema de Análise em Fluxo	51
3.2.4.2.1 - Otimização dos Parâmetros Experimentais	53
3.2.4.3 – Método Comparativo	54
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.3.1 - Formas de Inserção	55
3.3.2 - Efeito da Vazão	56
3.3.3 - Efeito da Composição do Tampão	58
3.3.4 - Estudo do Volume da Amostra	61
3.3.5 - Estudo do Volume de NAD ⁺	61
3.3.6 - Estudo da Concentração do NAD ⁺	63
3.3.7 – Efeito da Força Iônica	64
3.3.8 – Estudo do Número de Ciclos	66
3.3.9 - Diluição em Linha	68
3.3.10 - Determinação de glicerol em amostras de vinho	70
3.4 – CONCLUSÃO	72

CAPÍTULO IV - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO TARTÁRICO EM VINHOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

4.1 – INTRODUÇÃO	74
4.1.1 – Sistema de análise em fluxo para determinação de ácido tartárico ---	75
4.2 - PARTE EXPERIMENTAL	79
4.2.1 - Reagentes e Soluções	79
4.2.2 – Materiais	80
4.2.2.1 - Equipamentos e Acessórios	80

4.2.3 – Metodologia	81
4.2.4 – Procedimentos	81
4.2.4.2 - Sistema de Análise em Fluxo	81
4.2.4.2.1 - Otimização dos Parâmetros Experimentais	82
4.2.4.3 – Método Comparativo	83
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.3.1 – Efeito da Adição do Analito na Solução do Reagente	86
4.3.2 - Estudo do Volume do Reagente	88
4.3.3 - Estudo do Volume da Amostra	88
4.3.4 – Estudo do Comportamento Cinético da Reação	92
4.3.5 - Estudo do Percurso Analítico	93
4.3.6 - Estudo do Número de Ciclos	94
4.3.7 - Estudo da Concentração de Vanadato	95
4.3.8 - Determinação de Ácido Tartárico em Amostras de Vinho	95
4.4 – CONCLUSÃO	98
 CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	
5.1 – CONCLUSÃO	101
 CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - VINHOS – ASPECTOS GERAIS

O vinho é uma bebida milenar cercada de fatos históricos ou lendários que tornam difícil datar cronologicamente sua origem. JOHNSON em seu livro “A História do Vinho” relata: *Não se pode apontar precisamente o local e a época em que o vinho foi feito pela primeira vez, do mesmo modo que não sabemos quem foi o inventor da roda. Uma pedra que rola é um tipo de roda; um cacho de uvas caído, potencialmente, torna-se, um tipo de vinho.*¹

Um grupo de cientistas da Universidade de Barcelona recentemente identificou restos de vinho tinto em um vaso de cerâmica que acompanhavam o Faraó Tutancâmon.² O vaso no qual foi achado o vinho está no Museu Egípcio do Cairo e contém uma inscrição referente ao faraó e está assinada pelo mestre vinhateiro Khaa. Tutancâmon foi o faraó da XVIII Dinastia (1336 - 1325 a.C.) e seu túmulo foi descoberto pelo egiptólogo britânico Howard Carter no Vale dos Reis, em Luxor, em 1922.

De fato, muitos são os fatos históricos e cientificamente comprovados, assim como não faltam lendas sobre o vinho que se poderia discernir. Mas de certo, é que o vinho não teve que esperar para ser inventado: ele estava lá, onde quer que uvas fossem colhidas e armazenadas em um recipiente que pudesse reter seu suco.¹

É imprescindível lembrar que as descobertas sobre os microorganismos e a fermentação, feitas por Louis Pasteur (1822-1895), constituem o marco fundamental para o desenvolvimento da enologia moderna.

Relatos históricos revelam que, através das expedições colonizadoras, as vinhas saíram da Europa e chegaram a outros continentes. Aclimataram-se e passaram a fornecer bons vinhos, especialmente nas Américas do Norte e do Sul e na África. As videiras foram trazidas da Ilha da Madeira ao Brasil em 1532 por Martim Afonso de Souza e plantadas por Brás Cubas, inicialmente no litoral paulista e depois, em 1551, na região de Tatuapé.³

No início do século XX, o Estado do Rio Grande do Sul, foi incentivado a cultivar castas viníferas através de estímulos governamentais. Nesse período a

atividade vitivinícola expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do país, sempre em zonas com período hibernar definido e com o predomínio de uvas espécies das variedades americanas e híbridas. Entretanto, na década de 70, com a chegada de algumas empresas multinacionais na região da Serra Gaúcha e da Fronteira Oeste (município de Sant'Ana do Livramento), verificou-se um incremento significativo da área de parreirais com cultivares *Vitis vinifera*.

A viticultura tropical brasileira foi efetivamente desenvolvida a partir da década de 1960, com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa na região do Vale do Rio São Francisco, no nordeste semi-árido brasileiro. Nos anos 70 surgiu o pólo vitícola do Norte do Estado do Paraná e na década de 1980 desenvolveram-se as regiões do Noroeste do Estado de São Paulo e de Pirapora no Norte de Minas Gerais, todas voltadas à produção de uvas finas para consumo *in natura*. Iniciativas mais recentes, como as verificadas nas regiões Centro-Oeste (Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) e Nordeste (Bahia e Ceará), permitem que se projete um aumento significativo na atividade vitivinícola nos próximos anos.⁴

Embora a produção de vinhos, suco de uva e derivados da uva e do vinho também ocorra em outras regiões, a maior concentração está no Rio Grande do Sul, onde são elaborados, em média anual, 330 milhões de litros de vinhos e mostos, representando 95% da produção nacional.

A partir de setembro de 1995 o Brasil passou a ser membro da OIV*, Organização Internacional do Vinho, organismo que regula as normas internacionais de produção do vinho, cujo cumprimento resulta, obrigatoriamente, em elevação do padrão dos vinhos. Conseqüentemente, uma das normas implantada foi à implementação das Denominações de Origem Controlada, como as existentes nos países europeus.

A vitivinicultura brasileira evoluiu de maneira extraordinária nas duas últimas décadas, e o Brasil produz hoje vinhos de boa qualidade. O atual panorama vinícola brasileiro é animador. No cenário mundial o Brasil encontra-se como o 16º produtor, como demonstra a Figura 1.1.⁵

* Do francês: Office International de la Vigne e du Vin

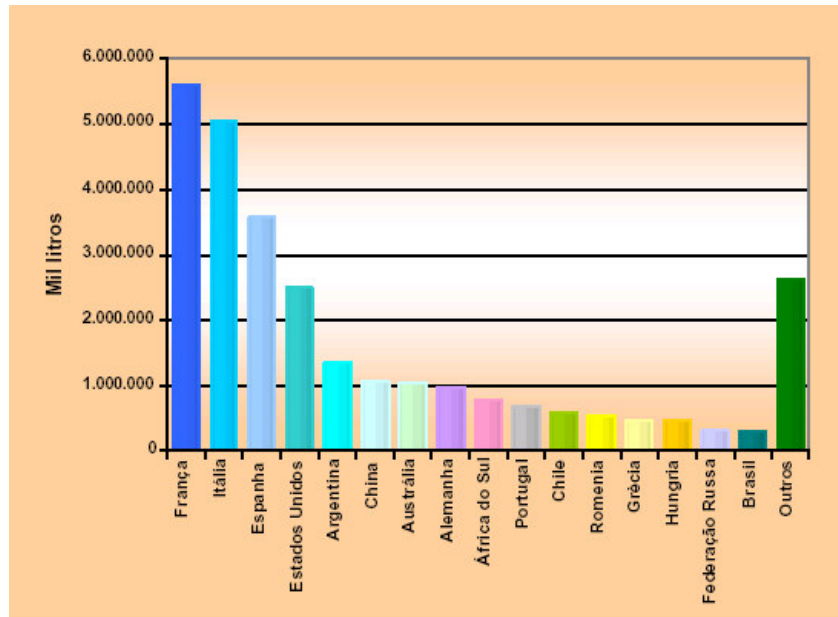


FIGURA 1.1 – Produção mundial de vinho, média 2000/2002. ⁵

Pesquisadores da EMBRAPA em um artigo técnico sobre a viticultura brasileira apontaram dois problemas cruciais que dificultam um maior desenvolvimento da vitivinicultura brasileira. O primeiro é sem dúvida o pequeno consumo, 2 litros per capita por ano, resultante da falta de tradição vinícola e do baixo poder aquisitivo do brasileiro. O segundo é o preço do vinho nacional, que é relativamente caro, em consequência da alta taxa de impostos e de encargos sociais, e não tem conseguido enfrentar os baixos preços de muitos importados. ⁴

No Brasil, os primeiros passos na pesquisa em viticultura foram dados com a criação do Laboratório Central de Enologia, em 1938. Após alguns anos, em 1985, esta iniciativa resultou na criação de uma unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, denominada Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho – CNPUV. Esse Centro, cuja sede está localizada em Bento Gonçalves-RS, é hoje o principal responsável por toda a pesquisa produzida nesta área no país.

A pouca tradição vinícola do Brasil reflete-se no interesse por pesquisas nesta área. Em pesquisa no *site* da *Webofscience*, verificou-se que o empenho dos pesquisadores brasileiros no desenvolvimento de metodologias aplicadas em amostras de vinhos é recente. ⁶ Até a data da referida pesquisa, 145 artigos científicos haviam sido publicados envolvendo pesquisadores brasileiros,

sendo que o primeiro trabalho foi em 1977. Na década de 1990 foi observado um aumento significativo do número de trabalhos em relação às duas décadas anteriores. Este panorama tende a se estabelecer como demonstra o número expressivo de trabalhos nos últimos quatro anos, correspondente a ca 66% do total.

De fato, o vinho é uma matriz bastante complexa, haja vista sua composição química. Existem virtualmente milhares de compostos químicos diferentes dentro de uma simples garrafa de vinho, pertencentes às mais distintas classes químicas, que potencialmente podem atuar como interferentes.

Os métodos analíticos manuais para análise de vinho são em sua grande maioria laboriosos e, geralmente, usam reagentes cancerígenos. Os métodos empregando análise em fluxo surgiram como uma alternativa na redução do uso de reagentes e ganho em produtividade analítica. Nesse contexto, observou-se, após extensa pesquisa bibliográfica, que há um significativo número de trabalhos empregando análise em fluxo com aplicação em amostras de vinho para quantificação de variados analitos.

Devido à composição química dos vinhos, a determinação de seus constituintes, maiores ou menores, requer tratamentos prévios da amostra, diluições, etc. Os primeiros trabalhos em fluxo aplicados em amostras de vinho usaram extensas diluições prévias. O emprego de câmara de diluição, diálise e pervaporação têm sido investigado e empregado com sucesso como forma de minimizar o efeito de interferência da matriz.

1.2 - ENZIMAS

O poder da célula de ativar os milhares de reações indispensáveis ao seu funcionamento reside na existência de catalisadores biológicos específicos para cada reação – as enzimas.⁷

A utilização de reações enzimáticas pelo homem se confunde com os primórdios da civilização. Inicialmente esta utilização ocorreu exclusivamente de forma doméstica, para mais recentemente tornar-se de grande importância em uma vasta gama de aplicações industriais e tecnológicas.

A natureza química das enzimas permaneceu desconhecida até 1926, quando o bioquímico Summer terminou a purificação da enzima urease isolada de

sementes de *Canavalia ensiliformis*. Nessa época, uma grande dificuldade era a falta de precisão do grau de pureza das preparações enzimáticas obtidas. O fato de uma preparação enzimática ser menos estável quanto mais purificada, levou a se supor que o isolamento de uma enzima seria impossível.⁷

Toda enzima possui um centro ativo, onde se processam as reações com determinados substratos. Este centro ativo é constituído de resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína e um grupo não-proteico, responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem apenas de sua estrutura como proteína para exercer sua atividade, chamadas de apoenzimas. Outras dependem de um ou mais componentes chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas coenzimas. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado haloenzima.

A reação enzimática, representada na equação a seguir, foi formulada por Michaelis e Menten, em 1913 baseados em estudos iniciados por Brown em 1902, onde foi observada a formação de um complexo entre a enzima substrato. A reação enzimática ocorre entre a enzima (E) e o substrato (S) formando o complexo enzima/substrato (ES). A formação do produto da reação (P) a partir de ES é a etapa limitante da velocidade da reação. De tal modo, a velocidade da reação enzimática depende das concentrações da enzima e do substrato.



Conforme demonstra a Figura 1.2, segundo a lei da ação das massas, a velocidade de uma reação química é proporcional à concentração dos reagentes, isto é, o substrato. A representação gráfica da velocidade da reação em função do substrato proporcionará um segmento de reta (A). Entretanto, uma reação catalisada por uma enzima, tal representação gráfica origina uma curva com a forma de um eixo de hipérbole (B).⁷

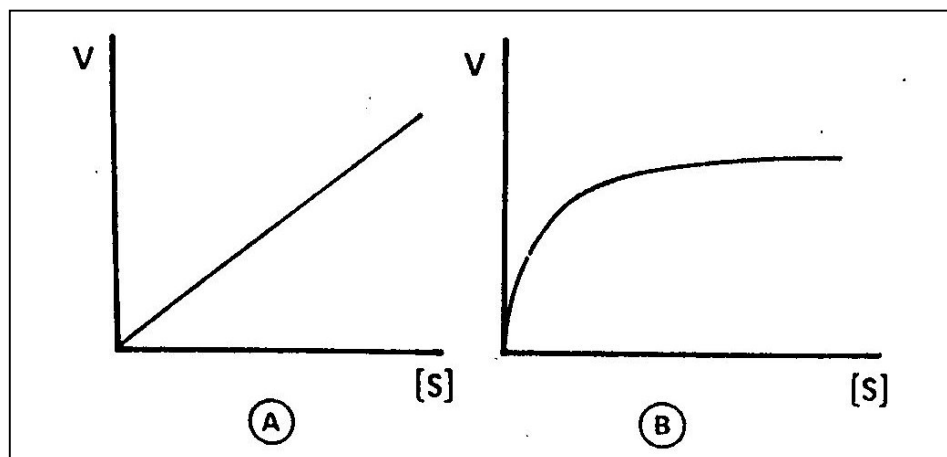


FIGURA 1.2 – Efeito da concentração do substrato (S) na velocidade (V) da reação. A – reação química; B – reação catalisada por uma enzima.⁷

Este comportamento é explicável devido à formação do complexo enzima/substrato, (ES) que é o reagente efetivo, cuja concentração é proporcional a formação do produto (P). Sempre que a concentração da enzima (E) for menor em relação ao substrato (S) resultará em uma formação proporcional do produto. Todavia, um progressivo aumento da concentração do substrato conduzirá a um estado de complexação de todas as moléculas da enzima com o substrato, isto é, a saturação da enzima. Nessa condição, novas adições de substrato não produzirão acréscimo na velocidade de formação do produto.

Tal comportamento encontra-se demonstrado na representação esquemática da Figura 1.3, na qual considera-se que a enzima atua durante um intervalo de tempo muito curto e igual nos quatro casos. Nota-se que em III e IV se forma a mesma quantidade de produto apesar do grande excesso de substrato em IV.

Nas últimas décadas, devido à seletividade, em alguns casos especificidade, e poder catalítico, as enzimas passaram a ser explorada de forma cada vez mais intensa, resultando em aplicações em diferentes áreas, tais como: Química Analítica, Medicina, Agricultura, Tecnologia de Alimentos e estudos ambientais.

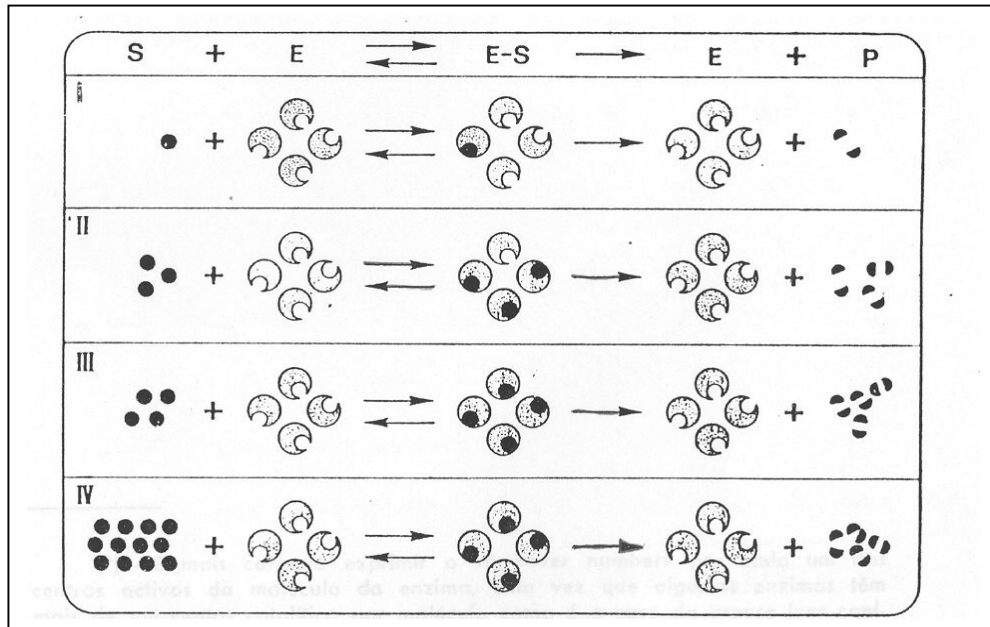


FIGURA 1.3 – Representação esquemática do efeito da concentração do substrato na atividade da enzima. I, II, III, IV, concentrações do substrato, baixa, $\frac{3}{4}$ saturante, saturante e em grande excesso, respectivamente.⁷

A aplicação analítica das enzimas imobilizadas vem sendo usada, preferencialmente, no lugar da enzima em solução. No geral, os métodos de imobilização ocorrem por ligações covalentes com suportes sólidos. Neste caso, ligações múltiplas originam preparações mais estáveis, entretanto com menor flexibilidade espacial das enzimas, resultando geralmente em decréscimo de atividade. Esses métodos de imobilização estão disseminados tanto em aplicações industriais como em sistemas de análise. Exemplos de aplicações analíticas envolvendo enzimas imobilizadas são os biossensores, os reatores para análises cromatográficas ou em sistemas de análise por injeção em fluxo.⁸

Dentre as principais vantagens advindas da aplicação de enzimas imobilizadas pode-se ressaltar: as enzimas podem ser reutilizadas; os processos químicos podem ser continuamente operados e prontamente controlados; os produtos podem ser facilmente separados; os problemas de efluentes e manipulação de material são minimizados; a reprodutibilidade do procedimento analítico pode ser aumentada; facilidade de construção de transdutores enzimáticos; diminuem o custo, aumentam a rapidez e a exatidão das determinações.^{8,9}

A introdução de enzimas imobilizadas em Química Analítica tem encontrado variadas aplicações no processamento industrial e em avaliações de controle de qualidade. Quando utilizadas em sistemas de análise por injeção em fluxo, propriedades tais como velocidade, portabilidade e simplicidade de análise são conseguidas.

1.3 - MULTICOMUTAÇÃO

Praticamente três décadas se passaram desde a introdução do processo de análise por injeção em fluxo - FIA[†] ¹⁰ e tem sido grande o interesse de pesquisa nesta área. O processo propagou-se pelo mundo, tornando-se base de muitos grupos de pesquisa. O crescente número de artigos científicos, publicações em congressos, livros e teses acadêmicas corroboram o crescimento desta ferramenta analítica.

O sucesso deste processo e sua rápida propagação pelo mundo deram-se em virtude das suas características analíticas que proporcionam o desenvolvimento de procedimentos com alta produtividade e pelo baixo custo dos equipamentos empregados. Hoje, o processo FIA já é bem estabelecido possibilitando a automação de vários procedimentos analíticos tais como titulação, extração líquido-líquido, separação em fase sólida, difusão gasosa, diálise, adição de padrão, geração de hidretos, etc.

A Multicomutação advém da consolidação do processo de FIA e foi proposta com o intuito de automatizar os procedimentos analíticos em fluxo. Trata-se de uma estratégia onde a manipulação das soluções de amostra e reagentes é controlada pelo microcomputador.¹¹ Sua utilização se faz necessária, principalmente em procedimentos onde o controle exato do tempo é extremamente necessário para garantir uma boa repetibilidade das medidas. Ademais, outra vantagem de sistemas analíticos controlados por computador, é a economia de reagente que se obtém quando se utilizam válvulas, como por exemplo, válvulas solenóides de três vias. Pode-se programar o computador para que a introdução da solução de reagente no percurso analítico somente ocorra no momento em que este é necessário, evitando,

[†] Do inglês: Flow injection Analysis

assim, o desperdício. Fator de suma importância tanto do ponto de vista da geração de custo por análise quanto do ponto de vista ambiental, com a menor geração de resíduos.

Recentemente, dois excelentes artigos de revisão tratando das potencialidades da multicomutação foram escritos por autores espanhóis e por um conjunto de autores brasileiros e portugueses. No geral, os referidos artigos tratam de conceitos básicos, destacam as aplicações e as tendências apresentadas por esta estratégia.^{12,13} ICARDO *et al.* fazem um paralelo das vantagens e desvantagens dos sistemas empregando multicomutação *versus* os sistemas FIA clássicos.¹² ROCHA *et al.* destacam que as vantagens obtidas com o emprego da multicomutação a tornam potencialmente aplicável na Química Verde.¹³

A estrutura básica de um sistema em fluxo empregando multicomutação está apresentado esquematicamente, na Figura 1.4, através de um diagrama de blocos. Nesse caso, as inserções das soluções de amostra e reagentes ocorrem através do emprego de válvulas solenóides de três vias. O volume de solução inserido é controlado pelo tempo de acionamento das válvulas. O volume de inserção das soluções (v_s) é definido pelo produto da vazão (φ) e o tempo de acionamento da válvula (t_i), $v_s = \varphi t_i$.

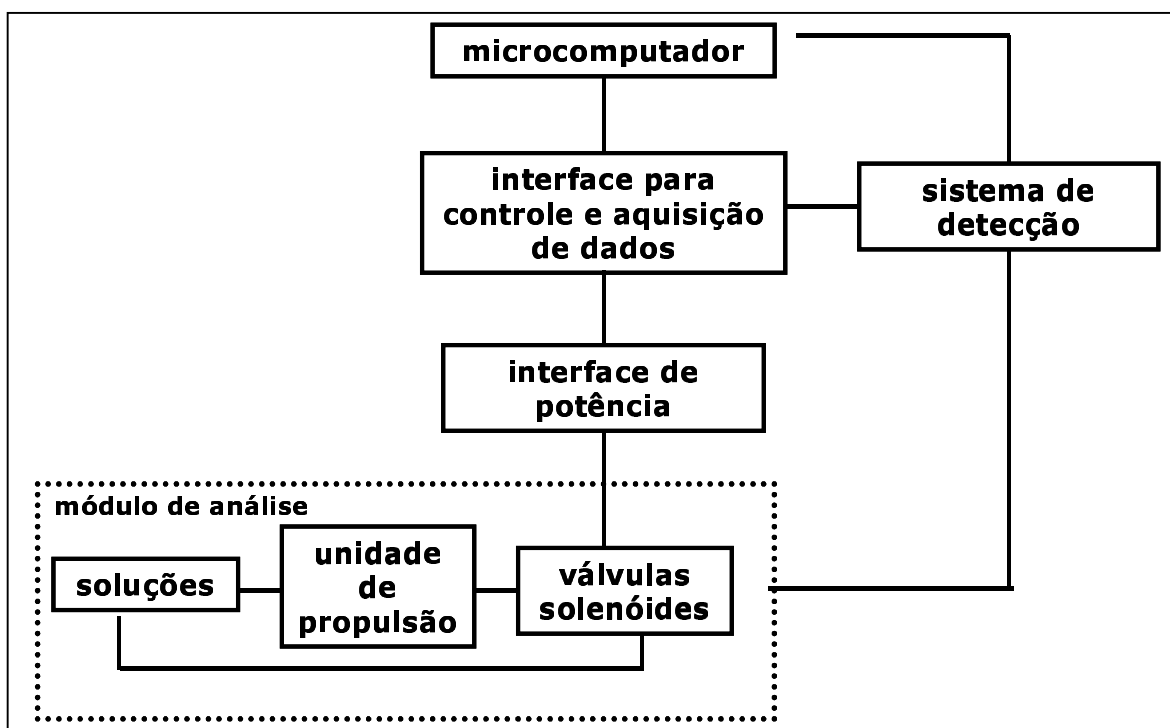


FIGURA 1.4 - Diagrama de blocos de um sistema de análises em fluxo controlado por um microcomputador.

Com base no exposto, neste trabalho propõe-se o desenvolvimento de procedimentos para determinação de etanol, glicerol e ácido tartárico empregando multicomutação em fluxo, aplicados em amostras de vinho sem tratamento prévio.

CAPÍTULO II

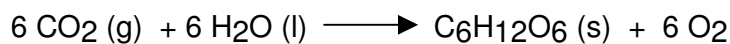
DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE ETANOL EM VINHOS POR QUIMILUMINESCÊNCIA

2.1 - INTRODUÇÃO

O teor de etanol em vinhos representa um dos mais relevantes fatores de qualidade, no que se refere aos seguintes aspectos: pela sua expressão quantitativa, visto ser a substância mais importante dos vinhos depois da água; pela sua origem, haja vista que a fermentação alcoólica dos açúcares dos mostos constitui a forma mais direta e precisa, de caracterizar a vinificação; pela influência direta e indireta que exerce nas características organolépticas dos vinhos; ou ainda, pela enorme importância do seu papel na própria conservação dos vinhos.¹⁴

A vinificação, na sua forma mais básica, é simples. Trata-se de um processo de fermentação realizado por microorganismo do gênero *Saccharomyces*, destacando-se as espécies *S. ellipsoideus* (ou *cerevisae* ou *vini*), *S. chevalieri* e *S. oviformis* (ou *bayanus*).¹⁵ Nesse processo bioquímico os microorganismos convertem moléculas de carboidratos, originados pela fotossíntese, em álcool e dióxido de carbono, através de um processo exotérmico, conforme esquema apresentado nas Equações da Figura 2.1.

Equação 1:



Equação 2:

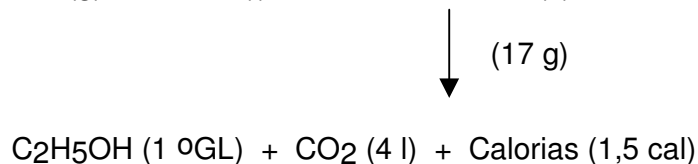


FIGURA 2.1 – Esquema simplificado das reações que ocorrem nos processos de fotossíntese (Equação 1) e fermentação (Equação 2).

Comumente, o teor alcoólico do vinho está na faixa de 9 a 15 °GL (Gay –Lussac), representando uma concentração de 72 a 100 g l⁻¹,¹⁶ necessitando de

uma quantidade açúcar na faixa de 153 – 255 g. Isto demonstra que o teor alcoólico do vinho está intrinsecamente ligado à quantidade de açúcar contido nas uvas.

É importante lembrar que o valor comercial dos vinhos é determinado, em sua grande expressão, pelo teor de etanol. Em muitos países, o nível de etanol nos vinhos serve como referência de qualidade e fator de taxação.¹⁷ Isso faz com que alguns produtores recorram a adulterações, com adição de quantidades irregulares de açúcar,¹⁸ comprometendo a autenticidade do vinho e não atendendo as normas internacionais impostas pela OIV.

Em face da importância da concentração de etanol, as medidas do grau alcoólico requerem métodos com alta precisão e exatidão.¹⁹ O doseamento químico do etanol, recomendado pela OIV e AOAC[‡],^{20,21} baseia-se na oxidação crômica, após destilação em um micro-Kjeldahl, apresentando elevada precisão.

No geral, quantifica-se etanol rotineiramente durante a produção do vinho, usando métodos bem-estabelecidos que comumente envolvem a separação do analito da amostra matriz por destilação antes das medidas químicas ou físicas, ou usando métodos cromatográficos.

Novos procedimentos aplicando cromatografia têm sido propostos.²²⁻³⁰ Nos últimos anos, a cromatografia gasosa tem sido aceita como procedimento padrão para ensaios de etanol, entretanto o custo relativamente alto e a natureza da análise *off-line* têm restringido seu uso no monitoramento dos processos de fermentação.³¹

É crescente o número de metodologias propostas para determinação de etanol em vinhos, empregando variadas técnicas analíticas, tais como: amperometria,³²⁻⁴⁰ potenciometria,⁴¹ eletroforese capilar,^{42,43} espectrometria Raman,^{44,45} espectroscopia de infravermelho,^{46,47} quimiluminescência,^{48,49} fluorimetria⁵⁰ e espectrofotometria UV-Vis.⁵¹⁻⁵⁷

Dentre a vasta literatura de metodologias para determinação de etanol, um expressivo número de trabalhos envolvem análise em fluxo. Sob este aspecto, encontram-se alguns artigos de revisão. Em 1992, LUQUE DE CASTRO e GARCIAMESA,⁵⁸ enfatizaram o uso da análise em fluxo para análise de bebidas, em particular os vinhos. Nesse artigo os autores demonstraram as potencialidades do processo que permite efetuar determinações individuais ou múltiplas, de modo

[‡] Do inglês: Association of Official Analytical Chemistry

seqüencial ou simultâneo. Passados alguns anos, LUQUE DE CASTRO e LUQUE-GARCIA,⁵⁹ destacaram o uso de biossensores, que acoplado aos sistemas em fluxo, representam uma excelente ferramenta no monitoramento dos processos de fermentação, podendo ser aplicados na determinação de etanol individualmente ou com outros compostos. Recentemente, SEGUNDO *et al.*, apresentaram uma revisão a respeito do uso de sistemas SIA[§] em análise de vinhos e demonstraram a capacidade virtual do processo no desenvolvimento de procedimentos nesta área, dando ênfase à implementação do tratamento da amostra em linha e à operação do processo através de *programa computacional* de controle.⁶⁰

Dentro deste contexto, as enzimas têm desempenhado um importante papel à frente das metodologias que vêm sendo propostas para determinação de etanol.⁶¹ Aplicadas como biossensores^{32,40,62-64} ou imobilizadas,^{53,54,65-71} têm sido uma prodigiosa alternativa em face da complexidade química da amostra. As enzimas freqüentemente usadas são a *álcool oxidase* e *álcool desidrogenase*. A primeira oxida o etanol a acetaldeído, produzindo peróxido de hidrogênio. Os produtos dessa reação podem ser monitorados por quimiluminescência ou por sensores eletroquímicos. A enzima *álcool desidrogenase*, largamente utilizada, requer o uso do cofator NAD⁺ para promover a reação de oxi-redução, podendo ser monitorada por espectrofotometria, fluorescência ou eletroquímica.

É válido lembrar que nos últimos anos o emprego da pervaporação tem sido ressaltado em análise de alimentos e para fins enológicos.^{72,73} O processo apresenta-se como uma alternativa às etapas de pré-tratamento da amostra, sendo aplicável nas determinações que envolvem analitos voláteis ou em reações com produtos voláteis. Atrelada aos sistemas em fluxos, a pervaporação tem sido aplicada na determinação de etanol, empregando diferentes técnicas de detecção.⁷⁴⁻

77

Poucos são os trabalhos⁷⁸⁻⁸⁰ que fazem uso da multicomutação na determinação de espécies contidas em bebidas alcoólicas. Neste trabalho, fazendo-se uso da multicomutação, propõe-se um procedimento analítico para determinação de etanol em vinho, sem tratamento prévio da amostra, empregando reação enzimática e detecção por quimiluminescência.

[§] Do inglês: Sequential Injection Analysis

2.2 - PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 - Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagente de grau analítico empregando água purificada (condutividade menor que $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Solução tampão carbonato foi preparada a partir de uma solução $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ de K_2CO_3 , ajustando-se o pH para 10,5 com solução $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de HCl.

Solução estoque de 10 mmol l^{-1} de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona (Sigma)) foi preparada dissolvendo-se 443,0 mg de luminol em 250 ml de solução tampão carbonato. Esta solução foi estocada em frasco de polietileno, protegida da luz e mantida sob refrigeração. A solução de trabalho $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ de luminol foi preparada por diluição da solução estoque com solução tampão carbonato.

Solução $50,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de hexacianoferrato(III) de potássio foi preparada diariamente dissolvendo-se 412 mg de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 25 ml de água.

Solução estoque de peróxido de hidrogênio (ca. 1 mmol l^{-1}) foi preparada a partir de uma solução 30% (m/m) e padronizada com permanganato de potássio. Soluções de referência foram preparadas por sucessivas diluições da solução estoque com água.

Soluções $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de tampão fosfato com pH 7,0 e 7,5 foram preparadas dissolvendo-se o sal H_2KPO_4 em água e ajustando-se o pH com solução $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de NaOH.

Solução 2,5% (m/v) de glutaraldeído foi preparada a partir de uma solução de glutaraldeído 25% (m/v) em 10,0 ml de solução $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7,0.

Soluções de referência de etanol foram preparadas diariamente a partir de etanol 96% (v/v), densidade $0,81 \text{ kg l}^{-1}$.

Álcool oxidase (AOD), (38 U mg^{-1} EC 1.1.3.13 da *Pichia pastoris*, ref. A-2404), fornecido pela SIGMA (St. Louis, MO, USA), foi imobilizada em esferas de vidro com porosidade controlada (CPG). As esferas de vidro em Aminopropil (porosidade média: 170Å ; granulometria: 200-400 mesh, ref. G-4518) fornecidas pela SIGMA (St. Louis, MO, USA).

Amostras de vinho tinto, branco e rosê foram compradas no comércio local.

2.2.2 - Materiais

2.2.2.1 - Equipamentos e acessórios

O módulo de análise foi construído empregando tubos de polietileno (0,8 mm d.i.), confluências feitas em acrílico e válvulas solenóides de três vias (Nresearch 161T031). A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Ismatec IPC-8. Um microcomputador 386, equipado com uma interface eletrônica (Advantech, PCL 711S) e um *programa computacional* escrito em linguagem Quick BASIC 4.5 foi empregado para o acionamento das válvulas e aquisição de dados.

Para detecção quimiluminescente foi utilizado um luminômetro desenvolvido no CENA.⁸¹ Foi empregada uma cela de vidro (78 mm² e 1,0 mm de caminho óptico) acoplada entre dois fotodiodos OSD50-E (RS 846-711). O conjunto foi acondicionado em uma caixa metálica para evitar a incidência de luz ambiente sobre os fotodetectores.

2.2.3 - Metodologia

Os testes iniciais para avaliação do desempenho do dispositivo proposto basearam-se na reação de oxidação do luminol (5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinediona) por peróxido de hidrogênio, catalisada por hexacianoferrato(III) de potássio, em meio alcalino. No diagrama de fluxo utilizado, mostrado na Figura 2.2, a amostra foi inserida na solução transportadora, através do acionamento da válvula V₁, recebendo por confluência as soluções de luminol (R₁) e do catalisador (R₂), pelo acionamento das válvulas V₂ e V₃. Visando minimizar perdas de radiação, à distância do ponto de confluência **z** e a entrada da cela de fluxo foi a menor possível.

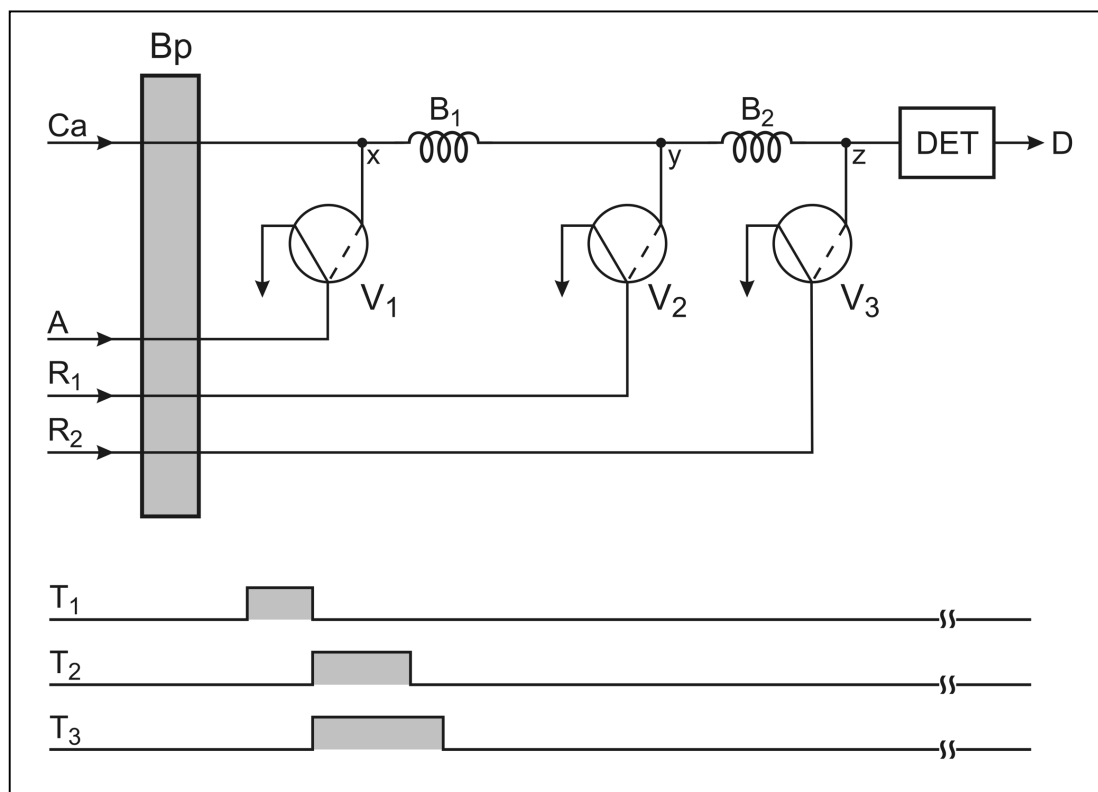


FIGURA 2.2 – Diagrama de fluxos do módulo de análise empregado para avaliação do desempenho do detector. **Ca** – solução transportadora (H₂O), 2 ml min⁻¹; **A** – amostra, 2 ml min⁻¹; **R₁** – solução 4,5 mmol l⁻¹ de luminol, 1 ml min⁻¹; **R₂** – solução 50 mmol l⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], 1 ml min⁻¹; **B₁** e **B₂** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **V₁**, **V₂**, **V₃** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂** e **T₃** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂** e **V₃**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

O procedimento para determinação de etanol foi baseado na reação enzimática, apresentado na Figura 2.3, onde a enzima *álcool oxidase* converte o etanol em acetaldeído e peróxido de hidrogênio (Equação 1). O peróxido de hidrogênio produzido reage com o luminol, em meio alcalino, na presença de hexacianoferrato (III), que funciona como catalisador (Equação 2). A concentração de peróxido de hidrogênio produzido é diretamente proporcional à concentração de etanol. A intensidade da radiação emitida é diretamente proporcional à concentração do peróxido, portanto o sinal gerado em função da radiação emitida pode ser utilizado para determinar a concentração de álcool em vinhos.

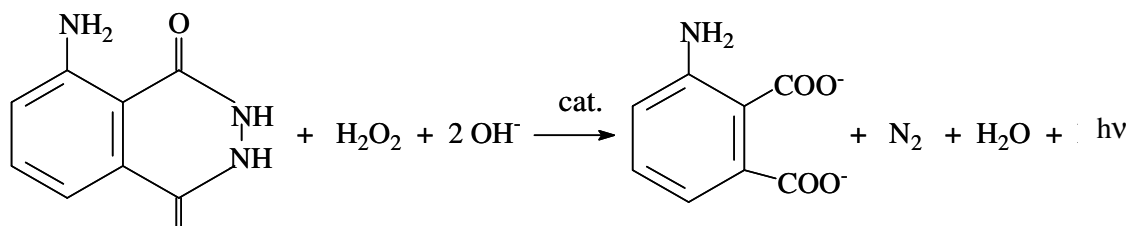
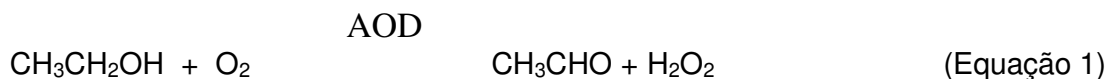


FIGURA 2.3 – Esquema simplificado das reações envolvidas no procedimento proposto. Equação 1: conversão enzimática do etanol, Equação 2: reação quimiluminescente com o luminol. cat – hexacianoferrato(III) de potássio.

2.2.4 - Procedimentos

2.2.4.1 - Imobilização da enzima

A *álcool oxidase* foi imobilizada em esferas de vidro com porosidade controlada (CPG) seguindo o procedimento descrito por MASOOM e TOWNSHEND⁸² para a *glicose oxidase* e por RUZ *et al.*,⁸³ para *álcool desidrogenase*; com algumas modificações sugeridas por RANGEL e TÓTH,⁵⁴ no que se refere à etapa de silanização, que se tornou desnecessária visto que as esferas (CPG) fornecidas pela SIGMA já são apropriadas para fixação direta de proteínas.

Adicionaram-se 3,0 ml de solução 2,5% de glutaraldeído em um frasco contendo 0,1 g de esferas de vidro com porosidade controlada (CPG) em aminopropil. Para desoxigenação da suspensão, borbulhou-se nitrogênio (*ca* 2 min) a cada 10 minutos, nos primeiros 30 minutos. A reação ocorre num período de 1 hora, à temperatura ambiente. Após a reação, as esferas de vidro ativadas foram lavadas com água destilada em funil de vidro sinterizado, porosidade 4. Em seguida, as esferas foram adicionadas em 3,0 ml de solução 0,1 mol l⁻¹ de tampão fosfato, pH

7,0, contendo 90 $\mu\text{l} \approx 100$ unidades de *álcool oxidase*. Borbulhou-se nitrogênio de modo análogo ao descrito acima e manteve-se a suspensão sob leve agitação, à 4 °C, em um frasco fechado, por 4 horas. Prosseguiu-se com sucessivas lavagens das esferas com água e solução 0,1 mol l⁻¹ de tampão fosfato geladas. A seguir, usando uma seringa, a suspensão em tampão fosfato foi transferida para uma coluna de acrílico (30 mm x 3 mm d.i.) contendo tela de náilon nas extremidades para reter as esferas de vidro. Quando não estava sendo usada, a coluna foi mantida à 4 °C, em tampão fosfato pH 7,0.

2.2.4.2 - Sistema de análise em fluxo

Para a otimização das condições operacionais da enzima imobilizada foi empregado um módulo de análise representado na Figura 2.4. Nesta configuração, todas as válvulas estão desligadas e a solução transportadora flui continuamente em direção ao detector (Det). Em seguida, a válvula V₁ foi acionada para inserção da amostra (A), passando através da coluna, contendo a enzima imobilizada (AOD), onde o etanol era convertido a acetaldeído, produzindo peróxido de hidrogênio. As soluções de luminol (R₁) e de hexacianoferrato(III) de potássio (R₂) foram adicionadas nas confluências, acionando-se as válvulas V₂ e V₃, respectivamente. A quantidade de etanol é proporcional ao peróxido de hidrogênio produzido, que por sua vez foi medido por quimiluminescência, através da reação de oxidação do luminol, catalisada por hexacianoferrato(III) de potássio, em meio alcalino. Para verificar a resposta da enzima e otimizar os volumes das soluções injetados foram realizados experimentos usando soluções de referência com concentração na faixa de 25 a 700 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de etanol.

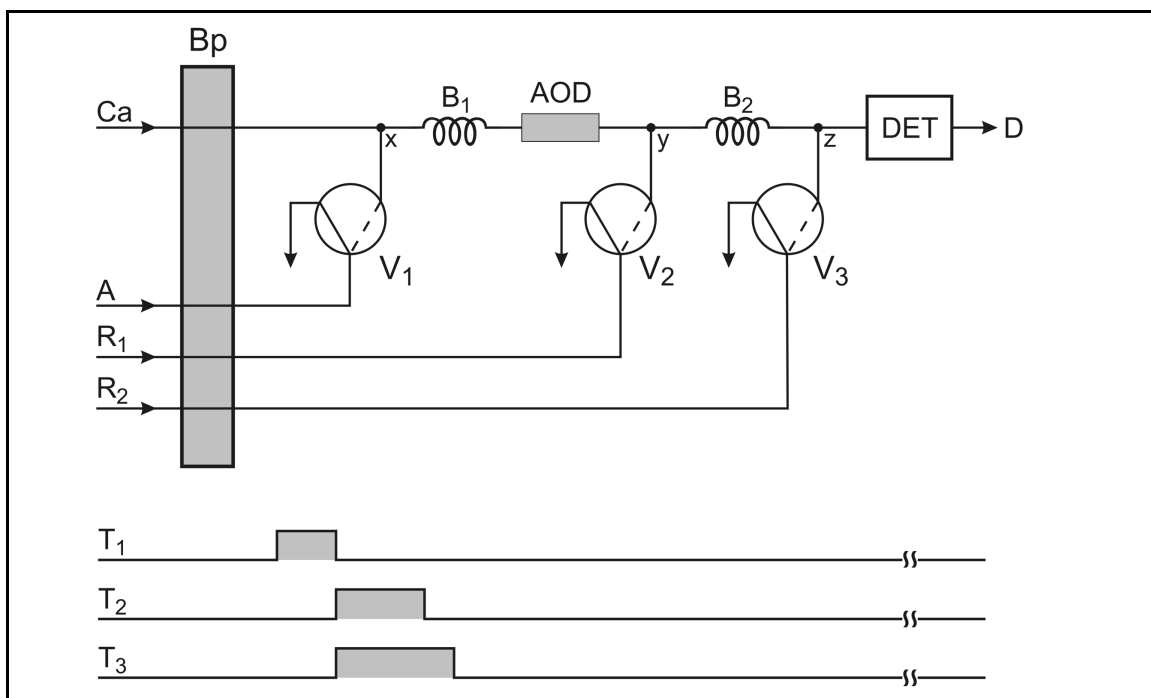


FIGURA 2.4 – Diagrama de fluxos do módulo de análise usado na otimização da reação enzimática. **V₁**, **V₂** e **V₃** – válvulas solenóides; **AOD** – coluna enzimática; **Ca** – solução transportadora (solução $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ de tampão fosfato, pH 7,5), $2,0 \text{ ml min}^{-1}$; **A** – amostra, $2,0 \text{ ml min}^{-1}$; **R₁** – solução $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** e **B₂** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **V₁**, **V₂**, **V₃** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂** e **T₃** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂** e **V₃**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

2.2.4.2.1 - Otimização dos parâmetros experimentais

Todos os experimentos de otimização do sistema foram realizados empregando-se o módulo de análise apresentado na Figura 2.4 e os estudos reacionais foram feitos usando o método de otimização univariado. Experimentos visando encontrar as melhores condições operacionais para o sistema foram realizados mantendo-se a concentração do luminol e do hexacianoferrato (III) usada em estudo anterior.⁸¹ Variaram-se alguns fatores que afetam as reações, tais como: vazão, concentração hidrogeniônica, concentração do tampão e volumes de inserção das soluções de amostra e reagentes.

Inicialmente, fixou-se os tempos de acionamento das válvulas V_1 , V_2 e V_3 , relativas à inserção das soluções da amostra, luminol e hexacianoferrato(III), em 10, 19 e 25 s, correspondentes aos volumes de 330, 323 e 425 μl , respectivamente. Avaliou-se o efeito da vazão da solução transportadora variando-a de $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ a $2,4 \text{ ml min}^{-1}$. Em seguida, o efeito da concentração hidrogeniônica na reação enzimática foi analisado variando-se o pH da solução transportadora de 6,0 a 9,0. Definido o pH ótimo, analisou-se a resposta do sistema, quanto à concentração da solução transportadora, variando-se a concentração da solução do tampão fosfato de 5 a 200 mmol l^{-1} .

Fixadas as melhores condições para os parâmetros citados, partiu-se para a avaliação do efeito do volume de inserção da amostra e dos reagentes. Para verificar a resposta do sistema em função do volume da amostra foi variado o intervalo do tempo de acionamento da válvula V_1 de 4 a 10 s (132 a 330 μl) mantendo-se o intervalo de tempo de acionamento das demais válvulas, V_2 e V_3 , em 19 e 25 s, respectivamente. Em seguida, para otimizar o volume da solução de luminol adicionado à zona da amostra, o intervalo de tempo de acionamento da válvula V_2 foi variado de 13 a 19 s (220 a 323 μl), mantendo-se V_3 em 27 s. De modo análogo, no que concerne ao volume da solução de hexacianoferrato (III) de potássio, variou-se o intervalo de tempo de acionamento da válvula V_3 de 17 a 25 s (289 a 425 μl), mantendo-se a válvula V_2 acionada por 17s.

Após a otimização dos parâmetros experimentais envolvidos no sistema proposto, foram avaliados os efeitos das potenciais espécies interferentes tais como metanol, propanol-1, propanol-2, sulfito, ácido ascórbico, glicerol, glicose,

frutose e sacarose. Os experimentos foram feitos tomando-se como referência uma solução contendo $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de etanol, acrescida de diferentes concentrações das espécies interferentes. A magnitude dos sinais obtidos com estas soluções foi comparada aos sinais obtidos com a solução de referência.

Posteriormente, aplicaram-se os parâmetros experimentais otimizados na determinação de etanol em vinhos, empregando-se o módulo de análise com a configuração apresentada adiante na Figura 2.15.

2.2.4.3 – Método comparativo

O procedimento empregado para comparação dos resultados obtidos pelo sistema proposto na determinação de etanol em amostras de vinho foi baseado no método oficial da AOAC 920.57 no qual 50,0 ml de amostra foram destilados, utilizando-se sistema de destilação apropriado, num tempo aproximado de 25 minutos.²¹ Em seguida, 25,0 ml do destilado foram transferidos para um densímetro digital, com precisão de 4 casas decimais. Passados 2 minutos, tempo de estabilização da temperatura, empregando um densímetro digital, mediu-se a densidade à 20 °C. O valor da densidade foi convertido por tabela padrão em porcentagem (v/v). Este procedimento foi executado no Laboratório do Setor Açúcar e Álcool -Departamento Agro-indústria Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP.

2.5 -RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes iniciais foram feitos para avaliação do luminômetro com a nova célula de geometria laminar, confeccionada em vidro, apresentada na Figura 2.5, empregando o sistema de análise em fluxo da Figura 2.2. Utilizando-se soluções de referência de peróxido de hidrogênio, o sistema apresentou comportamento similar ao apresentado com a célula em acrílico,⁸¹ com uma faixa de resposta linear para concentrações de H_2O_2 entre 2,50 e 500 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

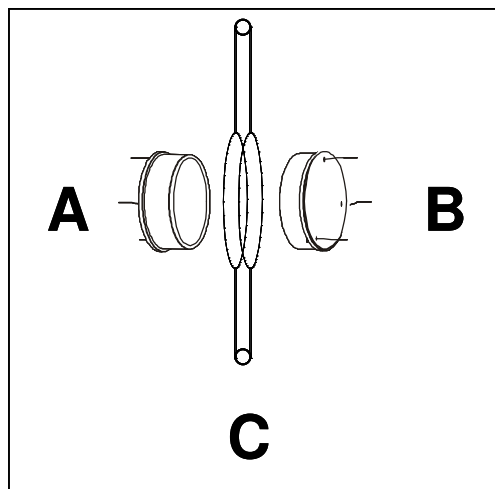


FIGURA 2.5 – Dispositivo empregado para medidas por quimiluminescência. **A** e **B** – fotodiodos OSD50-E; **C** – cela de vidro com superfície plana de 78 mm² e caminho óptico de 1,0 mm.

Em seguida, inseriu-se a coluna enzimática no módulo de análise, Figura 2.4. Os estudos de otimização da reação enzimática, que se encontram descritos a seguir foram realizados empregando as condições experimentais descritas na seção 2.2.4.2.1.

2.5.1 - Efeito da Vazão

Nos sistemas FIA, o intervalo de tempo para o desenvolvimento da reação química pode ser determinado pelo comprimento do percurso analítico e pela soma das vazões do fluido transportador e dos reagentes. Em se tratando das reações enzimáticas, a vazão tem uma grande importância na performance do sistema visto a influência no tempo de contato ou interação entre a enzima e o substrato.^{50,53} Estudos prévios^{75,84} revelaram que o aumento da vazão compromete a precisão dos resultados obtidos e a estabilidade da coluna enzimática, ocasionando também decréscimo no sinal analítico. Assim sendo, primeiramente, avaliou-se o efeito da variação da vazão no sistema proposto. O estudo foi realizado em função da magnitude do sinal analítico como mostra a Figura 2.6.

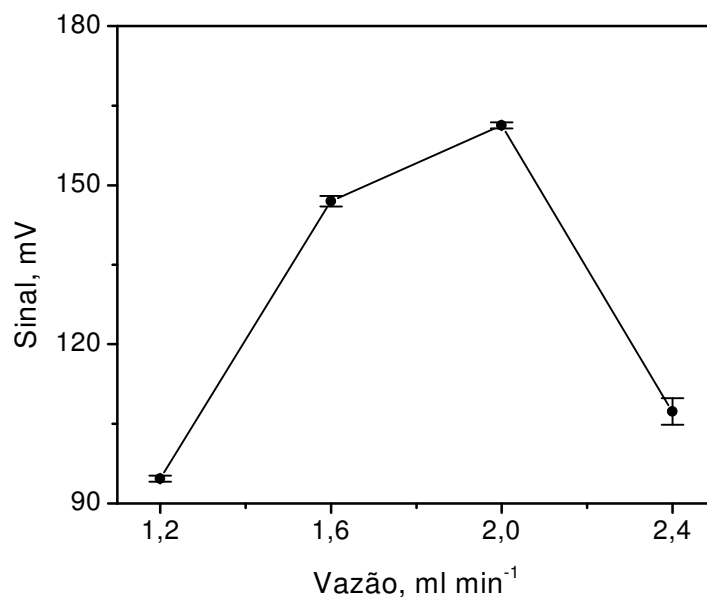


FIGURA 2.6 – Influência da vazão no desenvolvimento da reação. Sinais obtidos usando solução de referência de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ com medidas realizadas em triplicatas, empregando sistema de análise em fluxo descrito na Figura 2.4. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,0; volumes de amostra, luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 330, 323 e $425 \mu\text{l}$, respectivamente.

Os resultados apresentados demonstraram um considerável ganho na magnitude do sinal analítico até a vazão de $2,0 \text{ ml min}^{-1}$, seguido de uma expressiva perda de sinal (ca 33%), provavelmente causada pela diminuição do tempo de residência da zona da amostra em contato com a enzima. A vazão de $2,0 \text{ ml min}^{-1}$ foi escolhida com compromisso entre a magnitude do sinal analítico e a frequência analítica.

2.5.2 - Efeito do pH e da Concentração do Tampão

A atividade da enzima imobilizada não deve ser influenciada pela solução transportadora nos sistemas FIA.⁸⁴ Desta forma, empregaram-se 100 mmol l^{-1} de tampão fosfato como solução transportadora, uma vez que ele também foi usado para conservar a enzima imobilizada.

De acordo com o resultado mostrado na Figura 2.7, observa-se uma tendência assintota nas curvas analíticas, sendo que as causas podem ser tanto em decorrência da resposta da enzima⁷ bem como do uso de parâmetros ainda não otimizados.

A análise destes resultados foi feita levando-se em consideração o comportamento da sensibilidade em relação à concentração hidrogeniônica. Variando-se o pH do tampão fosfato na faixa de 6,0 a 9,0, nota-se que a sensibilidade aumentou em função do pH até 7,5 e manteve-se constante de pH 7,5 a 9. No entanto, para valores de pH maiores que 8,0 a estabilidade da enzima decresceu rapidamente, desnaturando. Embora o pH mais alto favoreça a reação de quimiluminescência do luminol, o efeito observado é devido à atividade da *álcool oxidase* que, segundo a literatura,⁸⁵ apresenta o máximo de atividade entre pH 7,5 e 8. Desta forma, escolheu-se o pH 7,5 para os demais experimentos.

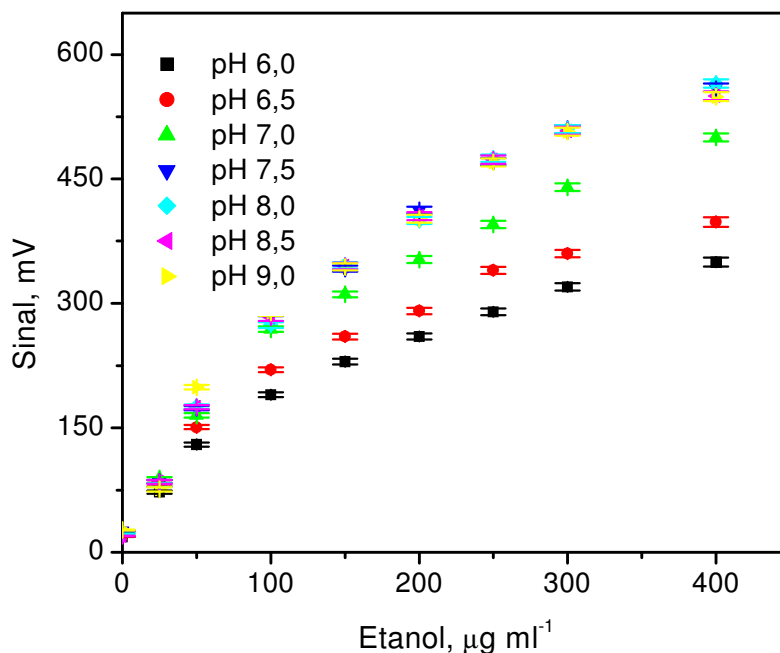


FIGURA 2.7 – Influência da variação da concentração hidrogeniônica da solução transportadora na reação enzimática. Valores de pH e suas respectivas equações: ■ pH 6,0: $y = 75,59 + 0,80x$ ($r=0,9542$); ● pH 6,5: $y = 86,36 + 0,91x$ ($r=0,9514$); ▲ pH 7,0: $y = 94,31 + 1,15x$ ($r=0,9612$); ▼ pH 7,5: $y = 32,73 + 1,67x$ ($r=0,9744$); ◆ pH 8,0: $y = 29,02 + 1,68x$ ($r=0,9744$); ◆ pH 8,5: $y = 25,46 + 1,68x$ ($r=0,9727$); ► pH 9,0: $y = 32,24 + 1,66x$ ($r=0,9696$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato; volumes de amostra, luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 330, 323 e 425 ml, respectivamente.

Após a definição do pH ótimo para o desenvolvimento do procedimento proposto, ainda com relação à solução transportadora, experimentos foram realizados para definir o efeito da composição da solução do tampão fosfato. Conforme mostra a Figura 2.8, um aumento na concentração do tampão proporcionou um significativo ganho de sensibilidade. Este comportamento foi observado até a concentração de 100 mmol l^{-1} , que foi escolhida para dar prosseguimento à otimização dos parâmetros experimentais.

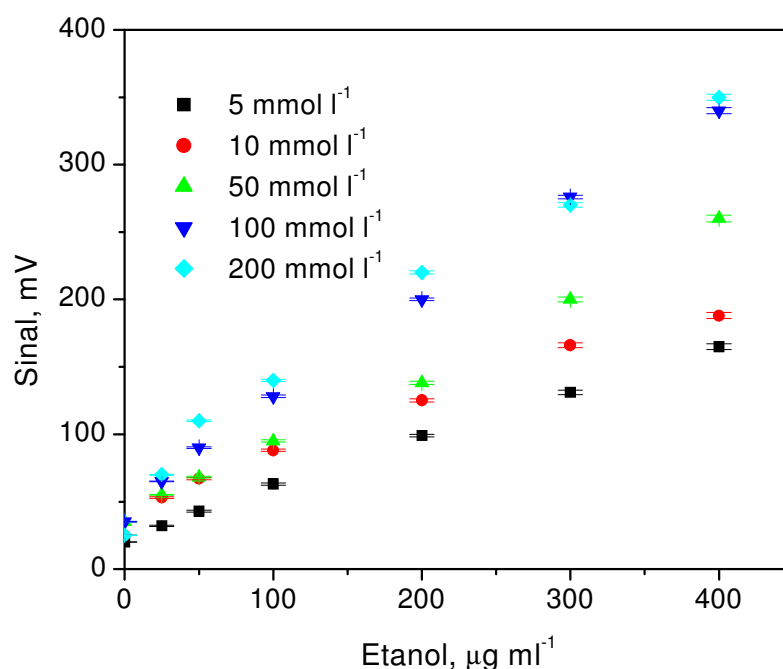


FIGURA 2.8 – Influência da variação da concentração da solução do tampão fosfato pH 7,5 na resposta do sistema proposto. Valores das concentrações e suas respectivas equações: ■ 5 mmol l^{-1} : $y = 24,01 + 0,36x$ ($r=0,998$); ● 10 mmol l^{-1} : $y = 41,49 + 0,39x$ ($r=0,997$); ▲ 50 mmol l^{-1} : $y = 37,92 + 0,54x$ ($r=0,998$); ▼ 100 mmol l^{-1} : $y = 46,77 + 0,75x$ ($r=0,998$); ◆ 200 mmol l^{-1} : $y = 53,28 + 0,75x$ ($r=0,989$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: tampão fosfato, pH 7,5; volumes de amostra, luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 330, 323 e 425 ml, respectivamente.

2.5.3 - Estudo do Volume da Amostra

Considerou-se a resposta analítica do sistema em decorrência da variação do volume de amostra inserido no percurso analítico. Para isso empregou-se volumes de amostra na faixa de 132 a 330 μl e construiu-se curvas analíticas para cada condição.

Conforme os resultados mostrados na Figura 2.9, o sistema apresentou um expressivo ganho de sensibilidade à proporção que se inseriu um volume maior de amostra, até um volume de 264 μl . Comportamento teoricamente esperado, haja vista que o aumento do volume de amostra proporcionou uma maior quantidade de substrato para conversão enzimática e, além disso, minimiza o efeito da dispersão da amostra no fluido transportador. Escolheu-se o volume de 264 μl , pois volumes maiores não proporcionaram ganho de sensibilidade, tendendo a estabilidade, conforme demonstra a referida Figura.

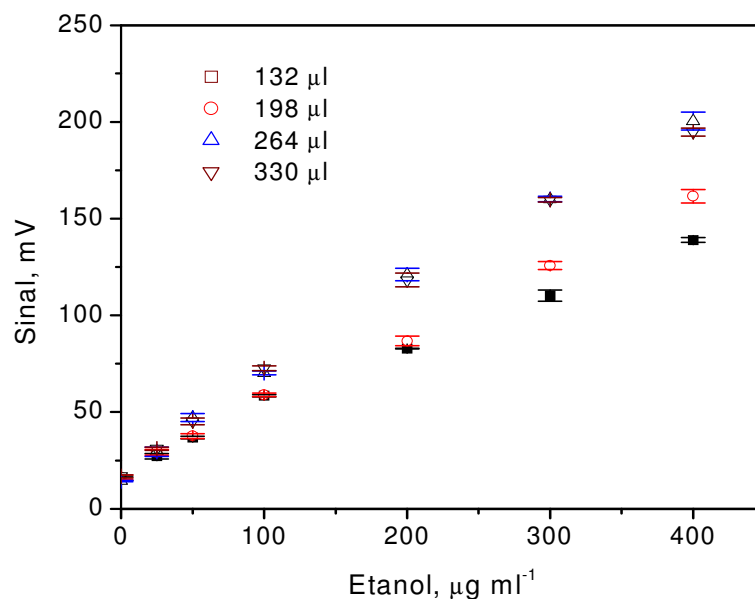


FIGURA 2.9 – Influência da variação do volume de amostra. Volumes da amostra inseridos e suas respectivas equações: ■ 132 μl : $y = 22,65 + 0,30x$ ($r=0,994$); ● 198 μl : $y = 19,61 + 0,36x$ ($r=0,996$); ▲ 264 μl : $y = 15,14 + 0,49x$ ($r=0,998$); ▼ 330 μl : $y = 19,64 + 0,46x$ ($r=0,998$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,5.; volumes de luminol e hexacianoferrato (III) de potássio: 323 e 425 μl , respectivamente.

2.5.4. Estudo do Volume de Luminol

Após estabelecer o volume ideal de amostra, partiu-se para a análise da influência da variação do volume de luminol na zona da amostra. Pode-se verificar na Figura 2.10 que o uso de um volume de 290 μl proporcionou a melhor condição apresentando maior sensibilidade e linearidade. A inserção de volumes maiores não proporcionou ganho de sensibilidade. Desta forma, fixou-se o volume de luminol em 290 μl . Acima deste volume observou-se uma tendência a estabilidade.

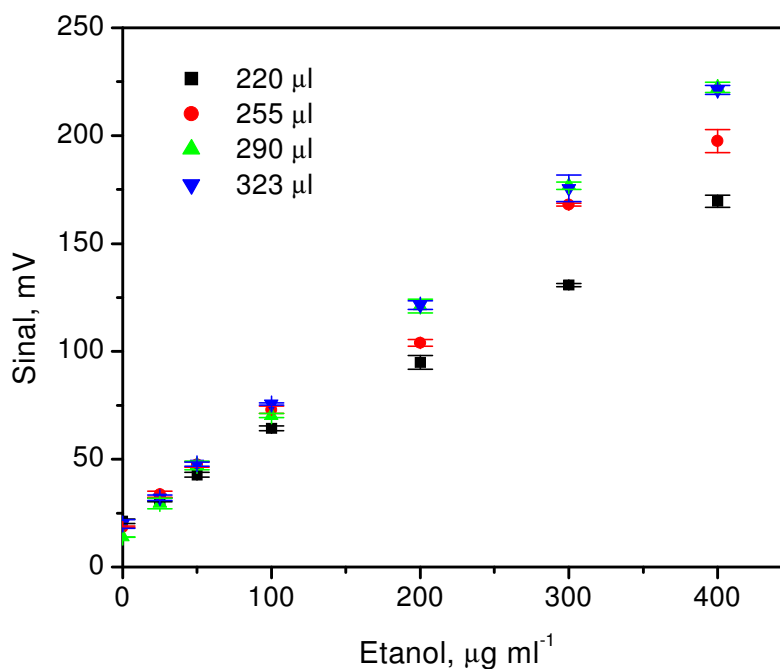


FIGURA 2.10 – Influência da variação do volume de luminol. Volumes de luminol inseridos e suas respectivas equações: ■ 220 μl : $y = 23,01 + 0,36x$ ($r=0,999$); ● 255 μl : $y = 22,74 + 0,45x$ ($r=0,995$); ▲ 290 μl : $y = 17,50 + 0,52x$ ($r=0,998$); ▼ 325 μl : $y = 21,66 + 0,50x$ ($r=0,999$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,5.; volumes de amostra e hexacianoferrato (III) de potássio: 264 e 425 μl , respectivamente.

2.5.5. Estudo do Volume do Hexacianoferrato (III) de Potássio

Como demonstra o diagrama tempo apresentado na Figura 2.4, as válvulas V_2 e V_3 , que inseriam luminol e hexacianoferrato (III), respectivamente, foram acionadas ao mesmo tempo de modo a garantir a presença do catalisador na chegada da zona da amostra ao detector, conforme estudos anteriores.^{86,87} Nesta configuração a válvula V_2 foi desligada e V_3 permaneceu acionada para garantir a presença do catalisador em toda a zona da amostra. Desta forma, fez-se o estudo da influência do volume de hexacianoferrato (III) inserido para avaliar o tempo de acionamento necessário para garantir a melhor condição para a reação.

Os resultados apresentados na Figura 2.11 demonstram um ganho de sensibilidade à proporção que se aumentou o volume de catalisador. Este comportamento foi observado até a inserção do volume de 390 μl ; volumes maiores apresentaram tendência a estabilidade. A partir destes resultados, fixou-se o volume de catalisador em 390 μl , que resultou na permanência da válvula V_3 acionada por 6 s após desligamento da válvula V_2 .

2.5.6. Estudo dos interferentes

Segundo MARSHALL e GIBSON,⁸⁸ a enzima *álcool oxidase* não é específica para o etanol e sua seletividade obedece a seguinte ordem de reatividade: metanol (100%), etanol (55,2%), propanol-1 (20,7%), butanol-1 (12,1%), álcool alílico e formaldeído (5,2%). Portanto, contaminação de amostras com um destes compostos produzirão interferência na resposta enzimática.

Tendo em vista a aplicação do procedimento proposto em amostras de vinho, fez-se o estudo de interferentes, uma vez que o vinho é uma matriz bastante complexa pela sua composição química, o que pode acarretar numa possível interferência na determinação de etanol. Deste modo, realizou-se estudo dos seguintes interferentes: metanol, glicerol, propanol-1, propanol-2, sulfito, ácido ascórbico, sacarose, frutose e glicose. Onde os resultados encontram-se apresentados na Tabela 2.1, demonstrando que o metanol e o propanol-1 apresentaram interferência positiva com um aumento da magnitude do sinal analítico, comportamento esperado devido à seletividade da enzima. O sulfito e o

ácido ascórbico apresentaram uma interferência negativa na determinação de etanol, com diminuição do sinal. Neste caso, ambas são substâncias redutoras que influenciam na reação quimiluminescente do peróxido de hidrogênio com o luminol.⁸⁹ A interferência foi observada quando a relação álcool/interferente foi de 10:1, para o metanol e o sulfito; e de 1:1, para o metanol e o ácido ascórbico. Porém estas proporções estão muito acima das concentrações encontradas nos vinhos. Os demais interferentes não apresentaram diferença significativa na magnitude do sinal analítico. Estes resultados são concordantes com àqueles reportados por XIE *et al.*⁴⁹ Avaliou-se também uma solução contendo todos os interferentes estudados numa relação de 50:1, etanol/interferente, a qual não apresentou diferença significativa na magnitude do sinal analítico.

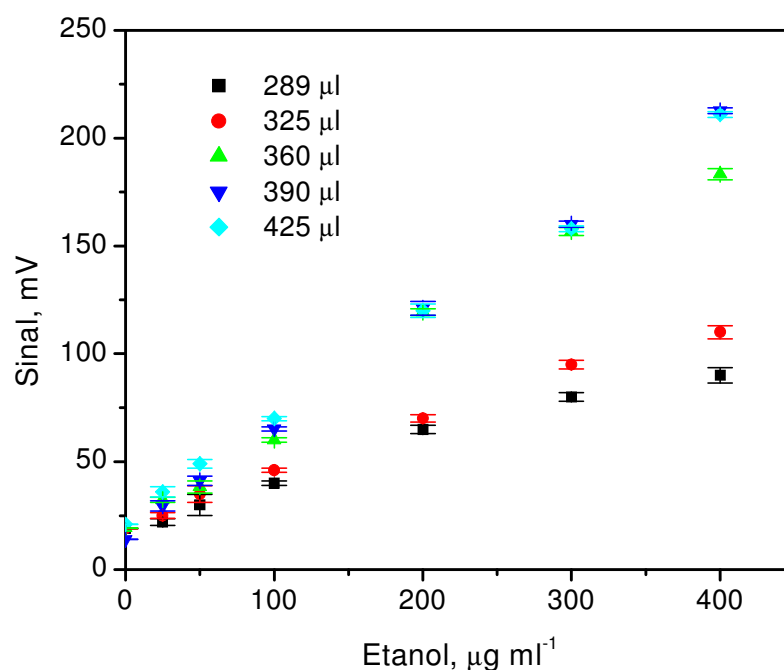


FIGURA 2.11 – Influência da variação do volume de hexacianoferrato(III) de potássio. Volumes de hexacianoferrato(III) inseridos e suas respectivas equações: ■ 289 μl : $y = 20,60 + 0,18x$ ($r=0,989$); ● 325 μl : $y = 21,99 + 0,23x$ ($r=0,993$); ▲ 360 μl : $y = 20,96 + 0,43x$ ($r=0,996$); ▼ 390 μl : $y = 16,54 + 0,49x$ ($r=0,999$); ◆ 425 μl : $y = 23,77 + 0,46x$ ($r=0,999$); onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mol l^{-1} de solução tampão fosfato, pH 7,5.; volumes de amostra e luminol: 264 e 290 μl , respectivamente.

TABELA 2.1 – Interferência apresentada pelo metanol, propanol-1, sulfito e ácido ascórbico

Interferente	Concentração ^a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Razão etanol / interferente	Sinal (mV) Média ^b \pm Sd	Erro Relativo (%)
Metanol	0	-	112,3 \pm 0,9	-
	0,1	1000	112,4 \pm 0,8	0,1
	1	100	112,9 \pm 0,9	0,5
	10	10	137,9 \pm 1,0	23,0
Propanol-1	0	-	111,3 \pm 1,2	-
	10	10	111,7 \pm 0,9	0,4
	100	1	135,2 \pm 1,2	21,5
Sulfito	0	-	112,2 \pm 0,9	-
	1	100	112,1 \pm 0,8	- 0,1
	10	10	106,2 \pm 1,4	- 5,3
	100	1	89,8 \pm 0,9	- 20,0
Ácido ascórbico	0	-	111,9 \pm 0,6	-
	1	100	111,9 \pm 0,4	- 0,1
	10	10	110,0 \pm 0,2	- 2,0
	100	1	96,5 \pm 1,1	- 14,0

^a adição de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de etanol ; ^b n = 3

Após otimização das condições operacionais para desenvolvimento da reação enzimática, o sistema apresentou uma relação linear caracterizada pela equação $S \text{ (mV)} = 47,3 + 0,32 \mu\text{g ml}^{-1}$ de etanol ($r=0,998$); numa faixa de concentração de etanol de 25 a 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de etanol; coeficiente de variação 1,1% ($n = 15$) para uma solução de referência contendo 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de etanol; consumo de reagentes de: 0,27 mg de luminol e 0,54 mg de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ por determinação e frequência analítica de 54 determinações por hora, considerando-se o tempo despendido na troca da amostra.

2.5.7. Diluição em linha

A concentração de etanol nos vinhos, em geral, encontram-se na faixa de 11 a 12% (v/v). O sistema proposto apresentou resposta linear entre 25 e 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0,003 a 0,05 % (v/v)) etanol. Assim sendo, a aplicação de amostras reais no referido sistema demandou uma diluição prévia das amostras. Em busca desse objetivo foram estudadas várias estratégias de diluição da amostra empregando-se módulos de análise em fluxo com diferentes conformações.

As Figuras 2.12, 2.13 e 2.14 apresentam os diferentes módulos de análises que foram testados. Como se pode observar, os módulos propostos tinham por base a configuração da Figura 2.4, na qual foram feitos todos os estudos de otimização.

Na Figura 2.12, uma alíquota da amostra foi inserida em um fluxo de água pelo acionamento da válvula V_1 , passando por uma bobina (B_1), construída com tubo de Teflon[®] (1,6 mm d.i) que proporcionava maior diluição devido à dispersão. Em seguida, através do acionamento da válvula V_2 , a amostra diluída foi inserida no fluido transportador, onde passava pela coluna enzimática e recebia os reagentes pelo acionamento das válvulas V_3 e V_4 .

Na Figura 2.13, foi colocada uma válvula para o fluido transportador, que mantinha o fluxo em direção ao detector. No momento da amostragem, a amostra era aspirada, pelo acionamento das válvulas V_1 , V_2 e V_4 , e o fluxo do transportador desviado até a bobina B_2 . A zona da amostra ficava retida na bobina de reação B_1 , sendo inserida no fluido transportador, através do acionamento das válvulas V_1 e V_3 , passando pelo reator enzimático. Em seguida, recebia por confluência as soluções dos reagentes, acionando-se as válvulas V_5 e V_6 , respectivamente. Com esta configuração, foi possível aplicar o conceito de reamostragem^{**},⁹⁰ obtendo-se o sinal analítico para diferentes tempos de deslocamento da zona da amostra, onde foi possível escolher o melhor tempo de deslocamento para execução da análise com uma única amostragem.

^{**} Do inglês: Zone-sampling

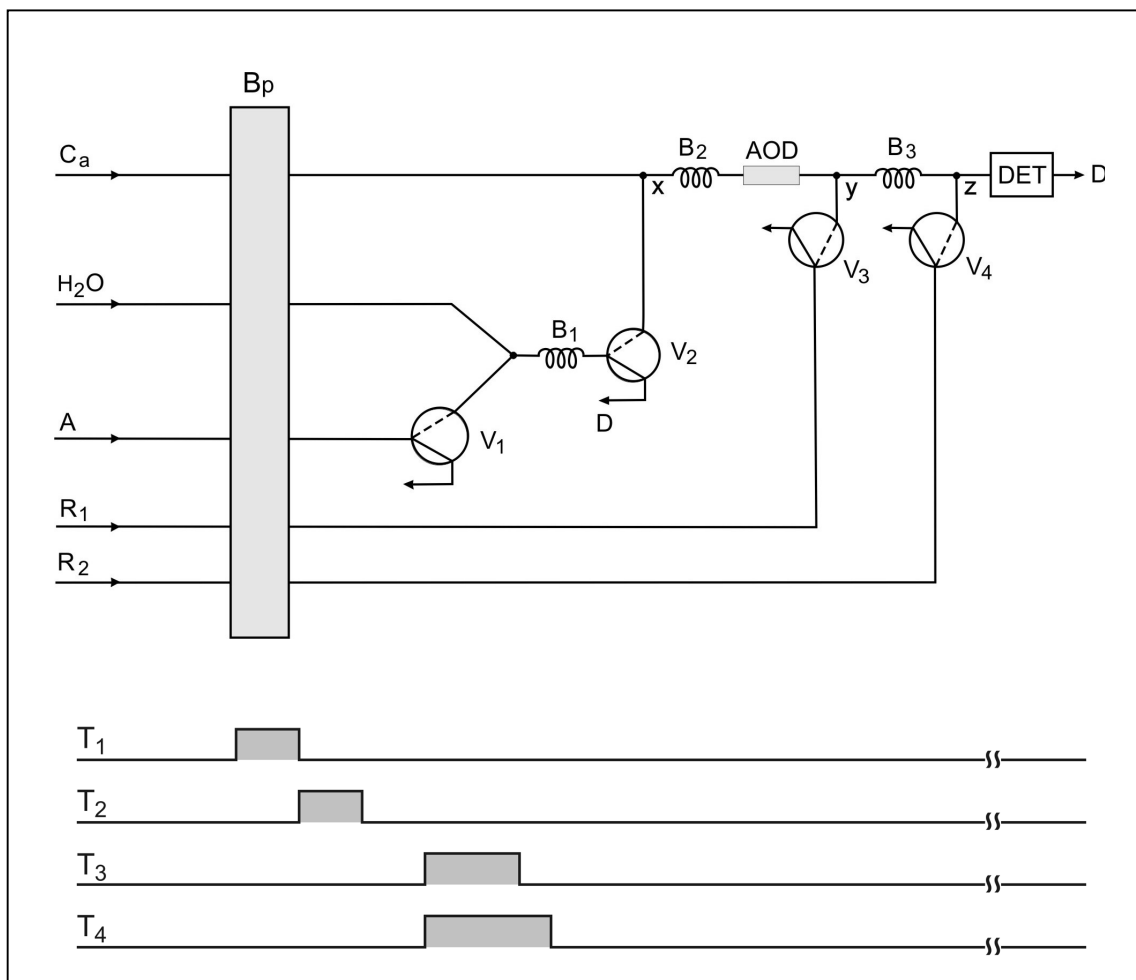


FIGURA 2.12 – Diagrama de fluxos do módulo de análise para diluição em linha. **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l^{-1} de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min^{-1} ; **A** – amostra, $0,320 \text{ ml min}^{-1}$; **R₁** – solução $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** – bobina de reação de 50 cm de Tubo de Teflon[®] (1,6 mm d.i.) **B₂** e **B₃** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃** e **T₄** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

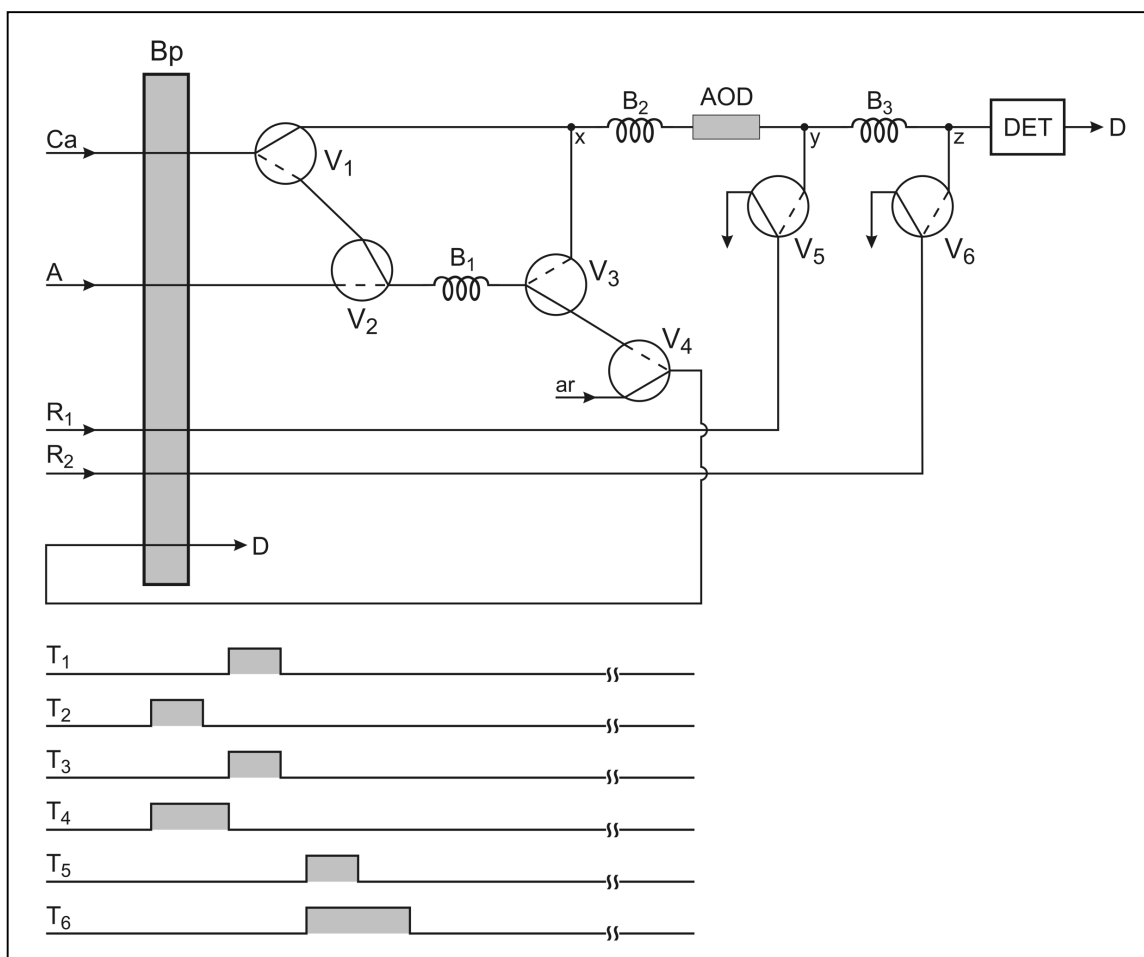


FIGURA 2.13 – Diagrama de fluxos do módulo de análise para diluição em linha baseado no conceito de reamostragem. **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l⁻¹ de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min⁻¹; **A** – amostra, 0,320 ml min⁻¹; **R₁** – solução 4,5 mmol l⁻¹ de luminol, 1 ml min⁻¹; **R₂** – solução 50 mmol l⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], 1 ml min⁻¹; **B₁** – bobina de reação de 50 cm de Tubo de Teflon[®] (1,6 mm d.i.) **B₂** e **B₃** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄**, **V₅** e **V₆** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃**, **T₄**, **T₅** e **T₆** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄**, **V₅** e **V₆**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

Com essas configurações vários estudos foram realizados em busca da otimização dos sistemas, trabalhando-se com soluções de referência de etanol na faixa de concentração encontrada nos vinhos. Porém observou-se a dificuldade na limpeza do percurso da amostragem, causando efeito de memória, que afetava a precisão das medidas. Para minimizar este problema foi necessário tempo de limpeza muito longo, na troca da amostra, que influenciava desfavoravelmente a frequência analítica.

Visando solucionar os problemas encontrados com os módulos de análises descritos anteriormente, testes foram feitos com um sistema híbrido de análise em fluxo, composto por um injetor comutador e válvulas solenóides, mostradas na Figura 2.14. A amostra foi aspirada, acionando-se a válvula V_2 e transportada pelo fluxo de água, passando pela bobina de dispersão (B_1) onde ocorria a diluição, preenchendo a alça de amostragem (L). Uma alíquota da amostra diluída, contida na alça de amostragem, foi inserida no fluido transportador. Acionando-se a válvula V_1 , deslocava-se a amostra em direção ao detector, passando pelo reator enzimático e em seguida, recebia por confluência as soluções dos reagentes, acionando-se das válvulas V_3 e V_4 , respectivamente.

Este sistema apresentou melhores resultados que os anteriormente estudados, porém o problema da repetibilidade das medidas continuou, apresentando um coeficiente de variação na faixa de 3,5% a 4,5%, relativamente alto, considerando-se outros procedimentos em fluxo proposto na literatura para este analito na referida matriz.^{19,33,49-52} No decorrer dos estudos realizados observou-se que a precisão do sistema sofria forte influência da coluna enzimática, isto é, ao longo do uso ocorria a compactação das esferas de vidro que provocava um aumento da impedância hidrodinâmica e, conseqüentemente, um aumento da pressão no sistema, proporcionando um refluxo que afetava a inserção do volume da amostra. A incidência deste comportamento foi verificada quanto maior a vazão do sistema.

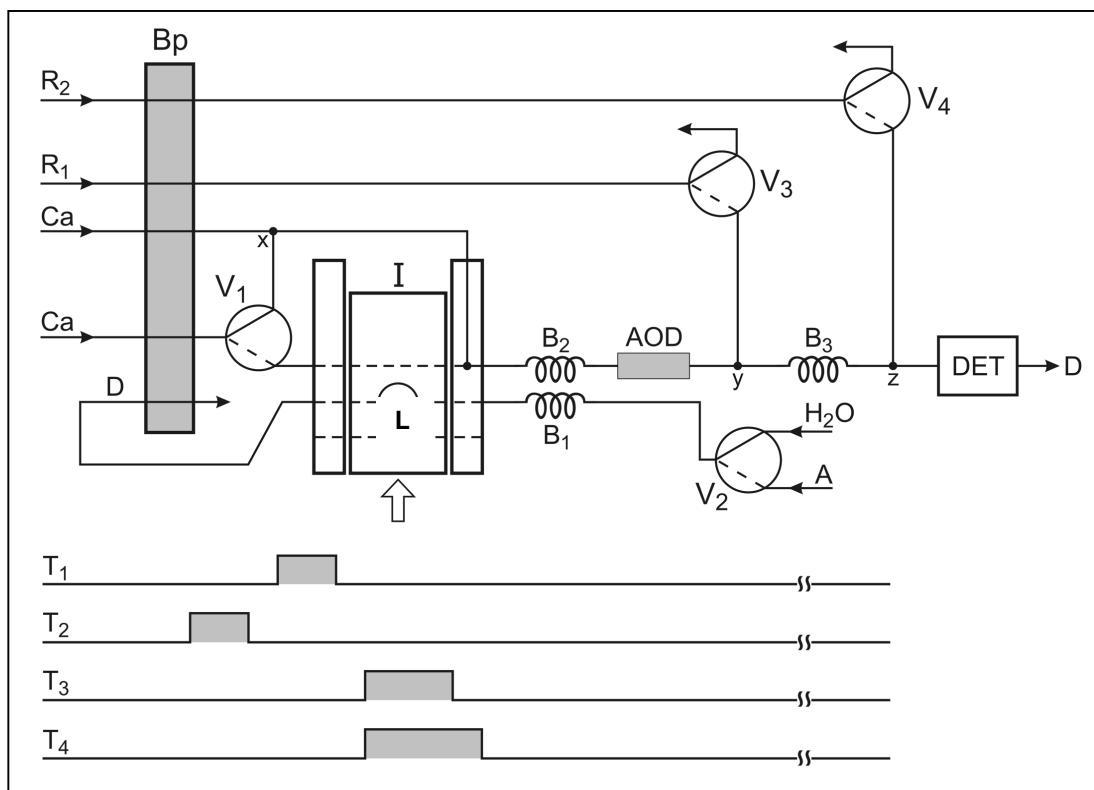


FIGURA 2.14 – Diagrama de fluxos do módulo de análise usando sistema híbrido para determinação de etanol. **I** - injetor comutador; **L** – alça de amostragem.; **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l⁻¹ de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min⁻¹; **A** – amostra, 0,320 ml min⁻¹; **R₁** – solução 4,5 mmol l⁻¹ de luminol, 1 ml min⁻¹; **R₂** – solução 50 mmol l⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], 1 ml min⁻¹; **B₁** – bobina de reação de 50 cm de Tubo de Teflon[®] (1,6 mm d.i.) **B₂** e **B₃** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄**, – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃** e **T₄** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃** e **V₄**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

Após avaliação dos resultados obtidos empregando os sistemas descritos anteriormente e considerando as dificuldades operacionais dos mesmos, utilizou-se módulo de análise descrito na Figura 2.15. Nesta configuração, foram empregadas cinco válvulas solenóides, incluindo uma para a solução transportadora e outra para descarte da zona da amostra, permitindo a escolha da zona da amostra a ser reamostrada.⁹⁰ A inserção da amostra no fluido transportador foi feita através do acionamento das válvulas V_1 e V_2 ; em seguida, as válvulas foram desligadas proporcionando à dispersão da zona da amostra pelo reator B_1 e posterior descarte pelo acionamento da válvula V_3 . Após alguns segundos, V_3 foi desligada, permitindo a inserção de uma alíquota da amostra diluída no percurso analítico, transportada através da enzima imobilizada e recebendo os reagentes pelo acionamento de V_4 e V_5 . A estratégia utilizada foi favorável, permitindo a diluição em linha, sendo possível otimizar o sistema com soluções referência na faixa de 2,5 a 30 % (v/v) de etanol.

Com o objetivo de minimizar o volume de amostra a ser inserido no fluxo transportador, utilizou-se um tubo de Tygon de menor vazão para amostra ($320 \mu\text{l min}^{-1}$). Para atenuar o efeito da impedância hidrodinâmica, através do *programa computacional* de controle, o bombeamento foi interrompido e diminuiu-se a rotação da bomba peristáltica para o mínimo possível ($0,21 \mu\text{l s}^{-1}$), onde foi efetuada a etapa de amostragem. Em seguida, a válvula V_3 foi acionada para descarte da zona da amostra de maior concentração; e posteriormente desligada, para deslocamento da zona da amostra no percurso analítico.

Com o objetivo de selecionar a zona da amostra dispersa, correspondente à diluição desejada, foi realizado um estudo variando-se o tempo de deslocamento da amostra na bobina B_1 . Os sinais analíticos apresentados na Figura 2.16 representam o perfil da dispersão da zona da amostra em diferentes tempos de deslocamento. Para cada tempo de deslocamento, repetia-se toda a seqüência para determinação de etanol. Variou-se o tempo de deslocamento da zona da amostra na bobina reação B_1 de 1 a 37 s, com incremento de tempo de 3s. O tempo de deslocamento escolhido foi de 25,0 s, relativo ao registro h .

Neste estudo verificou-se a necessidade da definição do volume de amostra diluída a ser inserido no percurso analítico, pois o desligamento da válvula V_3 , após o tempo hábil para a diluição da amostra, ocorria na formação de picos duplos causados pela dispersão da zona da amostra remanescente no percurso analítico. Para melhor definição do sinal analítico, optou-se por um tempo fixo de 3,0

s, seguido de um novo descarte, pelo acionamento da válvula V_3 , aplicando-se rotação máxima da bomba peristáltica ($75 \mu\text{l s}^{-1}$).

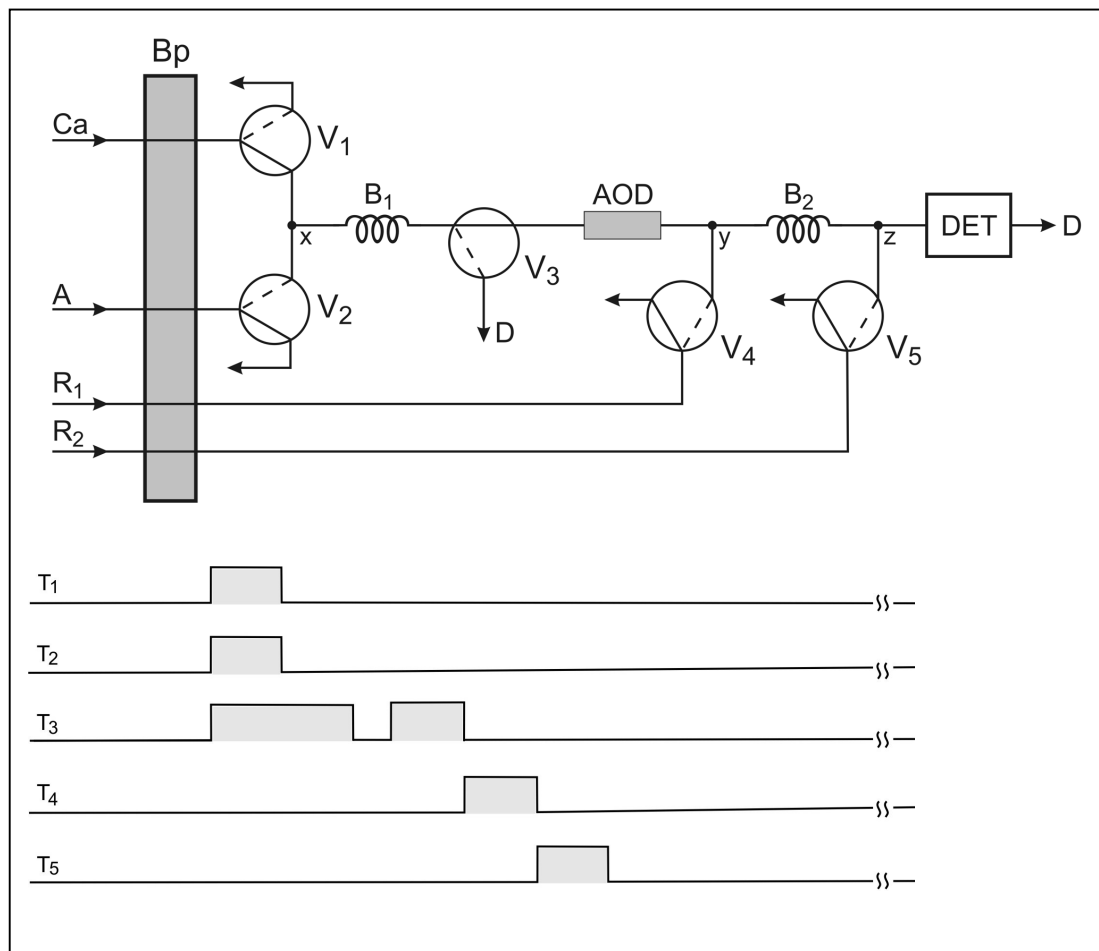


FIGURA 2.15 – Diagrama de fluxos do módulo de análise usando sistema híbrido para determinação de etanol. **Ca** – solução transportadora (solução 100 mmol l^{-1} de tampão fosfato, pH 7,5), 2 ml min^{-1} ; **A** – amostra, $0,320 \text{ ml min}^{-1}$; **R₁** – solução $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ de luminol, 1 ml min^{-1} ; **R₂** – solução 50 mmol l^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 ml min^{-1} ; **B₁** e **B₂** – bobinas de reação, 50 e 20 cm, respectivamente; **AOD** – coluna enzimática; **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄** e **V₅** – válvulas solenóides; **x**, **y**, **z** – pontos de confluência; **Bp** – Bomba peristáltica; **Det** – detector; **D** – recipiente de descarte. **T₁**, **T₂**, **T₃**, **T₄** e **T₅** – diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóides **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄** e **V₅**. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

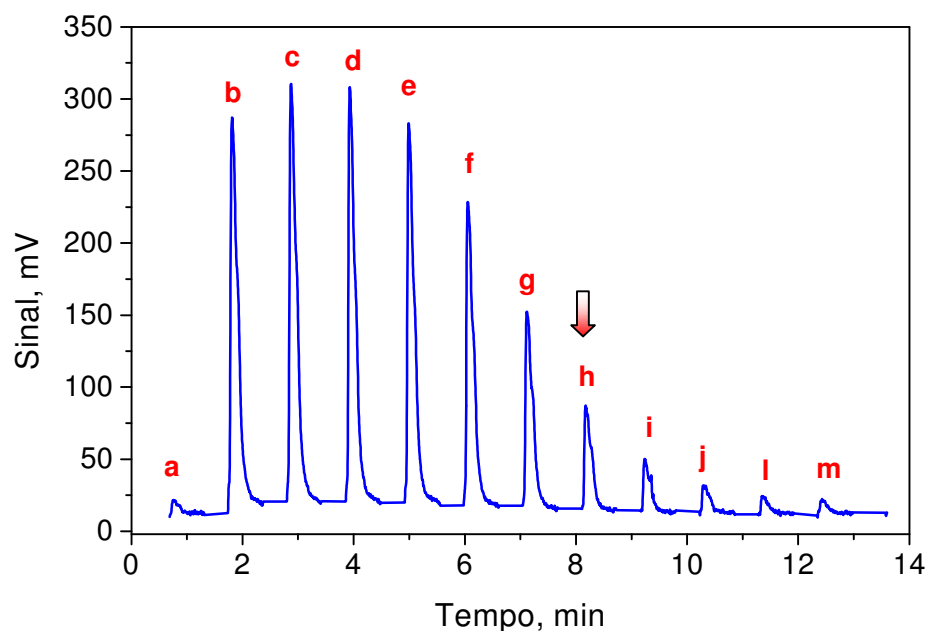


FIGURA 2.16 – Sinais transientes obtidos com o sistema da FIGURA 2.15 empregando uma solução de referência 10% (v/v) etanol. Incremento do tempo de deslocamento: 3s.

O conjunto de estratégias adotadas foi favorável, permitindo a diluição em linha, sendo possível otimizar o sistema com soluções referência de etanol na faixa de 2,5 a 30% (v/v). Na Tabela 2.2 encontra-se a seqüência das etapas empregadas para determinação de etanol em vinhos. Os resultados obtidos após a otimização foram: uma relação linear caracterizada pela equação $\text{Sinal (mV)} = (20 \pm 1) + (7,8 \pm 0,3) C$, onde C é a concentração de etanol expressa em %; apresentando coeficiente de correlação igual a 0,9974, numa faixa de concentração de etanol de 2,5 a 25% (v/v); coeficiente de variação 1,8% ($n = 10$) para uma amostra de vinho apresentando 11% (v/v) de etanol; consumo de reagentes de: 0,27 mg de luminol e 0,54 mg de $K_3Fe(CN)_6$ por determinação; consumo de amostra: 2 μL por determinação; um limite de detecção estimado em nível de 99,7% ($k=3$)⁹¹ de 0,3% (v/v); e freqüência analítica de 25 determinações por hora, considerando-se o tempo despendido na troca da amostra.

TABELA 2.2 – Seqüência das etapas para determinação de etanol em vinhos

Etapa	Vazão	Descrição						Tempo
	$\mu\text{l s}^{-1}$		V_1^*	V_2^*	V_3^*	V_4^*	V_5^*	(s)
1	-	Parada do fluxo e redução da vazão	0	0	0	0	0	12
2	0,21	Amostragem	1	1	1	0	0	10
3	33	Deslocamento e descarte 1	0	0	1	0	0	25
4	33	Deslocamento da amostra	0	0	0	0	0	3
5	75	Descarte 2	0	0	1	0	0	10
6	17	Inserção luminol e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0	0	0	1	1	17
7	17	Inserção de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0	0	0	0	1	6
9	33	Tempo de limpeza	0	0	0	0	0	10

* 0 = válvula desligada; 1 = válvula acionada

2.5.8. Determinação de etanol em amostras de vinho

Após otimização das variáveis experimentais, o sistema foi aplicado em amostras de vinho de mesa tinto, branco e rosê. Na Figura 2.17 encontram-se os sinais transientes obtidos com soluções de referência e algumas amostras.

Os resultados obtidos foram comparados com o Método Oficial da AOAC, 920.57, conforme demonstrado na Tabela 2.3. Aplicou-se o *teste t com múltiplas amostras*,⁹² cujo resultado ($t\text{-exp.} = 0,299$, $t\text{-calc.} = 1,833$), não apresentou diferença significativa em nível de 90% de confiança e nove graus de liberdade.

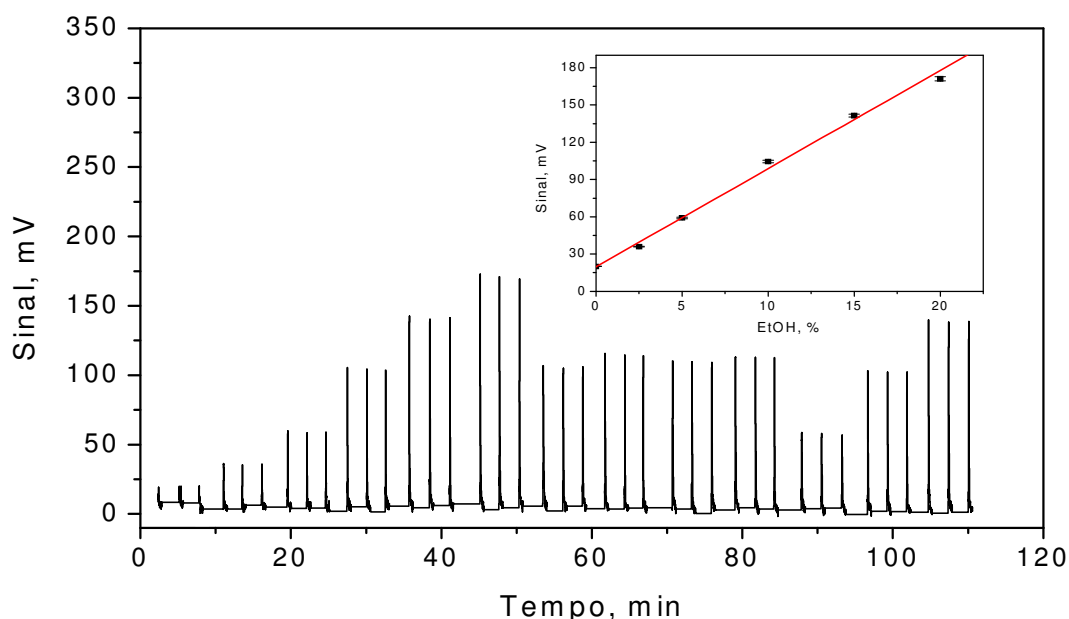


FIGURA 2.17 – Registro dos sinais transientes obtidos com o sistema da FIGURA 2.15. Da esquerda para a direita: sinais correspondem ao branco, soluções de referência de etanol a 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 % (v/v), seguidos de quatro amostras de vinho e de soluções de referência de etanol a 5,0; 10 e 15 % (v/v). Curva analítica apresentando seguinte equação: $y = 19,76 + 7,89x$, onde y = sinal em mV; x = concentração de etanol em % (v/v).

TABELA 2.3 – Comparação dos resultados do teor de etanol em amostras de vinhos

Amostra	Método Proposto ¹ , Etanol, % (v/v) ¹	Método de referência ¹ , Etanol, % (v/v) ¹
1 ^a	10,8 ± 0,3	10,75 ± 0,05
2 ^b	11,4 ± 0,1	11,39 ± 0,05
3 ^b	11,9 ± 0,1	11,90 ± 0,05
4 ^b	12,0 ± 0,1	11,99 ± 0,05
5 ^c	11,8 ± 0,3	11,85 ± 0,05
6 ^b	11,8 ± 0,2	11,82 ± 0,05
7 ^b	12,7 ± 0,3	12,65 ± 0,05
8 ^b	11,9 ± 0,1	11,99 ± 0,05
9 ^b	12,9 ± 0,1	12,76 ± 0,05
10 ^b	12,8 ± 0,1	12,76 ± 0,05

¹ n = 3 ± desvio padrão

^a Vinho rosé ; ^b Vinho tinto; ^c Vinho branco.

2.6. CONCLUSÃO

O sistema em fluxo proposto para determinação de etanol em vinho empregando multicomutação e detecção por quimiluminescência apresentou um bom desempenho analítico, permitindo a determinação do analito em amostras sem tratamento prévio, efetuando diluição em linha, sem intervenção do operador. A reação enzimática mostrou-se apropriada, devido à seletividade da enzima, visto a composição química da matriz, minimizando o efeito dos possíveis interferentes ao procedimento proposto. Nos primeiros trinta dias de uso, o emprego da enzima imobilizada em esferas de vidro apresentou com perda gradativa de sinal, chegando ao máximo de 30%. Após este período, manteve-se estável, apresentando vida útil por *ca* 3 meses, com uso freqüente, resultando em *ca* 1500 determinações. Ao mesmo tempo o procedimento proposto mostrou-se adequado para a determinação de etanol em outras matrizes contendo concentrações tanto ao nível de $\mu\text{g ml}^{-1}$ quanto ao nível de porcentagem.

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICEROL EM VINHOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

3.1 - INTRODUÇÃO

Em termos quantitativos, o glicerol ($\text{CH}_2\text{OH-CHOH-CH}_2\text{OH}$) é o terceiro constituinte dos vinhos, a seguir à água e ao etanol. Sua formação ocorre durante a fase inicial da fermentação alcoólica e, no geral, a quantidade formada depende do teor de açúcares do mosto, da natureza das leveduras presentes no meio e das condições em que se realiza a fermentação.⁹³ Sua determinação em vários estágios do processo de vinificação é uma importante informação que está direta ou indiretamente relacionada com o controle de qualidade.⁹⁴

Tendo em consideração a sua expressão quantitativa, a presença de glicerol nos vinhos exerce uma influência assimilável nas características sápidas, contribuindo para o gosto “doce”.⁹⁵

O doseamento de glicerol é freqüentemente aplicado na aferição da genuinidade de vinhos doces naturais, onde ocorre a fermentação parcial dos açúcares do mosto. Segundo RIBÉREAU-GAYON *et al.*, uma relação de glicerol/etanol superior a 10 - 11% constitui uma indicação quase certa de adição fraudulenta de glicerol.⁹⁶

Nesse sentido, a quantificação de glicerol é um importante fator de controle de qualidade dos vinhos. A OIV adota como método de referência para o doseamento de glicerol um método analítico clássico,²⁰ baseado na oxidação do glicerol pelo ácido periódico e detecção colorimétrica a 480 nm por intermédio da sua reação com o 1,3,5-benzenotriol. Um método enzimático empregando as enzimas *glicerol kinase* e *glicerol fosfato desidrogenase* é recomendado pela OIV como método usual. A determinação de glicerol por cromatografia líquida proposta por CAPUTI *et al.*,⁹⁷ foi adotado como método oficial da AOAC.²¹

A exemplo de outras áreas, o uso da cromatografia tem se apresentado como uma poderosa técnica de análise aplicada em laboratórios de rotina para fins enológicos. A vasta pesquisa que tem sido desenvolvida nesta área é justificável em

virtude da técnica apresentar a capacidade de quantificação simultânea de várias espécies, dentre as quais encontra-se o glicerol.⁹⁸⁻¹¹⁵

Ainda tratando-se de técnica multielementar, alguns trabalhos têm sido propostos para detecção, quantificação e/ou classificação dos compostos presentes no vinho empregando a espectrometria de infravermelho.¹¹⁶⁻¹¹⁹ Em trabalho recente, NIEUWOUDT *et al.* usaram análise de componente principal - PCA^{††} para identificação e classificação de amostras de vinho fora dos padrões (*outlier*) empregando glicerol como modelo de calibração.¹¹⁶

Em 1999, HERMANN empregou espectroscopia de ressonância magnética usando razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ através de glicerol de diferentes origens para detectar adulterações em alimentos e comprovar a autenticidade de vinhos.¹²⁰

Grande parte dos procedimentos analíticos para a quantificação de glicerol em vinhos emprega análise em fluxo com diferentes técnicas de detecção, descritas a seguir.

Métodos potenciométricos usando eletrodo seletivo a íon foram propostos por GERVASIO *et al.* para determinação de glicerol em bebidas destiladas¹²¹ e por LUCA *et al.*, aplicando em amostras de vinho.¹²²

No que se refere ao emprego da quimiluminescência na quantificação de glicerol, a literatura demonstra que os procedimentos estão intrinsecamente ligados ao uso de enzimas imobilizadas.¹²³⁻¹²⁷ Nesse caso, a enzima mais viável seria a *glicerol oxidase*,^{128,129} visto que o produto da conversão enzimática gera peróxido de hidrogênio, entretanto a referida enzima não se encontra disponível comercialmente. Desta forma, os procedimentos propostos fazem uso da combinação das enzimas *glicerol desidrogenase* e *NADH oxidase* ou das enzimas *glicerol kinase* e *glicerol-3-fosfato oxidase*.

Em face da complexidade da composição química dos vinhos, o uso de reações enzimáticas tem sido uma alternativa bastante aplicada na determinação de diferentes analitos. Nesse contexto, destaca-se a construção de biossensores utilizados, principalmente, no monitoramento de glicerol na produção do vinho.¹³⁰⁻¹³⁵

Sistemas em fluxo aplicando a determinação simultânea de etanol e glicerol em vinhos têm sido propostos por alguns autores. Nesses casos a determinação de glicerol se deu via reação enzimática com a *glicerol desidrogenase*,

^{††} Do inglês: Principal Component Analysis

imobilizada em esferas de vidro. O produto da reação foi monitorado por fluorimetria^{50,76} a λ_{ex} 340 nm e λ_{em} 460 nm ou espectrofotometria⁵³ a 340 nm. A mesma reação havia sido utilizada anteriormente por outros autores.^{68,134-136}

Nos laboratórios de controle de qualidade, é comum a determinação de glicerol através de reações enzimáticas empregando *kits* disponíveis comercialmente. O procedimento é manual e os referidos *kits* apresentam uma quantidade de solução para um número limitado de determinações. Em busca da redução do consumo da solução enzimática, KRONKA *et al.*¹³⁷ propuseram um procedimento em fluxo usando multicomutação para determinação de glicerol no produto da fermentação alcoólica do caldo de cana. Os autores reportaram como vantagens uma redução do consumo de solução enzimática e geração de efluente estimada em 96 e 97%, respectivamente.

Sob as vantagens concernentes ao processo de multicomutação, neste trabalho é proposto um procedimento em fluxo para determinação de glicerol em vinhos através do uso de enzima imobilizada e detecção espectrofotométrica, aplicado-o em amostras sem tratamento prévio.

3.2 – PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 - Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico empregando água purificada (condutividade menor que 0,1 $\mu\text{S cm}^{-1}$).

A solução tampão carbonato usada foi preparada a partir de uma solução 100 mmol l^{-1} de K_2CO_3 , ajustando-se o pH para 9,5 com solução 100 mmol l^{-1} de HCl.

A *glicerol desidrogenase* (GDH, 76 U mg^{-1} , EC 1.1.1.6 da *Cellulomonas sp.*, ref. G-3512), e as esferas de vidro em aminopropil (porosidade: 170Å, 200-400mesh, ref. G-4518) foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, USA).

Solução 2,5% (m/v) de glutaraldeído foi preparada a partir de uma solução de glutaraldeído 25% (m/v) fornecida pela Merck (Schuchardt, Germany) por diluição apropriada em 0,1 mol l⁻¹ de tampão fosfato, pH 7,0.

Solução 6 mmol l⁻¹ de NAD⁺ (β-nicotinamida adenina dinucleotídeo, ref. N-7381) foi preparada diariamente dissolvendo-se 99,5 mg do reagente em uma solução 0,1 mol l⁻¹ tampão carbonato, pH 9,5, completando-se o volume para 25 ml.

Solução estoque de 20,0 g l⁻¹ de glicerol foi preparada pesando-se 11,5 g de glicerol a 87% (m/v) e diluindo-se para 500 ml com água. As soluções de referência foram preparadas a partir de diluições sucessivas da solução estoque.

As soluções transportadoras empregadas para o estudo de força iônica foram preparadas a partir de uma solução 100 mmol l⁻¹ de K₂CO₃, acrescentando-se sulfato de amônio ou sulfato de potássio na concentração desejada e ajustando-se o pH para 9,5, com solução 100 mmol l⁻¹ de HCl.

Um kit enzimático para determinação de glicerol em alimentos fornecido pela Boehringer Mannheim/R-Biopharm (ref.148270) foi empregado como método de referência para determinação de glicerol em vinho.

Amostras de vinhos tintos e brancos foram compradas no comércio local e analisadas sem tratamento prévio.

3.2.2 - Materiais

3.2.2.1 - Equipamentos e Acessórios

O módulo de análise foi construído empregando tubos de polietileno (0,8 mm d.i.). As confluências e a coluna enzimática foram feitas em acrílico. Na inserção das soluções foram empregadas válvulas solenóides de três vias (Nresearch 161T031). A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Ismatec IPC-8. Um microcomputador 386, equipado com uma interface eletrônica (Advantech, PCL 711S) e programa computacional escrito em linguagem QuickBASIC 4.5 foi empregado para o controle do módulo de análise e para o monitoramento dos sinais.

Um espectrofotômetro UV-Vis modelo 700 plus Femto equipado com uma cela de quartzo Hellma (10 mm de caminho óptico, 80 μ l de volume interno) foi empregado para detecção.

O artefato usado para promover a diluição da amostra, apresentado na Figura 3.1, consistiu de uma folha de poliéster com dimensões de 40 x 30 mm e 0,2 mm de espessura instalado entre dois blocos de acrílico. Para evitar vazamentos das soluções, o conjunto foi fixado com quatro parafusos.

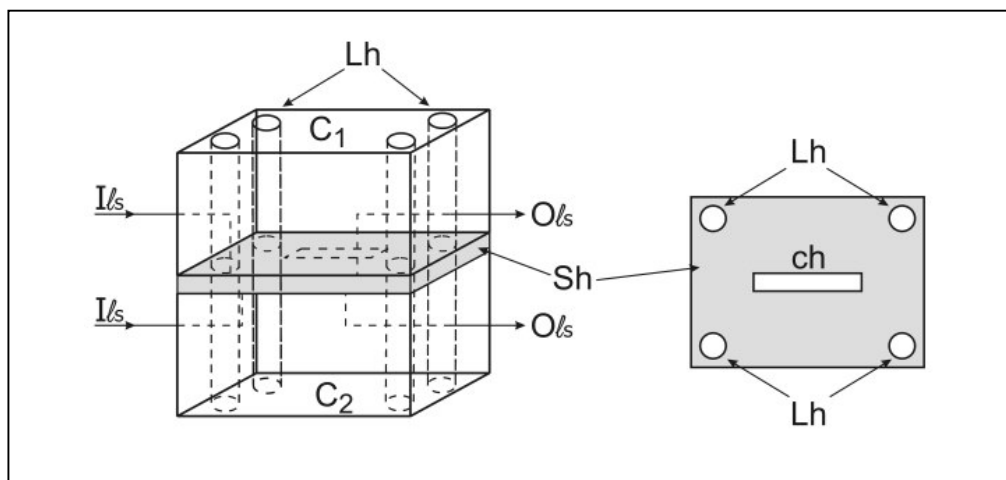


FIGURA 3.1 - Vista do artefato empregado para diluição da amostra. C_1 and C_2 = blocos de acrílico, dimensões 40 x 30 x 20 mm, Lh = furos de passagem dos parafusos, I_s and O_s = entrada e saída das soluções, respectivamente; Sh = folha de poliéster, dimensões 40 x 30 mm e 0,2 mm de espessura, ch = canal de amostragem, dimensão 10,0 mm de comprimento x 1,0 mm de largura.

3.2.3 - Metodologia

O procedimento para determinação de glicerol foi baseado na reação enzimática, cujo esquema encontra-se na Figura 3.2, onde a enzima *glicerol desidrogenase* na presença do cofator NAD^+ catalisa a reação de oxidação do glicerol produzindo dihidroxiacetona e NADH. A concentração de NADH produzido é diretamente proporcional à concentração de glicerol e pode ser monitorada por espectrofotometria, fluorimetria e amperometria.

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ na sua forma oxidada) é um composto de dois nucleotídeos unidos através dos seus grupos fosfatos por uma ligação de anidrido de ácido fosfórico. A coenzima sofre redução reversível do anel nicotinamida. Quando uma molécula sofre oxidação, liberando dois átomos de

hidrogênio, a forma oxidada do nucleotídeo (NAD⁺) recebe um hidreto (:H⁻, o equivalente de um próton e dois elétrons) e é transformada na sua forma reduzida (NADH). O segundo H⁺ removido da molécula é liberado para o solvente aquoso. Na abreviação NADH, o H representa este íon hidreto adicionado e também deixa clara a perda de uma carga positiva quando H⁻ é adicionado à forma oxidada. A principal função do NAD⁺ é captar os elétrons resultantes da oxidação de um substrato, assim o NAD⁺ sofre redução, passando para NADH, o qual conserva a energia livre liberada pela oxidação deste substrato.¹³⁸

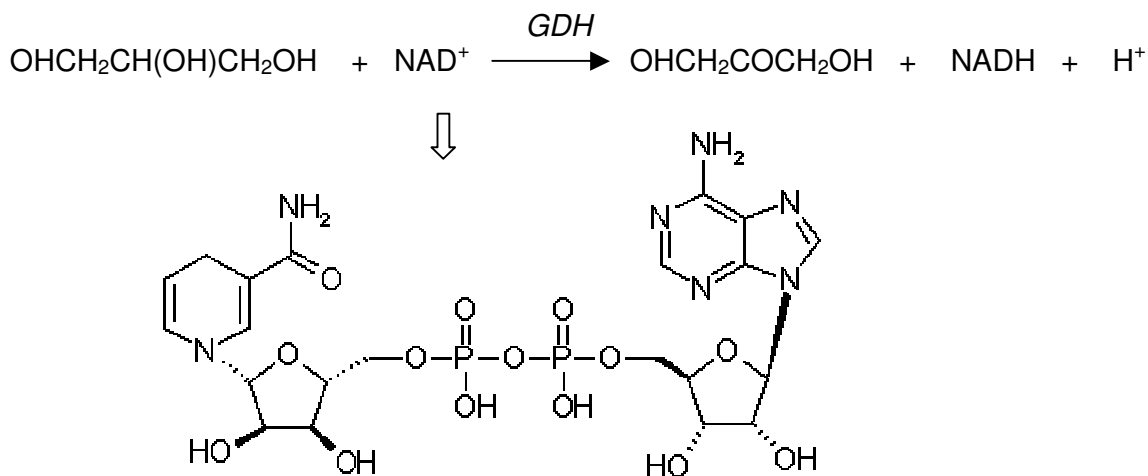


FIGURA 3.2 – Esquema simplificado da reação de oxidação do glicerol na presença da enzima GDH e do cofator NAD⁺. Fórmula estrutural do NAD⁺.

3.2.4 - Procedimentos

3.2.4.1 - Imobilização da Enzima

A *glicerol desidrogenase* foi imobilizada em esferas de vidro com porosidade controlada (CPG) de modo análogo ao descrito anteriormente no item 2.2.4.1, para a *álcool oxidase*. Neste caso, devido à enzima apresentar-se na forma sólida, 17 mg \approx 1000 unidades, dissolveu-se o conteúdo total em 1ml de solução tampão fosfato, considerando-se como solução estoque, que foi mantida sob

refrigeração à 4 °C. Para cada imobilização, empregou-se 100 µl da referida solução enzimática.

3.2.4.2 - Sistema de Análise em Fluxo

No sistema de análise em fluxo empregado na determinação de glicerol, representado na Figura 3.3, empregou-se quatro válvulas solenóides V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , responsáveis pela inserção das soluções transportadora, amostra, reagente e descarte, respectivamente.

A exemplo dos estudos de otimização descritos no Capítulo II, primeiramente, efetuaram-se estudos para avaliação da resposta da enzima imobilizada. Neste caso, o sistema em fluxo não apresentava o diluidor da amostra (Sd) nem a válvula V_4 . A amostra foi inserida no percurso analítico no ponto de confluência x , juntamente com o reagente (NAD^+). Durante a inserção da zona da amostra a válvula V_1 permaneceu acionada e a solução transportadora foi desviada do percurso analítico (SV_1). Em seguida, o acionamento alternado das válvulas V_2 e V_3 permitiram a inserção das alíquotas das soluções da amostra (S) e do reagente (R) formando o ciclo de amostragem. Terminado o ciclo de amostragem, V_1 foi desligada e a zona da amostra deslocada para o detector, passando pela coluna enzimática onde ocorreu a reação de oxi-redução e formação do NADH e monitoramento a 340 nm. A avaliação do sistema foi feita utilizando-se soluções de referência com concentração de glicerol na faixa 200 a 1000 µg ml⁻¹.

Posteriormente, verificou-se a necessidade da diluição da amostra e utilizou-se a configuração da Figura 3.3. Durante a etapa de amostragem, acionaram-se as válvulas V_1 , V_2 e V_4 , proporcionando o deslocamento da solução da amostra pelo canal de amostragem seguindo para o descarte (D). Manteve-se a válvula V_4 acionada e desligaram-se as demais, promovendo a dispersão da amostra. Logo após, todas as válvulas foram desligadas e a solução transportadora voltou a fluir, deslocando a fração remanescente da amostra no percurso analítico. A seguir, inseriu-se o reagente, através do acionamento da válvula V_3 , produzindo a uma mistura prévia da amostra e do reagente antes da reação enzimática. Nestas condições trabalhou-se com soluções de referência de glicerol na faixa de 2,0 a 10,0 g l⁻¹.

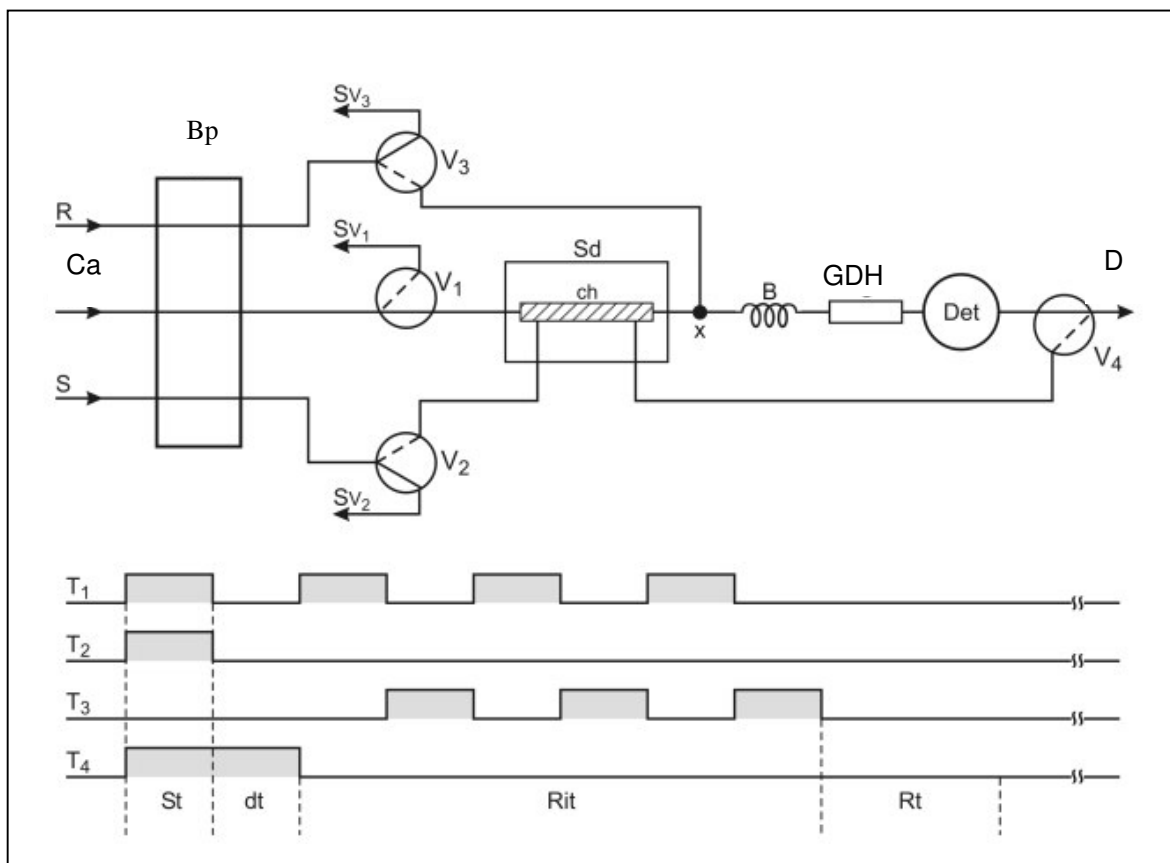


FIGURA 3.3 – Diagrama de fluxos do sistema para determinação de glicerol. **Bp** - bomba peristáltica; **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄** - válvulas solenóides; **Sd** - diluidor da amostra; **x** - confluência; **B** – bobina de reação (50 cm); **GDH** - coluna enzimática; **Det** - espectrofotômetro a 340 nm; **Ca** -solução transportadora, 100 mmol l⁻¹ tampão carbonato (pH 9.5), 2.0 ml min⁻¹; **S** - amostra, 0,32 ml min⁻¹; **R** - solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺, 1.0 ml min⁻¹; **Sv₁**, **Sv₂**, **Sv₃** - recuperação das soluções da amostra e do NAD⁺, respectivamente; **D** - descarte; **ch** - canal de amostragem. **T₁**, **T₂**, **T₃** e **T₄** - diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóide **V₁**, **V₂**, **V₃**, **V₄**; **St**, - inserção da amostra, **dt** - tempo de diluição, **Rit** = inserção do reagente, **Rt** = leitura do sinal. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

3.2.4.2.1 - Otimização dos Parâmetros Experimentais

Estudos preliminares foram feitos com o objetivo de selecionar a melhor forma de inserção das soluções da amostra e do reagente. Em seguida, definiram-se as melhores condições com relação à vazão, concentração hidrogeniônica da solução transportadora, concentração da solução tampão e do reagente, volumes de inserção da amostra e reagente.

Experimentos para definir o volume das soluções da amostra e do reagente foram realizados mantendo-se a válvula V_1 acionada e o ciclo de amostragem repetido oito vezes. O volume da solução da amostra a ser inserido foi definido variando-se o intervalo de tempo de acionamento da válvula V_2 entre 0,5 a 2,0 s, correspondente aos volumes de 3,0 a 11 μl , respectivamente, e mantendo-se a válvula V_3 acionada por 2,0 s (33 μl), proporcionando um excesso de reagente. De modo análogo, para definição do volume de inserção do reagente, manteve-se a válvula V_2 acionada por 1,0 s e variou-se o tempo de acionamento de V_3 de 0,5, a 2,0 s, relativos aos respectivos volumes de 8,5 a 33 μl .

A concentração de glicerol nos vinhos é superior a faixa de resposta linear do método baseado na reação enzimática. Assim, fez-se necessário uma etapa de diluição da amostra que foi alcançada empregando-se artefato mostrado na Figura 3.1, onde se acionou as válvulas V_1 , V_2 e V_4 para o preenchimento do canal de amostragem (ch). Logo após, manteve-se V_4 ligada, promovendo um descarte de parte da amostra e conseqüente diluição. Em seguida, efetuou-se o ciclo de amostragem, acionando-se as válvulas V_1 e V_3 , alternadamente.

Para verificar a capacidade operacional do sistema foram realizados experimentos utilizando soluções de referência de glicerol com concentrações na faixa de 2,0 a 20,0 g l^{-1} e variou-se o intervalo de tempo para descarte (dt) de 1,0 a 3,0 s. Definidos os parâmetros experimentais, aplicou-se o sistema na determinação de glicerol em vinhos.

3.2.4.3 – Método Comparativo

O método de referência para glicerol em vinho foi feito usando o kit comercial. As medidas foram feitas com amostras previamente diluídas (1 + 99) em água, de acordo com procedimento “*Determinação de glicerol em vinhos*” descrito no manual do fabricante.¹³⁹ Após a mistura dos reagentes, esperou-se um tempo de 15 minutos para efetuar a leitura da absorbância. Passado este tempo, caso a reação não atingisse o equilíbrio, efetuava-se a leitura a cada 2 minutos até obtenção de duas leituras constantes.

O princípio do método baseia-se nas reações esquematizadas na Figura 3.4.¹⁴⁰ O glicerol sofre reação de fosforilação com 5'-trifosfato de adenosina (ATP), catalisada pela enzima *glicerolkinase* (GK) produzindo L-glicerol-3-fosfato e 5'-difosfato de adenosina (ADP) - Equação 1. O ADP é reconvertido em ATP através da reação com o fosfoenolpiruvato (PEP) sob ação da enzima *piruvatokinase* (PK), formando piruvato (Equação 2). Catalisada pela enzima *L-lactato desidrogenase* (L-LDH), o piruvato é reduzido a L-lactato pelo NADH, com a oxidação do NADH a NAD⁺ (Equação 3). A quantidade de NADH oxidado é estequiometricamente proporcional à concentração de glicerol. O produto final da reação foi medido pelo decréscimo da absorbância em 340 nm.

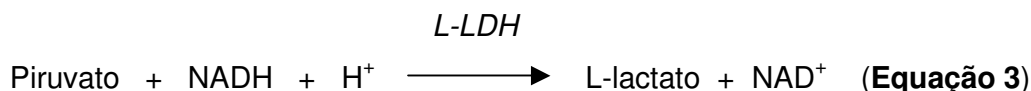
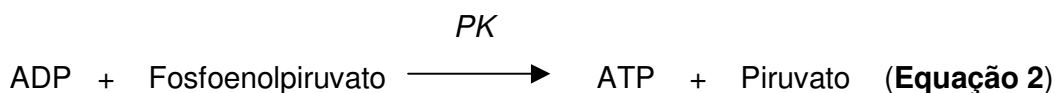
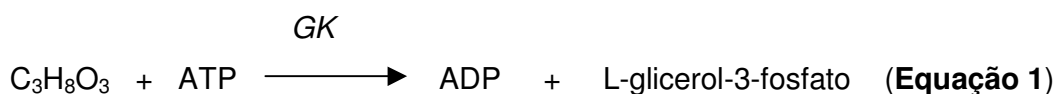


FIGURA 3.4 – Esquema simplificado das reações enzimáticas envolvidas na determinação de glicerol usando kit comercial.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta seção referem-se aos estudos realizados para otimização do sistema proposto. Alguns estudos como temperatura e interferentes não foram realizados, fundamentando-se em resultados contidos na literatura.

Segundo CANIZARES e LUQUE DE CASTRO,¹³⁵ o aumento da temperatura favorece o sinal analítico. Porém temperaturas acima de 35 °C, há uma perda de sinal e desnaturação da enzima. A maioria dos procedimentos propostos anteriormente trabalha em temperatura do laboratório, ca 20 °C, sem prejuízo do desenvolvimento da reação enzimática. Neste trabalho, os experimentos foram realizados em laboratórios onde a temperatura foi mantida por ar refrigerado.

No que concerne à influência dos potenciais interferentes, estudos anteriores revelaram que devido à diluição necessária para aplicação do método em amostras reais, estes não apresentaram diferença significativa.⁵⁰

3.3.1 - Formas de Inserção

Os procedimentos em fluxo propostos anteriormente para determinação de glicerol utilizaram diferentes formas de inserção da amostra e reagente.^{52,53,136} A *Glicerol desidrogenase* não possui atividade própria, necessita de um cofator; no caso, o NAD⁺.⁷ Deste modo, a forma de inserção do NAD⁺ possui uma enorme importância na sensibilidade do método. Alguns procedimentos utilizaram o NAD⁺ contínuo,⁵³ isto é, a amostra foi inserida em um fluxo contínuo de reagente para posterior reação enzimática; outros optaram pelo uso do NAD⁺ de forma intermitente,⁵² conduzindo a um menor consumo de reagente. Esta estratégia é bastante favorável haja vista o custo relativamente alto, US\$ 649.20 / 12 g*, deste reagente.

O produto da oxidação do glicerol dá origem ao NADH que absorve em 340 nm, todavia, o NAD⁺ também apresenta absorção neste comprimento de onda. Os procedimentos que adotaram o uso do reagente contínuo desconsideram esta

* Valor fornecido pela LabCenter, representante comercial da Sigma, em 06/07/2004

absorção, proporcionando uma leitura de branco praticamente nula. Quando se utiliza o NAD⁺ intermitente tem-se uma leitura de branco relativa à absorção do reagente, influenciando na sensibilidade do método. MATSUMOTO *et al.* avaliaram e compararam três formas de mistura do NAD⁺/amostra: pré-mistura, sanduíche (A/R/A), inserção A/R em único ciclo.¹³⁶ Com a obtenção dos resultados, concluíram que a pré-mistura promoveu a melhor resposta, porém requer um gasto excessivo de reagente. A amostragem sanduíche revelou ser a segunda melhor alternativa, apresentando uma eficiência de mistura de 91%.

Deste modo, fazendo-se uso da multicomutação, preliminarmente avaliaram-se diferentes formas de inserção de NAD⁺ buscando-se a melhor condição para o desenvolvimento do procedimento proposto. Foram avaliadas as inserções em ciclo único: A/R, amostragem sanduíche: A/R/A e R/A/R; e fracionamento da zona da amostra, seguindo modelo da amostragem binária.¹¹ Para esta estimativa, manteve-se o volume final de 48 µl de amostra e 204 µl de reagente, aplicando-se as diferentes estratégias. Nos resultados mostrados na Figura 3.5, pode-se observar que a condição que apresentou maior sensibilidade foi aquela em que se empregou inserção da zona da amostra fracionada em diferentes ciclos de amostragem. A partir destes resultados, os demais experimentos foram realizados empregando-se 6 ciclos de amostragem introduzindo volumes da amostra e de reagente 8 e 34 µl, para cada ciclo, respectivamente.

3.3.2 - Efeito da Vazão

Considerando-se a importância da vazão no desenvolvimento da reação enzimática, realizou-se o estudo do efeito da vazão sobre a reação estudada. Os resultados, mostrados na Figura 3.6, revelam que o aumento da vazão proporcionou um aumento na leitura do branco, referente à absorção do NAD⁺. A variação da vazão não representou em ganho significativo de sensibilidade, no entanto em favor da frequência analítica escolheu a vazão de 2 ml min⁻¹ para dar prosseguimento ao trabalho.

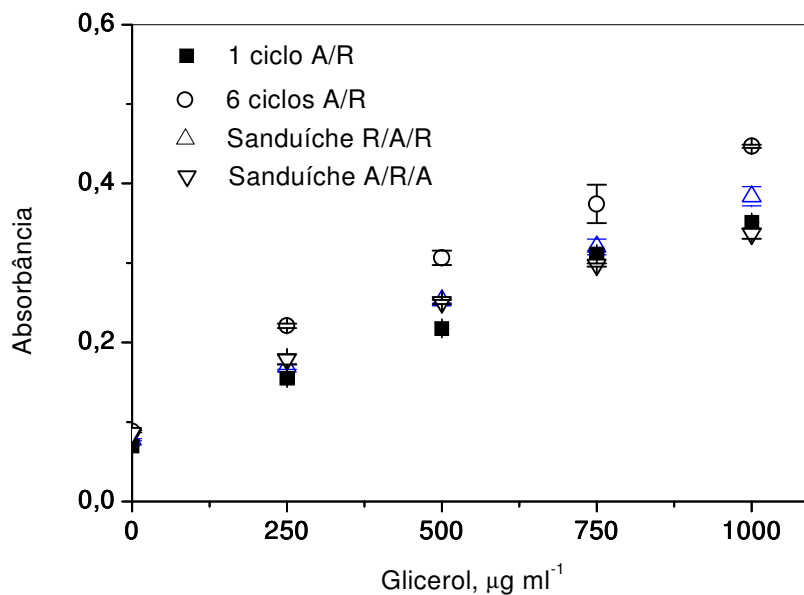


FIGURA 3.5 – Influência das diferentes formas de inserção amostra/reagente. **A** – amostra; **R** – reagente. Modos de inserção e suas respectivas equações: ■ 1 ciclo: $y = 0,077 + 2,88 \times 10^{-4}x$ ($r=0,993$); ● 6 ciclos: $y = 0,0975 + 3,55 \times 10^{-4}x$ ($r=0,998$); ▲ Sanduíche R/A/R: $y = 0,0784 + 3,39 \times 10^{-4}x$ ($r=0,994$); ▼ Sanduíche A/R/A: $y = 0,105 + 2,48 \times 10^{-4}x$ ($r=0,984$) onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 50 mmol l^{-1} de solução tampão carbonato, pH 9,0.; volumes da amostra e da solução $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ : 48 e 204 μl , respectivamente.

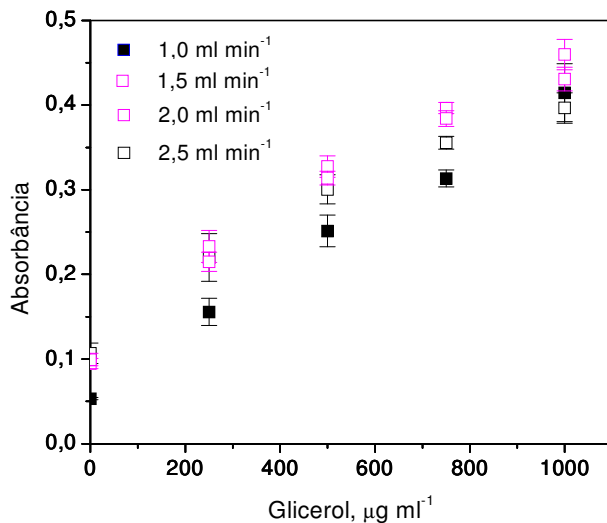


FIGURA 3.6 – Influência da variação da vazão do sistema no desenvolvimento da reação. Valores das vazões e suas respectivas equações: ■ 1,0 ml min⁻¹: $y = 0,053 + 3,55 \times 10^{-4}x$ ($r=0,996$); ■ 1,5 ml min⁻¹: $y = 0,112 + 3,59 \times 10^{-4}x$ ($r=0,988$); ■ 2,0 ml min⁻¹: $y = 0,100 + 3,95 \times 10^{-4}x$ ($r=0,996$); ■ 2,5 ml min⁻¹: $y = 0,118 + 3,10 \times 10^{-4}x$ ($r=0,989$), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 50 mmol l⁻¹ de solução tampão carbonato, pH 9,0.; volumes da amostra e da solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺: 48 e 204 μl , respectivamente, fracionados em 6 ciclos de amostragem.

3.3.3 - Efeito da Composição do Tampão

Estudos anteriores reportaram que o uso de tampão carbonato produz uma melhor resposta analítica para a reação enzimática empregando GDH imobilizada.^{50,136} Deste modo, os estudos com relação à composição da solução tampão foram concernente à avaliação das concentrações de HCO₃⁻ e a concentração hidrogeniônica. O efeito da concentração hidrogeniônica foi estudado variando-se o pH de 8,0 a 10,0 e mantendo-se a concentração do tampão carbonato em 50 mmol l⁻¹ conforme recomenda a literatura.⁵²

Para verificar o efeito da concentração hidrogeniônica da solução tampão sobre a reação foram obtidas curvas analíticas em diferentes valores de pH, conforme mostra a Figura 3.7. Os resultados revelam um aumento proporcional da

sensibilidade com o pH. Entretanto, quando foi empregado tampão carbonato, pH 10, após consecutivas determinações observou-se uma grande instabilidade da coluna enzimática caracterizada pela perda acentuada da magnitude do sinal (ca 60%), sugerindo uma possível desnaturação da enzima. Comportamento semelhante foi observado por SEGUNDO e RANGEL.⁵² Por conseguinte, escolheu-se o pH 9,5 como compromisso entre a estabilidade da enzima e a sensibilidade. Nestas condições a coluna enzimática apresentou estabilidade e uma vida útil em torno de três meses, com uso freqüente, sem perda significativa do sinal.

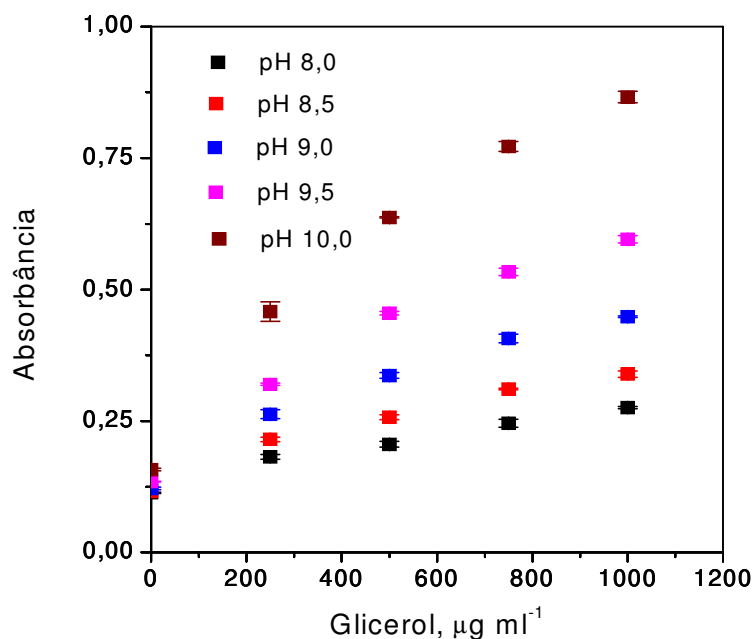


FIGURA 3.7 – Influência da variação da concentração hidrogeniônica da solução transportadora tampão carbonato 50 mmol l^{-1} , no desenvolvimento da reação enzimática. Valores de pH e suas respectivas equações: ■ pH 8,0: $y = 0,115 + 1,62 \times 10^{-4}x$ ($r=0,995$); ■ pH 8,5: $y = 0,139 + 2,17 \times 10^{-4}x$ ($r=0,976$); ■ pH 9,0: $y = 0,129 + 3,21 \times 10^{-4}x$ ($r=0,985$); ■ pH 9,5: $y = 0,136 + 5,74 \times 10^{-4}x$ ($r=0,989$); ■ pH 10,0: $y = 0,170 + 9,19 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$) onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Volumes da amostra e da solução $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ : 48 e 204 μl , respectivamente, fracionados em 6 ciclos de amostragem.

A concentração do tampão foi avaliada variando-se a concentração de HCO_3^- entre 10 e 200 mmol l^{-1} , mantendo-se o pH em 9,5, previamente definido. Na Figura 3.8 são apresentadas as curvas analíticas obtidas com diferentes concentrações de HCO_3^- , onde se observa um aumento de sensibilidade para determinação de glicerol até uma concentração do tampão de 100 mmol l^{-1} de HCO_3^- . As concentrações maiores não apresentaram diferença significativa. Logo, adotou-se a solução contendo 100 mmol l^{-1} de HCO_3^- como solução transportadora de trabalho.

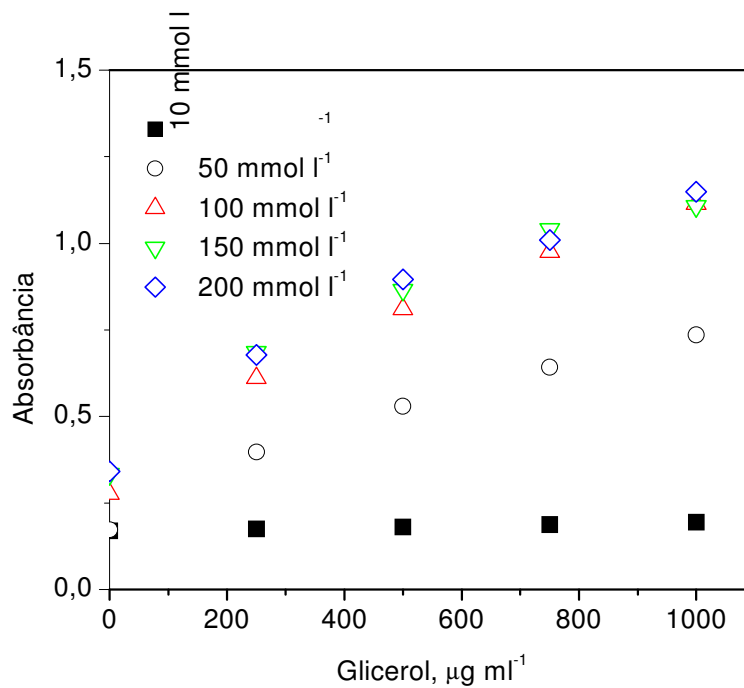


FIGURA 3.8 – Influência da concentração da solução tampão carbonato, pH 9,5 no desenvolvimento da reação. Valores das concentrações e suas respectivas equações: ■ 10 mmol l^{-1} : $y = 0,170 + 2,48 \times 10^{-5}x$ ($r=0,997$); ● 50 mmol l^{-1} : $y = 0,221 + 5,48 \times 10^{-4}x$ ($r=0,983$); ▲ 100 mmol l^{-1} : $y = 0,349 + 8,15 \times 10^{-4}x$ ($r=0,983$); ▼ 150 mmol l^{-1} : $y = 0,426 + 7,61 \times 10^{-4}x$ ($r=0,967$); ◆ 200 mmol l^{-1} : $y = 0,425 + 7,78 \times 10^{-4}x$ ($r=0,974$) onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Volumes da amostra e da solução $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ : 48 e 204 μl , respectivamente, fracionados em 6 ciclos de amostragem.

3.3.4 - Estudo do Volume da Amostra

Sabendo-se que a amostra contém o substrato para conversão enzimática, faz-se imprescindível o estudo do volume da solução da amostra para avaliar a sensibilidade do sistema proposto. Manteve-se 6 ciclos de amostragem, volume de reagente de 204 μl e variou-se o volume de inserção da solução da amostra entre 18 e 66 μl .

Ainda que as curvas analíticas demonstrem uma tendência assíntota, como mostra a Figura 3.9, este estudo demonstrou que se obtinha um ganho de sensibilidade à proporção que se aumentou o volume da solução da amostra. Este comportamento foi observado até o volume de 48 μl , a partir deste, os resultados convergiram a um valor constante, evidenciando que atingiu a estequiometria da reação, relativo a capacidade de conversão da enzima imobilizada, isto é, a saturação do centro ativo da enzima. Selecionou-se o volume de 33 μl para prosseguir com o trabalho tendo em vista que volumes maiores não representaram ganho significativo de sensibilidade.

3.3.5 - Estudo do Volume de NAD^+

Após a definição do volume de inserção da solução da amostra foram realizados experimentos para definição do volume de inserção da solução do reagente. Os resultados encontram-se na Figura 3.10. Variou-se o volume de solução do reagente de 51 a 204 μl , manteve-se o uso de 6 ciclos e os demais parâmetros já estabelecidos. Deste modo, foi observado um aumento da leitura do branco relacionado ao acréscimo do volume de solução de reagente inserido. Por conseguinte, o estudo revelou que o uso de volume acima de 102 μl não representou ganho de sensibilidade, entretanto escolheu-se o volume de 150 μl por apresentar maior tendência a linearidade.

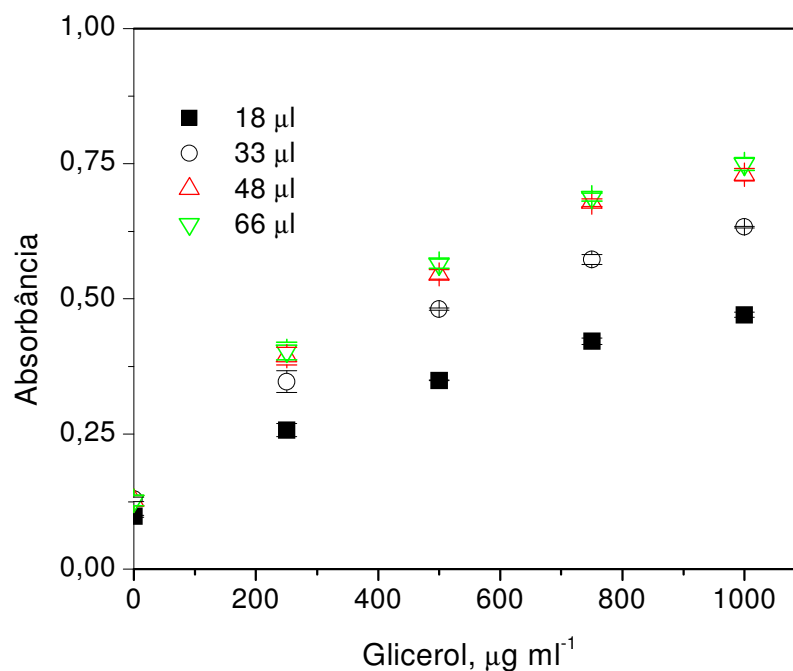


FIGURA 3.9 – Influência da variação do volume de amostra. Valores dos volumes e suas respectivas equações: ■18 µl: $y = 0,114 + 4,63 \times 10^{-4}x$ ($r=0,983$); ●33 µl: $y = 0,227 + 4,19 \times 10^{-4}x$ ($r=0,960$); ▲48 µl: $y = 0,178 + 6,40 \times 10^{-4}x$ ($r=0,973$); ▼66 µl: $y = 0,181 + 6,54 \times 10^{-4}x$ ($r=0,973$), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mmol l^{-1} de solução tampão carbonato, pH 9,5; volume da solução $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ : 204 µl. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem.

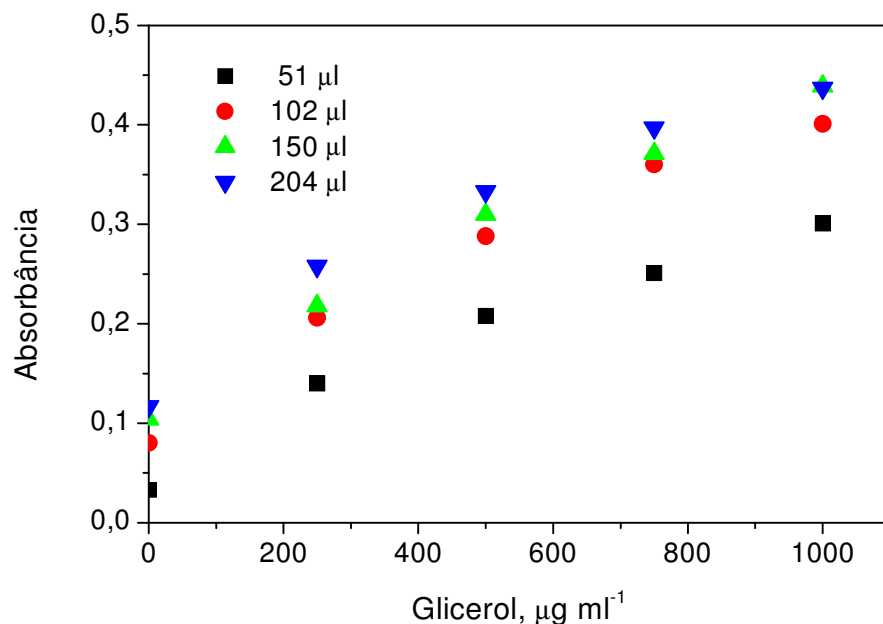


FIGURA 3.10 – Influência da variação do volume da solução de NAD^+ $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ inserido. Valores dos volumes e suas respectivas equações: ■ $51 \mu\text{l}$: $y = 0,057 + 2,58 \times 10^{-4}x$ ($r=0,981$); ● $102 \mu\text{l}$: $y = 0,108 + 3,18 \times 10^{-4}x$ ($r=0,981$); ▲ $150 \mu\text{l}$: $y = 0,123 + 3,29 \times 10^{-4}x$ ($r=0,991$); ▼ $204 \mu\text{l}$: $y = 0,153 + 3,11 \times 10^{-4}x$ ($r=0,972$), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Solução transportadora: 100 mmol l^{-1} de solução tampão carbonato, pH 9,5; volume da amostra $33 \mu\text{l}$. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem.

3.3.6 - Estudo da Concentração do NAD^+

Devido à cinética da reação enzimática da GDH ser dependente do NAD^+ , foi estudado o comportamento da reação em decorrência da variação da concentração do NAD^+ . MATOS *et al.* relataram que o uso de concentrações abaixo de $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ não apresentou resultados satisfatórios para o desenvolvimento da reação enzimática.⁵⁰ Assim sendo, variou-se a concentração de NAD^+ de 4 a 10 mmol l^{-1} . Conforme os resultados apresentados na Figura 3.11, pode-se observar um aumento na magnitude dos sinais em consequência do aumento da concentração do cofator. Entretanto ressalta-se que, comparando-se as curvas **b** e **d** com a curva **a**, a concentração do cofator aumentou 1,5 e 2,5 vezes,

enquanto o acréscimo de sinal foi de ca 25% e 30%, respectivamente. Neste caso, considerando-se que o aumento da concentração não representou um ganho significativo na sensibilidade, optou-se pelo uso da concentração de 6 mmol l⁻¹ de NAD⁺.

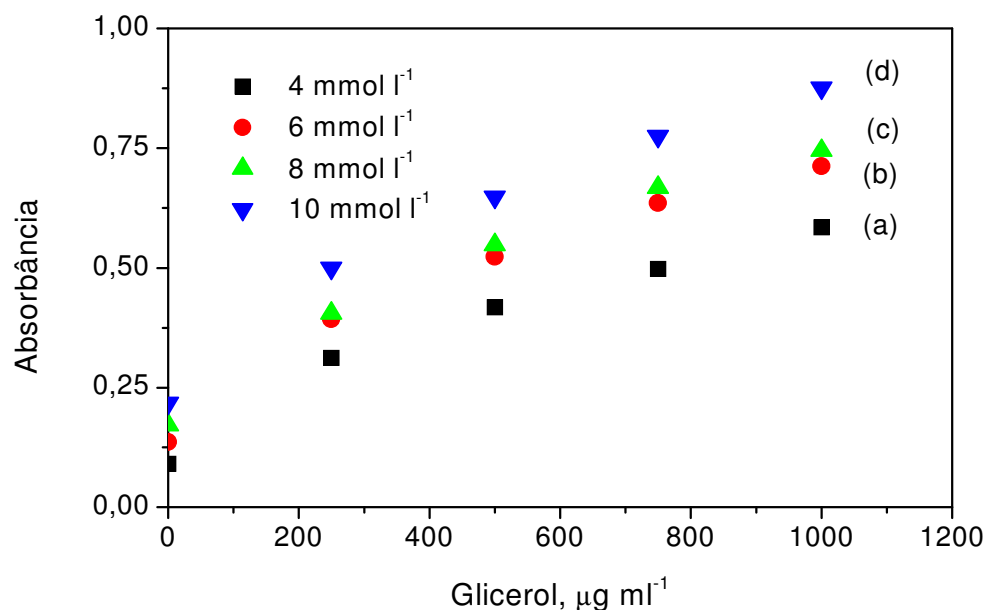


FIGURA 3.11– Influência da variação da concentração do NAD⁺ no desenvolvimento da reação enzimática. Valores das concentrações e suas respectivas equações: ■ 4 mmol l⁻¹: $y = 0,146 + 4,70 \times 10^{-4}x$ ($r=0,973$); ● 6,0 mmol l⁻¹: $y = 0,201 + 5,58 \times 10^{-4}x$ ($r=0,972$); ▲ 8,0 mmol l⁻¹: $y = 0,225 + 5,64 \times 10^{-4}x$ ($r=0,980$); ▼ 10,0 mmol l⁻¹: $y = 0,285 + 6,36 \times 10^{-4}x$ ($r=0,977$), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em µg ml⁻¹. Solução transportadora: 100 mmol l⁻¹ de solução tampão carbonato, pH 9,5; volumes da amostra e da solução 6,0 mmol l⁻¹ de NAD⁺: 33 e 150 µl, respectivamente. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem.

3.3.7 – Efeito da Força Iônica

Dentre os vários fatores que afetam as reações enzimáticas, encontra-se a força iônica. A presença de íons pode influenciar algumas reações enzimáticas positivamente ou negativamente. Estudos anteriores revelaram que a presença de

cátions monovalentes tais como NH_4^+ , Ti^+ , K^+ e Rb^+ ativam a enzima GDH do *Aerobacter aerogenes*.^{141,142} Posteriormente, BOYER¹⁴³ e BERGMAYER¹⁴⁴ reportaram que os íons K^+ e NH_4^+ atuam como ativadores enquanto o íon Na^+ atua como inibidor das reações enzimáticas.

Nesse sentido, MATSUMOTO *et al.* investigaram o efeito dos íons amônio e potássio e revelaram que a adição de 30 mmol l⁻¹ de sulfato de amônio ou sulfato de potássio numa solução tampão carbonato aumentou a resposta da coluna enzimática, contendo enzima GDH do *Enterobacter aerogenes*, em 10 vezes, quando comparado com o mesmo tampão sem a presença do cátion monovalente.¹³⁶ Nesse estudo constataram que o efeito do íon NH_4^+ foi superior ao do íon K^+ , proporcionando maior estabilidade para a enzima imobilizada.

Em 1995, CANIZARES e LUQUE DE CASTRO divulgaram que há um ganho na magnitude do sinal analítico proporcional à concentração de sulfato de amônio adicionado à solução tampão glicina quando usaram GDH do *Bacillus megaterium*.¹³⁶ Este aumento ocorre até a concentração de 0,1 mol l⁻¹ de sulfato de amônio. Acima deste valor o sinal analítico tende a decrescer devido à inibição da enzima com o aumento da força iônica, que causa dificuldade para o substrato reagir com os sítios ativos.

Em busca de condições que promovessem o maior desenvolvimento de reação, partiu-se para a avaliação do efeito da força iônica na reação enzimática estudada. Adicionaram-se diferentes concentrações de sulfato de amônio à solução de tampão carbonato e construiu-se diferentes curvas analíticas. A Figura 3.12, revela que apesar dos trabalhos previamente citados apresentarem respostas positivas a adição de cátions monovalentes, os estudos realizados não demonstraram diferença significativa na sensibilidade da reação na presença de diferentes concentrações de NH_4^+ . Comportamento semelhante foi obtido com a adição do íon K^+ . Tendo em vista que a GDH empregada neste estudo provém da *Cellulomonas sp*, os resultados obtidos sugerem que o estudo da força iônica nas reações enzimáticas possa ser influenciado pela origem da enzima.

Com base nestes resultados empregou-se solução de tampão carbonato sem adição de cátions, a exemplo de outros procedimentos presentes na literatura.^{50,52,53}

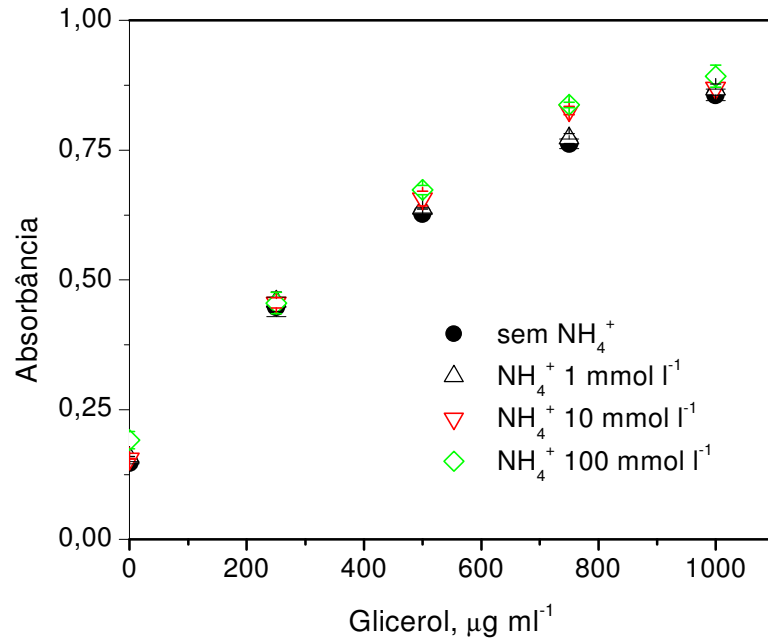


FIGURA 3.12 – Efeito da força iônica na reação enzimática. Curvas analíticas obtidas com uso da solução tampão carbonato 100 mmol l^{-1} , pH 9,5, sem e com adição de concentrações crescentes de sulfato de amônio. Solução transportadora com diferentes forças iônicas e suas respectivas equações: ● sem NH_4^+ : $y = 0,161 + 9,19 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$); ▲ NH_4^+ 1 mmol l^{-1} : $y = 0,170 + 9,19 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$); ▼ NH_4^+ 10 mmol l^{-1} : $y = 0,232 + 7,20 \times 10^{-4}x$ ($r=0,968$); ◆ NH_4^+ 100 mmol l^{-1} : $y = 0,256 + 7,69 \times 10^{-4}x$ ($r=0,980$), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Volumes da amostra e da solução $6,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de NAD^+ : 33 e $150 \mu\text{l}$, respectivamente. Valores dos volumes referentes aos 6 ciclos de amostragem.

3.3.8 – Estudo do Número de Ciclos

Nos parâmetros experimentais empregados nos estudos descritos nos itens anteriores estabeleceram-se 6 ciclos de amostragem. Para finalizar a otimização do sistema foram realizados experimentos com diferentes ciclos de amostragem, avaliando-se o comportamento do sistema. Estudou-se a variação do número de ciclos de 4 a 10, que se encontra demonstrado na Figura 3.13. À medida que se aumentou o número de ciclos de amostragem foi observado um ganho de

sensibilidade e linearidade. Tal comportamento foi observado até um número de 8 ciclos. Nesta condição o volume total da zona da amostra foi de *ca* 250 μl , igual ao volume da bobina de mistura, o que significa ter alcançado a condição de volume infinito. Sendo esta a melhor condição alcançada, adotou-se o uso de 8 ciclos de amostragem, mantendo-se a relação 1:5 das soluções de amostra - reagente.

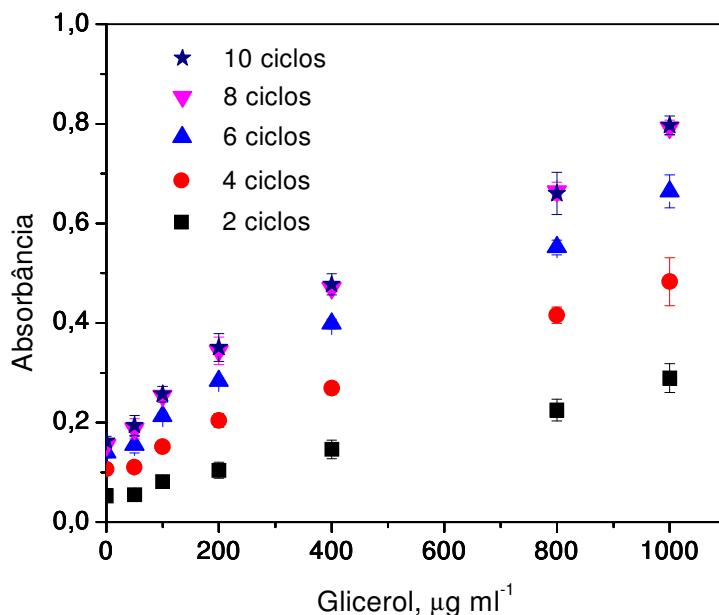


FIGURA 3.13 – Influência da variação do número de ciclo de amostragem. Número de ciclos e suas respectivas equações: ■ 2 ciclos: $y = 0,045 + 2,35 \times 10^{-4}x$ ($r=0,936$); ● 4 ciclos: $y = 0,104 + 3,99 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$); ▲ 6 ciclos: $y = 0,162 + 5,32 \times 10^{-4}x$ ($r=0,986$); ▼ 8 ciclos: $y = 0,161 + 6,8 \times 10^{-4}x$ ($r=0,992$), ★ 10 ciclos: $y = 0,175 + 6,37 \times 10^{-4}x$ ($r=0,994$), onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Com a definição dos parâmetros experimentais observou-se que o sistema não demonstrou resposta linear para faixa de concentração estudada, 50 a 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, apresentando um comportamento polinomial definido pela equação: $Y = 0,103 \pm 0,006 + (4,993 \pm 0,001)X + (1,79 \times 10^{-5} \pm 0,21 \times 10^{-5})X^2$ ($R^2 = 0,999$), onde Y e X são absorbância e concentração de glicerol em $\mu\text{g ml}^{-1}$. Trabalhando-se com uma faixa de concentração de glicerol de 25 a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, obteve-se resposta linear definida pela equação $Y = (0,125 \pm 0,01) + (5,49 \times 10^{-4} \pm 1,83 \times 10^{-5})X$ com coeficiente de correlação de 0,997.

3.3.9 - Diluição em Linha

Tendo em vista que a concentração de glicerol em vinhos varia entre 5 e 8 g l⁻¹, os procedimentos em fluxo propostos anteriormente, empregando reações enzimáticas, determinaram o teor de glicerol em vinhos fazendo uma diluição prévia da amostra em razões que variaram de 1:50,⁵² 1:100¹³⁶ ou 1:2500.⁵⁰

O escopo deste trabalho visava a determinação de glicerol sem nenhum tratamento ou diluição da amostra. Primeiramente, vários testes foram feitos usando a configuração do sistema de análise em fluxo empregado para determinação de etanol em vinhos, Figura 2.15, descrita no capítulo anterior. Entretanto, em busca de maior frequência analítica foi acoplado ao sistema de análise em fluxo (Figura 3.3) um artefato confeccionado em acrílico (Figura 3.1) com um volume interno de 2 µl que proporcionou a diminuição do volume da amostra inserido de modo mais simples.

Para verificar a aplicabilidade desta estratégia de diluição em linha foram realizados experimentos utilizando soluções de referência contendo entre 2,0 e 10,0 g l⁻¹ de glicerol. Variou-se o intervalo de tempo (dt) de acionamento da válvula V₄ (Figura 3.1) de 1,0 a 3,0 s. Conforme mostra a Figura 3.14, com o tempo de 1,0 s houve evidências de saturação da enzima. Com o tempo de descarte de 2,0 s obteve-se as melhores condições de linearidade e sensibilidade.

Sob estas condições, aplicando-se a seqüência da análise, sumarizada na Tabela 3.1, o sistema foi linear entre 2,0 e 10,0 g l⁻¹ de glicerol, apresentando as seguintes características: relação linear caracterizada pela uma equação $Abs = (0,1320 \pm 0,003) + (149 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-4}) C$, onde C é a concentração de glicerol em g l⁻¹ (R = 0,998); coeficiente de variação de 1,6% (n = 16) para uma solução de referência com 6,0 g l⁻¹ de glicerol; limites de detecção e quantificação de 0,4 e 1,29 g l⁻¹ de glicerol, respectivamente; consumo de NAD⁺ de 0,6 mg por determinação e uma frequência analítica de 33 determinações por hora, considerando-se o tempo despendido na troca da amostra.

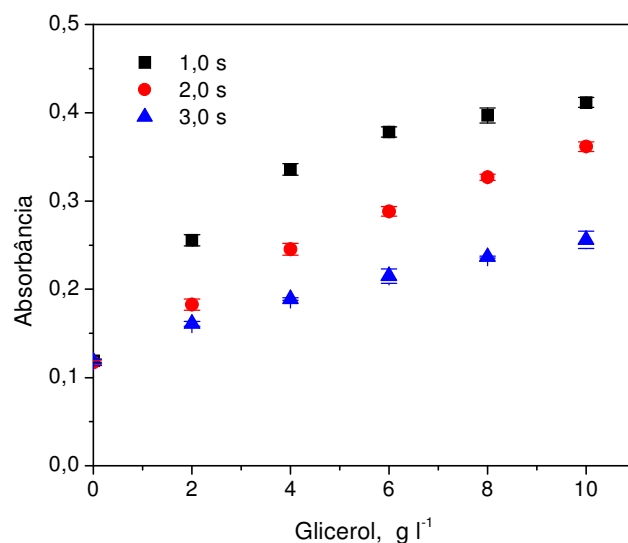


FIGURA 3.14 – Influência da variação do tempo de descarte (dt) da amostra na reação enzimática. Valores dos tempos e suas respectivas equações: ■ 1,0 s: $y = 0,130 + 0,034x$ ($r=0,960$); ● 2,0 s: $y = 0,120 + 0,026x$ ($r=0,996$); ▲ 3,0 s $y = 0,128 + 0,013x$ ($r=0,993$); onde y = Absorbância; x = concentração de glicerol em $g\ l^{-1}$.

TABELA 3.1 – Seqüência das etapas para determinação de glicerol em vinhos

Etapa	Vazão				Tempo (s)		
	$\mu l\ s^{-1}$	Descrição	V_1^*	V_2^*		V_3^*	V_4^*
1	17	Inserção da amostra	1	1	0	1	1,5
2	33	Descarte	0	0	0	1	2
3 [#]	33	Deslocamento da amostra	0	0	0	0	0,2
4 [#]	17	Inserção do NAD ⁺	1	0	1	0	2
5	33	Tempo de leitura e limpeza	0	0	0	0	70

* 0 = válvula desligada; 1 = válvula acionada; [#] etapas repetidas em 8 ciclos

3.3.10 - Determinação de glicerol em amostras de vinho

Empregando as condições experimentais otimizadas, determinou-se a concentração de glicerol em diferentes amostras de vinho de mesa. Conforme mostra os sinais transientes da Figura 3.15, o sistema demonstrou boa repetibilidade e estabilidade, apresentando um coeficiente de variação de 1,4% ($n = 15$) para uma amostra de vinho contendo $5,3 \text{ g l}^{-1}$ de glicerol.

A seguir o registro dos sinais analíticos obtidos a partir de soluções de referência e amostras de vinho são mostrados na Figura 3.16 demonstrando a boa estabilidade do sistema durante as análises.

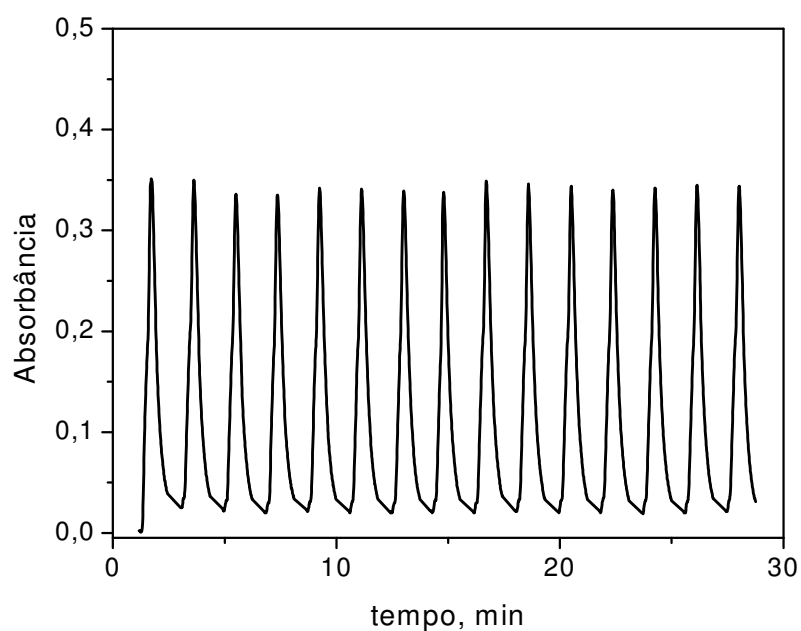


FIGURA 3.15 – Registro de 15 replicatas dos sinais transientes gerados pelo sistema proposto aplicado em uma amostra de vinho com $5,3 \text{ g l}^{-1}$ de glicerol.

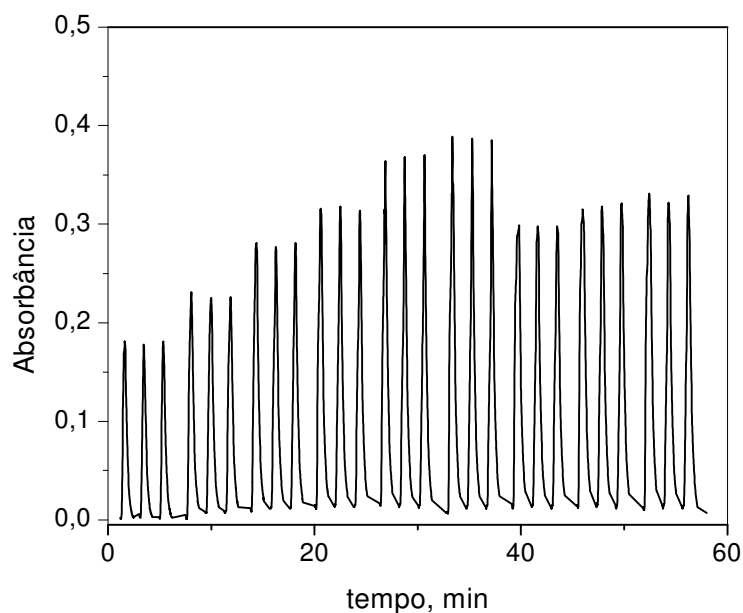


FIGURA 3.16 – Registro dos sinais. Da esquerda para a direita sinais transientes relativos ao branco e soluções de referência com 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 g l⁻¹ de glicerol, seguido de três amostras de vinho, em triplicata.

Os resultados apresentados pelo emprego do sistema proposto, mostrados na Tabela 3.2, foram comparados com um kit comercial para determinação de glicerol e aplicou-se o teste *t* com múltiplas amostras, cujo resultado ($t\text{-exp.} = 0,326$, $t\text{-calc.} = 1,833$), não apresentou diferença significativa em nível de 90% de confiança e nove graus de liberdade.

TABELA 3.2 – Comparação dos resultados do teor de glicerol em amostras de vinhos

Amostra	Método proposto ¹	Método de referência ¹
	Glicerol, g l ⁻¹	Glicerol, g l ⁻¹
1 ^a	5,3 ± 0,1	5,4 ± 0,2
2 ^b	8,5 ± 0,2	8,4 ± 1,0
3 ^b	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,2
4 ^b	6,3 ± 0,1	6,3 ± 0,1
5 ^c	5,3 ± 0,4	5,3 ± 0,1
6 ^b	6,2 ± 0,2	6,3 ± 0,2
7 ^b	7,4 ± 0,4	7,5 ± 0,2
8 ^b	8,4 ± 0,4	8,3 ± 0,7
9 ^b	6,7 ± 0,2	6,9 ± 0,5
10 ^b	7,5 ± 0,3	7,5 ± 0,4

¹ n = 3 ± desvio padrão

^a Vinho rosê ; ^b Vinho tinto; ^c Vinho branco.

3.4 - CONCLUSÃO

O sistema em fluxo proposto para determinação de glicerol em vinho empregando multicomutação e detecção por espectrofotometria permitiu a determinação do analito em amostras sem tratamento prévio, efetuando a diluição em linha. A reação enzimática, bastante empregada na literatura para a determinação de glicerol, mostrou-se apropriada, principalmente pela seletividade proporcionada minimizando o efeito de possíveis interferentes dada à complexidade da composição química da matriz. Entretanto, a baixa sensibilidade do método é um fator limitante. Os resultados alcançados demonstraram a viabilidade do procedimento para aplicação em amostras com diferentes faixas de concentrações. O emprego da enzima imobilizada em esferas de vidro apresentou excelente estabilidade, mantendo sua atividade praticamente inalterada por *ca* 3 meses, com uso freqüente, totalizando um número de *ca* 1500 determinações.

CAPÍTULO IV

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO TARTÁRICO EM VINHOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

4.1 - INTRODUÇÃO

Fundamentalmente, são os ácidos orgânicos fixos ou não voláteis que conferem aos vinhos as suas propriedades ácidas. A sua natureza e suas concentrações desempenham um papel decisivo no estabelecimento dos equilíbrios ácido-base e nas características organolépticas relacionadas ao “gosto ácido”. Dentre estes ácidos presentes nos vinhos encontram-se os ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico e láctico.

O ácido tartárico é o ácido praticamente específico da uva, sendo muito rara a sua existência em outras espécies do reino vegetal. É o mais importante dos ácidos presentes no vinho, por ser o ácido orgânico mais forte e mais dissociado, $pK_1 = 3,12$, contribui decisivamente para os valores de acidez fixa e nas características sensoriais dos vinhos.¹⁴ Sob o ponto de vista químico, o ácido tartárico é um ácido diprótico, cuja massa molar é de $150,09 \text{ g mol}^{-1}$, encontrado no vinho na forma de L(+)-ácido tártarico.

Durante a maturação da uva o seu teor diminui substancialmente.¹⁴⁵ Esta diminuição acentua-se durante a fermentação alcoólica, principalmente pela precipitação de sais de sódio e cálcio.¹⁴⁶ Após a vinificação, durante a primeira fase de maturação do vinho, o seu teor continua a decrescer em razão da insolubilidade dos sais presentes, principalmente sob baixas temperaturas. Esse excesso de tartaratos pode precipitar no vinho, o que é indesejável do ponto de vista comercial. Por isso, modernas vinícolas utilizam o processo de troca iônica onde os íons potássio, que produzem um tartarato pouco solúvel, são substituídos por íons sódio, gerando um sal mais solúvel.

A literatura cita que o teor de ácido tartárico normalmente encontrado no vinho estabilizado é de $1,5 \text{ g l}^{-1}$ a $3,0 \text{ g l}^{-1}$ e depende do tipo de vinho.^{147,148} Quando presente em grande quantidade, confere aspereza e uma certa adstringência ao vinho; mas, em concentrações adequadas é responsável pela

fineza ácida dos bons produtos. Encontra-se na forma livre e de sal, nesse caso, especialmente como o potássio.

A importância enológica do conhecimento dos teores dos principais ácidos orgânicos, presentes nos mostos e nos vinhos, originou o desenvolvimento de métodos analíticos para suas quantificações, seja de forma conjunta^{149,150} ou individualizada^{151,152}

Em se tratando do ácido tartárico especificamente, os métodos oficiais da AOAC e OIV, empregam técnicas clássicas para sua quantificação e são extremamente laboriosos. O método da AOAC fundamenta-se na obtenção do precipitado do tartarato ácido de potássio (cremor de tártaro), requerendo um período ≥ 15 h, em uma temperatura de $15 - 18^\circ\text{C}$, antes da determinação por titulação.²¹ No que se refere ao método de referência da OIV, trata-se do método mais antigo para o doseamento do ácido tartárico, proposto por Louis Pasteur.²⁰ O ácido é precipitado na forma de racemato de cálcio, mantido por 12 h, filtrado, lavado e seco a 70°C até peso constante.

As dificuldades dos métodos oficiais têm sido objeto de um grande número de trabalhos visando à melhoria e aplicabilidade. Neste aspecto, destacam-se os métodos que aplicam as técnicas cromatográficas quantitativas¹⁵³⁻¹⁵⁷ e eletroforese capilar,^{158,159} técnicas potenciométricas^{160,161} e polarográficas,¹⁶² espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier.^{119,163,164}

Os procedimentos manuais que fazem uso de uma reação com formação de uma substância titulável volumetricamente¹⁶⁵ ou mensurável colorimetricamente¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ têm sido bastante usuais por empregarem equipamentos facilmente encontrados nos laboratórios de análise química, embora estejam mais susceptíveis a erros. O emprego de reações quimiluminescente também tem sido aplicado. HE *et al.* empregaram a reação de quimiluminescência do Ce(IV) na presença do tris (2,2'-dipiridil) rutênio (II), $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, para determinação de ácido tartárico e ácido ascórbico.¹⁶⁹

4.1.1 – Sistemas de análise em fluxo para determinação de ácido tartárico

Lançando mão das vantagens apresentadas pela análise em fluxo, alguns procedimentos foram propostos para análise de ácido tartárico em vinhos.

LÁZARO *et al.*, em 1986, determinaram ácido tartárico em vinhos empregando análise em fluxo baseado na reação do ácido tartárico com o vanadato e detecção fotométrica.¹⁷⁰ A proposta veio como uma alternativa ao método de Rebelein recomendado pela OIV.¹⁶⁶ Os autores empregaram um sistema em fluxo composto de dois canais, onde o reagente fluía continuamente rumo ao detector. A solução da amostra, 200 µl, foi inserida no percurso analítico. Nesse sistema, para evitar o uso de um branco, a amostra e as soluções de referência foram preparadas no mesmo meio da solução transportadora. Para alcançar o pH recomendado para a reação, o sistema proporcionava a formação de um tampão acetato *in situ* pela mistura da solução transportadora, contendo ácido acético e a solução do reagente, com hidróxido de sódio. Os estudos realizados revelaram que a presença de uma pequena concentração de ácido tartárico na solução do reagente proporcionou aumento da sensibilidade e ampliação da faixa linear do método. Foram analisadas as amostras sem e com pré-tratamento em resina de troca iônica e os resultados comparados com o método de referência, não apresentaram diferença significativa. O sistema foi empregado em amostras diluídas 20 vezes, apresentando melhor linearidade na faixa de 0,02 a 0,40 g l⁻¹ de ácido tartárico; coeficiente de variação de 0,79%; frequência analítica de 50 determinações por hora e consumo de reagente por determinação de 0,609 mg de vanadato de sódio *versus* 100 mg de vanadato de amônio quando comparado ao método de referência.

Em 1998, RANGEL e TÓTH,¹⁷¹ propuseram a determinação seqüencial da acidez titulável e ácido tartárico em vinhos empregando espectrofotometria. As condições da reação foram similares à descrita anteriormente.¹⁷¹ Essa metodologia envolveu uma diálise em linha antes da injeção da amostra para efetuar a diluição e evitar interferência da matriz na detecção espectrofotométrica. Essa estratégia foi eficiente, no entanto, os autores observaram que a quantidade de ácido que passava pela membrana dependia do meio alcoólico. Desta forma, as soluções de referência para análise de vinhos de mesa e do porto foram preparadas em 10 ou 20% (v/v) de etanol, respectivamente. Empregando um injetor comutador, a amostra após passar pela câmara de diálise, foi transportada em um fluxo de água. Em seguida, recebia por confluência a solução do reagente, previamente misturado com uma solução de ácido acético. A reação foi monitorada em 500 nm. O sistema otimizado apresentou resposta linear entre 0,50 e 5,0 g l⁻¹ de ácido tartárico; uma

freqüência analítica de 16 determinações por hora e um consumo 2,0 mg de vanadato de amônio por determinação.

Recentemente, SILVA e ÁLVARES-RIBEIRO¹⁷² desenvolveram um procedimento em fluxo para determinação de ácido tartárico em vinho empregando otimização pelo método simplex¹⁷³ através de um programa de computador escrito em Microsoft BASIC 7.1. O sistema em fluxo aplicado foi similar ao usado por LÁZARO *et al.*,¹⁷⁰ acoplando uma câmara de diálise para evitar a diluição da amostra.¹⁷¹ Os autores empregaram um planejamento fatorial para avaliar o efeito e a interação entre os parâmetros experimentais: comprimento do reator, vazão, concentração da solução do reagente, e volume de injeção da amostra. Os resultados demonstraram que com exceção do comprimento do reator, todos os parâmetros são significativos, contudo nenhuma interação ocorre entre eles. Em seguida, aplicando a otimização por simplex, avaliaram três variáveis em função da resposta do sistema: vazão, volume de injeção da amostra e concentração do vanadato, obtendo uma resposta final de apresentou uma sensibilidade de 48,8 mAU, um desvio de 3,2 mAU, onde AU = unidades de absorção. O sistema apresentou sua melhor resposta linear entre 0,5 e 4,0 g l⁻¹ de ácido tartárico; sensibilidade de 24,14 mAU (r = 0,9993); limite de detecção calculado com o triplo do ruído da linha de base foi de 0,08 g l⁻¹ de ácido tartárico; desvio padrão relativo de 1,6 e 4,5%, respectivamente, para soluções de tartarato de 4,0 e 1,0 g l⁻¹; freqüência analítica de 36 determinações por hora e um consumo de vanadato de 0,682 mg por determinação.

O uso de reações enzimáticas também tem sido aplicado na determinação de ácido tartárico em vinhos. TSUKATANI e MATSUMOTO,¹⁷⁴ desenvolveram um procedimento em fluxo usando a atividade secundária da enzima *D-malato desidrogenase*. Em vista disso, aplicaram a estratégia de parada de fluxo[‡], para aumentar o tempo da interação enzima-substrato, retendo a zona da amostra na coluna enzimática por 180 s. O método quantificou L-tartarato pela formação do NADH que foi detectado por fluorescência. Uma forte interferência da matriz foi observada e o problema foi contornado pela medida da fluorescência inerente a amostra antes da determinação do analito. A medida da fluorescência foi corrigida pela subtração do valor apresentado pela amostra. O sistema apresentou

[‡] Do inglês: Stopped-Flow

uma faixa de resposta linear de 0,01 a 1,20 mmol l⁻¹ de ácido tartárico, consumo de 50 µl de amostra e foi aplicado em amostras previamente diluídas de 30 a 40 vezes. Nessas condições, uma freqüência analítica de 12 determinações por hora foi obtida. Os resultados aplicados em amostra de vinho foram concordantes com os obtidos por HPLC^{§§} e os testes de recuperação foram de 99,2% e 98,8% para amostras de vinho branco e tinto, respectivamente.

Uma outra alternativa, aplicando eletrodos seletivos para tartarato, foi proposta por SALES *et al.*¹⁷⁶ Foram construídos eletrodos de membrana de PVC com complexos de amônio quaternários e tartarato, como trocador iônico; e derivados de fenol, como solvente. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de eletrodo com membrana de éter octil orto-nitrofenil como solvente. Segundo os autores, o sistema apresentou um desvio padrão relativo de 5,0% e quando foi aplicado em amostras de vinhos branco e tinto. Os resultados quando comparados com um método independente não apresentaram diferença significativa.

O desenvolvimento crescente da técnica de espectrometria de infravermelho combinada com os avançados *softwares* de quimiometria tem se mostrado como uma interessante ferramenta analítica para o processo de controle de qualidade de produtos. A primeira aplicação em análise de vinho foi reportada por SCHINDLER *et al.*¹¹⁹ Os autores empregaram um sistema automático (SI)-FTIR^{***} onde foi possível determinar simultaneamente açúcares, álcoois e ácidos orgânicos. Os resultados espectrais foram avaliados usando um modelo PLS^{†††}. O sistema foi aplicado em amostras de vinho contendo de 1,0 a 1,7 g l⁻¹ de ácido tartárico e os resultados foram concordantes com o método de referência, apresentando boa reprodutibilidade. A análise completa se deu em menos de três minutos, demonstrando a grande aplicabilidade da técnica em controle de processos.

Buscando as vantagens oriundas da aplicação da multicomutação em sistemas de análise em fluxo, neste trabalho propõe-se o desenvolvimento de um procedimento em fluxo empregando-se multicomutação para determinação de ácido tartárico em vinhos sem tratamento prévio da amostra.

§§ Do inglês: High Performance Liquid Chromatography

*** Do inglês: Sequential Injection system with Fourier Transform Infrared detection

††† Do inglês: Partial Least Square

4.2 - PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 - Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico empregando água purificada (condutividade menor que $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

A solução $0,7 \text{ mol l}^{-1}$ de ácido acético, CH_3COOH , foi preparada a partir de diluição do ácido acético glacial 100% (v/v), $\rho_{20} = 1,05 \text{ kg l}^{-1}$. Esta solução foi utilizada como solução transportadora.

A solução do reagente foi preparada a partir da mistura de 250,0 mg de vanadato de sódio, NaVO_3 , e 20,0 mg de ácido tartárico, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, diluídos em 250 ml de solução aquosa de hidróxido de sódio, NaOH , $0,4 \text{ mol l}^{-1}$. As massas empregadas equivalem às concentrações $8,2 \text{ mmol l}^{-1}$ e $0,54 \text{ mmol l}^{-1}$, de vanadato de sódio e ácido tartárico, respectivamente.

Soluções de referência foram preparadas a partir de sucessivas diluições da solução estoque contendo $10,0 \text{ g l}^{-1}$ de ácido tartárico.

As soluções dos reagentes empregados no método de referência foram preparadas conforme recomenda a literatura¹⁶⁶ e estão descritas a seguir.

Ácido acético, diluído a 0,5 e 30% (v/v).

Resina de troca iônica AG 1-X8 (Bio-Rad) na forma acetato. Foi preparada uma suspensão contendo 100 g da resina em 200 ml de solução de ácido acético a 30% (v/v), deixando em contato por no mínimo 24 horas antes do uso. Quando não estava sendo usada a resina foi mantida em solução de ácido acético a 30% (v/v).

Solução de sulfato de sódio, Na_2SO_4 , a 7,1% (m/v).

Solução de acetato de sódio, CH_3COONa , a 27% (m/v).

Reagente vanádico foi preparado pela dissolução de 10,0 g de metavanadato de amônio, NH_4VO_3 , em 150 ml de solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol l}^{-1}$. Em seguida, juntou-se 200 ml de solução de acetato de sódio a 27% (v/v) e completou-se o volume para 500 ml com água.

Soluções com concentrações de 0,05; 0,5 e $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ de ácido sulfúrico foram preparadas a partir de diluições dos volumes apropriados de ácido sulfúrico a 96% (v/v), $\rho_{20} = 1,84 \text{ kg l}^{-1}$.

Solução de ácido periódico 50 mmol l^{-1} foi preparada pela dissolução de 10,70 g de periodato de sódio, NaIO_4 em 50 ml de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ e completado o volume para 1000 ml com água.

Solução de glicerol a 10% (m/v) foi preparada pesando-se 11,5 g de glicerol a 87% (m/v), diluindo-se com água e completando-se o volume pra 100 ml.

Solução de ácido tartárico $1,0 \text{ g l}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de ácido tartárico em 6,70 ml de solução de hidróxido de sódio 1 mol l^{-1} e completando-se o volume para 500 ml com solução de sulfato de sódio a 7,1% (m/v).

Amostras de vinhos tintos e brancos foram compradas no comércio local e analisadas sem tratamento prévio.

4.2.2 - Materiais

4.2.2.1 - Equipamentos e Acessórios

O módulo de análise foi construído empregando tubos de polietileno (0,8 mm d.i.). As confluências e a coluna enzimática foram feitas em acrílico. Na inserção das soluções foram empregadas válvulas solenóides de três vias (Nresearch 161T031). A propulsão dos fluidos foi efetuada por uma bomba peristáltica Ismatec IPC-8. Um microcomputador 386, equipado com uma interface eletrônica (Advantech, PCL 711S) e um *programa computacional* escrito em linguagem QuickBASIC 4.5 foi empregado para controle do módulo de análise e monitoramento dos sinais.

Um espectrofotômetro UV-Vis modelo 700 plus Femto equipado com uma cela de quartzo (10 mm de caminho óptico, 80 μl de volume interno) foi empregado para detecção.

Para a execução do método de referência, recomendado pela OIV,^{20,167} foi utilizada uma coluna de troca iônica, na forma acetato, apresentando 300 mm de comprimento, com ca 10 mm de diâmetro interno.

4.2.3 - Metodologia

A reação empregada para determinação de ácido tartárico baseou-se no monitoramento da reação de complexação que ocorre entre o ácido tartárico e o vanadato, originando a coloração alaranjada com o máximo de absorvância entre 490 – 500 nm. Este método foi proposto inicialmente por Rebelein¹⁶⁶ e adotado como método de referência para determinação de ácido tartárico em vinhos, pela OIV.²⁰

Neste trabalho, o procedimento para determinação de ácido tartárico foi fundamentado no sistema em fluxo proposto por LÁZARO *et al.*,¹⁷⁰ onde foi empregada reação baseada no método de Rebelein¹⁶⁶ com algumas modificações.

O vanádio (V) é ativo na oxidação de diversas substâncias orgânicas, tais como α -hidroxiácidos e carboidratos.¹⁷⁶

O ácido tartárico age como um ligante tetravalente formando complexos polinucleares com íons metálicos,¹⁷⁷ incluindo os óxidos de vanádio (IV)¹⁷⁸ em estado sólido¹⁷⁹ ou em solução^{180,181}. O produto desta oxidação pode se apresentar na forma de diferentes espécies dependendo do meio reacional.^{176,182}

4.2.4 - Procedimentos

4.2.4.1 - Sistema de Análise em Fluxo

O sistema de análise em fluxo aplicado na determinação de ácido tartárico, representado na Figura 4.1, consistiu de um módulo constituído de três válvulas solenóides. Foi utilizada uma configuração de canal único, com as soluções sendo aspiradas rumo ao detector. Através da válvula V₁ foram feitas as inserções das soluções: transportadora e amostra. Após a inserção, a solução da amostra sofria dispersão no fluido transportador, recebendo a solução reagente, pelo acionamento intermitente da válvula V₃, passando por uma bobina de reação (B₂) e conduzida para o detector (Det), onde a reação foi monitorada a 490 nm. Na troca da amostra, a válvula V₂ foi acionada para que o descarte da amostra e a lavagem do percurso fossem desviados do detector. Através do ponto de confluência x.

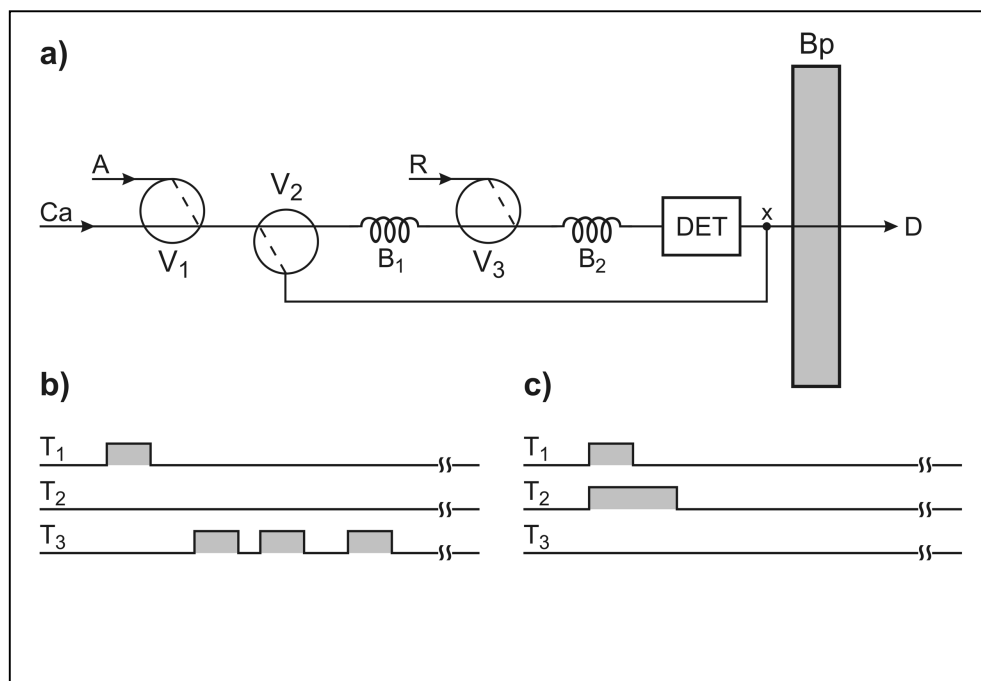


FIGURA 4.1 – **a)** Diagrama de fluxos do sistema para determinação de ácido tartárico em vinhos; **b)** diagrama de tempo da etapa de amostragem; **c)** diagrama de tempo da etapa da troca da amostra. **Bp** - bomba peristáltica; **V₁**, **V₂**, **V₃** - válvulas solenóides; **B₁** e **B₂** - bobinas de reação de 25 e 50 cm, respectivamente; **Det** - espectrofotômetro a 490 nm; **Ca** - solução transportadora, 0,7 mol l⁻¹ ácido acético, 1,0 ml min⁻¹; **A** - amostra, **R** - solução de reagente: NaVO₃ - 8,2 mmol l⁻¹ + de C₄H₆O₆ - 0,54 mmol l⁻¹ + NaOH - 0,4 mol l⁻¹; **D** - descarte; **T₁**, **T₂**, **T₃** - diagrama de tempo de acionamento das válvulas solenóide V₁, V₂, V₃. As linhas cheias e tracejadas nos símbolos das válvulas indicam a passagem do fluido quando as válvulas estão desligadas e ligadas, respectivamente.

4.2.4.1.1 - Otimização dos Parâmetros Experimentais

Levando-se em consideração os trabalhos em fluxo anteriormente reportados na literatura,¹⁷⁰⁻¹⁷² a otimização do sistema em fluxo resumiu-se aos estudos da verificação da cinética da reação; estudo do percurso analítico, número de ciclos de amostragem; volumes de inserção das soluções de amostra e reagente; e concentração da solução do reagente.

Os experimentos para definição do volume de solução do reagente foram definidos mantendo-se o volume da solução da amostra em 17 µl, obtido pelo

acionamento de V_1 por 1,0 s. Através da variação do tempo de acionamento da válvula V_3 , foram adicionados diferentes volumes de reagente (272 a 544 μl) no percurso analítico, fracionado em oito ciclos de amostragem. Em seguida, definiu-se o volume da solução da amostra variando-se o volume de 5 a 20 μl , mantendo-se o volume da solução do reagente em 408 μl . Conforme demonstra o diagrama de tempo da Figura 4.1, nota-se que a inserção da solução do reagente foi feita pelo acionamento da válvula V_3 de forma intermitente dividido em vários ciclos.

Ensaio aplicando-se a estratégia da parada de fluxo foram efetuados para estudo da cinética da reação. Em seguida, estudo do efeito do percurso analítico foi verificado empregando bobinas de reação que variaram de 50 a 200 cm, 250 a 1000 μl . O efeito da concentração do reagente foi avaliado variando-se a concentração de vanadato de sódio de 6,6 a 16 mmol l^{-1} .

4.2.4.2 – Método Comparativo

O procedimento empregado para comparação dos resultados foi feito conforme recomenda a OIV,^{20,166} baseado na seqüência descrita a seguir.

- 1) Preparação da coluna de troca iônica:
 - a) Preencheu-se a extremidade inferior da coluna com lã de vidro, impregnando-a com água;
 - b) Adicionaram-se 10 ml da suspensão da resina de troca iônica em forma acetato;
 - c) Preencheu-se a extremidade superior da coluna com lã de vidro, para evitar o desempacotamento da resina durante as lavagens.
- 2) Isolamento dos ácidos orgânicos:
 - a) Lavou-se a resina contida na coluna com solução de ácido acético 0,5% (v/v), repetindo-se a operação por quatro vezes;
 - b) Adicionaram-se 10 ml de vinho, deixando-se permear lentamente;
 - c) Lavou-se novamente a resina com solução de ácido acético 0,5% (v/v), deixando-se permear lentamente. Repetiu-se a operação por sete vezes com 10 ml de água em cada operação;

d) Eluiu-se os ácidos fixados na resina com uma solução de sulfato de sódio a 7,1%(m/v), recolhendo-se a solução eluída em um balão volumétrico até ajuste de 100ml, gota-a-gota.

3) Dosagem de ácido tartárico:

a) Em dois recipientes, *A* e *B*, adicionou-se 20 ml da solução eluída;

OBS: O recipiente *A* serve para a dosagem e o recipiente *B*, no qual o ácido tartárico é destruído pelo ácido periódico, serve de referência;

b) Ao recipiente *A*, adicionou-se 2 ml de ácido sulfúrico 1 mol l⁻¹, 5 ml de ácido sulfúrico 0,05 mol l⁻¹, 1 ml de glicerol a 10% (m/v);

c) Ao recipiente *B*, adicionou-se 2 ml de ácido sulfúrico 1 mol l⁻¹, 5 ml de ácido periódico 0,05 mol l⁻¹, esperaram-se 15 min. Adicionou-se 1 ml de glicerol a 10% (m/v), para destruir o excesso de ácido periódico e esperaram-se 2 min.

d) Adicionou-se 5 ml do reagente vanádico, primeiramente no recipiente *B*, logo em seguida, no recipiente *A*. Aguardaram-se 90 s e mediu-se a absorbância a 490 nm das duas soluções, *A* e *B*, e calculou-se a diferença.

4) Curva de calibração:

a) Introduziram-se 5, 10, 20, 30, 40 e 50 ml de solução de ácido tartárico 1 g l⁻¹ em balões volumétricos e completou-se o volume para 100 ml com solução de sulfato de sódio a 7,1% (m/v);

b) Tomaram-se 20 ml destas soluções em dois recipientes e procedeu-se conforme descrito em 3;

c) A representação gráfica da diferença das absorbâncias destas soluções em função do teor de ácido tartárico apresenta uma ligeira curvatura perto do ponto zero, sendo necessário calibrar esta curva para medidas de soluções com menos de 1,0 g l⁻¹.

Os resultados foram obtidos a partir da curva de calibração e expressos em g l⁻¹ de ácido tartárico.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mencionado anteriormente, tomou-se por base o procedimento em fluxo realizado por LÁZARO *et al.* para os estudos preliminares.¹⁷⁰ Os autores reportaram que a formação do complexo ácido tartárico – vanadato é favorecida entre pH 4,63 e 4,96, sendo este último o que apresenta absorção máxima e é recomendado pelo método oficial. Observaram grande perda de sensibilidade para os valores de pH abaixo de 4,63 e acima de 4,96.

Tal qual o procedimento proposto pelos citados autores, a configuração apresentada na Figura 4.2 permitiu a formação da solução tampão *in situ*, proporcionada pela mistura da solução transportadora e da solução do reagente. Um busca de uma melhor mistura, optou-se pela inserção em ciclos de amostragem, seguindo o modelo de inserção da amostragem binária,¹¹ usufruindo-se das vantagens apresentadas por esta estratégia.

Uma precaução a ser tomada no desenvolvimento do procedimento para determinação de ácido tartárico em vinhos, empregando o método do vanadato, é a intensa absorção apresentada pelos vinhos no comprimento de onda de 490 nm, conforme demonstra a Figura 4.2. Esta absorção é inerente das substâncias fenólicas presentes em maior quantidade nos vinhos tintos. Assim sendo tais substâncias representam um potencial interferente para o método proposto. Nesse sentido, no método de Rebelein,¹⁶⁶ a amostra de vinho passa por um tratamento em resina de troca iônica, retendo os tartaratos e descartando as substâncias fenólicas. No procedimento em fluxo proposto por LÁZARO *et al.*,¹⁷⁰ onde foi empregada a reação baseada no método de Rebelein, foi feito um paralelo empregando amostras com e sem tratamento em resina de troca iônica. Os resultados reportados pelos mencionados autores demonstraram que não havia diferença significativa entre os mesmos. Sugerindo que a diluição sofrida pela amostra no sistema de análise em fluxo foi suficiente para minimizar o efeito da absorção e provável interferência das substâncias fenólicas.

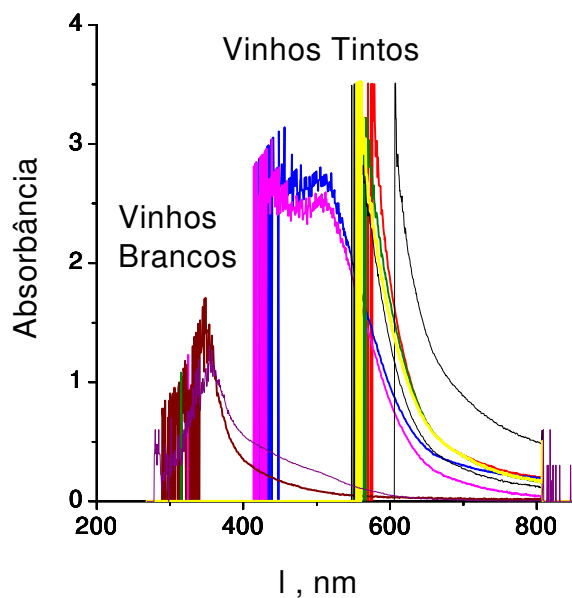


FIGURA 4.2 – Espectros de absorção de amostras de vinhos brancos e tintos.

Visando analisar a influência do meio alcoólico na reação foram efetuados experimentos para comparar o comportamento do sistema empregando soluções de referência preparadas em meio aquoso e alcoólico a 10% (v/v). Não foi observada diferença significativa nos resultados obtidos. Desta forma, na realização do trabalho, empregaram-se soluções de referência preparadas em meio aquoso.

Todos os experimentos foram realizados mantendo-se a vazão em $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.

4.3.1 – Efeito da Adição do Analito na Solução do Reagente

Os sistemas de análise em fluxo propostos anteriormente fizeram uso de uma certa concentração de ácido tartárico na solução reagente. Desta forma, primeiramente, estudou-se o efeito do uso de uma solução do reagente com e sem adição de ácido tartárico na resposta analítica do sistema para determinação de ácido tartárico.

Obtiveram-se duas curvas analíticas, empregando condições iguais de vazão, volumes das soluções de amostra e de reagente. A curva **a**, usou-se a solução do reagente sem a presença de ácido tartárico, contendo NaVO_3 - $8,2 \text{ mmol l}^{-1}$ + NaOH - $0,4 \text{ mol l}^{-1}$; na curva **b**, empregou-se a solução do reagente contendo ácido tartárico (NaVO_3 - $8,2 \text{ mmol l}^{-1}$ + de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ - $0,54 \text{ mmol l}^{-1}$ + NaOH - $0,4 \text{ mol l}^{-1}$).

A Figura 4.3a revela uma pequena curvatura para a faixa de concentração abaixo de $2,0 \text{ g l}^{-1}$ de ácido tartárico, cabendo uma calibração do método para baixas concentrações. Este comportamento não foi mais observado quando se acrescentou uma pequena concentração de ácido tartárico, conforme a Figura 4.3b. A necessidade da presença do analito na solução do reagente para determinações de baixas concentrações de determinados analitos é uma característica intrínseca de alguns métodos, conhecida como auto-catalise. Comportamento semelhante, entre outros, pode ser observado no método turbidimétrico para determinação de sulfato.¹⁸³

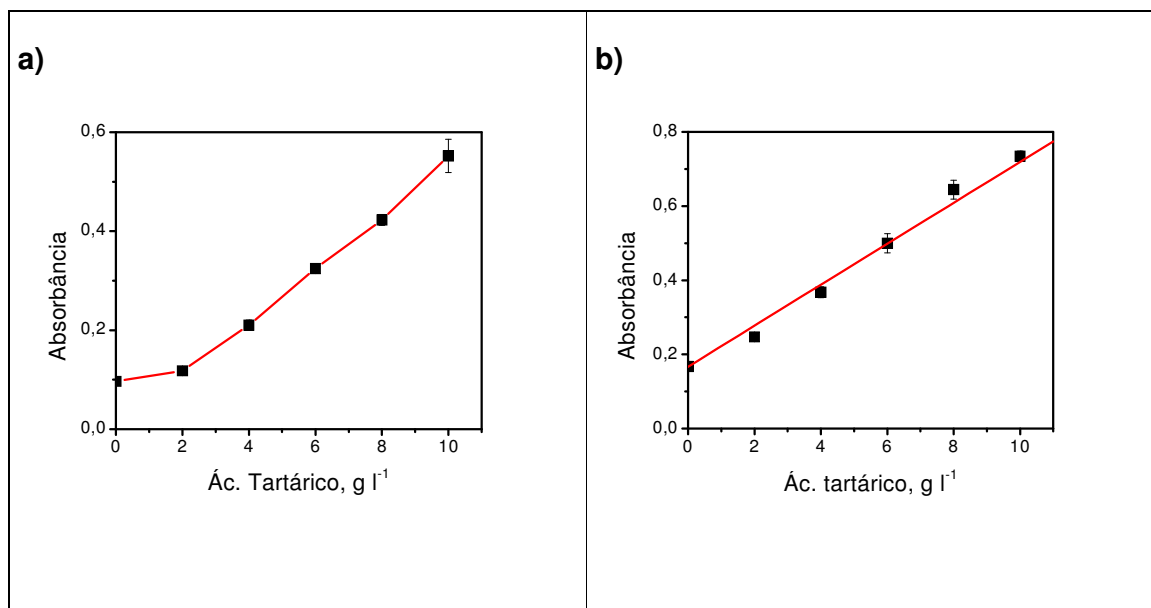


FIGURA 4.3 – Efeito da adição do analito na solução do reagente. **a** – curva analítica com solução do reagente contendo NaVO_3 - $8,2 \text{ mmol l}^{-1}$ + NaOH - $0,4 \text{ mol l}^{-1}$; $y=0,094 + 0,019x$ ($r = 0,810$); **b** – curva analítica com solução do reagente contendo NaVO_3 - $8,2 \text{ mmol l}^{-1}$ + NaOH - $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ $y=0,164 + 0,055x$ ($r = 0,997$), onde y é absorbância e x é concentração de ácido tartárico em g l^{-1} . Volumes das soluções da amostra e do reagente inseridos: 17 e 544 μl .

4.3.2 - Estudo do Volume do Reagente

Para avaliar o efeito da alteração do volume da solução do reagente inserido no percurso analítico, empregou-se uma bobina de reação de 200 cm, baseando-se nos procedimentos anteriores.¹⁷⁰⁻¹⁷² Conservou-se o volume de inserção da solução da amostra, soluções de referência com concentrações na faixa de 2 a 10 g l⁻¹ de ácido tartárico, em 17 µl. Variou-se o volume da solução do reagente pelo acionamento intermitente da válvula V₃, em oito ciclos, mantendo-se um intervalo de tempo de 2,0 s da válvula V₃ desligada. O tempo de acionamento da válvula para cada ciclo variou de 2,0 s a 4,0 s, correspondentes aos volumes de 34 a 68 µl, perfazendo uma variação no volume total de 272 a 544 µl de solução do reagente. Os resultados mostrados na Figura 4.4 revelaram ganho de sensibilidade até um volume de 408 µl. Com 544 µl, observou-se perda de sensibilidade. Provavelmente, este comportamento deve ser decorrente da razão 1:2, relativa ao volume de solução transportadora em relação ao volume de inserção da solução do reagente, que provavelmente proporcionou a formação do tampão *in situ* com pH menos apropriado para a reação isto é, um pH superior a 4,96, conforme discutido anteriormente. Para os estudos posteriores foi empregado um volume total de 408 µl para a solução do reagente, relativo a 51µl por ciclo.

4.3.3 - Estudo do Volume da Amostra

Conforme o diagrama de tempo apresentado na Figura 4.1b observa-se que a amostra é inserida em único ciclo, pelo acionamento da válvula V₁; dispersa no fluido transportador, sofrendo diluição. Em seguida, frações da solução reagente são inseridas pelo acionamento da válvula V₃, em vários ciclos de amostragem ao longo da amostra diluída, proporcionando uma melhor mistura da zona da amostra.

O estudo da variação do volume da solução da amostra, consistiu em avaliar o comportamento do sistema com o aumento do volume de amostra inserido. A Figura 4.5, demonstrou que a sensibilidade do método é dependente da quantidade de amostra inserida. Entretanto para a escolha do volume de amostra a ser adotado realizaram-se testes empregando-se uma amostra de vinho tinto,

verificando-se a absorção apresentada em 490 nm. Primeiramente, substituiu-se a solução reagente na válvula V₃, pela solução transportadora. Efetuou-se a análise da amostra empregando volumes de 10,0; 14,0 e 17,0 µl s da amostra. Em seguida, retornou-se a solução reagente e repetiu-se o procedimento, determinando-se o teor de ácido tartárico na amostra, para cada volume estudado.

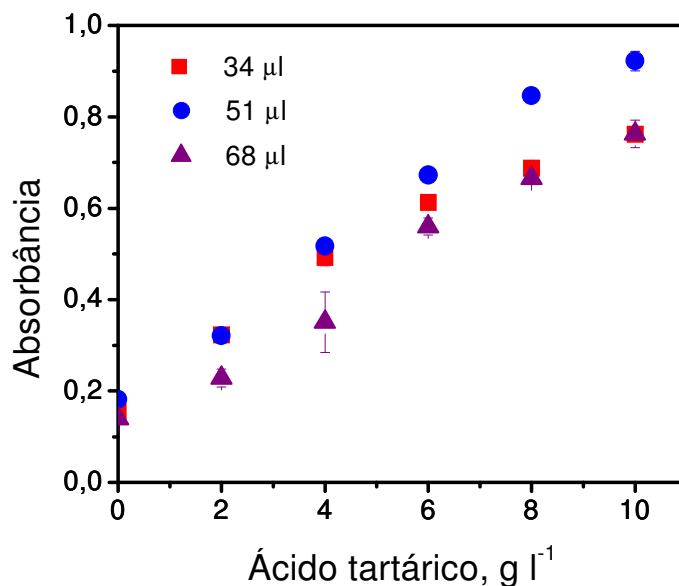


FIGURA 4.4 – Influência da variação do volume da solução do reagente. Volumes estudados e suas respectivas equações: ■ 34 µl: $y = 0,157 + 0,067x$ ($r=0,995$); ● 51 µl: $y = 0,181 + 0,082x$ ($r=0,999$); ▲ 68 µl: $y = 0,139 + 0,065x$ ($r=0,999$); onde y = Absorbância; x = concentração de ácido tartárico em g l⁻¹. Volume da amostra: 17 µl. Valores referentes a um ciclo de amostragem; número total de ciclos: 8 ciclos de amostragem.

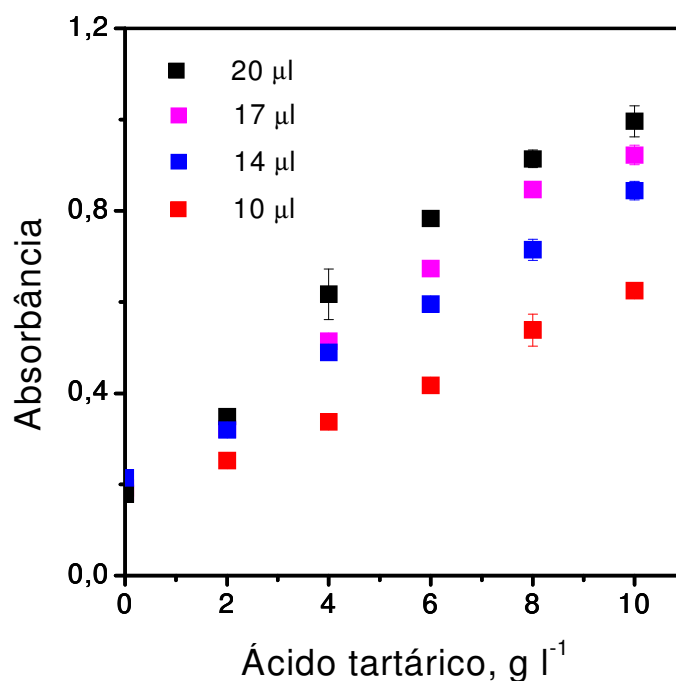


FIGURA 4.5 – Influência da variação do volume da solução da amostra. Volumes estudados e suas respectivas equações: ■ 10 µl: $y = 0,183 + 0,039x$ ($r=0,997$); ■ 14 µl: $y = 0,212 + 0,067x$ ($r=0,990$); ■ 17 µl: $y = 0,181 + 0,081x$ ($r=0,999$); ■ 20 µl: $y = 0,178 + 0,092x$ ($r=0,997$); onde y = Absorbância; x = concentração de ácido tartárico em $g\ l^{-1}$. Volume da solução do reagente: 408 µl, fracionados em 8 ciclos de amostragem.

Os resultados obtidos demonstraram que o aumento do volume da amostra proporcionava maior leitura do branco da amostra. Ainda que, nesses casos, seja comum a subtração do sinal analítico referente à amostra optou-se por empregar a condição que apresentou menor absorção, relativa ao volume de 10,0 µl. Conforme demonstra a Figura 4.6, o volume de 10,0 µl da amostra de vinho, quando dispersa no fluido transportador, apresentou uma absorção insignificante, indicando a viabilidade da estratégia adotada.

Embora o volume de 17 µl tenha representado a melhor condição em termos de sensibilidade e linearidade, Figura 4,5, escolheu-se um volume de 10,0 µl da amostra por apresentar sensibilidade suficiente para determinação do analito e

para minimizar o efeito da absorção dos vinhos tintos em 490 nm, apresentado na Figura 4.2.

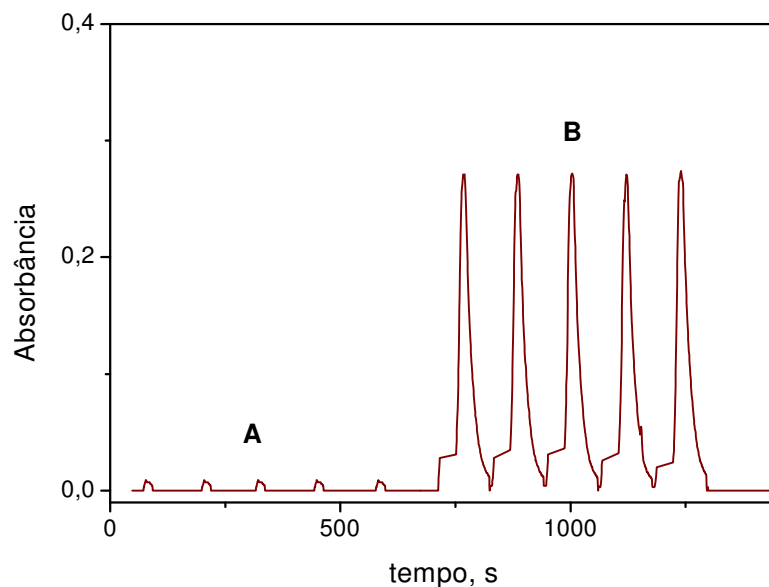


FIGURA 4.6 – Registro dos sinais transientes obtidos com amostra de vinho tinto. **A** - vinho tinto sem adição de reagente; **B** - vinho tinto com adição de reagente.

A intensa absorção apresentada pelos vinhos tintos demandava num longo tempo de limpeza na etapa de troca da amostra, afetando a frequência analítica do sistema. Tentou-se, então, aumentar a vazão do sistema o que ocasionou o aparecimento de um grande número de micro-bolhas que aderiam ao tubo e se desprendiam durante a análise, afetando os resultados. Desta forma, verificou-se a necessidade do uso da válvula V_2 , para o descarte no momento da troca da amostra, desviando do percurso analítico. O uso da válvula V_2 representou um ganho de 30% na frequência analítica.

4.3.4 – Estudo do Comportamento Cinético da Reação

Os procedimentos em fluxo propostos anteriormente para determinação de ácido tartárico empregaram bobinas de reação em torno de 200 cm ou mais. Visando minimizar o consumo de amostra e reagente, foram realizados experimentos com parada de fluxo para averiguar o comportamento cinético da reação. Como se pode verificar na Figura 4.7, os resultados evidenciaram que no instante em que o sinal atingiu o máximo de absorbância e desligou-se o bombeamento da solução, retendo a zona da amostra na cela de fluxo, ca 66% da reação já havia se completado, sugerindo que não se tratava de uma reação de cinética lenta. Tendo em vista que em sistema de análise em fluxo não é imperativo trabalhar em condições de equilíbrio, os resultados do comportamento cinético da reação sugeriram que era desnecessário o uso de um longo percurso analítico para obtenção do sinal analítico.

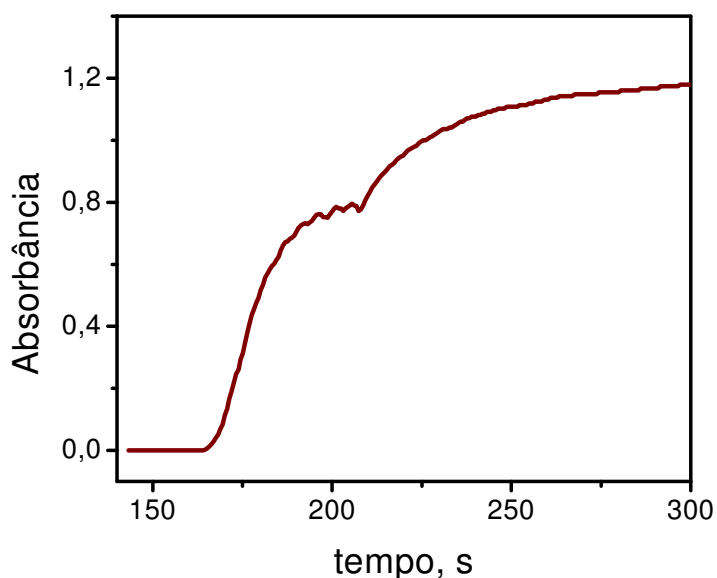


FIGURA 4.7 – Comportamento cinético da reação empregando parada de fluxo. Solução de referência de ácido tartárico contendo $8,0 \text{ g l}^{-1}$ de ácido tartárico.

4.3.5 - Estudo do Percurso Analítico

Em decorrência do estudo da cinética da reação, foram feitos experimentos para avaliar a influência da variação do percurso analítico. Variou-se o comprimento da bobina de reação B₂ de 50 a 200 cm, referentes aos volumes de 250 a 1000 µl, respectivamente.

Os resultados da Figura 4.8 revelaram que a variação do comprimento da bobina B₂ não apresentou ganho significativo na sensibilidade. Assim sendo, optou-se pelo emprego da bobina de reação de menor comprimento visando a redução do consumo de reagente e aumento da frequência analítica.

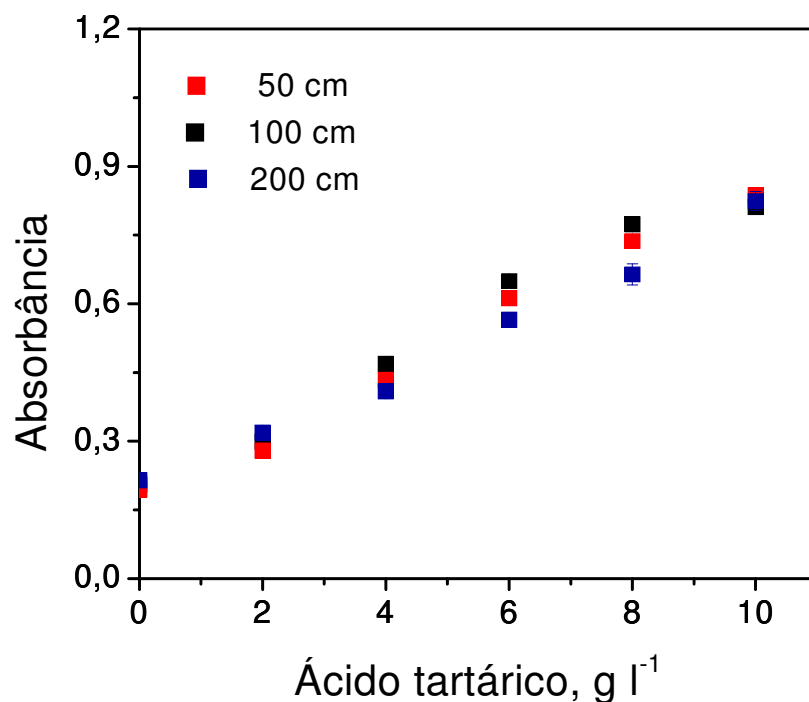


FIGURA 4.8 – Influência da variação do comprimento do percurso analítico. Comprimentos estudados e suas respectivas equações: ■ 50 cm: $y = 0,179 + 0,065x$ ($r=0,998$); ■ 100 cm: $y = 0,206 + 0,060x$ ($r=0,994$); ■ 200 cm: $y = 0,193 + 0,056x$ ($r=0,995$); onde y = Absorbância; x = concentração de ácido tartárico em $g\ l^{-1}$. Volumes das soluções da amostra e do reagente: 10 e 408 µl, respectivamente.

4.3.6 - Estudo do Número de Ciclos

Com a definição do emprego da bobina de reação B₂ de 50 cm, correspondente a ¼ da bobina empregada originalmente, foi necessário reduzir o número de ciclos de inserção da solução do reagente. Para isso variou-se o número de ciclos de 2 a 4, mantendo-se o volume de cada ciclo. As curvas analíticas, apresentadas na Figura 4.9, demonstraram que o uso de três ciclos proporcionou sensibilidade suficiente para a determinação do analito e um consumo de reagente de 153 µl por determinação. Desta forma, reduziu-se a razão amostra – reagente de 1:32, adotada no início do trabalho, para 1:15.

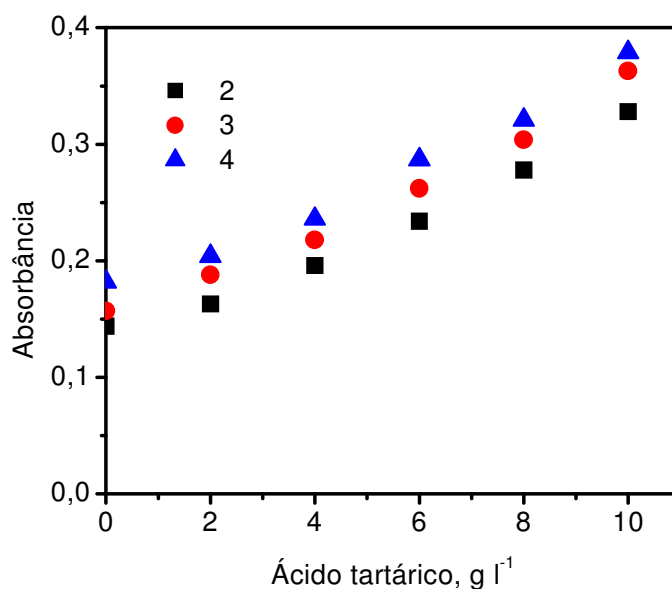


FIGURA 4.9 – Influência da variação do número de ciclos de amostragem. Número de ciclos estudados e suas respectivas equações: ■ 2 ciclos: $y = 0,131 + 0,019x$ ($r=0,997$); ● 3 ciclos: $y = 0,147 + 0,020x$ ($r=0,997$); ▲ 4 ciclos: $y = 0,169 + 0,020x$ ($r=0,994$); onde y = Absorbância; x = concentração de ácido tartárico em $g\ l^{-1}$. Volume da solução da amostra: 10 µl.

4.3.7 - Estudo da Concentração de Vanadato

Os procedimentos em fluxos propostos na literatura fazem uso de diferentes concentrações da solução de vanadato. Recentemente, SILVA *et al.* aplicando otimização por simplex, obtiveram uma sensibilidade de 26,47 mAU g⁻¹ para uma faixa de concentração de 0,5 e 7 g l⁻¹ de ácido tartárico ($r = 0,9988$) empregando uma concentração de 7,8 mmol l⁻¹ de vanadato.¹⁷² Nesse sentido, foi avaliada a influência da concentração de vanadato na solução do reagente, variando-se a concentração de 6,6 a 16 mmol l⁻¹, apresentado na Figura 4.10. Constatou-se que o aumento da concentração de vanadato apresentou um aumento da leitura do branco que resultou em um ganho desproporcional em relação ao aumento da concentração de vanadato. Tomando-se, por exemplo, às concentrações extremas verificou-se um ganho de 32% na sensibilidade para uma elevação de 142% na concentração da solução de vanadato. Escolheu-se a concentração 8,2 mmol l⁻¹ de vanadato de sódio por apresentar um ganho de sensibilidade ca 40% sobre a menor concentração de vanadato estudada. Nestas condições obteve-se uma faixa linear de 2,0 a 10,0 g l⁻¹ de ácido tartárico, representada pela equação $Abs = 0,171 \pm 0,009 + 0,044 \pm 0,001 C$ ($r = 0,9982$), onde C é a concentração de ácido tartárico em g l⁻¹.

4.3.8 - Determinação de Ácido Tartárico em Amostras de Vinho

Aplicando-se a seqüência de análise descrita na Tabela 4.1, empregou-se os parâmetros otimizados para o sistema em fluxo e construiu-se uma curva analítica com soluções de referência de 0,50 a 14,0 g l⁻¹ de ácido tartárico. Nessas condições, obteve-se uma resposta linear na faixa de 0,50 a 10,0 g l⁻¹ de ácido tartárico, com coeficiente de correlação de 0,9998, representado pela equação $Abs = 0,206 \pm 0,001 + 0,0404 \pm 2,76 \times 10^{-4} C$, onde C é a concentração de ácido tartárico em g l⁻¹.

Em seguida, aplicou-se em amostras reais, demonstrados pelos sinais apresentados na Figura 4.11. Os resultados obtidos, foram comparados com os do método de referência, conforme Tabela 4.2.

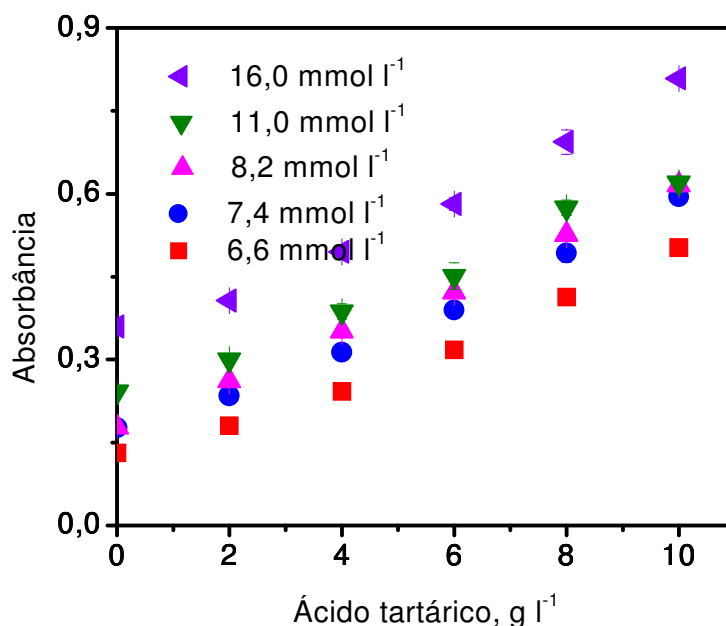


FIGURA 4.10 – Influência da variação da concentração da solução de vanadato. Concentrações estudadas e suas respectivas equações: ■ 6,6 mmol l⁻¹: $y = 0,127 + 0,032x$ ($r=0,989$); ● 7,4 mmol l⁻¹: $y = 0,172 + 0,035x$ ($r=0,995$); ▲ 8,2 mmol l⁻¹: $y = 0,171 + 0,044x$ ($r=0,998$); ▼ 11,0 mmol l⁻¹: $y = 0,241 + 0,038x$ ($r=0,999$); ◆ 16,0 mmol l⁻¹: $y = 0,357 + 0,041x$ ($r=0,985$); onde y = Absorbância; x = concentração de ácido tartárico em g l⁻¹. Volumes das soluções da amostra e do reagente: 10 e 153 μ l, respectivamente.

TABELA 4.1 – Seqüência das etapas para determinação de ácido tartárico em vinhos

Etapa	Vazão		Descrição	Tempo			
	μ l s ⁻¹			V_1^*	V_2^*	V_3^*	(s)
1	17		Inserção da amostra	1	0	0	0,6
2	17		Deslocamento da amostra	0	0	0	2
3 [#]	17		Deslocamento da amostra	0	0	0	1
4 [#]	17		Inserção da solução do reagente	0	0	1	3
5	17		Tempo de leitura e limpeza	0	0	0	80

* 0 = válvula desligada; 1 = válvula acionada; [#] etapas repetidas em 3 ciclos

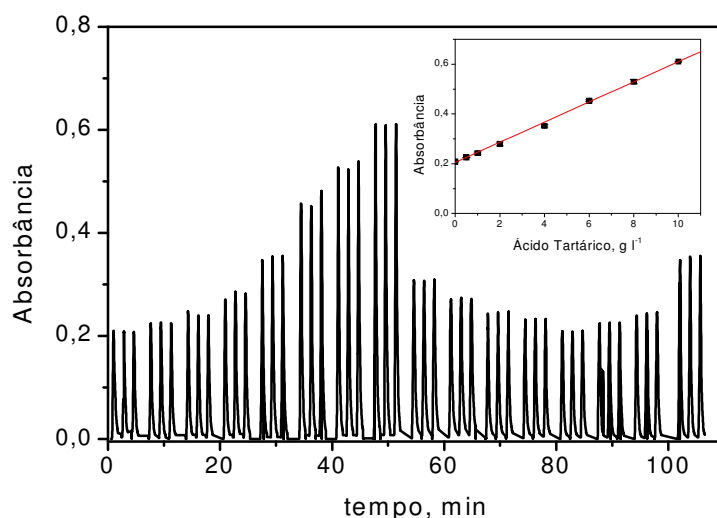


FIGURA 4.11 – Registro dos sinais. Da esquerda para a direita sinais transientes relativos ao branco e soluções de referência contendo 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10,0 g l⁻¹ de ácido tartárico, seguidos de quatro amostras de vinho e soluções de referência contendo 0,50; 1,0; 2,0; 4,0 g l⁻¹ de ácido tartárico.

TABELA 4.2 – Comparação dos resultados do teor de ácido tartárico em amostras de vinho

Amostra	Método proposto, Ácido tartárico, g l ⁻¹	Método de referência, Ácido tartárico, g l ⁻¹
1 ^a	2,53 ± 0,02	2,48 ± 0,06
2 ^a	1,63 ± 0,02	1,59 ± 0,05
3 ^b	0,97 ± 0,05	1,02 ± 0,08
4 ^b	0,66 ± 0,01	0,62 ± 0,04
5 ^a	1,54 ± 0,06	1,50 ± 0,08
6 ^a	1,84 ± 0,03	1,95 ± 0,08
7 ^a	2,22 ± 0,05	2,25 ± 0,15
8 ^a	0,79 ± 0,02	0,80 ± 0,05
9 ^b	0,54 ± 0,02	0,60 ± 0,05

¹ Média de três consecutivas determinações ± desvio padrão

^a Vinho tinto ; ^b Vinho branco.

A Figura 4.12 demonstra a boa correlação entre os métodos apresentando coeficientes angular e linear tendendo a 1, 0 e 0,0, respectivamente.

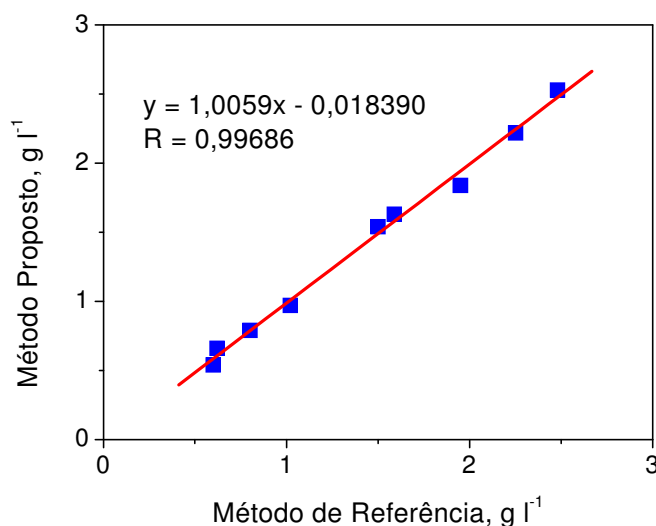


FIGURA 4.12 – Curva de correlação do método empregando multicomutação para determinação de ácido tartárico em função do método de referência.

O sistema apresentou um coeficiente de variação de 2,1% ($n = 18$) para uma amostra de vinho contendo $1,84 \text{ g l}^{-1}$ de ácido tartárico; limites de detecção e quantificação de $0,046 \text{ g l}^{-1}$ e $0,15 \text{ g l}^{-1}$ de ácido tartárico, respectivamente; baixo consumo de reagente: $2,4 \text{ mg}$ de NaOH; $150 \text{ }\mu\text{g}$ de NaVO_3 e $12,4 \text{ }\mu\text{g}$ de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ por determinação e uma frequência analítica de 28 determinações por hora, considerando-se o tempo despendido na troca da amostra.

4.4 – CONCLUSÃO

O emprego da multicomutação na determinação de ácido tartárico permitiu a determinação do analito em amostras de vinho sem tratamento prévio, efetuando-se a diluição da amostra em linha. A reação do ácido tartárico com o vanadato mostrou-se estável e sensível, permitindo a aplicação do procedimento em amostras com diferentes concentrações. Em comparação aos procedimentos

anteriores¹⁷⁰⁻¹⁷² o método proposto apresentou uma redução do consumo de reagente > 65% por determinação. Os resultados não apresentaram diferença significativa em nível de 90% quando se aplicou o teste t emparelhado.⁹²

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO

5.1 - CONCLUSÃO

Ao término deste trabalho, conclui-se que o emprego da multicomutação permitiu a análise de diferentes analitos em vinhos com uma boa precisão. Foi possível executar as análises com todas as etapas controladas através do *programa computacional*. Devido à diferença das concentrações dos analitos, diferentes estratégias de diluição em linha foram empregadas, alcançando-se os resultados desejados. Adicionalmente, os sistemas propostos, após otimização, apresentaram sensibilidade e linearidade compreendendo as faixas de concentrações de etanol, glicerol e ácido tartárico, presentes nos vinhos. A multicomutação, mais uma vez, proporcionou uma redução do consumo de amostra e reagente, gerando menor volume de efluente.

O uso de enzimas imobilizadas para a determinação de etanol e glicerol mostrou-se bastante viável. A *álcool oxidase* apresentou maior instabilidade, proporcionando perdas gradativas da atividade nos primeiros trinta dias de uso freqüente. A *glicerol desidrogenase*, mostrou-se mais estável durante o período de uso. Embora com perfis diferentes, ambas as enzimas, apresentaram vida útil por *ca* 3 meses, com uso freqüente, totalizando *ca* 1500 determinações. Ademais, devido à seletividade das enzimas, seu uso mostrou-se apropriado, minimizando o efeito dos potenciais interferentes. Entretanto, ressalta-se que o uso de enzimas purificadas no Brasil é dificultado pelas barreiras da importação, em virtude da indisponibilidade no comércio nacional. Sendo um material perecível e que necessita de cuidados especiais, uma provável perda no decorrer no processo de compra é possível de ocorrer.

Os procedimentos propostos apresentam potencial para serem aplicados em análise de rotina, em laboratórios de controle de qualidade da produção de vinhos. Observadas as características inerentes de cada um dos procedimentos, é possível a determinação destes analitos aplicados em outras matrizes, onde seus controles sejam necessários.

Os procedimentos propostos apresentaram resultados bastante precisos e concordantes com os métodos oficiais. Quando comparados aos métodos oficiais, os procedimentos apresentaram vantagens tais como: maior rapidez, resultando em maior frequência analítica; simplicidade; facilidade de operação; menor manuseio da amostra; menor consumo de amostra e reagentes, proporcionando menor geração de efluentes.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JONHSON, H. *A Historia do Vinho*. São Paulo, Companhia das Letras, 1999.
2. GUASCH-JANE M. R.; IBERN-GOMEZ, M.; ANDRES-LACUEVA, C; JAUREGUI, O. & LAMUELA-RAVENTOS, R. M. "Liquid chromatography with mass spectrometry in tandem mode applied for the identification of wine markers in residues from ancient Egyptian vessels" *Anal. Chem.* **76** (6): 1672, 2004.
3. Disponível em: <http://www.academiadovinho.com.br/> acessado em 19/07/2004.
4. PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. & MELO, L. M. R. "A vitivinicultura Brasileira: Realidade e Perspectivas" Artigos Técnicos (on line). Disponível: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/produtos/publicacoes/artigos/vitivinicultura.html>> acessado em 19/07/2004.
5. MELO, L. M. R. "Produção e Comércio Mundial de Vinhos" Artigos Técnicos (on line). Disponível: <http://www.cnpuv.embrapa.br/produtos/publicacoes/artigos/producao.pdf>. acessado em 19/07/2004.
6. Disponível em: <http://webofscience.com/> acessado em 19/07/2004.
7. RICARDO, C. P. P. & TEIXEIRA, A. R. N. *Enzimas*. 4a ed. Lisboa, Didáctica Editora, 1993.
8. LIMA, A. W. O. & ANGNES, L. "Biotálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica" *Quím. Nova*, **22**(2): 229, 1999.
9. TREVAN, M. D. *Immobilized Enzymes- An Introduction and applications in Biotechnology*". New York : J. Wiley, 1980.
10. RUZICKA, J. & HANSEN, E. H. "Flow injection analyses .1. New concept of fast continuous-flow analysis" *Anal. Chim. Acta*, **78**(1): 145, 1975.
11. REIS, B.F.; GINE, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & LAPA, R. A. "Multicommutation in flow-analysis .1. Binary sampling - concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests " *Anal. Chim. Acta*, **293** (1-2): 129, 1994.

12. ICARDO, M.C.; MATEO, J. V. G. & CALATAYUD, J. M. "Multicommutation as a powerful new analytical tool" *Trac-Trends In Analytical Chemistry*, **21** (5): 366-378 MAY 2002.
13. ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. & SANTOS, J. L.M. "Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends" *Anal. Chim. Acta*, **468** (1): 119, 2002.
14. CURVELO-GARCIA, A. S. *Controlo de Qualidade dos Vinhos – Química Enológica – Métodos Analíticos*. Lisboa, Instituto da Vinha e do Vinho, 1988.
15. Disponível em: <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/vinho/processos.html> acessada em 7/4/2004.
16. MATAIX, E. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection". *Talanta*, **51**(3): 489, 2000.
17. US Internal Revenue Service, *Wine*, Part 240 of Title 26, IRS Publi. nº 146, Code of Federal regulations. US Gov. Printing Office, Washington, DC, 1970.
18. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapes.br:2222/trnsform.php> acessada em 04/06/2004.
19. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ-JUAN, P. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Determination of ethanol in beverages by flow injection, pervaporation and density measurements". *Talanta*, **59**(4): 691, 2003.
20. Office International de la Vigne e du Vin (OIV). *Recueil des Methods Internationals D'analyse des Vins et des Moûts*. Edition Officiale. Paris, O.I.V., 1990.
21. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC), *Official Methods of Analysis* 16a ed., AOAC International, 1995.
22. ANTONELLI, A. "Ethanol determination by packed GLC: a quick method with small sample amount and high sensitivity". *Vitic. Enol. Sci.*, **49**: 165, 1994.
23. CAPUTI, A. J. & MOONEY, D. P. "Gas chromatography determination of ethanol in wine: Collaborative study". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**: 1152, 1983.
24. STACKLER, R. & CHRISTENSEN, E. N. "Quantitative determination of ethanol in wine by gas chromatography". *Am. J. Enol. Vitic.*, **25**: 202, 1974.
25. WANG, M. L.; CHOONG, Y. M.; SU, N. W. & LEE, M. H. "A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography". *J. Food and Drug Anal.*, **11** (2): 133, 2003.

26. NAKAJIMA, R.; YARITA, T. & SHIBUKAWA, M. "Analysis of alcohols by superheated water chromatography with flame ionization detection" *Bunseki Kagaku*, **52**(5): 305, 2003.
27. YARITA, T.; NAKAJIMA, R.; OTSUKA, S.; IHARA, T.; TAKATSU, A. & SHIBUKAWA, M. "Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as mobile phase" *J. Chromatog. A*, **976**(1-2): 387, 2002.
28. KUPINA, S. A. "A simultaneous quantitation of glycerol, acetic acid and ethanol in grape juice by high performance liquid chromatography". *Am. J. Enol. Vitic.*, **35**: 59. 1984.
29. STACKLER, B. & CHRISTENSEN, E. N. "Quantitative-determination of ethanol in wine by gas-chromatography" *Am. J. Enol. Viticult.*, **25**(4): 202, 1975.
30. MATAIX, E. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Pervaporation prior to gas chromatography for the determination of enological parameters" *Chromatographia*, **52**(3-4): 205, 2000.
31. WARRINER, K.; MORRISEY, A.; ALDERMAN, J.; KING, G.; TRELOAR, P. & VADGAMA, P. M. "Modified microelectrode interfaces for in-line electrochemical monitoring of ethanol in fermentation processes". *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **84**: 200, 2002.
32. NICULESCU, M.; ERICHSEN, T.; SUKHAREV, V.; KERENYI, Z.; CSOREGI, E. & SCHUHMANN, W. "Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation" *Anal. Chim. Acta*, **463**(1): 39, 2002.
33. CHEN, Z. L.; YU, J. J. & HIBBERT, D. B. "Flow injection, amperometric determination of ethanol in wines after solid-phase extraction" *Electroanalysis*, **9**(7): 541, 1997.
34. KATRLIK, J.; SVORC, J.; STRED' ANSKY, M. & MIERTUS, S. "Composite alcohol biosensors based on solid binding matrix" *Biosens. & Bioelectron.*, **13**(2): 181, 1998.
35. SANTOS, A. S.; FREIRE, R. S & KUBOTA, L. T. "Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on Meldola's blue absorbed on silica gel modified with niobium oxide". *J. Electroanal. Chem.*, **547**: 135, 2003.
36. NICULESCU, M.; MIELIAUSKIENE, R.; LAURINAVICIUS, V. & CSÖREGI, E. "Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors". *Food. Chem.*, **82**: 481, 2003.
37. TARNOWSKI, D.J. & KORZENIEWSKI, C. "Amperometric detection with membrane-based sampling for percent-level determinations of ethanol" *Anal. Chim. Acta*, **332**(2-3): 111, 1996.

38. MOHNS, J. & KUNNECKE, W. "Biosensors in automated analysis systems .1. Determination of ethanol in beer and wine by flow-diffusion analysis and amperometric detection" *Deust. Lebens.-Rundsch.*, **92**(1): 1, 1996.
39. ROTARIU, L. & BALA, C. "New type of ethanol microbial biosensor based on a highly sensitive amperometric oxygen electrode and yeast cells" *Anal. Lett.*, **36**(11): 2459, 2003.
40. ESTI, M.; VOLPE, G.; COMPAGNONE, D.; MARIOTTI, G.; MOSCONE, D. & PALLESCHI, G. "Monitoring alcoholic fermentation of red wine by electrochemical biosensors" *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**(1): 39, 2003.
41. KOKOVKIN, V. V. & SMOLYAKOV, B. S. Ethanol determination in aqueous solutions and wine stocks by potentiometry with ion selective electrodes". *J. Anal.Chem.*, **50**: 569, 1995.
42. SIMONET, B. M.; RIOS, A. & VALCARCEL, M. "Analytical potential of enzyme-coated capillary reactors in capillary zone electrophoresis" *Electrophoresis*, **25**(1): 50, 2004.
43. COLLINS, T. S.; MILLER, C. A.; ALTRIA, K. D. & WATERHOUSE, A. L. "Development of a rapid method for the analysis of ethanol in wines using capillary electrophoresis" *Am. J. Enol. Vitic.*, **48** (3): 280, 1997.
44. SANFORD, C. L. & MANTOOTH, B. A. "Determination of ethanol in alcohol samples using a modular Raman spectrometer". *J. Chem. Edu.*, **78**: 1221, 2001.
45. MENDES, L. S.; OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. & RUBIM, J. C. "Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier Transform (FT)-Near Infrared and FT-Raman Spectrometries" *Anal. Chim. Acta*, **493**(2): 219, 2003.
46. GALLIGNANI, M.; GARRIGUES, S. & DE LA GUARDIA, M. "Derivative fourier-transform infrared spectrometric determination of ethanol in alcoholic beverages" *Anal. Chim. Acta*, **287**(3): 275, 1994.
47. VAN DEN BERG, F. W. J.; VAN OSENBRUGGEN, W. A. & SMILDE A. K. "Process analytical chemistry in the distillation industry using near-infrared spectroscopy" *Proc. Contr. Qual.*, **9**: 51, 1997.
48. MARSHALL, R. W. & GIBSON, T. D. "Determination of sub-nanomole amounts of hydrogen-peroxide using an immobilized enzyme flow cell - application to the determination of ethanol" *Anal.Chim. Acta*, **266**(2): 309, 1992.
49. XIE, X. F; SULEIMAN, A. A.; GUILBAULT, G. G.; YANG, Z. & SUN, Z. "Flow-injection determination of ethanol by fiber-optic chemiluminescence measurement" *Anal. Chim. Acta*, **266**(2): 325(1992).

50. MATTOS, I. L.; FERNANDEZ-ROMERO, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCÁRCEL, M. "Simultaneous spectrofluorimetric determination of glycerol and ethanol in wine by flow injection using immobilized enzymes" *Analyst*, **120**(1): 179, 1995.
51. SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C. & RANGEL, A. O. S. S. "Automatic flow systems based on sequential injection analysis for routine determinations in wines" *Anal. Chim. Acta*, **513**(1): 3, 2004.
52. SEGUNDO, M. A & RANGEL, A. O. S. S. "Sequential injection flow system with improved sample throughput: determination of glycerol and ethanol in wines" *Anal. Chim Acta*, **458**(1): 131, 2002.
53. RANGEL, A. O. S. S. & TOTH, I. V. "Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection" *Anal. Chim Acta*, **416**(2): 205, 2000.
54. RANGEL, A. O. S. S. & TOTH, I. V. "Determination of ethanol in wines by flow injection spectrophotometry using gas-diffusion and an immobilized enzyme reactor" *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**(3): 259, 1999.
55. SASAKI, Y.; TAGASHIRA, S.; MURAKAMI, Y. & KAI, S. "Analytical application of o,o'-dialkyl dithiophosphate .9. Spectrophotometric determination of the alcohol content of alcoholic drinks with bis(o,o'-dipropyl dithiophosphato)nickel(II)" *Anal. Sci.*, **9**(4): 483, 1993.
56. PILONE, G. J. "Determination of ethanol in wine by titrimetric and spectrophotometric dichromate methods - collaborative study" *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**(2): 188, 1985.
57. CAPUTI, A.; UEDA, M. & BROWN, T. "Spectrophotometric determination of ethanol in wine" *Am. J. Enol. Vitic.*, **19**(3): 160, 1968.
58. LUQUE DE CASTRO, M. D. & GARCIAMESA, J. A. "Potential of flow-injection methodology for beverage analysis" *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**(1): 93, 1992.
59. LUQUE DE CASTRO, M. D. & LUQUE-GARCIA, J. L. "Biosensors in wine production monitoring" *Anal. Letters*, **33**(6): 963, 2000.
60. SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F.C. & RANGEL, A. O. S. S. "Automatic flow systems based on sequential injection analysis for routine determinations in wines" *Anal. Chim. Acta* **513**(1): 3, 2004.
61. MCCLOSKEY, L. P. & REPLOGLE, L. L. "Evaluation of an enzymatic method for estimating ethanol in wines using an enzyme kit". *Am. J. Enol. Vitic.*, **25**: 194, 1974.
62. LOBO, M. J.; MIRANDA, A. J. & TUNON, P. "Flow-injection analysis of ethanol with an alcohol dehydrogenase-modified carbon past electrode" *Electroanalysis*, **8**(10): 932, 1996.

63. REBELO, M. J. F.; COMPAGNONE, D.; GUILBAULT, G. G. & LUBRANO, G. J. "Alcohol electrodes in beverage measurements" *Anal. Letters*, **27**(15): 3027, 1994.
64. WANGSA, J. & DANIELSON, N. D. "Enzymatic determination of ethanol by flow-injection analysis using a kelf wax carbon paste electrode" *Electroanalysis*, **3**(7): 625, 1991.
65. MORI, H.; SEKINE, Y. & TAKAHASHI, Y. "Simultaneous determination of ethanol and acetaldehyde in liquor using a flow system composed of two enzyme reactors and an octadecylsilica column" *J. Health Sci.* **49**(1): 55, 2003.
66. LÁZARO, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCÁRCEL, M. "Individual and simultaneous enzymatic determination of ethanol and acetaldehyde in wines by flow injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **185**: 57, 1986.
67. MOHNS, J & KÜNNECKE, W. "Flow analysis with membrane separation and time based sampling for ethanol determination on beer and wine". *Anal. Chim. Acta*, **305**(1-3): 241, 1995.
68. MATTOS, I. L.; FERNANDEZROMERO, J. M.; DECASTRO, H. D. L. & VALCÁRCEL, M. "Simultaneous spectrofluorometric determination of glycerol and ethanol in wine by flow-injection using immobilized enzymes" *Analyst*, **120**(1): 179, 1995.
69. MATSUMOTO, K.; MATSUBARA, H.; HAMADA, M. & OSAJIMA, Y. "Simultaneous determination of glucose, ethanol, glycerol and sulfite in white wine by flow-injection analysis including parallel configuration of immobilized enzyme columns" *J. Japanese Soc. Food Sci. and Tech.*, **38**(8): 699, 1991.
70. MASON, M. "Report of the technical subcommittee on ethanol determination via immobilized enzyme". *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **41**: 89, 1983.
71. MASON, M. "Ethanol determination in wine with an immobilized enzyme electrode". *Am. J. Enol. Vitic.*, **34**:173, 1983.
72. AMADOR-HERNANDEZ, J. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Pervaporation: a useful tool in food analysis" *Food Chem.*, **68**(4): 387, 2000.
73. LUQUE DE CASTRO, M. D.; LUQUE-GARCIA, J. L. & MATAIX, E. "Analytical pervaporation: A key technique in the enological laboratory" *J. AOAC Intern.*, **86**(2): 394, 2003.
74. GONZALEZ-RODRIGUEZ, J.; PEREZ-JUAN, P. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Determination of ethanol in beverages by flow injection, pervaporation and density measurements" *Talanta*, **59**(4): 691, 2003.
75. MATAIX, E. & LUQUE DE CASTRO, M. D. "Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection" *Talanta*, **51**(3): 489, 2000.

-
76. DELGADO-REYES, F.; PAPAESTATHIOU, I.; ROMERO, J. M. F. & LUQUE LUQUE DE CASTRO, M. D. "Monitoring ethanol production during wine fermentation processes by a pervaporation enzymic derivatisation approach" *Analyst*, **123**(11): 2367, 1998.
 77. MATTOS, I. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCARCEL, M. "Pervaporation - an integrated evaporation gas-diffusion approach to analytical continuous separation techniques" *Talanta*, **42**(5): 755, 1995.
 78. VIEIRA, J. A.; RAIMUNDO, I. M.; REIS, B. F.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. & ARAUJO, N. N. " Monosegmented flow potentiometric titration for the determination of chloride in milk and wine" *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**(2): 259, 2003.
 79. BORGES, E. P.; MARTELLI, P.B. & REIS, B. F. "Automatic stepwise potentiometric titration in a monosegmented flow system" *Mikrochim. Acta*, **135**(3-4): 179, 2000.
 80. COMITRE, A. L. D. & REIS, B. F. "Automatic multicommutated flow system for ethanol determination in alcoholic beverages by spectrophotometry" *Lab. Robotics Automat.*, **12**(1): 31, 2000.
 81. BORGES, E. P.; FERNANDES, E. N.; ROCHA, F. R. P. & REIS, B. F. "Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência". *Quim. Nova*, **25** (6B): 1191, 2002.
 82. MASOOM, M. & TOWNSHEND, A. "Determination of glucose in blood by flow injection analysis and an immobilized glucose oxidase column". *Anal. Chim. Acta*, **166**(DEC): 111, 1984.
 83. RUZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCÁRCEL M. "Flow-injection analysis – use of immobilized enzymes for the determination of ethanol in serum". *Analyst*, **112**: 259, 1987.
 84. TANIAI, T.; SUKURAGAWA, A. & OKUTANI, T. "Fluorometric determination of ethanol in liquor samples by flow-injection analysis using immobilized enzyme-reactor column with packing prepared by coupling alcohol oxidase and peroxidase onto chitosan beads". *Journal of AOAC International*, **84**(5): 1475, 2001.
 85. PROVESTA. *Technical Report on Alcohol Oxidase*, Provesta, Bartlesville, OK, 1991.
 86. PUCHADES, R.; LEMIEUX, L. & SIMARD, R. E. "Determination of free amino-acids in cheese by flow-injection analysis with an enzymatic reactor and chemiluminescence detector" *J. Food Sci.*, **55**(6): 1555, 1990.
 87. SHAW, F. "Development and construction of an analyzer for the determination of the hydrogen-peroxide content of natural-water using a chemi-luminescent reaction" *Analyst*, **105**(1246): 11, 1980.

88. MARSHALL, R. W. & GIBSON, T. D. "Determination of sub-nanomole amount of hydrogen peroxide using an immobilized enzyme flow cell". *Anal. Chim. Acta*, **266**(2): 309, 1992.
89. HUANG, Y. L.; KIM, J. M. & SCHMID, R. D. "Determination of sulfite in wine through flow-injection analysis based on the suppression of luminol chemiluminescence" *Anal. Chim. Acta*, **266** (2): 317, 1992.
90. REIS, B. F.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J.; KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN FILHO, H., & PESSEDA, L. C. R. "Zone-sampling processes in flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **123**(JAN): 221, 1981.
91. Analytical Methods Committee. "Recommendations of the definition, estimation and use of the detection limit". *Analyst*, **112**: 199, 1987.
92. CHRISTIAN, G. D. *Analytical Chemistry*, 5a ed. New York, Wiley, 1994. cap. 3.
93. COMPAGNONE, D.; ESTI, M.; MESSIA, M. C.; PELUSO, E. & PALLESCHI, G. "Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation" *Biosen. Bioelectron.*, **13**(7-8): 875, 1998.
94. RIBÉREAU-GAYON, J. GLORIES, Y. MAUJEAN, A. & DUBOURDIEU, D. *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*. New York, Wiley, Toronto, 1998; vol. 1.
95. LUBBERS, S. VERRET, C. & VOILLEY, A. "The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine" *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **34**(4): 262, 2001.
96. RIBÉREAU-GAYON J. PEYNAUD, E. DSUDRAUD, P. & RIBÉREAU-GAYON, P. *Sciences et Techniques du Vin. Tome 1 – Analyse et Contrôle des Vins*. Dunod, Paris, 1982.
97. CAPUTI, A.; CHRISTENSEN, E.; BIEDENWEG, N. & MILLER, S. "Liquid-chromatographic method for determination of glycerol in wine and grape juice - collaborative study" *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**(3): 379, 1992.
98. WALKER, T.; MORRIS, J.; THRELFALL, R. & MAIN, G. "Analysis of wine components in cynthiana and syrah wines" *J. Agric. Food Chem.*, **51**(6): 1543, 2003.
99. CHINNICI, F. SPINABELLI, U. & AMATI, A. "Simultaneous determination of organic acids, sugars, and alcohols in musts and wines by an improved ion-exclusion HPLC method" *J. Liq. Chromatog. Related Technologies*, **25**(16): 2551, 2002.
100. 100.BRANDOLINI, V.; SALZANO, G.; MAIETTI, A.; CARUSO, M.; TEDESCHI, P.; MAZZOTTA, D. & ROMANO, P. "Automated multiple development method for determination of glycerol produced by wine yeasts" *World J. Microbiol. & Biotech.*, **18**(5): 481, 2002.

101. CASTELLARI, M.; SARTINI, E.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C. & GALASSI, S. "Determination of carboxylic acids, carbohydrates, glycerol, ethanol, and 5-HMF in beer by high-performance liquid chromatography and UV-Refractive index double detection" *J. Chromatog. Sci.*, **39**(6): 235, 2001.
102. PARPINELLO, G. P. & VERSARI, A. "A simple high-performance liquid chromatography method for the analysis of glucose, glycerol, and methanol in a bioprocess" *J. Chromatog. Sci.*, **38**(6): 259, 2000.
103. CASTELLARI, M.; VERSARI, A.; SPINABELLI, U.; GALASSI, S. & AMATI, A. "An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines" *J. Liq. Chromatog. Related Technologies*, **23** (13): 2047, 2000.
104. WAGNER, K. & RAPP, A. "Influence of yeasts on the formation of 2-phenylethanol during the alcoholic fermentation" *Deut. Lebens.-Runds.*, **95**(8): 304, 1999.
105. SAVCHUK, S. A.; BRODSKII, E. S. & FORMANOVSKII, A. A. "Determination of glycols in potable water and alcoholic beverages by gas chromatography and chromatography-mass spectrometry" *J. Anal. Chem.*, **54**(8): 741, 1999.
106. VONACH, R.; LENDL, B. & KELLNER, R. "High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines" *J. Chromatog. A*, **824**(2): 159, 1998.
107. ESCOBAL, A.; IRIONDO, C.; LABORRA, C.; ELEJALDE, E. & GONZALEZ, I. "Determination of acids and volatile compounds in red Txakoli wine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography" *J. Chromatog. A*, **823**(1-2): 349, 1998.
108. GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G.; ZORRO, L.; CARRASCAL, V. & PEREZ-BUSTAMANTE, J. A. "Organic acids analysis in "Brandy de Jerez" ion-exclusion chromatography, "post-column" buffering and conductimetric detection" *Analisis*, **26**(4): 186, 1998.
109. LINGET, C.; NETTER, C.; HEEMS, D. & VERETTE, E. "On-line dialysis with HPLC for the automated preparation and analysis of amino acids, sugars and organic acids in grape juice and wines" *Analisis*, **26**(1): 35, 1998.
110. LOPEZ T. E.; PUIGDEU, M. A.; TEIXEIRA, E. & BUXADERAS, S. "Organic acids, sugars, and glycerol content in white winemaking products determined by HPLC: Relationship to climate and varietal factors" *Am. J. Enol. Viticult.*, **47**(2): 193, 1996.
111. KLEIN, H. & LEUBOLT, R.; "Ion-exchange high-performance liquid-chromatography in the brewing industry" *J. Chromatog.*, **640**(1-2): 259, 1993.
112. FORCEN, M.; MULET, A. & BERNA, A. "Contribution of gas-chromatographic and conventional data to the characterization of majorcan musts and wines by

- means of pattern-recognition techniques” *J. Sci. Food Agricult.*, **60**(2): 229, 1992.
113. CALULL, M.; MARCE, R. M. & BORRULL, F. “Determination of carboxylic-acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchange high-performance liquid-chromatography with refractive-index detection” *J. Chromatog.*, **590**(2): 215, 1992.
114. PFEIFFER, P. & RADLER, F. “Determination of organic-acids, sugars, glycerol and ethanol in wine by high-performance liquid-chromatography with a cation-exchange resin” *Zeitsch. Lebens.*, **181**(1): 24, 1985
115. RAPP, A. & ZIEGLER, A. “Determination of sugars, glycerol, ethanol and carboxylic-acids in grape must and wine by means of high-pressure liquid-chromatography” *Deuts. Lebens.*, **75**(12): 396, 1979.
116. NIEUWOUDT, H. H.; PRIOR, B. A.; PRETORIUS, I. S.; MANLEY, M. & BAUER, F. F. “Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples” *J. Agric. Food Chem.*, **52**(12): 3726, 2004.
117. BUZAS, M. C.; CHIRA, N.; DELEANU, C. & ROSCA, S. “Identification and quantitative measurement by H-1-NMR spectroscopy of several compounds present in Romanian wines” *Revista Chimie* **54**(10): 831, 2003.
118. VONACH, R.; LENDL, B. & KELLNER, R. “High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines” *J. Chromatog. A*, **824**(2): 159, 1998.
119. SCHINDLER, R.; VONACH, R.; LENDL, B. & KELLNER, R. “A rapid automated method for wine analysis based upon sequential injection (SI)-FTIR spectrometry” *Fresen. J. Anal. Chem.*, **362**(1): 130, 1998.
120. HERMANN, A. “Determination of site specific D/H isotope ratios of glycerol from different sources by H-2-NMR spectroscopy” *Zeitsch. Lebens.*, **208**(3): 194, 1999.
121. GERVASIO, A. P. G.; BORGES, E. P.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; LAPA, R. A. S. & LIMA, J. L. F. C. “Potentiometric flow injection determination of glycerol in distilled spirits” *J. Agric. Food Chem.*, **50** (1): 74, 2002.
122. LUCA, G. C.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; ARAUJO, A. N. & LIMA, J. L. F. C. “Development of a potentiometric procedure for determination of glycerol and 2,3-butanediol in wine by sequential injection analysis” *Anal. Chim. Acta*, **366**(1-3): 193, 1998.
123. YAQOOB, M. & NABI, A. “Flow injection chemiluminescent assays for glycerol and triglycerides using a co-immobilized enzyme reactor”. *Luminesc.*, **18**(2): 67, 2003.

124. NAVAS, M.J. & JIMENEZ, A. M. "Chemiluminescent methods in alcoholic beverage analysis" *J. Agric. Food Chem.* **47**(1): 183, 1999.
125. KIBA, N.; AZUMA, N. & FURUSAWA, M. "Chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with co-immobilized glycerol dehydrogenase NADH oxidase" *Talanta* **43**(10): 1761, 1996.
126. KONDRUWEIT, S.; DREMEL, B. A. A. & SCHMID, R. D. "A new chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with immobilized glycerol dehydrogenase in combination with NADH oxidase" *Anal. Letters*, **27**(8): 1489, 1994.
127. PUCHADES, R.; LEMIEUX, L. & SIMARD, R. E. "Chemiluminescent assay for glycerol in wine using flow-injection". *J. Food Sci.*, **56**(4): 1097, 1991.
128. UWAJIMA, T.; SHIMIZU, Y. & TERADA, O. "Glycerol oxidase, a novel copper hemoprotein from aspergillus-japonicus - molecular and catalytic properties of the enzyme and its application to the analysis of serum triglycerides" *J. Biol. Chem.*, **259**(5): 2748, 1984.
129. UWAJIMA, T.; AKITA, H.; ITO, K.; MIHARA, A.; AISAKA, K. & TERADA, O. "Formation and purification of a new enzyme, glycerol oxidase and stoichiometry of the enzyme reaction". *Agric. Biol. Chem.*, **44**(2): 399, 1980.
130. NICULESCU, M.; SIGINA, S. & CSOREGI, E. "Glycerol dehydrogenase based amperometric biosensor for monitoring of glycerol in alcoholic beverages" *Anal. Letters*, **36** (9): 1721, 2003.]
131. NICULESCU, M.; MIELIAUSKIENE, R.; LAURINAVICIUS, V. & CSOREGI, E. "Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors" *Food Chem.*, **82**(3): 481, 2003.
132. GUPTA, A.; SINGH, V. K.; QAZI, G. N. & KUMAR, A. "Gluconobacter oxydans: Its biotechnological applications" *J. Molecular Microbiol. Biotechn.*, **3**(3): 445, 2001.
133. LIU, Z. H.; WEN, M. L.; YAO, Y.; SHI, N. H.; LIU, S. Q. & QIAO, M. "Bacteria-based sensor for monitoring glycerol" *Collect. Czechoslovak Chem. Communications*, **64**(9): 1412, 1999.
134. COMPAGNONE, D.; ESTI, M.; MESSIA, M. C.; PELUSO, E. & PALLESCHI, G. "Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation" *Biosens. & Bioelectron.*, **13**(7-8): 875, 1998.
135. CANIZARES, P. & LUQUE DE CASTRO, M. D. L. "Flow-through spectrofluorimetric sensor for the determination of glycerol in wine" *Analyst*, **120**(12): 2837, 1995.

136. MATSUMOTO, K.; MATSUBARA, H.; HAMADA, M.; DOI, T & OSAJIMA, Y. "Determination of glycerol in wine by amperometric flow injection analysis with an immobilized glycerol dehydrogenase reactor" *Agric. Biol. Chem.*, **55**(4): 1055, 1991.
137. KRONKA, E. A. M.; BORGES, P. R.; LATANZE, R.; PAIM, A. P. S. & REIS, B. F. "Multicommutated flow system for glycerol determination in alcoholic fermentation juice using enzymatic reaction and spectrophotometry" *J. Flow Injection Anal.*, **18**(2): 132, 2001.
138. Disponível em: www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/valmir/bioquimica/glicolise/NADH.html acessado em 23/06/2004.
139. BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM. UV-Method for Determination of Glycerol in Foodstuffs and Other Materials, 2003. p.1-4.
140. KREUTZ, F. H. "Enzimatische glycerinbestimmung" *Klin. Wochenschrift* **40**: 362, 1962.
141. LIN, E. C. C & MAGASANIK, B. "Activation of glycerol dehydrogenase from aerobacter-aerogenes by monovalent cations" *J. Biol. Chem.*, **235**(6): 1820, 1960.
142. MCGREGOR, W. G.; PHILLIPS, J. & SUELTER, C. H. "Purification and kinetic characterization of a monovalent cation-activated glycerol dehydrogenase from aerobacter-aerogenes" *J. Biol. Chem.*, **249**(10): 3132, 1974
143. BOYER, P. D. *The Enzymes*, Academic Press, New York, 3 ed. 1982, vol XI pt A.
144. BERGMAYER, U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 3a ed, 1986 vol II.
145. RIZZON, L. A. & MIELE, A. "Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha" *Ciência Rural*, **31**(5): 893, 2001.
146. LAMIKANRA, O. "Changes in organic acid composition during fermentation and aging of noble muscadine wine" *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 935, 1997.
147. NAVARRE, C. *L'Oenologie*. Paris, Lavoisier-Tec & Doc, 1991, p. 322.
148. USSEGLIO-TOMASSET, L. *Chimica Enologica*. Bressia, AEB, 1995, p.431.
149. LIMA, J. L. F. C. & RANGEL, A. O. S.S. "Enzymatic determination of L(-) malic and L(+) lactic acids in wine by flow injection analysis" *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**(1): 58, 1992.
150. FU, C. G.; SONG, L. N. & FANG, Y. Z. "Simultaneous determination of sugars and organics acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with

- amperometric detection at a disk-shaped copper” *Anal. Chim. Acta*, **341**(1): 81, 1998.
151. ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C. SARAIVA, M. L. M. F. S. & ZAGATTO, E. A. G. “A new approach to dialysis in sequential injection system: spectrophotometric determination of L(+)-lactate in wines” *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**(4): 428, 1997.
152. XIAOKAITI, A.; WANG, J. & ZAITONGGULI, D. “Indirect determination of tartaric acid in drinks by atomic absorption spectrometry” *Chinese J. Anal. Chem.*, **27**(9): 1115, 1999.
153. RADIN, L.; PRONZATO, C.; CASARETO, L. & CALEGARI, L. “Tartaric acid in wines may be useful for preventing renal calculi – rapid determination by HPLC” *J. Liq. Chromatogr.*, **17**(10): 2231, 1994.
154. KUPINA, S. A.; POHL, C. A. & GANNOTTI, J. L. “Determination of tartaric, malic and citric acids in grape juice and wine using gradient ion chromatography” *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**(1): 1, 1991.
155. MONGAY, C.; PASTOR, A. & OLMOS, C. “Determination of carboxylic acids and inorganic anions in wines by ion-exchange chromatography” *J. Chromatogr. A*, **736**: 351, 1996.
156. KOTANI, A.; MIYAGUCHI, Y.; TOMITA, E.; TAKAMURA, K. & KUSU, F. “Determination of organic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection during wine brewing” *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 1440, 2004.
157. PEREZ-RUIZ, T.; MARTINEZ-LOZANO, C.; TOMAS, V. & MARTIN, J. “High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection” *J. Chromatogr. A*, **1026**(1-2): 57, 2004.
158. ESTEVES, V. I.; LIMA, S. S.F.; LIMA, D. L. D. & DUARTE, A. C. “Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine” *Anal. Chim. Acta*, **513**(1): 163, 2004.
159. MALLET, S.; ARELLANO, M.; BOULET, J. C. & COUDERC, F. “Determination of tartaric acid in solid wine residues by capillary electrophoresis and indirect UV detection” *J. Chromatogr. A*, **853**: 181, 1999.
160. GODINHO, O. E. S.; SOUZA, N. E.; ALEIXO, L. M. & IVASKA, A. U. “Determination of tartaric acid and the sum of malic and citric acids in grapes juices by potentiometric titration”. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**(5): 1028, 1988.
161. HARTOFLYLAX, V. F.; EFSTATHIOU, C. E. & HADJIOANNOU T. P. “Kinetic-study of tartaric acid periodate reaction – determination of tartaric acid using an improved periodate-selective electrode” *Microchem. J.*, **33**(1): 9, 1986.

162. KRASNOVA, N. S.; GERHKOVICH, I. A.; KOZUB, G. I. & BABICH, V.V. "Determination of tartaric acid in wine by an indirect polarographic method" *J. Anal. Chem.- USSR*, **41**(2): 285, 1986.
163. PATZ, C. D.; BLIEKE, A.; RISTOW, R. & DIETRICH, H. "Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis" *Anal. Chim. Acta*, **513**(1): 81, 2004.
164. KUPINA S.A. & SHRIKHANDE, A. J. "Evaluation of a Fourier transform infrared instrument for rapid quality-control wine analyses" *Am. J. Enol. Viticult.*, **54**(2): 131, 2003.
165. AMERINE, M. A. & OUGH, C. S. *Methods for Analysis of Musts and Wines*. 2^a ed., New York, Wiley & Sons, 1988, p. 62-63.
166. REBELEIN, H. "Colorimetric method for the simultaneous determination of tartaric and lactic acids in wine and cider" *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **57**(2): 36, 1961.
167. PILONE, G. J. "Determination of tartaric acid in wine" *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**(2): 104, 1977.
168. HILL, G. & CAPUTI, A. "Colorimetric determination of tartaric acid in wine" *Am. J. Enol. Vitic.*, **21**(3): 153, 1970.
169. HE, Z.; LI, X.; MENG, H.; LU, S.; SONG, G.; YUAN, L & ZENG, Y. "Development of a chemiluminescence method for the simultaneous determination of ascorbic and tartaric acids based upon their reaction with cerium(IV) in the presence of rutheniumtris(dipyridine)" *Anal. Lett.*, **3**(9): 1553, 1998.
170. LÁZARO, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. & VALCÁRCEL, M. "Photometric determination of tartaric acid in wine by flow injection analysis" *Analyst*, **111**: 729, 1986.
171. RANGEL, A. O. S. S. & TÓTH I. V. "Sequential determination of titratable acidity and tartaric acid in wines by flow injection spectrophotometry" *Analyst*, **123**: 661, 1998.
172. SILVA, H. A. D. F. O. & ÁLVARES-RIBEIRO, L. M. B. C. "Optimization of flow injection analysis system for tartaric acid determination in wines" *Talanta*, **58**: 1311, 2002.
173. SPENDLEY, W.; HEXT, G.R. & HIMSWORTH, F.R. "Sequential application of simplex designs in optimisation and evolutionary operation" *Technometrics*, **4**(4): 441, 1962.
174. TSUKATANI, T & MATSUMOTO, K. "Quantification of L-tartrate in wine by stopped-flow" *Anal. Sci.*, **16**(3): 265, 2000.

-
175. SALES, M. G. F.; AMARAL, C. E. L. & MATOS, C. M. D. "Determination of tartaric acid in wines by FIA with tubular tartrate-selective electrodes" *Fresen. J. Anal. Chem.*, **369**(5): 446, 2001.
 176. ANDO, R. A.; RAMINELLI, C.; BARRETO, W. J. & TAKASHIMA, K. "Oxidation of two α -hidroxy acids by Vanadium(V)" *Monatsh. Chem.*, **134**: 1321, 2003.
 177. TAPSCOTT, R.E.; BELFORD R.L. & PAUL I.C. "Stereochemistry of tartrato(4-)-bridged binuclear complexes." *Coord. Chem. Rev.*, **4**: 323, 1969.
 178. KISS, T.; BUGLYÓ, P.; SANNA, D.; MICERA, G.; DECOCK, P. & DEWAELE, D. "Oxovanadium(IV) complexes of citric and tartaric acids in aqueous solution" *Inorg. Chim. Acta*, **239**: 145, 1995.
 179. HAHS, S. K.; ORTEGA, R. B.; TAPSCOTT, R. E.; CAMPANA, C. F. & MOROSIN, B. "Preparation, characterization, and stereochemistry of binuclear vanadyl(IV) monomethyl-tartrate(4-) and dimethyltartrate(4-) complexes and the crystal-structure of tetrasodium [μ -(+)-dimethyltartrato(4-)]- [μ -(-)-dimethyltartrato(4-)]-bis(oxovanadate(IV)) dodecahydrate " *Inorg. Chem.*, **21**: 664, 1982.
 180. PETTIT, L. D & SWASH J. L. M. "Complexes of D-, L-, DL-, and meso-tartaric acid with hydrogen and oxovanadium(IV) cations" *J. Chem. Soc. Dalton*, **4**: 286, 1978.
 181. HOLLAND R.M. & TAPSCOTT R.E. "Equilibria of vanadyl(IV) tartrates in aqueous-solution above pH-7" *J. Coord. Chem.*, **11**(1): 17, 1981.
 182. TAKASHIMA, K.; ZIGLIO, C. M. & RONCONI, C. M. "Kinetic and mechanistic aspects for the tartaric acid oxidation by vanadium(V) in sulfuric acid medium" *Int. J. Chem. Kinet.*, **30**(1): 55, 1998.
 183. KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; BAHIA, O.; JACINTHO, A. O. & JORGENSEN, S. S. "Turbidimetric determination of sulfate in plant digests and natural-waters by flow-injection analysis with alternating streams" *Anal. Chim. Acta.*, **145**(JAN): 179, 1983.
-

