



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química



EXPLORAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE SULFITO ASSISTIDA POR
ULTRA-SOM PARA A DETERMINAÇÃO INDIRETA DE AÇÚCARES
REDUTORES EMPREGANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL

ANTONIO INÁCIO SANTIAGO NETO

Orientador: Prof. Dr. Mauro Korn

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal da
Bahia para obtenção de título de Mestre
em Ciências Naturais - Química.

Salvador, BA
2006

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à força maior, que mesmo latente, às vezes nos impulsiona sempre para frente de forma que alcancemos os nossos ideais.

Gostaria de agradecer também:

- ◆ Ao meu pai, minha mãe, irmãos e demais familiares que sempre acreditaram em mim e que me ajudaram em todos os momentos da minha caminhada.
- ◆ Aos meus amigos e colegas de laboratório Sonofia: Josué, Enaldo, Sílvia, Daniel, Vitória, Tiago, Zé Tiago, Eduardo, Rodolfo, Márcia, Soledad, Lucas, Totonho, e os demais IC do prédio especial pela amizade, apoio e por tornar este ambiente tão agradável no desenvolvimento desta dissertação.
- ◆ Aos meus amigos Sivan, Fábio Ole, Vanjo que colaboraram e contribuíram de forma moral e experimental no andamento deste trabalho.
- ◆ Ao meu orientador, Mauro Korn, pelo incentivo, dedicação e enriquecimento do trabalho através das discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.
- ◆ Aos funcionários e amigos da UNEB e UFBA, que de alguma forma contribuíram para a finalização desta dissertação.
- ◆ Aos professores Madson, Marta, pela colaboração na caminhada deste trabalho.
- ◆ A CAPES por conceder bolsa durante a execução deste trabalho.

RESUMO

Métodos para a determinação de açúcares redutores totais em alimentos explorando a técnica de análise em fluxo têm sido reportados na literatura. Na estrutura dos açúcares redutores há um grupo carbonila capaz de formar adutos com S(IV) em pH entre 4 e 5. No presente trabalho, a concentração de açúcares redutores totais foi determinada monitorando a concentração dos íons sulfito ligados a grupos carbonílicos empregando a técnica de análise por injeção seqüencial. A p-rosanilina foi empregada para a monitoração espectrofotométrica do sulfito ligado a 580 nm. Foi observado que o excesso de sulfito foi oxidado prontamente a sulfato por radicais hidroxila produzidos durante irradiação ultra-sônica como também o tratamento de ultra-som foi incapaz de decompor os adutos. Os adutos foram decompostos pela alcalinização da zona da amostra. O sistema SIA foi desenvolvido para determinação de açúcares redutores totais na faixa de concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O limite de detecção de açúcares redutores totais foi de $6,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e o desvio padrão relativo para 10 determinações consecutivas foi menor que 2%. A concentração de açúcares redutores totais em soro glicosado foi determinada pelo método proposto e os resultados foram comparados ao método de referência, não apresentando diferença significativa para um nível de confiança de 95%.

Palavras chave: sistema de análise por injeção seqüencial, açúcares redutores, ultra-som, determinação de sulfito.

ABSTRACT

Methods for the determination of total reducing sugars in food and beverage by exploiting flow techniques have been reported. In the structure of all reducing sugars has a carbonyl group leading to produce adducts with hydrogen sulfite ions at pH range of 4 - 5. In the present work the concentration of total reducing sugars was determined by monitoring the sulfite ions bonded to carbonyl groups of analyte by sequential injection analysis (SIA) technique. The *p*-rosaniline was used in the SIA procedure for sulfite determination at 580 nm. It was observed that the excess of sulfite was readily oxidized to sulfate by hydroxyl radicals produced during ultrasonic irradiation as well as the ultrasound treatment was unable to decompose the adducts. The adduct was decomposed by alkalinizing the sample zone. The SIA procedure was developed for determination of total reducing sugars in the range of $6,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. The limit of detection was calculated at $6,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ and relative standard deviation was less than 2% (N= 10). The concentration of total reducing sugar in food and beverage samples were also determined by reference methods and the results were not significantly different at the 95% confidence level.

Keywords: sequential injection analysis, reducing sugars, ultrasound, determination of sulphite.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	9
1.0 Introdução	10
1.1 Processos para determinação de Açúcares Redutores	10
1.2 A Química do S (IV)	15
1.3 Análises em Fluxo	21
1.3.1 Análise por Injeção Seqüencial (SIA)	23
1.4 Considerações sobre Efeitos Químicos dos Ultra-sons	25
2.0 Objetivos	28
2.1 Objetivos Gerais e Específicos	28
3.0 Experimental	29
3.1 Reagentes e Soluções	29
3.2 Equipamentos	31
3.3 Sistema SIA	32
4.0 Resultados e Discussão	34
4.1 Avaliação do Efeito do Ultra-som sobre Adutos de S(IV)	34
4.2 Otimização do Procedimento de Análise por Injeção Seqüencial	40
4.2.1 Efeito do volume de amostra injetado	40

4.2.2	Efeito do volume de reagente	41
4.2.3	Concentração de NaOH	42
4.2.4	Ordem de adição dos reagentes	43
4.2.5	Forma de Inserção de Reagentes e Amostras	44
4.2.6	Efeito do Número de Ciclos para Misturas	44
4.3	Avaliação de Interferentes	45
4.4	Figuras de Mérito	47
4.5	Aplicação	48
5.0	Potencialidades e Perspectivas Futuras	50
6.0	Conclusão	51
7.0	Referências Bibliográficas	53

LISTA DE FIGURAS

1.0	Introdução	
1.1	Estrutura da glicose e frutose	10
1.2	Mecanismo da reação de glicose com Cu^{2+} (Teste de Fehling)	10
1.3	Distribuição das espécies de sulfito em função do pH	16
1.4	Espécies isoméricas do ácido sulfuroso	17
1.5	Representação dos equilíbrios de malvidin 3-O-glucosídeo (1)	18
1.6	Reação do sulfito com a <i>P</i> - rosanilina em meio ácido	19
1.7	Reagentes orgânicos empregados para determinação de sulfito	21
1.8	Representação esquemática de uma montagem FIA	22
1.9	Representação das zonas dos reagentes e amostra	23
1.10	Representação Esquemática de uma montagem SIA	24
3.0	Experimental	
3.1	Reação de derivatização dos aldeídos com 2,4-DNPH em meio ácido	30
3.2	Representação Esquemática de uma montagem SIA empregada	32
4.0	Resultados e Discussão	

4.1	Cromatograma dos adutos para diferentes tempos de sonicação	34
4.2	Perfil de degradação de solução de sulfito[HSO ₃ ⁻] = 20 mg/ L	37
4.3	Perfil de degradação de solução de sulfito[HSO ₃ ⁻] = 10 mg/ L	37
4.4	Variação do pH da solução de S(IV) com o tempo de sonicação	38
4.5	Efeito do volume de amostra injetado sob o sinal analítico	41
4.6	Avaliação do volume de p-rosanilina injetado	42
4.7	Avaliação da influência do número de ciclos de mistura na reação	45
4.8	Degradação de ácido ascórbico em solução aquosa	46
4.9	Curva analítica para determinação de açúcares redutores	48

LISTA DE TABELAS

1.0	Introdução	
1.1	Métodos para determinação de açúcares redutores	12
3.0	Experimental	
3.1	Passos envolvidos na determinação de sulfito pelo sistema SIA proposto	33
4.0	Resultados e Discussão	
4.1	Resultados obtidos pelo monitoramento de formaldeído para avaliar a estabilidade do aduto formaldeído-sulfito	35
4.2	Resultados obtidos pelo monitoramento de sulfito para avaliar a estabilidade do aduto formaldeído-sulfito	35
4.3	Estabilidade dos adutos de glicose-sulfito sob exposição as ondas ultrasônicas	36
4.4	Efeito da concentração de NaOH na quebra do aduto	43
4.5	Efeito da ordem de adição dos reagentes e amostras	43
4.6	Comparação das formas de inserção dos reagentes e amostras	44
4.7	Avaliação da interferência de ácido ascórbico	47
4.8	Resultados obtidos com o método proposto (SIA) e com o método de referência	49

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Processos para Determinação de Açúcares Redutores

Os monossacarídeos glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupos carbonílicos capazes de se oxidarem na presença de oxidantes moderados, como Fe^{3+} ou Cu^{2+} em soluções alcalinas (Lehninger *et al*, 2000). As estruturas destes monossacarídeos são apresentadas na Figura 1.1.

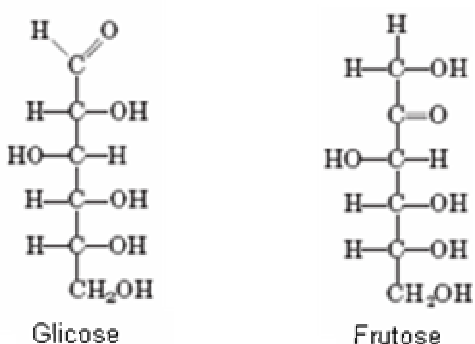


Figura 1.1 Estrutura da glicose e frutose

Como a sacarose contém em sua estrutura dois resíduos de monossacarídeos que comprometem seus grupos anoméricos, esse dissacarídeo não apresenta propriedade redutora. Esta característica redutora de alguns açúcares é à base do método de Fehling (Figura 1.2), o qual permite identificar a presença de açúcares redutores em diferentes amostras (Stryer *et al*, 2001).

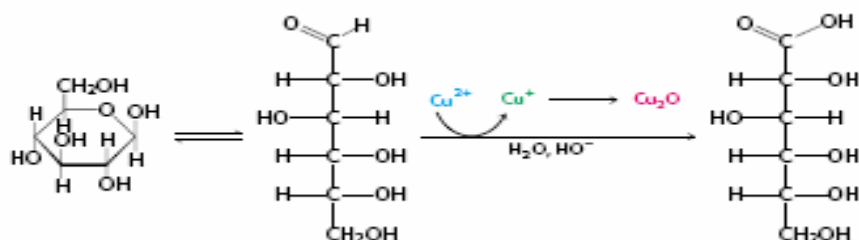


Figura 1.2 Mecanismo da reação de glicose com Cu^{2+} (Teste de Fehling).

A oxidação do carbono anomérico dos açúcares redutores só ocorre com a forma linear, a qual existe em equilíbrio com a forma cíclica (Fig. 1.2). Glicosídeos, como, por exemplo, a sacarose, não são facilmente convertidos às formas com grupamentos carbonílicos livres.

A determinação de açúcares redutores é freqüentemente realizada na indústria de vinho (Lopes *et al*, 1995; Araújo *et al*, 2000), sendo um parâmetro importante para acompanhamento do processo de fermentação (Sartini *et al.*, 1998) e controle de qualidade para certos vinhos por conferir se os mesmos atendem aos limites legais ou comerciais de teores de açúcares redutores (Amerine e Ough, 1980). O monitoramento de açúcares redutores totais (ART) é de grande importância para controle na indústria sucro-alcooleira, principalmente no que se refere à melhoria da eficiência do processo de produção, ao pagamento da cana-de-açúcar em função do teor de sacarose e para a avaliação do estado de maturação da cana (Zagatto *et al*, 2005). A determinação de açúcares redutores é também um parâmetro de fundamental importância para a avaliação de méis, visando a criação de padrões de qualidade e para proteção do consumidor de possíveis adulterações (Crane, 1990; Marchini, 2001).

Para se estimar o teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais em alimentos, são reportados vários métodos não seletivos. Mesmo assim, esses fornecem resultados com elevado grau de confiabilidade, quando corretamente empregados (Borges *et al*, 1987). Contudo métodos mais seletivos para a determinação de açúcares vêm sendo desenvolvidos. Métodos baseados na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vêm sendo empregados (Cano e Almeida-Muradian, 1998; Courtin *et al*, 2000), assim como os métodos de análise

baseados na ação de enzimas (Frost, 1984; Kunsst *et al*; 1984; Matissek *et al*, 1998). Contudo, o elevado custo das enzimas deve ser considerado como uma possível restrição ao emprego destes métodos de análise.

Os métodos clássicos para a análise de açúcares redutores são, em sua maioria, baseados na reação de Fehling. Porém, foram também reportados métodos baseados na desidratação dos açúcares em meio de ácidos concentrados, para posterior reação com fenol e produção de compostos cromogênicos para posterior monitoração por espectrofotometria. Os métodos para determinação de açúcares redutores podem agrupados de acordo com a Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Métodos para determinação de açúcares redutores

TECNICA	METODO
Volumetria	EDTA Lane-Enyon Luff-Schoorl
Gravimetria	Musson-Walker
Espectrofotometria	ADNS Antrona Fenol-Sulfúrico Somogyi-Nelson
Índice de Refração	Grau Brix

Com relação aos métodos físicos para análise de açúcares, o mais empregado é a refratometria (escala Brix), o qual mede a quantidade de sólidos solúveis presentes em uma amostra. Este se baseia em um sistema de graduação de aparelhos especialmente empregados na indústria açucareira.

No método do ácido 3-5-dinitrossalicílico (ADNS), este é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que, no caso mais simples, o grupamento aldeído é oxidado a ácido aldônico (Dubois *et al*, 1956).

A reação com antrona (9,10-diidro-9-oxoantraceno) é baseada na ação hidrolítica e desidratante do H_2SO_4 sobre os carboidratos. Após condensação, há a formação de um produto de coloração azul e os açúcares redutores podem ser quantificados por espectrofotometria a 620 nm (Brevil e Saddler, 1985).

No método complexométrico com EDTA, os açúcares presentes na amostra reagem com solução de Cu^{2+} , e estes íons são reduzidos a Cu^+ que precipitam na forma de Cu_2O . A concentração residual de Cu^{2+} é, então, titulada contra solução padronizada de EDTA (Matissek *et al*, 1998). Por sua vez, no método de Somogyi-Nelson os glicídios redutores em meio alcalino, são transformados em enodíóis, os quais reduzem o íon Cu^{2+} a Cu^+ . O Cu_2O produzido reduz o heteropoliácido arsenomolibídico, levando à produção de composto de coloração azul, o qual é monitorado a 640 nm (Nelson, 1960).

No método de Luff-Schoorl o açúcar redutor é oxidado, enquanto os íons Cu^{2+} são reduzidos a Cu^+ . Este cátion precipita na forma de Cu_2O em meio alcalino e o excesso de Cu^{2+} é determinado por iodometria (Villela *et al*, 1973).

Um dos métodos mais empregados para a determinação de açúcares redutores em diferentes matrizes é o método de Lane-Eynon, o qual se baseia na redução em meio alcalino e na presença de tartarato de Cu^{2+} a Cu^+ , levando à produção de Cu_2O e ocasionando perda na intensidade da coloração azul original do complexo Cu^{2+} -tartarato (Shneider, 1979).

O método oficial para a determinação de açúcares redutores e totais em alimentos, segundo AOAC (Association of Official Analytical Chemists), é a polarimetria. No entanto, esta técnica exige condições específicas e existem sérias limitações se as atividades ópticas de outras substâncias presentes na amostra interferem na determinação polarimétrica (Meade e Chen, 1977).

A espectroscopia no infravermelho tem sido empregada nas análises de açúcares em alimentos (Baker, 1985, Cadet *et al.*, 1997, Achá *et al.*, 1988). Esta técnica de análise só não é mais empregada pela (i) complexidade dos espectros no infravermelho; (ii) intensa absorção de água pela amostra; e, (iii) atenuação da radiação no infravermelho nas amostras.

Muitos procedimentos para a determinação de açúcares redutores em diversas matrizes envolvem equipamentos sofisticados, com elevados custos operacionais e reagentes tóxicos, como, por exemplo, nos métodos cromatográficos. Neste sentido, os sistemas de análise em fluxo (FIA) vêm sendo explorados como alternativas para estas determinações, pois possibilitam a execução das etapas da análise com menor ingerência do operador, menor risco de contaminação, além do baixo custo operacional e elevada produtividade analítica (Peris-Tortajada *et al.*, 1992; Reis *et al.*, 1994).

Procedimentos para a determinação de açúcares redutores em fluxo têm sido propostos empregando diversas técnicas de detecção, como espectrofotometria (Mattos *et al.*, 1988; Zagatto *et al.*, 1988; Araújo *et al.*, 2000; Oliveira e Fatibello-Filho, 1999), fluorimetria (Danielson *et al.*, 1999), amperometria (Parellada *et al.*, 1996), gravimetria (Sartini *et al.*, 1998) e quimiluminescência (Koerner *et al.*, 1986). A propriedade redutora dos açúcares tem sido explorada para o desenvolvimento de

procedimentos de análise espectrofotométrica e, em decorrência deste fato, a espectrofotometria é indubitavelmente a técnica mais difundida para determinação de açúcares redutores em sistemas de análise em fluxo (Trent *et al*, 1986; Reis *et al*, 2003).

Uma dos procedimentos descritos para a determinação de açúcares redutores envolve a reação com ácido pícrico e monitoramento da diminuição da concentração de picrato em solução, empregando eletrodo íon seletivo a picrato (Maquiera *et al*, 1987; Lopes *et al*, 1995). Outro método de análise em fluxo proposto foi baseado na redução, sob aquecimento e em meio alcalino, de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Alves *et al*, 2005; Oliveira *et al*, 2001).

O método para a determinação de açúcares redutores, baseado na formação de complexo colorido entre Cu^+ e 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (neocuproína) também foi empregado com êxito para determinação indireta de açúcares redutores totais (Araújo *et al*, 2000). Por sua vez, Sartini *et al* (1998), desenvolveram sistema de análise em fluxo com detecção gravimétrica para a determinação de açúcares redutores baseado na reação do açúcar redutor com o reagente de Fehling.

Considerando os procedimentos propostos para a determinação de açúcares redutores em diferentes matrizes pode ser constatado que os métodos químicos de análise são habitualmente indiretos e se baseiam na capacidade redutora dos monossacarídeos glicose e frutose. No presente trabalho foi desenvolvido um procedimento para a determinação de açúcares redutores, de forma indireta, baseado na formação de adutos entre os açúcares redutores e sulfito para posterior monitoração do sulfito ligado.

1.0 A Química do S(IV)

O SO_2 se dissolve em água formando soluções de H_2SO_3 , o qual é um ácido diprótico fraco (Bronikowska e Rudzinski, 1991), cujos valores das constantes de ionização são $K_{a1} = 1,3 \times 10^{-2}$ e $K_{a2} = 6,3 \times 10^{-8}$. Como qualquer ácido fraco, a distribuição das espécies derivadas do H_2SO_3 em meio aquoso varia com o pH do meio, como pode ser observado na Figura 1.3 pelas curvas das frações (α) das espécies oriundas do S(IV).

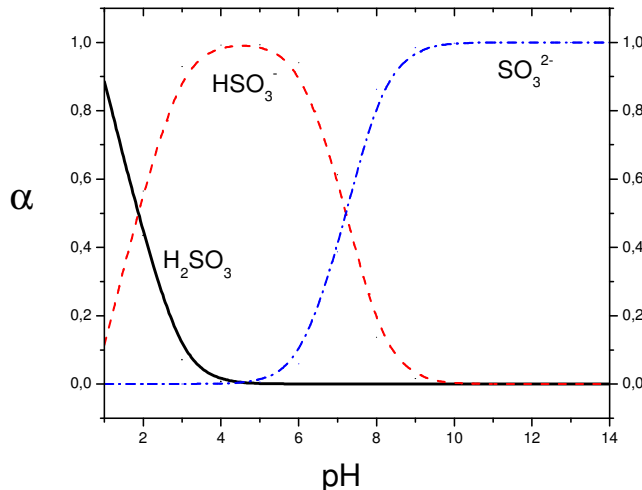
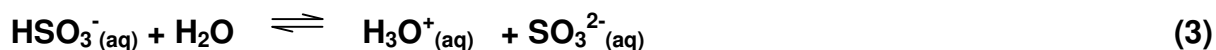


Figura 1.3 Distribuição das espécies de sulfito em solução aquosa em função do pH.

Muitas reações de interesse de compostos de S(IV) estão relacionadas ao fato destes serem agentes redutores. Esta propriedade é justificada possivelmente pelas formas isoméricas do H_2SO_3 (Figura 1.4), devido ao fato das ligações S–H

(Figura 1.4, esquema 2) serem redutoras, o que explicaria também a formação do íon HSO_3^- (Martins e Andrade, 2002; Lee, 1980).

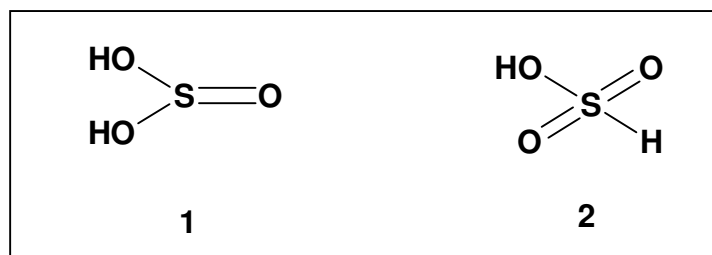


Figura 1.4 Espécies isoméricas do ácido sulfuroso.

Os ânions de S(IV) possuem nucleofilicidade suficiente para reagir, por adição, com compostos que apresentem (i) grupos carbonílicos, produzindo adutos hidroxissulfonatos; (ii) ligações duplas carbono-carbono; (iii) quinonas; (iv) compostos heterocíclicos nitrogenados; além de (v) açúcares reduzidos e (vi) proteínas (Pizzoferrato *et al.*, 1998). Essas reações com sulfito podem ocorrer em produtos alimentícios, condicionadas à natureza, tipo de processamento e tempo de estocagem do alimento. Neste sentido, existe uma diferenciação entre as espécies de sulfito presentes nos alimentos. O “sulfito livre” é caracterizado por não estar associado a nenhum tipo de composto e, por analogia, o “sulfito ligado” é caracterizado como aquele associado com algum composto que tenha os grupos funcionais e características acima mencionadas. Desta forma, o teor de “sulfito total” corresponde à soma das concentrações do sulfito na forma livre e ligada (Santos, 2004).

Nos vinhos tinto o S(IV) geralmente encontra-se ligado, formando adutos com compostos carbonílicos e/ou com antocianinas (Figura 1.5). Burroughs & Sparks, 1973 descreveram os equilíbrios dos principais compostos carbonílicos do vinho associados ao S(IV). Já, nos vinhos brancos, o sulfito encontra-se

predominantemente associado ao aldeído, sendo que a distribuição dos adutos depende do pH.

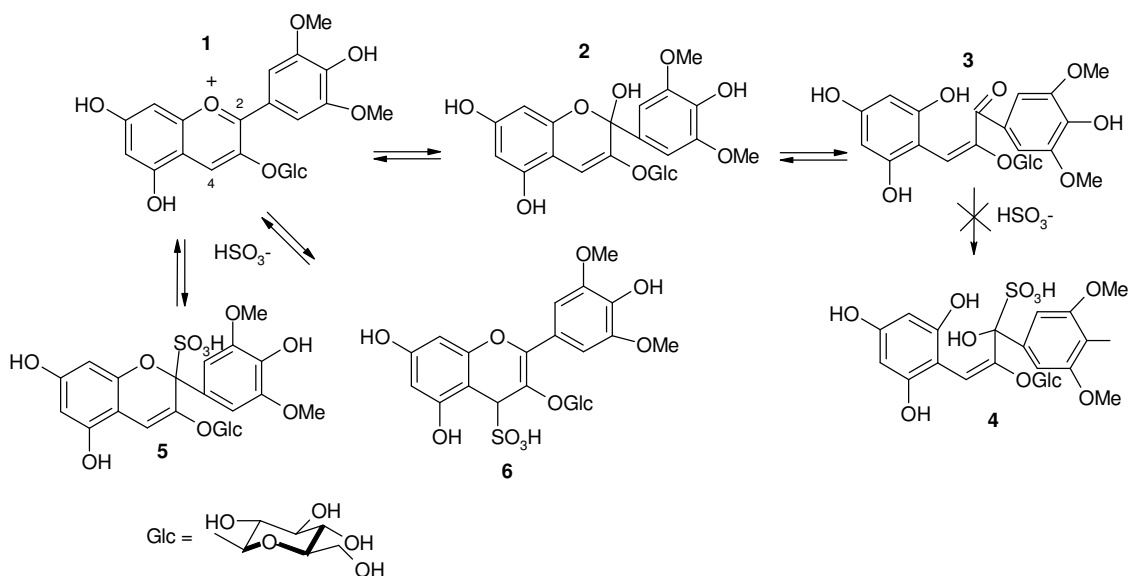


Figura 1.5 Representação dos equilíbrios de malvidin 3-O-glucosídeo (1) e reação com HSO_3^- .

Os equilíbrios apresentados na Figura 1.5 dependem do pH do meio. Com o aumento do pH ocorre a formação de carbinol (2) e chalcona (3). Geralmente o pH do vinho está entre 3 e 3,5 (Aquarone *et al*, 1983) e possibilita a ocorrência das três espécies acima observadas (1, 2 e 3). Desta forma, Jurd (1964) demonstrou, através de estudos espectrais, que a reação do sulfito ocorria com a antocianina (1) e não com a chalcona (3).

O S(IV) ligado ao grupamento carbonílico pode ser recuperado pela acidificação e aquecimento da amostra. Diversos métodos foram desenvolvidos para a determinação de S(IV) em amostras de alimentos.

Na literatura são reportados vários procedimentos para determinação de S(IV) em diferentes matrizes e em várias faixas de concentração. Os métodos mais

frequentemente relatados são: espectrofotométricos (Boltz e Howoll, 1978), fluorimétricos (Xin-Qi *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002); cromatográficos (Casela *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 1998) e fluorimétricos (Gru *et al.*, 1998), eletroforéticos (Jankovskiene *et al.*, 2001) e polarográficos (Umiker *et al.*, 2002).

Vários procedimentos de análise em fluxo também foram desenvolvidos para a determinação de sulfito. Estes empregavam detecção amperométrica (Alipázaga *et al.*, 2002), potenciométrica (Hassan *et al.*, 2001), enzimática (Fatibello Filho e Vieira, 1997; Groom *et al.*, 1993) e por quimioluminescência (Qin *et al.*, 1998).

Martinez-Calatayud, em 1995, afirmava que a espectrofotometria era a técnica mais empregada em sistema de análise em fluxo. Os principais procedimentos com detecção espectrofotométrica para a determinação de sulfito utilizam corantes derivados do trifenilmetano - verde de malaquita (Cunniffi, 1995) e *p*-rosanilina (West e Gaeke, 1956). O método do verde de malaquita relaciona a perda da coloração característica do reagente (verde de malaquita) na presença de nucleófilos, como o sulfito. O mesmo princípio (descolorimetria) pode ser usado para a determinação de sulfito com *p*-rosanilina. Porém, diferenças estruturais entre os corantes possibilitam a geração de coloração na presença de formaldeído, após reação com sulfito quando a *p*-rosanilina é empregada (Figura 1.6).

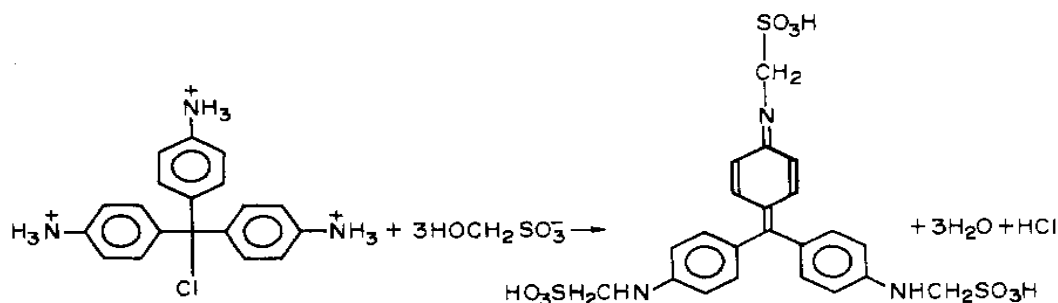


Figura 1.6 Reação do sulfito com a *P*-rosanilina em meio ácido.

Padrões de reação semelhantes são reportados na literatura para outros reagentes destinados à determinação de sulfito. Entre estes deve ser destacado o método que emprega o corante verde brilhante (Safavi e Ensafi, 1991), o 4,4'-diaminotriphenilmetano (Lambert *et al.*, 1982), o p-aminoazobenzeno (Kniseley & Throop, 1966), a p-nitroanilina (Bethge & Carlson, 1968) e a 2-amino-4-nitroanilina (Lambert *et al.*, 1978). As estruturas dos reagentes supracitados são apresentadas na Figura 1.7.

Um dos principais problemas encontrados para determinação de sulfito é a instabilidade deste em solução. Isto por que o sulfito é facilmente oxidado pelo oxigênio atmosférico. Para evitar a conversão indesejada do analito, foram consideradas as possibilidades de adição de alguns estabilizantes, destacando-se: HgCl_4^- (West e Gaeke, 1956), ciclohexanona (Lambert *et al.*, 1982), morfolina (Raman *et al.*, 1986), acetona e formaldeído (Lindgren e Cedergren, 1982). As melhores condições de estabilização do sulfito são encontradas com HgCl_4^- e formaldeído. Uma alternativa para evitar a adição de estabilizantes é a preparação de soluções imediatamente antes de executar as determinações.

Uma vez que o S(IV) reage com açúcares redutores formando adutos, torna-se muito interessante que este monitoramento possa ser efetuado empregando estratégias de análise em fluxo que permita quantificar este “sulfito ligado” e, conseqüentemente, o teor de açúcar redutor presente. A automação de procedimentos para a determinação quantitativa de espécies químicas tem sido proposta como alternativa aos procedimentos convencionais, em virtude do aumento da produtividade analítica e simplicidade operacional.

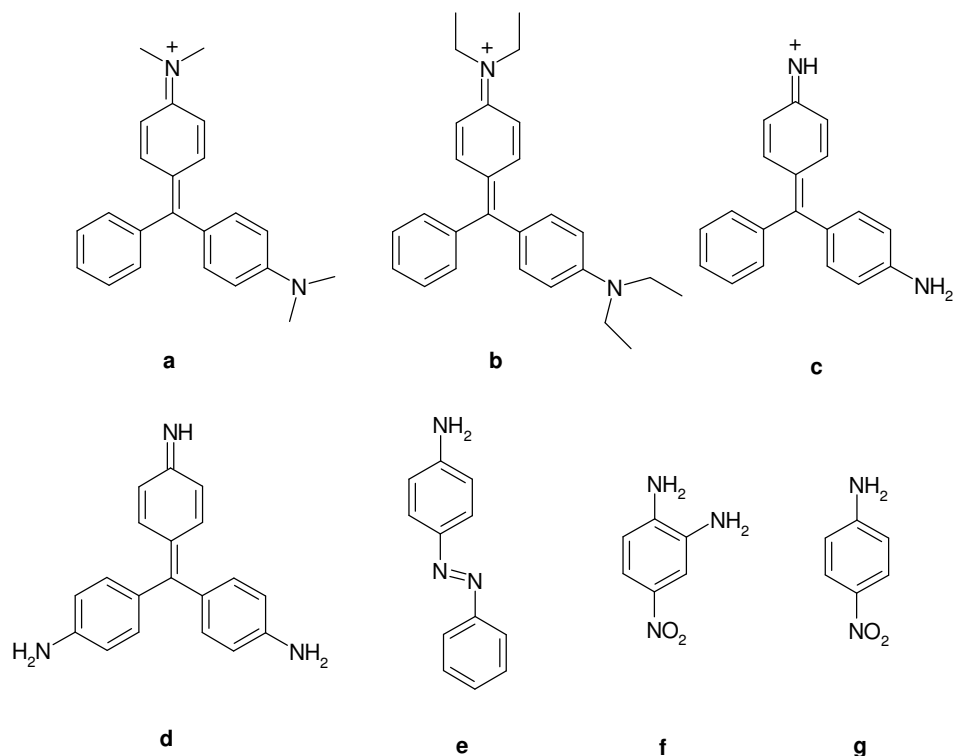


Figura 1.7 Reagentes orgânicos empregados para determinação de sulfito. (a) verde de malaquita, (b) verde brilhante, (c) 4,4'-diaminotrifenilmetano (d) p-rosanilina, (e) p-aminoazobenzeno, (f) 4-nitro-1,2-diaminobenzeno e (g) p-nitroanilina.

1.1 Análises em Fluxo

A tentativa de automatizar processos de análise tem sido uma dos principais objetos de estudo da química analítica moderna. A economia de reagentes, o aumento na produtividade analítica, bem como a redução de contaminações e riscos provenientes da manipulação justifica esta tendência.

As técnicas em fluxo baseiam-se correntemente na introdução de uma alíquota de amostra em um fluxo carregador, ocorrendo posteriormente a mistura, em linha, com um ou mais reagentes. Originam-se assim uma zona reacional, a qual será encaminhada para um sistema de detecção, no qual é produzido um sinal

analítico, cuja intensidade é correlacionada com uma propriedade física ou química da solução em análise.

O surgimento, em 1975, da análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) evidenciou as potencialidades desta técnica analítica, ao permitir automatizar ensaios em série e a custos reduzidos (Ruzicka e Hansen, 1975). Nos anos de 1990, foi proposta a análise por injeção seqüencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”), tornando possível à automatização de procedimentos mais complexos, os quais envolviam um maior número de reagentes e, principalmente, operações (Ruzicka e Marshall, 1990).

A Figura 1.8 representa esquematicamente uma montagem FIA. Como se pode observar, o sistema compreende habitualmente um dispositivo de propulsão (bomba peristáltica), um injetor cuja alça define o volume de amostra a ser inserido no percurso analítico, uma porção do tubo onde ocorre à formação do gradiente de concentração (bobina de reação) e um dispositivo detector que monitora a espécie de interesse.

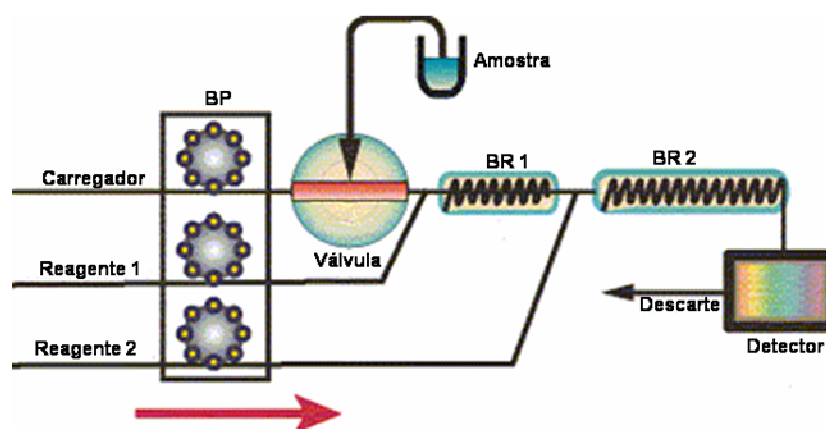


Figura 1.8 Representação esquemática de uma montagem FIA. Adaptado da FIALAB Instruments.

A técnica FIA envolve o emprego de montagens simples e de baixo custo, as quais exibem elevada versatilidade e flexibilidade. Estas vantagens, associadas ao fato de a análise requerer pequenos volumes de amostra e permitir a detecção em condições de não equilíbrio químico e físico, justificam a larga utilização da técnica FIA na automatização de procedimentos analíticos.

1.3.1 Análise por Injeção Seqüencial (SIA)

A necessidade de reconfigurar fisicamente as montagens em fluxo de modo a adaptá-las a diferentes determinações, inerente a técnica FIA, culminou na proposição da análise por injeção seqüencial (SIA), em 1990 (Ruzicka e Marshall, 1990). Esta técnica surgiu como uma alternativa versátil e robusta a automatização de procedimentos analíticos complexos, envolvendo mais de um reagente. A análise por injeção seqüencial baseia-se na aspiração seqüencial de volumes precisos de amostra e reagentes para uma bobina de armazenamento.

A aspiração das diferentes soluções é efetuada a partir de uma válvula seletora e pela seleção do canal correspondente. Pela inversão do sentido do fluxo, e por comutação da válvula seletora ocorre a sobreposição reproduzível das zonas de amostra e reagente. Origina-se, assim uma zona composta resultante da penetração mútua de duas zonas, conforme evidencia a Figura 1.9.

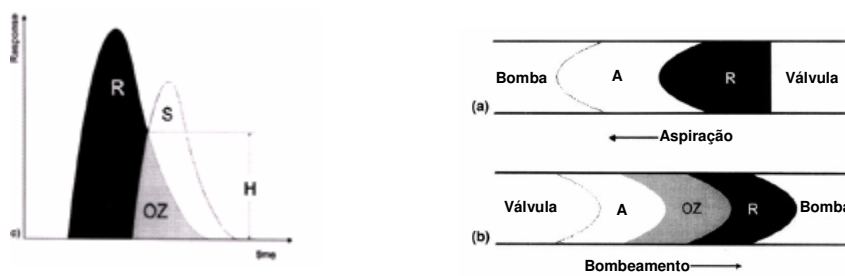


Figura 1.9. Representação das zonas dos reagentes e amostra. (a) aspiração para a bobina de armazenamento; (b) inversão do fluxo; (c) perfis de concentração: R, zona de reagente, S, zona de amostra, OZ, sobreposição das zonas, H, altura do pico. Adaptado de PÉREZ-OLMOS *et al*, 2005.

Um sistema SIA típico, representado esquematicamente na Figura 1.10 compreende um dispositivo propulsor (bomba), uma bobina de armazenamento (BA), uma bobina de reação (BR), uma válvula seletora de fluidos (VS), um sistema de detecção (D).

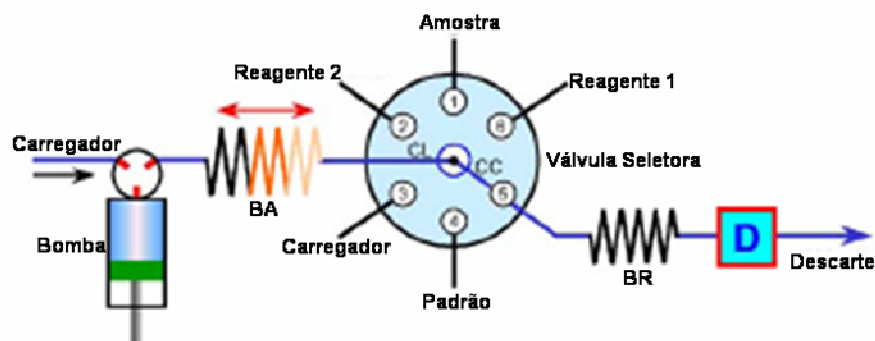


Figura 1.10 Representação esquemática de uma montagem SIA. Adaptado da FIALAB Instruments.

A unidade principal de um sistema SIA é a válvula seletora de fluidos, que funciona como apoio dos componentes restantes da montagem (detectores, reatores, dispositivos reacionais) e das soluções envolvidas na determinação. A circulação de fluidos no sistema ocorre a partir do orifício central da válvula de seleção, que se encontra ligado ao tubo de armazenamento, podendo conectar-se também a cada um dos orifícios laterais. O funcionamento de um sistema SIA, baseado em inversões do sentido do fluxo, associado à versatilidade da válvula seletora, possibilita que se opere em linha, não só reações químicas complexas, mas

diferentes opções de pré-tratamentos das amostras. O número de soluções e de operações, a efetuar num sistema SIA, encontra-se apenas limitado pelo número de orifícios laterais da válvula seletora, havendo, no entanto a possibilidade de incorporar, num mesmo sistema, mais do que um dispositivo de seleção, o que permite a implementação de um maior número de operações de forma versátil.

Num sistema SIA, os volumes são definidos pela vazão e tempo de aspiração de um reagente ou da amostra para a bobina de armazenamento, de modo que o dispositivo de propulsão deve proporcionar condições para o início, interrupção e inversão do sentido do fluxo de forma precisa e que garanta a repetibilidade das operações (Christian e Ruzicka, 1992).

No trabalho desenvolvido foi explorada a versatilidade de um sistema SIA às vantagens do emprego de ultra-sons no preparo de amostras para a determinação indireta de açúcares redutores em amostras de produtos alimentícios.

1.4 Considerações sobre Efeitos Químicos dos Ultra-sons

Os ultra-sons são ondas mecânicas que se propagam através de qualquer meio material com frequência maior que 16 kHz. Os ultra-sons respondem por uma região do espectro acústico, o qual é subdividida em três regiões principais – a faixa dos infra-sons ($\nu < 16$ Hz); a faixa sons ($16 \text{ Hz} < \nu < 16 \text{ kHz}$), perceptíveis aos humanos; e, a faixa dos ultra-sons ($\nu > 16 \text{ kHz}$). Para os ultra-sons pode ser assumida, ainda, uma divisão de faixas: a dos ultra-sons de baixa frequência ($16 \text{ kHz} < \nu < 1 \text{ MHz}$) e de alta frequência ($\nu > 1 \text{ MHz}$). Sabe-se que quando ondas ultra-sônicas com frequência e intensidade suficientes para promover a cavitação se

propagam na água, provocam a sonólise do solvente, formando os radicais $\bullet\text{H}$ e $\bullet\text{OH}$ (Él Piner, 1964). Este processo ocorre de acordo com a seguinte equação:



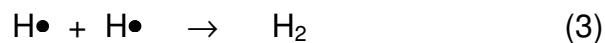
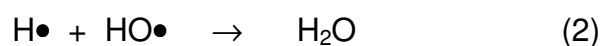
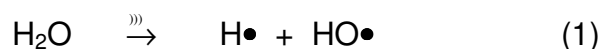
Os efeitos químicos provocados pelos ultra-sons ocorrem devido ao fenômeno da cavitação acústica, o qual engloba a nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos à irradiação com ondas ultra-sônicas de baixa frequência (Mason e Lorimer, 1989; Suslick, 1990). O ultra-som se propaga através de um líquido em ciclos alternados de compressão e expansão. Caso a onda acústica tenha amplitude suficientemente alta, pode vencer as forças intermoleculares num ponto do líquido, criando uma cavidade.

Uma vez formada a cavidade (nucleação) durante a etapa de expansão (pressão negativa), os gases e vapores presentes no líquido podem se difundir para a cavidade (crescimento). Na etapa de compressão (pressão positiva) as moléculas de gases e vapores presentes no interior das bolhas não retornam completamente para o líquido, resultando em aumento efetivo do tamanho da cavidade. Assim, durante os sucessivos ciclos de compressão e expansão, ocorre o aumento das dimensões da cavidade, até que esta alcance seu diâmetro crítico (ca 170 μm em água), implodindo violentamente (Suslick, 1990). A implosão das bolhas de cavitação provoca a liberação de grande quantidade de energia, resultando em temperaturas locais instantâneas da ordem de 5.000 K e pressões da ordem de 1.000 bar (Suslick, 1989).

Existem três zonas distintas de reação num sistema exposto às ondas ultra-sônicas (Korn *et al.*,2005):

- (i) Fase gasosa, no interior das bolhas transientes;
- (ii) Interface gás-líquido;
- (iii) Fase líquida (vizinhança da cavidade).

Em se tratando da água, a alta energia gerada pelo colapso de uma bolha de cavitação contendo moléculas de água na forma vapor e de gotículas, leva à clivagem de moléculas, com a formação de radicais $\bullet\text{H}$ e $\bullet\text{OH}$ (Doktycz e Suslick, 1990) (Eq.1). Estes radicais podem se combinar produzindo água; ou sofrerem arranjos para a formação de gás hidrogênio e peróxido de hidrogênio (Eq. 2–4). Contudo, H_2O_2 , H_2 , $\text{HO}\bullet$ e $\text{H}\bullet$ podem levar à formação de outros produtos, caso outras espécies estejam presentes no meio irradiado.



Numerosas aplicações dos ultra-sons nas etapas de análise química são encontradas na literatura (Capelo *et al.*, 1999, Filgueiras *et al.*, 2000), nas quais as ondas ultra-sônicas atuam favorecendo a ação dos solventes, normalmente ácidos ou misturas de ácidos diluídos, aumentando a eficiência dos procedimentos de decomposição da amostra ou de extração dos analitos.

Novas aplicações dos ultra-sons para a melhoria do desempenho de métodos espectrofotométricos têm sido estudadas induzindo a uma perspectiva de consolidação desta linha de investigação. Assim, um procedimento para a oxidação de Cr^{3+} a CrO_4^{2-} pela ação dos ultra-sons de baixa frequência foi reportado para viabilizar a determinação espectrofotométrica de Cr^{3+} em amostras de águas (Borges e Korn, 2002); assim, como a oxidação sonoquímica de Fe^{2+} a Fe^{3+} e oxidação prévia de I^- a I_2 pela sonicação de solução aquosas de CCl_4 , foram anteriormente exauridas (Borges, 2002). Neste contexto, a produção sonoquímica de espécies se apresenta como uma importante alternativa para a geração *in situ* de reagentes para procedimentos de análise química.

Diante deste potencial o ultra-som foi empregado em associação com o sistema SIA para a degradação de S(IV) livre.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais e Específicos

- Desenvolver um sistema automatizado, empregando o conceito de análise por injeção seqüencial (SIA) para determinação indireta de açúcares redutores a partir da formação de adutos, explorando a degradação de sulfito livre pela ação sonoquímica;
- Explorar a potencialidade do ultra-som na oxidação sonoquímica de sulfito;
- Avaliar os efeitos da irradiação ultra-sônica sob soluções de sulfito e adutos;
- Propor mecanismos de oxidação de sulfitos;

- Avaliar, otimizar, validar e aplicar o procedimento para análise de açúcares redutores pela determinação indireta de açúcares redutores em diferentes amostras.

3.0 EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau analítico de pureza e suas soluções foram preparadas com água desionizada recém preparada.

Solução estoque de sulfito 1.000 mg L^{-1} foi preparada diariamente, dissolvendo $0,1570 \text{ g}$ de Na_2SO_3 anidro (Merck) em 1 L de água. Soluções de referência de sulfito foram preparadas, diluindo apropriadamente a solução estoque pouco antes de serem utilizadas nos experimentos, para evitar a oxidação do sulfito a sulfato (Lindgren e Cedegren, 1982).

A solução de p-rosanilina foi preparada pela dissolução de $0,1000 \text{ g}$ do cloreto de p-rosanilina P.A (Sigma) em 20 mL de etanol P.A. e avolumada para 100 mL com água. A solução de trabalho foi preparada pela mistura de $5,0 \text{ mL}$ da p-rosanilina com $1,7 \text{ mL}$ de HCl (Merck) $36\% \text{ m/v}$ e $250 \mu\text{L}$ de solução de formaldeído (Merck) $37\% \text{ v/v}$, seguindo as recomendações de Araújo *et al*, 2000 . O volume da solução foi completado para 25 mL com água

A solução estoque 100 mg L^{-1} em formaldeído foi preparada pela tomada de 100 mg de solução $37\% \text{ (m/v)}$ em formaldeído (Merck), seguida de diluição com água para 100 mL . A solução estoque de formaldeído foi armazenada em frasco âmbar à temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. As soluções de referência de formaldeído com

concentrações na faixa de concentração entre 0,5 e 10 mg L⁻¹ foram preparadas pelas diluições apropriadas da solução estoque.

Para a avaliação da estabilidade dos adutos aldeídos-S(IV) à irradiação ultrassônica empregou-se o método do 2,4-DNPH (2,4-dinitrofenilidrazina) para a monitoração de possíveis degradações do aduto e do formaldeído (Figura 3.1). Para tanto, 500 mL de solução 0,2% (m/v) de 2,4-DNPH (Merck) foi preparada pela dissolução de 1 g do reagente em 100 mL de acetonitrila (J.T. Baker), seguida da adição de 5 mL de H₃PO₄ concentrado (Quimex), completando o volume para 500 mL com água desionizada. A solução de 2,4-DNPH foi purificada, seguindo procedimento estabelecido por Andrade e colaboradores (1999), procedendo-se a três extrações com 10 mL de CCl₄ (Quimex).



Figura 3.1 Reação de derivatização dos aldeídos com 2,4-DNPH em meio ácido.

As hidrazonas de formaldeído foram sintetizadas, seguindo o procedimento descrito por Shriner (1983), seguida de três recristalizações com solução 35:5 (v/v) etanol:água. A partir dessas hidrazonas, foram preparadas as soluções de referência de aldeídos em acetonitrila, as quais foram empregadas para as determinações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As soluções estoques de diferentes açúcares (frutose, glicose e sacarose) foram preparadas na concentração 1000 mg L⁻¹ pela dissolução de 100 mg dos açúcares em 100 mL com água. As soluções de trabalho foram preparadas pela

diluição das soluções estoques. Solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH (Merck) foi preparada pela dissolução de 4,0 g do reagente em 100 mL de água.

3.2 Equipamentos

Uma válvula seletora multiposição de oito canais modelo Cheminert™ 25C-3188D-EMH (Valco Instruments, EUA) foi empregada para o gerenciamento das soluções no sistema de análise por injeção seqüencial (SIA) proposto. Um espectrofotômetro Femto 700 Plus (Brasil), equipado com cela de fluxo em borossilicato com 10 mm de caminho óptico e 200 μL de volume interno, foi empregada para as medidas dos sinais analíticos. Uma bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson, França), equipada com tubo de peristáltico de cloreto de polivinila (PVC), foi empregada para a propulsão dos fluídos. Conduitos de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,8 mm de diâmetro interno foram empregados na montagem do sistema SIA.

As irradiações ultra-sônicas foram conduzidas em béquer de 10 mL (Vidrolab) de 22 mm de diâmetro interno, com espessura das paredes de 1,25 mm e 36 mm de profundidade. Para a geração dos ultra-sons foi empregado banho ultra-sônico 75D Aquasonic (VWR Scientific Instruments) com capacidade de 2 L, freqüência de 40 kHz e potência de 40 W, equipado com temporizador, sistema para controle da temperatura e dreno para descarte do líquido do banho.

Para as medidas de pH foi empregado milivoltímetro DM-21 (Digimed), equipado com eletrodo combinado de vidro.

As análises cromatográficas foram realizadas, empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência CG-480C (CG Instrumentos Científicos), equipado com

válvula injetora tipo rheodyne e detector espectrofotométrico com leituras dos sinais efetuadas a 360 nm. Coluna cromatográfica LiChrospher C₁₈ (Merck) com 5 µm, 250 mm x 4 mm foi empregada. A fase móvel utilizada era constituída pela mistura de metanol, água e acetonitrila, na proporção volumétrica de 75,0: 24,5: 0,5. A vazão foi fixada a 1,0 mL min⁻¹ e a alça de amostragem em 20 µL.

3.3 Sistema SIA

Um diagrama esquemático da montagem SIA desenvolvida está ilustrado na Figura 3.2. Na Tabela 3.1 é detalhadamente apresentada a seqüência de passos envolvidos na determinação indireta de açúcares redutores totais empregando a reação entre sulfito e *p*-rosanilina.

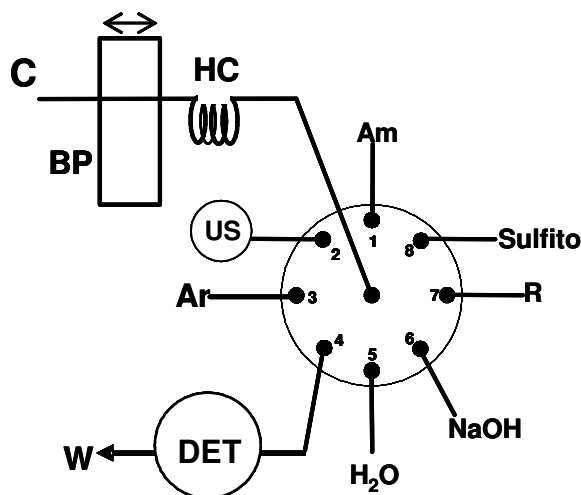


Figura 3.2 Esquema da montagem SIA empregada. C = carregador (H₂O), BP = bomba peristáltica; HC = bobina de armazenamento; R = *p*-rosanilina; Am = amostra, DET = espectrofotômetro ($\lambda = 580$ nm), W = descarte; US = banho ultra-sônico.

No sistema proposto, inicialmente as alíquotas das soluções de amostra (açúcar) e sulfito eram aspiradas para bobina de amostragem (HC), sendo esta zona

inserida entre bolhas de ar. Em seguida, a zona da amostra foi endereçada ao banho ultra-som, onde era sonicada por um intervalo de tempo definido. Esta estratégia foi empregada buscando melhorar a mistura e conseqüente formação do aduto e minimizar a dispersão da zona da amostra.

Após a etapa de sonicação, uma alíquota da amostra era aspirada alcançando a bobina de armazenamento com posterior adição de hidróxido de sódio para efetuar a “quebra” do aduto e p-rosanilina. Em seguida a zona da amostra permanecia em ciclos para efetuar uma maior mistura e formação do composto colorido. Finalmente a zona da amostra era endereçada para o detector espectrofotométrico ($\lambda = 580 \text{ nm}$).

Tabela 3.1 Etapas para determinação de S(IV) no sistema SIA.

Canal	Vazão (mL min ⁻¹)	Tempo (s)	Descrição
3	-1,6	2	Inserir bolha de ar
1	-1,6	36,4	Aspiração de 1,0 mL de amostra
8	-1,6	36,4	Aspiração de 1,0 mL de sulfito
3	+1,6	2	Inserir outra bolha de ar
2	-1,6	75	Envio para o ultra-som
4	0	180	sonicação
6	-1,6	0,5	Alíquota de NaOH
2	-1,6	10	Alíquota de Aduto
7	-1,6	6	Alíquota de p-rosanilina
4	+1,6	10	Mistura
4	-1,6	10	
4	+3,2	70	Envio para o detector

* Vazões positivas indicam bombeamento e negativas indicam aspiração.

** Etapa repetida por três vezes.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do Efeito do Ultra-som sobre Adutos de S(IV)

É de conhecimento que os aldeídos reagem com íons sulfito e bissulfitos para formar ácidos hidroxiaquilsulfônicos pela adição do S(VI) à carbonila. O íon sulfito possui nucleofilicidade suficiente para reagir de modo semelhante com açúcares redutores. Entretanto, nenhum enfoque foi realizado sobre os efeitos do ultra-som na estabilidade destes adutos.

Para avaliar os efeitos do ultra-som na degradação de adutos açúcar-S(IV) foram realizados ensaios preliminares, em batelada, para observar sua “possível” degradação. Assim, soluções de adutos previamente preparadas pela mistura equimolar de S(IV) e formaldeído foram sonicadas por intervalos de tempo pré-estabelecidos e alíquotas das soluções irradiadas foram analisadas empregando o método da 2,4-DNPH. A partir dos resultados obtidos (Tabela 4.1) não pôde ser observada nenhuma alteração nos cromatogramas para períodos de sonicação de até 90 min (Figura 4.1).

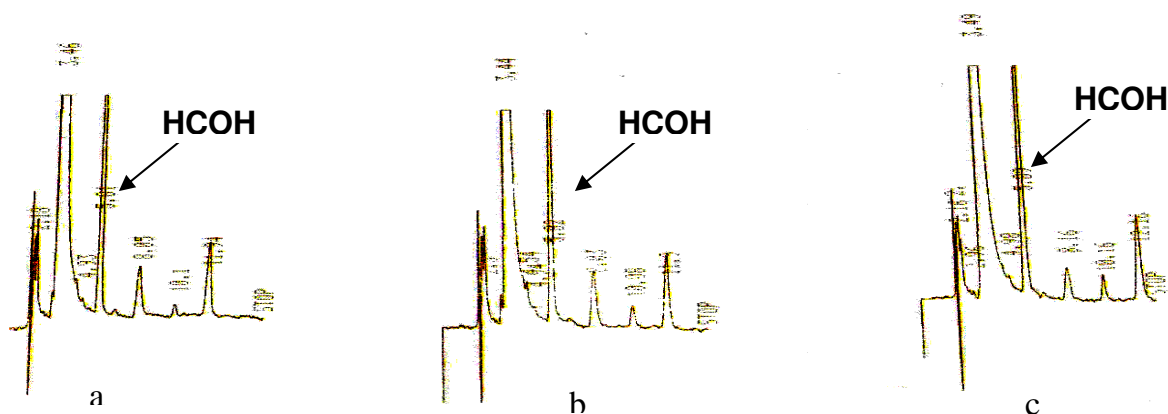


Figura 4.1 Cromatograma dos adutos para diferentes tempos de sonicação: (a) 30 min; (b) 60 min; (c) 90 min.

Tabela 4.1 Resultados obtidos pelo monitoramento do formaldeído para avaliar a estabilidade dos adutos de formaldeído-sulfito sob exposição ao ultra-som com o tempo de sonicação. Condições: pH= 4,5.

Tempo de sonicação (min)	Área integrada <i>Hidrazona de HCOH</i>
0	1385
30	1406
60	1433
90	1395

Também foi monitorada a concentração de sulfito ligado com o objetivo de avaliar o efeito da sonicação empregando para este fim o método da *p*-rosanilina. A partir dos resultados obtidos não foi possível observar diferenças significativas, reforçando a hipótese da estabilidade do sulfito ligado frente às ondas ultra-sônicas para até 90 min de sonicação. (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Resultados obtidos pelo monitoramento do sulfito com o tempo de sonicação dos adutos sulfitos-formaldeídos. Condições: pH= 4,5

Tempo de sonicação (min)	Absorbância
0	0,228
30	0,212
60	0,220
90	0,223

Como o sulfito apresenta a propriedade de formar adutos com açúcares redutores foi avaliada a estabilidade destes sob sonicação, pelo monitoramento do

teor de sulfito, empregando o método da *p*-rosanilina. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.3. Observando os resultados pôde ser também evidenciada a estabilidade dos adutos de glicose-sulfito frente à irradiação ultra-sônica.

Tabela 4.3 Estabilidade dos adutos de glicose-sulfito (pH= 5,0) sob exposição às ondas ultra-sônicas por diferentes períodos.

Tempo de sonicação (min)	Absorvância
0	0.320
30	0.310
60	0.315
90	0.325

Diante dos resultados que evidenciaram a estabilidade dos adutos, foram também realizados estudos em batelada com soluções de referência de S(IV) para avaliar o comportamento destas frente às ondas ultra-sônicas, monitorando a concentração desta espécie pelo método da *p*-rosanilina. Nas figuras 4.2 e 4.3 são apresentados os perfis de degradação de soluções de S(IV) com concentração de sulfito de 20 e 10 mg L⁻¹, respectivamente.

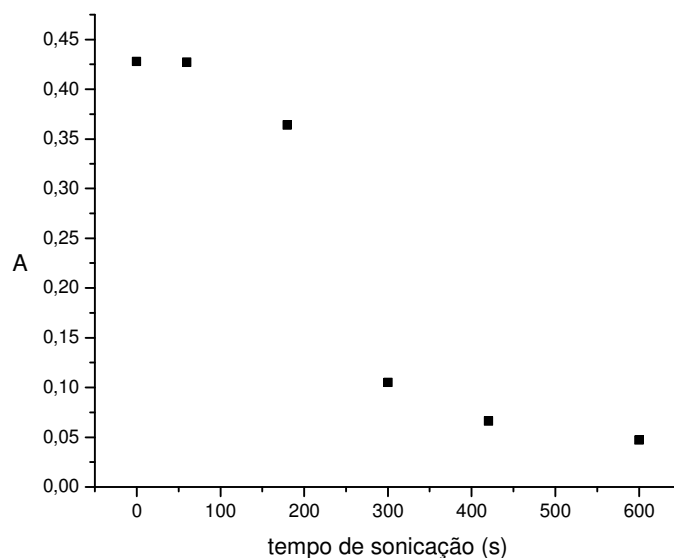


Figura 4.2 Perfil de degradação de solução de referência de sulfito exposta à radiação ultra-sônica. Condições: $[\text{HSO}_3^-] = 20 \text{ mg L}$, pH 4,5.

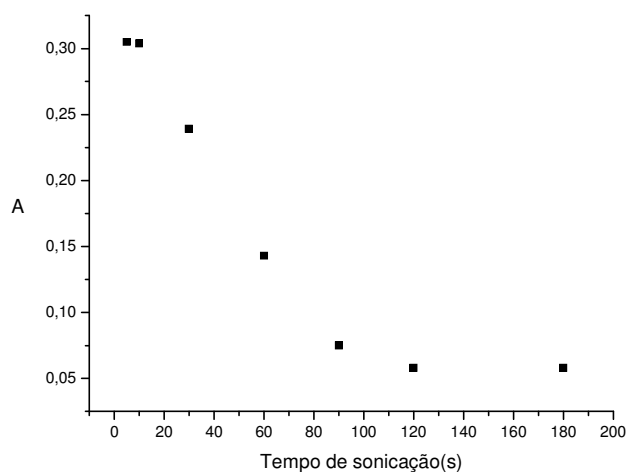


Figura 4.3 Perfil de degradação de uma solução de referência de $[\text{HSO}_3^-] = 10 \text{ mg L}^{-1}$ submetida à irradiação ultra-sônica, pH 4,5.

Com o monitoramento do sulfito e com base nos perfis de sonicação obtidos pôde ser observado decréscimo na concentração de sulfito com o aumento do tempo de sonicação, o que evidencia sua degradação.

Pôde também ser observado que o tempo de sonicação para a completa degradação sonoquímica do S(IV) foi dependente da concentração de sulfito no meio. Assim, enquanto que para a solução de S(IV) em concentração de 10 mg L^{-1} foram necessários 60 s para a degradação de 50% do S(IV) presente na solução, pôde ser observado o aumento do período de sonicação para 240 s para a mesma taxa de degradação (oxidação) quando soluções de S(IV) duas vezes mais concentradas (20 mg L^{-1}) foram submetidas à ação ultra-sônica.

Adicionalmente, a forma sigmoidal comum a ambas as curvas de degradação sonoquímica (Fig. 4.2 e Fig. 4.3) sugere que a oxidação de S(IV) para S(VI) ocorre por reação com radicais livre e, possivelmente, pela ação dos radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) produzidos pela sonólise da água.

Durante a etapa de sonicação do S(IV) também foi monitorado o pH das soluções de S(IV) expostas aos efeitos do ultra-som (Figura 4.4).

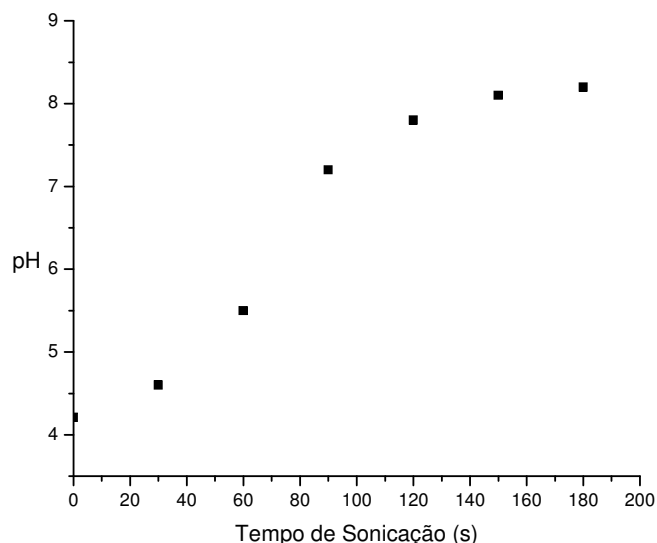


Figura 4.4 Variação do pH da solução de S(IV) com o tempo de sonicação.

De acordo com os resultados pode ser observada uma elevação do pH do meio sob efeito da sonicação. Uma exposição por 80 s da solução de S(IV) acarretou numa variação de 2 unidades de pH. Para confirmar esta hipótese de oxidação com a produção de sulfato foram feitos ensaios qualitativos de precipitação com solução de $BaCl_2$. Contudo, na literatura não foi encontrado nenhum estudo sobre os possíveis efeitos sonoquímicos em soluções de sulfito.

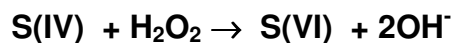
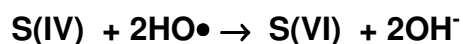
Considerando que (i) ocorre uma elevação do pH do meio com o tempo de sonicação, (ii) “sulfito livre” é oxidado a sulfato pela ação sonoquímica, (iii) os íons sulfato produzidos pela ação sonoquímica não levam à produção de adutos com grupos carbonílicos, e (iv) a incapacidade do ultra-som em degradar os adutos em meio ácido, pôde ser proposto um método para determinar açúcares redutores, de forma indireta, pela monitoração da concentração do “sulfito ligado”. Para tanto é necessário garantir que (i) a quantidade de S(IV) inserida à amostra foi suficiente para reagir com os açúcares redutores em meio ácido, e (ii) que o tempo de sonicação seja suficiente longo para converter todo o S(IV) livre em S(VI) antes da alcalinização do meio. Desta forma, dado que os adutos decompõem-se rapidamente em meio alcalino, a quantificação do S(IV) remanescente permitiu a determinação do teor de açúcares redutores nas amostras investigadas.

Assim, as etapas envolvidas na determinação de açúcares redutores incorporam a adição de excesso de S(IV) à solução da amostra, a sonicação por intervalo de tempo pré-estabelecido para a oxidação de S(IV) a S(VI), a alcalinização da solução e a determinação da concentração do S(IV) remanescente. Deve ser ressaltado que como todos os açúcares redutores apresentam um único grupamento carbonílico, a estequiometria da reação entre S(IV) e o açúcar é 1:1 e, portanto, a

concentração molar de sulfito será igual à concentração dos açúcares redutores presentes na amostra.

Mecanismos de oxidação de S(IV)

De acordo com as evidências: elevação do pH do meio com o tempo de sonicação; oxidação de sulfito livre a sulfato evidenciado pela formação de precipitado com solução de BaCl₂, pode ser proposto os seguintes mecanismos:



Inicialmente, ocorre a formação de radicais **H• e HO•** pela sonólise da água. Em solução podem ocorrer inúmeros rearranjos, como a formação de peróxido de hidrogênio. A primeira hipótese é que os radicais hidroxila reage com o S(IV) formando o S(VI) e acarretando uma elevação do pH do meio. Também pode ser sugerido que os radicais hidroxilas reagem com o peróxido de hidrogênio formado inicialmente em solução formando S(VI).

4.2 Otimização do Procedimento de Análise por Injeção Seqüencial

Para o desenvolvimento de um sistema em fluxo baseado no princípio de análise por injeção seqüencial torna-se necessário uma avaliação dos parâmetros. A otimização foi conduzida pelo método univariado, isto é, variando-se cada parâmetro independentemente e fixando-se os restantes.

4.2.1 Efeito do Volume de Amostra Injetado

O volume total da amostra inserido foi avaliado (Figura 4.4). Esse estudo foi realizado mantendo o volume de reagente igual a 165 μL . A partir dos dados obtidos pôde ser observado o aumento do sinal analítico com o aumento do volume total amostrado. Um volume total de amostra de 206 μL foi selecionado para os experimentos subseqüentes.

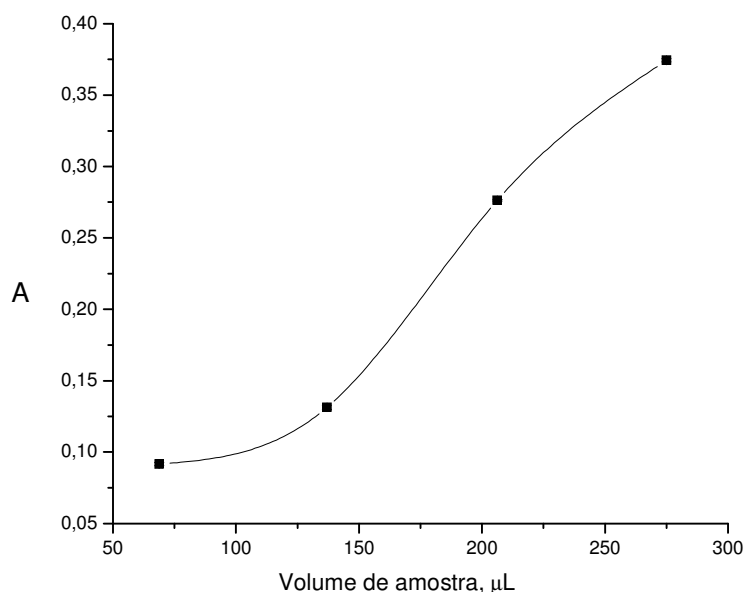


Figura 4.5 Efeito do volume de amostra injetado sob o sinal analítico. Vazão 1,65 mL min^{-1} . $[\text{HSO}_3] = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$. $N= 3$.

4.2.2 Efeito do Volume de Reagente

A partir dos dados obtidos pôde ser observado o aumento do sinal analítico com o aumento do volume total amostrado. Um volume de 82,5 μL foi selecionado para os experimentos subseqüentes, uma vez que para volumes maiores houve decréscimo substancial na magnitude do sinal analítico. Este fato se deve em

princípio, pelo efeito de dispersão e pelo elevado sinal do branco o que acarretaria uma atenuação do sinal analítico.

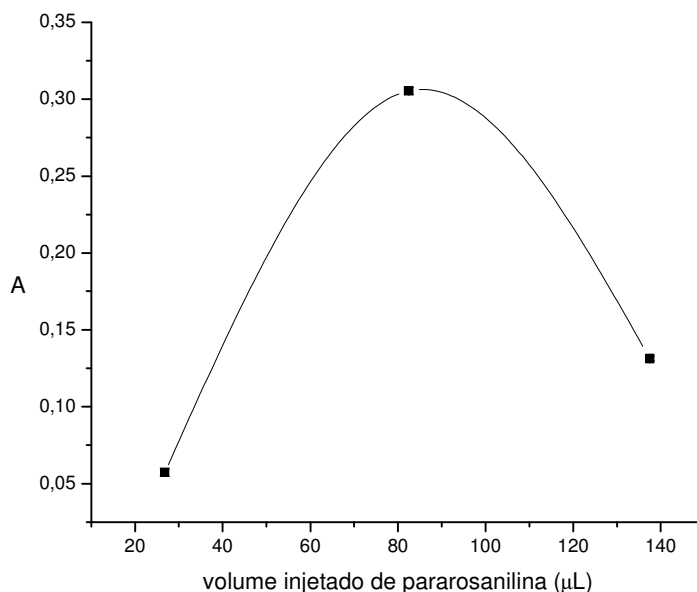


Figura 4.6 Avaliação do volume de p-rosanilina injetado. Vazão $1,65 \text{ mL min}^{-1}$ e $[\text{HSO}_3^-] = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$. $N= 3$.

4.2.3 Concentração de NaOH

A influência da concentração de hidróxido de sódio também foi avaliada, uma vez que o aduto sofre degradação em meio alcalino (Tabela 4.4). A faixa de concentração em estudo foi de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração escolhida foi de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, pois para concentrações maiores houve uma diminuição do sinal analítico. Para concentrações de NaOH na faixa de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ tornava-se inviável a homogeneização e alcanilização da zona da amostra, devido à viscosidade da própria solução de hidróxido de sódio.

Tabela 4.4 Efeito da concentração de NaOH na quebra do aduto. Volume de amostra injetado 206 μL , volume de reagente 82,5 μL , vazão = 1,65 mL min^{-1} , ordem de adição: Soda-amostra- p-rosanilina para 3 ciclos de misturas. Para N= 3.

Concentração de NaOH (mol L^{-1})	Concentração sulfito (mg L^{-1})
1×10^{-2}	$1,14 \pm 0,03$
1×10^{-3}	$1,43 \pm 0,01$
1×10^{-4}	$1,47 \pm 0,03$

4.2.4 Ordem de Adição dos Reagentes

Também foi avaliado no sistema em fluxo proposto a ordem de adição dos reagentes (Tabela 4.5) e o efeito sobre a magnitude do sinal analítico. A ordem que apresentou melhores resultados foi: hidróxido de sódio – aduto – p-rosanilina. A reação entre sulfito e a p-rosanilina ocorre em meio ácido e a partir do momento que se adiciona hidróxido e em seguida p-rosanilina parte do ácido presente na solução do reagente é neutralizado pelo hidróxido implicando na atenuação do sinal analítico. A ordem de adição: P-rosanilina – Hidróxido de Sódio – Amostra não apresentou sucesso já que a reação ocorre em meio ácido e conseqüentemente, parte da acidez proveniente da p-rosanilina era neutralizada pelo hidróxido de sódio implicando numa atenuação na magnitude do sinal analítico.

Tabela 4.5 Efeito da ordem de adição dos reagentes e amostras para a degradação do aduto açúcar redutor-sulfito. N= 3.

Ordem de Adição	Sinal Analítico
Amostra – Soda – P-rosanilina	$0,130 \pm 0,002$
Soda – Amostra – P-rosanilina	$0,161 \pm 0,004$

4.2.5 Forma de Inserção de Reagentes e Amostras

Inicialmente, foi avaliada a forma de inserção da amostra e dos reagentes, associado à multicomutação e aspiração seqüencial seguida de inversão no sentido do fluxo (Tabela 4.6). Usualmente, o conceito de multicomutação está associado à amostragem binária, em que pequenas alíquotas de amostras são intercaladas com pequenas alíquotas de reagente, de acordo com controle de tempo, o que resulta numa maior homogeneização da amostra e por isso uma mistura mais completa.

Tabela 4.6 Comparação das formas de inserção dos reagentes e amostras no sistema SIA proposto. (N = 3)

Forma de inserção	Sinal Analítico
Amostragem binária em tandem	0,516 ± 0,03
Injeção consecutiva da amostra e reagente	0,500 ± 0,02

Com base nos resultados e comparando as formas de inserção não foram observadas diferenças significativas (~3%) que levassem a optar pela amostragem binária em tandem das soluções da amostra e do reagente ao invés da injeção consecutiva de uma alíquota da solução da amostra seguida de uma alíquota única da solução reagente. Além disto à amostragem binária sacrificava a válvula seletora multiposição nas rotinas de análise.

4.2.6 Efeito do Número de Ciclos para Misturas

O número de inversões no sentido do fluxo no sistema SIA para garantir a maior taxa de reação também foi avaliado. Para tanto, o tempo proporcional ao deslocamento que a zona de amostra era submetida a cada inversão no sentido do

fluxo foi mantido constante em 10 s. A variação do sinal analítico com o número de inversões do sentido do fluxo pode ser observada na Figura 4.6. De acordo com os dados obtidos pôde ser observado que três ciclos foram suficientes para garantir a melhor condição de mistura com a menor dispersão. Para um maior número de ciclos acarretaria uma maior dispersão da zona reacional e conseqüentemente uma atenuação na magnitude do sinal analítico.

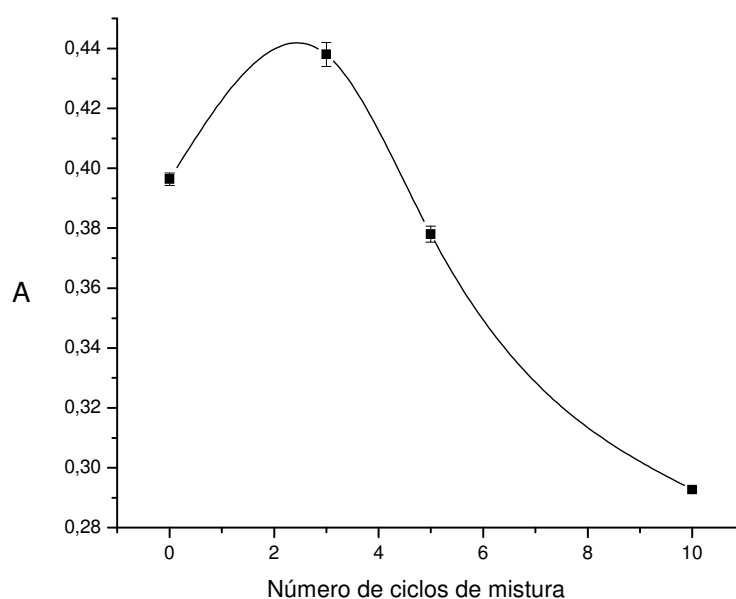


Figura 4.7 Avaliação da influência do número de ciclos de mistura na reação. Volume de amostra injetado 206 μL , vazão 1,65 mL min^{-1} e $[\text{HSO}_3^-] = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$. N= 3.

4.3 Avaliação de Interferentes

Um estudo de interferência torna-se necessário com o grau de complexidade de diferentes matrizes. A literatura cita uma série de interferentes no método da p-rosanilina, como por exemplo: Acetaldeído, acroleína, propinaldeído, benzaldeído, cianeto, acetato, bicarbonato, nitrito e peróxido de hidrogênio. Como possíveis interferentes do sistema proposto seriam aqueles que reagissem com o sulfito,

interferindo na formação e degradação do aduto açúcar redutor-bissulfito. No presente trabalho as matrizes não apresentavam um grau de complexidade elevado, já que a princípio era aplicação da metodologia proposta na determinação de açúcares redutores em sucos em geral. Então foi avaliado como principal interferente o ácido ascórbico presente nestes sucos de frutas. Para avaliar o nível de interferência foram preparadas soluções mistas contendo o analito (sulfito) e o interferente nas diversas proporções molares, sendo o sinal obtido comparado com uma solução de referência (sulfito puro). A partir dos resultados obtidos, pela diferença significativa de sinal analítico, constatou-se a interferência do ácido ascórbico em todas as proporções estudadas (Tabela 4.7). Esta interferência ocorre devido possivelmente, a interação do ácido deidroascórbico com o sulfito em solução ou produto originado da oxidação durante a etapa de sonicação (Figura 4.7).

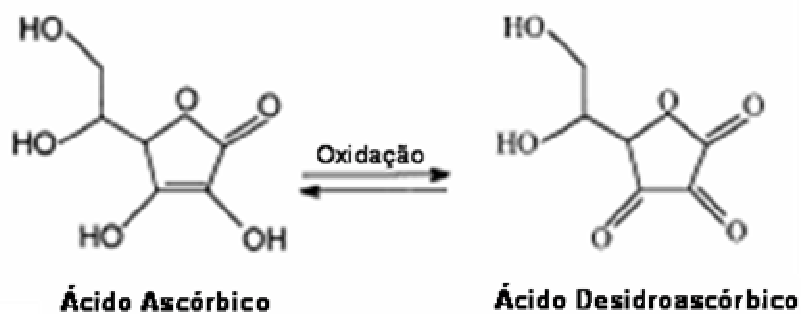


Figura 4.8 – Degradação de ácido ascórbico em solução aquosa para ácido desidroascórbico

Tabela 4.7 Avaliação da interferência de ácido ascórbico na determinação de sulfito pelo sistema SIA proposto.

Concentração (mg L ⁻¹)		Sinal analítico
S(IV)	ácido ascórbico	
1	0	0,493 ± 0,003
1	0,001	0,454 ± 0,006
1	0,01	0,452 ± 0,003
1	0,1	0,393 ± 0,005
1	1	0,304 ± 0,005
1	10	0,286 ± 0,002
1	100	0,212 ± 0,004

4.4 Figuras de Mérito

Nas condições otimizadas o sistema SIA proposto apresentou boa precisão com desvios padrão relativos inferiores a 2,0 %, possibilitando a determinação de 12 amostras por hora, com elevada sensibilidade. O limite de detecção (3σ) foi estimado em $6,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação em $2,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em açúcares redutores totais. A faixa linear de trabalho foi de $6 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de açúcares redutores, respondendo à equação ($A = -0,01225 + 0,1473 \cdot C(\text{mg L}^{-1})$, $R = 0,9997$) como pode ser observado na Figura 4.9.

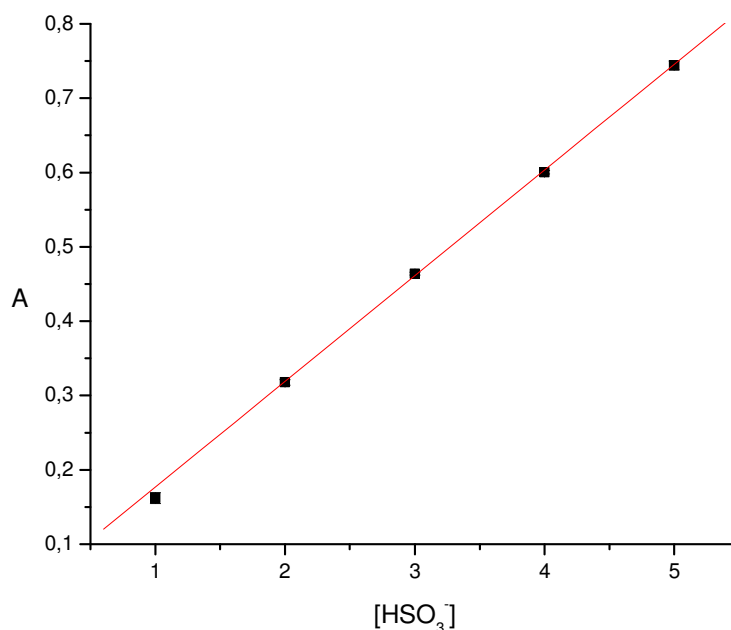


Figura 4.9 Curva analítica para determinação indireta de açúcares redutores empregando o sistema SIA proposto nas condições otimizadas.

4.5 Aplicação

Confirmada a capacidade do sistema SIA proposto para determinação de açúcares redutores, o método foi aplicado em amostras de soro glicosado, água de coco engarrafado e açúcar. Os resultados obtidos foram comparados com o método de referência para açúcares redutores (Tabela 4.8), sendo adotado o método de Lane-Eynon (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Este método tem como princípio considerar açúcares redutores, como glicose e frutose, capazes de reduzir o cobre presente em soluções cupro-alcálicas. Os açúcares são oxidados a ácidos orgânicos, em reação que não é estequiométrica, onde se mantém a mesma proporcionalidade entre as quantidades de açúcares redutores e cobre reduzido. Essa relação empírica é empregada para se calcular a

quantidade de açúcar redutor em uma solução necessária para reduzir, sob aquecimento, o cobre presente na forma de íons cúpricos em uma solução estabelecida por íons tartaratos.

Tabela 4.8 Resultados obtidos com o método proposto (SIA) e com o método de referência (Instituto Adolfo Lutz, 1985). (N = 3) Resultados expressos em % m/m de glicídeos redutores. As amostras de 1 a 3 são de soros glicosados; 4 e 5 são amostras de água de coco engarrafadas; 6 e 7 - amostras de açúcar cristal.

Amostra	Método Proposto (%,m/m)	Método de Referência (%, m/m)
1	62,2 ± 0,4	64,1 ± 0,8
2	59 ± 1	61 ± 1
3	65,4 ± 0,7	64,6 ± 0,7
4	10,7 ± 0,5	11,5 ± 0,6
5	12,0 ± 0,7	11,0 ± 0,8
6	nd	nd
7	nd	nd

* nd = Não detectado

5.0 Potencialidades e Perspectivas Futuras

Com relação aos métodos convencionais para determinação de açúcares redutores, baseados nas reações de oxirredução, nenhum enfoque tem sido dado à presença de sulfitos. As metodologias convencionais estão baseadas em reação redox com Cu^{2+} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ou IO_4^- e determinação subsequente da fração de espécies oxidantes que não reagem ou a concentração das espécies produzidas através destas reações. Entretanto nenhum estudo é realizado em relação à presença de sulfito nestes sistemas, pois os mesmos podem reduzir as espécies de estudo (Cu^{2+} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ou IO_4^-). Também é de conhecimento que os sulfitos em meio ácido se volatilizam, no entanto há possibilidades de que durante este processo, estes se liguem a compostos carbonílicos presentes em solução formando adutos estáveis.

Considerando o contexto em que foi desenvolvido é importante destacar a proposta de cunho inovador apresentada, pois na literatura consultada nenhum enfoque tem sido dado em relação aos adutos de açúcares redutores e enxofre (VI), bem como exploração destes no sentido de desenvolvimento de métodos alternativos para determinação indireta de açúcares redutores.

6.0 Conclusão

A versatilidade dos sistemas SIA somada a uma elevada produtividade analítica e ao reduzido consumo de amostras e reagentes torna o procedimento proposto para a determinação de açúcares redutores em diferentes amostras de bebidas e alimentos uma alternativa atraente para procedimentos de análise de rotina. Os resultados obtidos confirmaram a potencialidade do procedimento proposto para a determinação indireta de açúcares redutores baseado na associação da análise por injeção seqüencial e a degradação do sulfito livre pela irradiação ultra-sônica.

O método proposto possibilitou a determinação de açúcares redutores totais, apresentando RSD < 2% para 10 determinações consecutivas. Os resultados obtidos empregando o procedimento em fluxo proposto foram comparados com os obtidos pelo método de referência (método de Lane-Eynon) e, empregando teste *t-pareado*, foi observada concordância para 95% de confiabilidade. Nas condições otimizadas o sistema possibilitou o processamento de até 12 amostras por hora, apresentando limite de detecção de $6,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de quantificação em $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em açúcares redutores totais.

O emprego do ultra-som mostrou-se promissor para a oxidação de S(IV) a S(VI), o que pode ser constatado a partir dos ensaios de precipitação com BaCl_2 . O formato dos perfis de sonicação sugere que a oxidação de S(IV) para S(VI) ocorreu por reação com radicais livre e, possivelmente, pela ação dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) produzidos. A sonicação exaustiva da solução de S(IV) leva à completa degradação do mesmo, sendo este tempo dependente da concentração de sulfito livre no meio.

O método proposto apresenta algumas limitações, pois o mesmo não pode ser aplicado em amostras de sucos de frutas, devido à presença de ácido ascórbico. O ácido ascórbico interfere na determinação de açúcares redutores, possivelmente, devido à interação do ácido desidroascórbico formado com o S(IV). A sua aplicação também se torna inviável para a determinação de açúcares redutores em vinhos, pois nos mesmos há sulfito livre e ligado na forma de adutos com aldeídos, antocianina e/ou açúcares, e a irradiação ultra-sônica mostrou-se inadequada para a degradação dos adutos.

7.0 Referências Bibliográficas

ACHÁ, V., NAVEAU, H. e MEURENS, M. Extractive sampling methods to improve the sensitivity of FT-IR spectroscopy in analysis of aqueous liquids. *Analisis*, 26,157, 1988.

ALIPÁZAGA, M.V., KOSMINSKY, L. COICHEV, N. e BERTOTTI, M., S(IV) induced autoxidation of Cu(II)/tetraglicine complexes in the presence of aldehydes: mechanistic considerations and analytical application, *Talanta*, 57, 375, 2002.

ALVES, E.R., FORTES, P.R., BORGES, E.P. e ZAGATTO, E.A.G., Spectrophotometric flow-injection determination of total reducing sugars exploiting their alkaline degradation, *Analytica Chimica Acta*, 2005.

AMERINE, M.A e OUGH, C.S., *Methods for analysis of Musts and wines* , Wiley, New York, 1980.

ANDRADE, J.B., ANDRADE, M.V., PINHEIRO, H.L.C., MARTINS, R.A. e BORGES, E.L., Determination of Formaldehyde and Acetaldehyde by HPLC, *American Laboratory*, 31, 22, 1999.

AQUARONE, E., LIMA, U.A. e BORZANI, W., *Biotecnologia – Alimentos e Bebidas produzidos por fermentação*, Ed. Edgard Blucher, v 5, São Paulo, 1983.

ARAÚJO, A.N., LIMA, J.L.F.C., RANGEL, A.O.S.S. e SEGUNDO, M.A., Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugar in wines, *Talanta*, 52, 59, 2000.

BAKER, D., The determination of fiber, starch and total carbohydrate in snack foods by near-infrared reflectance spectroscopy, *Cereal Food. World*, 30, 389, 1985.

BETHGE, P.O. e CARLSON, M., p-nitroaniline as a colorimetric reagent for sulphur dioxide, *Talanta*, 16, 144, 1969.

BREVIL, C. e SADDLER, J.N., Comparison of the 3,5- dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity, *Enzyme and Microbiology*, 7, 327, 1985.

BRONIKOWSKA, W.P. e RUDZINSKI, K.J., Absorption of SO₂ into aqueous systems, *Chemical Engineering Science*, 46(9), 2281, 1991.

BOLTZ, D.F. e HOWOLL, J.A., Colorimetric determination of nonmetals, 2^a edition, John Wiley & Sons, NY, 1978.

BORGES, M.T.M.R., PARAZZI, C. e PIEDADE, S.M.D.S., Avaliação de métodos químicos de determinação de açúcares redutores em xaropes, *Anais do 4^o Congresso Nacional da STAB. VIII Convenção da ACTALAC*, Olinda, PE, 1987.

BORGES, S.S. e KORN, M., Geração sonoquímica de oxidantes em solução saturada de tetracloreto de carbono, *Química Nova*, 25, 558, 2002.

BORGES, S.S., KORN, M. e LIMA, J.L.F.C. , *Analytical Science*, 18, 1361, 2002.

BURROUGHS, L.F. e SPARKS, A.H., Sulphite-binding power of wines and ciders, II – Theoretical considerations and calculation of sulphite binding equilibria, *Journal Science Food Agriculture*, 24, 199,1973.

CADET, F. e OFFMANN, B., Extraction of characteristic bands of sugars by multidimensional analysis of their infrared spectra. *Spectroscopic Letters.*, 29, 523, 1997.

CALATAYUD, J.M., *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: automation in the laboratory*, Taylor & Francis, London, 1995.

CANO, C.B. e ALMEIDA-MURADIAN, L.B., Análise de padrões de carboidratos normalmente encontrados no mel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Parte I. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998.

CAPELO, J.L., FILGUEIRAS, A.V., LAVILLA, I. BENDICHO, C. Solid-liquid extraction of copper from slurried samples using high intensity probe sonication for electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 50, 905, 1999.

CASELA, I.G., GUASCITO, M.R. e DESIMONI, E., Sulfide measurements by flow injection analysis and ion chromatography with electrochemical detection, *Analytical Chimica Acta*, 409, 27, 2000.

CHRISTIAN, G.D., RUZISKA, J. e The second coming of flow-injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, 261, 11, 1992.

CRANE, E., *Bees and beekeeping: science, practice and world resources*. Oxford: Heinemann Newnes, 1990.

COURTIN, C.M., VAN DEN BROECK, H., DELCOUR, J.A, Determination of reducing end sugar residues in oligo and polysaccharides by gas-liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, 866, 197, 2000.

CUNNIFF, O. Ed., *Association of Official Analytical Chemists; Official Methods of Analysis of AOAC International*, Arlington, 33,1995.

DANIELSON, N.D.; HEENAN, C.A.; HADDADIAN, F. e NUMAN, A.Q, Fluorometric determination of fructose, glucose, and sucrose using zirconyl chloride, *Microchemical Journal*, 63, 405, 1999.

DOKTYCZ, S.J. e SUSLICK, K.S., *Interparticle Collisions Driven by Ultrasound*, *Science*, 247, 1067-1069, 1990.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTO, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., *Colorimetric method form determination of sugars and related substaces*, *Nature*, 28, 350, 1956.

ÉL'PINER, I.E. *Ultrasound: Physical, Chemical, and Biological Effects*, Consultants Bureau Entrerprises, Inc., 1964, 371.

FATIBELLO-FILHO, O. e VIEIRA, I.C., *Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (Ipomoea batatas (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase*, *Analytica Chimica Acta*, 354, 51, 1997.

FIALAB Instruments, Leaders in Flow Injection Technology, acessado dia 12/05/2006.

FROST, G.M., Industrial enzyme applications industrial, Biotechnology wales, 11, 1984.

GROOM, C.A., LUONG, J.H.T. e MASSON, C., Development of a flow injection analysis mediated biosensor for sulfite, Journal of Biotechnology, 27, 117, 1993.

GRU, C., SARRADIN, P.M., LEGOFF, H.N, CAPRAIS, S. e LALLIER, H. Determination of reduced sulfur compounds by high-performance liquid chromatography in hydrothermal seawater and body fluids from Riftia pachyptila, Analyst, 123, 1289, 1998.

HASSAN, S.S.M., MAREI, S.A., BADR, I. H. e ARIDA, H. A., Flow injection analysis of sulfite ion with a potenciometric titanium phosphate-epoxy based membrane sensor, Talanta, 54, 773, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 45, 1985.

JANKOVSKIENE, G., DAUNOIRAVICIUS, Z. e PADARAUSKAS, A., Capillary electrophoretic determination of sulfite using the zone-passing technique of in-capillary derivatization, Journal of Chromatography A, 934, 67, 2001.

JURD, L., Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins, *Journal of Food Science*, 29 (1), 16, 1964.

KNISELEY, S.J. e THROOP, L.J., p-Aminoazobenzene for the spectrophotometric determination of sulfur dioxide, *Analytical Chemistry*, 38(9), 1270, 1966.

KOERNER, C.A. e NIEMAN, T.A., Chemiluminescence flow injection analysis determination of sucrose using enzymatic conversion and a microporous membrane flow cell, *Analytical Chemistry*, 58, 116, 1986.

KORN, M., PEREIRA, M.G. e BORGES, S.S., Algumas aplicações analíticas dos ultra-sons, *Sociedade Portuguesa de Química*, 51, 2005.

KUNSST, A., DRAEGER, B. e ZIEGENHORN, J., *Methods in enzymatic analysis*, 3ª edição, Academic Press: New York, 163, 1984.

LAMBERT, J.L., CHEJLAVA, M.J., BEYAD, M.H. e PAUKSTELIS, J.V., The protonated 4,4'-diaminotriphenylmethyl cation as a reagent and cyclohexanone as an absorbant for sulphur dioxide determination, *Talanta*, 29, 37, 1982.

LAMBERT, J.L., CHEJLAVA, M.J., PAUKSTELIS, J.V. e LIU, A.T., 4-nitro-1,2-diaminobenzene as a new chromogen in the West-Gaeke method for sulfur dioxide, *Analytica Chimica Acta*, 99, 379, 1978.

LEE, J.D., *Química Inorgânica: um novo texto conciso*, Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1980.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L e COX, M.M., Princípios de Bioquímica, 3ª edição, Editora Sarvier, São Paulo, 2000.

LINDGREN, M. e CEDERGREN, A., Conditions for sulfite stabilization and determination by ion chromatography, *Analytical Chimica Acta*, 141, 279, 1982.

LOPES, T.I.M.S., RANGEL, A.O.S.S., LIMA, J.L.F.C e MONTENEGRO, M.C.B.S.M., Construction and use of a tubular picrate íon-seletive electrode for reducing sugar determination in Port Wine by flow-injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, 122, 1995.

MAQUIEIRA, A., LUQUE DE CASTRO M.D e VALCARCEL, M., Determination of reducing sugars in wine by flow-injection analysis, *Analyst*, 112, 1569, 1987.

MARCHINI, L.C. *Caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos*. 2001. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

MARTINS, C.R e ANDRADE, J.B., Química atmosférica do enxofre (IV): emissões, reações em fase aquosa e impacto ambiental, *Química Nova*, 25 (2), 259, 2002.

MASON, T.J. e LORIMER, J.P., *Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry*, Ellis Horwood Limited, Chichester, UK, 1988.

MATISSEK, R., SCHENEPEL, F.M. e STEINER, G. Analisis de los alimentos: fundamentos, metodos, aplicaciones. Editora Acribia, S.A, Espanha, 1998.

MATTOS, I.L., ZAGATTO, E.A.G. E JACINTHO, A.O., Spectrophotometric flow-injection determination of sucrose and total reducing sugar in sugar-cane juice and molasses, *Analytica Chimica Acta*, 214, 1988.

MEADE, G.P., CHEN, J.C.P., Cane Sugar Handbook. 11ed. New York: John Wiley & Sons, 947,1977.

MIURA, Y., FUZUNOBU, K. e KOH, T., Determination of sulfur compounds at the ppb level by ion chromatography utilizing their catalytic effects on the post-column reaction of iodine with azide, *Journal of Chromatography A*, 804, 143, 1998.

NELSON, N., A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose, *Journal of Biologic Chemistry*, 153, 375, 1960.

OLIVEIRA, A.F. e FATIBELLO-FILHO, O., Flow injection spectrophotometric determination of reducing sugars using a focalized coiled reactor in a domestic microwave oven, *Talanta*, 50, 899, 1999.

OLIVEIRA, A.F., FATIBELLO-FILHO, O. e NÓBREGA, J. A., Focused-microwave-assisted reaction in flow injection spectrophotometry: a new liquid–vapor separation chamber for determination of reducing sugars in wine, *Talanta*, 55, 677, 2001.

PARELLADA, J., DOMÍNGUEZ, E. e FERNÁNDEZ, V.M., Amperometric flow injection determination of fructose in honey with a carbon paste sensor based on fructose dehydrogenase, *Analytica Chimica Acta*, 330, 71, 1996.

PÉREZ-OLMOS, R., SOTO, J.C., ZÁRATE, N., ARAÚJO, A.N., LIMA, J.L.F.C. e SARAIVA, M.L.M.F.S., Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis, *Food Chemistry*, 90, 2005.

PERIS-TORTAJADA, M., PUCHADES, R. e MAQUEIRA, A., *Food Chemistry*, 43, 1992.

PIZZOFERRATO, L., LULLO, G. e QUATTUCCI, E., Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC, *Food Chemistry*, 43 (2), 275, 1998.

QIN, W., ZHANG, Z. e ZHANG, C., Chemiluminescence flow system for the determination of sulfite, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 824, 1998.

RAMAN, V., RAI, J., SINGH, M. e PARASHAR, D. C., Morpholine as an absorbing reagent for the determination of sulphur dioxide. *Analyst*, 111, 189, 1986.

REIS, B.F., GINÉ, M.F., ZAGATTO, E.A.G, LIMA, J.L.F.C. E LAPA, R.A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests, *Analytica Chimica Acta*, 293, 129, 1994.

REIS, B.F., TOMAZZINI, M.C. e TUMANG, C.A., Automatic procedure exploiting multicommutation in flow analysis for simultaneous spectrophotometric determination of nonstructural carbohydrates and reducing sugar in forage materials, *Analytical Sciences*, 19, 1683, 2003.

RUZICKA, J., e HANSEN, E.H., FIA. Parte I: A new concept of fast continuous flow analysis, *Analytica Chimica Acta*, 78, 145, 1975.

RUZICKA, J. e MARSHALL, G.D., Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, *Analytica Chimica Acta*, 237, 329 - 343, 1990.

SAFAVI, A. e ENSAFI, A.A., Kinetic spectrophotometric determination of traces of sulphites, *Analytical Chimica Acta*, 252, 121, 1991.

SANTOS, J.C.C., Dissertação de Mestrado: Avaliação e síntese de corantes fenotiazínicos para determinação espectrofotométrica de sulfeto e sulfito empregando sistemas de análise em fluxo, Universidade Federal da Bahia, 2004.

SARTINI, R.P., OLIVEIRA, C.C., ZAGATTO, E.A.G e BERGAMIN-FILHO, H., Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry. *Analytica Chimica Acta*, 366, 119, 1998.

SCHNEIDER, F., Sugar analysis. Official and tentative methods recommended by the international commission for uniform methods of sugar analysis (ICUMSA), Peterborough, 41, 1979.

STRYER, L., TYMOCZKO, J.L e BERG, J.M., Bioquímica, 3ª edição, Editora Guanabara Koogan, São Paulo, 2001.

SUSLICK, K.S. The Chemical Effects of Ultrasound, Scientific American, 2, 80-86, 1989.

SUSLICK, K.S. Applications of ultrasound to materials chemistry, Sonochemistry Science, 247, 1439-1445, 1990.

TRENT, J.D e CHRISTIANSEN, S., Determination of total nonstructural carbohydrates in forage tissue by p-hydroxybenzoic acid hydrazide flow injection analysis, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, 1033, 1986.

UMIKER, K.J., MORRA, M.J. e CHENG, I.F., Aqueous sulfur species determination using differential pulse polarography, Microchemical Journal, 73, 287, 2002.

VILLELA, G.G., BACILA, M., TASTALDI, H, Técnicas e experimentos de bioquímica, ed Guanabara, 552, São Paulo, 1973.

WEST, P.W. e GAEKE, G.C., Fixation of sulfur dioxide as disulfitomercurate (II) and subsequent colorimetric estimation, Analytical Chemistry, 28, 12, 1956.

XIN-QI, Z., DONG-HUI, L., HONG, Z. e JIN-GOU, Fluorimetric determination of sulfite by the co-quenching effect of formaldehyde and sulfite on the fluorescence of tetra-substitued amino aluminum phthalocyanine, Analytica Chimica Acta, 448, 71, 2001.

YANG, X.F., GUO, X.Q. e ZHAO, Y.B., Novel spectrofluorimetric method for the determination of sulfite with rhodamine B hydrazine in a micellar medium, *Analytica Chimica Acta*, 456, 121, 2002.

ZAGATTO, E.A.G., ALVES, E.R., BORGES, E.P e BARROS, V.A.F., Determinação de açúcares redutores totais empregando sistemas de análises por injeção em fluxo: aplicação a amostras de relevância sucro-alcooleira, *Revista Analytica*, 19, 2005.

ZAGATTO, E.A.G., MATTOS, I.L. e JACINTHO, A.O., Determination of sucrose in sugar-cane juice and molasses by flow-injection spectrophotometry, *Analytica Chimica Acta*, 204, 1988.