

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Silvia Regina Pessoa de Meneses

**Monitoramento de espécies químicas produzidas durante a
fermentação alcoólica utilizando sistemas de análises em fluxo**

PIRACICABA - SP

2008

Silvia Regina Pessoa de Meneses

**Monitoramento de espécies químicas produzidas durante a fermentação
alcoólica utilizando sistemas de análises em fluxo**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura
da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente.

Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto

PIRACICABA – SP

2008

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Meneses, Silvia Regina Pessoa de

Monitoramento de espécies químicas produzidas durante a fermentação alcoólica utilizando sistemas de análise em fluxo / Silvia Regina Pessoa de Meneses; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - Piracicaba, 2008.

45 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise em fluxo contínuo 2. Espectrofotometria 3. Química analítica I. Título

CDU 543.068.3:543.27

*Ao meu amado filho Rafael, por ser
a razão da minha vida*

*Às minhas adoradas mãe Marilene, avó Laura e
irmã Sandra, pelo amor, pelo carinho
e pela paciência*

*Aos meus queridos tios, primos, sobrinhos e
minha querida madrinha por sempre
acreditaram em mim*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo pelas facilidades oferecidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

Ao Professor Elias Ayres Guidetti Zagatto, pela orientação científica, ensinamentos de vida e amizade.

Ao Professor Luiz Carlos Basso, pelas discussões, orientações científicas e amizade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica do CENA, Professores Francisco Krug, Boaventura Reis, Fernanda Giné, José Ferreira, pela colaboração e convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Química Analítica do CENA, Sheila, Fátima, Yolanda, Valdemir, e Otávio, pelo apoio, carinho e amizade.

Às bibliotecárias da Seção Técnica de Biblioteca do CENA, pela amizade e presteza.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação do CENA, pela amizade e auxílio.

Aos amigos do Laboratório de Química Analítica do CENA, especialmente, Viviane Paula, Evandro e Mário, pelas colaborações científica e pessoal, apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica do CENA, Sandra, Josiane, Simone, Ana Cristi, Rejane, Carla, Gláucia, Quienly, Marcelo, Alfredo, Dario e Milton, pela amizade, estímulo.

Aos amigos especiais, Paula, Viviane, Sheila, Cristiane e Evandro, pela disposição e carinho em me receber em vossas casas.

Aos amigos da vida toda, Cristiane Vigna, Márcia Falcão, Viviane Burili, Silvia Mauri, Regina Pedron, Cida Ribeiro, Lilian Silva, Marcus Opsal e amigos da BOA, por existirem.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma

Até quando o corpo pede um pouco mais de alma

A vida não pára...

Enquanto o tempo acelera e pede pressa

Eu me recuso faço hora vou na valsa

A vida é tão rara...

Enquanto todo mundo espera a cura do mal

E a loucura finge que isso tudo é normal

Eu finjo ter paciência...

O mundo vai girando cada vez mais veloz

A gente espera do mundo e o mundo espera de nós

Um pouco mais de paciência...

Será que é tempo que lhe falta pra perceber?

Será que temos esse tempo pra perder?

E quem quer saber? A vida é tão rara

Tão rara...

Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma

Mesmo quando o corpo pede um pouco mais de alma

Eu sei, a vida não pára

A vida não pára não...

(Paciência, Lenine)

Não são nossas habilidades que revelam quem realmente somos,
são as nossas escolhas.

Alvo Dumbledore em “Harry Potter e a Câmara Secreta”

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Lista de Figuras.....	xii
1. Introdução.....	01
2. Revisão da literatura.....	10
3. Materiais.....	15
3.1 Instrumentos e acessórios.....	15
3.2 Reagentes.....	16
3.3 Amostras.....	17
3.4 Outros materiais.....	17
4. Método.....	18
4.1 Sistemas de análises em fluxo.....	18
4.2 Solução receptora.....	20
4.3 Solução doadora.....	21
4.4 Acidez do ambiente reacional.....	22
4.5 Concentração dos reagentes.....	23
4.6 Efeito da temperatura.....	23
4.7 Intervalo de tempo disponível par as reações.....	24
4.8 Figuras de mérito.....	24
5. Resultados e discussão.....	25
5.1 Sistemas de análises em fluxo.....	25
5.2 Solução receptora.....	25
5.3 Solução doadora.....	26
5.4 Acidez do ambiente reacional.....	27
5.5 Concentração dos reagentes.....	29
5.6 Efeito da temperatura.....	30
5.7 Intervalo de tempo disponível par as reações.....	30
5.8 Figuras de mérito.....	33
6. Conclusões.....	37
7. Referencias.....	39

RESUMO

MENESES, S.R.P. **Monitoramento de espécies químicas produzidas durante a fermentação alcoólica utilizando sistemas de análises em fluxo.** 2008. 45 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

Sistemas de análises químicas por injeção em fluxo envolvendo difusão gasosa foram projetados para a determinação espectrofotométrica de sulfeto e sulfito em melaços e caldos de cana de açúcar fermentados, visando a seleção de leveduras em função das quantidades destas espécies químicas produzidas durante o processo de fermentação.

Os métodos para determinação de sulfeto e sulfito envolveram os reagentes N,N-dimetil-*p*-fenilenidiamino (DMPD) e verde de malaquita (MG), respectivamente. A reação entre DMPD e sulfeto, em presença de Fe(III) e em meio ácido, resulta na formação de azul de metileno (MB) que é monitorado a 668 nm. O sinal analítico é registrado sob forma de pico cuja altura é proporcional ao teor de sulfeto na amostra. A reação entre MG e sulfito, em meio alcalino, resulta na diminuição da absorbância de MG monitorada a 620 nm. O sinal analítico é registrado como pico invertido proporcional à concentração de sulfito.

Os principais parâmetros envolvidos em ambas as determinações, tais como vazões, concentrações de reagentes, pH dos ambientes reacionais, temperatura, volume inserido da amostra, dimensões dos módulos de análises, bem como presença de tensoativos e eletrólitos concentrados foram investigados, permitindo a otimização dos sistemas.

Devido às interações entre os analitos e os compostos contendo grupos carbonila existentes na matriz, bem como atrações eletrostáticas entre as espécies gasosas formadas e as partículas em suspensão, a etapa de volatilização dos analitos da amostra se constituiu em

fator limitante quanto á utilização dos procedimentos em análises *in situ*. Neste sentido, a necessidade de tratamento prévio da amostra foi demonstrada.

Os sistemas propostos são robustos e fornecem resultados precisos (d.p.r. < 2 %) com valocidade analítica de 30 determinações por hora. As curvas analíticas se apresentam lineares até 5,0 mg L⁻¹ S-S²⁻ ou 25,0 mg L⁻¹ S-SO₂, os limites de detecção foram estimados como 0,04 e 0,7 mg L⁻¹ de S-S²⁻ e S-SO₂, e os consumos de reagentes foram de 0,6 mg DMPD e de 0,002 mg MG por determinação. Emprego do método das adições-padrão foi sugerido para superação das interferências matriciais.

ABSTRACT

MENESES, S.R.P. **Analytical flow systems for monitoring some chemical species produced during sugar fermentation for ethanol production.** 2008. 45 p. Thesis (Doctoral) – Centre for Nuclear Energy in Agriculture, University of S. Paulo, Piracicaba, 2008.

Flow injection systems involving gas diffusion were designed for spectrophotometric determination of sulfide and sulfite in fermented sugarcane juices and molasses, aiming at yeast selection relying on their amounts produced during fermentation process.

N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine (DMPD) e malachite green (MG) were used for sulfide and sulfite determinations, respectively. Reaction of sulfide with DMPD was developed in the presence of Fe(III) under acidic conditions, and yielded molybdenum blue (MB), which was monitored at 668 nm. The analytical signal was recorded as a peak with height proportional to the sulfide content in the sample. Reaction of sulfite with MG was developed under alkaline conditions, and caused a MG absorbance lessening monitored at 620 nm. The analytical signal was recorded as an inverted peak proportional to the sulfite concentration.

For both determinations, the main involved parameters such as flow rates, reagent concentrations, pH of the reaction media, temperature, sample inserted volume, manifold geometry, as well as the presence of surfactants and concentrated electrolytes were investigated, allowing further system optimization.

Due to analyte interactions with the carbonyl groups of some chemical species in the sample, as well as electrostatic attractions of the formed gaseous species by the solid suspended particles, the volatilization step constituted itself in a limiting factor for applying

the procedures to *in situ* analysis. In this context, the need for a previous sample treatment was suggested.

The proposed systems are rugged and yield precise results (r.s.d. < 2 %) at a sampling rate of 30 determinations per hour. Linearity of the analytical curves was noted up to 5.0 mg L⁻¹ S-S²⁻ or 25.0 mg L⁻¹ S-SO₂, detection limits were estimated as 0.04 mgL⁻¹ S-S²⁻ and 0.7 mg L⁻¹ S-SO₂, and the reagent consumptions were 0.6 mg DMPD and 0.002 mg MG per determination. Exploitation of the standard addition method for overcoming matrix effects was suggested.

LISTA DE FIGURAS

1. Câmara de difusão gasosa tipo “sandwich”.....	15
2. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de sulfeto.....	19
3. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de sulfito.....	20
4. Influência da natureza da solução doadora.....	26
5. Influência da concentração de HCl nos reagentes.....	28
6. Influência do pH da solução R ₂	28
7. Influência da concentração dos reagentes.....	29
8. Influência da concentração do reagente MG.....	30
9. Influência da vazão da solução doadora.....	31
10. Influência da vazão da solução receptora.....	31
11. Influência da vazão dos reagentes.....	32
12. Registro de sinais referentes a soluções-padrão e amostra.....	34
13. Curvas analíticas associadas a sulfeto.....	35
14. Curvas analíticas associadas a sulfito.....	36

1. INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos que se apresentam, usual e predominantemente, sob forma unicelular. Como células simples, crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores. Por causa da sua alta relação área/volume, são eficientes na realização de alterações químicas. São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas (Stevenson, 1974).

Atualmente empregadas em escala industrial, são de extrema importância para a produção de bebidas fermentadas, panificação e álcool combustível (Gutierrez, 1997). Além desses, outros produtos podem ser obtidos da biomassa de leveduras, *e.g.* proteínas, lipídios, nucleotídeos, enzimas, pigmentos, aminoácidos, vitaminas, etc. (Halasz & Lasztity, 1991).

No Brasil, linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisae* são comumente utilizadas para obtenção de etanol por serem de fácil manutenção em laboratório e por apresentarem bioquímica, genética e biologia celular bem conhecida (Rose & Harrison, 1969; Hartwell, 1974). A fermentação alcoólica é o único procedimento adotado para a obtenção de etanol em nosso país. Conduzida em larga escala transforma os açúcares redutores provenientes da hidrólise ácida ou enzimática da sacarose extraída da cana de açúcar, em etanol e CO₂ (Gutierrez, 1997).

O caldo de cana obtido no processo de extração apresenta quantidade e qualidade variável de impurezas. Areia, argila e bagacilho são algumas das impurezas insolúveis eliminadas através do tratamento primário que inclui peneiramento e centrifugação do caldo.

Nas etapas seguintes de produção do mosto para fermentação, o caldo passa por um tratamento químico que inclui aquecimento a 105 °C (coagular e flocular colóides ou não açúcares, emulsificar graxas e ceras), purificação (sedimentar e filtrar impurezas floculadas) e evaporação da água, para que o produto final seja um xarope com 55 – 65 °Brix. Visando o

controle da acidez e assepsia do caldo, a adição de SO₂ (resultante da queima de enxofre) é frequentemente utilizada (Copersucar, 05/mai/2008).

Resíduos de sulfito podem ser tóxicos. Seu teor no produto final deve então se manter abaixo dos limites máximos permitidos (Reed & Peppler, 1973; Rose, 1977). Deve-se aqui salientar que a presença de sulfito sob baixas concentrações é desejável porque esta espécie reage com compostos carbonílicos, contribuindo para a estabilização do aroma das bebidas fermentadas (Meade, 1977). Relativamente à produção de etanol, a presença de sulfito durante o processo de fermentação exerce um efeito benéfico na redução do crescimento bacteriano, reduzindo por consequência os custos da produção (Alves, 1994).

A diminuição da quantidade adicionada de sulfito tem sido proposta (Caridi & Corte, 1997) para reduzir seu teor no produto final, pois a própria levedura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo responsável pela fermentação alcoólica, tem a habilidade metabólica para produzir sulfito a partir da redução enzimática do sulfato presente no meio fermentescível (Heinzel & Truper, 1978). Linhagens de leveduras com maiores capacidades de produção de sulfito devem então ser selecionadas e, para isto, a manipulação genética das linhagens tem sido desenvolvida (Donalies & Stahl, 2002).

Durante o processo fermentativo, sulfeto é também produzido como consequência da redução enzimática do sulfito (metabolismo da levedura durante a fermentação). Esta espécie química, quando em concentrações superiores a 50 µg l⁻¹ S confere um aroma desagradável às bebidas fermentadas (Walker, 1998). No álcool combustível, o excesso de sulfeto condiciona características corrosivas ao produto final, devido à formação de compostos sulfurados, prejudicando sua utilização (Lima et al., 2001).

Através da manipulação genética de linhagens de leveduras, há a possibilidade de se inibir a expressão do gene responsável pela redução do sulfito, visando diminuir a quantidade de sulfeto produzido durante o processo de fermentação. Alternativamente à manipulação

genética, o monitoramento de processos envolvendo formação de espécies químicas que podem ser convertidas a formas gasosas se constitui em uma importante potencialidade (Sutherland et al., 2003).

Métodos analíticos que permitam a quantificação de sulfeto e de sulfito em tempo real se revestem de importância, podendo se constituir em fator adicional para o controle de fermentação. Neste sentido, aplicação de sistemas de análises químicas em fluxo - reconhecidos como excelentes gerenciadores de soluções - onde o processamento das amostras é feito de forma reprodutível e sem contacto com o ambiente externo (Krug et al., 1986), ainda, incluindo membranas como barreira seletiva, apresenta-se vantajosa comparativamente aos procedimentos tradicionais, provavelmente porque análises químicas envolvendo espécies gasosas são, em geral, mais susceptíveis a erros na determinação da concentração dos analitos e/ou na interpretação dos resultados (Pasquini & Silva, 1999).

O uso de membranas como barreira seletiva propicia o estudo de diferentes condições reacionais relativamente à separação, diluição e/ou concentração e posterior detecção da espécie separada (Miro & Frenzel, 2004). Apesar de a separação, em geral, não se realizar sob condições de equilíbrio nos sistemas de análises químicas em fluxo (transferência de massa em geral entre 5 e 20 %), perdas em sensibilidade são compensadas com ganhos em seletividade, principalmente quando a cinética reacional é explorada (Fang, 1993).

A seleção da membrana depende de alguns fatores como, razão e propriedades físico-químicas das soluções doadora e receptora da espécie volátil, propriedades mecânicas do material da membrana, natureza e número de amostras a serem analisadas, projeto do módulo de separação por membrana, dentre outros (Kuban, 1992). Deve-se ainda dispensar especial atenção em relação ao material que constitui a membrana, pois ele deve apresentar boa estabilidade mecânica e química para permitir a passagem das espécies de interesse ou

simplesmente retardar a passagem de espécies não desejáveis (Luque de Castro & Tena, 1993).

A aplicação de sistemas de análises químicas em fluxo utilizando membranas como barreira seletiva para determinação de analitos voláteis apresenta-se vantajosa, comparativamente aos procedimentos tradicionais de análises químicas. Sua versatilidade pode ser demonstrada através da sua aplicação a matrizes em diferentes estados: sólido (Farrella et al., 1996), líquido (Azevedo et al., 1999) e gasoso (Satieperakul et al., 2004).

As membranas são definidas como estruturas com dimensões laterais muito maiores que a espessura através da qual a transferência de massa pode ocorrer sob diferentes processos (Mcnaught & Wilkinson, 1997), e podem ser caracterizadas segundo sua origem (biológicas ou sintéticas), e sua estrutura físico-química (homogêneas ou heterogêneas). Membranas homogêneas (hidrofílicas, *e.g.* silicone ou borracha) são capazes de separar gases ou líquidos; as membranas heterogêneas (hidrofóbicas, usualmente de PTFE ou polipropileno) são similares a filtros tradicionais, apresentando rigidez, bem como estrutura altamente livre com poros interconectados e distribuídos ao acaso (Ruzicka & Hansen, 1988).

O transporte através de membranas homogêneas é processado em duas etapas. Primeiramente, os componentes da mistura se dissolvem dentro da membrana e em seguida se difundem através dela; a separação é promovida devido às diferenças de difusibilidade e/ou solubilidade das moléculas em solução. A transferência de massa, neste caso, depende da solubilidade da espécie química gasosa entre o material da membrana e as soluções doadora e receptora (Fang, 1993).

Nas membranas heterogêneas, o processo de separação ocorre quando a espécie na fase gasosa se difunde através da camada definida pela geometria dos poros. Como características principais, devem apresentar inércia química, resistência mecânica e tolerância a variações de temperatura e/ou da pureza do material do qual é constituída. Apesar de o

mecanismo de permeação se basear nas propriedades físicas, sua seletividade é, na maioria das vezes, garantida pela volatilidade e pela diferença em difusibilidade dos compostos na fase gasosa. A incorporação de membranas como barreiras seletivas em sistemas de análises em fluxo propicia a utilização de procedimentos de separação que exploram mecanismos como diálise, difusão gasosa, extração, pervaporação, dentre outros (Fang, 1993).

A diálise envolve processos de separação que podem ocorrer em função de gradientes de concentração (diálise passiva), gradientes de intensidade iônica (diálise de Donnan) ou aplicação de campo elétrico (eletrodiálise).

Diálise passiva tem sido aplicada principalmente para remoção de compostos com baixo peso molecular de matrizes complexas. A eficiência deste tipo de diálise está relacionada com a configuração e a geometria do módulo de análises, com as características da membrana, e com a razão e composição química das soluções doadora e receptora da espécie de interesse (Fang, 1993). A diálise passiva tem sido utilizada para determinação de vários analitos em uma variedade de matrizes, como uma etapa de tratamento prévio da amostra. Deve-se salientar que a implementação de sistemas de análises em fluxo explorando multi-deteção, que permitem determinações simultâneas em uma única zona de amostra, explorando vários detectores em série ou em paralelo, ou utilizando dois ou mais módulos de separação (Lima et al., 1996).

A diálise de Donnan, ou diálise ativa, baseia-se na transferência das espécies de interesse, através de permanentes mudanças na carga da superfície das membranas. Embora menos utilizada que a diálise passiva, este tipo de diálise envolve interação eletrostática entre os componentes da amostra e os sítios ativos das membranas, permitindo implementos em concentração do analito bem como melhoria em seletividade. As aplicações típicas deste tipo de diálise se referem ao enriquecimento de metais em concentrações-traço com posterior detecção por espectrometria de emissão atômica (Kasthurikrishnan & Koropchak, 1993).

Assim como a diálise de Donnan, a eletrodiálise pode ser usada para enriquecimento de compostos iônicos em matrizes complexas (Staden & Hattingh, 1998), para neutralizar amostras fortemente alcalinas em sistemas acoplados a cromatógrafos iônicos (Haddad & Lausana, 1994), e para supressão da condutividade em sistemas com auto-regeneração de soluções (Weiss, 1995). A instrumentação necessária para utilização de sistemas envolvendo eletrodiálise diminui sua aplicação em sistemas de análises em fluxo (Miro & Frenzel, 2004).

Outro processo de separação comumente empregado é a difusão gasosa. Membranas hidrofóbicas semipermeáveis são utilizadas para promover o processo de separação e/ou concentração de compostos voláteis em relação à matriz da amostra. Os módulos de análises explorando difusão gasosa com geometrias que envolvem membrana tubular (Melo et al., 2003), ou planar (Ruzicka & Hansen, 1988), têm sido muito bem estabelecidos. A geometria do módulo de difusão gasosa permite que as espécies de interesse permeiem de maneira eficiente através da membrana e sejam imediatamente direcionadas ao detector (Schepers et al., 1995), além de possibilitarem o emprego de diferentes vazões para as soluções doadora e receptora da espécie de interesse. Isto flexibiliza as etapas de separação e/ou concentração envolvidas (Trojanowicz, 2000).

Compostos iônicos, coloridos ou contendo material particulado, geralmente não interferem no processamento das amostras e no resultado das análises, possibilitando a utilização de amostras sem qualquer tratamento prévio (Fang, 1993). Processos envolvendo destilação podem ser também facilmente implementados nesses sistemas e aplicados a diferentes matrizes, *e.g.* efluentes (Zagatto et al., 1979; Arms et al., 2001), sedimentos (Silva et al., 2001) e material vegetal (Lima et al., 1997). Métodos considerados pouco seletivos também podem ser explorados e os resultados apresentam como características reprodutibilidade, seletividade, sensibilidade, inerentes aos sistemas de análises em fluxo (Cerdeira et al., 1995).

A aceitação dos sistemas de análises em fluxo envolvendo difusão gasosa pode ser confirmada pela larga aplicação dos procedimentos envolvendo concentração e/ou separação em linha de espécies de interesse (compostos orgânicos voláteis, espécies voláteis de enxôfre, derivados fenólicos, entre outros), visando análises de amostras ambientais tais como água, ar e solo (Takayanagi, 2007), bem como desenvolvendo metodologias capazes de mensurar contaminantes *in situ* (Ketola et al., 2002).

O processo de separação envolvendo extração líquido-líquido utiliza membranas hidrofóbicas cujos poros contêm imobilizada uma fase orgânica, entre duas fases aquosas; o analito de interesse é extraído da amostra aquosa e passa de uma fase para a outra continuamente, ficando temporariamente preso na fase orgânica. O procedimento é caracterizado pela extração em três fases, sendo bastante explorado para análises de amostras de águas (Jonsson & Mathiasson, 1999a). A seletividade pode ser implementada simplesmente com ajustes de pH das soluções doadora e receptora da espécie de interesse, que permitam a extração de compostos com propriedades ácido-base, gerando um gradiente de pH e enriquecendo a concentração do analito de interesse da amostra; desta forma a transferência de massa pode ser indiretamente controlada. O material extraído é usualmente analisado por cromatografia, eletroforese, ou espectroscopia (Jonsson & Mathiasson, 1999b). Interferências na composição da fase orgânica imobilizada na membrana relativamente à presença de compostos com cargas (íons metálicos); a ligações de hidrogênio ou a presença de reagentes quelantes, podem impedir que as espécies de interesse atravessem a membrana (Jonsson & Mathiasson, 2000).

Podem-se ainda integrar processos de separação como, por exemplo, evaporação e difusão gasosa, o que se constitui na essência da pervaporação. A evaporação do analito através do aumento da temperatura da amostra permite que as espécies voláteis produzidas difundam-se através da membrana a uma solução receptora, sem qualquer contato da amostra

com a membrana (Bryce et al., 1996). A difusão ocorre porque os gradientes de temperatura formados no espaço entre a amostra e a membrana refletem diferentes valores na pressão de vapor das espécies de interesse que se movimentam e permeiam através da membrana (Luque de Castro & Papaefstathiou, 1998).

O processo de separação baseado em pervaporação tem sido comumente empregado em sistemas de análises em fluxo para análises de amostras complexas, tais como alimentos, efluentes industriais, águas residuais e solos. Relativamente às técnicas de detecção, a potenciometria, a amperometria, a fluorimetria e a espectrofotometria têm sido predominantemente empregadas (Vallejo et al., 2001).

Os processos de separação são bem estabelecidos e têm sido aplicados com sucesso, na determinação de parâmetros de interesse ambiental em amostras que apresentam coloração (efluentes industriais e domésticos), contém material particulado (fertilizantes, solos, gases atmosféricos) e/ou compostos com alto peso molecular (ácidos húmicos). A incorporação de unidades de separação explorando membrana como barreira seletiva para determinação de analitos voláteis em amostras de matrizes complexas tem proporcionado incrementos em seletividade, e em alguns casos sensibilidade, aos sistemas de análises em fluxo.

O principal objetivo deste trabalho foi então desenvolver um sistema de análises em fluxo explorando membranas como barreira seletiva para quantificar a formação de sulfeto e sulfito do processo de fermentação alcoólica. Adicionalmente, almejava-se a seleção mais eficiente de linhagens de leveduras. Desta forma, processos envolvendo manipulação genética não seriam necessários.

Para a quantificação de sulfeto e de sulfito, foram empregados dois métodos espectrofotométricos, ambos envolvendo difusão gasosa. N,N-dimetil-*p*-fenileno-diamino (DMPD) (Yuan & Kuriyama, 2000) e verde de Malaquita (MG) (Melo et al., 2003) foram empregados para as determinações de sulfeto e sulfito, respectivamente. A concepção de um

sistema de análises para monitorar a formação destes analitos visava a melhoria em confiabilidade na avaliação e na seleção de linhagens de leveduras, utilizadas para produção de álcool combustível e para a fabricação de bebidas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A Química Analítica referente a compostos de enxofre tem sido tema de diversas revisões, as quais descrevem um número considerável de métodos de determinação quantitativa utilizando as mais variadas técnicas. Neste sentido, Szekeres (1974) compilou perto de novecentas citações, num extenso trabalho descrevendo e avaliando os métodos para determinação dos ácidos inorgânicos derivados do enxofre e os seus sais correspondentes.

Marczenko (1986) descreveu detalhadamente a determinação de enxofre em diversas matrizes (aços, solos, plantas, água, ar), especialmente com relação aos métodos espectrofotométricos do azul de metileno e o da pararosanilina. Discutiu também o método clássico turbidimétrico baseado na formação de suspensão de sulfato de bário, e considerou os três métodos bastante seletivos.

Com relação aos métodos estabelecidos para determinação dos compostos de enxofre que podem ser convertidos a espécies gasosas (sulfeto e sulfito), sistemas de análises por injeção em fluxo ganham destaque, quando exploram técnicas de separação e/ou concentração, principalmente difusão gasosa, pois sua adaptação é simples e de fácil aplicação, sobretudo quando utilizados para determinação de compostos voláteis em matrizes complexas (Fang, 1993).

Cardwell e colaboradores (2000) publicaram um método para determinação simultânea de sulfito e ácido ascórbico em vinhos brancos e tintos e também em vários tipos de sucos de frutas. Neste sistema, o dióxido de enxofre era separado da matriz através de uma unidade de separação que explorava difusão gasosa e quantificado amperometricamente utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado e um eletrodo de Ag/AgCl como referência. Os resultados eram concordantes com aqueles obtidos por cromatografia iônica. A

curva analítica se referia a $0,25 - 15 \text{ mg L}^{-1} \text{ S-SO}_2$ e o limite de detecção foi estimado em $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de sulfito.

Atanassov e colaboradores (2000) descreveram um método espectrofotométrico conduzido em um sistema de análises por injeção em fluxo explorando difusão gasosa para determinação de CO_2 e SO_2 em amostras de vinho. A determinação de sulfito baseia-se na reação entre SO_2 e MG. Os resultados apresentados mostraram desvio padrão-relativo menor do que 4,5 % e, quando comparados com aqueles obtidos pelo método de referência, não se notaram diferenças significativas entre métodos com nível de 95% de probabilidade.

Outro método espectrofotométrico implementado em sistema multisingula de análises em fluxo (MSFIA, do inglês “Multi Syringe Flow Injection Analysis”), descrito por Segundo e colaboradores (2000), utilizou como reagentes a pararosanilina e o formaldeído. A metodologia descrita foi aplicada com sucesso na determinação de sulfito livre e total em amostras de vinho. A unidade de difusão gasosa era utilizada para prevenir interferências devido à coloração das amostras. Os resultados apresentaram desvio-padrão relativo menor do que 3,2 %, e permitiram o estabelecimento de curvas analíticas entre $2 - 75$ e $10 - 250 \text{ mg L}^{-1}$ para sulfito livre e total respectivamente.

Visando a determinação de sulfeto em amostras de leveduras fermentadas em soluções de cultura, Yuan & Kuriyama (2000) apresentaram um trabalho baseado na combinação do método de Fisher, que utiliza como reagente o DMPD, com a técnica de análises em fluxo explorando difusão gasosa. Foram relatados valores de $0,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de sulfeto como limite de detecção, desvio-padrão relativo de 3,4 % e curvas analíticas entre $0,4$ e $1,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ S}$.

Segundo & Rangel (2001) propuseram um sistema de análises por injeção sequencial que envolvia a utilização de reagentes como pararosanilina e formaldeído, para determinação de sulfito livre e total em amostras de vinhos. Neste sistema, a amostra era diretamente

inserido no percurso analítico e o sulfito livre separado na câmara de difusão era monitorado. Para a quantificação do sulfito total, a amostra passava por um tratamento prévio de hidrólise em linha confluindo uma solução alcalina antes de ser inserida e processada no sistema proposto. Como figuras de mérito, os autores relataram desvios-padrão relativos menores do que 1,2 e 2,3 % para sulfito livre e total, respectivamente, valores de concentrações entre 20 – 250 mg L⁻¹ para a curva analítica e ainda se referiram a resultados estatísticos concordantes com o método de referência.

Outra aplicação para o método de Fisher foi apresentada por Silva e colaboradores (2001) para determinação de sulfetos ácidos voláteis em amostras de sedimentos de rio. Os autores destacaram a robustez do sistema e apresentaram como figuras de mérito valores de limite de detecção de 40 µg L⁻¹ S e curva analítica entre 0,05 e 2,0 mg L⁻¹ S, esta última podendo ser expandida até 32 mg L⁻¹ S a partir de diluições da amostra realizadas em linha.

Melo e colaboradores (2003) propuseram um sistema de análises por injeção em fluxo explorando difusão gasosa através de uma membrana tubular concêntrica, visando a determinação de sulfito em amostras de vinho branco. O reagente utilizado foi o MG e os principais parâmetros foram avaliados. Foram relatados desvio-padrão relativo do menor que 1,5 % e curva analítica se referindo à faixa entre 1,0 – 20,0 mg L⁻¹ SO₂.

A descrição de um sistema que explora injeção sequencial e fluxo monosegmentado foi apresentada por Silva e colaboradores (2003). O método se baseou na reação de sulfeto com DMPD e o sistema foi aplicado a amostras de águas naturais. Foram relatados: desvio-padrão relativo dos resultados igual a 5,2 %, curva analítica entre 0,17 e 1,0 mg L⁻¹ S, e limite de detecção estimado em 0,04 mg L⁻¹ S.

Silva & Masini (2004) incorporaram uma câmara de difusão gasosa no sistema proposto anteriormente para determinação de sulfeto, adaptando-o à determinação de sulfito. A nova configuração possibilitou a separação do analito da matriz da amostra e, nesse caso,

não alterou a configuração do sistema, que apresentou limite de detecção de $60 \mu\text{g L}^{-1} \text{SO}_2$ e curva analítica entre 0,1 e $4,0 \text{ mg L}^{-1} \text{SO}_2$.

Um sistema MSFIA acoplado a uma unidade de difusão gasosa envolvendo para separação do analito da matriz foi proposto por Armas e colaboradores (2004) para determinação espectrofotométrica de sulfeto em efluentes urbanos contendo sólidos em suspensão. O método era baseado na reação de formação do azul de metileno. Os autores apresentaram estudos sobre o efeito das variações dos principais parâmetros envolvidos na otimização do sistema. Os resultados analíticos foram concordantes com aqueles obtidos com o método oficial da APHA-AWWA-WPFC (1998).

Araújo e colaboradores (2005) propuseram um sistema de análises em fluxo explorando difusão gasosa para determinação condutimétrica de sulfito e ácido acético em amostras de vinhos e de sucos de frutas, separadamente. Relativamente à determinação de sulfito, o método se baseava na conversão do analito a dióxido de enxofre que, sob condições ácidas, se difundia através da membrana em direção a uma solução receptora (água desionizada). Alterações na condutividade da água eram proporcionais ao teor de sulfito nas amostras. Os limites de detecção foram estimados como $0,03 \mu\text{g L}^{-1} \text{SO}_2$, o desvio-padrão relativo foi menor do que 0,2 % e a curva analítica se referiu à faixa entre 1,0 e $50,0 \text{ mg L}^{-1} \text{SO}_2$. Os resultados de experimentos relativos recuperação variaram entre 97,3 e 99,3 %.

Ferrer e colaboradores (2006) usaram um sistema inteligente (do inglês: “smart”) de análises em fluxo explorando multiseringas com detecção por espectrofotometria ou por reflectometria visando à determinação de sulfeto em efluentes urbanos contendo sólidos em suspensão. O método envolvia a formação do cromóforo azul de metileno a partir da oxidação de DMPD por Fe(III). Neste sistema, procedimentos automatizados de análises diretas, ou com tratamentos prévios de diluição e concentração, foram realizados após a otimização dos valores de concentrações. Os resultados demonstraram limites de detecção estimados como 4,6

$\mu\text{g L}^{-1}$ e curvas analíticas referentes às faixas entre 50 – 1000 e 500 – 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de sulfeto por reflectometria e espectrofotometria, respectivamente.

Finalmente, deve-se salientar que, ao longo desta busca bibliográfica não foram encontrados trabalhos relativos à determinação de sulfeto e sulfito em melaços, mostos, caldo de cana de açúcar e similares. Entretanto, por ser um parâmetro importante, o sulfito na indústria brasileira de produção de açúcar e álcool, é quantificado empregando-se procedimento clássico de análises (ICUMSA, 2000).

3. MATERIAIS

3.1. Instrumentos e acessórios

Nos experimentos realizados, foi utilizada como unidade propulsora de fluidos uma bomba peristáltica Ismatec, modelo IPC-04, provida de tubos de Tygon com diferentes diâmetros internos. O injetor-comutador era confeccionado em acrílico, sendo operado manualmente. Para confecção das linhas de transmissão e das bobinas de reação, foram utilizados tubos de Teflon com diâmetro interno de 0,8 mm. O diâmetro de enrolamento das bobinas reacionais era de 2,0 cm.

Câmaras de difusão gás-líquido tipo “sandwich” (Figura 1), também confeccionadas em acrílico (70 mm de largura; 1,5 mm de espessura; 0,5 mm de profundidade), e equipadas com membrana em fita de Teflon (1/2' x 260”) marca TFEThread Seal Tape (EUA), foram utilizadas como unidade de difusão.

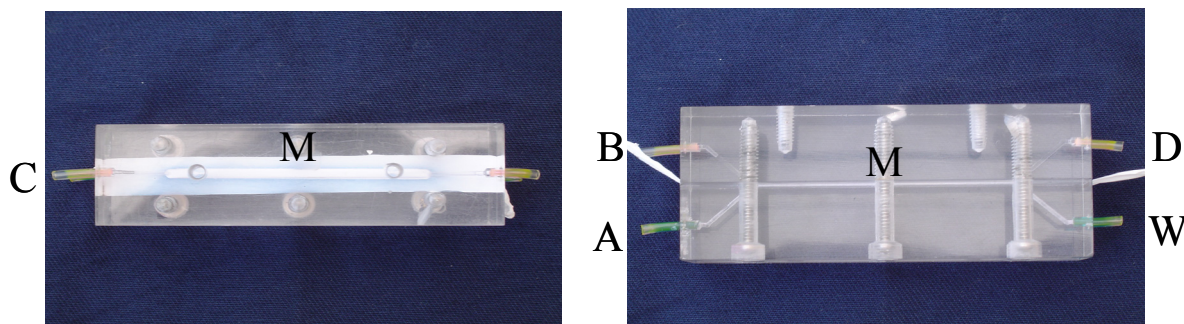


Figura 1. Câmara de difusão gasosa tipo “sandwich”. A = entrada do fluxo doador; B = entrada do fluxo receptor; C = canais; M = membrana; D = saída para o detector; W = descarte.

Como unidade de detecção, foi utilizado um espectrofotômetro Femto modelo 432, equipado com cela de fluxo Hellma, modelo 178 OS, com passo óptico de 10 mm e volume interno de 80 ml. Este era conectado a um registrador potenciométrico Kipp & Zonen modelo

111. Alternativamente, um espectrofotômetro da Ocean Optics equipado com cubeta de fluxo em forma de “Z” e operado por computador (Meneses, 2003) foi empregado.

3.2. Reagentes e soluções-padrão

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada e reagentes de qualidade analítica.

Solução-padrão estoque de sulfeto, $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ S-S}^{2-}$. Preparada dissolvendo-se 0,75 g $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em solução $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ completando-se o volume até 100 mL com a mesma solução. As soluções-padrão de trabalho na faixa de 0,0 a $10,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ S-S}^{2-}$ eram preparadas diariamente por diluições da solução estoque.

Solução-padrão estoque de sulfito, $1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ S-SO}_3$. Preparada dissolvendo-se 0,16 g Na_2SO_3 em solução $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ completando-se o volume até 100 mL com a mesma solução. As soluções-padrão na faixa de 0,0 a $30,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ S-SO}_3$ eram preparadas por diluições da solução estoque.

Ambas as soluções-padrão estoque acima mencionadas foram padronizadas (APHA,1992).

Solução $2,0 \text{ g L}^{-1}$ DMPD (N,N-dimetil-*p*-fenilenodiamino). Preparada dissolvendo-se 0,2 g DMPD em solução $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ e completando-se o volume até 100 mL com a mesma solução.

Solução $8,0 \text{ g L}^{-1} \text{ Fe(III)}$. Preparada dissolvendo-se 1,62 g $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em solução $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ e completando-se o volume até 100 mL com a mesma solução diluente.

Solução $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$, preparada diluindo-se 125 mL do ácido concentrado (65 % v/v) em água e completando-se o volume até 1000 mL com água.

Solução $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$. Preparada dissolvendo-se 2,0 g da base em água e completando-se o volume até 1000 mL com água.

Solução $0,2 \text{ g L}^{-1}$ MG (verde de malaquita). Preparada dissolvendo-se 20,0 mg MG mais 0,85 g KH_2PO_4 em água e completando-se o volume até 100 mL com água. A solução de trabalho, $7,0 \text{ mg L}^{-1}$, era preparada a partir de diluições da solução estoque.

Solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ P- PO_4 . Preparada dissolvendo-se 26,1 g K_2HPO_4 em água, completando-se o volume até 500 mL com água, e ajustando-se o pH em 8,0 com H_3PO_4 .

3.2. Amostras

As amostras fermentadas de caldo de cana e de melaços para a seleção de leveduras foram preparadas nos Laboratórios de Bioquímica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, sob a supervisão do Dr Luis Carlos Basso. As amostras de caldo eram diluídas a uma concentração final de aproximadamente 14 % em açúcares redutores finais (ART), e os melaços se constituíam em um mistura de caldo de cana e de melaço com concentração de aproximadamente 14 % ART, sendo metade do açúcar proveniente de cada uma das fontes.

3.3. Outros materiais

Neste trabalho utilizaram-se também materiais de uso rotineiro em laboratórios de Química Analítica, tais como vidraria, banho termostaticado, capela de fluxo laminar, etc.

4. MÉTODO

A implementação de métodos espectrofotométricos em sistemas de análises em fluxo envolvendo difusão gasosa tem possibilitado a determinação de baixas concentrações de sulfeto e de sulfito em diferentes amostras ambientais, alimentícias e industriais, podendo também ser aplicada para monitoramento dessas espécies químicas durante o processo de fermentação (Yuan & Kuriyama, 2000).

O método para a determinação de sulfeto se fundamenta na reação de DMPD em presença de Fe(III) em meio ácido, produzindo azul de metileno, MB (Kuban et al., 1992; Yuan & Kuriyama, 2000; Armas et al., 2004). O produto formado apresenta absorção máxima a 668 nm.

Para determinação de sulfito, o método proposto envolve a reação com MG em meio alcalino. Como este reagente apresenta alto coeficiente de absorvidade molar (620 nm), ocorre uma diminuição da absorbância devido à presença de sulfito na amostra, a qual é proporcional à concentração do analito. Desta forma, a espectrofotometria inversa é explorada.

Visando o bom desenvolvimento do trabalho, os parâmetros estudados foram avaliados individualmente, sendo os demais mantidos constantes. As soluções-padrão utilizadas nos experimentos descritos a seguir tinham concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 mg L⁻¹ de sulfeto ou 5,0; 15,0 e 25,0 mg L⁻¹ de sulfito.

4.1. Sistemas de análises em fluxo

A partir das observações referentes às características de cada uma das reações, foram projetados dois sistemas de análises em fluxo incluindo uma unidade difusão gasosa, para

estudo dos parâmetros relacionados aos métodos propostos. Esses sistemas são apresentados nas Figuras 2 e 3.

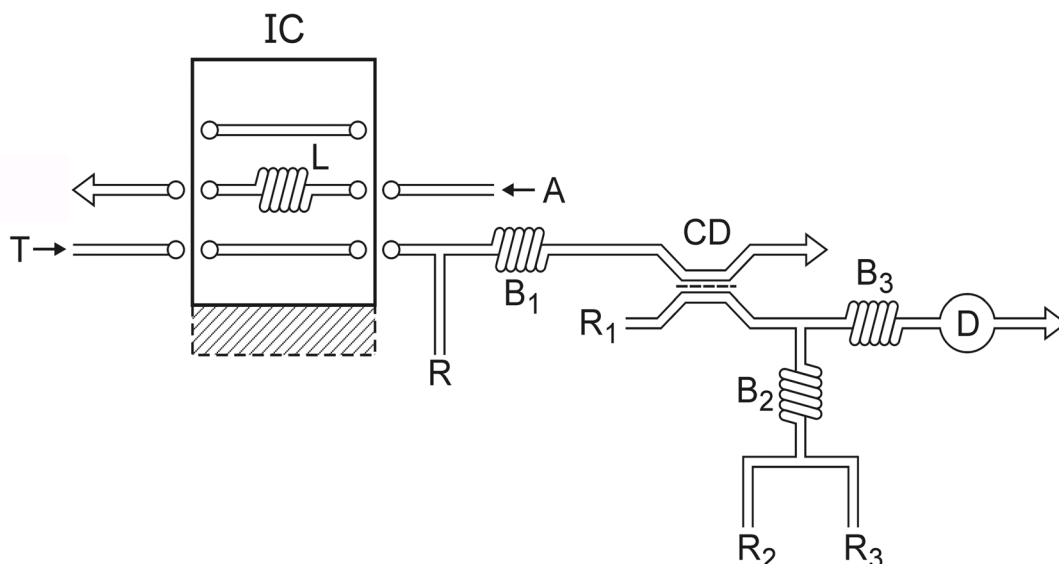


Figura 2. Diagrama de fluxos do sistema FIA para determinação de sulfeto. A = amostra ($0 - 5 \text{ mg l}^{-1} \text{ S-S}^{2-}$); T = água; R = $1,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$; $R_1 = 0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$; $R_2 = 2,0 \text{ g l}^{-1} \text{ DMPD}$, $R_3 = 8,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Fe(III)}$; IC = injetor-comutador; CD = câmara de difusão gasosa; B_1 , B_2 e B_3 = reatores (20, 20 e 50 cm); D = detector (668 nm).

No sistema representado na Figura 2, a amostra ($250 \mu\text{L}$) é inserida em um fluxo transportador ($0,40 \text{ mL min}^{-1}$) por meio do injetor-comutador. A zona da amostra é acidificada ($0,40 \text{ mL min}^{-1}$) e encaminhada à câmara de difusão onde, o H_2S formado se difunde através da membrana, sendo coletado em uma solução receptora ($0,15 \text{ mL min}^{-1}$). A seguir, soluções confluentes dos reagentes DMPD e Fe(III) ($0,15 \text{ mL min}^{-1}$) são adicionados, e a amostra processada flui através do detector. A modificação transiente na absorbância é quantificada a 668 nm e registrada em forma de pico, cuja altura é proporcional ao teor de sulfeto na amostra.

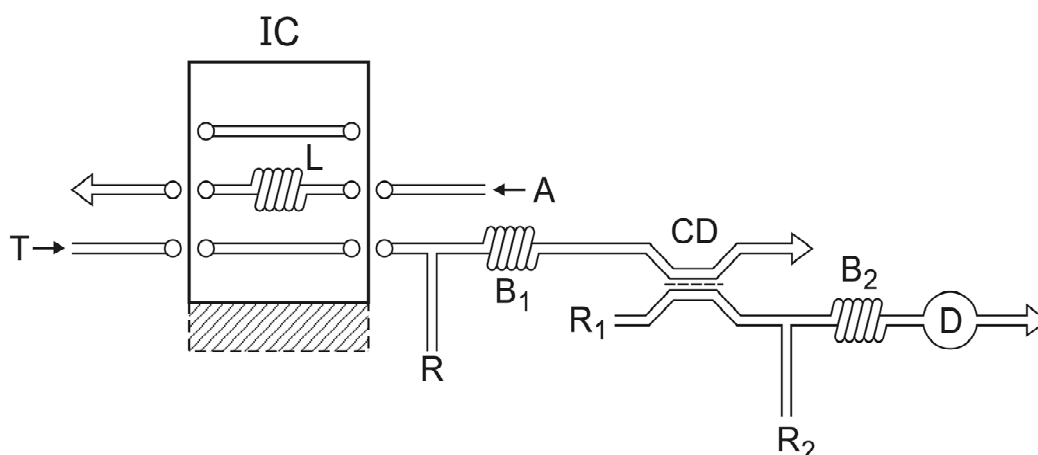


Figura 3. Diagrama de fluxos do sistema FIA para determinação de sulfito. A = amostra (0 - 25 mg l⁻¹ S-SO₃); T = água; R = 1,5 mol L⁻¹ HCl; R₁ = 0,5 mol L⁻¹ P-PO₄ (pH 8); R₂ = 7,0 mg L⁻¹ MG; IC = injetor-comutador; CD = câmara de difusão gasosa; B₁ e B₂ = reatores (20 cm); D = detector (620 nm).

A Figura 3 representa o sistema no qual a amostra (250 µL) é inserida em um fluxo transportador (0,40 mL min⁻¹) por meio do injetor-comutador. O SO₂ formado após acidificação da zona da amostra permeia através da membrana na câmara de difusão, sendo coletado em uma solução receptora (0,3 mL min⁻¹). A seguir, soluções confluentes de MG e solução-tampão fosfato (0,15 mL min⁻¹) são adicionadas. Em seguida, a amostra processada passa através do detector e a diminuição do sinal transiente é quantificada a 620 nm e registrada na forma de pico invertido, cuja altura é proporcional ao teor de sulfito na amostra.

4.2. Solução receptora

A eficiência da solução receptora alcalina, em sistemas envolvendo difusão gasosa, está relacionada com sua capacidade de coletar espécies químicas voláteis previamente separadas da matriz. A utilização de soluções diluídas de NaOH se apresentou como alternativa viável na medida em que reflete um pH ≥ 11, bem acima dos pKa's dos sistemas

envolvidos, e não compromete o pH do ambiente reacional. Com o objetivo de criarem condições reacionais favoráveis à concentração de NaOH utilizada como solução receptora foi estudada entre 0,01 e 0,1 mol L⁻¹.

4.3. Solução doadora

Soluções ácidas foram utilizadas como solução doadora para ambos os métodos propostos neste trabalho. Para se otimizar a eficiência da liberação das espécies químicas voláteis, a concentração do ácido escolhido foi variada visando melhoria em sensibilidade. Foi também avaliada a influência da intensidade iônica. Além disso, experimentos incluindo adições de tensoativos foram realizados.

Seleção do ácido

Para se avaliar a capacidade de a solução doadora volatilizar o analito, ácidos fortes (clorídrico, sulfúrico, nítrico) e ácidos fracos (fosfórico, cítrico e acético) foram utilizados como reagente R. Neste sentido, soluções 1,5 mol L⁻¹ em cada um desses ácidos foram avaliadas.

O processo de conversão de espécies químicas a formas gasosas está relacionado com o pH da solução doadora. Para formação de H₂S ou de SO₂, o mesmo deverá ser menor do que o pKa do analito, garantindo assim que a espécie esteja preferencialmente em seu estado gasoso. Neste sentido, variações na acidez da solução doadora foram estudadas empregando-se concentrações na faixa entre 0,5 e 2,5 mol L⁻¹ no reagente R.

Intensidade iônica e tensoativos

Devido à complexidade da matriz da amostra, atenção especial foi dada às condições de saturação do meio. Desta forma, soluções ácidas saturadas em NaCl ou KCl, foram utilizadas como reagente R, a influência da intensidade iônica foi então avaliada.

Relativamente ao uso de tensoativos, a vantagem decorrente da sua própria característica se refere à diminuição da tensão superficial, o que poderia auxiliar no processo de liberação dos analitos voláteis envolvidos neste trabalho de Tese. Os experimentos visando verificar a influência da presença de tensoativos foram realizados adicionando-se 0,01 % dos tensoativos álcool polivinílico (PVA), Tween 80, Triton X-100, glicerol, cloreto de cetilpiridina (CPC)), dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) e gelatina, à solução ácida R (Figuras 2 e 3).

Nestes experimentos, soluções-padrão em concentrações de 1,0; 3,0 e 5,0 mg L⁻¹ de sulfeto e 5,0; 15,0 e 25,0 mg L⁻¹ de sulfito, foram empregadas e comparadas a amostras reais de caldo, melão e soluções de cultura fermentadas. Para esse fim, quantidades conhecidas desses analitos foram adicionadas às amostras para se obter concentrações finais iguais àsquelas das soluções-padrão utilizados.

4.4. Acidez do ambiente reacional

A reação de formação de MB ocorre em meio ácido (Yuan & Kuriyama, 2000). As condições do ambiente reacional foram então definidas variando-se a concentração do ácido que compõe as soluções dos reagentes DMPD e Fe(III), entre 0,5 e 2,0 mol L⁻¹.

Para se avaliar o desenvolvimento da reação envolvendo MG em função de variações de acidez, estudos referentes aos valores de pH da solução de fosfato mono-ácido de potássio (K₂HPO₄) foram realizados. Neste sentido, quatro soluções 0,5 mol L⁻¹ P-PO₄ foram preparadas e o pH ajustado entre 7 e 10 por meio de adição de soluções 1,0 mol L⁻¹ NaOH ou HCl. Deve-se salientar que a reação ocorre sob condições alcalinas (Melo et al., 2003).

4.5. Concentração dos reagentes

Objetivando avaliar a influência da concentração dos reagentes envolvidos na determinação de sulfeto, soluções 1,0 – 4,0 g L⁻¹ DMPD e 1,0 – 10,0 g L⁻¹ Fe(III) foram preparadas e avaliadas, individualmente, empregando-se o sistema da Figura 2.

Para a definição da concentração de MG referente à determinação de sulfito, foram preparadas soluções em concentrações que variaram entre 5,0 e 20 mg L⁻¹ MG, empregando o sistema da Figura 3. Experimentos paralelos indicaram que, nesta faixa de concentrações, os valores correspondentes de absorbância se encontravam entre 0,6 – 1,5 o que reflete condições adequadas relativamente ao monitoramento espectrofotométrico.

4.6. Efeito da temperatura

Experimentos visando avaliar o desenvolvimento das reações de ambos os métodos, em função de variações de temperatura entre 10 e 40 °C foram conduzidos de forma similar. Para tal fim, os frascos contendo os reagentes e a bobina de reação, foram imersos em um banho com temperatura controlada. Após cada ajuste de temperatura, esperava-se aproximadamente 5 minutos para que o equilíbrio térmico fosse alcançado. Experimentos preliminares indicaram que não havia variações significativas para temperaturas abaixo das indicadas neste experimento. Temperaturas acima de 60 °C foram consideradas indesejáveis pelo fato de haver formação excessiva de bolhas que, ao passarem pelo detector, prejudicavam a mensuração do sinal analítico.

4.7. Intervalo de tempo disponível para as reações

Experimentos para se avaliar a influência do intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da etapa de permeação do analito e das reações envolvidas foram realizados variando-se a rotação da bomba peristáltica. A vazão da solução doadora foi variada entre 0,2

e $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, e a solução receptora teve sua vazão variada entre $0,06$ e $0,30 \text{ mL min}^{-1}$. Experimentos para avaliar a influência da vazão dos reagentes ($0,1 - 0,2 \text{ mL min}^{-1}$) foram também conduzidos.

Ainda, para se avaliar o progresso da reação em função do tempo de residência da amostra no sistema, foi utilizado o procedimento de parada de fluxo (Ruzicka & Hansen, 1988). O bombeamento era interrompido no instante em que o espectrofotômetro indicava a leitura de absorbância máxima, garantindo assim que a zona da amostra ficasse parada dentro da cubeta de fluxo até a reação se completar. A análise do sinal registrado permitiu então se inferir o posterior desenvolvimento reacional.

4.8. Figuras de mérito

Após o dimensionamento dos sistemas, as principais figuras de mérito foram estimadas. O tempo de limpeza, ou período (Ruzicka & Hansen, 1988) foi avaliado registrando-se em alta velocidade (1 cm s^{-1}) o sinal analítico típico para a solução-padrão mais concentrada e mensurando-se graficamente o intervalo entre instantes referentes ao máximo sinal e a 1 % dele. Desta forma, a velocidade analítica (inverso do período) se referiu a 1 % de “carry-over”. De posse do valor da velocidade analítica, os consumos de reagentes por determinação foram avaliados. A precisão dos resultados foi estimada processando-se amostras típicas de melaços e de caldos de cana. Testes de recuperação foram conduzidos visando-se um indicativo da boa exatidão dos procedimentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sistemas de análises químicas em fluxo explorando difusão gasosa propostos neste trabalho de Tese permitiram o estudo e a avaliação dos principais parâmetros para cada um dos procedimentos, individualmente. Os sistemas projetados forneceram sempre resultados repetitivos (d.p.r. tipicamente $< 2 \%$), e derivas de linha base não foram observadas. Ainda, foi possível destacar algumas características analíticas favoráveis a ambos tais como a robustez, a simplicidade operacional e a praticidade.

5.1. Sistemas de análises em fluxo

Nos sistema de análises em fluxo propostos (Figuras 2 e 3), soluções-padrão de 0,00 a 5,00 mg L⁻¹ S-S²⁻ e 0,00 a 25,0 mg L⁻¹ S-SO₃²⁻ foram processadas em triplicata, e os limites de detecção foram estimados como 0,3 mg l⁻¹ S-S²⁻ e 1,0 mg l⁻¹ SO₂. Os resultados se mostraram precisos (d.p.r. $< 2 \%$) para ambos os sistemas, e nenhum deles apresentou problemas de limpeza nem derivas da linha base, sendo então adequados para os objetivos propostos.

Para o dimensionamento dos sistemas, a influência dos principais parâmetros envolvidos foi investigada, conforme se discute a seguir.

5.2. Solução receptora

Para ambas as determinações consideradas, variações na concentração da solução de NaOH (R₁, Figuras 2 e 3) não alteraram o sinal analítico. Este resultado demonstra que o aumento da concentração da solução receptora não favorece a coleta do analito. Como os resultados referentes a menores concentrações levam à obtenção de sinais similares aos referentes às maiores concentrações, a concentração da solução recptora foi selecionada como

0,01 mol L⁻¹ NaOH levando-se em consideração ainda a diminuição do consumo de reagentes e a facilidade de ajuste posterior de pH.

5.3. Solução doadora

Os resultados obtidos com o emprego de diferentes ácidos em R (Figuras 2 e 3) demonstraram que ácidos fortes são mais eficientes (*ca* 50 %) relativamente aos ácidos fracos para ambos sistemas (Figura 4). Pode-se observar que a maior diferença entre os ácidos fortes não foi superior a 5 %. Optou-se pelo emprego de HCl, uma vez que esse ácido tem sido comumente empregado em trabalhos correlatos. Ainda, este ácido é mais facilmente purificado. Deve-se salientar ainda, que devido à complexidade da matriz optou-se pela utilização do ácido clorídrico apesar de o método oficial recomendar ácido cítrico (Cunnif, 1995). Não foram observados precipitados nos reatores mesmo após uso dos sistemas por longos períodos (4 horas).

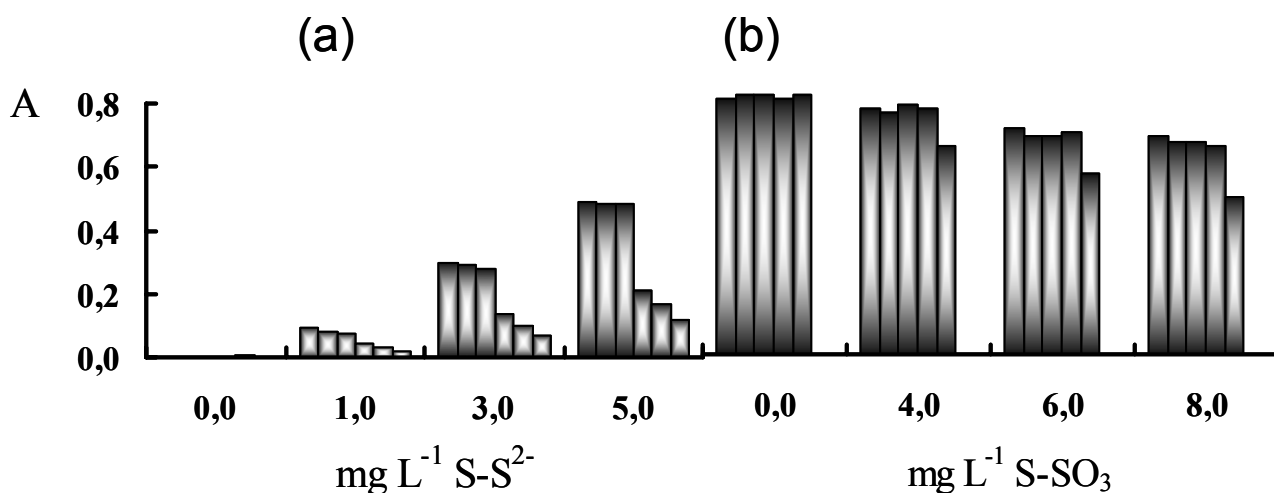


Figura 4. Influência da natureza da solução doadora. Da esquerda para direita, as colunas se referem a 1,5 mol L⁻¹ HCl, H₂SO₄, HNO₃, H₃PO₄, ácido cítrico e ácido acético. (a) sulfeto; (b) sulfito.

A concentração da solução de HCl utilizada como doadora correspondeu a um pH abaixo do valor de pK_1 do H_2S , 6,69 – 7,06 a 25 °C (Perrin, 1982), garantindo assim que o sulfeto presente na amostra está quantitativamente convertido à forma gasosa. A utilização de ácidos fortes, com valores de $pH < 2$, como solução doadora parece não alterar a formação do H_2S da amostra, bem como sua permeação através da membrana.

Relativamente ao sulfito, pode-se observar que variações na concentração do ácido não alteraram significativamente a formação do SO_2 . Desta forma, e para garantir a acidificação da amostra, uma solução de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ HCl foi escolhida como solução doadora, para ambos os sistemas.

Relativamente ao emprego de soluções ácidas saturadas em NaCl ou KCl, ou mesmo o uso de tensoativos, os resultados obtidos mostraram que, apesar de suas características favoráveis, não levaram a melhorias significativas em sensibilidade. Quando do processamento das amostras, efeitos matriciais não foram superados com estas adições, devido à complexidade da matriz.

5.4. Acidez do ambiente reacional

Estudos referentes à acidez reacional do método proposto para determinação de sulfeto demonstraram que concentrações do ácido clorídrico abaixo de $1,5 \text{ mol l}^{-1}$ em ambos os reagentes parecem não comprometer o desenvolvimento da reação (Figura 5). Emprego de concentrações maiores resultou em diminuição dos sinais analíticos, provavelmente devido a efeitos de protonação do reagente cromogênico.

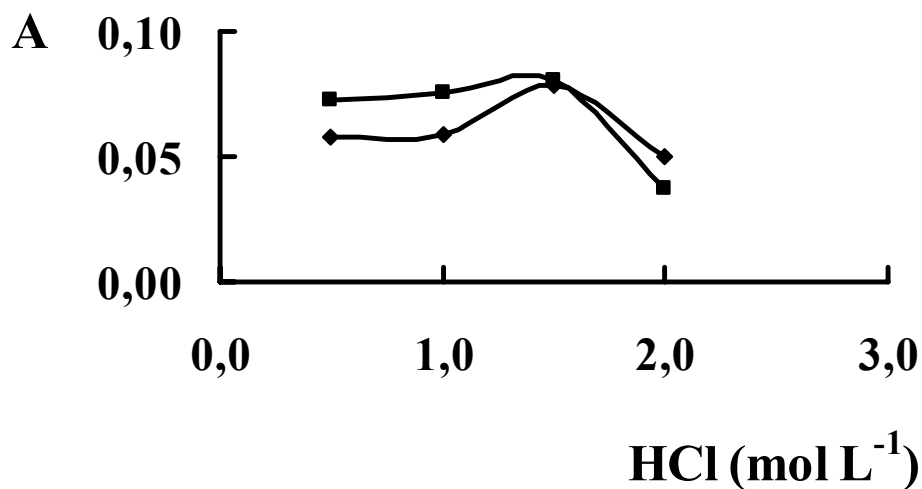


Figura 5. Influência da concentração de HCl nos reagentes. Sinais analíticos correspondem a 3,0 mg L⁻¹ S-S²⁻. As curvas correspondem a ■ 8,0 mg L⁻¹ Fe(III) e ◆ 2,0 mg L⁻¹ DMPD.

Confirmando que o ambiente reacional para o desenvolvimento da reação para a determinação de sulfito deve ser alcalino, os resultados mostraram que variações de pH influenciaram de maneira pronunciada o desenvolvimento da reação (Figura 6). Valores de pH menores que 7 e maiores que 9 resultaram em decréscimos significativos nos valores de absorbância, e os melhores resultados foram obtidos para pH igual a 8,0.

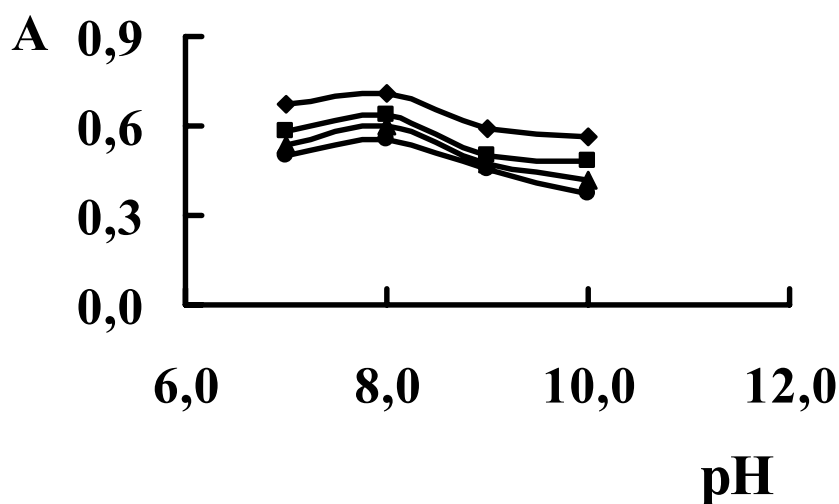


Figura 6. Influência do pH da solução R₂. A Figura se refere ao sistema da Figura 3. Curvas correspondem a ◆ 0,0; ■ 5,0; ▲ 15,0; ● 25,0 mg L⁻¹ S-SO₃.

5.5. Concentração dos reagentes

Com base nos resultados mostrados na Figura 7, pode-se inferir que variações na concentração dos reagentes, para a determinação de sulfeto, não resultaram em incrementos significativos nos sinais analíticos. De fato, o emprego de reagentes com 2,0 e 8,0 g L⁻¹ de DMPD e Fe(III) resultou em pequenos aumentos nos valores de absorbância relativamente às demais concentrações avaliadas.

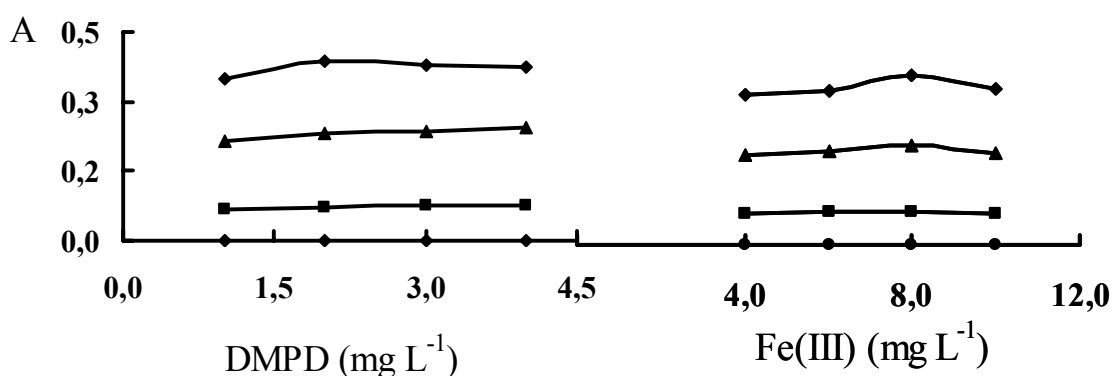


Figura 7. Influência da concentração dos reagentes. Curvas correspondem a • 0,0; ■ 1,0; ▲ 3,0 e ◆ 5,0 mg L⁻¹ S-S²⁻.

Relativamente à determinação de sulfito, deve-se ressaltar que o método envolve redução de absorbância em função da concentração do analito na amostra. Portanto, as melhores condições de trabalho são aquelas em que a linha base corresponde a valores de absorbância ao redor de 0,8. Variações na concentração de MG influenciaram diretamente os valores de absorbância da linha de base, porém observou-se uma diminuição na sensibilidade do método à medida que a concentração de MG era aumentada (Figura 8). A solução que correspondeu aos melhores resultados foi a de 7,0 mg L⁻¹ MG. Cabe ainda salientar que, apesar das variações na concentração do reagente, o sistema mostrou ter boa repetibilidade e estabilidade na linha base. Isto, aliado à pouca susceptibilidade dos sinais analíticos às variações de concentrações envolvidadas, reflete a robustez do sistema.

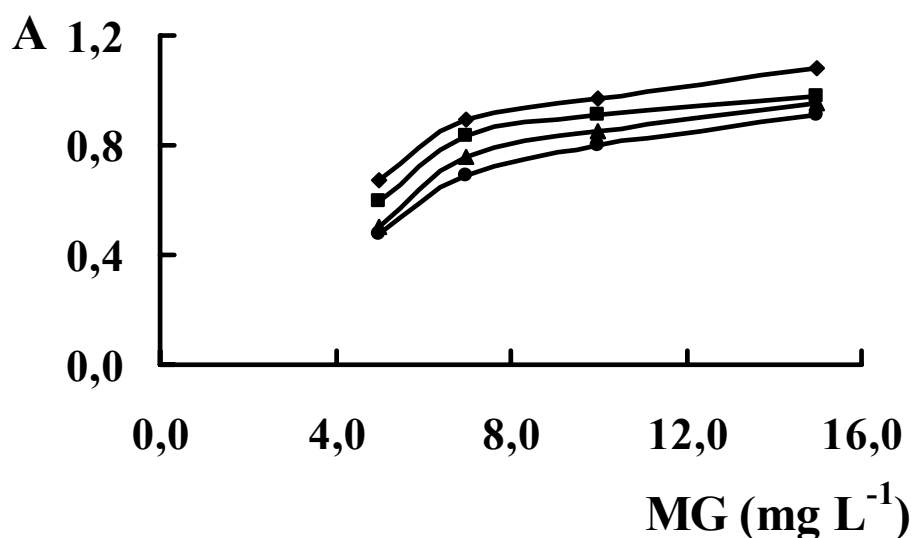


Figura 8. Influência da concentração do reagente MG. Curvas analíticas correspondem a $\blacklozenge$ 5,0; $\blacksquare$ 7,0; $\blacktriangle$ 10; $\bullet$ 15 mg L⁻¹ MG.

5.6. Efeito da temperatura

Os experimentos realizados empregando-se os sistemas das Figuras 2 e 3 revelaram que alterações na temperatura não provocam variações significativas em sensibilidade, reduções de sinal analítico de aproximadamente 15 % foram notadas quando a temperatura aumentou de 5 para 40 °C.

Os sistemas permaneceram sempre estáveis, apesar de pequenas variações nos valores de absorvância da linha base. Optou-se então por trabalhar a temperatura de 25 ± 1 °C, definida pelo sistema de condicionamento de ar do laboratório.

5.7. Intervalo de tempo disponível para as reações

Os resultados sintetizados na Figura 9 referem-se ao sistema desenvolvido para determinação de sulfeto, e indicam que relativamente à solução doadora, redução da vazão resultava em aumento do tempo de residência da amostra no sistema e, conseqüentemente, em picos registrados mais largos. A melhoria em sensibilidade para menores vazões se deveu aos

efeitos combinados dos aumentos do intervalo de tempo para o desenvolvimento reacional e para os processos de difusão gasosa. Deve-se aqui salientar que não foram notadas diferenças significativas no formato geral dos picos registrados. Como compromisso entre velocidade e sensibilidade analíticas a vazão de trabalho foi definida como $0,4 \text{ mL min}^{-1}$.

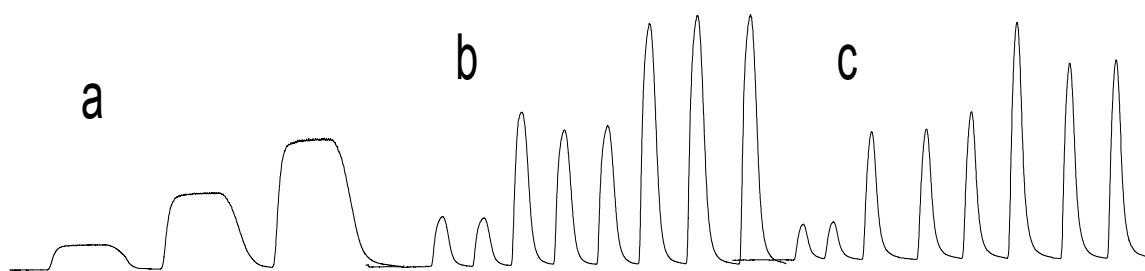


Figura 9. Influência da vazão da solução doadora. Sinais transientes referentes a 1,0; 3,0 e $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ S-S}^{2-}$. (a) $0,2 \text{ mL min}^{-1}$; (b) $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ (c) $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Relativamente à vazão da solução receptora melhores sinais analíticos foram aqueles referentes à vazão de $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 10), sendo que para as demais vazões, os sinais analíticos se apresentaram *ca* 40 % menores.

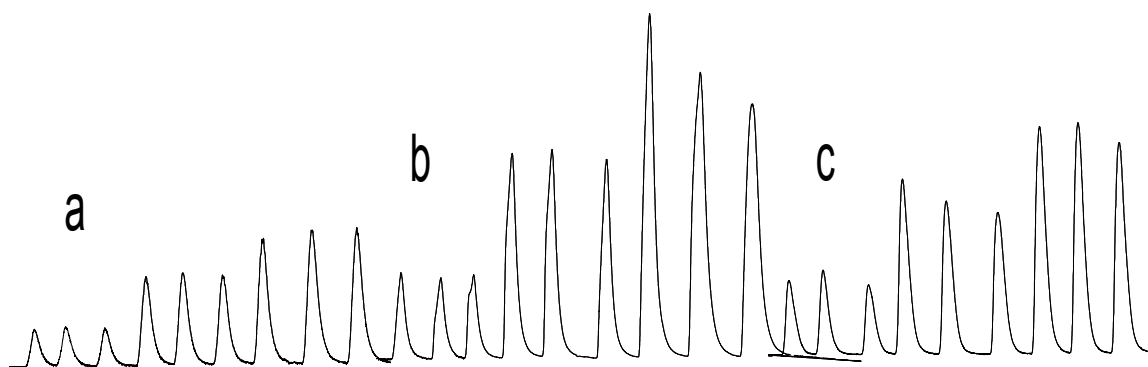


Figura 10. Influência da vazão da solução receptora. Os sinais registrados se referem a 1,0; 3,0 e $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ S-S}^{2-}$. (a) $0,06 \text{ mL min}^{-1}$; (b) $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ (c) $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

Observando-se os resultados relativos à vazão das soluções reagentes (Figura 11) conclui-se que os sinais analíticos são pouco dependentes da vazão, na faixa examinada. Isto poder ser explicado considerando-se que a diluição da zona de amostra nos pontos de confluência era sempre baixa e que as concentrações dos reagentes já haviam sido otimizadas. Este aspecto é também consequência da robustez do procedimento. Desta forma, as vazões dos reagentes foram selecionadas como $0,15 \text{ mL min}^{-1}$.

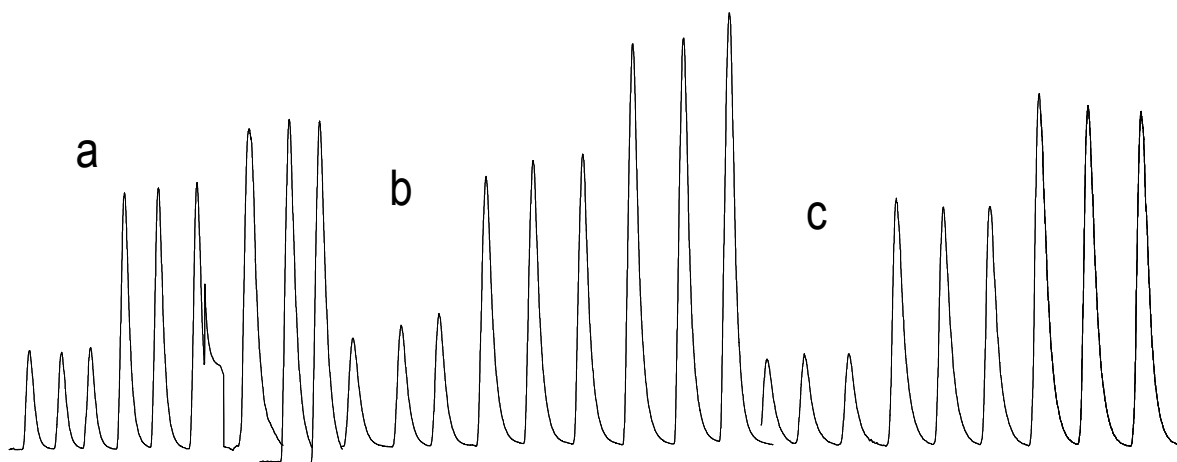


Figura 11. Influência da vazão dos reagentes. Sinais transientes referentes a 1,0; 3,0 e 5,0 $\text{mg L}^{-1} \text{ S-S}^{2-}$. (a) $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; (b) $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ (c) $0,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Relativamente à determinação de sulfito, as variações em vazão das soluções doadora, receptora e reagentes mostraram tendência similar às descritas anteriormente. Para a otimização do sistema proposto estabeleceu-se $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ como vazão de trabalho para a solução doadora. A vazão da solução receptora que mostrou os melhores resultados com relação à sensibilidade analítica foi àquela correspondente a $0,15 \text{ mL min}^{-1}$. Esta situação corresponde à melhor proporção entre vazões. Deve-se ressaltar que experimentos preliminares demonstraram que a sensibilidade poderia ser modificada mantendo-se a proporção em vazões e reduzindo-se a rotação da bomba peristáltica, o que permitia um aumento do intervalo de tempo disponível para a permeação do sulfito através da membrana.

Finalmente, a vazão do reagente MG foi selecionada como $0,15 \text{ mL min}^{-1}$, pois este foi o valor que levou à melhor sensibilidade analítica associada à boa razão sinal-ruído.

5.8. Figuras de mérito

Os sistemas de análises por injeção em fluxo explorando difusão gasosa para a determinação espectrofotométrica de sulfeto e de sulfito demonstraram viabilidade e podem ser sugerido para seleção de leveduras em função da produção de H_2S e SO_2 . Todos os parâmetros investigados indicaram que os métodos são potencialmente aplicáveis, principalmente devido às suas características de robustez, simplicidade operacional, praticidade, velocidade analítica e versatilidade.

Dentre os parâmetros investigados, alguns influenciaram o desempenho dos sistemas de maneira pouco pronunciada, o que confere características de robustez aos procedimentos analíticos. Os sinais analíticos foram aproximadamente 80 % daqueles obtidos sob condições estacionárias (estratégia de parada de fluxos) indicando o alto grau de completção dos processos envolvidos para ambos os sistemas. Sob as condições de operação otimizadas neste trabalho de Tese, as reações se mostraram pouco passíveis de alterações, eliminando, por exemplo, a necessidade do uso de banhos à temperatura controlada, e a espera para obtenção de equilíbrio térmico da amostra.

Relativamente à precisão analítica, os valores de desvios-padrão relativos foram estimados como $< 2.0 \%$, para ambos os sistemas. Os métodos apresentaram relação linear entre absorbância e concentração para as faixas entre 0,0 e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ para sulfeto ou 0,0 e $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ para sulfito; os limites de detecção foram estimados como 0,04 e $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de S^{2-} e S-SO_2 , respectivamente (Christian, 1994). Os sistemas processam *ca* 30 amostras por hora, o que corresponde a consumos de 0,6 mg DMPD e de 0,002 mg MG por determinação. Não foram observadas derivas de linha base durante períodos de operação de até 4 horas.

Com relação à exatidão analítica, constatou-se efeito matricial pronunciado, não se verificando sinais analíticos para ambos os analitos quando as amostras eram processadas sem nenhum tratamento prévio (Figura 12). Este resultado negativo não se deve a dificuldades de conversão de sulfito a H_2S , pois a amostra era acidificada antes da etapa de difusão gasosa. Cumpre salientar que o sulfito formado durante o processo de fermentação existe sob três formas diferentes, dependendo do pH do meio (Stratford & Rose, 1985); sob $\text{pH} < 2,0$, este analito se apresenta predominantemente como SO_2 livre; sob $\text{pH} > 8,0$ o analito ocorre largamente como SO_3^{2-} ; valores intermediários de pH resultam em concentrações maiores de HSO_3^- . Ainda, uma parte do sulfeto pode reagir com compostos que contém o grupo funcional carbonil para formar hidroxissulfonados, também conhecido como “sulfito blindado”.

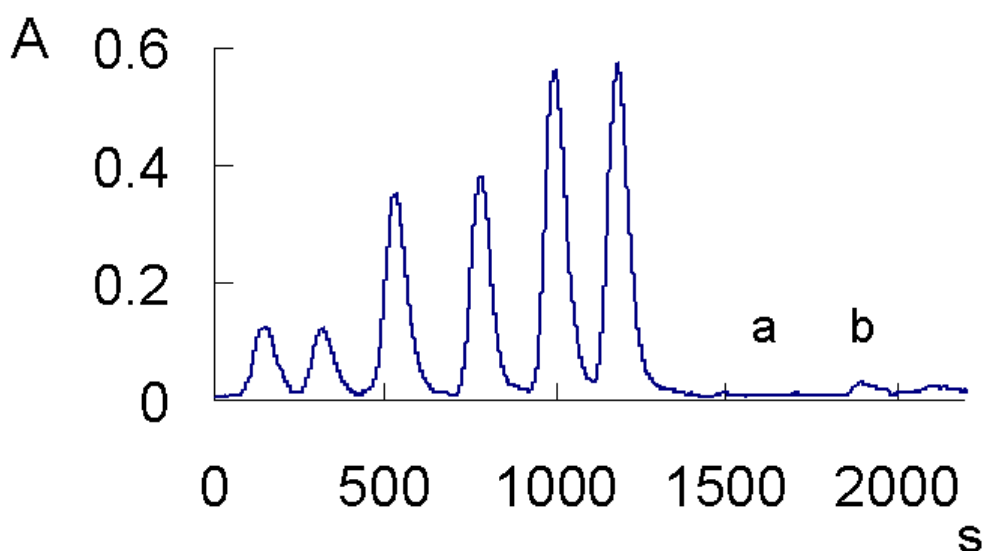


Figura 12. Registro de sinais referentes a soluções-padrão e amostra. Da esquerda para a direita, picos correspondem a 1,0; 3,0 e 5,0 $\text{mg L}^{-1} \text{S-S}^{2-}$ (a) amostra; (b) amostra + 3,00 $\text{mg L}^{-1} \text{S-S}^{2-}$.

O efeito matricial pode ainda ser devido a interações entre o SO_2 e os carboidratos presentes na amostra (Hansen et al., 1974). Como o analito se liga predominantemente a moléculas de açúcares que contém o grupo carbonila, sua liberação para difusão gasosa é comprometida.

Visando contornar esta situação, optou-se primeiramente por centrifugar e filtrar as amostras, obtendo-se sinais analíticos. Os métodos apresentaram valores de recuperações inferiores a 50 % e, ainda, variáveis de amostra para amostra. O tratamento das amostras com solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio durante 5 min (antes de sua introdução no sistema) levou à obtenção de resultados melhores. De fato, curvas analíticas lineares foram obtidas em presença da amostra (Figuras 13 e 14), o que indica a viabilidade de exploração do método das adições-padrão para a superação dos efeitos matriciais remanescentes. A exatidão analítica não pode ser comprovada em função dos baixos teores dos analitos nas amostras, o que se depreende da Figura 12. Entretanto, recuperação quantitativa foi obtida para uma amostra fortificada (do inglês “spiked”), inferindo-se então que a aplicação dos sistemas de análises em fluxo para monitoramento da fermentação em linha é viável.

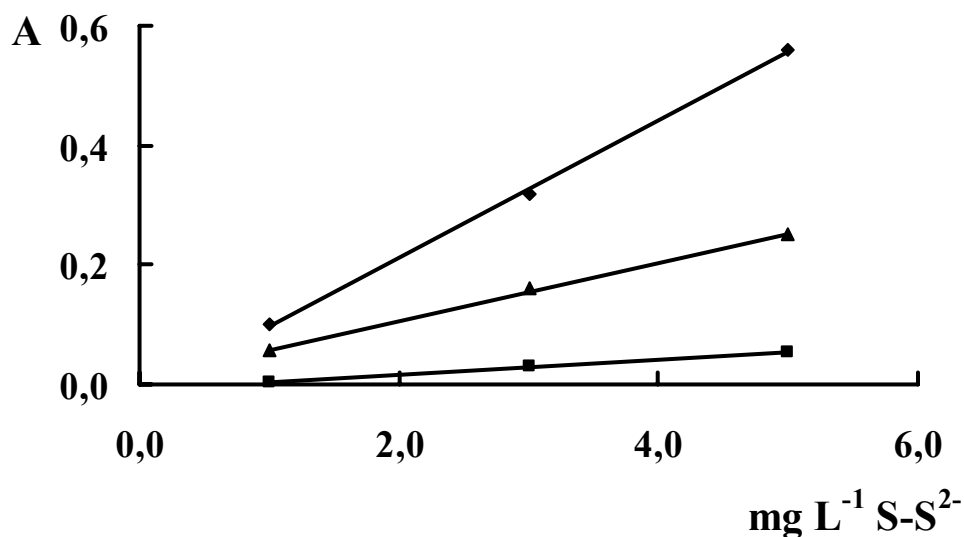


Figura 13. Curvas analíticas associadas a sulfeto. A figura se refere a $\blacklozenge$ soluções-padrão, $\blacktriangle$ caldo de cana de açúcar e $\blacksquare$ melaço.

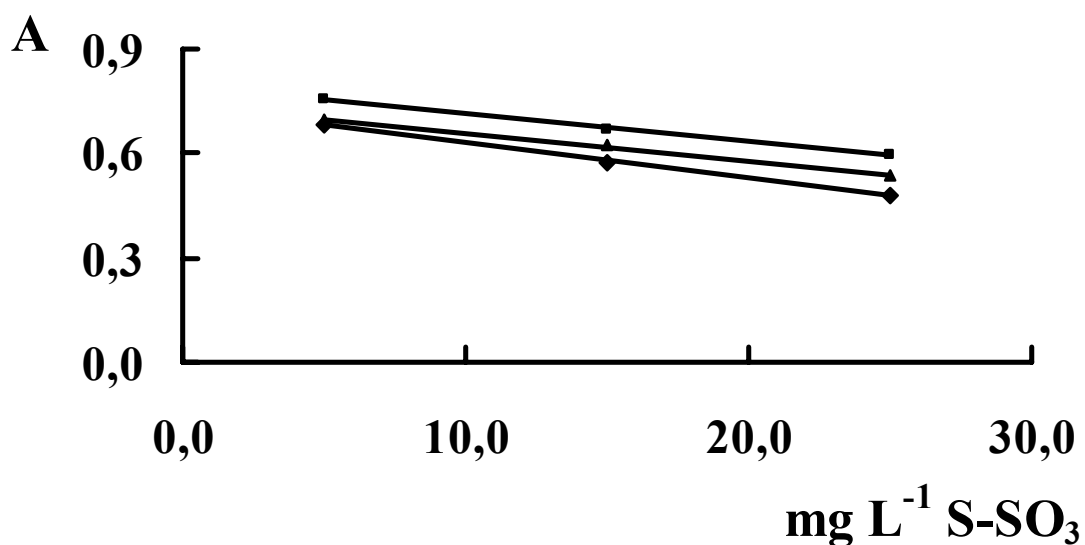


Figura 14. Curvas analíticas associadas a sulfito. A figura se refere a $\blacklozenge$ soluções-padrão, $\blacktriangle$ caldo de cana de açúcar e $\blacksquare$ melaço.

Como estudo em continuação sugere-se avaliar a possibilidade de se prescindir da etapa de difusão gasosa, à semelhança do método preconizado para análises de açúcares recomendado pela ICUMSA (2000). Estudos focalizando estes aspectos se encontram atualmente em progresso. Ainda, testes preliminares revelaram que o analito, sob determinadas condições, pode ser liberado mais facilmente se formaldeído for adicionado à amostra. Este composto se constitui de moléculas pequenas que provavelmente substituem o analito na ligação com os grupos carbonila.

6. CONCLUSÕES

Os sistemas de análises químicas em fluxo explorando difusão gasosa para determinação de sulfeto e sulfito em fermentados, desenvolvidos neste trabalho, apresentaram resultados promissores no que tange à seleção de leveduras.

A etapa de volatilização dos analitos da amostra se mostrou vulnerável devido à complexidade da matriz. Interações entre os analitos e os compostos contendo grupos carbonila da amostra parecem ser responsáveis pelas interferências matriciais. O efeito não é consequência das dificuldades de volatilização dos analitos, pois a amostra era acidificada antes da etapa de difusão gasosa.

A variação das condições de acidez e saturação do meio não promoveu a volatilização satisfatória proporcional dos analitos da amostra em comparação com aquelas obtidas utilizando soluções-padrão. A adição de hidróxido de sódio nas amostras antes de sua introdução no módulo de análises refletiu melhorias significativas nos sinais analíticos, mas ainda não suficientes para superação total da interferência matricial. Desta forma, os resultados analíticos devem ser obtidos explorando-se o método das adições-padrão.

Os sistemas apresentaram boas figuras de mérito analítico, especialmente alta robustez. De fato, variações pronunciadas nos principais parâmetros envolvidos resultaram em alterações relativamente pequenas nos sinais analíticos. Isto se refletiu também em boa repetibilidade e reprodutibilidades analíticas.

A linearidade da curva analítica, a boa precisão analítica e os baixos consumos de reagentes devem também ser aqui salientados.

Esforços devem, entretanto, ser ainda realizados visando a superação quantitativa dos efeitos matriciais, o que flexibilizará o emprego do sistema para monitoramento *in situ*. Este

aspecto é particularmente relevante em laboratórios industriais, nos quais o processamento mecanizado das amostras é em geral desejado.

REFERÊNCIAS

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação dos ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AMERICAN PUBLIC HEATH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington: APHA-AWWA-WPFC, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEATH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington: APHA-AWWA-WPFC, 1992.

ARAÚJO, C.S.T.; CARVALHO, J.L.; MOTA, D.R.; ARAÚJO, C.L.; COELHO, N.M.M. Determination of sulphite and acetic acid in foods by gas permeation flow injection analysis, **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 92, p. 765-770, 2005.

ARMAS, G.; FERRER, L.; MIRÓ, M; ESTELA, J.M.; CERDÀ V. In-line membrane separation method for sulfide monitoring in wastewater exploiting multisyring flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 524, p. 89–96, 2004.

ATANASSOV, G.T.; LIMA, R.C.; MESQUITA, R.B.R.; RANGEL, A.O.S.S.; TOTH, I.V. Spectrophotometric determination of carbon dioxide and sulphur dioxide in wines by flow injection. **Analusis**, Les Ulis Cedex, v. 28, p. 77–82, 2000.

AZEVEDO, C.M.N.; ARAKI, K.; TOMA, H.E.; ANGNES L. Determination of sulfur dioxide in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing modified electrodes with electrostatically assembled films of tetraruthenated porphyrin. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 387, p. 175–180, 1999.

BRYCE, D.W.; IZQUIERDO, A.; LUQUE DE CASTRO M.D. Continuous microwave assisted pervaporation/atomic fluorescence detection: An approach for speciation in solid samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 324, p. 69–75, 1996.

CARDWELL, T.J.; CHRISTOPHERSEN, M.J. Determination of sulfur dioxide and ascorbic acid in beverages using a dual channel flow injection electrochemical detection system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 416, p. 105-110, 2000.

CARIDI, A.; CORTE, V. Inhibition of malolactic fermentation by cryotolerant yeasts. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 19, p. 723–726, 1997.

CERDA, A.; OMS, M.T.; FORTEZA, R.; CERDA, V. Evaluation of flow injection methods for ammonium determination in wastewater samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 311, p. 165–173, 1995.

CHRITIAN, G.D. **Analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

COPERSUCAR. **Academia do açúcar e do álcool**. Disponível em: http://www.copersucar.com.br/institucional/por/academia/moderna_agroind.asp. Acesso em: 05 maio 2008.

CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC international**, Arlington: AOAC International, 1995

DONALIES, U.E.B.; STAHL, U. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSUI*. **Yeast**, San Francisco, v. 19, p. 475–484, 2002.

FANG, Z. **Flow injection separation and preconcentration**. Weinheim: Verlagsgesellschaft, 1993.

FARRELLA, J.R.; ILES, P.J.; YUANB, Y.J. Determination of arsenic by hydride generation gas diffusion flow injection analysis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 334, p. 193–197, 1996.

FERRER, L.; ARMS, G.; MIRO, M.; ESTELA, J.M.; CERDA, V. A multisyringe flow injection method for the automated sulfide in water using a miniaturized optical fiber spectrophotometer. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 64, p. 1119–1126, 2006.

FERRER, L.; ARMS, G.; MIRO, M.; ESTELA, J.M.; CERDA, V. Flow-through optical fiber sensor for automatic sulfide determination in waters by multisyringe flow system using solid-phase reflectometry. **Analyst**, Cambridge, v. 130, p. 644–651, 2005.

FERRER, L.; ESTELA, J.M.; CERDA, V. A smart multisyringe flow injection system for analysis of sample batches with high variability in sulfide concentration. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 391, p. 573–574, 2006.

GUTIERREZ, L.E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997.

HADDAD, P.R.; LAKSANA, S. On-line analysis of alkaline samples with a flow-through electro dialysis device coupled to an ion chromatograph. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 671, p. 131–139, 1994.

HALASZ, A.; LASZTITY, R. **Use yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991.

HANSEN, E.H.; BERGAMIN FILHO, H.; RUZICKA, J. Determination of the hydrogen-sulphite content in wine by means of the air-gap electrode, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 71, p. 225–227, 1974.

HARTWELL, L.H. *Saccharomyces cerevisiae* cell-cycle. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 38, p. 164–198, 1974.

HEINZEL, M.A.; TRUPER, G.H. Sulfite formation by wine yeasts. Part 5. Regulation of biosynthesis of *ATP*- and *ADP-sulfurylase* by sulfur and selenium-compounds. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 118, p. 243–247, 1978.

INTERNATIONAL COMMISSION FOR UNIFORM METHODS OF SUGAR ANALYSIS. **The determination of sulfite by the Rosaline colorimetric method in white sugar, in VVHP raw sugar and cane sugar juices and syrups**. Peterborough: ICUMSA, 2000.

JONSSON, J.A.; MATHIASSEN, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. I Principles. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, p. 318–325, 1999a.

JONSSON, J.A.; MATHIASSEN, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. II Applications. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, p. 325–334, 1999b.

JONSSON, J.A.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, p. 205–225, 2000.

KASTHURIKRISHNAN, N.; KOROPCHAK, J.A. Flow injection Donnan dialysis preconcentration of trace metal cations for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 65, p. 857–862, 1993.

KETOLA, R.A.; KOTIAHO, T.; CISPEN, M.E.; ALLEN T.M. Environmental applications of membrane introduction mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 37, p. 457–476, 2002.

KRUG, F.J.; BERGAMIN FO, H.; ZAGATTO, E.A.G. Commutation in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 179, p. 103–118, 1986.

KUBAN, V. Gas diffusion/permeation flow injection analysis. Part 1. Principles and instrumentation. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v. 23, p. 323–354, 1992.

KUBAN, V.; DASGUPTA, P.K.; MARX J.N. Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 64, p. 36–43, 1992.

LIMA, J.L.F.C.; RANGEL A.O.S.S.; SOUTO, M.R.S. Flow injection system with gas diffusion for the sequential determination of total nitrogen and phosphorus in vegetables. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 358, p. 657–662, 1997.

LIMA, J.L.F.C.; RANGEL, A.O.S.S.; SOUTO, M.R.S. Simultaneous determination of potassium and sodium in vegetables by flame emission spectrometry using a flow-injection system with two dialysis units. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 12, p. 81–85, 1996.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LUQUE DE CASTRO, M.D.; PAPAEFSTATHIOU, I. Analytical pervaporation: an new separation technique. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 17, p. 41–49, 1998.

LUQUE DE CASTRO, M.D.; TENA, M.T. Solid interfaces as analytical problem solvers in flow injection analysis. **Talanta**, Amsterdam, v. 40, p. 21–36, 1993.

MARCKZENKO, Z. **Separation and spectrophotometric determination of elements**. Chichester: Ellis Horwood, 1986.

McNAUGHT, A.D.; WILKINSON, A. **Compendium of chemical terminology**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1997.

MEADE, G.P. **Cane sugar handbook**. New York: John Wiley, 1977.

MELO, D.; ZAGATTO, E.A.G.; MATTOS, I.L.; MANIASSO, N. Spectrophotometric flow-injection determination of sulphite in white wines involving gas diffusion through a concentric tubular membrane. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo v. 14, p. 375–379, 2003.

MENESES, S.R.P. **Determinação espectrofotométrica de baixas concentrações de sulfato empregando um sistema miniaturizado de análises em fluxo**. 2003. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MIRÓ, M.; FRENZEL, W. Automated membrane-based sampling and sample preparation exploiting flow-injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, p. 624–636, 2004.

PASQUINI, C.; SILVA M.C.H. Determination of gaseous analytes in flow systems. A review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 10, p. 85–91, 1999.

PERRIN, D.D. **Ionisation constant of inorganic acids and bases in aqueous solution**. New York: Pergamon, 1982.

REED, G.; PEPPLER, H.J. **Yeast technology**. Westport: AVI Publishing Co., 1973.

ROSE, A.H. **Alcoholic beverages**. London: Academic Press, 1977.

ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The yeasts**. London: Academic Press, 1969.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. **Flow injection analysis**. 2. ed. New York: Wiley-Interscience, 1988.

SATIENPERAKUL, S.; CARDWELL, T.J.; CATTRALL, R.W.; McKELVIE, I.D.; TAYLOR, D.M.; KOLEV, S.D. Determination of carbon dioxide in gaseous samples by gas diffusion-flow injection. **Talanta**, Amsterdam, v. 62, p. 631–636, 2004.

SCHEPERS, D.; SCHULZE, G.; FRENZEL, W. Spectrophotometric flow-through gas sensor for the determination of atmospheric nitrogen dioxide. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 308, p. 109–114, 1995.

SEGUNDO, M.A.; RANGEL A gas diffusion sequential injection system for determination of sulphur dioxide in wines. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 427, p. 279–286, 2001.

SEGUNDO, M.A.; RANGEL, A.O.S.S.; CLADERA, A.; CERDA, V. Multisyringe flow system: determination of sulfur dioxide in wines. **Analyst**, Cambridge, v. 125, p. 1501–1505, 2000.

SILVA, M.S.P.; GALHARDO C.X.; MASINI, J.C. Application of sequential injection-monosegmented flow analysis (SI-MSFA) to spectrophotometric determination of sulfide in simulated waters samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 60, p. 45–52, 2003.

SILVA, M.S.P.; MASINI, J.C. Acoplamento de cela de difusão gasosa a sistema de análise por injeção sequencial visando à determinação espectrofotométrica de sulfeto. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p 545–549, 2004.

SILVA, M.S.P.; SILVA, I.S.; ABATE, G.; MASINI, J.C. Spectrophotometric determination of volatile sulfide in river sediments by sequential injection analysis exploiting the methylene blue reaction. **Talanta**, Amsterdam, v. 53, p. 843–850, 2001.

STADEN, J.F.; HATTINGH, C.J. Incorporation of electrodialysers into the conduits of FIA systems: enhancement of the mass transfer of chloride anions through passive neutral membranes. **Talanta**, Amsterdam, v. 45, p. 485–492, 1998.

STEVENSON, G.B. **Biologia dos fungos, bactérias e vírus**. São Paulo: Polígono, 1974.

STRATFORD, M.; ROSE, A.H. Hydrogen sulphide production from sulfite by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 131, p. 1417-1424, 1985.

SUTHERLAND, C.M.; HENSCHKE P.A.; LANGRIDGE, P.; LOPES, M.D. Subunit and cofactor binding of *Saccharomyces cerevisiae* sulfite-reductase - towards developing wine yeast with lowered ability to produce hydrogen sulfide. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Glen Osmond, v. 9, p. 186–193, 2003.

SZEKERES, L. Analytical chemistry of sulphur acids. **Talanta**, Amsterdam, v. 21, p. 1–44, 1974.

TAKAYANAGI, T. FIA bibliography (48). **Journal of Flow Injection Analysis**, Fukuoka, v. 24, p. 141-156, 2007.

TAYLOR, D.M.; KOLEV, S.D. Determination of carbon dioxide in gaseous samples by gas diffusion-flow injection. **Talanta**, Amsterdam, v. 62, p. 631–636, 2004.

TROJANOWICZ, M. **Flow injection analysis: instrumentation and applications**. Singapura: World Scientific, 2000.

VALLEJO, B.; RICHTER, P.; TORAL, I.; TAPIA C.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Determination of sulphide in liquid and solid samples by integrated pervaporation–potentiometric detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 436, p. 301–307, 2001.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Wiley, 1998.

WEISS, J. **Ion chromatography**. 2. ed. Weinheim: Verlagsgesellschaft, 1995.

YUAN, Y.J.; KURIYAMA, H. Determination of hydrogen sulfide in a yeast culture solution by flow analysis utilising methylene blue spectrophotometric detection. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 22, p. 795–799, 2000.

ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F.; BERGAMIN FILHO, H.; KRUG, F.J. Isothermal distillation in flow injection analysis. Determination of total nitrogen in plant material. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 109, p. 45-54, 1979.