



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO  
GERAÇÃO ELETROQUÍMICA DE REAGENTE E  
DETECÇÃO BIAMPEROMÉTRICA PARA A  
DETERMINAÇÃO DE SULFITO**

**Nattany Tayany Gomes de Paula**

**Recife**  
**Março/2015**

**Nattany Tayany Gomes de Paula\***

**SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO  
GERAÇÃO ELETROQUÍMICA DE REAGENTE E  
DETECÇÃO BIAMPEROMÉTRICA PARA A  
DETERMINAÇÃO DE SULFITO**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós- Graduação em Química  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Química pela  
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

**Orientador: Prof. Dr. André Fernando Lavorante**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento**

**\*Bolsista FACEPE**

**Recife  
Março/2015**

Nattany Tayany Gomes de Paula

**SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO  
GERAÇÃO ELETROQUÍMICA DE REAGENTE E  
DETECÇÃO BIAMPEROMÉTRICA PARA A  
DETERMINAÇÃO DE SULFITO**

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. André Fernando Lavorante (DQ/UFRPE) **Orientador**

---

Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento (DQ/UFRPE) **Co-orientador**

---

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira (DQ/UFRPE) **1º Examinador**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Silveira Paim (DQF/UFPE) **2º Examinador**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças de prosseguir, mesmo quando tudo parecia impossível;

Aos meus pais, que mesmo com todas as dificuldades sempre estiveram ao meu lado, em especial a uma pessoa guerreira e companheira, minha mãe Midian;

Ao meu segundo pai, Justino, que sempre me ajudou nos momentos difíceis de minha vida, que teve papel fundamental na minha formação acadêmica e está sempre disposto a me mostrar o melhor caminho;

A minha segunda mãe, Claudinha, que foi minha grande amiga e que me guiou nas minhas primeiras experiências como aluna de graduação;

Ao meu namorado, Yuri, que sempre teve muita paciência, que me apoiou, me deu forças e incentivo para que eu tomasse minhas próprias decisões;

Aos meus sogros, Ilka e Raul, que sempre me ajudaram e me tiveram como uma filha;

Ao prof. Dr. André F. Lavorante, pela oportunidade e pela grande contribuição em minha formação científica, por sempre confiar e acreditar em mim;

Ao prof. Dr. Valberes B. Nascimento, pelos sábios conselhos, paciência e plena dedicação que contribuíram assim para minha formação acadêmica e pessoal;

Ao prof. Dr. Prof. Ivano Gebhardt Rolf Gutz, pela contribuição neste trabalho através da doação da câmara de difusão gasosa;

Ao meu grupo de pesquisa que muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos Moara, e Filipe que sempre estiveram presentes e que me ajudaram no que foi preciso;

Aos amigos do Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores (LAQIS), Anabel, Lidiane, Pedro, Catarine, Carlos, Amanda, Carine, Ingrid, Marcones, Jamerson, Elaine, Rêne, Nayara, Heliana, Dilmo, Aécio, Natália, José Ailton, José Ricardo, Thiago, Rafael, Ana Gabriela, Gabriela, Daniele, Paulo, Gustavo, Bianca, Leonardo, Ludimilla e Rômulo, que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho.

A todos os professores, que contribuíram imensamente para minha formação acadêmica;

A FACEPE pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

PAULA, N. T. G. **SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO GERAÇÃO ELETROQUÍMICA DE REAGENTE E DETECÇÃO BIAMPEROMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFITO**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Química. Programa de pós-graduação em química. Recife, 2015.

Os agentes sulfitantes ou sulfitos são considerados aditivos alimentares que, após reação química, liberam dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), íon sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) ou íon bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ). Estes aditivos são agentes multifuncionais e atuam como antioxidantes em alimentos, no controle do crescimento bacteriano e de reações (enzimáticas e não enzimáticas) de escurecimento durante o processamento e estocagem. Mesmo sendo muito utilizado na indústria de alimentos, o emprego de sulfitos como conservantes provoca alguns problemas, reduzindo a qualidade nutricional dos alimentos tratados e em alguns casos são provocados efeitos adversos à saúde humana. Neste trabalho propõe-se determinar sulfitos em amostras de sucos industrializados e vinhos empregando um sistema de análise em fluxo com detecção biamperométrica. O sistema foi construído empregando-se uma Bomba Peristáltica, um Injetor Proporcional, uma Câmara de Difusão Gasosa (CDG) e uma Câmara de Geração de Reagente (CGR). A CGR foi acoplada a um potenciostato para a aplicação de corrente necessária para a geração eletroquímica de íons triiodeto. Para detecção foi utilizado um detector biamperométrico. Para o tratamento e aquisição de dados, foi utilizado um software desenvolvido em linguagem Lab View®. A metodologia de análise foi baseada em uma reação de oxirredução entre os íons  $\text{SO}_3^{2-}$  e  $\text{I}_3^-$ , que proporciona uma diminuição da corrente biamperométrica gerada pelo par redox  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$ , sendo essa diminuição de corrente proporcional a concentração de íons  $\text{SO}_3^{2-}$ . Após a otimização do procedimento proposto obteve-se as melhores condições: 0,25 mol L<sup>-1</sup> de KI, 1,0 mol L<sup>-1</sup> de HCl, 0,1 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, corrente de 0,25 mA aplicada na CGR e volume de amostra de 100 µL. Nestas condições, obteve-se uma resposta linear entre 1 e 12 mg L<sup>-1</sup> de sulfito ( $I = - (0,2371 \pm 0,0028) C + (6,7097 \pm 0,0182)$ ,  $R = -0,9997$ ), LD = 0,26 mg L<sup>-1</sup> e LQ = 0,86 mg L<sup>-1</sup>, desvio padrão relativo menor que 2% (n = 10), com frequência de amostragem de 40 determinações por hora. Estudos de potenciais interferentes demonstraram a seletividade do método proposto. Testes de adição e recuperação com amostras de sucos e vinhos foram realizados, obtendo-se resultados de recuperação entre 91,63 e 110,34%, demonstrando a possibilidade de operação do procedimento proposto em amostras reais.

Palavras-chave: Agentes sulfitantes; Sulfito; Análise por injeção em fluxo; Difusão gasosa; Biamperometria.

## ABSTRACT

PAULA, N. T. G. **FLOW ANALYSIS SYSTEM USING ELECTROCHEMICAL REAGENT GENERATION AND DETECTION BIAMPEROMETRIC FOR THE DETERMINATION OF SULFITE**. 2015. Masters Thesis Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Química. Programa de pós-graduação em química. Recife, 2015.

Sulfites are considered food additives that after chemical reaction releasing sulfur dioxide ( $\text{SO}_2$ ), sulfite ion ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), or bisulfite ion ( $\text{HSO}_3^-$ ). These additives act as antioxidants in food, in the control of bacterial growth and enzymatic and non-enzymatic browning reactions during processing and storage. Although widely used in the food industry, the use of sulfite as a preservative causes some problems, reducing the nutritional quality of foods processed and in some cases are caused adverse effects to human health. In this work it is proposed to determine sulfite in samples of processed juices and wines through an analytical flow system with biamperometric detection. The system was built employing a peristaltic pump, proportional injector, a Gas Diffusion Cell (GDC) and Reagent Generation Cell (RGC) and polyethylene tubes with an internal diameter of 0.8 mm for making the analytical path. The RGC was coupled to a potentiostat for applying current to the electrochemical generation of triiodide ions. For detection it was used a biamperometric detector, adapted to a coulometer for applying the constant potential. For the data acquisition and processing was performed using a software developed in Lab View® language. The analysis method was based on a redox reaction between the  $\text{I}_3^-$  ions  $\text{SO}_3^{2-}$  and providing a decrease of the generated current by the pair and this decrease in the signal is proportional to the concentration of  $\text{SO}_3^{2-}$  ions. After the system optimization, the proposed procedure was operated with KI concentrations of  $0.25 \text{ mol L}^{-1}$ , HCl  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , with  $0.25 \text{ mA}$  current applied in RGC and the length of the sampling loop was of  $20 \text{ cm}$ . In the proposed procedure, a linear response was obtained between  $1$  and  $12 \text{ mg L}^{-1}$  of sulfite  $E = - (0,2371 \pm 0,0028) C + (6,7097 \pm 0,0182)$ ,  $R = -0,9997$ ,  $LD = 0,26 \text{ mg L}^{-1}$  and  $LQ = 0,86 \text{ mg L}^{-1}$ , relative standard deviation less than  $2\%$  ( $n = 10$ ), with sampling frequency of  $40 \text{ h}^{-1}$ . Potential interfering studies demonstrated the selectivity of the proposed method. Addition and recovery tests with samples of juices and wines were performed to give results of recovery between  $91.63$  and  $110.34\%$ , demonstrating the possibility of operation of the proposed procedure in real samples.

Keywords: Sulfite; Flow injection analysis; Gas diffusion; Biamperometry.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Agentes sulfitantes ou sulfitos.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Métodos para determinação de sulfito.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. Método de Monier-Williams.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4. Coulometria .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. Biamperometria .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6. Iodimetria.....</b>	<b>15</b>
<b>2.7. Análise por injeção em fluxo.....</b>	<b>17</b>
<b>2.8. Determinação de sulfito utilizando análise por injeção em fluxo .....</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Geral.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Soluções.....</b>	<b>26</b>
4.1.1. Soluções estoque .....	26
4.1.2. Soluções de trabalho .....	26
<b>4.2. Equipamentos e acessórios .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Método.....</b>	<b>31</b>
4.3.1. Avaliação da câmara de geração de reagente (CGR).....	31
4.3.2. Avaliação do funcionamento do sistema .....	31
4.3.3. Descrição do sistema proposto .....	32
4.3.4. Estudo da natureza do ácido.....	34

4.3.5.	Estudo da concentração do ácido.....	34
4.3.6.	Estudo da concentração de KI .....	35
4.3.7.	Estudo da corrente aplicada na CGR.....	35
4.3.8.	Influência do volume de amostra .....	35
4.3.9.	Estudo de interferentes.....	36
4.3.10.	Análise das amostras e Teste de adição e recuperação .....	36
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1.	<b>Avaliação da câmara de geração de reagente (CGR).....</b>	<b>37</b>
5.2.	<b>Avaliação do funcionamento do sistema.....</b>	<b>39</b>
5.3.	<b>Estudo da natureza do ácido .....</b>	<b>41</b>
5.4.	<b>Estudo da concentração do HCl .....</b>	<b>42</b>
5.5.	<b>Estudo da concentração de KI.....</b>	<b>43</b>
5.6.	<b>Estudo da corrente aplicada na CGR.....</b>	<b>45</b>
5.7.	<b>Influência do volume de amostra.....</b>	<b>46</b>
5.8.	<b>Avaliação da estabilidade do sistema proposto.....</b>	<b>48</b>
5.9.	<b>Sinais transientes e curva analítica .....</b>	<b>49</b>
5.10.	<b>Estudo de interferentes .....</b>	<b>50</b>
5.11.	<b>Figuras de mérito do procedimento proposto.....</b>	<b>52</b>
5.12.	<b>Análise das amostras e Teste de adição e recuperação .....</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Sulfitos e seus respectivos números de identificação internacional (INS).	<b>6</b>
<b>Tabela 2.</b> Limite máximo da quantidade de agentes sulfitantes adicionados aos alimentos.	<b>9</b>
<b>Tabela 3.</b> Aplicações da Iodimetria. Adaptado de (SKOOG et al., 2006).	<b>15</b>
<b>Tabela 4.</b> Equações da reta e coeficientes de correlação (R) obtidos de acordo com o comprimento da alça de amostragem.	<b>47</b>
<b>Tabela 5.</b> Avaliação de possíveis interferentes estudados.	<b>51</b>
<b>Tabela 6.</b> Comparação das características analíticas do método proposto com outros métodos descritos na literatura.	<b>53</b>
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos para a análise de sucos e vinhos e o teste de adição e recuperação.	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema básico de um sistema de análise em fluxo. A = amostra; Ca = fluido carregador; R = reagente; B = bobina de reação; L = alça de amostragem; DET = detector; D = descarte (REIS, 1996). ..... 18
- Figura 2.** Ilustração do gradiente de concentração da zona de amostra e perfil do sinal transiente (CÓRDOVA, 2008). ..... 19
- Figura 3.** Esquema da Câmara de Difusão Gasosa (CDG). (P) parafusos, (T) tubos de polietileno, (BA) blocos de acrílico, (PA) percurso analítico. .... 28
- Figura 4.** Esquema da Câmara de Geração de Reagente (CGR). (A) câmara do eletrodo auxiliar, (B) câmara do eletrodo de trabalho, (C) fio de platina e (D) região perfurada (OLIVEIRA et al., 2006). ..... 29
- Figura 5.** Esquema do detector biamperométrico. .... 29
- Figura 6.** Diagrama de fluxo. A = Amostra; KI 0,25 mol L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>; HCl = ácido clorídrico; CGR = Câmara de Geração de Reagente; D = Detector; L = Descarte; IP = Injetor Proporcional; CDG = Câmara de Difusão Gasosa; BP = Bomba Peristáltica. .... 32
- Figura 7.** Ilustração da interface com o usuário do programa desenvolvido em linguagem LabView 8.5. .... 34
- Figura 8.** Espectros de absorvância obtidos para a formação do complexo amido-triiodeto. Cada espectro representa uma corrente aplicada expressa em mA como indicado na legenda. Curva obtida a partir dos espectros do complexo amido-triiodeto. KI = 0,25 mol L<sup>-1</sup>. .... 38
- Figura 9.** Curva analítica. Condições de estudo: Soluções de referência contendo, 30 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 150 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup> e 300 mg L<sup>-1</sup>, 0,25 mol L<sup>-1</sup> de KI, 1,0 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e corrente de geração de triiodeto de 0,25 mA. .... 39

- Figura 10.** Curva analítica. Condições de estudo: Soluções de referência contendo, 1 mg L<sup>-1</sup>, 2 mg L<sup>-1</sup>, 4 mg L<sup>-1</sup>, 6 mg L<sup>-1</sup> e 8 mg L<sup>-1</sup>, 0,25 mol L<sup>-1</sup> de KI, 1,0 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e corrente de geração de íons triiodeto de 0,25 mA. .... 40
- Figura 11.** Gráfico de barras do sinal analítico em função da natureza do ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> e HCl) para o branco, e para as soluções de 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>..... 41
- Figura 12.** Intensidade do sinal analítico em função da concentração de HCl (0,025; 0,15; 0,5; 1,0 e 1,5 mol L<sup>-1</sup>) para o branco, e para as soluções de 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>..... 42
- Figura 13.** Intensidade do sinal analítico em função da concentração de KI (0,15; 0,25; 0,35 e 0,45 mol L<sup>-1</sup>) para o branco e para as soluções de 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>..... 44
- Figura 14.** Intensidade do sinal analítico em função da corrente aplicada na CGR (0,05; 0,15; 0,25 e 0,35 mA) para o branco e para as soluções de 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>..... 45
- Figura 15.** Curvas analíticas em função do comprimento da alça de amostragem (de 10 a 40 cm) para soluções de referência de 0 a 10 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>..... 47
- Figura 16.** Avaliação da estabilidade da linha de base..... 49
- Figura 17.** Sinais transientes referentes à determinação de sulfito. Soluções de referência contendo, 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 e 12 mg L<sup>-1</sup>. Curva analítica para o sulfito. Concentração de KI 0,25 mol L<sup>-1</sup>, HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e corrente de geração de íons triiodeto de 0,25 mA. .... 50

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>JECFA</b>	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
<b>IDA</b>	Ingestão Diária Aceitável
<b>INS</b>	International Numbering System
<b>CCFAC</b>	Codex Committee on Food Additives and Contaminants
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>OIV</b>	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária



## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o hábito alimentar da população passou por mudanças, atraindo a atenção dos órgãos reguladores e da comunidade científica, pois a substituição de alimentos na sua forma natural por alimentos processados vem contribuindo de maneira direta para o empobrecimento da dieta (POLÔNIO; PERES, 2009). Além disso, mais de 2500 aditivos alimentares vem sendo utilizados para preservar, tingir ou “melhorar” os alimentos como consequência da industrialização e do desenvolvimento da tecnologia de processamento de alimentos (MOUTINHO et al., 2007).

É considerado aditivo alimentar a substância de origem natural ou sintética, que é adicionada aos alimentos para atender a uma determinada função tecnológica ou sensorial, por exemplo, para combater perecibilidade de alimentos e a degradação bacteriana, dar ou restaurar a cor ou conferir aroma aos alimentos (BEARTH et al., 2014). Um aditivo alimentar só é aprovado para consumo humano depois do estudo da sua toxicidade aguda, subaguda e crônica. No entanto, mesmo após aprovado, a observação de seus efeitos pós-comercialização deve ser mantida por um longo tempo (MOUTINHO et al., 2007).

Dentre os aditivos alimentares, os sulfitos (dióxido de enxofre gasoso ou sais de sódio, potássio e cálcio de sulfito de hidrogênio (bissulfito), dissulfito (metabissulfito) ou íons de sulfito) se destacam como uma série de aditivos multifuncionais, que são amplamente utilizados na indústria de alimentos como antioxidantes, corantes e conservantes. Entretanto, muitas vezes este aditivo alimentar é utilizado em excesso ou com abuso em muitas categorias de alimentos (ZHANG et al., 2014).

Os sulfitos são conhecidos por causar reações adversas em subgrupos específicos da população. Assim, existem disposições específicas no *Codex (General Standard for the Labelling of Prepackaged Food)* e nas legislações nacionais dos países para a rotulagem de alimentos e bebidas que contenham sulfitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

No Brasil, são seguidas as recomendações do JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) para o uso seguro de aditivos alimentares. De acordo com o JECFA, o uso de aditivos é assegurado em termos de sua ingestão diária aceitável (IDA), quantidade de aditivo que pode ser consumida diariamente e por toda vida sem risco apreciável à saúde, expressa em miligramas por quilogramas de peso corpóreo (MACHADO et al., 2007). No Brasil a ingestão diária aceitável de sulfito é de  $0,7 \text{ mg Kg}^{-1}$  de peso corpóreo por dia (AUN et al., 2011). Sendo assim, se faz necessário a análise de alimentos industrializados para conhecer os teores reais de sulfitos presentes nestes.

Existem vários métodos utilizados na determinação de sulfitos em alimentos e bebidas, entretanto, a escolha do método depende principalmente da matriz e da concentração de sulfito a ser analisada. Segundo a JECFA, os métodos propostos, geralmente, são baseados em reações químicas clássicas e na reatividade do sulfito com a matriz, o que requer alguns meios para recuperação de dióxido de enxofre. O método de Monier-Williams tem sido o procedimento mais utilizado para a determinação de sulfito em alimentos e bebidas e foi adotado como método oficial em vários países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Os métodos clássicos de determinação de sulfito em alimentos e bebidas são dispendiosos e apresentam limitações com relação à automação, frequência analítica, economia de reagentes, geração de efluentes, sensibilidade e preparo da mostra. Estas limitações têm sido superadas com o emprego de ferramentas analíticas modernas, como por exemplo, o sistema de análise por injeção em fluxo, obtendo-se resultados com menor geração de efluentes e maior frequência analítica (PUNDIR; RAWAL, 2013).

Dentre os detectores utilizados em sistemas de análise em fluxo podem-se destacar os detectores eletroquímicos. Quando o uso destes é adequado à reação envolvida, a sensibilidade e seletividade da análise são, em sua maioria, superiores quando comparados a sistemas com detectores espectrofotométricos (OLIVEIRA, 2011).

Neste trabalho, foi desenvolvido um procedimento analítico em fluxo para a detecção biamperométrica de sulfito. Neste sentido, foi construído um sistema em fluxo com geração eletroquímica de reagente objetivando um módulo de análise compacto, minimizando o consumo de reagentes, geração de efluentes, com pouca interferência do operador e maior frequência analítica.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Agentes sulfitantes ou sulfitos

A disponibilidade de alimentos no Brasil demonstra que as mudanças alimentares nos países em desenvolvimento têm sido favoráveis do ponto de vista dos problemas associados à subnutrição (aumento na disponibilidade de calorias *per capita* e aumento da participação de alimentos de origem animal na alimentação). Por outro lado, essa evolução vem acompanhada do aumento do consumo de alimentos industrializados e *fast foods*, ocasionando intensas mudanças nos padrões de adoecimento na segunda metade do século XX (BARRETO et al., 2005).

Como consequência da industrialização e do desenvolvimento da tecnologia de processamento de alimentos, cada vez mais aditivos alimentares vêm sendo empregados na produção de bebidas e alimentos (ALBUQUERQUE et al., 2012). O aditivo alimentar é definido como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Esta definição não inclui substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997).

Dentre os aditivos alimentares utilizados pela indústria de alimentos, com o intuito de aumentar o tempo de vida útil destes produtos, os agentes sulfitantes têm desempenhado um papel importante, devido à sua utilização em alguns alimentos como agente protetor. Frutos secos, legumes secos, biscoitos, mostarda e vinho são exemplos de alimentos que contêm sulfito (YILMAZ; SOMER, 2007).

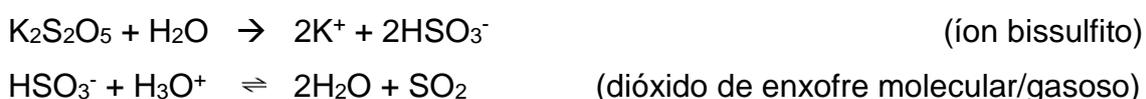
Os agentes sulfitantes têm sido utilizados desde a antiguidade, quando o dióxido de enxofre foi utilizado pelos egípcios e romanos para limpar e desinfetar recipientes utilizados para guardar vinho. A prática de adicionar

agentes sulfitantes em vinhos continua até os dias atuais. Os sulfitos também têm sido utilizados para garantir textura e cor desejável em batatas em conserva, evitar o escurecimento do camarão, entre outros. São agentes eficazes no branqueamento, são antimicrobianos, reagem rapidamente com oxigênio e são inibidores de enzimas (FAZIO; WARNER, 1985).

Os sulfitos possuem um efeito antioxidante responsável pela inibição de dois tipos de escurecimento, o enzimático e o não enzimático, onde baseia-se, principalmente, em sua capacidade de reagir com outros agentes oxidantes que são formados quando o oxigênio entra em contato com o alimento. As reações de escurecimento não enzimático mais importantes são as que envolvem aminoácidos, açúcares redutores e a caramelização de açúcares. No processo de escurecimento não enzimático, são formados inúmeros intermediários de reação, como açúcares redutores, carbonilas simples, dicarbonilas e  $\alpha$  e  $\beta$ -carbonilas insaturadas (FAVERO et al., 2011).

Neste caso, devido ao fato do sulfito apresentar elevada reatividade, podem reagir com todos esses intermediários e, desta forma, bloquear a formação de pigmentos marrons. No escurecimento enzimático, os sulfitos também podem agir como inibidores de inúmeras enzimas, incluindo polifenoloxidase, ascorbato oxidase, lipoxigenase, peroxidase e enzimas dependentes de tiamina (ISAAC et al., 2006; CARDOSO et al., 2007; FAVERO et al., 2011).

Os termos sulfitos e agentes sulfitantes são utilizados para descrever substâncias adicionadas aos alimentos que após reação química liberam dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), íon sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) ou íon bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) (AUN et al., 2011). Os agentes sulfitantes são quimicamente equivalentes quando incorporados ao alimento, uma vez que são convertidos às mesmas espécies iônicas ou não iônicas em determinado pH, força iônica, concentração e temperatura. As equações a seguir mostram a hidrólise do metabissulfito de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) dando origem ao íon bissulfito (ANVISA, 2011).





Dependendo do pH do meio, o íon bissulfito pode ser convertido a dióxido de enxofre ou íon sulfito. Em valores de pH próximos a 1,7, o ácido sulfuroso é predominante na sua forma indissociável. Na faixa de pH de 1,7 a 5,1 a espécie presente em maior quantidade é o íon bissulfito, enquanto que em pH acima de 5,1 a maior parte do ácido sulfuroso encontra-se dissociado (FAVERO et al., 2011).

O Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (International Numbering System) foi elaborado pelo Comitê do Codex Alimentarius da Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO) sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos (CCFAC), este sistema numérico internacional de identificação dos aditivos alimentares é uma alternativa à declaração do nome específico do aditivo nas listas de ingredientes. Podendo ser indicado no rótulo do produto, o nome do aditivo ou seu INS (AUN et al., 2011). Na Tabela 1, são apresentados os agentes sulfitantes permitidos pela legislação brasileira e seus respectivos INS.

**Tabela 1.** Sulfitos e seus respectivos números de identificação internacional (INS).

Substância	Fórmula Química	Rendimento teórico de SO <sub>2</sub> (%)	INS
Dióxido de enxofre	SO <sub>2</sub>	100	220
Sulfito de sódio	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	50,8	221
Bissulfito de sódio	NaHSO <sub>3</sub>	61,6	222
Metabisulfito de sódio	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	67,4	223
Metabissulfito de potássio	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	57,6	224
Sulfito de potássio	K <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	*	225
Sulfito de cálcio	CaSO <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	64,0	226
Bissulfito de cálcio	Ca(HSO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	*	227
Bissulfito de potássio	KHSO <sub>3</sub>	53,3	228

(ANVISA, 2011; FAVERO et al., 2011). \*Não informado na literatura.

Embora o uso de agentes sulfitantes tenha suas vantagens quanto a conservação dos alimentos, existe uma preocupação com os riscos do uso indiscriminado desses agentes devido a sua toxicidade. Seu uso tem ocasionado reações asmáticas em um pequeno grupo de indivíduos sensíveis da população asmática. Neste sentido, a ingestão de alimentos, contendo agentes sulfitantes, já foi indicada como causadora de várias mortes (FAZIO; WARNER, 1985; NIKNAHAD; O'BRIEN, 2008).

É importante ressaltar que as reações causadas por sulfitos são caracterizadas como intolerâncias, e não como alergias. A intolerância alimentar pode ter sintomas semelhantes aos de uma alergia, mas o sistema imunológico não é envolvido. A intolerância alimentar é caracterizada pela deficiência que o organismo tem em não conseguir digerir adequadamente um alimento ou um dos seus componentes (FAZIO; WARNER, 1985; POLÔNIO; PERES, 2009; FAVERO et al., 2011).

As reações adversas causadas por sulfitos incluem choque anafilático, distúrbios neurológicos, crise asmática, dores de cabeça, dores abdominais, náuseas, tontura, urticária e angioedema. Os asmáticos mostram uma maior sensibilidade aos sulfitos, onde uma estimativa de 5 a 11% de todos os asmáticos são afetados. Além disso, cerca de 25% dos casos relatados foram de pessoas sem histórico da doença. As investigações sobre esse perigo potencial e o conhecimento do uso generalizado de agentes sulfitantes são de extrema importância tendo em vista as inúmeras reações adversas causadas por este aditivo (FAZIO; WARNER, 1985; POLÔNIO; PERES, 2009; FAVERO et al., 2011).

Devido às variações nos sintomas, na gravidade das reações e nas sensibilidades de cada indivíduo para diferentes formas de sulfito, é improvável que um único mecanismo explique todas as reações adversas a estes aditivos. Porém, existem possíveis mecanismos baseados em registros clínicos, como por exemplo, a asma severa e o uso de esteróis como tratamento, que estavam associadas a uma predisposição à hipersensibilidade a sulfitos, e que o dióxido de enxofre era o agente responsável pelas respostas fisiológicas adversas (FAVERO et al., 2011; VALLY et al., 2009).

Entretanto, ainda não existe um único mecanismo de ação do sulfito no organismo e o porquê da prevalência de sensibilidade a sulfitos em crianças. Outro provável mecanismo para a toxicidade de sulfitos envolve a deficiência no metabolismo oxidativo de sulfitos, visto que uma pequena parcela da população possui uma reduzida atividade da enzima sulfito oxidase. Esta enzima é responsável pela oxidação de sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) endógeno e exógeno a sua forma inativa, o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), que é rapidamente excretado na urina. A deficiência da enzima sulfito oxidase pode se manifestar na infância, ocasionando doenças neurológicas severas e progressivas (NIKNAHAD; O'BRIEN, 2008). Porém ainda não está esclarecido se os danos neurológicos são resultado dos altos níveis de sulfito, da ausência de sulfato ou, ainda, da junção de ambos os fatores (MACHADO et al., 2006).

No Brasil, o procedimento de aprovação toxicológica é realizado pelo Ministério da Saúde e fiscalizado pela ANVISA. Segundo a ANVISA, um aditivo só deve ser utilizado por razões tecnológicas, nutricionais ou sensoriais. A necessidade de seu uso deve ser justificada sempre que proporcionar vantagens de ordem tecnológica, quando as mesmas não puderem ser alcançadas por operações de fabricação mais adequadas ou por maiores precauções de ordem sanitária ou operacional. O uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível possível para alcançar o efeito desejado não ultrapassando as concentrações recomendadas pelos valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) estabelecido pelo JECFA. O processo de fabricação de alimentos deve seguir as Boas Práticas de Fabricação (BPF) que são um conjunto de regras, normas e atitudes aplicadas ao manuseio de alimentos, para assegurar condições necessárias para atendimento do que exige a legislação em vigor. Assim, quando um aditivo possuir um valor de IDA "não especificado", seu uso deverá ser em quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário (AUN et al., 2011).

Os limites máximos permitidos de agentes sulfitantes em alimentos segundo a ANVISA, encontram-se expressos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Limite máximo da quantidade de agentes sulfítantes adicionados aos alimentos.

<b>Alimentos</b>	<b>Função do agente</b>	<b>Limite máximo (g/100g ou g/100ml)</b>
Geleia de fruta e geleia de mocotó	Conservador	0,01
Doces de frutas e ou de vegetais	Conservador	0,01
Leite de coco	Conservador	0,03
Frutas secas ou desidratadas	Conservador	0,1
Vegetais descascados e/ou picados, congelados ou não	Antioxidante	0,005
Vegetais secos ou desidratados	Conservador	0,02
Vegetais submetidos ou não a tratamento térmico em conserva	Antioxidante	0,005
Polpas de vegetais e purês de vegetais	Conservador	0,05
Cereais processados	Antioxidante	0,003
Farinhas com adição de aditivos de uso industrial	Melhorador de farinha	0,02
Pães com fermento biológico ou químico	Melhorador de farinha	0,005
Biscoitos e similares com ou sem recheio, com ou sem cobertura	Melhorador de farinha	0,005
Bolos, tortas, doces e massas de confeitaria	Melhorador de farinha	0,005
Açúcares	Conservador	0,002
Xaropes de glicose	Conservador	0,002
Mostarda de mesa	Antioxidante	0,025
Vinagres e fermentados acéticos	Conservador	0,02
Bebidas alcoólicas fermentadas	Antioxidante	0,005
Bebidas alcoólicas por mistura com graduação alcoólica até 17% v/v	Conservador	0,02
Cooler	Conservador	0,025
Sangria	Conservador	0,035
Bebidas gaseificadas e não gaseificadas prontas para o consumo	Conservador	0,004
Suco, néctar, polpa de fruta e água de coco	Antioxidante	0,005
Bebidas não alcoólicas a base de soja	Conservador	0,004
Preparações culinárias industriais	Antioxidante	0,02

(GGALI/ANVISA, 2013)

## **2.2. Métodos para determinação de sulfito**

Os métodos citados na literatura para realizar a análise sulfitos em alimentos se dividem em duas categorias básicas: métodos que necessitam de uma destilação inicial da amostra para liberar o dióxido de enxofre e aqueles que usam uma reação direta para alcançar o mesmo objetivo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Os principais métodos envolvidos são baseados nas seguintes estratégias: combinação com componentes orgânicos (ROBBINS et al., 2015); no equilíbrio entre as várias formas inorgânicas do sulfito (YIN, LI QIAN et al., 2010); volatilização de dióxido de enxofre em meio ácido (TZANAVARAS et al., 2009); e na oxidação de sulfitos (HELI et al., 2012).

Os métodos mais comuns envolvem a destilação de dióxido de enxofre a partir de uma amostra acidificada com um ácido forte concentrado, seguida de titulação colorimétrica ou determinação cromatográfica. O método de Monier-Williams é um dos procedimentos mais utilizados para a determinação de sulfito em alimentos e bebidas e foi adotado como método oficial em vários países. O fato deste método envolver destilação faz com ele seja laborioso, assim, atualmente, muitas modificações do método Monier-Williams têm sido propostas para a sua aplicação em diferentes matrizes e na tentativa de torná-lo mais prático (ISAAC et al., 2006).

### 2.3. Método de Monier-Williams

O método consiste na solubilização ou diluição da amostra (aberta no momento da análise) em solução  $4 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico. A solução contendo a amostra é transferida para um balão de destilação onde é mantida em refluxo por 120 min. É utilizado gás nitrogênio com fluxo lento para manter a pressão positiva e fazer com que o  $\text{SO}_2$  seja transferido quantitativamente para um par de frascos de coleta contendo 43 e 7 mL de peróxido de hidrogênio 3% (v/v), mantidos em banho de gelo. Em seguida, o conteúdo de ambos os frascos é transferido para um erlenmeyer e titula-se com solução padronizada de  $\text{NaOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando vermelho de metila, em 0,2% de etanol, como indicador ácido-base (FAZIO; WARNER, 1985; MARTINS et al., 2011).

O método de referência adotado pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) para a determinação de sulfitos em vinhos é uma modificação do procedimento de Monier-Williams (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Mesmo ocorrendo modernizações no método de Monier-Williams, deixando-o mais adequado às necessidades atuais, este ainda apresenta limitações, pois mantém a etapa da destilação. Esta etapa possui a desvantagem de ser lenta, tornando o método pouco adequado para análises de rotina, bem como, não aplicável em determinações de baixas concentrações de sulfito (ISAAC et al., 2006).

Métodos alternativos incluem determinação enzimática (MOLINERO-ABAD et al., 2014), cromatografia líquida (IAMMARINO et al., 2010), eletroforese capilar (CARVALHO; SCHWEDT, 2005) e técnicas de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica (HASSAN et al., 2006), amperométrica (ALAMO et al., 2010), potenciométrica (HASSAN et al., 2001) e quimiluminescência (LI et al., 2001).

## 2.4. Coulometria

A coulometria é a técnica analítica que se baseia na medida da quantidade de eletricidade necessária para oxidar ou reduzir, em uma célula eletrolítica, a substância de interesse. Esta substância pode reagir diretamente sobre um dos eletrodos ou em solução com um reagente gerado eletroquimicamente. Nesta técnica, é necessário que a reação eletroquímica usada na determinação ocorra com 100% de eficiência de corrente, ou seja, que cada Faraday (96485 C) provoque a transformação química de 1 equivalente grama da espécie envolvida. Este tipo de análise compreende duas técnicas distintas: a coulometria com potencial controlado e a coulometria com corrente constante (titulação coulométrica) (OHLWEILER, 1976; SKOOG et al., 2006).

Em titulações coulométricas o reagente é eletrogerado através da aplicação de corrente elétrica em um eletrodo apropriado, em geral inerte, e esta corrente passa através de um eletrólito onde é gerado o reagente. Quando se tem um controle da corrente e do tempo é possível calcular a quantidade gerada de reagente, através da Lei de Faraday da eletrólise, onde a quantidade de carga (Q) que passa através de uma célula eletrolítica é proporcional a quantidade do reagente produzido no eletrodo (OLIVEIRA, 2005).

A equação matemática desta lei, a corrente constante, encontra-se expressa na equação abaixo:

$$N = Q / nF = it / nF$$

N = nº de mol do reagente produzido;

Q = quantidade de carga que passa pela célula;

n = número de elétrons transferidos por molécula;

i = corrente;

F = constante de Faraday (96485 C/mol e<sup>-</sup>);

t = tempo.

Assim, sabendo-se o tempo de eletrólise ( $t$ ) e conhecendo-se a corrente constante aplicada é possível calcular a quantidade de reagentes gerada. Mantendo-se o volume constante, e rearranjando a equação anterior, temos:

$$t = NnF / i = CVnF / i = kC_a$$

C = concentração de reagente produzido;

V = volume da solução na célula eletrolítica;

K = constante.

A geração eletroquímica do reagente pode ser interna ou externa. Na geração interna existe a necessidade da ausência de qualquer espécie que possa sofrer reações no eletrodo além da amostra. Já na geração externa, o titulante é eletrogerado separadamente em uma célula de dois compartimentos, onde o contra eletrodo é isolado e depois segue em direção ao recipiente contendo amostra (OLIVEIRA et al., 2006; SKOOG et al., 2006)

A análise coulométrica a corrente constante pode ser utilizada na geração eletroquímica de reagentes e possui inúmeras vantagens, como por exemplo, não requerer o preparo de soluções padrão, poder trabalhar com reagentes instáveis, poder gerar quantidades mínimas conhecidas de reagentes, possuindo também a vantagem de ser totalmente automatizável (TAYLOR et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2006).

## 2.5. Biamperometria

A biamperometria baseia-se na medição do fluxo de corrente entre dois eletrodos de trabalho idênticos, polarizados por uma pequena e constante diferença de potencial e imersos em uma solução contendo como indicador um par redox reversível. A corrente que flui entre os eletrodos é função da concentração dos componentes do par redox, sendo limitada pela concentração daquele em menor concentração. Assim, se uma reação redox homogênea com um determinado analito altera a concentração deste componente, alterará por conseguinte a corrente. Portanto, a curva analítica pode ser crescente ou decrescente (NASCIMENTO et al., 2010). Esta é a base dos métodos eletroanalítico biamperométricos.

Os pares redox reversíveis indicadores mais utilizados na determinação biamperométrica são  $\text{Br}_2/\text{Br}^-$ ,  $\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)}$ ,  $\text{Ce(IV)}/\text{Ce(III)}$ ,  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$ ,  $\text{VO}_3^-/\text{VO}^{2+}$  e  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  (MILARDOVIC et al., 2007).

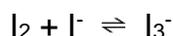
O pioneiro a utilizar eletrodos idênticos foi E. Solomon em 1897, que realizou uma “titulação galvanométrica” de cloreto de potássio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) com uma solução de nitrato de prata, aplicando uma diferença de potencial da ordem de 100 mV entre dois eletrodos de prata, obtendo um ponto final da titulação por uma queda no sinal da corrente. Em 1926, C. W. Foulke e A. T. Bawden propuseram a titulação de iodo com tiosulfato, empregando um par de eletrodos de platina polarizados através da aplicação de potencial entre 10 e 15 mV, chamando esta titulação de “*dead-stop end point technique*”. A biamperometria só se tornou conhecida em 1943 quando G. Wernimont e F. J. Hopkinson utilizaram a técnica na determinação de água na superfície de compostos cristalinos com o reagente de Karl Fischer. Embora essas titulações tenham sido, inicialmente, classificadas como técnicas potenciométricas, na realidade são técnicas amperométricas, por se tratar da medida de corrente em função do volume de titulante e recebendo o nome de biamperometria por utilizar dois eletrodos indicadores idênticos (GIOLITO, 1980).

## 2.6. Iodimetria

O iodo é um agente oxidante fraco muito empregado na determinação de redutores fortes. Métodos baseados na reação parcial do iodo a íon iodeto são denominados iodimetria. A semi-reação que descreve a conversão de iodo a íon iodeto é:



Em presença de excesso de íons iodeto, o iodo se apresenta na forma de íons triiodeto, como ilustrado na equação abaixo:



A formação dos íons triiodeto não afeta significativamente o potencial do sistema iodo-iodeto, como demonstrado na equação abaixo (SKOOG et al., 2006):



O baixo potencial do par  $I_3^-/I^-$  confere ao iodo um grau de seletividade que torna possível a determinação de agentes redutores fortes na presença de redutores fracos (SKOOG et al., 2006).

Na Tabela 3 são apresentadas aplicações que empregam o iodo como agente oxidante.

**Tabela 3.** Aplicações da iodimetria. Adaptado de (SKOOG et al., 2006).

Analito	Semi-reação
As	$H_3AsO_3 + H_2O \rightleftharpoons H_3AsO_4 + 2H^+ + 2e^-$
Sb	$H_3SbO_3 + H_2O \rightleftharpoons H_3SbO_4 + 2H^+ + 2e^-$

---

Sn	$\text{Sn}^{2+} \rightleftharpoons \text{Sn}^{4+} + 2e^{-}$
H <sub>2</sub> S	$\text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{S}_{(s)} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-}$
SO <sub>2</sub>	$\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-}$
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	$2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 2e^{-}$
N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	$\text{N}_2\text{H}_4 \rightleftharpoons \text{N}_2(\text{g}) + 4\text{H}^{+} + 2e^{-}$
Ácido ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 + 2\text{H}^{+} + 2e^{-}$

---

As soluções de iodo possuem duas fontes de erro quando utilizadas em titulações, a primeira é devida a sua volatilidade, e a segunda devido à oxidação de soluções ácidas de iodeto pelo oxigênio do ar (SKOOG et al., 2006). Devido a estas características inerentes às soluções de iodo, sistemas em fluxo envolvendo iodimetria e geração eletroquímica de iodo têm sido apresentados na literatura como vantajosos por serem sistemas fechados (OLIVEIRA et al., 2006).

## 2.7. Análise por injeção em fluxo

Como o número de análises clínicas e industriais cresceu significativamente ao longo dos anos e com ele a necessidade dos sistemas operarem de forma prática e econômica, houve um aumento no interesse por análises rápidas com uso de sistemas automáticos. Neste contexto o desenvolvimento de sistemas analíticos automáticos comerciais, em particular o sistemas de análise por injeção em fluxo, com intervenção mínima do operador, foi um dos mais importantes avanços da química analítica nas últimas décadas (MANSOUR; DANIELSON, 2012).

Um dos primeiros sistemas de análise em fluxo foi proposto por Skeggs (1957) para a determinação de ureia e glicose em sangue. Neste sistema, problemas como tratamento de amostra e frequência analítica baixa foram discutidos e solucionados com o uso de diálise e da análise em fluxo contínuo segmentado, obtendo assim uma frequência analítica de até 40 determinações por hora. Características deste sistema, como fluxo segmentado por ar, tinham o intuito de evitar dispersão da amostra ao longo do percurso analítico, e buscavam atingir o equilíbrio químico antes da detecção.

A partir da metade da década de setenta, Ruzicka e Hansen, propuseram uma alternativa de análise utilizando sistemas em fluxo com dimensões e vazões adequadas, evitando a segmentação por ar e aumentando assim a simplicidade dos sistemas, bem como a frequência analítica, dando origem à análise por injeção em fluxo (FIA) (ZAGGATO et al., 1999).

O sistema de análise por injeção em fluxo consiste na inserção da amostra em um fluido carregador que transporta a mesma para o detector, e durante o transporte a amostra pode receber reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, concentração, etc. (REIS, 1996).

A grande aceitação da análise por injeção em fluxo no desenvolvimento de metodologias analíticas pode ser demonstrada devido ao grande número de publicações.

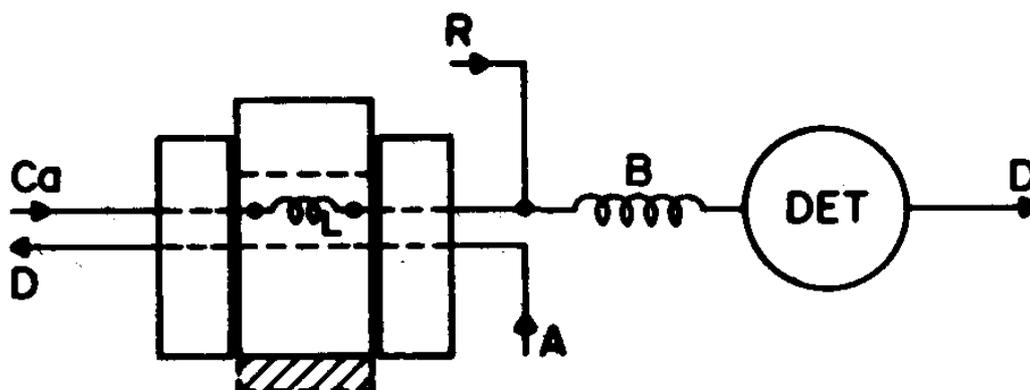
Inicialmente, a inserção da amostra era feita utilizando uma seringa hipodérmica, o que deu origem ao nome do processo, proposto 1975, por J.

Ruzicka e E. H. Hansen, e introduzido no Brasil em 1976, por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo CENA/USP (REIS, et al., 1989). Ao longo dos anos, foram propostos outros dispositivos para inserção da amostra no fluido carregador.

O sistema de análise por injeção em fluxo mais simples é o sistema de linha única. No módulo de análise com esse tipo de configuração, a mistura da solução amostra com a solução de reagente ocorre apenas por dispersão. Essa limitação foi superada com a adição de reagentes por confluência, passando a usar soluções quimicamente inertes, com relação à espécie química de interesse como carregador da amostra (REIS, 1996).

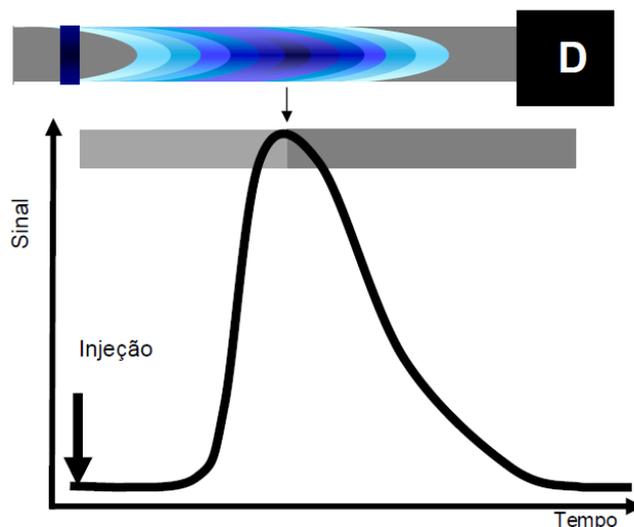
Desde sua origem, a análise por injeção em fluxo tem evoluído com relação à forma de inserção de soluções de reagente e amostra, e também com relação ao controle desses sistemas através de software, minimizando a interferência do operador (CERDÀ et al., 1999).

Na Figura 1 é representado um sistema em fluxo simples utilizando um injetor proporcional para a injeção da amostra no sistema, adição de reagente por confluência e empregando uma solução quimicamente inerte como carregador da amostra. Através da adição do reagente por confluência, é garantido que cada fração da amostra receberá a mesma quantidade de reagente, assim, ocorre uma melhor mistura do reagente com a amostra, havendo a possibilidade de diminuir o percurso analítico da confluência até o detector, com isso aumentando a frequência analítica.



**Figura 1.** Esquema básico de um sistema de análise em fluxo. A = amostra; Ca = fluido carregador; R = reagente; B = bobina de reação; L = alça de amostragem; DET = detector; D = descarte (REIS, 1996).

Devido à existência dos gradientes de concentração e da medida ser realizada com a zona de amostra em movimento, obtém-se um sinal transiente, cuja altura é relacionada à concentração da espécie de interesse (ROCHA et al., 2000). O perfil do sinal transiente obtido é em formato de “pico”, como ilustrado na Figura 2.



**Figura 2.** Ilustração do gradiente de concentração da zona de amostra e perfil do sinal transiente (CÓRDOVA, 2008).

Entre as vantagens dos sistemas FIA, pode-se destacar o baixo custo, a versatilidade, a facilidade operacional, a miniaturização, o baixo consumo de amostras e de reagentes e a alta frequência e reprodutibilidade analítica (ALVES et al., 2005).

Dada a versatilidade dos sistemas de análise em fluxo é possível adequar facilmente estes sistemas aos mais diversos tipos de análises, modificando o mesmo de acordo com o objetivo a ser alcançado, como por exemplo, o uso de diálises como uma ferramenta valiosa para separação *on-line* (STADEN et al., 1997).

As membranas de separação podem ser homogênea (hidrofílica), capazes de separar líquidos ou gases, ou heterogênea (hidrofóbica), similares a filtros tradicionais, com poros interconectados e distribuídos ao acaso. O processo de separação heterogêneo se destaca por apresentar inércia química da membrana, resistência mecânica e tolerância a variações de temperatura. A

difusão gasosa permite que a espécie de interesse permeie através da membrana e seja imediatamente transportada em direção ao detector, além de ser possível utilizar diferentes vazões na solução contendo a amostra e na solução que segue em direção ao detector (MENESES, 2008).

O uso de dialises em sistemas de análise em fluxo foi descrito pela primeira vez por Skeggs em 1957, no seu trabalho envolvendo automação para a determinação de ureia e glicose em sangue, e desde de então diversos trabalhos envolvendo o uso de dialises em sistemas de análise em fluxo vêm sendo utilizados como uma ferramenta de separação (HANSEN; RUZICKA, 1976; MACHERAS et al., 1986; STADEN, 1992; FONTENELE et al., 2007; TIMOFEEVA et al., 2015), evitando que a separação seja realizada manualmente, tornando as análises mais rápidas e com um menor custo (STADEN et al., 1997).

Outra alternativa para aumentar a frequência analítica das análises é através da geração eletroquímica de reagentes *on-line*. Assim, o número de sistemas de análise em fluxo utilizando geração eletroquímica de reagentes por coulometria tem crescido, pois além do aumento na frequência analítica nas determinações existem também outras vantagens associadas a utilização de sistemas em análise em fluxo com geração de reagente através de técnica coulométrica, dentre as vantagens podemos destacar: a geração de reagentes com precisão (dispensando a padronização de reagentes); reagentes instáveis podem ser aplicados pois serão gerados no momento da análise; é facilmente adaptado aos sistemas de análise em fluxo que são operados com quantidades mínimas de reagentes, pois permite a geração de quantidades mínimas e precisas de reagentes e apresentam facilidade para automação (SKOOG et al., 2006).

Sistemas com geração de reagente em fluxo vem sendo investigados, como por exemplo, o sistema de análise em fluxo utilizado na determinação de metabissulfito de sódio e amido através da eletrogeração de iodo (TAYLOR et al., 1994); o sistema fluxo-batelada proposto para a determinação do índice de bromo e número de bromo em matérias primas petroquímicas através da eletrogeração de bromo (PASQUINI et al., 2007), o sistema de análise em fluxo

aplicado na determinação da heparina através da eletrogeração de protamina (LEI et al., 2015); e os íons triiodeto, eletrogerados em uma câmara de geração de regente coulométrica, utilizados como transportador em um sistema de análise em fluxo para a análise de dipirona em medicamentos e como titulante em um sistema de análise em fluxo-batelada para a análise de ácido ascórbico em sucos naturais de laranja, onde a principal característica desta câmara é a produção de íons triiodeto em um compartimento onde se encontra o eletrodo de trabalho, separado do compartimento contendo o eletrodo auxiliar e o contato elétrico é mantido por uma parede porosa (OLIVEIRA et al., 2006).

## 2.8. Determinação de sulfito utilizando análise por injeção em fluxo

Na literatura, muitos métodos baseados em análise por injeção em fluxo para a determinação de sulfitos em alimentos e bebidas têm sido reportados, dentre eles são citados, como exemplo, métodos amperométricos (AMATATONGCHAI et al., 2015b), espectrofotométricos (HASSAN et al., 2006; DECNOP-WEEVER; KRAAK, 1997), condutimétricos (ARAUJO et al., 2005) e luminescentes (NAVARRO et al., 2010). A seguir são discutidos alguns destes métodos.

Um método para a análise de sulfito em sucos de fruta e vinhos foi proposto por Amatongchai e colaboradores (2015), onde é utilizado um sistema em fluxo simples com detecção amperométrica. Neste trabalho foi desenvolvido um sensor para a determinação de sulfito, o sensor foi um eletrodo de carbono vítreo modificado com multicamadas de nanotubos de Carbono - Poli (Cloreto de Dialildimetilamônio) – Compósitos de Nanopartículas de Ouro (CNT - PDDA - AuNPs / GC). Foi realizado um estudo da oxidação eletroquímica do sulfito por este eletrodo utilizando a voltametria cíclica. Os resultados demonstraram que o eletrodo modificado possui atividade eletrocatalítica para a oxidação de sulfito. O sulfito foi quantificado utilizando detecção amperométrica com o novo sensor em conjunto com a injeção em fluxo. A faixa linear de trabalho para a quantificação de sulfito foi de 2 - 200 mg L<sup>-1</sup> com um R<sup>2</sup> = 0,998 e um limite de detecção de 0,03 mg L<sup>-1</sup>. O método obteve uma frequência de amostragem de 23 amostras por hora.

Um método empregando injeção de fluxo para a determinação de sulfito em vinho usando a detecção por de luminescência e a reação entre permanganato e luminol foi desenvolvido por Navarro e colaboradores (2010). No trabalho é descrito um sistema em fluxo simples envolvendo uma reação entre o sulfito presente na matriz e o permanganato-luminol. A quantidade de sulfito foi determinada relacionando a intensidade de emissão quimiluminescente em função da concentração de sulfito, obtendo um coeficiente de correlação linear  $\geq 0,999$ , limite de detecção de  $4,7 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e limite de quantificação de  $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Entretanto, o método exigia um

preparo da solução de amostra através de um método de destilação modificado de Monier–Williams, o que proporciona lentidão do método proposto.

Determinação de sulfito em bebidas utilizando sistema de análise em fluxo e detecção espectrofotométrica foi proposta por Hassan e colaboradores (2006) através da complexação do sulfito com o ácido cobyrinic heptametil éster (diaquacobester, DACbs) formando um complexo estável sulfito cobester ( $SO_3Cbs$ ). Na ausência de sulfito este composto tem absorção máxima nos comprimentos de onda de 349, 409 e 525 nm, com a adição de sulfito surgem dois novos máximos de absorção em 313 e 425 nm e uma diminuição nos máximos em 349 e 525 nm. As variações nas absorbâncias foram linearmente proporcionais as concentrações de sulfito na faixa de trabalho, que variou entre 0,03 e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e apresentou um coeficiente de correlação linear de 0,9994 e limite de detecção de 10  $\text{ng mL}^{-1}$ .

Araújo e colaboradores (2005) propuseram um método para a determinação de sulfito e ácido acético em alimentos empregando um sistema de análise em fluxo com difusão gasosa. A detecção foi realizada baseada no aumento da condutância da água deionizada que passava continuamente na parte superior da câmara de difusão gasosa. Empregando o sistema proposto, os autores obtiveram limite de detecção e de quantificação de 0,03 e 0,10  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente, frequência analítica de 120 determinações por hora, obtendo um coeficiente de correlação linear de 0,9990. Entretanto, como a determinação era realizada através do aumento da condutância da água deionizada, qualquer íon que permeasse a membrana poderia influenciar na condutância da mesma, sendo assim um possível interferente.

Outra metodologia para a determinação de sulfito em vinhos envolvendo difusão gasosa foi proposta por Decnop-Weever e Kraak (1997). Neste trabalho foi proposto um sistema em fluxo com difusão gasosa e detecção espectrofotométrica utilizando o indicador ácido, verde de bromocresol. O sulfito é oxidado utilizando um ácido forte liberando dióxido de enxofre que se difunde através da membrana e se solubiliza na solução indicadora diminuindo o pH da mesma e gerando um pico negativo. Empregando o sistema proposto, obtiveram valores de recuperação na faixa de 100-109% para vinho tinto e 96-

100% para vinho rosé. Problemas com relação a interferentes, como dióxido de carbono, foram observados neste trabalho.

O procedimento proposto no presente trabalho difere dos demais mencionados por utilizar um detector biamperométrico para a determinação de sulfito, além disso, o reagente (íons triodeto) utilizado neste trabalho é eletrogerado, num sistema fechado, em linha por coloumetria, eliminando erros devido à volatilidade ou oxidação do iodo. O sistema proposto também utiliza uma câmara de difusão gasosa, comum a vários outros sistemas apresentados na literatura, minimizando possíveis efeitos de interferentes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Desenvolver um procedimento analítico para a quantificação de sulfito baseado em análise por injeção em fluxo combinado com a geração eletroquímica de reagente e detecção biamperométrica.

#### **3.2. Específicos**

- Verificar o funcionamento da câmara de geração de reagente (CGR) e da câmara de difusão gasosa (CDG);
- Montar sistema de análise por injeção em fluxo para a determinação de sulfito;
- Desenvolver o programa para a aquisição de dados;
- Implementar reação química de interesse;
- Verificar funcionamento do detector biamperométrico;
- Otimizar parâmetros físicos e químicos do sistema proposto;
- Realizar análise de interferentes;
- Realizar teste de adição e recuperação
- E analisar amostras de sucos e vinhos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, com reagentes de alto grau analítico e vidrarias devidamente calibradas.

#### 4.1.1. Soluções estoque

A solução estoque de sulfito  $500 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada a partir do sal de sulfito de sódio (Química Moderna) e armazenada em recipiente de vidro âmbar coberto com papel alumínio.

Solução estoque de ácido clorídrico (Química Moderna)  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada a partir do ácido concentrado.

Solução estoque de iodeto  $2,0 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada a partir do iodeto de potássio (Dinâmica) e armazenada em recipiente de vidro âmbar.

A solução estoque de acetato  $400 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada a partir do sal acetato de sódio (VETEC).

A solução estoque de carbonato  $400 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada a partir do sal carbonato de sódio (VETEC).

A solução estoque de fosfato  $400 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada a partir do sal fosfato de sódio monobásico (VETEC).

A solução estoque de nitrato  $400 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada a partir do sal nitrato de sódio (Dinâmica).

A solução estoque de sulfato  $400 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada a partir do sal sulfato de sódio (VETEC).

#### 4.1.2. Soluções de trabalho

Solução de amido 1% (m/v) (VETEC) foi preparada no momento do uso a partir do amido solúvel a quente.

Soluções de referência de sulfito foram preparadas, diariamente, com concentrações entre 1 e 12 mg L<sup>-1</sup> a partir de diluições da solução estoque para um volume de 100 mL.

A solução do eletrólito de suporte 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi preparada a partir do sal de sulfato de sódio.

As soluções de iodeto de potássio foram preparadas no momento do uso com concentrações entre 0,05 e 0,45 mol L<sup>-1</sup> a partir de diluições da solução estoque para um volume de 250 mL.

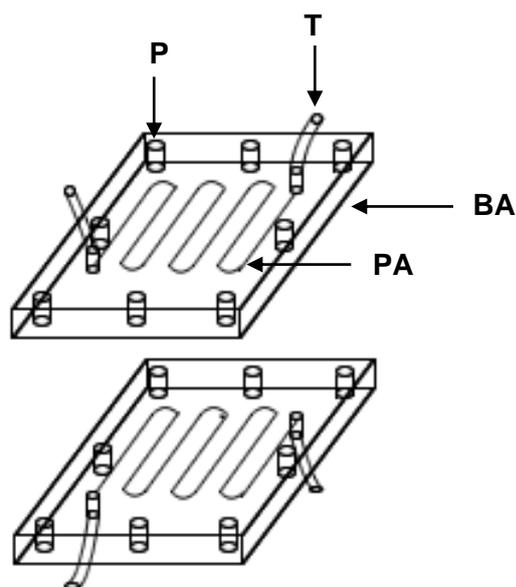
As soluções de ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido nítrico 1,0 mol L<sup>-1</sup> foram a partir de diluições dos ácidos P. A. (Química Moderna).

As soluções acetato, carbonato, fosfato, nitrato e sulfato foram preparadas, diariamente, a partir da diluição das soluções estoque para um volume de 100 mL.

## 4.2. Equipamentos e acessórios

O módulo de análise foi constituído por uma bomba peristáltica, (Ismatec®), com tubos de bombeamento de Tygon®; tubos de polietileno com diâmetro de 0,8 mm foram utilizados para a confecção do percurso analítico; um injetor proporcional foi utilizado para a inserção da solução de amostra no percurso analítico.

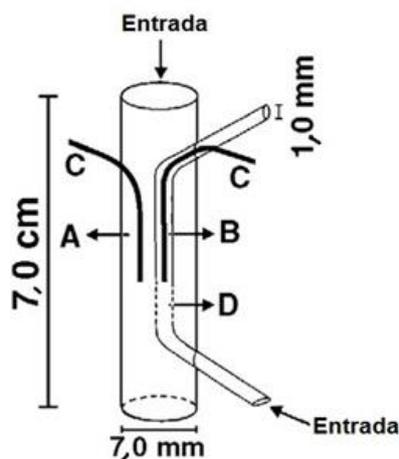
Foi construída uma Câmara de Difusão Gasosa (CDG) (TZANAVARAS et al., 2009) (Figura 3), constituída por dois blocos de acrílico com parafusos fixados em suas extremidades. Uma membrana em Teflon® foi acondicionada entre os blocos, para permitir que apenas a fase gasosa permeasse para a parte superior da câmara.



**Figura 3.** Esquema da Câmara de Difusão Gasosa (CDG). (P) parafusos, (T) tubos de polietileno, (BA) blocos de acrílico, (PA) percurso analítico.

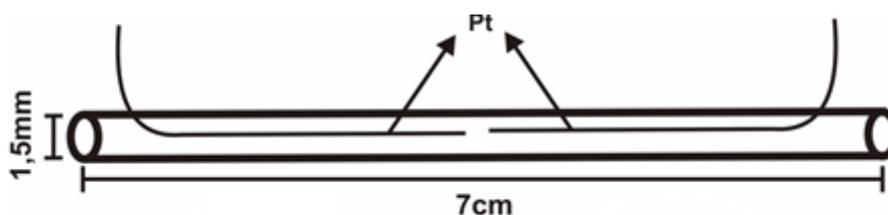
Também foi utilizada uma câmara de geração de reagente (CGR) (Figura 4) (OLIVEIRA et al., 2006) para a geração de triiodeto, a qual foi constituída de um tubo rígido de Polietileno® com diâmetro interno de 7,0 mm por onde passa a solução do eletrólito de suporte ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e outro tubo flexível de Tygon® com diâmetro interno de 1,0 mm por onde passa a solução de iodeto, em cada um desses tubos se encontra inserido um eletrodo de platina,

vários orifícios foram feitos com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, ao longo da parede do tubo flexível de Tygon® para proporcionar o contato eletrolítico entre as soluções dos dois compartimentos. Esta câmara encontra-se conectada a um potenciostato (Micro Química Automação Ltda), modelo MPPG\_P utilizado para a aplicação da corrente constante necessária para a geração de reagente (triiodeto).



**Figura 4.** Esquema da Câmara de Geração de Reagente (CGR). (A) câmara do eletrodo auxiliar, (B) câmara do eletrodo de trabalho, (C) fio de platina e (D) região perfurada (OLIVEIRA et al., 2006).

Para detecção empregou-se um detector biamperométrico, constituído por dois eletrodos de platina inseridos num tubo de Tygon® com diâmetro interno de 1,5 mm e 7 cm de comprimento, ilustrado na Figura 5. O detector biamperométrico era controlado por um sistema eletroquímico (Universal Biological Titrator, modelo OH-412), utilizado para a aplicação de um potencial constante de 100 mV entre os eletrodos de platina e concomitante leitura da corrente biamperométrica.



**Figura 5.** Esquema do detector biamperométrico.

Para a aquisição de dados, foi utilizado um programa desenvolvido em linguagem LabView 8.5.

### 4.3. Método

#### 4.3.1. Avaliação da câmara de geração de reagente (CGR)

Inicialmente, foi certificado avaliado o funcionamento da CGR. Este teste foi realizado variando-se a magnitude da corrente constante aplicada na CGR e monitorando-se a geração de íons triiodeto utilizando amido como indicador. O amido reage com o íon triiodeto, formando um complexo de cor azul intensa (SKOOG et al., 2006). Foram separados cinco balões volumétricos de 50 mL e neles adicionados 2 mL de uma solução de amido 1% (m/v). Em seguida a corrente aplicada na CGR foi variada entre 0,25 e 0,50 mA e o triiodeto gerado em cada magnitude de corrente coletado em balões volumétricos de 10 mL e transferido para os balões contendo amido. Posteriormente os balões foram completados com água deionizada e as soluções analisadas no espectrofotômetro UV-VIS (Agilent modelo 8453) no comprimento de onda de 582 nm.

#### 4.3.2. Avaliação do funcionamento do sistema

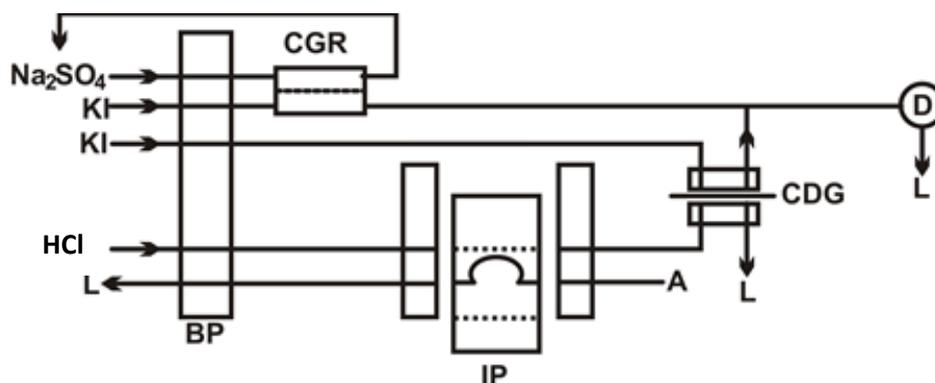
Inicialmente foi realizada a limpeza do detector biamperométrico, para a limpeza foi preparada uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na concentração de  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ . O detector foi conectado ao potenciostato, sendo selecionado o modo de operação Corrente x Potencial onde foram realizadas diversas varreduras cíclicas de potencial entre -2 e 2 V. Assim, caso houvesse algum resíduo depositado nos eletrodos eles seriam oxidados ou reduzidos sendo, portanto, eliminados.

Foram utilizados parâmetros segundo Oliveira e colaboradores (2006) para a geração do reagente. A corrente aplicada na CGR foi de 0,25 mA e concentração de KI de  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ . O ácido escolhido, inicialmente, para a conversão do sulfito a dióxido de enxofre foi o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Avaliaram-se as concentrações de sulfito entre 1 e  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , com

obtenção de uma curva analítica linear para a faixa de concentrações entre 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> de sulfito.

#### 4.3.3. Descrição do sistema proposto

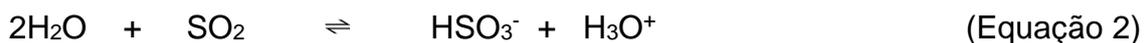
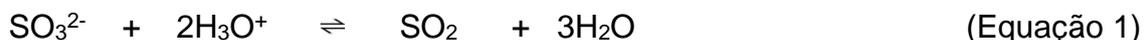
O diagrama de fluxo apresentado na Figura 6 representa o sistema em fluxo empregado na determinação de sulfito.



**Figura 6.** Diagrama de fluxo. A = Amostra; KI 0,25 mol L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>; HCl = ácido clorídrico; CGR = Câmara de Geração de Reagente; D = Detector; L = Descarte; IP = Injetor Proporcional; CDG = Câmara de Difusão Gasosa; BP = Bomba Peristáltica.

Inicialmente, conforme apresentado na Figura 6, a amostra contendo íons SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> é aspirada em direção a alça de amostragem. Quando esta se encontra preenchida, é realizada a injeção da amostra, a qual é transportada pela solução de ácido clorídrico em direção a CDG. Durante o percurso, os íons SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> são convertidos em SO<sub>2</sub> conforme apresentado na reação química (Equação 1). Posteriormente, na forma de gás, o sulfito é difundido através da membrana de Teflon® e passa para a parte superior da CDG, onde é solubilizado em solução de KI, reconvertendo o SO<sub>2</sub> em íons SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (Equação 2) (EBBING; GAMMON, 2012). A solução de referência e/ou amostra segue para a confluência onde encontra o par I<sub>3</sub><sup>-</sup>/I<sup>-</sup> gerado em linha pela CGR. Sem a presença do SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, o par redox I<sub>3</sub><sup>-</sup>/I<sup>-</sup> se mantém em equilíbrio gerando uma corrente constante no detector. Quando a solução de referência e/ou amostra contendo íons SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> entra em contato com a solução contendo o par I<sub>3</sub><sup>-</sup>/I<sup>-</sup>,

ocorre uma reação de oxirredução entre os íons  $\text{SO}_3^{2-}$  e  $\text{I}_3^-$  (Equação 3) ocasionando uma diminuição da corrente gerada pelo par  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$ , causada pelo consumo de  $\text{I}_3^-$ , sendo essa diminuição de sinal proporcional a concentração de íons  $\text{SO}_3^{2-}$  presentes no meio.



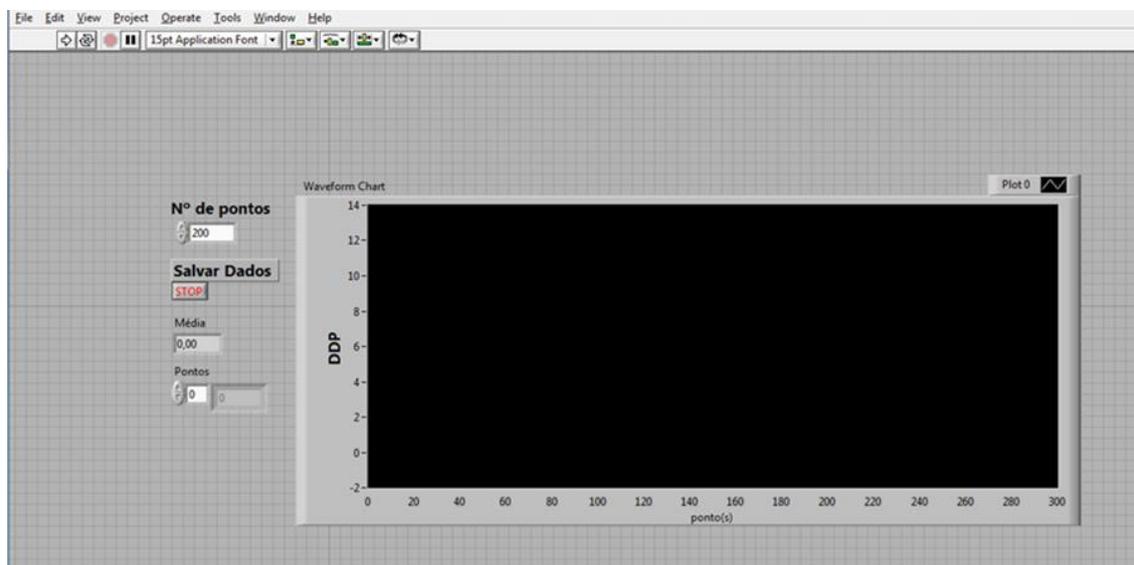
Inicialmente, para estudar os parâmetros do procedimento proposto para a determinação de sulfito, empregaram-se as condições estabelecidas por OLIVEIRA et al. (2006), as quais foram: corrente aplicada na CGR de 0,25 mA, 0,25 mol L<sup>-1</sup> de KI e 1,0 mol L<sup>-1</sup> de HCl. Os parâmetros avaliados foram estudo da natureza do ácido, concentração do ácido, concentração de KI, corrente aplicada na CGR e volume de amostra. Os estudos realizados para a obtenção da melhor resposta analítica em função da sensibilidade do método foram realizados de forma univariada.

A aquisição de dados foi realizada com auxílio de um dispositivo de aquisição de dados multifuncional (NI USB 6009, National Instruments, EUA) com um sinal de saída analógico de medição da tensão gerada, que é analisada no programa desenvolvido no software LabVIEW 8.5. Para a aquisição de dados foram fornecidos parâmetros de entrada, como tempo de integração, ou seja, número de pontos que seriam gerados em função do tempo.

Os sinais analíticos gerados na forma de diagrama, eram salvos na extensão de arquivo .LVM, reconhecidos pelo programa Microsoft Office Excel.

O layout do programa foi construído de maneira simples e objetiva, onde o usuário interage facilmente com o programa selecionando os dados de

entrada através de caixas de texto. Na interface com o usuário é possível selecionar o número de pontos, parar a leitura e salvar dados (Figura 7).



**Figura 7.** Ilustração da interface com o usuário do programa desenvolvido em linguagem LabView 8.5.

#### 4.3.4. Estudo da natureza do ácido

A importância da avaliação da natureza do ácido a ser empregado no processo de geração do dióxido de enxofre é em função de sua eficiência na conversão do  $\text{SO}_3^{2-}$  em  $\text{SO}_2$  gasoso. Para tanto, um estudo foi conduzido empregando os ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico na concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Neste sentido, foram monitoradas as soluções de branco,  $1,0$  e  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfito.

#### 4.3.5. Estudo da concentração do ácido

Após a escolha do ácido a ser utilizado através do estudo anterior, foi realizado o estudo da influência da concentração do ácido na conversão do sulfito em dióxido de enxofre. Deste modo, variou-se a concentração do ácido (HCl) entre  $0,025$  e  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Foi obtida uma resposta analítica em função da

variação do potencial, para as soluções de referência de sulfito entre 1,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> e o branco.

#### 4.3.6. Estudo da concentração de KI

A concentração da solução de KI foi estudada com o intuito de estabelecer uma condição de compromisso para o uso da menor concentração de KI que ao mesmo tempo maximizasse a eficiência da corrente de geração na CGR e a corrente biamperométrica. Para tanto, variou-se a concentração de KI entre 0,05 e 0,45 mol L<sup>-1</sup> e manteve-se constante a concentração de HCl em 1,0 mol L<sup>-1</sup>. A resposta analítica em função da variação do potencial foi monitorada para as soluções de referência de sulfito entre 1,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> e o branco.

#### 4.3.7. Estudo da corrente aplicada na CGR

A magnitude da corrente empregada na CGR define a concentração do I<sub>3</sub><sup>-</sup>. O estudo de corrente foi realizado através de injeções de soluções padrão de sulfito nas concentrações de 1,0, 10,0 mg L<sup>-1</sup> e o branco (0,0 mg L<sup>-1</sup>), obtendo-se sinais transientes de variação do potencial em função corrente aplicada para a geração de I<sub>3</sub><sup>-</sup>, variando-se a corrente aplicada entre 0,05 e 0,45 mA. Neste estudo, manteve-se constante a concentração de KI em 0,25 mol L<sup>-1</sup> e a concentração de HCl em 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.8. Influência do volume de amostra

O estudo do volume de amostra inserido no sistema está diretamente relacionado com a sensibilidade do método proposto. O volume de amostra está relacionado com o tamanho da alça de amostragem. Deste modo, variou-se o comprimento da alça de amostragem entre 10 e 40 cm, que corresponde ao volume de amostra entre 50 e 200 µL. Para tanto, manteve-se constantes a concentração de KI em 0,25 mol L<sup>-1</sup>, a corrente de geração em 0,25 mA e a

concentração de HCl em  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e os sinais transientes para cada tamanho da alça de amostragem foram obtidos utilizando soluções padrão de sulfito com concentrações de  $1, 10 \text{ mg L}^{-1}$  e o branco ( $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), traçando uma curva analítica para cada variação do comprimento da alça de amostragem.

#### 4.3.9. Estudo de interferentes

O estudo de potenciais interferentes foi realizado utilizando soluções padrão de sulfito  $4 \text{ mg L}^{-1}$  contendo de  $4$  a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de acetato, carbonato, fosfato, nitrato e sulfato, separadamente. Foram feitas soluções com concentrações de sulfito e do potencial interferente em concentrações iguais e à medida que não ocorria interferência a concentração do interferente era aumentada até que houvesse algum efeito do mesmo.

#### 4.3.10. Análise das amostras e teste de adição e recuperação

Para a análise das amostras e a realização do teste de adição e recuperação foram utilizadas 5 amostras, sendo 3 amostras de suco de frutas e 2 amostras de vinho, uma tinto e outro branco. O teste foi realizado mediante diluição das amostras em 1:100 (v/v) para as amostras de bebida mista de frutas cítricas, 2:100 (v/v) para as amostras de suco de uva e caju e 4:100 (v/v) para as amostras de vinho. Foram realizadas leituras das amostras diluídas e das amostras diluídas mais a adição de sulfito nas concentrações de  $2$  e  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e para cada análise foi construída uma curva analítica para calcular as concentrações das amostras analisadas com e sem adição de sulfito. Para o cálculo dos valores de recuperação de sulfito empregou-se a seguinte expressão matemática:

$$R\% = \frac{C_{AA}}{C_A + C_{SA}} * 100$$

R% = recuperação em porcentagem;

$C_{AA}$  = concentração da solução de amostra diluída com adição de sulfito;

$C_A$  = concentração da amostra diluída;

$C_{SA}$  = concentração do sulfito adicionado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação do sistema por injeção em fluxo proposto para a determinação de sulfito, foram efetuados estudos preliminares para verificar o desempenho analítico do sistema. Inicialmente foi realizada uma avaliação da câmara de geração de reagente para verificar a geração dos íons triiodeto, em seguida, após a montagem do sistema, foi avaliada a eficiência do sistema proposto na determinação de sulfito, após verificar o funcionamento do sistema foi então iniciada a otimização dos parâmetros químicos e físicos do sistema proposto: estudo da natureza do ácido; estudo da concentração do ácido; estudo da concentração do KI; estudo da corrente aplicada na CGR e influência do volume de amostra. Após a otimização do sistema proposto foi construída uma curva analítica com soluções padrão de sulfito, para em seguida realizar o estudo de interferentes e teste de adição e recuperação.

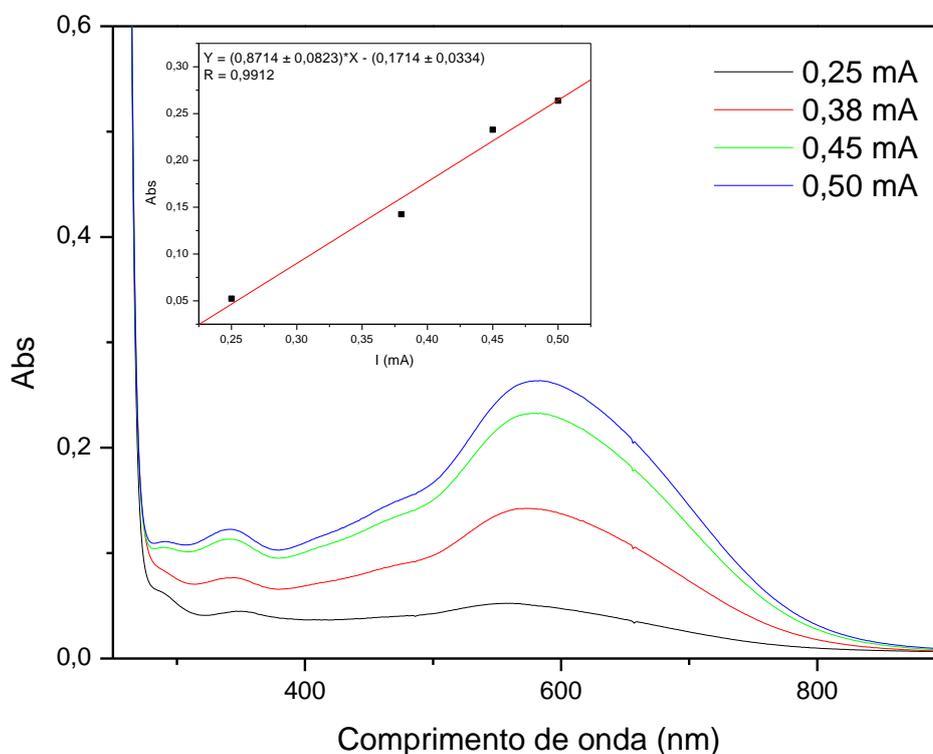
### 5.1. Avaliação da câmara de geração de reagente (CGR)

Para a otimização do sistema em fluxo proposto para a análise de sulfito, inicialmente, foi realizado o procedimento para avaliar a geração dos íons triiodeto da CGR. A análise foi realizada utilizando o amido como indicador, variando a concentração do triiodeto gerado através da variação da corrente aplicada na CGR.

O amido é um indicador bastante utilizado em reações redox envolvendo iodo como agente oxidante ou iodeto como agente redutor, uma vez que o amido forma um complexo azul com o íon triiodeto. Quando se tem um aumento na concentração do agente oxidante (iodo), a razão das concentrações do par  $I_3^-/I^-$  é elevada, conferindo uma coloração azul a solução. Porém, quando se tem uma elevada concentração do agente redutor (iodeto), ocorre uma diminuição na razão das concentrações do par  $I_3^-/I^-$ , assim não ocorre a formação do complexo havendo a ausência da cor azul na solução (SKOOG et al., 2006). Portanto, para observar a formação do complexo azul e evidenciar a geração dos íons triiodeto, variou-se a corrente

aplicada pelo potenciostato na CGR em 0,25; 0,38; 0,45 e 0,50 mA para uma concentração de  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de KI, mesma concentração utilizada na geração de íons triiodeto proposta por Oliveira e colaboradores (2006), e os espectros obtidos são apresentados na Figura 8.

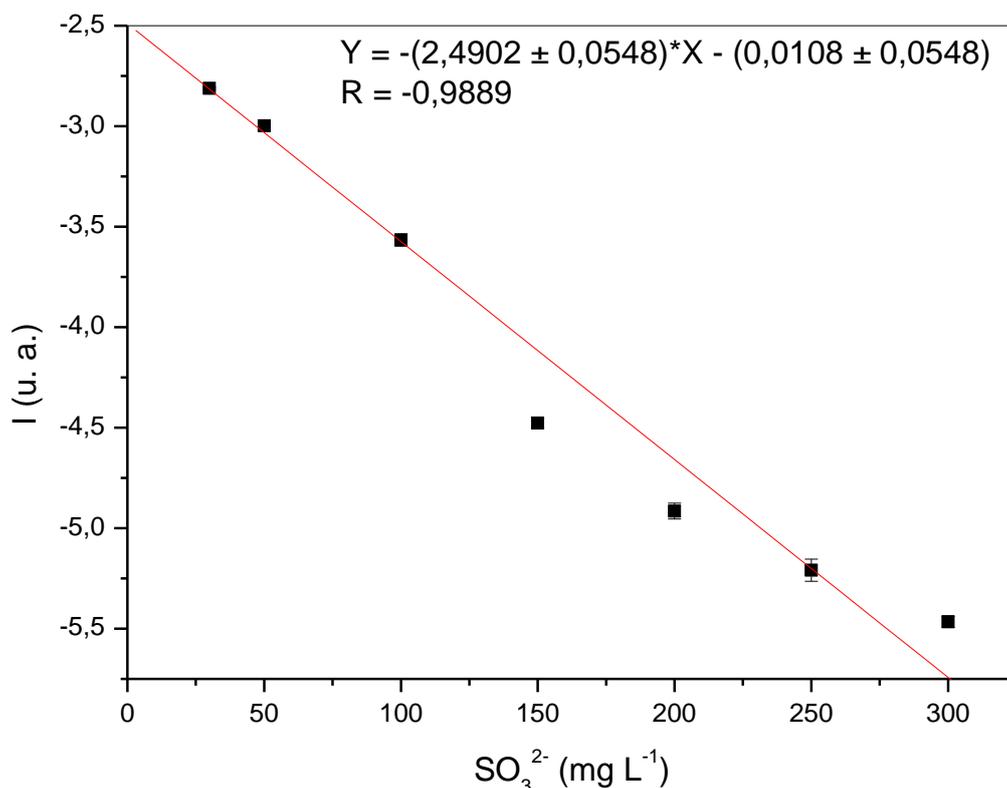
Na Figura 8 pode-se observar que aumentando-se a corrente aplicada de 0,25 a 0,5 mA houve um aumento de absorvância proporcional a quantidade de íons triiodeto gerados. Assim, nota-se uma resposta linear entre a corrente aplicada na CGR e absorvância referente a formação do complexo amido/ $\text{I}_3^-$  demonstrando que a CGR é eficiente na geração do triiodeto, para a formação do par  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$  que será utilizado como reagente na determinação de sulfito.



**Figura 8.** Espectros de absorvância obtidos para a formação do complexo amido-triiodeto. Cada espectro representa uma corrente aplicada expressa em mA como indicado na legenda. Curva obtida a partir dos espectros do complexo amido-triiodeto.  $\text{KI} = 0,25 \text{ mol L}^{-1}$ .

## 5.2. Avaliação do funcionamento do sistema

Após a verificação do funcionamento da CGR, foi realizada a avaliação do sistema com os parâmetros de geração do reagente definidos de acordo com Oliveira e colaboradores (2006), utilizando volume de solução de amostra de 250  $\mu\text{L}$ , que corresponde a uma alça de amostragem de 50 cm. Assim sendo, foi construída uma curva analítica com concentrações de sulfito variando entre 30 e 300  $\text{mg L}^{-1}$ , como ilustrado na Figura 9. Nota-se na Figura 9 a tendência a uma resposta linear na faixa estudada, porém em concentrações acima de 100  $\text{mg L}^{-1}$  observa-se uma perda de linearidade e a tendência da resposta de permanecer constante.

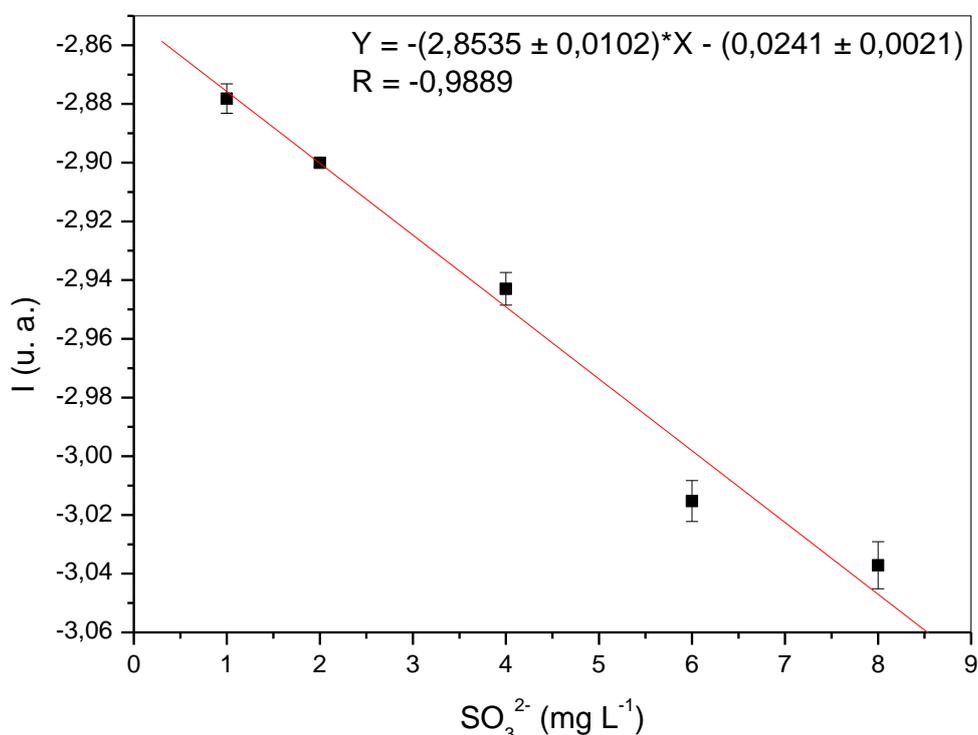


**Figura 9.** Curva analítica. Condições de estudo: Soluções de referência contendo, 30  $\text{mg L}^{-1}$ , 50  $\text{mg L}^{-1}$ , 100  $\text{mg L}^{-1}$ , 150  $\text{mg L}^{-1}$ , 200  $\text{mg L}^{-1}$ , 250  $\text{mg L}^{-1}$  e 300  $\text{mg L}^{-1}$ , 0,25  $\text{mol L}^{-1}$  de KI, 1,0  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e corrente de geração de triiodeto de 0,25 mA.

Verificou-se o funcionamento do sistema proposto e a possibilidade de sua aplicação para a determinação de sulfito em amostras de alimentos e

bebidas. Entretanto, notou-se que as concentrações da faixa de trabalho foram altas em função da baixa taxa de difusão do  $\text{SO}_2$  gerado para a parte superior da câmara de difusão. Neste sentido, foi realizado um estudo da vazão a ser empregada na solução carregadora da amostra, ácido, e foi observado que com uma vazão de  $2 \text{ ml min}^{-1}$  era possível a obtenção de sinais analíticos com concentrações de até  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo possível a construção de uma curva analítica com concentrações entre  $1$  e  $8 \text{ mg L}^{-1}$ , como pode ser observado na Figura 10. O ganho significativo na magnitude do sinal analítico (Figura 10) quando comparado ao estudo apresentado na Figura 9 e a linearidade apresentada na faixa de concentração entre  $1,0$  e  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$  demonstra a eficiência do sistema de difusão gasosa e melhora a sensibilidade do sistema proposto.

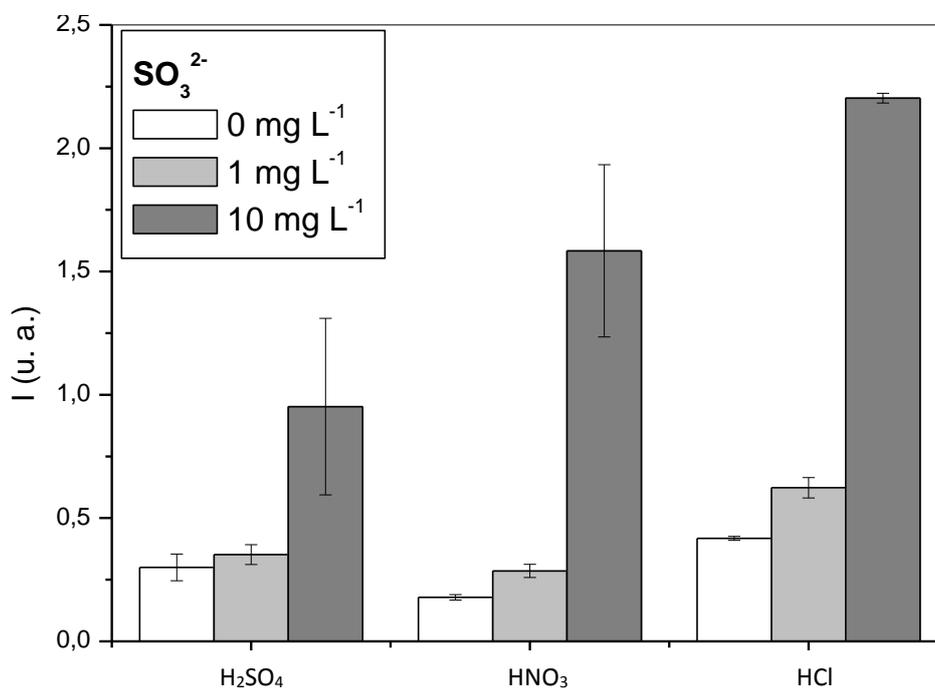
Assim sendo, após os ajustes preliminares do sistema foram realizados os estudos de otimização do procedimento proposto de acordo com o apresentado nas seções 4.3.5 - 4.3.9.



**Figura 10.** Curva analítica. Condições de estudo: Soluções de referência contendo,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $6 \text{ mg L}^{-1}$  e  $8 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{KI}$ ,  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e corrente de geração de íons triodeto de  $0,25 \text{ mA}$ .

### 5.3. Estudo da natureza do ácido

Com o intuito de avaliar a natureza do ácido utilizado para a geração do gás  $\text{SO}_2$ , foram testados os ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico na concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Para o estudo empregaram-se concentrações de sulfito de  $1$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e o branco e monitorou-se a variação do potencial em função da concentração. Na Figura 11 são apresentadas as respostas para os ácidos em função da concentração do  $\text{SO}_3^{2-}$ .



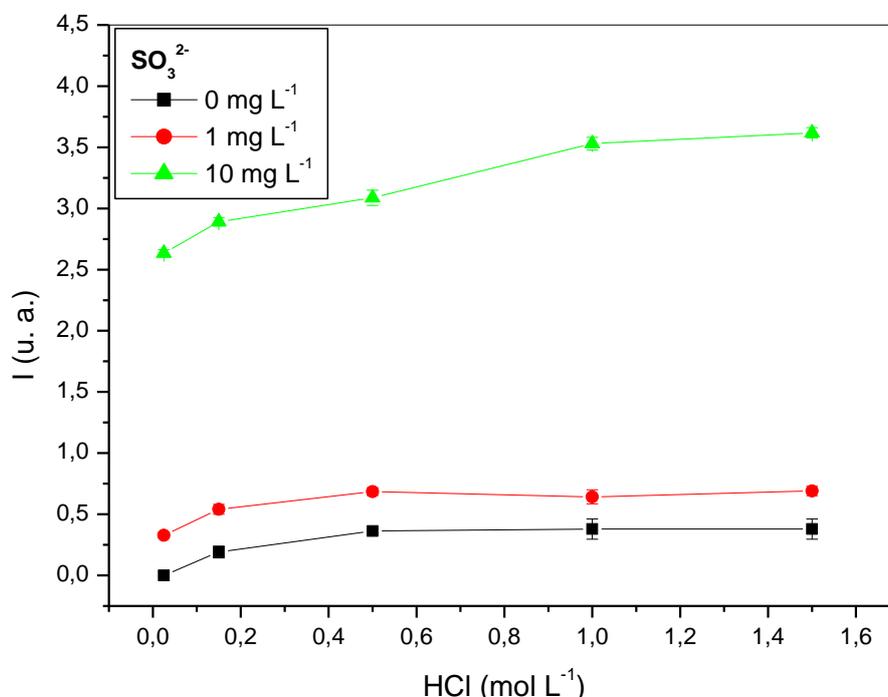
**Figura 11.** Gráfico de barras do sinal analítico em função da natureza do ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$ ) para o branco, e para as soluções de  $1$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Na Figura 11 observa-se que a melhor resposta para a geração do  $\text{SO}_2$  gasoso foi obtida empregando o  $\text{HCl}$ , quando comparado com o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e o  $\text{HNO}_3$ . A variação foi maior tanto para a concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , quanto para  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfito. Nota-se também, que na concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando os ácidos sulfúrico e nítrico houve um maior desvio padrão das respostas analíticas em comparação com o  $\text{HCl}$ . Este fato é devido à instabilidade do sinal analítico e da linha de base (maior ruído), conforme foi observado nos sinais transientes. Deste modo, selecionou-se o  $\text{HCl}$ , pois este

converte uma maior quantidade de sulfito a dióxido de enxofre, assim, uma maior quantidade de sulfito na forma de  $\text{SO}_2$  difundia através da membrana e, conseqüentemente, obtêm-se maior magnitude do sinal analítico, portanto maior sensibilidade. Embora estudos preliminares tenham sido realizados empregando ácido sulfúrico para converter o sulfito em dióxido de enxofre, não foi possível reduzir a faixa linear para concentrações menores de sulfito do que a já encontrada que era de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 5.4. Estudo da concentração do HCl

Após estabelecer a natureza do ácido a ser empregado, foi realizado um estudo da concentração de HCl necessária para converter uma maior quantidade de sulfito a dióxido de enxofre sem comprometer o sistema. O estudo foi realizado variando-se a concentração de HCl entre  $0,025$  e  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ . As respostas analíticas obtidas variando-se a concentração do HCl em função da variação da diferença do potencial para as concentrações de sulfito de  $1$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e a solução do branco são apresentadas na Figura 12.

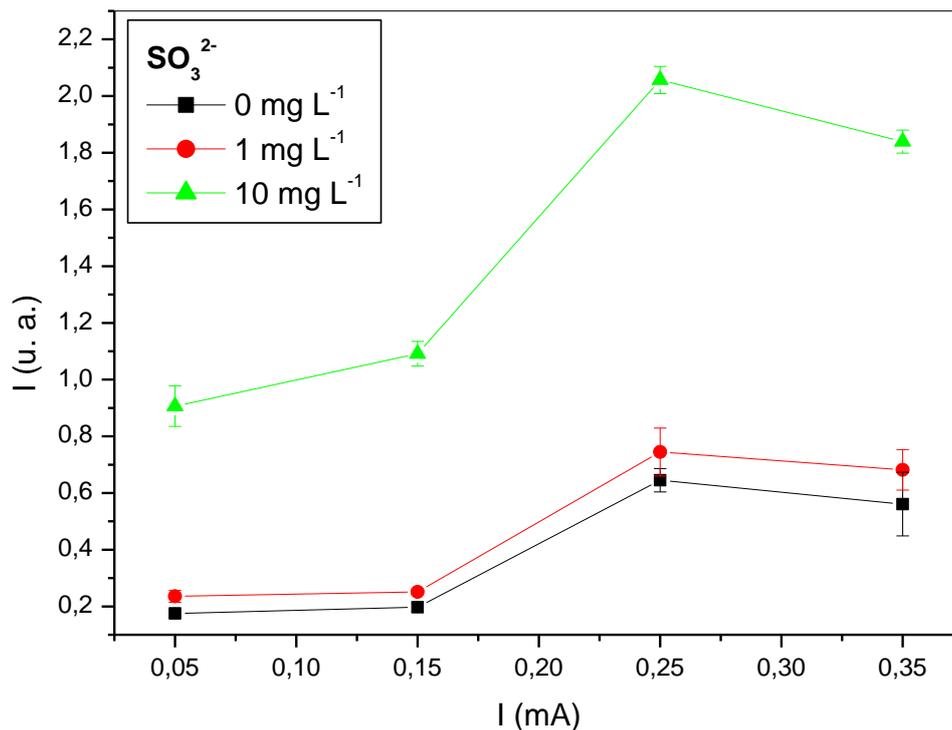


**Figura 12.** Intensidade do sinal analítico em função da concentração de HCl ( $0,025$ ;  $0,15$ ;  $0,5$ ;  $1,0$  e  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) para o branco, e para as soluções de  $1$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Na Figura 12 pode-se observar que as respostas analíticas para a solução do branco e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  se estabilizam na concentração de HCl de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Entretanto, para a resposta analítica empregando  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , nota-se a estabilidade na magnitude do sinal analítico nas concentrações de  $1,0$  e  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl. Notou-se no andamento do experimento que para a concentração de  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  havia um maior comprometimento (deterioração) da membrana da câmara de difusão gasosa, diminuindo o tempo de uso da mesma. Assim sendo, selecionou-se a concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl para os posteriores estudos de otimização do método proposto para a determinação de sulfito.

### 5.5. Estudo da concentração de KI

Após a otimização das variáveis referentes a CDG, iniciou-se a otimização referente ao processo de geração do reagente, o par  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$ . O KI é o reagente que possui relação direta com a razão do par  $\text{I}_3^-/\text{I}^-$ , portanto a variação da concentração do mesmo influenciará diretamente na corrente da linha de base. Assim, é importante avaliar a concentração de KI. O estudo da concentração de KI foi realizado variando-se a concentração entre  $0,05$  e  $0,45 \text{ mol L}^{-1}$  e manteve-se fixa a concentração de HCl em  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e o volume da solução de amostra em  $250 \mu\text{L}$ . As respostas analíticas variando-se a concentração de KI em função da variação da diferença potencial para as concentrações de sulfito de  $1,0$  e  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  e a solução do branco são ilustradas na Figura 13.



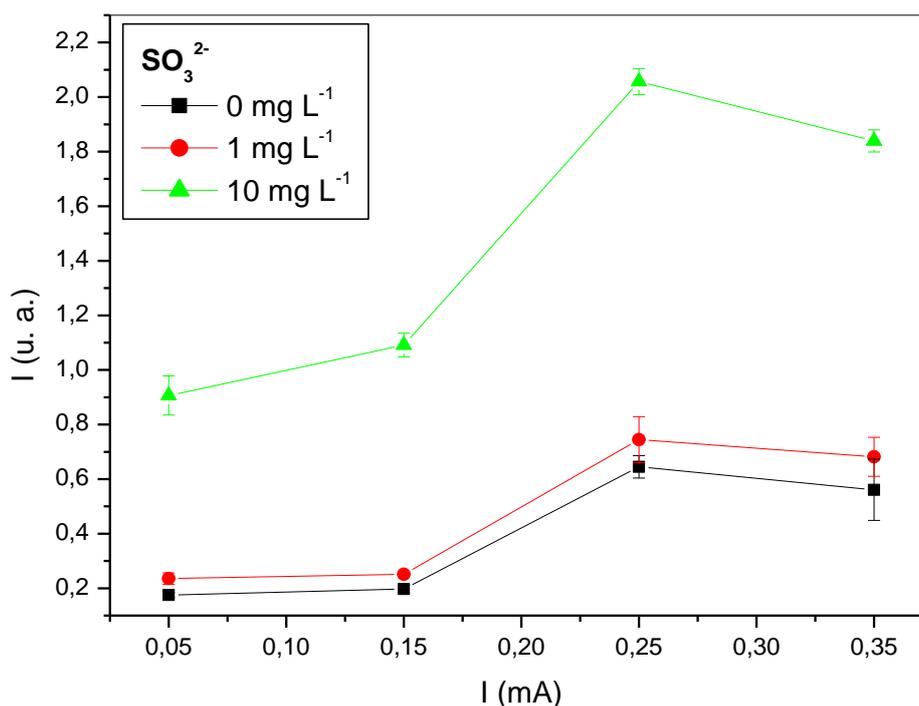
**Figura 13.** Intensidade do sinal analítico em função da concentração de KI (0,15; 0,25; 0,35 e 0,45 mol L<sup>-1</sup>) para o branco e para as soluções de 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

Na Figura 13 pode-se observar que a magnitude do sinal analítico referente a solução de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> aumenta quando aumenta-se a concentração do KI de 0,15 para 0,25 mol L<sup>-1</sup> e, posteriormente, observa-se a diminuição da magnitude do sinal analítico para a concentração de 0,35 mol L<sup>-1</sup> de KI. Para a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> nota-se uma tendência do sinal analítico aumentar, entretanto, observa-se que não há diferença significativa entre as respostas de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e da solução do branco. No estudo, também, foi observado que aumentando-se a concentração de KI, aumentava o ruído da linha de base, o que influenciava na resposta do sinal analítico referente a solução do branco. Portanto, quanto maior a concentração de KI, maior o limite de detecção (LD) do procedimento proposto, pois segundo a equação  $LD = 3 \cdot S_{d\text{branco}} / a$  (coeficiente angular da curva analítica), o  $S_{d\text{branco}}$  é diretamente proporcional ao LD do método. Também, observou-se que para concentrações menores que 0,15 mol L<sup>-1</sup> de KI, a resistência elétrica da solução de KI aumentava e o potenciostato, utilizado na aplicação de corrente constante para a geração de íons triiodeto, atingia valores de potencial maiores

do que os valores da faixa de trabalho do equipamento, não podendo garantir que a corrente aplicada fosse constante. Assim sendo, fixou-se a concentração de KI em  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , corroborando com os estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2006).

## 5.6. Estudo da corrente aplicada na CGR

Posteriormente ao estudo da concentração de KI, realizou-se o estudo da corrente aplicada na câmara de geração de reagente para a geração de íons triiodeto. Para tanto, variou-se a corrente aplicada entre 0,05 e 0,4 mA. A resposta analítica obtida da variação da corrente elétrica ( $I$  (u. a.)) em função da corrente aplicada na CGR ( $I$  (mA)) para as concentrações de 1 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfito e a solução do branco são apresentadas na Figura 14.



**Figura 14.** Intensidade do sinal analítico em função da corrente aplicada na CGR (0,05; 0,15; 0,25 e 0,35 mA) para o branco e para as soluções de 1 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Na figura 14, pode-se observar que aumentando a corrente de 0,15 para 0,25 mA aumenta a magnitude do sinal analítico de todas as soluções

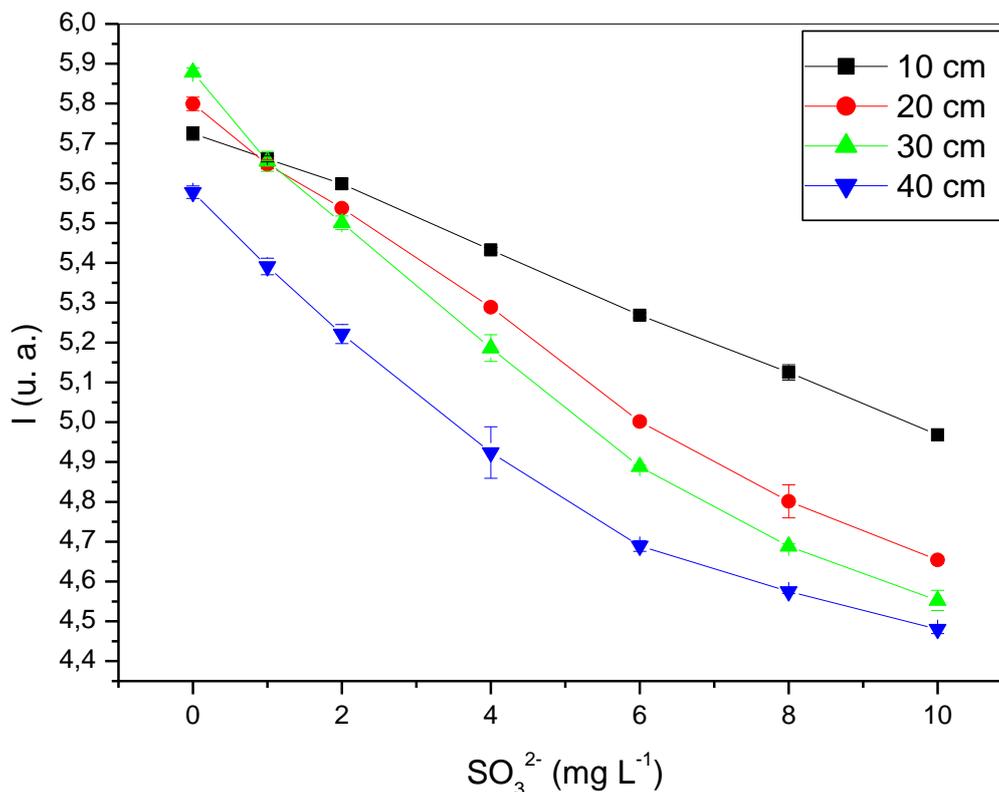
analisadas. Contudo, nota-se um aumento significativo para a solução de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

O aumento do sinal analítico foi acompanhado do aumento da corrente referente à linha de base, indicando que aumentando-se a corrente mais íons triiodeto são gerados o que aumenta a concentração do par I<sub>3</sub><sup>-</sup>/I<sup>-</sup>, uma vez que a corrente depende da presença de ambas as espécies. Portanto, pode-se afirmar que aumentando a corrente aplicada na CGR, aumenta a concentração do I<sub>3</sub><sup>-</sup> em solução. Entretanto, nota-se que para o estudo empregando a corrente de 0,35 mA houve uma diminuição significativa da resposta analítica para a solução de referência de 10,0 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Isso se explica pois, quando se trabalha com valores de corrente elevados, grande parte dos íons iodeto presentes na solução são oxidados e na ausência destes íons seria iniciado o processo de oxidação do solvente, o que ocasionaria a formação de bolhas no sistema devido a formação de O<sub>2</sub> proveniente da oxidação da água. Outro fator, é a compliância de potencial do equipamento, pois de acordo com a equação  $V = R \cdot I$ , quanto maior a corrente aplicada, menor será a quantidade de íons iodeto em solução, sendo assim a resistência (R) da solução aumenta e para garantir que a corrente aplicada seja mantida constante o potencial (V) do equipamento precisa aumentar junto com a resistência da solução e quando isto ocorre o equipamento trabalha fora de sua compliância de potencial, ou seja, em uma faixa de potencial maior do que a faixa de trabalho do equipamento, não garantindo que a corrente aplicada seja constante. Assim sendo, selecionou-se a corrente de 0,25 mA para os demais estudos de otimização do método proposto.

### 5.7. Influência do volume de amostra

Após estabelecer os parâmetros químicos e físicos da CDG e da CGR otimizados, realizou-se o estudo do volume de solução de amostra, que corresponde ao comprimento da alça de amostragem. Para tanto, fixaram-se todos os parâmetros anteriormente selecionados e foram construídas curvas analítica para a variação do comprimento da alça de amostragem entre 10 e 40

cm, que corresponde a variação do volume de solução de amostra entre 50 e 200  $\mu\text{L}$ . As respostas analíticas variando-se o comprimento da alça de amostragem versus o potencial para as concentrações de sulfito entre 0 e 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  são mostradas na Figura 15 e suas respectivas equações lineares apresentadas na Tabela 4.



**Figura 15.** Curvas analíticas em função do comprimento da alça de amostragem (de 10 a 40 cm) para soluções de referência de 0 a 10  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

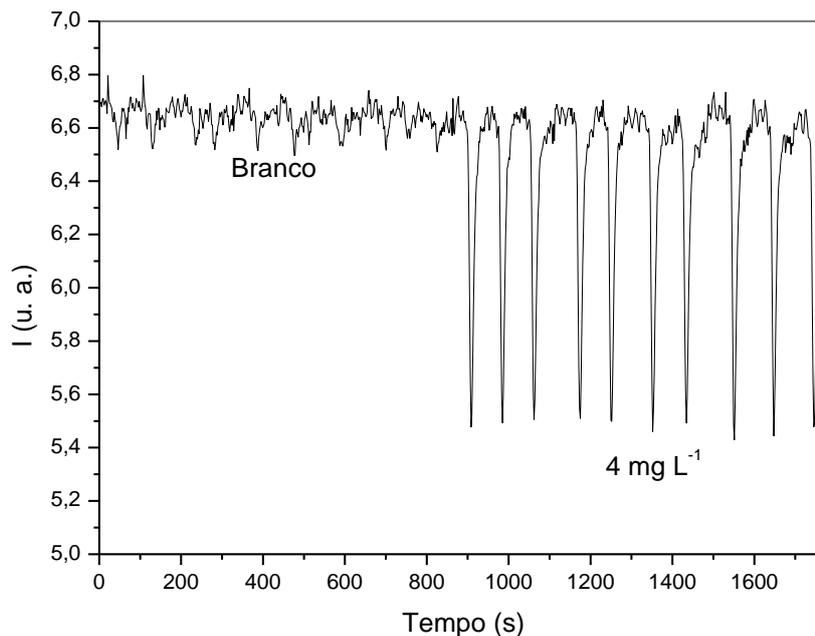
**Tabela 4.** Equações da reta e coeficientes de correlação (R) obtidos de acordo com o comprimento da alça de amostragem.

Comprimento da alça de amostragem (cm)	Equação da reta	R
10	$Y = -0,0776X + 5,7392$	-0,9995
20	$Y = -0,1156X + 5,7609$	-0,9952
30	$Y = -0,1446X + 5,7918$	-0,9868
40	$Y = -0,1107X + 5,4766$	-0,9785

Na Figura 15, pode-se observar que quanto maior o tamanho da alça de amostragem, menor era a linearidade da curva analítica, obtendo-se valores de coeficiente de correlação linear (R) cada vez menores (Tabela 4). Para a alça de amostragem de 40 cm, nota-se uma tendência a estabilidade do sinal analítico nas concentrações de 8 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Assim sendo, fixou-se o comprimento da alça de amostragem em 20 cm, que corresponde a 100 µL de solução de referência e/ou amostra, uma vez que neste comprimento foi obtido um bom coeficiente de correlação (R) com uma melhor sensibilidade.

### **5.8. Avaliação da estabilidade do sistema proposto**

A estabilidade do sistema foi verificada através do estudo de repetibilidade de sinais, onde foram realizadas 20 leituras, 10 vezes para o branco e 10 vezes para as soluções de sulfito de 4 mg L<sup>-1</sup>. Na Figura 16 nota-se que não há instabilidade da linha de base, e pode-se observar a repetição dos sinais analíticos indicando precisão do sistema, onde o valor de desvio padrão relativo foi estimado em 0,40% (n = 10), demonstrando assim a estabilidade do sistema proposto para a análise de sulfito. Também, foi estimada frequência analítica foi de 40 determinações por hora.

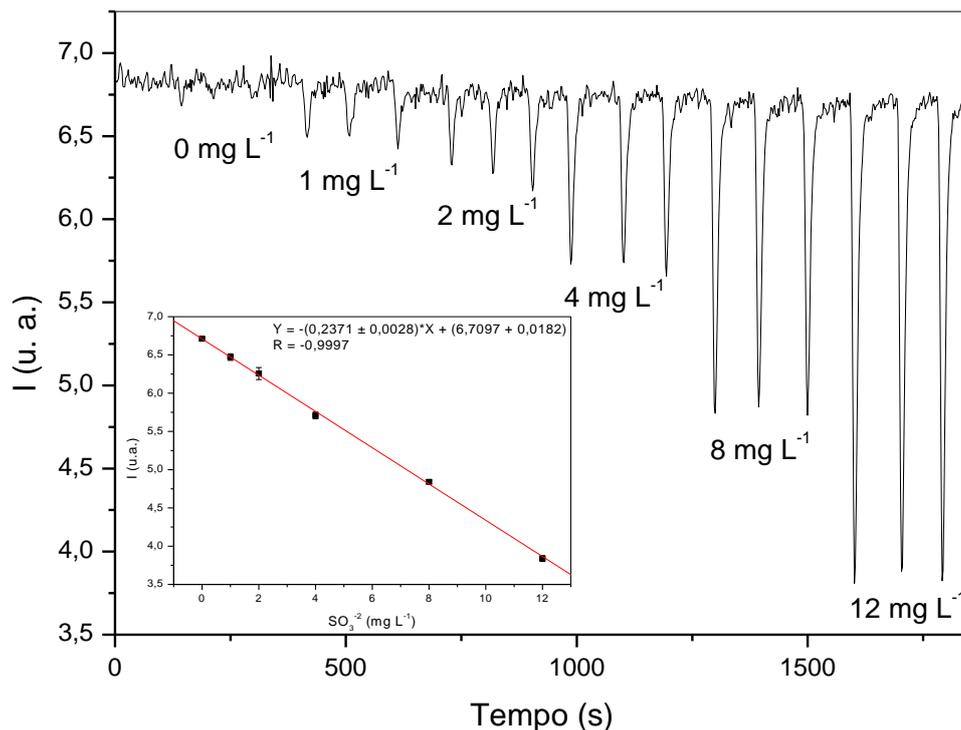


**Figura 16.** Avaliação da estabilidade da linha de base.

### 5.9. Sinais transientes e curva analítica

Na Figura 17 são apresentados os sinais transientes obtidos para as soluções de referência variando-se entre 1 e 12 mg L<sup>-1</sup>. É possível observar também que a resposta analítica para as soluções de referência estudadas apresentou repetibilidade entre 3 leituras demonstrando que o sistema proposto apresenta-se estável e com boa precisão apresentando um desvio padrão relativo, como mostrado anteriormente, de 0,40%.

Uma vez realizada a otimização dos parâmetros químicos e físicos do sistema proposto para a análise de sulfito, foi construída uma curva analítica (Figura 17 em destaque) com soluções de referência de sulfito. Obteve-se uma resposta linear entre 1 e 12 mg L<sup>-1</sup>. Estimou-se a equação linear empregando-se o método dos mínimos quadrados como sendo  $E = - (0,2371 \pm 0,0028) C + (6,7097 \pm 0,0182)$  ( $R = -0,9997$ ,  $n = 10$ ), com um limite de detecção de 0,26 mg L<sup>-1</sup> e limite de quantificação de 0,86 mg L<sup>-1</sup>. Onde E representa o sinal analítico e C a concentração do sulfito em mg L<sup>-1</sup>. Diante do exposto, pode-se dizer que o sistema em fluxo proposto para a análise de sulfito apresenta viabilidade para aplicações analíticas.



**Figura 17.** Sinais transientes referentes à determinação de sulfito. Soluções de referência contendo, 0 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 e 12 mg L<sup>-1</sup>. Curva analítica para o sulfito. Concentração de KI 0,25 mol L<sup>-1</sup>, HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> e corrente de geração de íons triiodeto de 0,25 mA.

### 5.10. Estudo de interferentes

Para avaliar a seletividade do método proposto foram investigados o efeito de possíveis interferentes que podem afetar a análise em amostras reais (AMATATONGCHAI et al., 2015; ARAUJO et al., 2005). O efeito destas substâncias no sinal analítico utilizando soluções de referência de sulfito de 4 mg L<sup>-1</sup> de sulfito contendo diferentes concentrações das espécies potencialmente interferentes, acetato, carbonato, fosfato, nitrato e sulfato. O limite de tolerância das substâncias interferentes foi definido a partir da quantidade das espécies químicas as quais os sinais obtidos usando a solução padrão de sulfito com a substância interferente ocasionasse uma variação de  $\pm 5\%$  em comparação ao sinal do padrão de 4 mg L<sup>-1</sup> de sulfito.

Analisando os resultados obtidos, mostrados na Tabela 5, pode-se observar que as espécies com maior potencial interferente são carbonato e

sulfato, pois estas substâncias apresentaram um limite de concentração menor que os demais interferentes.

Em amostras de sucos, os carbonatos podem existir em uma concentração máxima de 250 mg L<sup>-1</sup> e a adição de sulfatos não é mencionada (GGALI/ANVISA, 2013) sendo apenas proveniente da degradação do sulfito. Considerando que as amostras de sucos foram diluídas 1:100 e 2:100 (v/v), a concentração de carbonato se manteve em um máximo de 2,5 e 5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, e sendo o limite de tolerância muito maior que a concentração permitida após a diluição, possíveis efeitos de carbonato na análise não seriam esperados.

Nas amostras de vinhos é permitido o uso de carbonatos para melhorar os constituintes naturais do vinho, porém não é mencionado o teor de carbonato que pode ser adicionado. Como este valor não é especificado deve-se usar quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário sem que haja alteração de suas propriedades organolépticas normais. A adição de sulfatos é permitida em concentração máxima de 1,0 g L<sup>-1</sup> (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 1988). Considerando que as amostras de vinho foram diluídas 4:100 (v/v), a concentração de sulfatos se manteve em um máximo de 40 mg L<sup>-1</sup>. Como o máximo de sulfato esperado é igual ao limite de tolerância também não se espera efeito deste interferente nas análises de vinhos.

**Tabela 5.** Avaliação de possíveis interferentes estudados.

Sustância	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Varição do sinal (%)
H <sub>3</sub> CCOO <sup>-</sup>	500	-3,60
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	25	-0,08
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	90	-4,89
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	250	+1,36
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	40	-2,06

Solução padrão de 4 mg L<sup>-1</sup> de sulfito.

### 5.11. Figuras de mérito do procedimento proposto

O sistema em fluxo proposto apresentou uma resposta linear na faixa de 1,0 a 12,0 mg L<sup>-1</sup>, obtendo-se a equação  $I = - (0,2371 \pm 0,0028) C + (6,7097 \pm 0,0182)$ ,  $R = -0,9997$ , sendo I o valor da corrente em unidades arbitrárias (u. a.) e C o valor da concentração de sulfito em mg L<sup>-1</sup>. Foram obtidos limites de detecção e quantificação de 0,26 e 0,86 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, com um desvio padrão relativo de 0,4% e com uma frequência analítica estimada em 40 determinações por hora.

Na Tabela 6 são apresentadas, em resumo, as características do sistema em fluxo proposto comparadas com características de outros métodos encontrados na literatura. Entre as características do sistema proposto pode-se destacar a alta precisão, a frequência analítica alta e o baixo consumo de solução de amostra sem a necessidade de tratamento prévio. O método proposto também demonstrou uma robustez e simplicidade em comparação com o método oficial uma vez que este é realizado em batelada e necessita de uma destilação prévia (MARTINS et al., 2011).

**Tabela 6.** Comparação das características analíticas do método proposto com outros métodos descritos na literatura.

<b>Figuras de mérito</b>	<b>(YIN, L Q et al., 2010)</b>	<b>(FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 1997)</b>	<b>(AMATATONGCHAI et al., 2015a)</b>	<b>(CARBALLO et al., 2003)</b>	<b>Trabalho proposto</b>
Faixa linear (mg L <sup>-1</sup> )	0,008 – 1,601	3,2 - 48	2 – 200	0,9 – 16,9	1 - 12
Coeficiente Linear (R)	0,9999	0,9991	0,9989	0,9984	0,9997
Limite de detecção (mg L <sup>-1</sup> )	0,0005	0,18	0,03	0,15	0,26
RSD (%)	1,65 (n = 7)	0,6 (n = 4)	1,6 (n = 10)	6,9 (n = 3)	0,4 (n = 10)
Consumo de amostra (mL) <sup>a</sup>	2,31	0,5	0,02	0,02	0,1
Consumo de reagente (g) <sup>a</sup>	0,03	0,93	0,81	0,005	0,11
Geração de efluente (mL) <sup>a</sup>	7,92	2,83	2,62	-	5,36
Frequência analítica (h <sup>-1</sup> )	20	26	23	23	40

<sup>a</sup> Por determinação

### 5.12. Análise das amostras e teste de adição e recuperação

Entre os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método pode-se destacar o método de adição e recuperação (RIBANI et al., 2004).

O teste de adição e recuperação foi realizado para três tipos de amostras de suco (sucos de caju, uva e laranja) e para dois tipos de amostras de vinho (vinhos tinto e branco suaves). Antes da análise, as amostras foram filtradas e diluídas considerando o valor máximo de sulfito permitido para estas amostras. Para o suco de uva e bebida mista de frutas cítricas o teor máximo  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfito, suco de caju é de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  e vinhos é de  $350 \text{ mg L}^{-1}$  (FAVERO et al., 2011). As diluições foram realizadas para que o teor de sulfito estivesse dentro da faixa de trabalho do sistema.

Os resultados para a análise de sucos e vinhos e para o teste de adição de recuperação estão expressos na Tabela 7. Os valores de recuperação entre 91,63 e 110,34%, demonstrando que não houve efeito de matriz na determinação de sulfito nas amostras analisadas. A adição foi realizada em dois níveis de concentração: 2 e  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{SO}_3^{2-}$ .

**Tabela 7.** Resultados obtidos para a análise de sucos e vinhos e o teste de adição e recuperação.

<b>Amostra</b>	<b>Método proposto</b>	<b>Valor adicionado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Valor encontrado (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Suco de caju	0,09 ± 0,03	2,0	1,92 ± 0,03	91,6
		5,0	5,34 ± 0,15	104,8
Suco de uva	0,62 ± 0,03	2,0	2,63 ± 0,07	100,1
		5,0	5,62 ± 0,06	99,9
Bebida mista de frutas cítricas	0,12 ± 0,05	2,0	2,18 ± 0,20	102,7
		5,0	5,12 ± 0,10	100,0
Vinho tinto suave	1,24 ± 0,09	2,0	2,97 ± 0,16	91,7
		5,0	5,89 ± 0,16	94,4
Vinho branco suave	3,12 ± 0,09	2,0	5,54 ± 0,20	108,3
		5,0	8,96 ± 0,02	110,3

## 6. CONCLUSÃO

O procedimento analítico desenvolvido neste trabalho demonstrou a aplicabilidade de um sistema de análise por injeção em fluxo com geração eletroquímica de reagente e detecção biamperométrica para determinação de sulfito. O par redox  $I_3^-/I^-$  foi um eficiente sistema redox indicador, pois possibilitou a determinação indireta do sulfito em amostras de sucos e vinhos. A utilização da CDG, possibilitou a minimização dos possíveis interferentes presentes nas amostras, não havendo a necessidade do tratamento da amostra. Devido a possibilidade de geração do reagente  $I_3^-$  na CGR, a instabilidade do par  $I_3^-/I^-$  pode ser descartada, uma vez que o mesmo é gerado em linha em recipiente fechado. A simplicidade, baixo custo, elevada frequência analítica (64 determinações por hora), boa precisão (RSD de 0,4%,  $n = 7$ ) e limite de detecção de  $0,36 \text{ mgL}^{-1}$ , torna o método proposto viável para determinação de sulfito em amostras reais, além do baixo consumo de amostra e reagentes. O detector biamperométrico construído foi facilmente adaptado ao sistema por ser portátil e miniaturizado. Por tanto, pode-se concluir que o procedimento proposto para a análise de sulfito em amostras de sucos e vinhos apresentou-se eficaz.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMO, L. S. T.; TANGKUARAM, T.; SATIENPERAKUL, S. Determination of sulfite by pervaporation-flow injection with amperometric detection using copper hexacyanoferrate-carbon nanotube modified carbon paste electrode. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p. 1793–1799, 2010.

ALBUQUERQUE, M. V.; SANTOS, S. A.; CERQUEIRA, N. T. V.; SILVA, J. A. Educação Alimentar: Uma Proposta de Redução do Consumo de Aditivos Alimentares. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 2, p. 51–57, 2012.

ALVES, E. R.; POGGI E BORGES, E.; BARROS, V. A. F.; ZAGATTO, E. A. G. Determinação de açúcares redutores totais empregando sistemas de análises por injeção em fluxo: aplicação a amostra de relevância sucro-alcooleira. **Revista Analytica**, v. 19, p. 4–7, 2005.

AMATATONGCHAI, M.; SROYSEE, W.; CHAIRAM, S.; NACAPRICHA, D. Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes-PDDA-gold nanoparticles. **Talanta**, v. 133, p. 134–141, 2015. ANVISA. Relatório de Análise de Contribuições. , 2011.

ARAÚJO, C. S.; 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**, v. 92, n. 4, p. 765–770, 2005.

ARAÚJO, C. S. T.; CARVALHO, J. L.; MOTA, D. R.; ARAÚJO, C. DE; COELHO, N. M. M. Determination of sulphite and acetic acid in foods by gas permeation flow injection analysis. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 765–770, 2005.

AUN, M. V; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGONDI, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 34, n. 5, p. 177–186, 2011.

BARRETO, S. M.; PINHEIRO, A. R. O.; SICHIERI, R.; MONTEIRO, C. A.; FILHO, M. B.; SCHIMIDT, M. I.; LOTUFO, P.; ASSIS, A. M.; GUIMARÃES, V.; RECINE, E. G. I. G.; VICTORIA, C. G.; COITINHO, D. PASSOS, V. M. A. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde\*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 14, n. 1, p. 41–68, 2005.

BEARTH, A.; COUSIN, M.-E.; SIEGRIST, M. The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. **Food Quality and Preference**, v. 38, p. 14–23, 2014.

CARBALLO, R.; CAMPO, V.; ORTO, D.; BALBO, A. LO; REZZANO, I. Determination of sulfite by flow injection analysis using a poly [Ni-(protoporphyrin IX)] chemically modified electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 88, p. 155–161, 2003.

CARDOSO, W. S.; PINHEIRO, F. A.; PATELLI, T.; PEREZ, R.; RAMOS, A. Determinação da concentração de sulfito para a manutenção da qualidade da cor em maçã desidratada. **Revista Analytica**, v. 29, 2007.

CARVALHO, L. M.; SCHWEDT, G. Sulfur speciation by capillary zone electrophoresis. Determination of dithionite and its decomposition products sulfite, sulfate and thiosulfate in commercial bleaching agents. **Journal of Chromatography A**, v. 1099, n. 1-2, p. 185–90, 2005.

CERDÀ, V.; ESTELA, J. M.; FORTEZA, R.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; ALTIMIRA, P.; SITJAR, P. Flow techniques in water analysis. **Talanta**, v. 50, n. 4, p. 695–705, 1999.

CÓRDOVA, C. M. I. **Desenvolvimento de sistemas de análises em fluxo por multicomutação para determinação de poluentes ambientais**, 2008. Universidade de São Paulo.

DECNOP-WEEVER, L. G.; KRAAK, J. C. Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 337, n. 2, p. 125–131, 1997.

FATIBELLO-FILHO, O.; 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**, v. 354, p. 51–57, 1997.

FAVERO, D. M.; RIBEIRO, C. DA S. G.; AQUINO, A. D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis maléficos à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 1, p. 11–20, 2011.

FAZIO, T.; WARNER, C. R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, n. 4, p. 433–454, 1985.

FONTENELE, R. S.; HIDALGO, P.; GUTZ, I. G. R.; PEDROTTI, J. J. Flow injection analysis of ethyl xanthate by in-line dialysis and UV spectrophotometric detection. **Talanta**, v. 72, p. 1017–1022, 2007.

GGALI/ANVISA. Consolidado da legislação brasileira de aditivos alimentares. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+->

+noticias+anos/2013+noticias/anvisa+disponibiliza+consolidado+da+legislacao+brasileira+de+aditivos+alimentares>. .

GIOLITO, I. **Métodos eletrométricos e eletroanalíticos: Fundamentos e aplicações**. 2<sup>a</sup> ed. ed. São Paulo: MULTITEC coordenadoria de treinamento técnico, 1980.

HANSEN, E. H.; RUZICKA, J. Flow injection analysis part VI. the determination of phosphate and chloride in blood serum by dialysis and sample dilution. **Analytica Chimica Acta**, v. 87, p. 353–363, 1976.

HASSAN, S. S. M.; HAMZA, M. S. A.; MOHAMED, A. H. K. A novel spectrophotometric method for batch and flow injection determination of sulfite in beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, n. 2, p. 232–9, 2006.

HASSAN, S. S. M.; MAREI, S. A.; BADR, I. H.; ARIDA, H. A. Flow injection analysis of sulfite ion with a potentiometric titanium phosphate – epoxy based membrane sensor. **Talanta**, v. 54, p. 773–782, 2001.

HELI, H.; ESKANDARI, I.; SATTARAHMADY, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Cobalt nanoflowers: Synthesis, characterization and derivatization to cobalt hexacyanoferrate — Electrocatalytic oxidation and determination of sulfite and nitrite. **Electrochimica Acta**, v. 77, p. 294–301, 2012.

IAMMARINO, M.; TARANTO, A. DI; MUSCARELLA, M.; NARDIELLO, D.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Development of a new analytical method for the determination of sulfites in fresh meats and shrimps by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, n. 1-2, p. 61–65, 2010.

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

LEI, J.; DING, J.; CHEN, Y.; QIN, W. Potentiometric flow injection sensing system for determination of heparin based on current-controlled release of protamine. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, p. 60–65, 2015.

LI, B.; ZHANG, Z.; WU, M. Flow-injection chemiluminescence determination of sulfite using on-line electrogenerated silver(II) as the oxidant. **Analytica Chimica Acta**, v. 432, n. 2, p. 311–316, 2001.

MACHADO, R. M. D.; TFOUNI, S. A. V; VITORINO, S. H. P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. F. Presença dos ácidos benzóico e asórbico em vinhos e sidras produzidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 847–850, 2007.

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

MACHERAS, P.; KOUPPARIS, M.; TSAPROUNIS, C. An automated flow injection-serial dynamic dialysis technique for drug-protein binding studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 30, p. 123–132, 1986.

MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Reverse flow-injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 40, p. 1–14, 2012.

MARTINS, P. R.; POPOLIM, W. D.; NAGATO, L. A. F.; et al. Fast and reliable analyses of sulphite in fruit juices using a supramolecular amperometric detector encompassing in flow gas diffusion unit. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 249–255, 2011.

MENESES, S. R. P. **Monitoramento de espécies químicas produzidas durante a fermentação alcoólica utilizando sistemas de análises em fluxo**, 2008. Universidade de São Paulo.

MILARDOVIC, S.; KEREKOVIĆ, I.; RUMENJAK, V. A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzymatically produced ABTS+. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1688–1694, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria N.º 229, de 25 de outubro de 1988. , 1988. Brasil.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Item 1.2, Portaria nº 540, de 27 outubro de 1997: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. , 1997. Brasil.

MOLINERO-ABAD, B.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Sulfite oxidase biosensors based on tetrathiafulvalene modified screen-printed carbon electrodes for sulfite determination in wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 812, p. 41–4, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491762>>. Acesso em: 25/2/2015.

MOUTINHO, I. L. D.; BERTGES, L. C.; ASSIS, R. V. C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n°5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 1, p. 141–145, 2007.

NASCIMENTO, V. B.; SELVA, T. M. G.; COELHO, E. C. S.; SANTOS, F. P.; ANTÔNIO, J. L. S.; SILVA, J. R.; GAIÃO, E. N.; ARAÚJO, M. C. U. Automatic determination of chlorine without standard solutions using a biamperometric flow-batch analysis system. **Talanta**, v. 81, p. 609–613, 2010.

NAVARRO, M. V.; PAYÁN, M. R.; LÓPEZ, M. A. B.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; MOCHÓN, M. C. Rapid flow injection method for the determination of sulfite in wine using the permanganate-luminol luminescence system. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 2003–6, 2010.

NIKNAHAD, H.; O'BRIEN, P. J. Mechanism of sulfite cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Chemico-biological Interactions**, v. 174, n. 3, p. 147–54, 2008.

OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. 2<sup>a</sup> ed. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.

OLIVEIRA, L. S. **Desenvolvimento de um sistema eletroquímico de análise por injeção em fluxo para detecção de cocaína**, 2011. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, S. C. B. **Desenvolvimento e Aplicação de uma Célula de Fluxo para Geração Eletroquímica In-Line de Reagentes**, 2005. Universidade Federal da Paraíba.

OLIVEIRA, S. C. B.; COELHO, E. C. S.; SELVA, T. M. G.; SANTOS, F. P.; ARAÚJO, M. C. U.; ABREU, F. C.; NASCIMENTO, V. B. A coulometric flow cell for in-line generation of reagent, titrant or standard solutions. **Microchemical Journal**, v. 82, n. 2, p. 220–225, 2006.

PASQUINI, C.; AQUINO, E. V.; REBOUCAS, M. V.; GONZAGA, F. B. Robust flow-batch coulometric/biamperometric titration system: determination of bromine index and bromine number of petrochemicals. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, n. 1-2, p. 84–9, 2007.

POLÔNIO, M.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653–1666, 2009.

PUNDIR, C. S.; RAWAL, R. Determination of sulfite with emphasis on biosensing methods: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 10, p. 3049–62, 2013.

REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51–58, 1996.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, A. M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82–91, 1989.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROBBINS, K. S.; SHAH, R.; MACMAHON, S.; JAGER, L. S. DE. Development of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Sulfite in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015.

ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119–125, 2000.

SKEGGS, L. T. An automatic method for colorimetric analysis. **Technical Section**, 1957.

SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH. **Fundamentos de química analítica. Tradução da 8ª Edição norte-americana.** São Paulo: Thomson, 2006.

STADEN, J. F. VAN. Simultaneous flow-injection analysis for two components with on-line dialysis and gas diffusion in series. Determination of chloride and ammonia nitrogen in industrial effluent water. **Analytica Chimica Acta**, v. 261, p. 453–459, 1992.

STADEN, J. F. VAN; PLESSIS, H. DU; TALJAARD, R. E. Determination of iron(III) in pharmaceutical samples using dialysis in a sequential injection analysis system. **Analytica Chimica Acta**, v. 357, p. 141–149, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267097005291>>. .

TAYLOR, R. H.; ROTERMUND, J.; CHRISTIAN, G. D.; RUZICKA, J. Co-determination of sodium metabisulfite and starch in corn syrup by flow injection coulometry. **Talanta**, v. 41, p. 31–38, 1994.

TAYLOR, R. H.; RUZICKA, J.; CHRISTIAN, G. D. Flow-injection coulometric titrations. **Talanta**, v. 39, n. 3, p. 285–292, 1992.

TIMOFEEVA, I. I.; BULATOV, A. V; MOSKVIN, A. L.; KOLEV, S. D. A gas-diffusion flow injection method Coupled with online solid-liquid extraction for the determination of ammonium in solid Samples. **Talanta**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.051>, 2015.

TZANAVARAS, P. D.; THIAKOULI, E.; THEMELIS, D. G. Hybrid sequential injection-flow injection manifold for the spectrophotometric determination of total sulfite in wines using o-phthalaldehyde and gas-diffusion. **Talanta**, v. 77, p. 1614–1619, 2009.

VALLY, H.; MISSO, N. L. A.; MADAN, V. Clinical effects of sulphite additives. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 1643–1651, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives: sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Technical Report Series**, 2009.

YILMAZ, Ü. T.; SOMER, G. Determination of trace sulfite by direct and indirect methods using differential pulse polarography. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, n. 1, p. 30–5, 2007.

YIN, L. Q.; YUAN, D. X.; ZHANG, M. Determination of sulfite in water samples by flow injection analysis with fluorescence detection. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 12, p. 1457–1461, 2010.

ZAGGATO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações - IUPAC 1994). **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 143–146, 1999.

ZHANG, J. B.; ZHANG, H.; WANG, H. L.; ZHANG, J. Y.; LUO, P. J.; ZHU, L.; WANG, Z. T. Risk analysis of sulfites used as food additives in China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 27, n. 2, p. 147–54, 2014.