

## APLICAÇÕES EM ENOLOGIA DA ANÁLISE POR INJECCÃO EM FLUXO

JOSÉ L. F. C. LIMA<sup>1</sup> e ANTÓNIO O. S. S. RANGEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química-Física, Faculdade de Farmácia (U. P.)  
Rua Aníbal Cunha, 4000 PORTO

<sup>2</sup> Escola Superior de Biotecnologia (U. C. P.)  
Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200 PORTO

### RESUMO

Neste trabalho é efectuada uma revisão sobre a aplicação da Análise por Injecção em Fluxo (FIA) em enologia, bem como a sua previsível evolução. Apresenta-se ainda uma descrição dos seus princípios fundamentais, componentes e técnicas básicas.

### INTRODUÇÃO

Os procedimentos analíticos são geralmente constituídos por um conjunto de operações sequenciais designadamente a amostragem, a preparação da amostra (visa adequar a amostra à medida), a medição de uma propriedade física relacionável com a concentração, e o tratamento e registo dos resultados obtidos. Uma vez que, actualmente, se dispõe de instrumentação adequada para realizar, com rapidez, as duas últimas operações, o tempo global dispendido com a análise é essencialmente condicionado pelo processo de preparação da amostra que pode envolver operações tão diferenciadas como diluições, adição de reagentes, aquecimentos ou extracções. Estas operações, efectuadas com material cuja concepção tem mais de um século, são bastante morosas, e necessitam de um grande volume de trabalho, necessariamente especializado.

Este facto, aliado ao crescente número de análises a efectuar, e à necessidade de redução de custos, originou o desenvolvimento e aplicação da análise automática.

Os métodos automáticos são essencialmente baseados na substituição das operações manuais por operações descontínuas

ou contínuas seguidas da medição. Nos *métodos descontínuos* as amostras mantêm a sua identidade, pois são colocadas em vasos separados onde são realizadas as diversas operações prévias. Nos *métodos contínuos* a preparação da amostra ocorre num fluxo de líquido ou de gás, sendo a concentração da espécie a analisar medida sem que ocorra a interrupção desse fluxo.

No âmbito dos métodos contínuos de análise os sistemas com o fluxo segmentado (SFA) e, mais recentemente, os de fluxo não segmentado (FIA) têm sido os mais utilizados.

Os sistemas de fluxo segmentado foram inicialmente propostos por Skeggs (1957), e são baseados na segmentação do fluxo com bolhas de ar, azoto, ou mesmo de óleo. Estes sistemas procuram reproduzir os conceitos inerentes à análise clássica, em que se visa manter a identidade das amostras e a realização das medidas em condições de equilíbrio e de homogeneização. Estes sistemas são já vulgares em diversas áreas como a química clínica, ambiental e alimentar. São constituídos por dispositivos de amostragem, de propulsão, de introdução de bolhas de ar, dispositivos intermédios capazes de realizar operações como diálises, extracções líquido-líquido, aquecimentos, sistemas de eliminação de bolhas de ar, sistema de detecção e de tratamento de resultados. Estes analisadores, conhecidos vulgarmente como «auto-analyzers», são de eficácia comprovada, nomeadamente na área das análises clínicas, e na área dos vinhos (Curvelo-Garcia e Bouvier, 1988). Apresentam no entanto, como principais desvantagens, o facto de serem bastante complexos, e portanto muito dispendiosos, devido às dificuldades técnicas inerentes à segmentação do fluxo e a medições efectuadas em condições de homogeneização e equilíbrio.

Em alternativa a estes sistemas, foi descrita, em meados da década de setenta, uma nova metodologia de fluxo contínuo, que revolucionou os conceitos até então existentes no capítulo dos métodos automáticos, e que veio a ser designada por análise por injeção em fluxo (FIA). Esta metodologia, que resultou do trabalho efectuado quase em simultâneo por Ruzicka e Hansen (1975) na Dinamarca e por Stewart *et al.* (1976) nos Estados Unidos, rompeu com ideia de que os métodos automáticos deveriam ser meras adaptações dos métodos clássicos aos sistemas de fluxo. Com efeito, na nova metodologia, não há segmentação do fluxo de líquidos, pelo que as medições não são efectuadas

em condições de equilíbrio físico (homogeneização) nem de equilíbrio químico. Em FIA, as amostras são intercaladas (e não aspiradas como em SFA) num fluxo contínuo de líquido, que promove o seu transporte até ao detector. Durante o processo de transporte, ocorre a dispersão do segmento de amostra no transportador e, eventualmente, a reacção com o transportador ou com outros reagentes adicionados estrategicamente ao sistema. Finalmente, quando a espécie que gera o sinal analítico atinge o detector observa-se um sinal transiente relacionável com a concentração da amostra a analisar. O conceito de homogeneização e equilíbrio inerente ao SFA é assim substituído pelo de dispersão parcial da amostra no transportador, com rigoroso controlo do intervalo de tempo que decorre entre a injeção e a medição. Uma determinação por FIA (como em SFA) é geralmente iniciada com uma curva de calibração, seguindo-se então a introdução das amostras, finalizando-se, caso necessário, com uma nova calibração para controlar variações na resposta do detector. Garante-se, assim, que todos os parâmetros do sistema FIA se mantêm constantes durante o referido procedimento analítico. A dispersão e, eventualmente, a extensão da reacção que possa ocorrer é reprodutível para os sucessivos padrões e amostras, pelo que não há necessidade de efectuar a detecção em condições de equilíbrio físico ou químico.

A simplicidade, relativo baixo custo, versatilidade e facilidade de construção tem suscitado um significativo interesse de que resultou o seu rápido desenvolvimento e aplicação em numerosas áreas, com particular ênfase na das análises clínicas (Rocks e Riley, 1982) e também no controle ambiental (Lázaro *et al.*, 1985). Neste artigo é efectuada uma revisão sobre a sua aplicação na análise de vinhos, e é dada uma perspectiva do que poderá ser a sua evolução. Apresenta-se ainda numa forma resumida uma panorâmica sobre a Análise por Injeção em Fluxo.

### ***Princípios fundamentais da análise por injeção em fluxo***

A Análise por Injeção em Fluxo baseia-se na conjugação da intercalação da amostra no transportador, no controlo da dispersão parcial da amostra nesse fluxo e do tempo exacto para efectuar a medida do sinal analítico.

Para satisfazer estes requisitos uma montagem FIA simples é constituída por uma unidade de propulsão, de injeção, por tubagem (reactor) onde se realizam as operações exigidas pelo sistema de medida, um detector e um sistema de registo de dados.

O *sistema de propulsão* visa estabelecer um fluxo reproduzível de líquido transportador e, eventualmente, de outros reagentes adicionados ao sistema. As unidades de propulsão mais utilizadas têm sido sem dúvida as bombas peristálticas que apresentam, contudo, a desvantagem de introdução de ligeiros pulsos no sistema, que podem ser minimizados com dispositivos adequados (Alegret *et al.*, 1987). A sua utilização em sistemas que incorporam detectores potenciométricos aumentam a complexidade da montagem devido à necessidade de eliminar o ruído eléctrico que originam (Alegret *et al.*, 1984; Alonso *et al.*, 1986).

Alternativamente, a impulsão do fluxo pode ser obtida por bombas de pistão, gravidade, ou deslocamento de um líquido contido num recipiente pressurizado.

O *sistema de injeção* deve intercalar numa forma reproduzível o segmento de amostra no fluxo de transportador provocando uma mínima interrupção do fluxo. É de notar que o volume injectado não necessita de ser rigorosamente conhecido, mas deve ser igual para a série de padrões e de amostras. As válvulas rotatórias de baixa pressão são as unidades mais usadas, embora também tenham sido utilizadas, especialmente no início desta metodologia, seringas com agulhas hipodérmicas.

Os *reactores* mais utilizados em FIA são simplesmente tubos de Teflon com diâmetros internos geralmente compreendidos entre 0,3 e 1,0 mm, que podem ser montados no sistema esticados, enrolados, com nós aleatórios, ou ainda usados com um empacotamento de pequenas bolas de vidro, conhecidos pelas iniciais SBSR (single bead string reactor) (Reijn *et al.*, 1981). Podem ser ainda incorporadas unidades para realizar diálises, extracções líquido-líquido, colunas de troca iónica, ou câmaras de mistura com agitação mecânica.

Devido à diversidade das montagens FIA, é possível usá-las com os mais diversos tipos de *detectores* (ópticos, electroquímicos, entalpimétricos, fotoacústicos, fotoelectroquímicos, piezoeléctricos, radioquímicos) sem que para tal, na maioria dos casos, necessitem de modificações técnicas apreciáveis. Estes devem, no entanto, ser selectivos, apresentarem um tempo de

resposta rápido, e não contribuirão para o alargamento excessivo do sinal transiente introduzindo zonas adicionais de dispersão.

O *controlo da dispersão* do segmento de amostra entre o ponto de injeção e o da detecção é fundamental em FIA e determinante dos resultados obtidos.

O perfil de dispersão do troço de amostra em cada instante resulta de duas contribuições para o movimento das partículas: o transporte por convecção e o transporte por difusão. Em condições de fluxo laminar, a acção da convecção origina um perfil parabólico de velocidades em que a camada de líquido adjacente às paredes do tubo é praticamente estacionária enquanto que a velocidade das partículas no centro do tubo é o dobro da velocidade média. Se não ocorresse outro tipo de mecanismo haveria contaminação mútua entre amostras sucessivas, e o sinal transiente seria demasiado alargado. Tal não ocorre devido ao fenómeno da difusão, que resulta de gradientes de concentração em diferentes instantes do transporte por convecção. A difusão pode ser axial, originada em gradientes longitudinais de concentração, ou radial, decorrente de gradientes radiais. A difusão radial contribui para a manutenção da identidade das amostras, na medida em que impele as partículas adjacentes às paredes do tubo para o centro e vice-versa, o que evita a contaminação das amostras e permite um maior ritmo de amostragem.

Após a intercalação da amostra no sistema FIA, predomina o transporte por convecção, sendo o processo de difusão mais significativo à medida que aumenta o tempo de residência da amostra no sistema. Esta situação determina o sinal típico em FIA, que se traduz numa subida brusca de sinal quando a amostra atinge o detector, e um retorno à linha de base mais relaxado. Quando o tempo de residência da amostra é relativamente grande, o sinal analítico tende para uma curva Gaussiana.

O aumento das exigências requeridas para certas determinações originou o recurso a novos artifícios de modo a satisfazer as necessidades e, simultaneamente, aumentar a gama de aplicações do FIA. É o caso da *bombagem intermitente* que permite estudar cinéticas de reacções, bem como de aumentar a sensibilidade de algumas metodologias. Nesta técnica, o fluxo é parado («stopped flow») quando o segmento de amostra se encontra no detector, sendo novamente ligadas as bombas quando a

extensão da reacção for considerada suficiente para os objectivos da determinação. Esta técnica permite ainda adicionar um determinado reagente dispendioso somente quando a amostra passa na confluência onde o reagente é adicionado.

Embora os sistemas FIA originem, em geral, um baixo consumo de reagentes devido ao pequeno volume da tubagem e aos baixos caudais usados, a economia de reagentes pode ser maximizada com a utilização de técnicas como a das zonas confluentes («merging zones») (Ruzicka e Hansen, 1988) em que se procede a uma injeção sincronizada de amostra e reagente. Esta técnica pode ainda ser usada como processo de diminuição de sensibilidade fazendo com que a sobreposição entre os dois segmentos de solução intercalados apresente diferentes graus de coincidência.

Quando não existe restrição da quantidade de amostra e se pretende economizar reagente, pode-se ainda recorrer ao designado «*FIA reverso*», em que a amostra funciona como transportador, e os reagentes são intercalados nele. Esta técnica permite ainda aumentar a sensibilidade da medida e a sua zona de aplicabilidade, bem como a realização de determinações sequenciais usando válvulas de injeção em série.

A execução de *titulações em fluxo contínuo* é outra das possibilidades dos sistemas FIA que não tem paralelo em SFA, e decorre do facto do sinal ser transiente e controlável. Quando se intercala na solução uma espécie que reaja quantitativamente com uma espécie contida no transportador, é possível encontrar dois pontos no perfil de dispersão obtido, respectivamente na parte anterior e posterior, em que se obtém a condição de equivalência. O intervalo de tempo entre os dois pontos é proporcional ao logaritmo da concentração da espécie a determinar. O uso da largura do sinal transiente como parâmetro analítico não é exclusivo das titulações, podendo ser usado para aumentar a zona de linearidade das metodologias analíticas, devido à dependência logarítmica.

Além das técnicas anteriores, que são exclusivas dos sistemas FIA, podem ser usados sistemas de separação também utilizados em análise por fluxo segmentado.

As amostras podem ser *dialisadas*, de um canal contendo o troço de amostra para outro contendo o fluxo de aceitador. Esta é usada essencialmente para eliminar interferentes, ou ainda



para diminuir significativamente a quantidade de espécie a determinar que se encaminha para o detector, uma vez que apenas uma pequena parcela se difunde para o fluxo aceitador.

Pode-se ainda referir o uso em FIA de unidades de *extracção líquido-líquido* para aumentar a selectividade ou sensibilidade das determinações, de tubos com *enzimas imobilizadas* ou ainda com resinas de *troca iónica*.

### **Comparação do FIA com o SFA**

Os desenvolvimentos mais significativos de processos automáticos de análise realizados até ao momento nas mais diversas áreas, utilizam sistemas de fluxo segmentado, devido essencialmente ao facto de ser uma metodologia já bem estabelecida, que fornece resultados com uma precisão e exactidão semelhante aos métodos clássicos. Esta tendência manifesta-se também na análise de vinhos, justificando por isso que se faça uma comparação entre estes sistemas e os de fluxo contínuo (FIA).

Embora apresentem alguma similaridade, nomeadamente no que diz respeito a algum tipo de equipamento, as suas características, bem como a sua eficiência são bastante diferentes, como se pode concluir da análise comparativa apresentada de forma resumida na Tabela 1.

As amostras, em FIA, são injectadas e não aspiradas como em SFA, permitindo utilizar volumes de amostra bastante reduzidos, o que no caso da análise de vinhos não é importante, mas que assume particular relevância em análises clínicas. Os ciclos de lavagem, indispensáveis em SFA, não são necessários em FIA, visto que entre injeções de amostras sucessivas circula no sistema a solução correspondente ao ensaio a branco.

O consumo de reagentes é significativamente menor em FIA devido essencialmente ao menor volume da tubagem. A poupança de reagentes, que é por exemplo crítica quando se utilizam reagentes dispendiosos como as enzimas, pode ainda ser maximizada usando técnicas com as zonas confluentes, ou ainda recorrendo à utilização de enzimas imobilizadas e a válvulas rotatórias que permitam a recirculação de reagentes.

A possibilidade de efectuar titulações em fluxo contínuo é outra das possibilidades sem paralelo em SFA, assim como a avaliação cinética de reacções.

TABELA 1

Comparação entre algumas características dos sistemas de Análise por Fluxo Segmentado (SFA) e de Análise por Injecção em Fluxo (FIA)

*Comparison of operating characteristics for Segmented Flow Analysis (SFA) and Flow Injection Analysis (FIA)*

Parâmetros	SFA	FIA
Introdução da amostra	Aspiração	Injecção (intercalação)
Líquido transportador	Segmentado	Não segmentado
Tempo de arranque	20 min	1 min
Volume de amostra	0,2-2 mL	10-200 $\mu$ L
Tempo de resposta	2 a 30 min.	3 a 60 s
Diâmetro interno do tubo	2 mm	0,5 a 1,0 mm
Condições de detecção	Equilíbrio (homogeneização)	Dispersão controlada (não homogeneização)
Ritmo de Amostragem	20-80 h <sup>-1</sup>	50-360
Gastos de reagentes	Elevado	Baixo
Ciclo de lavagem	Essencial	Não é necessário
Longos tempo de incubação	Adequado	Não adequado
Avaliação cinética	Não é possível	Possível
Titulações	Não é possível	Possível
Tratamento de sinal analítico	Altura	Altura/área/largura

Os sistemas FIA são mais simples devido à ausência de segmentação do fluxo, mais versáteis e de menor custo, apresentando resultados de qualidade equivalente à fornecida pelos sistemas de fluxo segmentado mas com maiores ritmos de amostragem, excepção feita a reacções com tempos de incubação muito longos.

#### ***Aplicações do FIA em Enologia***

Na área dos produtos alimentares em geral e no caso do vinho em particular, têm aumentado as solicitações para a análise de diferentes parâmetros, em numerosas amostras, e em diferentes estádios da produção. Esta situação foi fundamentalmente determinada pela crescente preocupação com o controlo de qualidade, bem como pela tentativa de otimizar os procedimentos de produção e armazenamento, num contínuo esforço para melhorar o produto final. Para responder satisfatoriamente



a estas solicitações, os laboratórios tiveram que recorrer à análise automática.

A automatização da introdução das amostras no sistema de medida pode se conseguir simplesmente com a acoplagem a essa aparelhagem de um amostrador automático, nomeadamente em cromatografia gasosa, líquida de elevada eficiência, ou em espectrofotometria de absorção atômica. Contudo, para abranger um maior número de situações, os sistemas de fluxo contínuo são sem dúvida os mais eficazes.

Tal como se referiu anteriormente, os sistemas mais usados têm sido os de fluxo segmentado. Estes sistemas, apresentam no entanto limitações, designadamente quanto ao seu elevado custo de aquisição e manutenção, à necessidade de ser operado por pessoal especializado, e ainda o facto de, para ser rentável o seu arranque, ter de haver pelo menos cerca de 20 amostras para analisar.

Em semelhança ao que vem acontecendo em outras áreas, e dadas as suas características intrínsecas, afigura-se de grande interesse e com elevadas potencialidades, a utilização da metodologia FIA como o processo mais conveniente para automatizar determinações em vinhos.

Na verdade, só recentemente tem sido devotado trabalho de investigação neste sentido, não havendo portanto ainda um grande número de parâmetros determinados por esta metodologia (Tabela 2).

Tal como se verifica em SFA, também em FIA os detettores mais usados têm sido os espectrofotométricos, efectuando as medidas na zona do visível e ultra-violeta, havendo também a assinalar a utilização de sistemas que usam como método de detecção a entalpiometria, amperometria, espectrometria de absorção atômica, de emissão de chama, e a potenciometria.

*Detecção espectrofotométrica na zona do visível e ultra-violeta.* A predominância deste sistema de detecção pode ser explicado pela fácil adaptabilidade desta aparelhagem a sistemas de fluxo bem como a possibilidade de se determinarem muitas espécies, quer através das suas propriedades intrínsecas quer através das denominadas reacções de desenvolvimento de cor, algumas das quais bastante selectivas como é o caso das enzimáticas.

TABELA 2

Determinações em vinhos automatizadas por Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

*Wine species determined by Flow Injection Analysis (FIA)*

Espécie analisada	Método/Deteção	Precisão (Coef. Var./%)	Ritm. Amost. (h <sup>-1</sup> )	Referências
Acetaldeído	Enz./Espect.	0,5	50	Lázaro <i>et al.</i> , 1986a
Ácido tartárico	Espect.	0,79	50	Lázaro <i>et al.</i> , 1986b
Açúcares redutores	Espect.	2,44-2,88	40	Maquieira <i>et al.</i> , 1987
	Espect.	1,50-1,61	50	»
	Espect.	2,78-3,13	40	»
Carbonato total	Diál./Espect.	1-2	—	Anónimo, 1983a
Catiões metálicos:				
Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu	EAA	< 2	240-360	Lima e Rangel, 1990
Na, K	FEC	< 2	180-200	»
Cloretos	Tit./Potenc.	1	60-120	Lima e Rangel, 1989
Dióxido de enxofre	Diál./Espect.	1	—	Anónimo, 1983b
Dióxido de enxofre	Diál./Espect.	1-2	60	Sullivan <i>et al.</i> , 1986
Dióxido de enxofre	Amperom.	1,7-2,3	120	Granados <i>et al.</i> , 1986
Dióxido de enxofre	Espect.	1,5	250-300	Hernandez-Mendez <i>et al.</i> , 1987
Etanol	Enz./Espect.	—	120	Worsfold <i>et al.</i> , 1981
Etanol	Enz./Espect.	0,7	55	Lázaro <i>et al.</i> , 1986a
Etanol	Entalpiometria	< 0,1	110	Oliveira e Pasquini, 1988
Glucose	Enz./Espect.	2-3,1	40	Ruz <i>et al.</i> , 1986
Polifenóis totais	Espect.	3,4	200	Buitrago <i>et al.</i> , 1986

Usando este tipo de detector, foram desenvolvidos sistemas FIA para as determinações de acetaldeído, ácido tartárico, açúcares redutores, carbonato total, dióxido de enxofre, glucose e polifenóis totais.

Lázaro *et al.* (1986a) desenvolveram dois sistemas FIA para a determinação individual e simultânea de etanol e acetaldeído, respectivamente. As determinações são baseadas na oxidação dos dois compostos pelo NAD<sup>+</sup> na presença das enzimas álcool desidrogenase para etanol e aldeído desidrogenase para

o acetaldeído, sendo o medido o NADH formado. O sistema bicanal usado para as determinações uniparamétricas emprega a técnica das zonas confluentes, em que o transportador é uma solução tampão, sendo a amostra e a solução enzimática injectadas sincronizadamente. Na determinação de etanol são dispendidos por determinação 30  $\mu\text{L}$  de amostra e 60  $\mu\text{L}$  de enzima, e na de acetaldeído 60  $\mu\text{L}$  de amostra e 90  $\mu\text{L}$  de enzima. As amostras são diluídas previamente numa extensão condicionada pelo intervalo de aplicabilidade do método (0,002-0,016 % v/v etanol; 1,0-8,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de aldeído). No que se refere à determinação de etanol, os autores ensaiaram adicionalmente uma diluição das amostras no interior da montagem, utilizando injeções assimétricas. Embora tivessem intervalos de resposta linear comparáveis com a diluição manual, obtiveram um decréscimo de exactidão. Neste trabalho foi também experimentado o uso de uma «diluição fotométrica», realizando as medidas a um comprimento de onda de menor sensibilidade, conseguindo apenas diminuir, mas não evitar, a diluição prévia requerida. Na determinação simultânea dos dois compostos, usaram um sistema «FIA reverso» em que o transportador é a amostra de vinho diluída, sendo as enzimas injectadas simultaneamente através de duas válvulas colocadas em série, o que origina que as duas zonas analíticas cheguem ao detector em tempos diferentes. Usaram um detector tipo «diode-array» para compatibilizar as diferentes diluições necessárias para cada determinação, medindo os dois parâmetros a diferentes comprimentos de onda. Os sistemas descritos neste trabalho apresentam a desvantagem de necessitarem de duas válvulas sincronizadas, ou de um detector de «diode-array», o que encarece e complica as montagens, não evitando contudo a diluição prévia das amostras.

A determinação por FIA de etanol, já anteriormente havia sido ensaiada por Worsfold *et al.* (1981) com um sistema baseado na mesma reacção enzimática e que aplicaram à detetrminação no sangue e em algumas bebidas, incluindo uma amostra de vinho tinto. Neste sistema, 30  $\mu\text{L}$  de amostra de vinho também previamente diluído, são inseridos num fluido transportador constituído por uma solução de tampão à qual era adicionada numa confluência a solução enzimática, ocorrendo então a reacção, termostatizada a 25° C.

A utilização de um reactor com enzimas imobilizadas foi desenvolvida por Ruz *et al.* (1988) usando um sistema com duas válvulas acopladas internamente (ligadas entre si), para a determinação de glucose. A ligação directa entre as duas válvulas permite intercalar no transportador três segmentos de soluções diferentes. Esta técnica visou, neste caso, evitar o recurso ao «stopped-flow» em face da contribuição significativa e variável da matriz para o sinal analítico. São descritas duas configurações, que diferem essencialmente na colocação do reactor enzimático na montagem. Numa das configurações são introduzidos dois segmentos de amostra, em que apenas um deles percorre o reactor enzimático, situado no «loop» de uma das válvulas. Assim, no detector observam-se dois sinais analíticos, o primeiro correspondente ao «branco» (segmento de amostra que não passa no reactor), e ao «branco» mais espécie a medir (segmento que passa no reactor). Na outra configuração, o reactor encontra-se a jusante do sistema de injeção, ambos os segmentos de amostra o atravessam, encontrando-se separados entre si por um determinado volume de solução contendo a coenzima, colocada no «loop» de uma das válvulas. Nestas condições, ocorre um sinal transiente com três máximos, dois correspondentes ao «branco», e o pico central correspondente ao «branco» mais espécie a medir. A configuração com o reactor situado no «loop» da válvula permite determinar glucose entre 5 e 60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Este sistema fornece, no entanto, resultados anómalos quando aplicado a alguns vinhos tintos ou doces devido a algumas substâncias coradas ficarem retidas no reactor. Este problema não acontece com a configuração em que o reactor está colocado imediatamente antes do detector, pois as duas porções de amostra o atravessam. Este sistema é aplicável em amostras com concentração em glucose entre 10 e 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Embora seja evidente o interesse destes sistemas, a sua aplicação a análises de rotina não nos parece muito exequível, em face da utilização de enzimas imobilizadas.

A determinação de ácido tartárico baseada no método de Rebelein foi também estudada por Lázaro *et al.* (1986b) utilizando uma montagem bicanal onde são intercalados 200  $\mu\text{L}$  de vinho diluído, e que permite efectuar o doseamento num intervalo de concentrações entre 0,02 e 0,4  $\text{g.L}^{-1}$ . Em relação aos métodos clássicos os autores referem que é mais rápido, sensível,

selectivo e envolve um menor consumo de reagentes e amostra, não evitando porém a diluição prévia das amostras.

O mesmo grupo de investigação descreveu três sistemas para a determinação de açúcares redutores (Maquieira *et al.*, 1987) baseados em diferentes reacções clássicas. O primeiro usa uma montagem bicanal e a metodologia é baseada no método do ácido pícrico, introduzindo 230  $\mu\text{L}$  de amostras previamente diluídas e filtradas com carvão activado. O reactor é termosta-tizado, apresentando dois intervalos de concentração onde a metodologia é aplicável, consoante a temperatura (1,00-2,75  $\text{g.L}^{-1}$  a 80° C e 0,3-0,5  $\text{g.L}^{-1}$  a 95° C). A mesma montagem foi usada no método do Cu(II)-neocuproína, sendo intercalados 45,3  $\mu\text{L}$  de amostra também diluída e filtrada por carvão activado. Também neste caso são descritos dois intervalos de concentração onde a metodologia é aplicável (1,0-7,0  $\text{g.L}^{-1}$  a 50° C e 0,05-1,0  $\text{g.L}^{-1}$  a 75° C). Finalmente é apresentado um sistema «FIA reverso» baseado no método de Nelson-Somogyi. Este sistema é adequado para amostras com conteúdos em açúcares redutores entre 3,0 a 6,0  $\text{g.L}^{-1}$  a 65° C e 1,0 a 2,8  $\text{g.L}^{-1}$  a 71° C. Este último método tem a vantagem de não ser necessária a descolorização da amostra.

A determinação de carbanato total (Anónimo, 1983a) em diferentes tipos de bebidas, entre as quais vinhos espumosos, foi estudada pela firma Tecator, constituindo uma determinação integrada no sistema FIA comercializado por esta firma. A amostra é introduzida num fluxo de ácido diluído de modo a converter as diferentes formas de carbonato em dióxido de carbono, que em seguida é difundido para um outro canal através de uma membrana de PTFE. A mudança de cor da solução aceitadora é relacionada com a concentração da amostra. O sistema é aplicável a amostras que contenham teores em  $\text{CO}_2$  entre 1 e 9  $\text{g.L}^{-1}$ .

A determinação de  $\text{SO}_2$  total (Anónimo, 1983b), entre 50 e 300  $\text{mg.L}^{-1}$ , é apresentada pela mesma firma. Neste sistema, semelhante ao anterior, o fluxo de aceitador contém a pararosanilina como reagente de desenvolvimento de cor.

Ainda no que se refere à determinação  $\text{SO}_2$ , Sullivan *et al.* (1986) propuseram um sistema incorporando também uma unidade de difusão de gás. A medida é baseada na extensão da descoloração do verde de malaquite. Este método foi aplicado

a extractos de diversos produtos alimentares, entre os quais um vinho branco e um tinto. O sistema apresenta um limite inferior de detecção de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , superior de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , consumindo-se  $50 \mu\text{L}$  de amostra por injeção.

Hernandez-Mendez *et al.* (1987) desenvolveram uma metodologia FIA em que usaram um método iodométrico para a determinação de  $\text{SO}_2$  em que o reagente, o anião triiodeto, é gerado no próprio sistema. Este processo foi usado em amostras diluídas de vinhos brancos e rosados, e é aplicável no intervalo de concentrações entre  $0,2$  e  $15 \text{ mg.L}^{-1}$ .

A automatização por FIA do índice de polifenóis totais em vinhos brancos utilizando o método de Jerumanis foi desenvolvida por Buitrago *et al.* (1986), tendo otimizado os diversos parâmetros do sistema utilizando o método «Simplex».

*Detecção amperométrica.* A utilização de detectores amperométricos em sistemas de fluxo tem sido amplamente utilizada, nomeadamente em HPLC e em FIA.

Embora a detecção amperométrica apresente um grande potencial no que se refere à sua aplicação em vinhos, devido nomeadamente ao facto do sinal analítico não ser afectado pela coloração das soluções, apenas Granados *et al.* (1986) desenvolveram um sistema para uma determinação em vinhos, o dióxido de enxofre, usando este tipo de detector. O sistema engloba uma unidade de difusão de gás para isolar o  $\text{SO}_2$ , que em seguida é dirigido para a célula electroquímica, de configuração tipo «wall-jet», usando como eléctrodo de trabalho um eléctrodo de carbono vítreo. As amostras necessitam de serem diluídas antes de serem intercaladas no sistema de modo a evitar interferências na membrana de difusão. A  $25^\circ \text{C}$  a metodologia apresenta duas zonas de resposta linear,  $0,06$  a  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $12$  a  $110 \text{ mg.L}^{-1}$ , e a  $50^\circ \text{C}$  uma só zona, compreendida entre  $0,04$  e  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

*Detecção entalpimétrica.* A entalpimetria tem sido muito pouco usada como processo de detecção em FIA, talvez devido ao facto de não ser selectivo.

Oliveira e Pasquini (1988) apresentam um sistema bicanal para a determinação de etanol, usando como detector um par de termístores, o indicador e o de referência, ligados a uma



ponte de wheatstone contínua. A determinação tem de ser efectuada no destilado dos vinhos.

*Espectrometria de Absorção Atómica.* A concentração dos cátions metálicos cálcio, magnésio, ferro, manganês, zinco, e cobre em vinhos é usualmente determinada por espectrometria de absorção atómica. Como o respectivo teor é vulgarmente, com excepção do cobre, superior ao intervalo de concentrações onde esta metodologia é aplicável, as amostras têm que ser diluídas, por vezes bastante extensamente, antes de se efectuar a medida, sendo ainda, em alguns casos, necessário adicionar reagentes para eliminar interferências. A execução destes procedimentos prévios de diluição e introdução da amostra usando a metodologia FIA foi desenvolvida por Lima e Rangel (1990). Para isso, desenvolveram três montagens cujas configurações foram essencialmente condicionadas pela extensão da diluição que era necessária submeter a amostra para realizar as determinações numa zona linear, a necessidade de adição de reagentes e ainda pelo modo de funcionamento do sistema de detecção. Para conseguir a necessária diminuição do sinal analítico foram utilizadas duas estratégias. Por um lado a diluição no interior do próprio sistema, usando sistemas com divisão de fluxo, que se revelaram eficazes para evitar um excessivo alargamento do sinal transiente. Por outro, a imposição de um caudal à entrada do nebulizador superior ao de aspiração da própria aparelhagem provocando a redução do sinal analítico por diminuição da eficácia de nebulização, e ainda a diminuição da influência das propriedades físicas da matriz. Com estes sistemas é possível efectuar a determinação numa zona de resposta linear, sem qualquer tratamento prévio, de amostras de todos os tipos de vinhos nos intervalos de concentrações de 1,4-200 mg.L<sup>-1</sup> para cálcio, 0,9-200 mg.L<sup>-1</sup> para magnésio, 0,09-20 mg.L<sup>-1</sup> para ferro, 0,1-6 mg.L<sup>-1</sup> para manganês, 0,02-2 mg.L<sup>-1</sup> para zinco, e 0,04-4 mg.L<sup>-1</sup> para cobre, com ritmos de amostragem entre 240 e 360 amostras por hora.

*Espectrometria de emissão da chama.* Para efectuar a determinação de sódio e potássio, Lima e Rangel (1990) desenvolveram um sistema de elevada dispersão, recorrendo também a uma divisão de fluxo e impondo um caudal à entrada do nebulizador cerca de três vezes superior ao de aspiração do fotómetro. Com

este sistema é possível efectuar determinações de sódio e potássio em vinhos numa zona de dependência linear, também sem qualquer tratamento prévio, entre 3 a 200 mg.L<sup>-1</sup>, e 23 a 2000 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

*Potenciometria.* A potenciometria é, em princípio, um processo de detecção bastante adequado para FIA pois apresenta a mesma sensibilidade num amplo intervalo de concentrações, o sinal analítico não é afectado pela cor ou turvação da amostra, e não exige um tratamento químico complexo das amostras. No entanto a sua aplicação tem sido limitada pelas dificuldades de natureza mecânica que advêm da intercalação das unidades convencionais numa montagem FIA. A solução destes problemas passa pela construção de detectores de configuração tubular (Alegret *et al.*, 1984; Alonso *et al.*, 1986) que apresentam a vantagem de não distorcerem o fluxo, possibilitando mesmo a realização de determinações sequenciais. Lima e Rangel (1989) desenvolveram um sistema FIA para efectuar o doseamento do anião cloreto em vinhos. A realização de uma titulação em FIA, sem paralelo em sistemas SFA, tira partido do perfil de dispersão altamente reprodutível e controlável do segmento de amostra no transportador. Na montagem FIA desenvolvida para esta determinação, a amostra contendo anião cloreto (o titulado no sentido clássico), é intercalada no transportador contendo catião prata (o titulante no sentido da volumetria convencional). O perfil de concentração gerado numa câmara de mistura com agitação mecânica, que corresponde a uma diminuição de concentração de catião prata no transportador é monitorada num eléctrodo tubular de prata, recoberto com sulfureto de prata. Com este sistema é possível determinar anião cloreto em amostras que contenham entre 5 e 600 mg.L<sup>-1</sup>, com um ritmo de amostragem de 120 e 60 amostras por hora para respectivamente, os limites inferior e superior de concentração citados.

### CONCLUSÕES

A descrição efectuada permite evidenciar as vantagens da aplicação da Análise por Injecção em Fluxo no doseamento de componentes de vinhos, bem como das suas vantagens relativamente aos sistemas de fluxo segmentado. A maior versatilidade da metodologia FIA permite a utilização de uma maior diversi-

dade de processos de detecção, designadamente a espectrofotometria de absorção atómica (Lima e Rangel, 1990), potenciometria (Lima e Rangel, 1989), e a amperometria (Granados *et al.*, 1986). Os ritmos de amostragem são bastante elevados, podendo atingir as 360 amostras por hora (Lima e Rangel, 1990), e apresentam um baixo consumo de reagentes.

O baixo custo das montagens é outro dos aspectos que certamente irá contribuir para impor a metodologia FIA como o processo privilegiado na automatização da análise de vinhos, permitindo torná-la acessível à maior parte dos laboratórios de controlo.

Uma vez que se tem assistido a uma utilização crescente de métodos baseados em análises enzimáticas, o recurso a sistemas FIA, mesmo com configurações simples, poderá reduzir significativamente os custos unitários das determinações.

Finalmente, é de prever que o desenvolvimento da aplicação do FIA à análise de vinhos passará pela utilização de técnicas já usadas em outras áreas. Destas, poderemos realçar a análise multiparamétrica com o uso sequencial de detectores diferentes (Alonso *et al.*, 1986), a introdução da amostra com válvulas de injeção que permitam a determinação de mais de um parâmetro na mesma amostra (Araújo *et al.*, 1989) ou ainda na economia de reagentes enzimáticos, que pode ser 20 vezes inferior à actualmente usada na aparelhagem SFA (Alonso *et al.*, 1988).

#### AGRADECIMENTOS

À NATO pelo apoio financeiro concedido através do projecto SFS-PO-FOOD-CHEM, PO-PORTO FOOD, SP B.

#### RÉSUMÉ

##### **L'analyse par injection dans un flux en oenologie**

Une révision de l'application en oenologie de l'Analyse par Injection dans un Flux (FIA), ainsi qu'une étude de son développement prévisible sont présentées. De plus, on décrit ses principes fondamentaux, et les techniques basiques associées.

#### SUMMARY

##### **Flow injection analysis applicaion in wine analysis**

The Flow Injection Analysis (FIA) application to wine analysis, as well as its prospects is presented. The FIA fundamentals, basic components and techniques are also referred.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegret, S.; J. Alonso; J. Bartroli; A. A. S. C. Machado; J. L. F. C. Lima e M. Paulis  
1987 Construction of equipment for potentiometric determinations in flow injection analysis. *Quím. Anal.*, **6**: 278-292.
- Alegret, S.; J. Alonso; J. Bartroli; J. M. Paulis; J. L. F. C. Lima e A. A. S. C. Machado  
1984 Flow-through tubular PVC matrix membrane electrode without inner reference solution for flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, **164**: 147-152.
- Alonso, J.; A. N. Araújo; J. Bartroli; J. L. F. C. Lima e M. Poch  
1988 Determinação de glucose por análise de injeção em fluxo com recirculação enzimática. *Resumo das lições plenárias e das comunicações ao 11.º Encontro Anual da Sociedade Portuguesa de Química*. Comunicação AA-P4.8, Lisboa.
- Alonso, J.; J. Bartoli; J. L. F. C. Lima e A. A. S. C. Machado  
1986 Sequential flow injection determinations of calcium and magnesium in waters. *Anal. Chim. Acta*, **179**: 503-508.
- Anónimo  
1983a Determination of total carbonate in beverages (refreshing drinks, sparkling wines, etc.) by flow injection analysis. *Tecator, Application Note*, ASN, 66-21.  
1983b Determination of total sulphite in wine by flow injection analysis and gas diffusion. *Tecator, Application Note*, ASN, 61-23.
- Araújo, A. N.; J. L. F. C. Lima; A. O. S. S. Rangel; J. Alonso; J. Bartroli e R. Barber  
1989 Simultaneous determination of total iron and chromium (VI) in waste water with a flow injection system based on the sandwich technique. *Analyst*, **114**: 1465-1468.
- Buitrago, J.; R. Cela e J. A. Pérez-Bustamante  
1986 Determinación automatizada del índice de polifenoles totales en vinos blancos mediante análisis por inyección en flujo (FIA). *Afinidad*, **XLIII** (406): 530-586.
- Curvelo-García, A. S. e J. C. Bouvier  
1988 A análise automática en enologia. *Enología* (12): 27-43.
- Granados, M.; S. MasPOCH e M. Blanco  
1986 Determination of sulphur dioxide by flow injection analysis with amperometric detection. *Anal. Chim. Acta*, **179**: 445-451.
- Hernandez-Mendez, J.; A. Alonso Mateos; C. Garcia de Maria e R. M. Garcia Alcantara  
1987 Determinación de anhídrido sulfuroso en vinos mediante análisis por inyección en flujo. *IX Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros*, Almendralejo, Espanha.
- Lázaro Boza, F.; D. Luque de Castro e M. Valcárcel Cases  
1985 Flow injection environmental analysis: a review. *Analisis*, **13** (4): 147-159.

- Lázaro, F.; M. D. Luque de Castro e M. Valcárcel  
1986a Individual and simultaneous enzymatic determination of ethanol and acetaldehyde in wines by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, **185**: 57-64.  
1986b Photometric determination of tartaric acid in wine by flow injection analysis. *Analyst*, **111**: 729-732.
- Lima, J. L. F. C. e A. O. S. S. Rangel  
1990 Determination of metallic cations in wines by flow injection analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**: 284-288.  
1989 Chloride pseudotitration in wines by FIA with a Ag<sub>2</sub>/Sg tubular electrode as detector. *J. Food Comp. Anal.*, **2**: 356-363.
- Maquieira, A.; M. Dolores Duque de Castro e M. Valcárcel  
1987 Determination of reducing sugars in wine by flow injection analysis. *Analyst*, **112**: 1569-1572.
- Oliveira, W. A. e C. Pasquini  
1988 Determination of ethanol using flow injection enthalpimetry. *Analyst*, **113**: 359-360.
- Reijn, J. M.; W. E. Van der Linden e H. Poppe  
1981 Dispersion in open tubes and tubes packed with large glass beads. The single bead string reactor. *Anal. Chim. Acta*, **123**: 229-237.
- Rocks, B. e C. Riley  
1982 Flow-injection analysis: A new approach to quantitative measurements in clinical chemistry. *Clin. Chem.*, **28** (3): 409-421.
- Ruz, J.; A. Rios; M. D. Luque de Castro e M. Valcárcel  
1988 Determination of glucose in alcoholic beverages by flow injection with two internally coupled injection valves and an enzyme reactor. *Anal. Chim. Acta*, **211**: 281-285.
- Ruzicka, J. e E. H. Hansen  
1975 Flow Injection Analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, **78**: 145-157.  
1988 *Flow Injection Analysis* (2nd Ed). John Wiley & Sons, New York.
- Skeggs, L. T.  
1957 An automated method for colorimetric analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**: 311-322.
- Stewart, K. K.; G. R. Beecher e P. E. Hare  
1976 Rapid analysis of discrete samples: The use of nonsegmented, continuous flow. *Anal. Biochem.*, **70**: 167-173.
- Sullivan, J. J.; T. A. Hollingworth; M. M. Wekell; R. T. Newton e J. E. Larose  
1986 Determination of sulfite in food by flow injection analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69** (3): 542-546.
- Worsfold, P. J.; J. Ruzicka e E. H. Hansen  
1981 Rapid automated enzymatic method for the determination of alcohol in blood and beverages using flow injection analysis. *Analyst*, **106**: 1309-1317.

