



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PAULO ALBERTO BEZERRA DA SILVA

Desenvolvimento de métodos espectrométricos para a determinação de açúcar redutor em vinho e determinação de íons Cu^{2+} e Hg^{2+} em amostras águas fluviais e cachaça utilizando carbon dots

Recife
2017

PAULO ALBERTO BEZERRA DA SILVA

Desenvolvimento de métodos espectrométricos para a determinação de açúcar redutor em vinho e determinação de íons Cu^{2+} e Hg^{2+} em amostras águas fluviais e cachaça utilizando carbon dots

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Silveira Paim

Orientador: Prof. Dr. André Fernando Lavorante

Recife

2017

Catálogo na fonte
Bibliotecário Jefferson Luiz Alves Nazareno CRB4-1758

S586d Silva, Paulo Alberto Bezerra da.
Desenvolvimento de métodos espectrométricos para a determinação de açúcar redutor em vinho e determinação de íons de Cu^{2+} E Hg^{2+} em amostras de águas fluviais e cachaça utilizando carbon dots / Paulo Alberto Bezerra da Silva. – 2017.
112 f. : fig.

Orientadora : Ana Paula Silveira Paim.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN.
Química fundamental. Recife, 2017.
Inclui referências.

1. Química analítica. 2. Espectrometria. 3. Vinho. I. Paim, Ana Paula Silveira. (Orientador). II. Título.

543

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2018-44

PAULO ALBERTO BEZERRA DA SILVA

"DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR EM VINHO E DETERMINAÇÃO DE ÍONS Cu^{2+} E Hg^{2+} EM AMOSTRAS ÁGUAS FLUVIAIS E CACHAÇA UTILIZANDO CARBON DOTS."

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 28/08/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Ana Paula Silveira Paim (Orientadora)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Claudete Fernandes Pereira

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. William Toito Suarez

Departamento de Química
Universidade Federal de Viçosa

Profa. Raquel Milani

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Prof. Ricardo Saldanha Honorato

Ministério da Justiça e Segurança Pública - Polícia Federal

Dedico este trabalho a minha amada esposa Elaine pelo apoio emocional, compreensão, amizade e amor, em todos esses anos que estamos juntos.

Ao meu amado filho Paulo Miguel, pelo sorriso nos momentos difíceis e por ser o meu maior incentivo.

Com muito amor e carinho aos meus avós, José Soares e Maria Zenaide.

A minha mãe Edilza por toda compreensão e apoio dedicado.

A minha tia Maria que sempre me apoiou e compreensão.

A toda minha família pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo Dom da vida e me conceder a graça de terminar não só o doutorado mais de conhecer pessoas especiais neste longo caminho, pessoas que me ajudaram com palavras de apoio e compreensão, essenciais no doutoramento.

Aos meus orientadores André F. Lavorante e Ana Paula S. Paim, pela confiança, oportunidade e ensinamentos científicos.

A minha co-orientadora Mônica Belian, pela amizade, ensinamentos e ajuda científica.

Ao meu amigo Gustavo Campelo, pela ajuda e discussões científicas que ajudaram muito na realização deste trabalho.

Ao meu amigo Gilson Bezerra, pela ajuda e discussões científica.

A professora Conceição da Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia - Portugal, pela realização de algumas análises em seu laboratório

A todos os colegas que fazem parte do grupo SALA F.

A todos os professores e alunos do LAQIS.

A todos os amigos que participaram de maneira direta ou indiretamente.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos, o primeiro utiliza espectrofotometria UV/Visível para a determinação de açúcares redutores em vinho e o segundo utiliza a espectrofluorimetria para a determinação íons Hg^{2+} e Cu^{2+} , em amostras de água e cachaça, empregando *carbon dots*. O método para a determinação de açúcares redutores em vinho foi desenvolvido utilizando a multicomutação em fluxo. O sistema em fluxo proposto consiste de 5 minibombas solenóide para a propulsão e gerenciamento das soluções, controladas por um computador com programa desenvolvido em LabVIEW® e uma diálise em linha, com a função de minimizar os potenciais interferentes e diluição das amostras. O método proposto é baseado na reação de óxido-redução e do complexo formado entre o cobre e neocuproína ($[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$) com o açúcar redutor (AR), em meio alcalino, o qual foi monitorado espectrofotometricamente em 460 nm. O açúcar reduz Cu^{2+} a Cu^+ , resultando em mudança de coloração de verde ($[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$) para laranja ($[(\text{Cu-Neo})_2]^+$). O sistema proposto apresentou uma faixa de trabalho entre 0,25 a 4,0 g L^{-1} , coeficiente de correlação linear $r = 0.9975$, RSD de 2,6% ($n = 12$), LD e LQ de 0,03 e 0,1 g L^{-1} , respectivamente. O sistema apresentou também alta frequência analítica de 45 determinações $\cdot \text{h}^{-1}$ e baixo consumo de reagentes e amostra. O método proposto foi comparado ao método oficial AOAC e através do teste t, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados ao nível de confiança de 95%. O segundo trabalho desenvolvido foi baseado na propriedade luminescente dos *carbon dots* (CD). O CD foi sintetizado através do método hidrotermal, partindo do ácido cítrico como precursor e tiosemicarbazida como passivante. O CD obtido foi caracterizado por microscopia de transmissão e espectrometria de infravermelho, absorção e fluorescência. Foram observadas bandas intensas e definidas de excitação e emissão em 365 e 440 nm, respectivamente. O método proposto foi aplicado na determinação de Hg^{2+} em amostras de água e Cu^{2+} em amostras de água e cachaça. A determinação de Hg^{2+} apresentou faixa de trabalho entre 1,0 e 15,0 mg L^{-1} , $r = 0,9973$, RSD de 2,9% ($n=10$), LD e LQ de 0,20 e 0,65 mg L^{-1} , respectivamente, em pH 6,0. A determinação do íon Cu^{2+} apresentou faixa de trabalho entre 1,0 a 10,0 mg L^{-1} , $r = 0,9964$, RSD de 3,2% ($n=10$), LD e LQ de 0,15 e 0,50 mg L^{-1} , respectivamente, em pH 10,0. O método apresentou supressão da luminescência tanto para a determinação do íon Hg^{2+} , quanto para Cu^{2+} , os quais

foram comparados ao método de referência, através do teste t, com intervalo de confiança de 95% e não foram observadas diferenças significativas entre os resultados entre os resultados obtidos.

Palavras-chave: Espectrometria. Vinho. Multicomutação. Açúcar redutor. Carbon dots.

ABSTRACT

In this work two methods were developed, the first one uses UV / Visible spectrophotometry for the determination of reducing sugars in wine and the second uses spectrofluorimetry for the determination of Hg^{2+} and Cu^{2+} ions in water and cachaça samples using carbon dots. The method for the determination of reducing sugars in wine was developed using multicomputing in flow. The proposed flow system consists of 5 solenoid minibuses for the propulsion and management of the solutions, controlled by a computer with a program developed in LabVIEW® and in-line dialysis, in order to minimize the potential interferences and dilution of the samples. The proposed method is based on the oxide-reduction reaction and the complex formed between copper and neocuproin ($[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$) with the reducing sugar (AR) in alkaline medium, which was monitored spectrophotometrically in 460 nm. The sugar content of Cu^{2+} is reduced to Cu^+ , resulting in a change in the color of green ($[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$) to orange ($[(\text{Cu-Neo})_2]^+$). 25 to 4.0 g L⁻¹, linear correlation coefficient $r = 0.9975$, RSD of 2.6% ($n = 12$), LD and LQ of 0.03 and 0.1 g L⁻¹, respectively. The proposed method was compared to the official AOAC method, by means of the test and no significant differences were observed between the results at the 95% confidence level. The CD was synthesized by the hydrothermal method, starting from the citric acid as precursor and thiosemicarbazide as passivante. The CD obtained was characterized by transmission microscopy and infrared spectrometry, absorption and fluorescence. and defined excitation and emission at 365 and 440 nm, respectively. The proposed method was applied in the determination of Hg^{2+} in water and Cu^{2+} samples in water and cachaça samples. The determination of Hg^{2+} showed a working range between 1.0 and 15.0 mg L⁻¹, $r = 0.9973$, RSD of 2.9% ($n = 10$), LD and LQ of 0.20 and 0.65 mg L⁻¹, respectively, at pH 6.0. The determination of the Cu^{2+} ion showed a range of 1.0 to 10.0 mg L⁻¹, $r = 0.9964$, RSD of 3.2% ($n = 10$), LD and LQ of 0.15 and 0.50 mg L⁻¹, respectively, at pH 10.0. The method showed suppression of the luminescence both for the determination of the Hg^{2+} ion and Cu^{2+} , which were compared to the reference method, through the t-test, with a 95% confidence interval and no significant differences were observed between the results obtained.

Keywords: Spectrometry. wine. Multicomutation. Reducing sugar. Carbon dots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Regiões brasileiras produtoras de vinho	24
Figura 2-	Estrutura molecular: a) Glicose; b) Frutose	31
Figura 3-	Configuração geral de um sistema em fluxo. A: Amostra; R: Reagente; BP: bomba peristáltica; VI: Válvula de Injetor; BR: Bobina de reação; D: detector; e W: descarte.	38
Figura 4-	Diagrama do sistema em fluxo multicomutado. P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄ , P ₅ , = minibombas solenoide; R ₁ = NaOH (1 mol L ⁻¹); S = Amostra; R ₂ = [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ (0,1 mol L ⁻¹); C _s = Transportador (H ₂ O); x = confluência; BT = Banho Termostático; R = Reator; UD = Unidade de Diálise; D = Detector; W = Descarte.	44
Figura 5-	Diagrama esquemático do circuito de acionamento das minibombas solenoide.....	46
Figura 6-	Célula de difusão líquida (CDL). A: desenho esquemático mostrando duas placas de acrílico com h = 1,5 cm, c = 7 cm e L = 7 cm, presas por parafusos, no centro duas borrachas de 1 mm de espessura e entre essas borrachas a membrana de acetato celulose utilizada na diálise: B: visão lateral; C: visão superior.	47
Figura 7-	Painel frontal do software de controle das minibombas e aquisição de dados	48
Figura 8-	Mudança de coloração de verde (Cu(neocup) ₂] ²⁺) para Laranja ([Cu(neocup) ₂] ⁺)	50
Figura 9-	Espectro de absorção da reação entre AR e [(neo) ₂ Cu] ²⁺	53
Figura 10-	Estudo da concentração do complexo [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ . Condições experimentais: 1,0 g L ⁻¹ AR; 0,010 mol L ⁻¹ de NaOH, banho termostatizado a 65 °C; proporção volumétrica de 1: 1: 1 (v / v), com 10 pulsos para cada solução e 10 ciclos de amostragem (400 µL de cada solução), reator de 100 cm e detecção a 460 nm.	55
Figura 11-	Estudo da concentração de NaOH. Condições experimentais: 1,0 g L ⁻¹ AR; 0,01 mol L ⁻¹ [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ ; banho termostatizado a 65 °C; proporção volumétrica de 1: 1: 1 (v / v), com 10 pulsos para cada solução e 10 ciclos de amostragem (400 µL de cada solução); reator de 100 cm e detecção a 460 nm	56

Figura 12-	Estudo da temperatura.....	57
Figura 13-	Estudo do volume da solução de NaOH. Condições experimentais: 0,01 mol L ⁻¹ [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ ; 0,050 mol L ⁻¹ de NaOH; proporção volumétrica de 1: 1 (AR: [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ ; v / v), com 10 pulsos para cada solução e 10 ciclos de amostragem (400 µL de cada solução); banho termostatizado a 85 °C; reator de 100 cm e detecção a 460 nm.....	58
Figura 14-	Estudo do volume da solução de referência AR. Condições experimentais: 0,010 mol L ⁻¹ de [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ ; 0,050 mol L ⁻¹ de NaOH; proporção volumétrica de 0,8:1 (NaOH: [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ ; v/v), com 8 (320 µL) e 10 (400 µL) pulsos para cada solução, respectivamente, e 10 ciclos de amostragem; banho termostatizado a 85 °C; reator de 100 cm e detecção a 460 nm.	59
Figura 15-	Estudo do volume da solução [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ . Condições experimentais: 1,0 g L ⁻¹ de AR; 0,010 mol L ⁻¹ de [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ ; 0,050 mol L ⁻¹ de NaOH; proporção volumétrica de 2:1 (NaOH: AR; v / v), com 8 (320 µL) e 4 (160 µL) pulsos para cada solução, respectivamente, e 10 ciclos de amostragem; banho termostatizado a 85 °C; reator de 100 cm e detecção a 460 nm.....	61
Figura 16-	Estudo do número de ciclos. Condições experimentais: 1,0 g L ⁻¹ AR; 0,010 mol L ⁻¹ [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ ; 0,050 mol L ⁻¹ NaOH; proporção volumétrica de 2:1:4 (NaOH / AR / [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ , v / v), com 8 (320 µL), 4 (160 µL) e 16 (640 µL) pulsos para cada solução, respectivamente, e 10 ciclos de amostragem; banho termostatizado a 85 °C; reator de 100 cm e detecção a 460 nm.	63
Figura 17-	Sinais analíticos obtidos para diferentes concentrações de AR e curva analítica	65
Figura 18-	Sinais analíticos obtidos de repetições de análises realizadas para calcular o RSD%.	66
Figura 19-	Evolução de diferentes tipos de síntese de CD. <i>Figura adaptada</i> (BAKER; BAKER, 2010).....	74
Figura 20-	Esquema da síntese de CD usando ácido cítrico e tiosemicarbazida..	87
Figura 21-	Ilustração da excitação e emissão do CD	90
Figura 22-	Espectro de excitação e emissão do CD.....	91

Figura 23-	Gráfico de estabilidade do CD	92
Figura 24-	Espectro de absorção do CD.	93
Figura 25-	Formulas estruturais do ácido cítrico e tiosemicarbazida	93
Figura 26-	Espectro de infravermelho (Transmitância x número de onda (cm^{-1}) ..	94
Figura 27-	Microscopia eletrônica de transmissão do CD.....	95
Figura 28-	Efeito de alguns íons metálicos em pH 6,0, na intensidade de luminescência do CD.	96
Figura 29-	Efeito de alguns íons metálicos em pH 10,0, na intensidade de luminescência do CD.	97
Figura 30-	A - Espectro de fluorescência do CD na presença de Hg^{2+} na faixa de 1 a 15 mg L^{-1} , em pH 6,0; B - curva analítica na faixa de 1 a 10 mg L^{-1} Hg^{2+}	97
Figura 31-	A: Espectro de fluorescência de CD em presença de várias concentrações de Cu^{2+} na faixa de 1 a 8 mg L^{-1} , em pH 10,0. B: curva analítica na faixa de 1 a 10 mg L^{-1} Cu^{2+}	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação dos vinhos quanto ao teor de açúcar.	34
Tabela 2-	Reagentes e solventes	43
Tabela 3-	Sequência de acionamento das minibombas solenoide.	45
Tabela 4-	Equação da curva e coeficiente de correlação linear do estudo do volume da solução de NaOH.....	58
Tabela 5-	Equação da curva e coeficiente de correlação linear do estudo de volume do AR.....	60
Tabela 6-	Equação da curva e coeficiente de correlação linear do estudo do volume do [(Cu-Neo) ₂] ²⁺	62
Tabela 7-	Parâmetros químicos e físicos obtidos na otimização do sistema em fluxo	64
Tabela 8-	Teste comparativo entre o método oficial e o método proposto.....	67
Tabela 9-	Comparação de métodos encontrados na literatura para determinação de AR em vinhos	68
Tabela 10-	Preparo das soluções tampão.....	85
Tabela 11-	Reagentes e solventes	86
Tabela 12-	Parâmetros do método proposto por determinação.....	99
Tabela 13-	Testes de recuperação e comparação dos resultados obtidos com o método proposto e o método oficial para as diferentes amostras analisadas.....	100
Tabela 14-	Figuras de mérito do método proposto para determinar Hg ²⁺ e Cu ²⁺	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ANR	Açúcares não-Redutores
AR	Açúcares Redutores
ART	Açúcares Redutores Totais
CDL	Célula de Difusão Líquida
CD	<i>Carbon Dots</i>
CQD	carbon quantum dots
DU	Unidade de diálise
FAAS	Espectrômetro de absorção atômica com chama, do inglês: <i>Flame Atomic Absorption Spectrometer</i>
FIA	Análise por injeção em fluxo, do inglês, <i>flow injection analysis</i>
IR	Infravermelho
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MCFA	Multicomutação em análise em fluxo, do inglês, multicommutation flow analysis
MET ou TEM	Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês, <i>Transmission Electron Microscope</i> ,
MPFS	Sistema em fluxo multi-bombeado, do inglês, <i>Multi-pumping flow systems</i>)
MSFIA	Análise por injeção de fluxo multi-seringa, do inglês, <i>multisyringe flow injection analysis</i>)
MWCNT	Nanotubos de carbono de múltiplas camadas, do inglês, <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>
NIR	Infravermelho próximo, do inglês, <i>Near Infrared</i>
PCs	Pontos de carbono
PEG	Carbono e polietileno glicol
PPEI-EI	Propionil etilenoimina-co-etilenoimina
QD	Quantum Dots
QY	Rendimento quântico absoluto, do inglês, <i>Quantum yield</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês, Relative Standard Deviation
SD	Desvio Padrão, do inglês, Standard Deviation

SAI	Análise por injeção sequencial do inglês: <i>Sequential Injection Analysis</i>
Si-dots	<i>Silicon dots</i>
SWCNTs	Nanotubos de carbono de simples camadas do inglês, <i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>
UV/VIS	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EM FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES EM VINHOS	21
2.1	OBJETIVOS	22
2.1.1	Objetivo geral	22
2.1.2	Objetivos específicos	22
2.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.2.1	História do vinho	23
2.2.2	Etapas de Elaboração do Vinho	25
2.2.3	Colheita	25
2.2.4	Desengace e esmagamento	25
2.2.5	Fermentação	25
2.2.5.1	Fermentação alcoólica	26
2.2.5.2	Fermentação lenta	26
2.2.5.3	Fermentação malolática	27
2.2.6	Estabilização	27
2.2.6.1	Estabilização Tartárica	28
2.2.6.2	Filtração	28
2.2.7	Engarrafamento e envelhecimento	28
2.2.8	Composição	28
2.2.9	Classificação	32
2.2.10	Quanto à classe	32
2.2.11	Quanto à cor	33
2.2.12	Quanto ao teor de açúcar	33

2.2.13	Determinação de açúcar redutor em vinho	34
2.2.14	Análise em fluxo.....	37
2.3	MATERIAIS UTILIZADOS	41
2.3.1	Equipamentos e Acessórios	41
2.3.2	Soluções	41
2.3.3	Solução estoque	41
2.3.4	Soluções de trabalho	42
2.3.5	Amostras	43
2.3.6	Descrição geral do sistema	43
2.3.7	Descrição do programa	47
2.4	METODOLOGIA	49
2.4.1	Método proposto.....	49
2.4.2	Método de referência Lane-Eynon	50
2.4.2.1	Expressão dos resultados	52
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
2.5.1	Aspectos Gerais.....	53
2.5.2	Otimização do sistema proposto	54
2.5.2.1	Efeito da concentração de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ e NaOH.....	54
2.5.2.2	Efeito da Temperatura.....	56
2.5.2.3	Efeito da razão volumétrica de NaOH/AR/ $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$	57
2.5.2.3.1	<i>Efeito do volume da zona de amostragem.....</i>	<i>62</i>
2.6	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	64
2.6.1	Figuras de mérito	68
3	CONCLUSÃO	69

4	SÍNTESE DE CARBON DOTS E SEU EMPREGO NA DETERMINA ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE ÍONS Hg²⁺ e Cu²⁺ EM AMOSTRAS DE ÁGUA E CACHAÇA	70
4.1	OBJETIVOS	71
4.1.1	Objetivo geral	71
4.1.2	Objetivos específicos	71
4.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	72
4.2.1	Carbon Dots.....	72
4.2.2	Metodologias de síntese dos CD	75
4.2.2.1	Métodos " <i>top-down</i> "	75
4.2.2.2	Métodos " <i>bottom-up</i> "	76
4.2.2.3	Mecanismo de fluorescência dos carbon dots	77
4.2.3	Aplicações	78
4.2.3.1	Bioimagens.....	78
4.2.3.2	Biosensor.....	80
4.2.3.3	Sistema de distribuição biomédica.....	80
4.2.3.4	Fotocatálise.....	81
4.2.3.5	Quimiossensor	81
4.3	MATERIAIS UTILIZADOS	84
4.3.1	Equipamentos e Acessórios	84
4.3.2	Soluções	84
4.3.3	Reagentes e Solventes	85
4.3.4	Amostras	86
4.4	METODOLOGIA	87
4.4.1	Síntese do <i>carbon dots</i>.....	87

4.4.2	Procedimento experimental	87
4.4.3	Caracterização do CD	88
4.4.3.1	Espectroscopia de fluorescência	88
4.4.3.2	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV/VIS)	88
4.4.3.3	Espectrometria na região do infravermelho (IR)	88
4.4.3.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	88
4.4.3.5	Rendimento quântico	89
4.4.4	Estudo de pH e seletividade.....	89
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4.5.1	Síntese do <i>Carbon dots</i>.....	90
4.5.2	Caracterização de CD	90
4.5.2.1	Espectroscopia de fluorescência	90
4.5.2.2	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV/VIS)	92
4.5.2.3	Espectrometria na região do infravermelho	93
4.5.2.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	95
4.5.2.5	Rendimento quântico	95
4.5.2.6	Estudo de pH e seletividade.....	96
4.6	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	99
4.6.1	Aspectos gerais	99
4.6.2	Validação	99
5	CONCLUSÃO	102
6	PERSPECTIVAS	103
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

A espectrometria é um conjunto de métodos analíticos baseados nas propriedades dos átomos e moléculas de absorver ou emitir energia em uma determinada região do espectro eletromagnético. As medidas baseadas nestas radiações são amplamente empregadas na química analítica, os métodos de análise são baseados na radiação produzida e absorvida pela espécie de interesse. Os métodos espectroquímicos tem desempenhado papel fundamental na elucidação de estruturas moleculares na determinação qualitativa e quantitativa de espécies químicas (SKOOG; HOLLER; WEST, 2010).

Os métodos espectrométricos podem ser classificados de acordo com a região da radiação eletromagnética empregada na determinação e incluem ultravioleta (UV), infravermelho, micro-ondas, entre outros. A interação da matéria com estas radiações fornece informações importantes a respeito do material analisado, podendo ocorrer fenômenos de difração, reflexão, refração, absorção e emissão (Pavoni et al., 2014).

Ao irradiar uma determinada amostra, essa radiação pode ser espalhada, refletida e absorvida. Na espectroscopia de absorção pode-se obter informações qualitativas e quantitativas desta amostra através da atenuação do feixe de radiação fornecida, pois parte desta radiação é absorvida pela amostra, esta atenuação é proporcional à concentração do analito que se deseja determinar. Através desse método é possível descobrir propriedades específicas e quantificar a espécie desejada através de curvas analíticas (SKOOG; HOLLER; WEST, 2010)..

Na espectroscopia de fotoluminescência a espécie analisada ao ser excitada por radiação de comprimento de onda específica emite fótons, os quais são medidos e quantificados em sua intensidade. As formas mais importantes de fotoluminescência para os propósitos analíticos são as espectroscopias de fluorescência e fosforescência. Estas duas formas de emissão acontece pela absorção da radiação eletromagnética. Quando uma molécula ou átomo absorve certa quantidade de energia ele é excitado e quando volta ao seu estado fundamental emite parte da energia absorvida em forma de fóton. A fluorescência ocorre de forma muito mais rápida (10^5 s) que a fosforescência que pode até continuar emitindo por até hora após a fonte de excitação for interrompida. A fluorescência é bem mais utilizada em química analítica, pois permite uma

determinação rápida e sensível de espécies químicas. São poucas moléculas que emitem fluorescência, pois para isso é preciso estrutura molecular características que permitam relaxamento lento dos processos não-radiativos e conseqüentemente aumente a velocidade de relaxação por fluorescência (SKOOG; HOLLER; WEST, 2010).

Todos esses métodos e técnicas são bastante utilizados em pesquisas e controle de qualidade de empresas nas etapas de fabricação, a fim de assegurar a conformidade do produto final. Com isso, fica clara a importância das técnicas espectrométrica na análise química. Devido a essas características, neste trabalho foi utilizado o método com radiação na região do UV/visível empregando a absorção molecular na determinação de açúcares redutores em amostras de vinho, e fluorescência utilizando carbon dots para a determinação de íons Hg^{2+} em amostras de água e Cu^{2+} em amostras de cachaça (SKOOG; HOLLER; WEST, 2010).

2 DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EM FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES EM VINHOS

A importância do controle de qualidade dos alimentos, desde a sua fabricação, armazenamento e transporte, até chegar ao consumidor final, com padrões rigorosos de análises e rastreabilidade, tem sido mundialmente discutido. Esta preocupação cresce quando trata-se de um produto complexo e que tenha um público bastante exigente, como é o caso do vinho que é bastante apreciado pelas suas características organolépticas como sabor e aroma, bem como, pelos benefícios à saúde (DA SILVA et al., 2017; MAZZA et al., 1999).

O vinho é definido como sendo uma *bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura* (BRASIL, 1988; MAPA, 2016). Somente analisando esta definição pode-se imaginar que o vinho seria uma bebida simples. Na verdade, o vinho é uma mistura complexa de diferentes compostos químicos que são responsáveis pela sua cor, sabor, amargor e aroma característicos (SAMOTICHA et al., 2017; SOYOLKHAM et al., 2011).

A qualidade do vinho depende de diversos fatores, tais como, os processos agrotécnicos, variação genética, maturidade, condições climáticas e geográficas. As condições de vinificação durante a produção, tais como temperatura de fermentação, aplicação de enzimas de processamento e concentração de álcool, todos esses fatores irão afetar na sinergia dos compostos presentes no vinho, o que irá determinar sua qualidade e, conseqüentemente, seu valor (PÉREZ-MAGARIÑO; M. ORTEGA-HERAS; JOSÉ, 2002; SAMOTICHA et al., 2017; SOYOLKHAM et al., 2011).

Devido a isso, o controle de qualidade do vinho se torna cada vez mais necessário e se dá através de análises físico-químicas e sensoriais rigorosas, para assegurar sua qualidade, classificação e evitar possíveis fraudes, principalmente aqueles que provém de regiões específicas que têm suas características bem definidas como: vinho de designação de origem protegida (PDO do inglês, *protected designation of origin*) (PÉREZ-MAGARIÑO; M. ORTEGA-HERAS; JOSÉ, 2002).

Por ser uma bebida que reflete diretamente as condições de como foi produzida o controle de cada etapa da sua elaboração se faz principalmente através de análises químicas que determinam acidez, cor, compostos fenólicos, compostos

voláteis, pH, açúcares redutores, álcool etílico, sulfatos, etc. (DA SILVA et al., 2008; MAPA, 2014).

O vinho possui três classificações: quanto a classe, a cor e ao teor de açúcar (BRASIL, 1988). Com isso, fica fácil perceber que a determinação do açúcar no vinho precisa ser muito bem controlada durante todo o processo de elaboração, desde o início: na escolha da uva, na etapa de fermentação, na etapa de maturação até o produto acabado. Esta necessidade, tem impulsionado vários pesquisadores a desenvolver processos e métodos mais rápidos e precisos com o objetivo de assistir com mais eficiência o controle de qualidade do vinho, e foi esta a motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um procedimento analítico para determinação de açúcares redutores em amostras de vinhos, explorando a análise por injeção em fluxo multicomutado.

2.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um sistema em fluxo multicomutado;
- Desenvolver um programa computacional em LabView para a determinação de açúcares redutores;
- Otimizar o método proposto;
- Aplicar às amostras reais e comparar com o método de referência;
- Estabelecer as figuras de mérito.

2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2.1 História do vinho

Pela definição legal, *vinho é uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uvas frescas, sãs e maduras*. O vinho pode ser classificado quanto a classe (de mesa, leve, fino, espumante, fricante, gaseificado, licoroso e composto), a cor (tinto, rosé e branco) e quanto o teor de açúcar (nature, extra-brut, brut, seco, meio doce, suave e doce) (BRASIL, 1988).

A denominação vinho é exclusiva ao produto obtido a partir da uva, sendo vedada sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras espécies e cultivares. Os vinhos obtidos de outras frutas devem ser denominados fermentados, seguidos pelo nome da fruta utilizada: fermentado de laranja, de jabuticaba, etc. (BRASIL, 1988).

Ninguém sabe ao certo onde e quando o vinho foi inventado, mas é sabido que sua história teve início há milhares de anos, há relatos que, desde a era glacial o homem já conhecia o vinho. Em escavações em Catal Huyuk, na Turquia, em Damasco, na Síria, em Byblos, no Líbano e na Jordânia, encontrou-se sementes de uvas do período neolítico, a cerca de 8.000 a.C., porém, os registros mais antigos foram encontrados na Geórgia e datam de 7000 a.C. a 5000 a.C., ou seja, não se pode situar com precisão o lugar e a data em que se elaborou vinho pela primeira vez. As sementes encontradas na Geórgia podem ser da variedade *Vitis vinífera sativa*. Sabe-se que se cultivavam videiras e, presumidamente, produzia-se vinho na região ao sul das montanhas do Cáucaso há pelo menos 7000 a.C. e talvez até muito antes disto (BRUCH, 2011; JOHNSON, 1989; VENTURINI FILHO, 2005).

A uva foi trazida para as Américas por Cristóvão Colombo, através de expedições colonizadoras em 1493. No Brasil, as videiras chegaram da Ilha da Madeira, em 1532, trazidas por Martim Afonso de Souza e foram plantadas por Brás Cubas, inicialmente no litoral de São Paulo e depois na região de Tatuapé (JOHNSON, 1989). Posteriormente, os portugueses tentaram o cultivo de uva em diversas regiões do país, porém foi no Rio Grande do Sul que as videiras se adaptaram melhor. A viticultura chegou às terras gaúchas em 1626, durante as missões jesuítas através do Padre Roque Gonzáles de Santa Cruz, onde recebeu

ajuda dos índios para a elaboração do vinho utilizado nas cerimônias religiosas (AMARANTE, 2005; JOHNSON, 1989).

Hoje o Brasil é um país emergente na elaboração de vinho, com crescimento acelerado e um futuro promissor neste segmento, As principais vinícolas estão distribuídas nas regiões nordeste, sul e sudeste do país, **Figura 1** (IBRAVIN, 2017).

Figura 1 - Regiões brasileiras produtoras de vinho



Embora ainda se tenha muito o que avançar no plantio de uvas e elaboração de vinho no Brasil, existem alguns locais de referência na elaboração de vinhos finos como, Vale dos Vinhedos, Campanha Gaúcha, Campos de Cima da Serra e Serra Gaúcha, todos no Rio Grande do Sul. Essas regiões concentram a maior parte da elaboração de vinhos de qualidade. A região do Vale do São Francisco, localizada nos estados de Pernambuco e Bahia, também tem recebido destaque, há anos produz excelentes uvas de mesa e tem se mostrado adequada também às cepas viníferas. Desta região saem bons espumantes elaborados com a uva moscatel. Em outros estados, como Minas Gerais e São Paulo, são produzidos vinhos populares, feitos com uvas de mesa (ADEGA DOS VINHOS, 2017; AMARANTE, 2005).

2.2.2 Etapas de Elaboração do Vinho

Dependendo do tipo e estilo do vinho, o número de etapas para a elaboração do vinho pode variar, mas no geral, o processo básico envolve cinco etapas (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.3 Colheita

Durante o processo de elaboração do vinho, uma importante decisão e talvez a maior delas é estabelecer o momento certo de colher as uvas. A colheita é feita de acordo com o tipo das uvas, pois, umas amadurecem em épocas diferentes. Com isso o enólogo tem a missão de colher a uva no momento certo, porque uvas colhidas antes do tempo tendem a produzir vinhos mais ácidos e menos alcoólicos. Enquanto as colhidas tardiamente podem originar vinhos com menor acidez e com maior teor alcoólico (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.4 Desengace e esmagamento

Realizada a colheita, a uva segue para vinícola onde é colocada em uma máquina chamada de desengaçadeira-esmagadeira, a qual remove os engaços que se processados adicionam um amargor indesejável ao vinho. De forma delicada a desengaçadeira-esmagadeira rompe as cascas das uvas para que as sementes não sejam esmagadas, obtendo assim o suco da uva (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.5 Fermentação

Na fermentação ocorrem várias etapas, tais como, fermentação alcoólica, (maceração, remontagem, descuba e prensagem), fermentação lenta e fermentação malolática.

2.2.5.1 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é a etapa mais importante na elaboração do vinho, pois nesta etapa são as leveduras que se alimentam do açúcar natural presente no mosto, transformando-o principalmente em álcool e CO₂.

É nesta etapa que será decidido se o vinho será fermentado em tanques de aço ou em barris de carvalho. No tanque de aço, preserva-se mais o frescor da uva, enquanto que na fermentação em barris de carvalhos o vinho permanecerá durante todo o tempo restante da elaboração, isso torna o vinho mais "macio" ao paladar. Os vinhos fermentados em carvalho apresentam propriedades características, geralmente são mais claros, menos frutados e ganham aromas e sabores amadeirados.

Outros fatores importantes no sucesso da vinificação é o controle da temperatura e o tempo de fermentação. A temperatura irá variar de acordo com o tipo do vinho (branco, rosé e tinto). O tempo de fermentação no caso do rosé e tinto, será importante porque passam mais ou menos tempo em contato com as cascas da uva, o que irá conceder mais ou menos coloração, esse tempo de contato é chamado de maceração. Nesse período, é acompanhada a densidade do mosto e este é agitado suavemente pelo menos duas vezes ao dia, esse processo é chamado de remontagem. Quando o mosto chega a uma densidade desejada é realizada a descuba, que é a retirada do excesso de resíduos maiores e posteriormente, é feita a prensagem para a retirada de resíduos (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.5.2 Fermentação lenta

Esta etapa é a complementação da fermentação alcoólica e tem como objetivo acompanhar o desprendimento do dióxido de carbono. É preciso muita atenção na medida da temperatura de fermentação e nas análises da densidade, dos teores de açúcar, álcool e acidez total (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.6.1 Estabilização Tartárica

A estabilização tartárica do vinho é realizada através do resfriamento entre as temperaturas de -3 e -4°C, para que os cristais que teriam a possibilidade de decantarem no inverno sejam removidos, principalmente o bitartarato de potássio (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.6.2 Filtração

As partículas em suspensão são eliminadas, através da passagem do vinho por elementos filtrantes, nesta etapa de filtração são utilizados vários tipos de filtro com diferentes porosidades e até mesmo, membranas. Isso deixa o vinho límpido e brilhante (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.7 Engarrafamento e envelhecimento

Passadas todas as etapas descritas, os vinhos são engarrafados e mantidos em repouso na vinícola, até estarem prontos à comercialização. Esta etapa tem o objetivo de estabilizar ainda mais o vinho recuperando-o de uma possível doença da garrafa, causada pela agitação ou contato com oxigênio no interior da garrafa durante o envase.

Nesse período, o vinho passa por uma série de transformações físico-químicas. O seu aroma e sabor torna-se mais fino e agradável, a sua cor sofre modificações devido às alterações das antocianinas, responsáveis pela coloração vermelha do vinho tinto jovem.

O tempo de repouso dependerá do tipo da uva e também do público, alguns vinhos permanecem em repouso por dias, semanas ou até vários anos (MENEGUZZO; MANFROI; RIZZON, 2017; ROSS, 2017).

2.2.8 Composição

O vinho é uma mistura complexa e ainda não é totalmente conhecida, formado principalmente de compostos orgânicos e complementada por algumas

espécies inorgânicas. A diferença entre vinhos envolve diversas famílias de compostos responsáveis pela cor, pelo aroma e pelo sabor. Estas características são influenciadas principalmente pelo clima, solo, variedade, idade da videira, tratamentos culturais, estágios da maturação da uva, à colheita, tipo e tecnologia de vinificação, etc. (AMERINE; OUGH, 1987; SAMOTICHA et al., 2017).

A complexidade da composição do vinho tem desafiado os químicos. Há uma enorme variedade de compostos químicos dentro de uma garrafa de vinho, os quais podem atuar como interferentes em métodos de determinação, o que torna difícil o trabalho com amostras de vinho *in natura* (AMERINE; OUGH, 1987; SAMOTICHA et al., 2017).

Os principais componentes do vinho são: água, alcoóis, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, proteínas e outras substâncias nitrogenadas, polissacarídeos, açúcares, compostos aromáticos, minerais e vitaminas (VENTURINI FILHO, 2005).

A água representa de 70 a 90% do volume, dependendo do tipo de vinho. Provém inteiramente da uva. Sua adição ao vinho é proibida em qualquer quantidade.

Quanto aos alcoóis, o etanol é o mais importante álcool no vinho, pois auxilia no equilíbrio doce. É produzido pelas leveduras no processo de fermentação chegando a teores de 15% (v/v), a partir dessa concentração as leveduras morrem. É essencial para a estabilidade, o envelhecimento e as propriedades sensoriais do vinho. O glicerol é o segundo álcool mais importante do vinho, seu teor é de 0,5 a 1,5% (v/v). Ele apresenta importância sensorial, devido ao gosto doce e a suntuosidade, fatores que contribuem para a suavidade do vinho. A produção do glicerol é favorecida por fermentações à baixas temperaturas e está diretamente relacionada ao tipo de levedura usada. Por outro lado, teores de glicerol acima do normal pode comprometer a qualidade do vinho, isso pode ocorrer se no processo de elaboração do vinho forem utilizadas uvas com "podridão".

O álcool metílico ou metanol também é encontrado no vinho, porém este não é produzido no processo de fermentação, sendo derivado da hidrólise das pectinas da uva. Outros alcoóis bastante importantes são os superiores que são alcoóis de cadeia longa, que em baixas concentrações podem desempenhar papel desejável na qualidade sensorial do vinho (VENTURINI FILHO, 2005).

Os ácidos são constituintes importantes do vinho pelo seu gosto característico, além de terem relação direta com a cor dos vinhos. Os principais

ácidos orgânicos do vinho são o tartárico, málico e cítrico, todos provenientes da uva; já os ácidos láctico, succínico e acético são produzidos durante a fermentação.

A acidez do vinho está diretamente relacionada com a acidez da uva. Há a acidez fixa e volátil, sendo a acidez total a soma destas.

A acidez volátil é representada, principalmente, pelo ácido acético, mas são também encontrados traços de ácidos fórmicos, butírico e propiônico. Durante a fermentação alcoólica são produzidas pequenas quantidades de ácido acético pelas leveduras (menos de $0,3 \text{ g L}^{-1}$). A oxidação do etanol, ou a transformação de ácidos, açúcares, sais e glicerol, pode resultar no excesso de bactérias acéticas, elevando os teores de acidez volátil, o que compromete a qualidade sensorial do vinho.

Os compostos fenólicos ou polifenóis provêm, principalmente, das cascas e sementes da uva. São os principais responsáveis pela diferença entre os vinhos tintos e brancos, como por exemplo, cor e adstringência. São também potentes antioxidantes, sendo assim responsáveis diretos pela longevidade dos vinhos. A composição polifenólica das uvas tintas e brancas e o modo de vinificação são os fatores responsáveis por essas diferenças. Os polifenóis podem ser classificados em flavonóides e não flavonóides (MOTA et al., 2010; VENTURINI FILHO, 2005).

Entre os flavonóides do vinho, os mais importantes são as antocianidinas que são as responsáveis pela pigmentação vermelha no vinho tinto. As antocianidinas são compostas de um núcleo benzopirilo e um anel fenólico, representado pelo fenil-2-benzopirilo, que se distinguem na uva e no vinho.

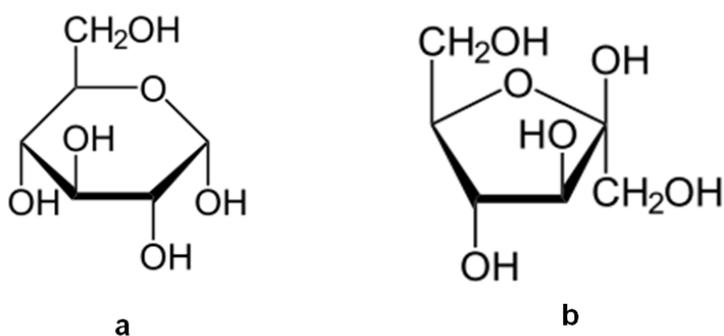
Existem cinco antocianidinas no vinho: Cianidina, Peonidina, Delfinidina, Petunidina e Malvidina, esta última está em maior concentração no vinho e na uva, é responsável por aproximadamente 50% da coloração. Nos vinhos tintos as antocianinas estão na forma de mono e diglicosídeos. Esta variação se dá pela fixação da molécula de açúcar (glicose), que está na posição β para os monoglicosídeos, e nas posições 3 e 5 para os diglicosídeos (ZORZAN, 2006).

As proteínas e outros compostos nitrogenados também são encontrados nos mostos e vinhos: aminoácidos, proteínas, vitaminas, amins e nitratos. Muitos destes compostos são de fundamental importância para o crescimento das leveduras. A maioria das substâncias nitrogenadas do vinho são provenientes do metabolismo da videira; outras provêm do próprio metabolismo das leveduras (VENTURINI FILHO, 2005)

Os principais açúcares da uva são a glicose e a frutose. Estes são consumidos na fermentação alcoólica pelas leveduras. Entretanto, ao final desta, resta um resíduo de açúcares, ditos redutores. Nos vinhos licorosos doces naturais, o teor de açúcar vem do alto teor acumulado pela uva, de modo que, mesmo depois da fermentação alcoólica, restam ainda teores elevados de açúcar. O açúcar do vinho pode também provir da adição externa, desde que dentro dos parâmetros estabelecidos por lei. Neste caso, no Brasil, a sacarose é o único tipo permitido, este processo é conhecido como chaptalização (VENTURINI FILHO, 2005).

Os açúcares redutores podem ser definidos como sendo poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas, ou ainda um composto que por hidrólise fornecem esses compostos. Os carboidratos podem ser classificados como açúcares redutores ou não-redutores. Os redutores que são os mais comuns são capazes de reduzir rapidamente algumas substâncias, devido à presença em sua molécula de grupos aldeídos ou cetonas livres ou potencialmente livres. As propriedades desses açúcares podem ser comprovadas pela sua capacidade de reduzir íons metálicos, especialmente de cobre ou prata, em solução alcalina. A solução de Benedict é um reagente comumente usado na detecção de açúcares redutores; nesse reagente, íons de Cu^{2+} são mantidos em solução, com um complexo de citrato em meio alcalino. Quando o Cu^{2+} é reduzido, o Cu^+ formado é menos solúvel e precipita sob a forma de Cu_2O , um sólido amarelo ou vermelho. O açúcar redutor, por sua vez, é oxidado, quebrado e polimerizado na solução alcalina de Benedict (CONN, E. E. E STUMPT, 1980).

Figura 2 - Estrutura molecular: a) Glicose; b) Frutose



A uva é rica em polissacarídeos, e quando madura possui teores elevados. Os polissacarídeos ajudam na conservação do vinho, pois evitam que ocorra precipitação prematura de diversas macromoléculas, que são úteis durante o envelhecimento (VENTURINI FILHO, 2005).

Existem mais de mil compostos aromáticos no vinho, que se encontram em maior quantidade em uvas maduras e são precursoras de aromas, cujas formas mais importantes são a glicosilada e carotenóides. Durante a vinificação, transformam-se em substâncias aromáticas formando o chamado, aroma varietal ou aroma primário do vinho. Após a vinificação, vem as etapas de estabilização e de envelhecimento, no decorrer das quais ocorrem transformações bioquímicas e, principalmente, físico-químicas, formando os chamados aromas de envelhecimento ou aroma terciário (GUERRA, 2006)(VENTURINI FILHO, 2005).

Grande parte das substâncias aromáticas do vinho encontra-se sob a forma de ésteres. Os ésteres que aparecem durante a fermentação são os de maior importância no aroma dos vinhos (VENTURINI FILHO, 2005).

2.2.9 Classificação

A classificação dos vinhos está definida na Lei Nº 7.678 (BRASIL, 1988) e o Decreto Nº 8.198 (BRASIL, 2014), que dispõe sobre a elaboração, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho.

2.2.10 Quanto à classe

Os vinhos podem ser classificados quanto à classe em:

- **Vinhos de mesa:** graduação alcoólica de 8,6 a 14% em volume ou 10° a 13° g L⁻¹.
- **Vinhos leves:** graduação alcoólica de 7 a 9,9% do total do seu volume, obtidos pela fermentação natural de seus açúcares.
- **Vinhos finos e nobres:** graduação alcoólica de 8,6 a 14% em volume, são elaborados com castas nobres, proveniente exclusivamente de variedades “Vitis Vinífera”.
- **Vinhos espumantes natural:** provenientes de uma segunda fermentação alcoólica do vinho na garrafa (método champenoise/tradicional) ou em

grandes recipientes (método Charmat) e com graduação alcoólica entre 10 a 13% em volume a 20 °C.

➤ **Vinhos moscatel espumantes ou moscato espumantes:** obtido através da fermentação do mosto ou mosto conservado em recipientes fechados. Sua graduação alcoólica fica entre 7 a 10% do volume total.

➤ **Vinhos frisantes:** graduação alcoólica entre 7 a 13% em volumes com conteúdo de anidrido carbônico de 1,1 até 2 atm de pressão a 20 °C natural ou gaseificados.

➤ **Vinhos gaseificados ou filtrado doce:** resultante da adição de anidrido carbônico puro por qualquer processo, com graduação alcoólica entre 10 a 13% do volume total.

➤ **Vinhos licorosos:** conteúdo alcoólico natural ou adquirido entre 14 a 18% do seu volume, sendo nestes vinhos permitido o uso de álcool etílico, mosto concentrado, caramelo, mistela simples, açúcares e caramelo de uva.

➤ **Vinhos compostos:** graduação alcoólica entre 15 a 18% do seu volume total, obtidos pela adição de macerados ou concentrados de plantas amargas ou aromáticas, substâncias de origem mineral ou animal, álcool etílico, açúcar, caramelo e mistela simples, sendo que 70% do seu conteúdo deverá ser de vinho.

➤ **Champanha (Champagne):** vinho espumante, produzido na região de Champagne-França, cujo CO₂ é obtido, unicamente, de uma segunda fermentação alcoólica do vinho. Graduação alcoólica entre 7 e 10% do volume total.

2.2.11 Quanto à cor

Os vinhos podem ser classificados quanto a cor, em vinhos tintos, vinhos Rose ou Clarete e vinhos brancos.

2.2.12 Quanto ao teor de açúcar

Os vinhos podem ser classificados também através da concentração de açúcares redutores totais, como pode ser observado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Classificação dos vinhos quanto ao teor de açúcar.

Classificação	Quantidade de Açúcares Redutores (g L⁻¹)
Vinho de mesa	
Seco	≤ 4
Meio-seco ou demi-sec	> 4 e ≤ 25
Suave ou doce	> 25
Vinho frizante	
Seco	≤ 4
Meio-seco ou demi-sec	> 4 e ≤ 25
Suave ou doce	> 25 e ≤ 80
Vinho fino	
Seco	≤ 4
Meio-seco ou demi-sec	> 4 e ≤ 25
Suave ou doce	> 25 e ≤ 80
Vinho leve	
Seco	≤ 4
Meio-seco ou demi-sec	> 4 e ≤ 25
Suave ou doce	> 25 e ≤ 80

Fonte: (BRASIL, 2014)

2.2.13 Determinação de açúcar redutor em vinho

Açúcares redutores (AR) são monossacarídeos que possuem grupos carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes, em soluções alcalinas. As funções cetônicas e aldeídicas livres possibilitam a redução de íons catiônicos, como o cobre, ferro e prata (DEMIATE et al., 2002).

Os açúcares não-redutores (ANR) precisam sofrer uma reação de hidrólise da ligação glicosídica para oxidar. Um exemplo é a sacarose, que é formada pela ligação entre o grupo funcional aldeídico de uma molécula de glicose e o grupo funcional cetônico de uma molécula de frutose. A hidrólise de açúcares não-redutores é geralmente feita com ácido forte ou com o uso de enzimas. Os açúcares não-redutores podem ser quantificados pelas mesmas metodologias que os

açúcares redutores, desde que primeiramente ocorra a reação de hidrólise, que pode ser química ou enzimática, para transformar os ANR em AR. Alguns métodos envolvem hidrólise prévia para quantificar os dois tipos de açúcares, enquanto que a cromatografia é capaz de quantificar todos os tipos de açúcares sem hidrólise (DEMIATE et al., 2002; DORNEMANN, 2016).

Para estimar o teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais em alimentos, existem vários métodos químicos não seletivos que fornecem resultados, com elevado grau de confiabilidade, quando utilizados corretamente. Os métodos químicos clássicos conhecidos para a análise são na sua maioria fundamentados na redução de íons cobre em soluções alcalinas (a solução de Fehling e Benedict, são exemplos) (DEMIATE et al., 2002).

A propriedade de oxiredução de cátions como o cobre e prata afeta a cor das soluções que os contém, tornando-os adequados para emprego como componentes analíticos. O Cu^{2+} , de coloração azul anil quando em solução alcalina, ao ser reduzido estequiometricamente a Cu^+ forma um precipitado vermelho-tijolo. Este é o fundamento da reação envolvendo o reagente conhecido como licor de Fehling. No reagente de Tollens, o cátion selecionado é a prata, que passa de Ag^+ a Ag^0 transformando uma solução incolor em um precipitado negro, capaz de espelhar a face interna de um recipiente de vidro (espelho de prata) (DEMIATE et al., 2002).

Existem vários métodos e técnicas para a determinação de AR, como por exemplo, a refratometria, a espectrofotometria (nesta técnica se destacam os métodos de Somogyi-Nelson, Fenol-Sulfúrico e o ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS)), a titulometria de Lane-Eynon, cromatografia e polarimetria (DORNEMANN, 2016).

No método, de Somogyi-Nelson e Lane-Eynon, o açúcar é aquecido com uma solução alcalina de tartarato de cobre, o que leva a obtenção de óxido cuproso que, reagindo com molibdato de arsênio, possibilita a produção de um composto de coloração azul passível de ser quantificada por colorimetria. No método de Lane-Eynon, observa-se que o nome Fehling encontra-se associado aos reagentes utilizados na redução do cobre. O reativo de Fehling é uma mistura de sulfato de cobre e hidróxido de sódio, o ácido tartárico é adicionado para manter o hidrato cúprico em solução. Este método se baseia no fato que os sais cúpricos, em solução tartárica alcalina, podem ser reduzidos à quente por aldoses ou cetoses transformando-se em sais cuprosos vermelhos, que se precipitam, perdendo sua cor azul primitiva. O tartarato, ao unir-se ao cobre, formando um complexo solúvel,

impede a formação de hidróxido cúprico insolúvel que se formaria se existisse cobre livre na solução alcalina (DEMIATE et al., 2002).

As desvantagens dos métodos químicos baseados na redução de metais e compostos consiste no fato de que os mesmos dependem de um tempo de reação preciso, a temperatura da reação e a concentração dos reagentes devem ser cuidadosamente controladas; não distingue os diferentes tipos de açúcares redutores; são susceptíveis à interferência de outros tipos de moléculas que atuam como agentes redutores como é o caso do ácido ascórbico (DEMIATE et al., 2002).

Apesar da grande variedade de métodos para a determinação de açúcares redutores, a necessidade de métodos alternativos mais rápidos e confiáveis levou alguns pesquisadores a desenvolver métodos, afim de determinar esses açúcares. A análise em fluxo por apresentar propriedades que suprem as necessidades almejadas foi bastante explorada nesse aspecto.

Em 1992 Tortajada-Peris e colaboradores propuseram um método para determinação de açúcar redutor, utilizando a reação de neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) complexada com Cu(II) em meio alcalino, empregando um sistema de análise em fluxo (PERIS-TORTAJADA; PUCHADES; MAQUIEIRA, 2000). Em 1993, Yebra e colaboradores exploraram as versatilidades da análise em fluxo e determinaram açúcar redutor, empregando um sistema FIA acoplado a um espectrômetro de absorção atômica com chama, (FAAS, do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometer*). O método era baseado na redução do Cu(II) com a solução de Fehling (YEBRA; GALLEGOS; VALCÁRCEL, 1993). Em 1994, Hartmann e colaboradores utilizaram a redução do ácido p-hidroxibenzoico em meio alcalino para a determinação de açúcar redutor com detecção fotométrica explorando FIA (HARTMANN; HASWELL; GRASSERBAUER, 1994).

Lopes e colaboradores desenvolveram em 1995, um eletrodo de íon-seletivo com picrato para a determinação de açúcar redutor empregando potenciometria. A metodologia envolve uma reação entre o açúcar redutor e o ácido pícrico, sendo a diminuição da concentração de picrato monitorada com eletrodo (LOPES et al., 1995).

Em 1998, Sartini e colaboradores determinaram açúcar redutor através da gravimetria explorando FIA. O método foi baseado na pesagem do precipitado formado durante a reação de oxi-redução do Cu(II) com solução de Fehling (SARTINI et al., 1998).

Oliveira e colaboradores determinaram, em 1999, açúcar redutor em caldo de cana-de-açúcar fazendo uso de um forno micro-ondas doméstico para auxiliar na reação de oxi-redução do Fe(III) em meio alcalino explorando o conceito de FIA acoplado a um espectrofotômetro para detecção (OLIVEIRA; FATIBELLO-FILHO, 1999).

Em 2000, Araújo e colaboradores desenvolveram um método de determinação de açúcar redutor em vinhos baseado na reação de oxi-redução do Cu(II) a Cu(I) complexado com Neocuproína em meio alcalino, o açúcar redutor foi mensurado através de espectrofotometria acoplado a um sistema SIA, neste trabalho a faixa de trabalho foi de 2 - 25 g L⁻¹ para vinhos de mesa, 20 - 140 g L⁻¹ para vinhos do porto e frequência analítica de 14 - 18 análises por hora (ARAÚJO et al., 2000).

Em 2009, Fernández-Navales e colaboradores desenvolveram um método utilizando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês, *Near Infrared*) para a determinação de açúcar redutor utilizando ferramentas estáticas aplicadas a quimiometria (FERNÁNDEZ-NOVALES et al., 2009).

Atualmente existem vários métodos para a determinação de açúcar redutor explorando as vantagens da análise em fluxo. Sua robustez e versatilidade podem ser percebidos através das diversas formas reportadas anteriormente, nos quais foram utilizadas diversas formas de detecção e tratamento das amostras, provando sempre ser um processo de inserção de amostra preciso e exato tornando-o assim uma ferramenta bastante útil.

2.2.14 Análise em fluxo

Em 1975, Ruzicka & Hansen propuseram um novo conceito de análises que consistia na inserção de amostras em um fluxo transportador não segmentado por ar, este novo conceito ficou conhecido como análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês, *Flow injection analysis*). Inicialmente, a inserção das soluções era realizada através de uma seringa hipodérmica e o sucesso da análise dependia muito da habilidade/experiência do operador do sistema. Esta dependência ia de encontro com o intuito inicial de automatização e trazia algumas desvantagens, como, oscilação do sinal analítico, variação de volume de amostra, durabilidade do septo de borracha onde ocorria a injeção da amostra e a falta de reprodutibilidade

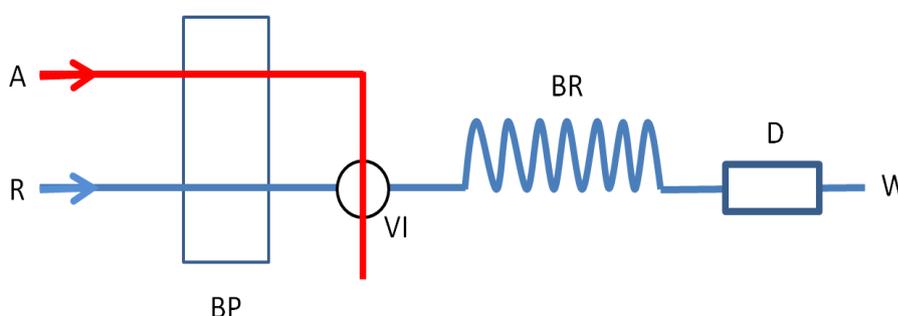
ocasionada pela variação de pressão na inserção da amostra (RUZICKA; HANSEN, 1975).

Em 1977, Ruzicka e colaboradores propuseram o injetor comutador (RUZICKA et al., 1977) e Bergamim e colaboradores propuseram o injetor proporcional em 1978. Ambos injetores minimizaram significativamente os problemas de inserção da amostra no sistema FIA. O injetor permitia a introdução da amostra de forma mais eficaz, permitindo assim uma reprodutibilidade de aproximadamente 1% (BERGAMIN; MEDEIROS; REIS, 1978). Posteriormente, outras formas de inserção foram desenvolvidas a fim de minimizar os erros e a dependência do analista (REIS; BERGAMIN, 1993).

A aceitação e sucesso do FIA se deve tão somente à necessidade do surgimento de procedimentos automatizados, mas também por ser um sistema simples de fácil operação, robusto, de baixo custo, apresentar boa repetibilidade e reprodutibilidade, maior frequência analítica, melhor possibilidade de exploração cinética da reação e menor consumo de reagentes e amostras, quando comparados com seus métodos tradicionais.

Um sistema de análise por injeção em fluxo é formado basicamente de quatro partes: propulsão, Injeção, reação e detecção. Para melhor entendimento, um sistema FIA simples é apresentado na **Figura 3**.

Figura 3 - Configuração geral de um sistema em fluxo. A: Amostra; R: Reagente; BP: bomba peristáltica; VI: Válvula de Injetor; BR: Bobina de reação; D: detector; e W: descarte.



Na **Figura 3**, soluções de amostra (A) e reagente (R) são bombeados para o sistema através da bomba peristáltica (BP) e ambos passam pelo injetor (VI). Quando o injetor muda de posição, amostra e reagente se misturam na bobina de

reação (BR) e seguem para o detector onde o sinal analítico é registrado e por fim, a mistura reacional é coletada no descarte (W).

As vantagens do sistema FIA chamaram a atenção de vários pesquisadores, o que levou a um desenvolvimento rápido da ferramenta analítica, produzindo um grande número de aplicações usando a análise por injeção em fluxo em diversas áreas.

Devido a essa evolução, uma definição mais ampla para o sistema FIA seria um processo de mecanização, no qual a amostra é inserida em um fluido transportador em direção ao detector, onde, durante este percurso, a amostra pode ser submetida a processos de preparo, adição de reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, pré-concentração, extração, etc. (REIS; GINÉ; KRONKA, 1989).

Com o avanço da tecnologia, principalmente no acesso ao microcomputador, surgiram novas propostas de análise em fluxo, como por exemplo, a análise por injeção sequencial (SIA, do inglês: *Sequential Injection Analysis*) proposta por Růzicka e Marshall em 1990 (RŪZICKA; MARSHALL, 1990), a multicomutação em análise em fluxo proposta por Reis e colaboradores (REIS, B. F. *et al.*, 1994), os sistemas multi-seringas desenvolvidos por Cerda e colaboradores (CERDA *et al.*, 1999) e sistema de multi-bombeamento desenvolvido por Lima e colaboradores (LIMA *et al.*, 2004).

O sistema SIA proposto por Růzicka e Marshall em 1990, tem como principal característica, o emprego de uma válvula seletora rotatória (multi-portas). Esta válvula seria responsável pela comunicação entre cada uma das portas (caminhos) através da porta central conectada a uma bobina coletora que tem o objetivo de armazenar e misturar amostra e reagentes durante a formação da zona de amostragem. O sistema de propulsão é formado por seringas acopladas a bomba de pistão, que através da válvula seletora aspira e injeta o fluido ou solução transportadora realizando toda a movimentação bidirecional dos fluidos (RŪZICKA; MARSHALL, 1990; SANTOS; MASINI, 2010).

Em 1994, Reis e colaboradores propuseram um sistema em fluxo que visava um maior controle dos volumes e misturas através do gerenciamento na inserção de amostras e reagentes denominado de análise em fluxo multicomutado (MCFA). O MCFA utiliza válvulas solenóide controladas por microcomputador para introduzir pequenas alíquotas de amostra e reagentes no percurso analítico de maneira

individual e alternada, garantindo uma melhor mistura, devido a maior interpenetração das interfaces amostra/reagente (KRONKA et al., 1997; REIS; GINE; ZAGATTO, 1994).

A tendência de procurar novas estratégias que consumisse menor volume de soluções de reagente e amostra, foi o principal motivo do surgimento de sistema μ FIA, que tem como característica principal a utilização de micro-fluxo. Essa abordagem apresenta desempenhos analíticos e custos competitivos, podendo ser construídos explorando os conceitos de microfluídica e microeletrônica, às vezes integrando unidades de propulsão, mistura e detecção em um único dispositivo, produzindo os chamados micro sistemas analíticos totais (μ TAS, do inglês, *micro total analytical systems*) (HASWELL, 1997; MANZ; GRABER; WIDMER, 1990; MELCHERT; REIS; ROCHA, 2012).

A análise por injeção de fluxo multi-seringa (MSFIA, do inglês, *multisyringe flow injection analysis*) proposto por Cerda e colaboradores em 2002 (MIRÓ; CERDÀ; ESTELA, 2002), consistia de um conjunto de seringas para o bombeamento das soluções, essas seringas eram acopladas a válvulas solenoides multi-porta. As seringas tinham diferentes volumes (0,5-25 mL) e eram usualmente movidas pelo mesmo motor. Esta abordagem combina características de SIA (robustez, baixos volumes de reagentes e versatilidade), com as da FIA (taxas de amostragem melhoradas e melhor desempenho analítico) (MELCHERT; REIS; ROCHA, 2012; MIRÓ; CERDÀ; ESTELA, 2002).

Em 2004 surgiu um novo tipo de sistema em fluxo, proposto por Lima e colaboradores (LIMA et al., 2004). O sistema compreendia um conjunto de minibombas solenoide, no qual, cada minibomba tinha volume fixo na ordem de microlitros e era dedicada a propulsão de uma solução diferente. O bombeamento nesse sistema é pulsado, o que facilita a mistura dos reagentes, além disso, pode incluir como vantagens, a portabilidade e baixa geração de resíduos. Esse sistema foi chamado de sistema em fluxo multi-bombeado (MPFS, do inglês, *Multi-pumping flow systems*) (LIMA et al., 2004; MELCHERT; REIS; ROCHA, 2012).

Até aqui, fica claro que o sistema em fluxo evoluiu, não somente com o objetivo de melhorar os parâmetros analíticos mas também, visando a diminuição no consumo de amostras e reagentes, gerando menos resíduos, colaborando assim com os princípios da química verde (*Green Chemistry*) (MELCHERT; REIS; ROCHA, 2012).

2.3 MATERIAIS UTILIZADOS

2.3.1 Equipamentos e Acessórios

Para montagem do sistema em fluxo para determinação de AR em vinhos foram utilizados, um microcomputador dual core, 5 minibombas solenoide (Biochem Valve™ Inc., Boonton, NJ, USA) sendo 3 minibombas de 4 μL por pulso para a inserção da solução de amostra e dos reagentes (P_1 , P_2 e P_3) e 2 minibombas solenoide de 10 μL por pulso para a água deionizada utilizada como transportador (P_4 e P_5) e tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno para a confecção do sistema em fluxo. Para a detecção foi utilizado um espectrofotômetro modelo USB-4000-UV/VIS da Ocean Optics equipado com cabos de fibra ótica de 50 μm de diâmetro interno para a propagação da radiação e uma lâmpada de tungstênio, uma cubeta em fluxo de quartzo com 10 mm de percurso ótico e 80 μL volume interno (Hellma, Plainview, NY, USA). Para o controle da temperatura da reação proposta empregou-se um banho termostático (QUIMIS®). O dispositivo para a diálise foi confeccionado em acrílico, onde entre os dois blocos foram fixados 4 parafusos, colocado duas lâminas de borracha de 1 mm de espessura e, entre elas foi adicionado a membrana de nitrato celulose 0,45 μm .

2.3.2 Soluções

As soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$) obtida através do sistema Milli-Q, fabricado pela (Millipore, Molsheim, France) e os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.3.3 Solução estoque

A solução estoque de açúcares redutores 100 g L^{-1} , foi composta de 40% (m/m) de glicose e 60% (m/m) de frutose (proporção encontrada na uva) e refrigeradas a 4°C (ARAÚJO et al., 2000). Para tanto, foram dissolvidos em 5 mL de água deionizada, 0,6 g de frutose (Sigma-Aldrich, >99,5%) e 0,4 g de glicose (Sigma-Aldrich, >99,5%) e, posteriormente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com água deionizada.

2.3.4 Soluções de trabalho

As soluções 0,25 - 4,0 g L⁻¹ de açúcar redutor foram preparadas a partir da solução estoque 100 g L⁻¹ de açúcar redutor. Estas soluções foram preparadas com 12% (v/v) de etanol.

A solução de 0,1 mol L⁻¹ do complexo [(Cu-Neo)₂]²⁺, foi preparada diariamente dissolvendo 1,041 g de neocuproína (C₁₄H₁₂N₂, (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina), Sigma-Aldrich, >99.5%) em 5 mL de etanol. Esta solução foi adicionada à solução aquosa contendo 0,4 g de sulfato de CuSO₄ • 5 H₂O (Sigma-Aldrich, 99%). Essa mistura foi diluída a 50 mL com água deionizada.

Uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 mol L⁻¹ foi preparada pesando-se 4 g de NaOH, dissolvida em 60 mL de água destilada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL, onde o volume foi ajustado com água deionizada.

Todas soluções foram preparadas sem purificação prévia dos reagentes ou solventes. Os reagentes, solventes e suas especificações estão resumidos na **Tabela 2**.

A solução Fehling A foi preparada com 34,639 g de sulfato de cobre penta hidratado (CuSO₄ • 5H₂O), dissolvido em água deionizada, transferido para um balão volumétrico de 500 mL onde foi completado o volume com água deionizada.

A solução Fehling B foi preparada 173 g de tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆) previamente seco a 130 – 150 °C por 3 horas e 50 g de hidróxido de sódio dissolvidos em água destilada, transferido para balão volumétrico de 500 mL e completado o volume com água deionizada.

Tabela 2 - Reagentes e solventes

Reagentes e solventes	Procedência	Massa molar g mol ⁻¹	Teor %
2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (Neocuproína, C ₁₄ H ₁₂ N ₂)	Sigma-Aldrich	208,33	99,5
Frutose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Vetec	180	>99,5
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma-Aldrich	180	>99,5
Sulfato de cobre penta hidratado CuSO ₄ · 5 H ₂ O	Sigma-Aldrich	249,6	>99
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Fmaia	46,07	99,3
Hidróxido de sódio (NaOH)	Dinâmica	40	97

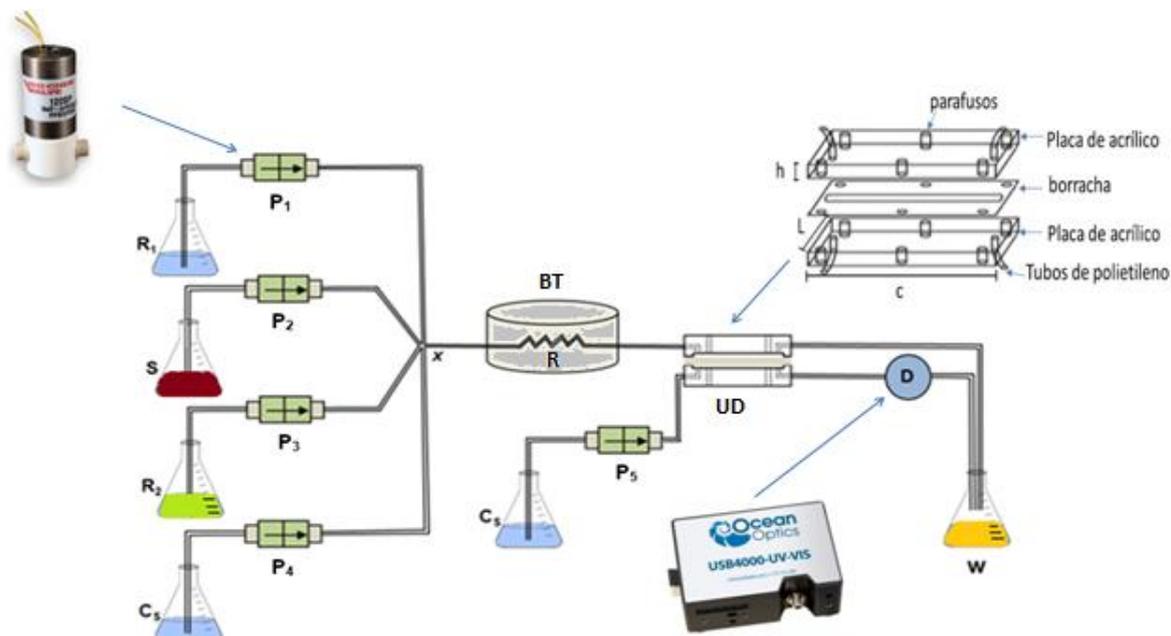
2.3.5 Amostras

Foram adquiridas, em supermercados locais, 11 amostras de diferentes tipos de vinhos (6 amostras de vinho tinto seco, 2 amostras de vinho meio seco, 2 amostras de vinho licoroso e 1 amostra de vinho branco) as quais permaneceram armazenadas a 3 °C. Posteriormente, as amostras foram analisadas no sistema em fluxo proposto, sem tratamento prévio. Nos casos em que a concentração excedia a faixa de trabalho do método, as mesmas foram diluídas e, posteriormente, analisadas.

2.3.6 Descrição geral do sistema

O diagrama do sistema em fluxo proposto para a determinação de AR em vinhos é mostrado na **Figura 4**. Um computador, Intel Pentium dual core foi utilizado para o controle das variáveis do sistema e controle das medidas utilizando a linguagem de programação gráfica LabView.

Figura 4 - Diagrama do sistema em fluxo multicomutado. P_1, P_2, P_3, P_4, P_5 = minibombas solenoide; $R_1 = \text{NaOH}$ (1 mol L^{-1}); S = Amostra; $R_2 = [(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); C_s = Transportador (H_2O); x = confluência; BT = Banho Termostático; R = Reator; UD = Unidade de Diálise; D = Detector; W = Descarte.



O controle das minibombas foi realizado empregando uma interface eletrônica com um circuito integrado ULN2803A, alimentada por fonte externa de 12 V e 1 A. Esta interface foi conectada à um dispositivo USB-6009 (National Instruments, USA) para fazer o acionamento das minibombas através da porta USB 2.0 do computador, **Figura 5**. O sinal analítico gerado pelo espectrofotômetro foi monitorado também através da porta USB 2.0 do computador.

Na **Tabela 3** está apresentada a sequência de acionamentos das mini bombas.

Tabela 3 - Sequência de acionamento das minibombas solenoide.

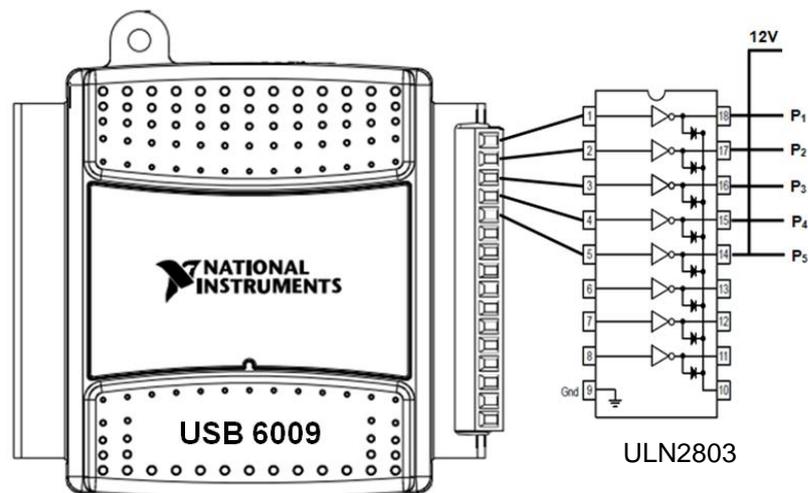
Etapa	Evento	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	Pulsos	Ciclos
A		0/1	0	0	0	0	50	1
B	Enchimento das linhas	0	0/1	0	0	0	50	1
C	de fluxo e calibração do	0	0	0/1	0	0	50	1
D	espectrofotômetro	0	0	0	0/1	0	50	1
E		0	0	0	0	0/1	50	1
1	Inserção NaOH	0/1	0	0	0	0	8	
2	Inserção amostra	0	0/1	0	0	0	4	10
3	Inserção [(Cu-Neo) ₂] ²⁺	0	0	0/1	0	0	16	
4	Transporte, detecção e lavagem	0	0	0	0/1	0/1	100	1
5	Troca de amostra	0	0/1	0	0	0	50	1
6	Lavagem do sistema	0	0	0	0/1	0	50	1

0 = desligado, 1 = ligado

Conforme mostra a **Tabela 3**, inicialmente as minibombas são acionadas (1) intercaladamente, para preencher as linhas de fluxo com as respectivas soluções de amostra, reagente e transportador. Nesta etapa o espectrofotômetro é calibrado durante a inserção de água deionizada que realizada através do acionamento da minibomba P₄.

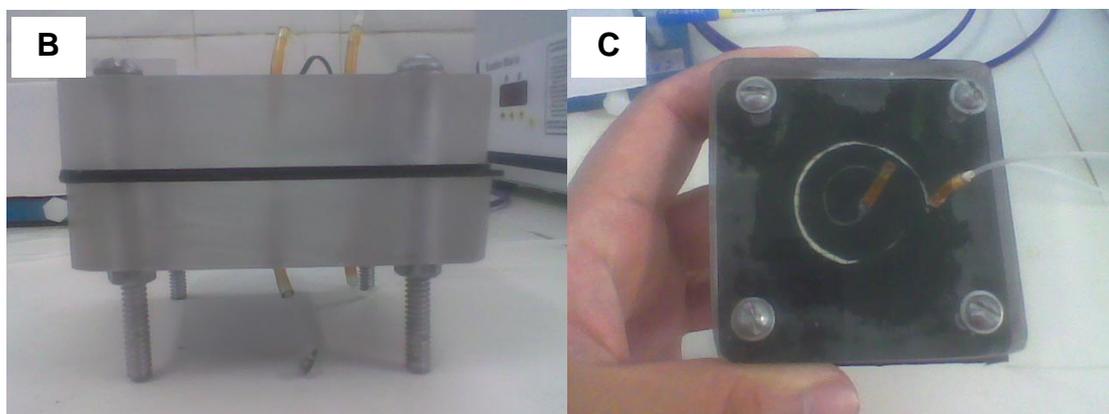
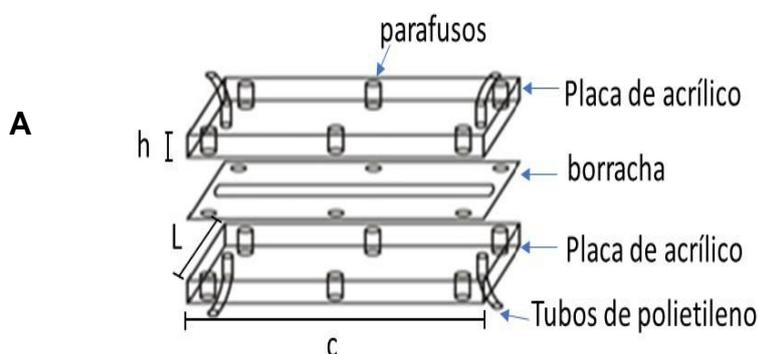
Para dar início ao ciclo analítico, 40 µL da solução de NaOH é inserida no percurso analítico, em seguida a minibomba é desligada e 40 µL da solução da amostra é inserida, ao desligar a minibomba da amostra, 40 µL da solução de cobre-neocuproína é inserida no percurso analítico. Para transportar a solução para o detector, realizar a leitura do sinal analítico e a lavagem do sistema, as minibombas P₄ e P₅ são acionadas.

Figura 5 - Diagrama esquemático do circuito de acionamento das minibombas solenoide.



A Célula de Difusão Líquida (CDL) ou unidade de diálise (DU), foi construída no laboratório, a DU foi constituída de dois blocos de acrílico com altura $h = 1,5$ cm, comprimento $c = 7$ cm, largura $L = 7$ cm, fixados por quatro parafusos (**Figura 6**), entre as placas foi posto uma membrana de acetato celulose $0,45 \mu\text{m}$, com duas camadas de borracha de $1,0$ mm para vedação, nessas borrachas também continham caminho analítico que a solução percorria dentro da unidade de diálise. A DU foi utilizada para diminuir a presença dos interferentes da amostra no meio reacional, tais como as antocianinas. Essas são as principais responsáveis pela coloração do vinho tinto, a qual interfere no sinal analítico causando erros na detecção espectrofotométrica.

Figura 6 - Célula de difusão líquida (CDL). **A:** desenho esquemático mostrando duas placas de acrílico com $h = 1,5$ cm, $c = 7$ cm e $L = 7$ cm, presas por parafusos, no centro duas borrachas de 1 mm de espessura e entre essas borrachas a membrana de acetato celulose utilizada na diálise; **B:** visão lateral; **C:** visão superior.



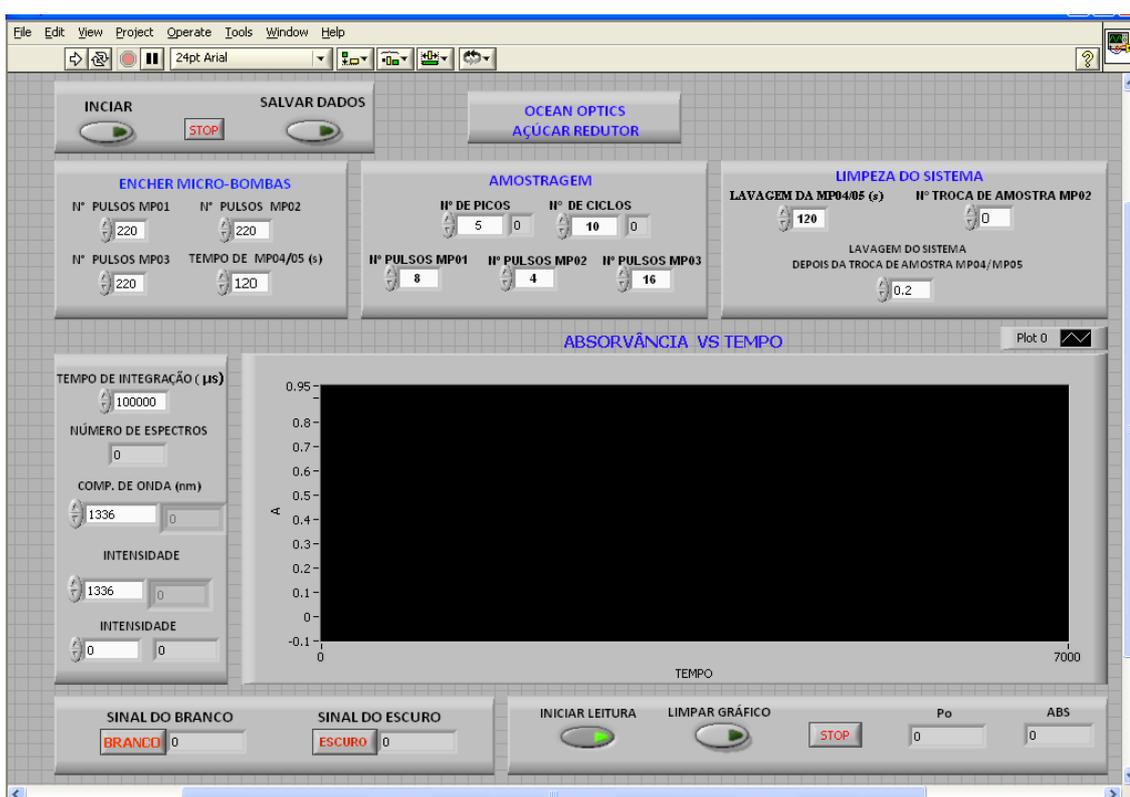
2.3.7 Descrição do programa

O software para controle e monitoramento do sistema em fluxo multicomutado foi desenvolvido em LabView 8.5 (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Work bench*). O LabVIEW é uma linguagem de programação gráfica desenvolvida pela *National Instruments Corporation*, que em vez de linhas usa ícones na criação de aplicativos e muito aplicado no campo de medições e automações (GASPAR, 2005).

O painel frontal do programa desenvolvido para a determinação de AR foi dividido em várias etapas. A etapa de enchimento dos tubos de polietileno até a confluência. Na amostragem, são inseridas as soluções de reagentes e amostra,

nesta etapa é possível alterar o número de análise a ser realizada e quantos ciclos será realizado para formação da zona de amostragem, assim com a proporção dos reagentes e amostra. Na etapa de limpeza do sistema é possível controlar o transporte da zona de amostragem até o detector, controlar a troca de amostra e realizar a limpeza. Durante todo o processo os sinais transientes foram coletados e gravados no gráfico localizado abaixo dos comandos mencionados, o qual pode ser visualizado na **Figura 7**.

Figura 7 - Painel frontal do software de controle das minibombas e aquisição de dados



2.4 METODOLOGIA

2.4.1 Método proposto

O método proposto é baseado na reação de oxi-redução entre o complexo de neocuproína com cobre²⁺, [Cu(Neo)₂]²⁺, com o açúcar redutor (glicose e frutose), reduzindo o complexo a [(Cu(Neo)₂)]⁺ e formando ácidos carboxílicos (DANTAS, 2004). As soluções de amostra e de reagentes são inseridos no sistema em fluxo, formando uma zona de amostragem particionada, esta forma de inserção é também conhecida como *tanden* ou sanduiche, e é utilizada para melhorar a mistura. O hidróxido de sódio é utilizado na reação como catalisador, pois desprotona os grupos hidroxilas do açúcar acelerando a reação entre [(Cu(Neo)₂)]⁺ e o AR. Após a etapa de amostragem, a zona de amostragem é transportada para o banho termostático, mantido a 85°C e posteriormente, para unidade de diálise, onde os possíveis interferentes foram removidos e a solução dialisada foi transportada para o detector, onde a absorbância foi monitorada em 460nm. Os sinais transientes foram enviados ao computador, posteriormente, tratados para a determinar a concentração de AR nas amostras de vinho.

O princípio do método pode ser representado pela seguinte equação química (**equação 1**) (LEE et al., 2011):



A diferença de coloração no início da reação até o produto final é percebida facilmente, pois a solução de [Cu(neocup)₂]²⁺ tem coloração verde e quando reduzida a [Cu(neocup)₂]⁺ apresenta coloração laranja, evidenciando a ocorrência da reação, como pode ser observada na **Figura 8**.

Figura 8 - Mudança de coloração de verde ($\text{Cu}(\text{neocup})_2^{2+}$) para Laranja ($[\text{Cu}(\text{neocup})_2]^+$)



2.4.2 Método de referência Lane-Eynon

Para a determinação de açúcares redutores foi utilizado o método de referência Lane-Eynon.

Preparo da amostra

Transferiu-se 50 mL da amostra desalcoolizada através da evaporação em chapa de aquecimento até 1/3 do volume da amostra. A alíquota foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e aferido o volume com água destilada. Para amostras com alto teor de açúcares foi tomado uma alíquota menor (GRANATO, 2011).

Foi efetuado a clarificação como segue: pipetar 50 mL da amostra desalcoolizada em um balão de 100 mL, adicionar 2 mL da solução de acetato neutro de chumbo (volume maior para produtos com alto teor de matérias corantes). Adicionar aproximadamente 0,5 g de carvão ativo (evitar excesso, pois poderá adsorver parte dos açúcares). Agitar bem e deixar em repouso por 10 minutos. Completar o volume com água destilada. Filtrar o conteúdo do balão volumétrico sobre 0,4 g de fosfato monoácido de sódio (ou 0,4 g de oxalato de sódio) por mililitro de solução de acetato neutro de chumbo utilizado, num erlenmeyer de 250 mL (a solução apresentará sedimentos em poucos minutos, deixando o líquido sobrenadante claro). Adicionar um pouco mais de fosfato (ou oxalato) para assegurar a completa precipitação do acetato de chumbo. Filtrar novamente, se necessário.

Transferir 50 mL da amostra assim preparada para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 1 mL de ácido clorídrico concentrado e levar ao banho-maria, de modo que a solução mantenha uma temperatura entre 67 e 70°C por 15 minutos. Esfriar à temperatura ambiente, neutralizar com hidróxido de sódio 5 mol L⁻¹, usando papel de tornassol como indicador, e completar o volume com água destilada.

Titulação da solução do branco

Em erlenmeyer de 250 mL, adiciona-se 20 mL de solução de Soxhlet (10 mL de Felhing A + 10 mL de Felhing B), 50 mL de água destilada e uma certa quantidade da solução padrão de glicose. Levar o frasco ao aquecimento, de modo que entre em ebulição dentro de 4 minutos. Iniciada a ebulição, adicionar 3 gotas de azul metileno. Decorrido um minuto do início da fervura, proceder a titulação até o desaparecimento da coloração azul. Repetir a operação até que os resultados em duplicata sejam iguais (GRANATO, 2011).

Titulação da solução de amostra

Em erlenmeyer de 250 mL, adicionar 20 mL da solução de Soxhlet, 40 mL de água destilada e 10 mL da amostra preparada anteriormente. Levar o frasco ao aquecimento, de modo que entre em ebulição dentro de 4 minutos. Iniciada a fervura, adicionar 2 gotas de azul de metileno. Após 1 minuto, continuar a titulação até o desaparecimento da coloração azul da solução, o intervalo de tempo será aproximadamente o mesmo tempo gasto na determinação do branco. Repetir a operação até que os resultados em duplicata sejam iguais (GRANATO, 2011). (GRANATO, 2011).

2.4.2.1 Expressão dos resultados

O teor de açúcares redutores (AR) deverá ser calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$AR (g L^{-1}) = \frac{(a - b) \cdot 5 \cdot n}{V}$$

a = volume gasto na titulação da amostra;

b = volume gasto na titulação do branco;

n = fator de diluição;

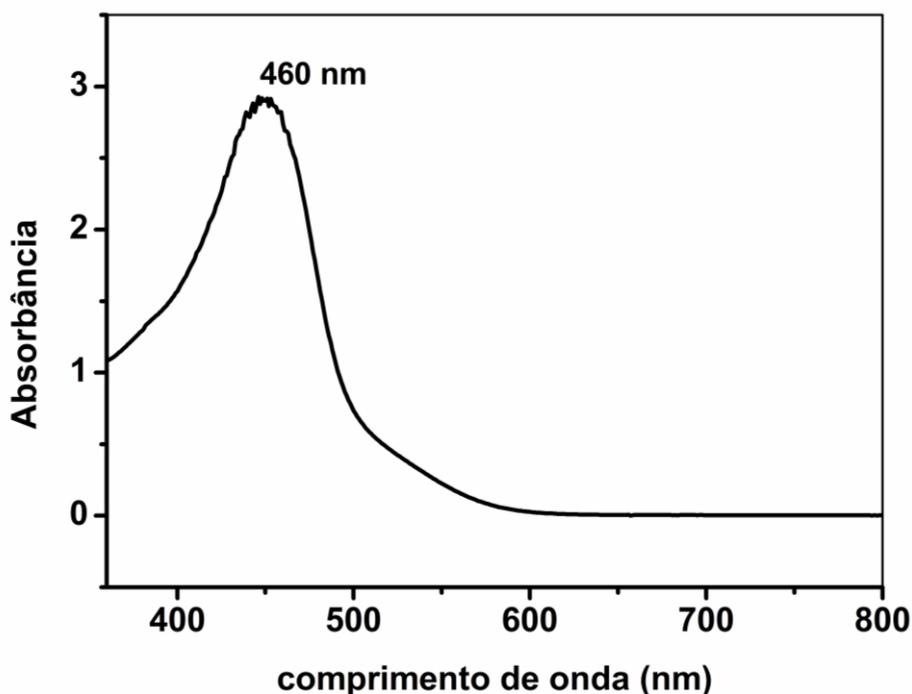
V = volume da amostra usado para a titulação (BLASI, 2004).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Aspectos Gerais

Para estabelecer o comprimento de onda que seria empregado na determinação dos açúcares redutores, a reação entre o açúcar e o complexo $[\text{Cu}(\text{Neo})_2]^{2+}$, foi monitorado entre 400 e 700 nm e a absorção máxima foi obtida em 460 nm como pode ser observado na **Figura 9**.

Figura 9 - Espectro de absorção da reação entre AR e $[(\text{neo})_2\text{Cu}]^{2+}$



O método de Job (método das variações contínuas) foi empregado para estudar a relação estequiométrica do complexo formado entre Cu^{2+} e neocuproína. As soluções foram preparadas com concentrações molares iguais a $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e variou-se a razão volumétrica entre 1: 9 e 9: 1 (v / v). (HILL; MACCARTHY, 1986). O melhor valor de razão estequiométrica estimado entre Cu^{2+} e neocuproína foi de 1: 2 (v / v).

Os parâmetros químicos e hidrodinâmicos do procedimento proposto foram estudados pelo método univariado.

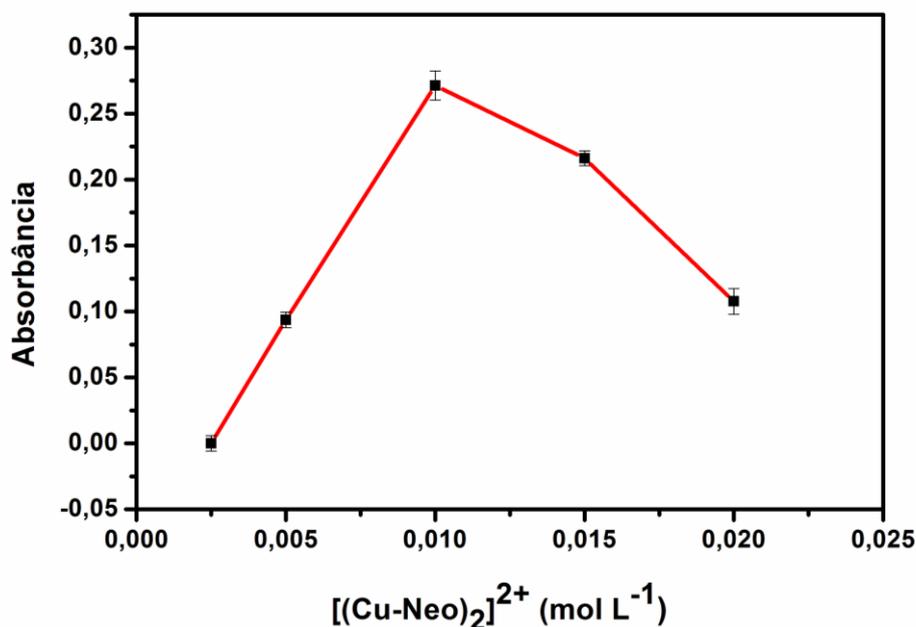
As condições iniciais pré-estabelecidas, tais como concentrações de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para as soluções de AR, NaOH e $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$, respectivamente; $65 \text{ }^\circ\text{C}$ para o banho termostatizado; proporção volumétrica de 1:1:1 (v/v); com 10 pulsos para cada solução e 10 ciclos de amostragem, foram mantidas como ponto de partida para os estudos. Como a reação, sob aquecimento, acontece de forma rápida o tamanho do reator não influenciou de forma significativa. Desta forma, o comprimento do reator utilizado foi fixado em 100 cm.

2.5.2 Otimização do sistema proposto

2.5.2.1 Efeito da concentração de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ e NaOH

O efeito da concentração de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ e NaOH foi investigado mantendo a solução de referência em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ AR. A concentração de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ variou de $0,00250$ a $0,020 \text{ mol L}^{-1}$, como mostrado na **Figura 10**. Como pode ser observado na **Figura 10**, a magnitude do sinal analítico aumenta com o aumento da concentração de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ até a concentração de $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, com valores maiores que esta concentração o sinal começou a diminuir. Isso pode ser atribuído à proporção estequiométrica dos reagentes, uma concentração acima de $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, ocorre o excesso de reagente e com isso o mesmo não participa da reação e contribui apenas para diluição da zona de amostragem, ocasionando assim, a diminuição do sinal analítico. Dado o resultado obtido, foi estabelecida em $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ a concentração do complexo $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$.

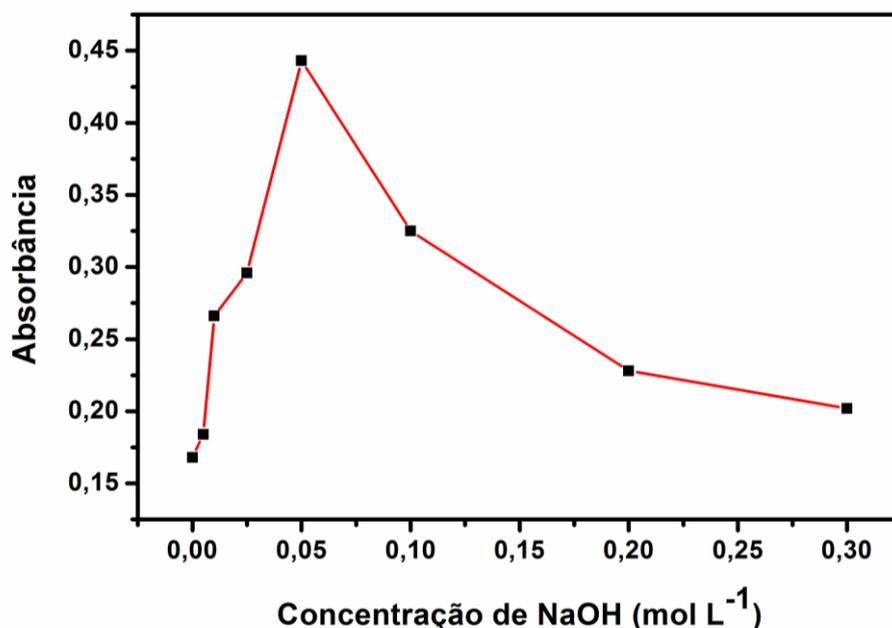
Figura 10 - Estudo da concentração do complexo $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$. Condições experimentais: $1,0 \text{ g L}^{-1}$ AR; $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, banho termostático a $65 \text{ }^\circ\text{C}$; proporção volumétrica de 1: 1: 1 (v / v), com 10 pulsos para cada solução e 10 ciclos de amostragem ($400 \text{ }\mu\text{L}$ de cada solução), reator de 100 cm e detecção a 460 nm .



O NaOH é utilizado neste método como catalisador e sua concentração é um fator de extrema importância, pois pode afetar a sensibilidade do procedimento. Com isso, foi realizado um estudo, variando a concentração de NaOH de $0,0050$ a $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, usando os mesmos parâmetros previamente definidos e concentração da solução de $0,010 \text{ mol L}^{-1} [(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$, produzindo os resultados mostrados na **Figura 11**.

Pode-se perceber na **Figura 11** que o sinal analítico aumenta com o aumento da concentração de NaOH até $0,050 \text{ mol L}^{-1}$, posteriormente, há um decréscimo na magnitude do sinal analítico com o aumento de concentração de NaOH. Este fato pode ser atribuído à decomposição do complexo $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ com o aumento da concentração de NaOH, formando o precipitado $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ($K_{ps} = 2,2 \times 10^{-20}$). O precipitado formado pode saturar rapidamente a membrana utilizada na diálise. Com isso, a concentração de NaOH escolhida foi $0,050 \text{ mol L}^{-1}$.

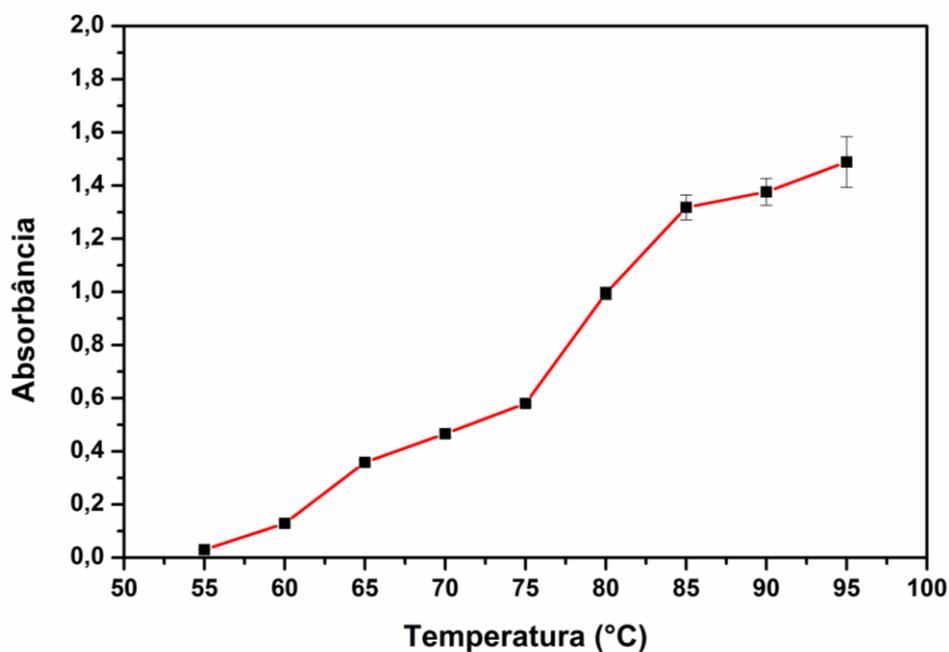
Figura 11 - Estudo da concentração de NaOH. Condições experimentais: 1,0 g L⁻¹ AR; 0,01 mol L⁻¹ [(Cu-Neo)₂]²⁺; banho termostatizado a 65 °C; proporção volumétrica de 1: 1: 1 (v / v), com 10 pulsos para cada solução e 10 ciclos de amostragem (400 µL de cada solução); reator de 100 cm e detecção a 460 nm



2.5.2.2 Efeito da Temperatura

O estudo do efeito da temperatura sob a reação química entre o complexo [(Cu-Neo)₂]²⁺ e o AR, foi estudado, conforme mostra a **Figura 12**, variando a temperatura do banho termostatizado entre 55 e 95 °C, mantendo-se a concentração da solução de referência em 1,0 g L⁻¹ AR, 0,010 mol L⁻¹ complexo [(Cu-Neo)₂]²⁺ e 0,050 mol L⁻¹ de NaOH. Analisando a **Figura 12**, observa-se que o sinal analítico aumenta com o aumento da temperatura, porém acima de 85 °C ocorre a formação de bolhas de ar no percurso analítico devido a ebulição da solução (zona de amostragem), tornando a detecção do sinal analítico irreproduzível, visto que as bolhas desviam o feixe de radiação do espectrofotômetro, ocasionando ruídos. Com isso foi escolhido 85 °C, como a melhor temperatura de trabalho.

Figura 12 - Estudo da temperatura

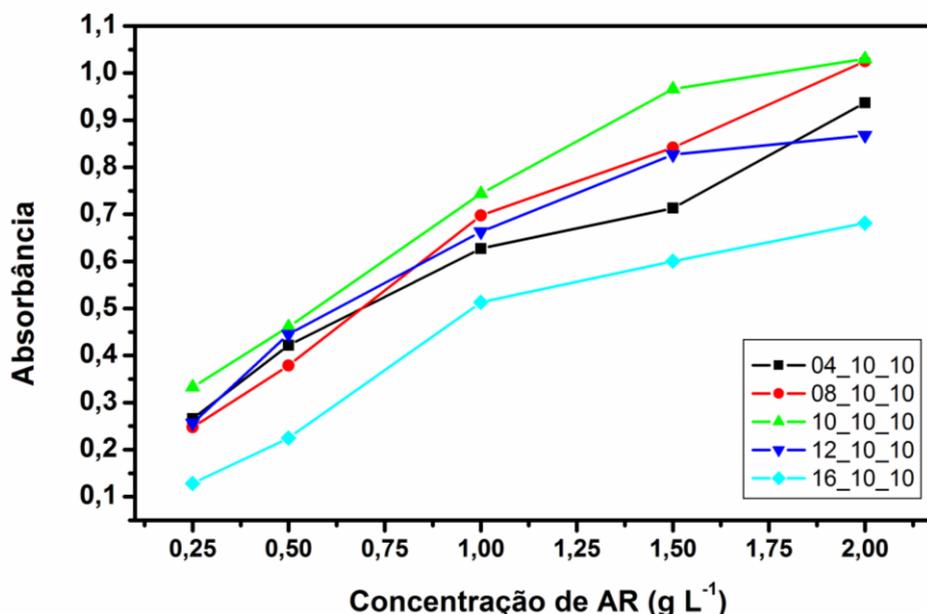


2.5.2.3 Efeito da razão volumétrica de NaOH/AR/ $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$

O efeito da razão volumétrica dos reagentes e amostra foi estudado utilizando o método univariado, mantendo as concentrações que foram fixadas nos estudos anteriores.

O primeiro estudo realizado da razão volumétrica foi a variação do número de pulsos/volume do NaOH em 4, 8, 10, 12 e 16 pulsos com 10 ciclos, o que é equivalente ao volume de NaOH de 160, 320, 400, 480 e 640 μL , respectivamente, visto que em cada acionamento das minibombas são inseridos 4 μL de solução. O número de pulsos do AR e $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ foram mantidos em 10 pulsos cada. Para cada pulso/volume de NaOH foi traçada uma curva analítica com concentrações de AR 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 g L^{-1} , como mostra a **Figura 13**.

Figura 13 - Estudo do volume da solução de NaOH. Condições experimentais: $0,01 \text{ mol L}^{-1} [(Cu-Neo)_2]^{2+}$; $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH; proporção volumétrica de 1: 1 (AR: $[(Cu-Neo)_2]^{2+}$; v / v), com 10 pulsos para cada solução e 10 ciclos de amostragem ($400 \mu\text{L}$ de cada solução); banho termostatizado a $85 \text{ }^\circ\text{C}$; reator de 100 cm e detecção a 460 nm



Para a escolha do melhor volume foi necessário analisar também o coeficiente de correlação linear (r) e a sensibilidade de cada curva. Com o auxílio da **Tabela 4**, é possível visualizar esses parâmetros.

Tabela 4 - Equação da curva e coeficiente de correlação linear do estudo do volume da solução de NaOH

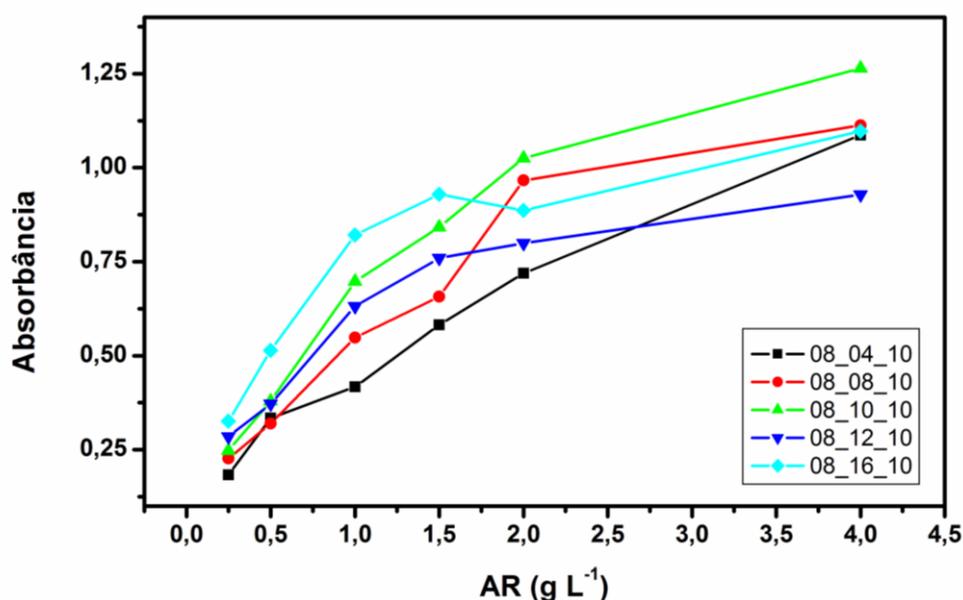
Pulsos P_1	NaOH (μL)	Equação Linear	Coefficiente de correlação linear (r)
4	160	$y = (0,2164 \pm 0,0406) + (0,3586 \pm 0,0330)x$	0,9875
8	320	$y = (0,1715 \pm 0,0479) + (0,4444 \pm 0,0389)x$	0,9887
10	400	$y = (0,2681 \pm 0,0621) + (0,4178 \pm 0,0505)x$	0,9788
12	480	$y = (0,2470 \pm 0,0705) + (0,3477 \pm 0,0575)x$	0,9615
16	560	$y = (0,2462 \pm 0,0575) + (0,3113 \pm 0,0495)x$	0,8896

Analisando a **Tabela 4**, nota-se que a melhor condição foi com 8 pulsos ($320 \mu\text{L}$) de NaOH, pois a mesma apresentou maior r e maior sensibilidade. Observa-se também, que com o aumento do volume de solução de NaOH para 400 , 480 e $640 \mu\text{L}$, houve uma perda de linearidade. Isso ocorreu porque a quantidade de

reagente pode ter ocasionado a precipitação de $\text{Cu}(\text{OH})_2$, semelhante ao que ocorreu no estudo da concentração de NaOH. Portanto, selecionou-se 8 pulsos (320 μL) de NaOH para os estudos seguintes.

O estudo do volume da solução de referência, AR, foi realizado de modo semelhante ao estudo de volume do NaOH. Neste, o número de pulsos do NaOH foi fixado em 8 pulsos (320 μL conforme estudo anterior) e a do complexo $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ em 10 pulsos (400 μL), variando somente os pulsos da solução de referência AR em 4, 8, 10, 12 e 16 pulsos equivalente a 160, 320, 400, 480 e 640 μL , respectivamente. Foi traçada uma curva analítica para cada condição, as quais podem ser observadas na **Figura 14**.

Figura 14 - Estudo do volume da solução de referência AR. Condições experimentais: 0,010 mol L^{-1} de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$; 0,050 mol L^{-1} de NaOH; proporção volumétrica de 0,8:1 (NaOH: $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$; v/v), com 8 (320 μL) e 10 (400 μL) pulsos para cada solução, respectivamente, e 10 ciclos de amostragem; banho termostatizado a 85 °C; reator de 100 cm e detecção a 460 nm.



Para a escolha do melhor volume de AR foi necessário analisar também o coeficiente de correlação linear (r) e a sensibilidade de cada curva analítica (**Tabela 5**).

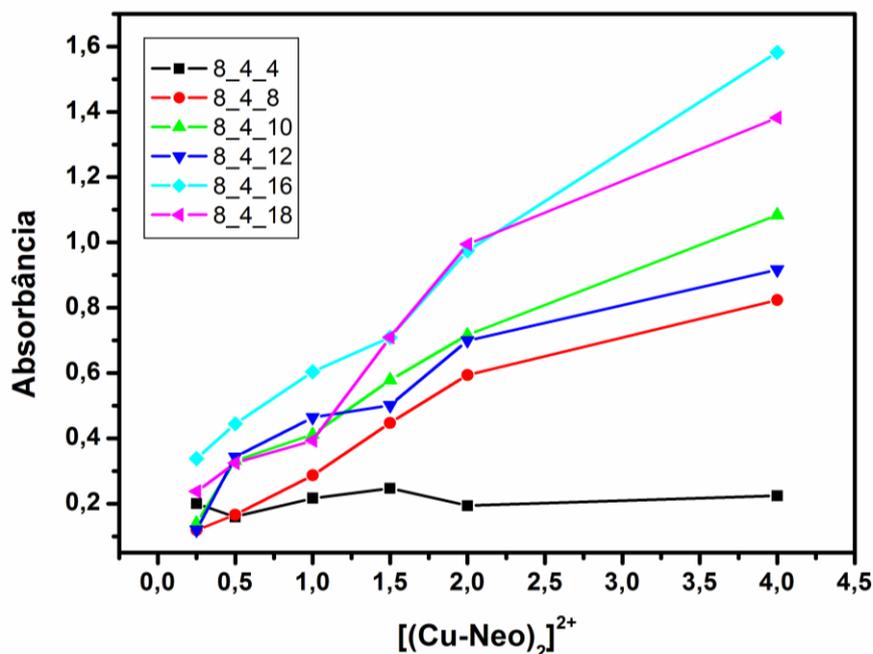
Tabela 5 - Equação da curva e coeficiente de correlação linear do estudo de volume do AR.

Pulsos P ₂	AR (μL)	Equação Linear	Coefficiente de correlação linear (r)
4	160	$y = (0,2316 \pm 0,0318) + (0,2184 \pm 0,0147)x$	0,9933
8	320	$y = (0,2449 \pm 0,0532) + (0,2262 \pm 0,0269)x$	0,9794
10	400	$y = (0,3053 \pm 0,1186) + (0,2704 \pm 0,0558)x$	0,9416
12	480	$y = (0,3774 \pm 0,0872) + (0,1634 \pm 0,0440)x$	0,8804

Analisando a **Tabela 5** nota-se que o maior coeficiente de correlação linear foi obtido com 4 pulsos da solução de referência AR (160μL). Para volumes inferiores a 160 μL, correspondentes a 4 pulsos por ciclo de amostragem, não foi possível obter uma resposta analítica significativa devido à sensibilidade do método proposto. Dado os resultados, o volume de 4 pulsos foi escolhido para os próximos estudos.

Finalmente, o estudo do volume/número de pulsos do complexo [(Cu-Neo)₂]²⁺ foi realizado fixando os volumes de NaOH e solução de referência AR em 8 e 4 pulsos, respectivamente. O número de pulsos do complexo [(Cu-Neo)₂]²⁺ estudado foi de 4, 8, 10, 12, 16 e 18 pulsos 160 a 720 μL. Foi traçada uma curva analítica para cada condição deste estudo, as quais são apresentadas na **Figura 15**.

Figura 15 - Estudo do volume da solução $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$. Condições experimentais: $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de AR; $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$; $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH; proporção volumétrica de 2:1 (NaOH: AR; v / v), com 8 (320 μL) e 4 (160 μL) pulsos para cada solução, respectivamente, e 10 ciclos de amostragem; banho termostatizado a $85 \text{ }^\circ\text{C}$; reator de 100 cm e detecção a 460 nm.



Como pode ser percebido na **Figura 15**, foi realizado um estudo de volume até 720 μL (18 pulsos), isso ocorreu devido a melhor condição ter sido com 640 μL (16 pulsos), o que levou a realizar um estudo com condições superiores a 16 pulsos. Nota-se também que quanto maior o volume da solução de $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$ aumentava, também o coeficiente de correlação linear, isso ocorreu até 16 pulsos (640 μL).

Para melhor visualização, os resultados obtidos nas curvas analíticas foram resumidos na **Tabela 6**. Assim como nos estudos anteriores, na escolha do melhor volume do $[(\text{Cu-Neo})_2]^{2+}$, foi preciso não só analisar o coeficiente de correlação linear, mas também a sensibilidade da curva, a qual foi o fator decisivo.

Tabela 6 - Equação da curva e coeficiente de correlação linear do estudo do volume do [(Cu-Neo)₂]²⁺.

Pulsos P ₃	[(Cu-Neo) ₂] ²⁺ (μL)	Equação linear	Coefficiente de correlação linear (r)
4	160	$y = (0,1589 \pm 0,1064) + (0,0404 \pm 0,0552)x$	0,4766
8	320	$y = (0,1083 \pm 0,0444) + (0,1932 \pm 0,0224)x$	0,9742
10	400	$y = (0,2316 \pm 0,0318) + (0,2184 \pm 0,0147)x$	0,9933
12	480	$y = (0,1993 \pm 0,0612) + (0,1861 \pm 0,0309)x$	0,9610
16	640	$y = (0,3597 \pm 0,0326) + (0,3079 \pm 0,0169)x$	0,9940
18	720	$y = (0,2476 \pm 0,0497) + (0,1959 \pm 0,0251)x$	0,9762

Analisando a **Tabela 6**, observa-se que os maiores coeficientes de correlação lineares foram 0,9933 e 0,9940, respectivamente, os quais são praticamente iguais para as condições de 10 e 16 pulsos. O dado decisivo para escolha da melhor condição foi a sensibilidade que apresentou valores de 0,2184 e 0,3079 para 10 e 16 pulsos respectivamente. Com isso, o volume de 640μL (16 pulsos) foi escolhido para o complexo e fixado para os estudos posteriores.

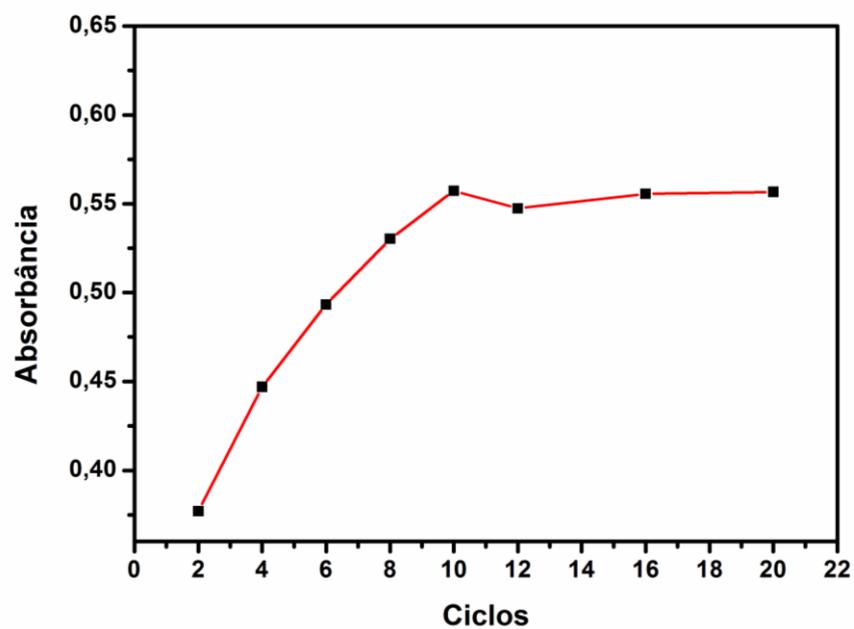
2.5.2.3.1 Efeito do volume da zona de amostragem

Outro estudo bastante importante a considerar é o volume da zona de amostragem, pois a mesma afeta diretamente o sinal analítico e conseqüentemente a sensibilidade.

O estudo de volume da zona de amostragem é realizado através da variação do número de ciclos, para tanto o número de ciclos foi variado de 2 a 20 ciclos que corresponde a um volume de 0,56 a 5,6 mL.

Como pode ser observado na **Figura 16**, o sinal analítico cresce com o aumento do número de ciclos de amostragem, porém isso não ocorre com valores maiores que 10 ciclos. Acima de 10 ciclos, não ocorre aumento significativo na magnitude do sinal indicando que o sistema atingiu o estado estacionário. Com isso, foi escolhido 10 ciclos (1120 μL) como melhor resultado, visto que também há um menor consumo de soluções de amostra e reagente com essa condição.

Figura 16 - Estudo do número de ciclos. Condições experimentais: 1,0 g L⁻¹ AR; 0,010 mol L⁻¹ [(Cu-Neo)₂]²⁺; 0,050 mol L⁻¹ NaOH; proporção volumétrica de 2:1:4 (NaOH / AR / [(Cu-Neo)₂]²⁺, v / v), com 8 (320 μL), 4 (160 μL) e 16 (640 μL) pulsos para cada solução, respectivamente, e 10 ciclos de amostragem; banho termostatizado a 85 °C; reator de 100 cm e detecção a 460 nm.



2.6 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

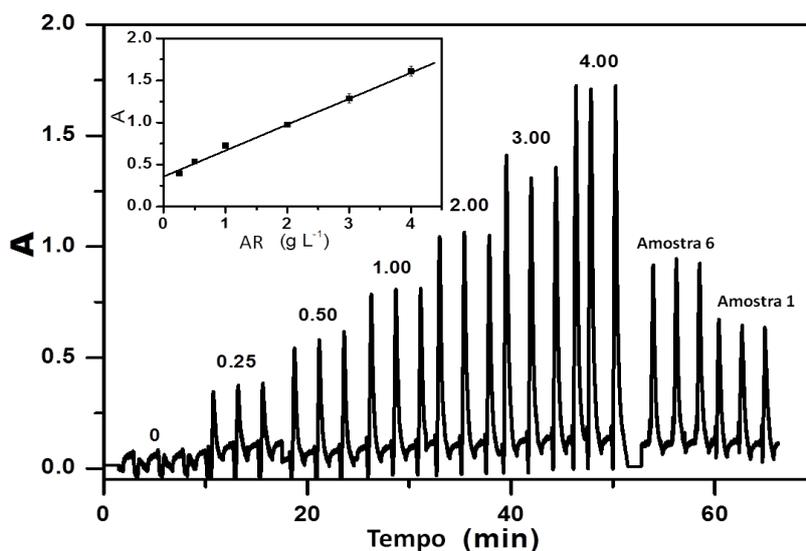
A validação do método proposto foi realizada com os parâmetros definidos na etapa de otimização do sistema, apresentados na **Tabela 7**. Para tanto, foram determinados os parâmetros de validação, que são: faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Os cálculos dos parâmetros, foram realizados de acordo com as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), do Inmetro - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2010) e da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 2002).

Tabela 7 - Parâmetros químicos e físicos obtidos na otimização do sistema em fluxo

Parâmetros	Intervalo	Valor selecionado
Concentração de NaOH (mol L ⁻¹)	0,005 - 0,3	0,05
Concentração de [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ (mol L ⁻¹)	0,0025 - 0,05	0,01
Temperatura (°C)	50 - 100	80
Volume de solução NaOH (μL)	160 - 640	320
Volume de solução da amostra (μL)	160 - 640	160
Volume de solução de [(Cu-Neo) ₂] ²⁺ (μL)	160 - 720	640
Ciclos de amostragem	2 - 20	10

As curvas analíticas foram construídas empregando os parâmetros estabelecidos nos estudos do sistema em fluxo proposto. A curva analítica foi obtida com soluções de referência de AR com concentrações de 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹ de AR. A curva obtida apresentou equação **A = (0,36 ± 0,02) + (0,31 ± 0,01) * x**, onde A é absorbância e C é concentração em g L⁻¹, de AR, e o coeficiente de correlação linear (r) igual a **0,9975**. O sistema apresentou boa distinção entre as diferentes concentrações de AR, com sinais bem definidos e retornando rapidamente a linha de base. Estas características podem ser observadas na **Figura 17**.

Figura 17 - Sinais analíticos obtidos para diferentes concentrações de AR e curva analítica

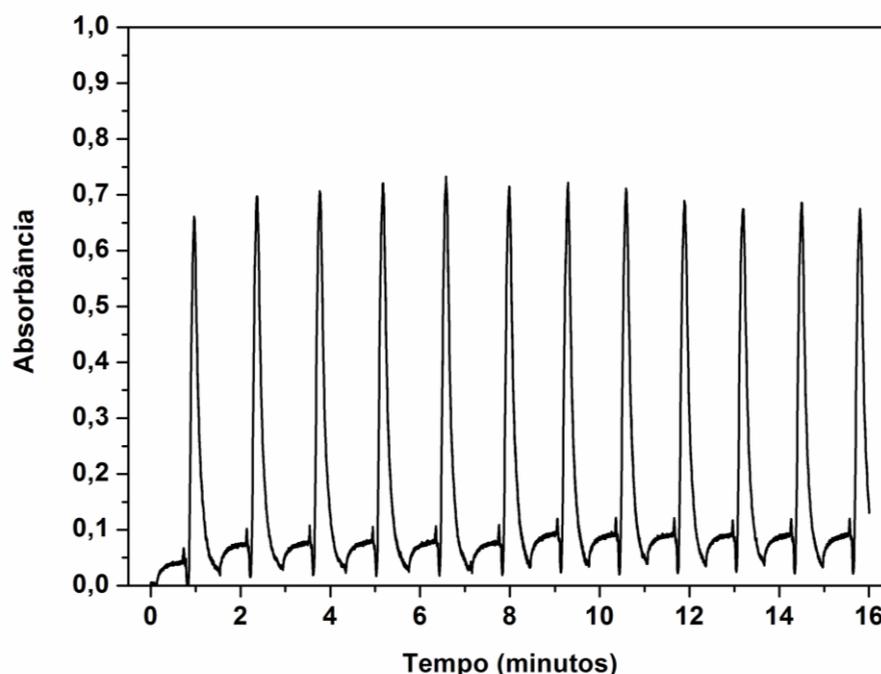


Com isso, pode-se afirmar que o sistema apresentou linearidade para a faixa de concentração de 0,25 a 4,0 g L⁻¹ de AR.

A repetibilidade representa a dispersão entre os valores de ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra, utilizando a mesma metodologia, no mesmo dia, com o mesmo analista e no mesmo local. Os valores das medidas mostram a relação de concordância entre as repetições. A repetibilidade pode ser expressa como desvio padrão (SD) ou desvio padrão relativo (%RSD) (MATOSO, 2001; RIBANI et al., 2004).

Neste trabalho a precisão do método proposto foi calculada através de 12 determinações consecutivas da solução de 1,0 g L⁻¹ de AR (**Figura 18**), obtendo desvio padrão de 0,01829 e desvio padrão relativo de 2,6%, apresentando concordância entre os sinais analíticos e demonstrando assim a potencialidade do método proposto.

Figura 18 - Sinais analíticos obtidos de repetições de análises realizadas para calcular o RSD%.



A exatidão é o dado mais importante da validação de metodologia, pois representa a concordância entre um valor medido e um valor tido como verdadeiro ou real, que pode ser medido através da comparação com materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaios de recuperação ou adição de padrão.

O teste de exatidão realizado neste trabalho foi a comparação de métodos, que consiste na comparação dos resultados de análise das amostras, realizados com o método proposto e com o método de referência. Obtido os resultados verifica-se, suas proximidades pelos dois métodos e através de métodos estatísticos (neste caso, o teste de *t-student*), verifica-se se há ou não diferença significativa entre os métodos (RIBANI et al., 2004).

Os resultados do método proposto e do método de referência, neste caso o método da AOAC, foram obtidos em triplicata e estão representados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Teste comparativo entre o método oficial e o método proposto

Amostras	Tipo de vinho	Quantidade encontrada (g L ⁻¹) ^a	
		Método AOAC	Método proposto
1	Tinto seco	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1
2	Tinto seco	8,4 ± 0,3	5,1 ± 0,2
3	Tinto seco	5,7 ± 0,2	4,3 ± 0,3
4	Tinto seco	3,5 ± 0,2	2,34 ± 0,08
5	Tinto seco	4,0 ± 0,3	2,9 ± 0,1
6	Tinto seco	1,8 ± 0,2	1,73 ± 0,09
7	Meio seco	13,7 ± 0,1	15,0 ± 0,4
8	Meio doce	81,3 ± 0,4	81 ± 6
9	Licoroso	110,5 ± 0,7	141 ± 10
10	Licoroso	123 ± 2	156 ± 2
11	Branco seco	3,0 ± 0,2	4,64 ± 0,01

n = 3

Aplicando o teste t pareado, no nível de confiança de 95%, o valor calculado foi $t = 1,356$, enquanto o valor teórico é $t = 1,812$, indicando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados.

O LD foi obtido através do método baseado em parâmetros da curva analítica, o qual foi calculado através da seguinte equação:

$$LD = \frac{3\sigma}{s}$$

Onde, σ é o desvio padrão e s é a inclinação da reta ("slope"), ou seja, a sensibilidade. O LD encontrado para este trabalho foi de $0,030\text{g L}^{-1}$.

O LQ foi obtido utilizando o método baseado nos parâmetros da curva analítica, calculado a partir da fórmula:

$$LD = \frac{10 \sigma}{s}$$

Onde, σ é o desvio padrão e s é o "slope" da reta. O LQ encontrado para este trabalho foi de $0,10 \text{ g L}^{-1}$ AR.

2.6.1 Figuras de mérito

Após estabelecer as melhores condições de análise, o sistema em fluxo apresentou uma frequência analítica de 45 determinações por hora e uma geração de efluentes de 3.120 mL por determinação. A comparação com outros métodos descritos na literatura está resumida na **Tabela 9**.

O procedimento proposto apresenta vantagens que incluem um menor limite de detecção, menor consumo de reagentes e amostras, menor geração de efluente e conseqüentemente uma redução significativa no custo da análise. Tudo isso, deixa evidente a viabilidade do método proposto como uma alternativa para determinação de AR em amostras de vinhos.

Tabela 9 - Comparação de métodos encontrados na literatura para determinação de AR em vinhos

Parâmetros	AOAC (Latimer Jr 2012)	FIA ^a (Maquieira et al., 1987)	FIA ^a (Peris-Tortajada et al., 1992)	SIA ^a (Araújo et al., 2000)	Metodo proposto ^a
Faixa linear (g L^{-1})	-	0,05 - 1,0	1,2 - 7,2	2 - 25 or 20 - 140	0,25 - 4,0
LD (g L^{-1})	-	-	-	1,2 or 11.2	0,03
R.S.D. (%)	-	1,61	-	2,1 or 1,7	2,6
Volume de amostra (mL) ^b	50	0,0453	0,143	0,120 or 0,340	0,160
Volume de efluente (mL) ^b	112	3,453	3,593	8,898 or 9,553	3,120
Consumo NaOH (mg) ^b	1000	40,32	34,50	4,95	0,160
Neocuproina (mg) ^b	-	0,672	0,690	0,054	0,330
CuSO ₄ (mg) ^b	692.78	0,336	0,345	0,027	0,128
Frequência (h^{-1})	1	50	40	18 or 14	45

^a Procedimentos baseados em oxidação-redução da reação em meio alcalino entre o complexo $[\text{Cu}^{2+}$ -Neocuproina] e açúcares redutores.

^b Valores por determinação.

3 CONCLUSÃO

O procedimento proposto se mostrou bastante eficiente para a determinação de açúcares redutores em amostras de vinho. As propriedades da análise por injeção em fluxo empregando um sistema multicomutado com minibombas solenoide, permitiu a introdução de uma unidade de diálise em linha, melhorando a resposta e eliminando o efeito de matriz.

O sistema proposto apresentou características analíticas bastantes interessantes, tais como: frequência analítica de 45 determinações h^{-1} , ampla faixa linear de trabalho entre 0,25 - 4,00 $g L^{-1}$ com coeficiente de correlação linear de $R = 0,9975$, limites de detecção e quantificação relativamente baixos, com valores de 0,03 e 0,1 $g L^{-1}$ respectivamente. Apresentou um desvio padrão relativo de 2,6% ($n=12$) e quando comparado com o método padrão da AOAC, os resultados obtidos não apresentam diferença significativa em nível de confiança de 95%. Além do baixo consumo de amostras e reagentes, o que leva a uma menor geração de efluente e conseqüentemente o sistema proposto agride menos o meio ambiente, contribuindo assim com o conceito de "química limpa".

O procedimento proposto para a determinação de açúcares redutores não necessita de tratamentos prévios da amostra, pois a célula de difusão líquida permite a redução da coloração vermelha do vinho, o qual é o principal interferente na detecção espectrofotométrica. Os métodos mais utilizados, além de serem laboriosos, necessitam de prévio tratamento da amostra, dependendo ainda mais da capacidade do operador e conseqüentemente, aumentando as chances de erros. Para este tratamento alguns métodos utilizam-se de substâncias tóxicas como o acetato de chumbo, utilizado para o clareamento das amostras, quando são empregados os métodos de Lane-Eynon e o da OIV, por exemplo.

Os teores obtidos de açúcares redutores nas amostras de vinhos analisadas, variaram de 1,2 a 156 $g L^{-1}$. Os menores valores foram para vinho tinto seco e os maiores para vinhos licorosos.

Neste sentido, a metodologia proposta oferece simplicidade, versatilidade, redução na geração de efluentes, sistema automatizado, maior precisão e alta frequência analítica. O que o torna apto para ser empregado na determinação de açúcares redutores em amostras de vinhos.

4 SÍNTESE DE CARBON DOTS E SEU EMPREGO NA DETERMINAÇÃO ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE ÍONS Hg^{2+} e Cu^{2+} EM AMOSTRAS DE ÁGUA E CACHAÇA

Os CD são considerados uma nova classe de nanopartículas fluorescentes que apresentam algumas propriedades, tais como, alta fotoestabilidade, capacidade de serem funcionalizados com moléculas diferentes de acordo com a aplicação desejada, elevada estabilidade, não toxicidade, entre outras. Estas propriedades fizeram dos CD um material muito interessante para serem aplicados em diversas áreas, como por exemplo, biosensores, bioimagem, produtos farmacêuticos, células de combustível, entre outras (CAO et al., 2007; YANG et al., 2009).

Os CD são vistos como o novo membro da família dos *Quantum Dots* (QDs), porque compartilham de algumas das propriedades físicas que fizeram os QDs relevantes na área de nanoquímica, como por exemplo, a fluorescência, o tamanho e banda de excitação e emissão bem definidas. No entanto, QD tradicionais têm um núcleo de metal pesado que limita a sua aplicação em ensaios "*in vivo*", devido ao seu efeito tóxico. Neste sentido, alguns autores têm referido os CD como alternativa mais promissora para esta finalidade. De fato, alguns estudos mostram que os CD podem ser aplicados em bioimagem (BAKER; BAKER, 2010).

Desde a sua descoberta em 2004 (XU et al., 2004), tem havido um grande interesse nessas nanopartículas, com isso, o número de trabalhos sobre o tema aumentou rapidamente. Este novo material à base de carbono apresenta-se como uma alternativa não tóxica, e as vias sintéticas para a sua produção estão aumentando rapidamente. Os métodos de síntese podem ser divididos basicamente em nove grupos, todos têm suas vantagens e desvantagens as quais dependem principalmente do material de partida.

O CD utilizado neste trabalho foi sintetizado através do método "*bottom-up*" utilizando ácido cítrico e tiosemicarbazida em banho hidrotermal.

4.1 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um procedimento analítico utilizando *carbon dots*, para a determinação de íons metálicos (Hg^{2+} e Cu^{2+}), em amostras de água e cachaça empregando detecção espectrofluorimétrica.

4.1.2 Objetivos específicos

- Sintetizar *carbon dots*;
- Caracterizar os *carbon dots*;
- Aplicar os *carbon dots* para o desenvolvimento de um método para a determinação de íons Hg^{2+} e Cu^{2+} ;
- Determinar as figuras de mérito do método;
- Aplicar o método a amostras reais de águas e cachaça;
- Comparar com método de referência.

4.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.2.1 Carbon Dots

A nanociência é uma área que está sendo muito explorada nos seus diversos aspectos. A mesma se refere ao conjunto de estudo e conhecimento das técnicas e aplicações das nanotecnologias a qual é uma das tecnologias mais importantes do século XXI e tem sido amplamente aplicada em várias áreas, principalmente na biomédica, na física e na química. Quando comparados com os corantes fluorescentes tradicionais, os nanomateriais fluorescentes levam vantagens, pois devido ao tamanho, estes têm efeito quântico que são características únicas aos nanomateriais, os quais podem superar os defeitos de superfície, tais como a baixa estabilidade, fraca intensidade de fluorescência e a rápida fotodegradação (ZUO et al., 2015).

Entre os tipos de nanopartículas, os QDs tornaram-se foco de atenção devido às suas propriedades eletrônicas e luminescentes únicas. No entanto, estes semicondutores geralmente contêm metais pesados, que são em geral muito tóxicos e limitam as suas novas aplicações no campo da biomedicina.

A nanociência oferece muitas oportunidades para os avanços científicos e tecnológicos e pesquisas recentes têm conseguido avanços com nanomateriais de carbono, como por exemplo: os fulerenos (C_{60}), também conhecidos como "*buckminsterfullerene*"; os nanotubos de carbono; os nanodiamantes; as nanofibras de carbono; os grafenos; e os *carbon dots* (CD) que foram recentemente descobertos. Cada um desses nanomateriais de carbono mostram interessantes e notáveis propriedades físico-químicas que conduziram à novas possibilidades ao avanço científico e tem se mostrado promissor para a evolução tecnológica (BAKER; BAKER, 2010).

Os nanodiamantes e os *carbon dots* possuem tamanhos semelhantes e também a possibilidade de alteração da sua superfície, porém fazem parte de diferentes famílias porque possuem estruturas diferentes (ESTEVES DA SILVA; GONÇALVES, 2011).

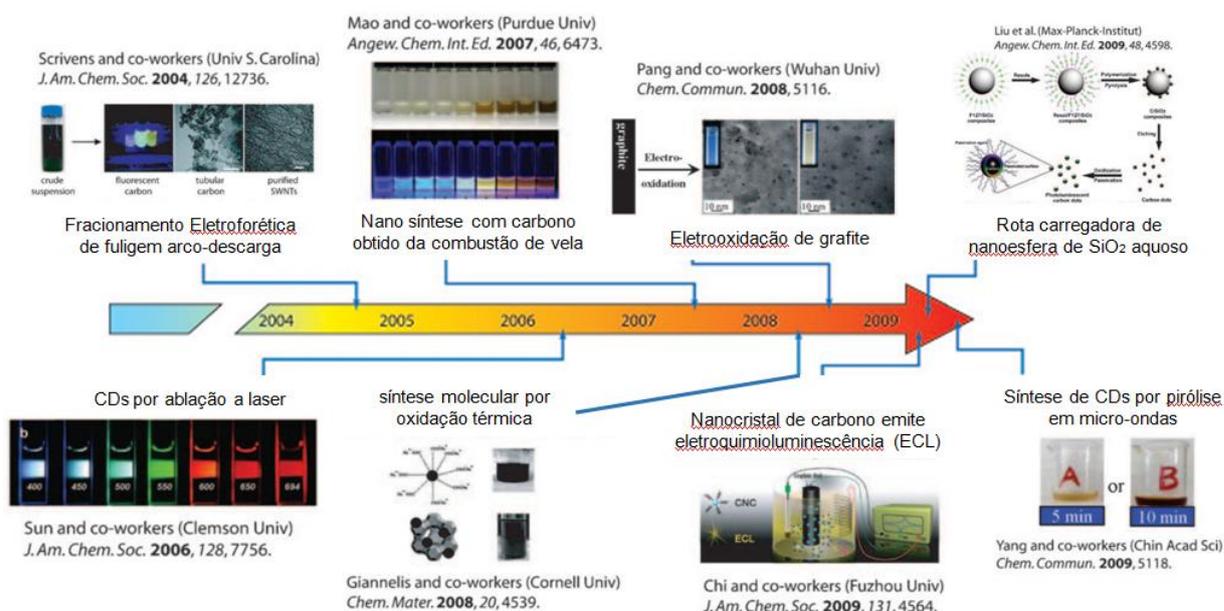
Os *carbon dots* foram descobertos por acaso em 2004 (XU et al., 2004), durante a purificação eletroforética de nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs, do inglês, *Single-Walled Carbon Nanotubes*) derivados de fuligem.

Mesmo não sendo o objetivo do trabalho, os pesquisadores passaram a analisar as propriedades básicas deste nanomaterial fluorescente até então desconhecido. Foram observadas três frações de CD de diferentes tamanhos, os quais quando expostos a excitação em 365 nm apresentavam coloração verde-azul, amarelo e laranja (entre 500-600 nm) e tamanho aproximado de 18,0 nm. Também foi observado que o aumento de tamanho destas partículas apresentavam deslocamento para a região do vermelho do espectro eletromagnético, conhecido como *red shift*. (BAKER; BAKER, 2010; ESTEVES DA SILVA; GONÇALVES, 2011).

Desde a sua descoberta, ainda não há uma definição de sua nomenclatura, porém são conhecidos como *carbon dots*, nanodots de carbono ou pontos de carbono (PCs). Esse composto, têm sido estudados e sintetizados por diferentes grupos de pesquisa, afim de obter uma melhor compreensão sobre o seu comportamento luminescente, alcançar melhores rotas sintéticas e desenvolver novas aplicações para estes nanomateriais (VAZ et al., 2015).

Os CD, têm se mostrado promissores, tanto em aplicações analíticas, como marcadores e nanodispositivos. Sua rápida evolução de aplicações pode ser observada no resumo apresentado na **Figura 19**. O surgimento dessas nanopartículas abriu "*um mundo de possibilidades*", tanto para a síntese, quanto para a aplicação, isto, despertou o interesse de cientistas, visto que, a mesma não apresentava toxicidade (CAO et al., 2007; ZUO et al., 2015). Os CD são constituídos basicamente de átomos de carbonos, que é um elemento muito abundante e até recentemente era impossível pensar que poderia ser solúvel em água. No entanto, esses antigos conceitos só se aplicam em macroestruturas de carbono, quando se aborda estruturas de carbono em escala nanométrica suas propriedades são significativamente diferentes, além de serem solúveis em água, apresentam alta fluorescência (ESTEVES DA SILVA; GONÇALVES, 2011).

Figura 19 - Evolução de diferentes tipos de síntese de CD. *Figura adaptada* (BAKER; BAKER, 2010)



Os CD não são os únicos nanomateriais à base de carbono que mostra forte atividade luminescente. Em 2000, Riggs e colaboradores mostraram que pequenas cadeias de nanotubos de carbono de múltiplas camadas (MWCNTs, do inglês, *Multi-Walled Carbon Nanotubes*) e nanotubos de carbono de simples camadas (SWCNTs do inglês, *Single-Walled Carbon Nanotubes*), apresentam forte luminescência (RIGGS et al., 2000). Luo e colaboradores também demonstraram que curtas cadeias de MWCNTs funcionalizados com grupos carboxílicos emitem forte luminescência e que a intensidade destas emissões dependem do comprimento do nanotubo (LUO et al., 2007). Outros trabalhos com S-MWCNTs mostram que a luminescência é dependente do tamanho da partícula semelhante ao observado nos CD (BAKER; BAKER, 2010).

Os CD, constituídos basicamente por diversos grupos de ácidos carboxílicos na sua superfície, que justifica sua alta solubilidade em meio aquoso, são facilmente funcionalizados com compostos orgânicos, polímeros, inorgânicos ou espécies biológicas. Os CD têm formas quase isotrópicas definidas, fácil funcionalização de sua superfície, grande variedades de rotas sintéticas simples, rápidas e de baixo custo. Consequentemente, vêm despertando o interesse de cientistas, como alternativas para o desenvolvimento de outras nanopartículas de carbono em diferentes aplicações. Além dessas vantagens a mais importante é que os CD não

são tóxicos, o que diminui as preocupações com a saúde e os riscos ambientais e biológicos conhecidos dos QDs. Com isso, os CD estão no centro das atenções para o desenvolvimento de alternativas de baixa toxicidade que tenham as características de desempenho desejáveis de QDs, porém que não prejudique o meio ambiente se inserindo assim no conceito de química verde (*Green Chemistry*) (BAKER; BAKER, 2010; CAO et al., 2007; SUN et al., 2006).

4.2.2 Metodologias de síntese dos CD

Desde sua descoberta inúmeras rotas sintéticas e precursores têm sido utilizadas para obtenção dos CD, as quais, podem ser classificadas em dois grupos: "*top-down*" e "*bottom-up*" (BAKER; BAKER, 2010).

Na abordagem "*top-down*" o aglomerado de maior estrutura de carbono é "quebrada" em nanopartículas de carbono menores, resultando nos CD. Na "*bottom-up*" ocorre o inverso, pois, é baseada em reações químicas a partir de pequenas moléculas precursoras para formar CD em pequena escala (ZUO et al., 2015). A seguir, serão descritas as duas metodologias, no entanto, observa-se que atualmente as sínteses envolvem a mistura das duas estratégias.

4.2.2.1 Métodos "*top-down*"

Envolve a quebra de estruturas de carbonos maiores, como por exemplo, nanodiamantes (YU et al., 2005), grafite (SUN et al., 2006), nanotubos de carbono (ZHOU, JIGANG; BOOKER, CHRISTINA; LI, RUYING; ZHOU, XIANGTAI; SHAM, TSUNKONG; SUN, XUELIANG; DING, 2007), fuligem de carbono (LIU; YE; MAO, 2007), carvão ativado (DONG et al., 2010) e óxido de grafite (WANG et al., 2011). A quebra pode ser realizada usando técnicas como descarga de arco, oxidação eletroquímica e ablação por laser (LIM; SHEN; GAO, 2015).

Em 2004, Xu e colaboradores descobriram o primeiro exemplo de CD fluorescentes quando foram purificar os nanotubos de carbono de SWCNTs originadas de fuligem, através do método de descarga de arco (XU et al., 2004). A fuligem foi oxidada com ácido nítrico, extraída com solução de hidróxido de sódio e a suspensão negra obtida foi, então, submetida a eletroforese em gel, obtendo três grupos de nanopartículas de carbono fluorescente, que emitiam na região do azul,

verde, amarelo e laranja do espectro eletromagnético obtendo um rendimento quântico na região do amarelo de 1,6 % (LIM; SHEN; GAO, 2015; ZUO et al., 2015).

Posteriormente, Sun e colaboradores foram pioneiros na síntese de CD por ablação por laser partindo de um material de carbono utilizando gás argônio como carregador, na presença de vapor de água (YU et al., 2005).

Zhou e colaboradores utilizaram o método eletroquímico para a preparação de CD fluorescentes, os autores usaram nanotubos de carbono multicamadas como eletrodo de trabalho. As multicamadas foram cultivadas em membranas de carbono por meio do método de deposição de vapor. Foram obtidos CD com 2,8 nm e rendimento quântico de cerca de 6,4 %. Como o rendimento quântico de fluorescência dos CD preparados por métodos eletroquímicos não é alto, e necessita de novos estudos para aperfeiçoamento da síntese (LIM; SHEN; GAO, 2015; ZUO et al., 2015).

4.2.2.2 Métodos "*bottom-up*"

A abordagem "*bottom-up*" é baseada na reação de polimerização de moléculas pequenas para a formação de CD. Esta estratégia inclui método hidrotermal, pirólise assistida por micro-ondas, ultrassom, método de desidratação de ácido e pirólise. Entre esses, os mais utilizados são o método hidrotermal e o método de pirólise assistida por micro-ondas (ZUO et al., 2015).

Em 2007, Liu e colaboradores sintetizaram pela primeira vez CD por métodos hidrotérmicos. A síntese consistia na mistura de fuligem de vela como fonte de carbono, com ácido nítrico por meio de refluxo de calor obtendo uma solução homogênea de cor negra. Em seguida, o material foi purificado por meio de centrifugação, diálise, eletroforese em gel, entre outros processos de obtenção de CD fluorescentes com diferentes tamanhos de partícula. Os autores observaram que a fluorescência da nanopartícula de carbono, está relacionada com o tamanho da mesma, o comprimento de onda da emissão vai mudando gradualmente para o vermelho com o aumento do tamanho, por isso os CD apresentam multi-emissões (LIU; YE; MAO, 2007).

Com o passar dos anos, diversos pesquisadores desenvolveram sínteses utilizando os métodos hidrotermal com precursores diferentes e obtendo rendimento quântico cada vez maiores (ZUO et al., 2015).

Zhu e colaboradores desenvolveram um método simples para sintetizar CD utilizando micro-ondas, para tal empregaram hidrocarbonetos como fonte de carbono e polietileno glicol (PEG 200) como solvente e agente de revestimento da nanopartícula. Neste método, o tamanho de partícula e os rendimentos quânticos fluorescentes de CD dependiam do tempo de reação (ZHU et al., 2009). Wang e colaboradores desenvolveram um método fácil, rápido e econômico. Primeiro transformaram a casca do ovo em cinzas, em seguida as cinzas foram misturadas com solução aquosa de NaOH, e depois submeteu a mistura à radiação de micro-ondas, durante cinco minutos, para obter CD (WANG et al., 2012). Chandra e colaboradores utilizaram sacarose como fonte de carbono e sintetizaram CD fluorescentes com ácido fosfórico por radiação de micro-ondas, obtendo CD em tempo de reação entre 3 e 10 minutos (CHANDRA et al., 2011). Yang e colaboradores criaram um método rápido de síntese modificada com grupos amina utilizando quitosana e aplicaram as nanopartículas obtidas em testes de imagem para o adenocarcinoma de pulmão humano de células A549 (YANG et al., 2012; ZUO et al., 2015).

4.2.2.3 Mecanismo de fluorescência dos carbon dots

Ao longo do tempo têm havido vários estudos para esclarecer o mecanismo da fluorescência das nanopartículas. A teoria do confinamento quântico é a mais utilizada e afirma que todas as partículas estão confinadas entre o "gap" de energia formado entre o orbital molecular mais alta energia ocupado (HOMO) e o orbital molecular de mais baixa energia desocupado (LUMO), onde o elétron localizado no orbital HOMO é excitado ao orbital LUMO, através da absorção de energia. Após a excitação, o elétron relaxa liberando energia na forma de emissão de luz, retornando assim ao estado fundamental. Este mecanismo de confinamento explica o comportamento dos *Quantum Dots* que são semicondutores, apesar de muitos pesquisadores considerar os CD como sendo da família dos QDs, este mecanismo não se aplica aos CD, pois o carbono não é um semicondutor (GONÇALVES, 2013).

Apesar dos pesquisadores buscarem um entendimento das propriedades ópticas dos CD, até então não se tem uma explicação única sobre seu mecanismo. A origem da fotoluminescência de CD é atribuída a várias razões: efeito quântico; defeitos e estados de superfície; grupos de superfície; passivação de superfície;

fluoróforos com diferentes graus de p-conjugação e recombinação de pares elétron-buraco localizada dentro de pequenos aglomerados de carbono sp^2 , incorporados dentro de uma matriz sp^3 (ESTEVES DA SILVA; GONÇALVES, 2011; SRIVASTAVA; GAJBHIYE, 2011).

Inicialmente, a teoria do mecanismo foi desenvolvida com o objetivo de tentar explicar a fluorescência dos *silicon dots* (Si-dots), que são nanopartículas à base de silício descobertas muito antes do CD. Como estas nanopartículas têm propriedades semelhantes e não são semicondutores, a teoria desenvolvida para Si-dots também pode ser empregada para os CD.

Apesar das propriedades ópticas dos CD depender do tamanho dos nanocristais e como a teoria do confinamento não se aplica totalmente aos CD, muitos pesquisadores acreditam que o mecanismo de fluorescência do Si-dots e CD é determinada, principalmente, por defeitos do estado de superfície (ESTEVES DA SILVA; GONÇALVES, 2011).

4.2.3 Aplicações

4.2.3.1 Bioimagens

Atualmente, existem vários compostos orgânicos que são usados como marcadores fluorescentes "*in vivo*", a maioria são cópias de outras moléculas envolvidas no processo que se deseja investigar. No entanto, a maioria destas moléculas apresenta certas desvantagens como: fotodegradação, cintilamento, curto tempo de vida de fluorescência, entre outros. Estas desvantagens são o que move os pesquisadores a buscarem novas alternativas (GONÇALVES, 2013).

Os *quantum dots*, têm sido usados "*in vitro*" e em algumas experiências "*in vivo*" para obtenção de imagem. No entanto, os QDs normalmente contêm cádmio e outros metais pesados, os quais são muito tóxicos, podem levar a sérios problemas de saúde e ambientais. Conforme já mencionado, isso limita sua aplicação "*in vivo*" (BYERS; HITCHMAN, 2011; HARDMAN, 2006). Como consequência disto, os CD surgem como uma alternativa e uma ferramenta útil para aplicações em bioimagem (ESTEVES DA SILVA; GONÇALVES, 2011; LIN et al., 2014). O aumento do número de trabalhos utilizando CD em bioimagem ocorreu principalmente devido a três fatores: (i) natureza não tóxica, (ii) facilidade de funcionalização, (iii) propriedades de fluorescência (GONÇALVES, 2013).

O primeiro trabalho a considerar os CD como marcador em bioimagem foi o desenvolvido por Sun e colaboradores que marcaram células de *Escherichia coli* com os CD sintetizados por ablação a laser de carbono, e observou a absorção celular de CD por células Caco-2 por microscopia confocal (SUN et al., 2006). Com síntese similar, Cao e colaboradores obtiveram CD com superfície passivada com propionil etilenoimina-co-etilenoimina (PPEI-EI) e demonstraram o potencial para uso em imagens, através da incubação de células MCF-7 com CD em meio tamponado a 37 °C. Nessas condições as células apresentaram coloração verde quando excitada a 800nm (CAO et al., 2007).

As imagens de fluorescência dos CD se mostraram mais brilhantes do que os QDs disponíveis comercialmente. A toxicidade *in vitro* dos CD foi avaliada através de seus efeitos sobre câncer de mama humano MCF-7 e de adenocarcinoma colo retal HT-29 de células humanas. A toxicidade *in vivo* de CD foi avaliada utilizando camundongos e não foi observado nenhum efeito tóxico. Os testes realizados com CD demonstraram serem biocompatíveis e exibiram um desempenho de imagem semelhante ao das formulações comerciais com QDs (ESTEVES DA SILVA; GONÇALVES, 2011; YANG et al., 2009).

Ray e colaboradores obtiveram CD através da fuligem da queima de uma vela, oxidando quimicamente e depois separaram os CD obtendo nanopartículas entre 2-6 nm. Neste trabalho, os autores concluíram que a passivação poderia não ser necessária para atingir alta intensidade de luminescência. O CD obtidos foram também aplicados em bioimagem convencional em células de Carcinoma Ascite de Ehrlich (EACs) (RAY et al., 2009).

Outros trabalhos também comprovam o potencial dos CD na aplicação de bioimagem, como Zhang e colaboradores que usaram lactose como fonte de carbono e 3-hidroximetil aminometano como agente de passivação para obter alta intensidade de fluorescência e baixa toxicidade. Os CD foram obtidos através do método hidrotermal e foram aplicados com sucesso em imagens de células HeLa (CAO et al., 2007; YANG et al., 2009; ZHANG et al., 2013).

Uma recente estratégia é a dopagem de *carbon dots* com nitrogênio e enxofre para ter um aumento de rendimento quântico e sua posterior aplicação em bioimagem, devido à baixa toxicidade do material (CHEN et al., 2016; KUO et al., 2015; WANG et al., 2014).

4.2.3.2 Biosensor

Os *Carbon dots* têm sido bastante utilizados como biossensor devido as diversas propriedades como a sua elevada solubilidade em água, a flexibilidade na modificação da superfície, não toxicidade, excelente biocompatibilidade, boa permeabilidade celular, e elevada foto estabilidade. Os biossensores baseados em CD podem ser utilizados no monitoramento visual da glicose, cobre, fosfato, ferro potássio, pH e ácido nucleico (LIM; SHEN; GAO, 2015).

4.2.3.3 Sistema de distribuição biomédica

O sistema de distribuição biomédica é uma perspectiva que combina terapia e bioimagem para diagnósticos e acompanhamento médico visual dos efeitos das drogas. Recentes avanços em nanociência e nanotecnologia têm desenvolvido nanoestruturas multifuncionais que combinam especificidade e funções terapêuticas e de diagnóstico em um único complexo nanoestruturado. Um transportador de drogas tradicional não tem a observabilidade e rastreabilidade apresentada pelos nanomateriais fluorescentes quando usados como transportador de drogas. Devido à baixa toxicidade, esses nanocompostos são excelentes na biocompatibilidade e também apresentam grupos funcionais modificáveis na sua superfície, com isso os CD tornaram-se objetos de investigação em liberação (*delivery*) da droga (WANG; HU, 2014; ZUO et al., 2015).

Lai e colaboradores utilizaram glicerol como precursor de carbono para a síntese de CD por pirólise. O CD obtido foi modificado com PEG para aumentar sua luminescência, estabilidade e biocompatibilidade, e depois foi ligado em sílica mesoporosa ($mSiO_2$) formando o CD- $mSiO_2$ -PEG. O material sintetizado foi utilizado para transportar uma droga antitumoral indicada no tratamento do câncer de mama, a doxorrubicina (DOX). A forma de atuação do DOX transportado pelo CD- $mSiO_2$ -PEG foi estudada em células HeLa. Os resultados mostraram que os CD e DOX entraram no citoplasma e núcleo com emissão de fluorescência nas regiões azul e vermelha. Com isso foi possível transportar o fármaco à célula, rastrear e observar o monitoramento da liberação da droga no interior das células (LAI et al., 2012; ZUO et al., 2015).

Kim e colaboradores utilizaram CD com partículas de ouro conjugado com polietilenimina (PEI) e pDNA para levar o DNA ao interior da célula. Os resultados experimentais sugerem que o conjunto introduzido nas células com os CD localizados no citoplasma da célula e as pDNA entraram no núcleo das células. O antibiótico ciprofloxacina quando associado a CD, apresenta fluorescência verde brilhante. Com isso este trabalho pode abrir um caminho para bioimagem mas fornecem também uma nova maneira eficiente para liberação controlada de drogas com alta atividade antimicrobiana sob determinadas condições fisiológicas. (WANG; HU, 2014).

4.2.3.4 Fotocatálise

Com a crescente exigência da sociedade por energia com baixa emissão de carbono, as atenções se voltaram em retirar o máximo proveito da energia, seja ela solar, que é inesgotável, bem como de outras fontes de energias limpas. Com isso, materiais avançados usados para reação de produção de hidrogênio por meio de métodos eletrocatalítico e fotoeletroquímico são fundamentais para a área de energia renovável. No entanto, os materiais fotocatalíticos tradicionais, tais como TiO_2 e ZnO , geralmente com faixa de absorção de luz ultravioleta têm sido grandemente restringidos em aplicações práticas (LIM; SHEN; GAO, 2015; ZUO et al., 2015).

Cao e colaboradores sintetizaram CD com polietileno glicol (PEG1500) e preparam] um aglomerado de CD com ouro e platina via fase líquida. Neste sistema, os CD agem como doadores de elétrons restaurando os sais (HAuCl_4 ou H_2PtCl_6) envolvidos no sistema de redução da água para produzir hidrogênio. Zhang e colaboradores utilizaram CD para preparar um composto catalítico o $\text{CD/Ag/Ag}_3\text{SO}_4$ (ZHANG et al., 2013). Este composto foi utilizado como catalisador na decomposição do azul de metileno em radiação visível (ZUO et al., 2015).

4.2.3.5 Quimiossensor

Uma aplicação interessante dos CD é na detecção de substâncias químicas. A determinação de metais pesados em soluções aquosas e em células, como por

exemplo, determinar Hg^{2+} que é de extrema importância ambiental, pois se trata de um metal que tem efeito tóxico sobre o meio ambiente e à saúde humana.

Gonçalves e colaboradores demonstraram que os CD em solução ou imobilizados em sol-gel são sensíveis à presença de Hg^{2+} . Os autores sintetizaram CD através de ablação a laser e passivação com $\text{NH}_2\text{-PEG}_{200}$ e N-acetil-L-Cisteína, os quais foram utilizados como detector de íon mercúrio (GONÇALVES; DUARTE; ESTEVES DA SILVA, 2010; LIM; SHEN; GAO, 2015).

Yan e colaboradores utilizaram o sistema de Hg^{2+} -CQD para a detecção seletiva de Hg^{2+} em solução aquosa, bem como em células vivas. Os autores relataram a síntese de dois tipos de CQDs (*carbon quantum dots*) usando ácido cítrico com 1,2-etilenodiamina e N-(b-aminoetil)-g-aminopropil como agente passivador. Essa dopagem possibilitou elevados rendimentos quânticos. Neste estudo ficou evidente a seletividade das emissões fluorescentes (*quenching*) dos CD pelos íons Hg^{2+} (LIM; SHEN; GAO, 2015; YAN et al., 2014).

Wee e colaboradores sintetizaram CD através da hidrólise ácida utilizando a albumina como fonte de carbono e passivador, o resultado foi um CD com seletividade a íons Pb^{2+} , o qual foi usado como um quimiossensor de Pb^{2+} (WEE; NG; NG, 2013).

Alguns trabalhos utilizam CD dopados com nitrogênio (N), enxofre (S) e boro (B) para aumentar o rendimento quântico e com isso conseguir limites de detecção e quantificação menores. Chen e colaboradores conseguiram dopar CD com N e S para determinação de Cr (VI) (CHEN et al., 2017). Tian e colaboradores também determinou Cr (VI) através de CD dopado com B e N, a síntese foi realizada com ácido 3-aminofenilborônico e glicose, este, como fonte de carbono (TIAN et al., 2017).

A simplicidade da síntese de CD também pode ser demonstrada através dos diferentes precursores utilizados. Liu e colaboradores sintetizaram um CD, a partir de chocolate comercial e o mesmo foi aplicado na determinação de íons chumbo (II) (LIU et al., 2016).

Estes e outros artigos mostram a viabilidade da síntese de CD, sua simplicidade na obtenção e de baixo custo visto que os precursores utilizados são reagentes comuns. O presente trabalho utilizou-se destas propriedades para sintetizar um CD através de ácido cítrico como precursor e tiosemicarbazida para

dopagem de N e S, e utilizando o mesmo para a determinação de Cu^{2+} e Hg^{2+} em amostras de água e Cu^{2+} em amostras de cachaça.

4.3 MATERIAIS UTILIZADOS

4.3.1 Equipamentos e Acessórios

Para o aquecimento da síntese do *carbon dots* foi utilizado uma estufa Ecocell fabricado pela MMM *Medcenter Einrichtungen GmbH*, equipado com um reator de Teflon[®] com uma "camisa" externa de Inox[®] para a reação. O espectrofotômetro UV/VIS 8453 fabricado pela Agilent Technologies foi utilizado para obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta e visível. Para a obtenção do espectro de infravermelho foi utilizado o FTIR modelo 640-IR, fabricado pela Varian[®]. Na obtenção da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizado o equipamento LVEM5 da DeLong Instruments. Para a digestão de amostras foi utilizado um micro-ondas modelo MarsExpress fabricado pela CEM corporation (Matthews, NC, USA). Para a detecção foi utilizado um espectrofluorímetro modelo RF-5301PC (Shimadzu, São Paulo, Brasil), para os testes de comparação foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de chama, modelo AA240FS, fabricado pela Varian[®] (Inc., Palo Alto, Califórnia, USA). Acessórios complementares, tais como funis, balões volumétricos, béqueres e micropipetas, foram utilizados para o preparo e manuseio de soluções.

4.3.2 Soluções

Todas soluções foram preparadas com água deionizada com resistividade de 18,2 $\Omega \cdot m$ a 25 °C, obtida por meio do sistema Milli-Q, (Millipore (Molsheim, France) e reagentes de grau analítico.

As soluções de referência utilizadas para os íons metálicos: Al, As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Si, Ti e Zn, foram da SpecSol[®] com concentração de 1000 mg L⁻¹. A solução de referência utilizada para o íon Hg 1000 mg L⁻¹, foram da *Sigma-Aldrich tracecert*[®].

Tabela 10 - Preparo das soluções tampão.

pH	Volume das soluções* (mL)	
	Cloreto de potássio (KCl) 0,2 mol L ⁻¹	Ácido clorídrico (HCl) 0,2 mol L ⁻¹
1	25	21,2
2	50,0	10,6
	Bifalato de potássio (C ₈ H ₅ KO ₄) 0,2 mol L ⁻¹	HCl 0,2 mol L ⁻¹
3	50,0	44,6
	Ácido acético 0,2 mol L ⁻¹	Acetato de sódio 0,2 mol L ⁻¹
4	41,0	9,0
5	14,8	35,2
	Fosfato monobásico de sódio (NaH ₂ PO ₄) 0,2 mol L ⁻¹	Fosfato dibásico de sódio (Na ₂ HPO ₄) 0,2 mol L ⁻¹
6	87,7	12,3
7	39,0	61,0
8	5,3	94,7
	Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃) 0,2 mol L ⁻¹	Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 0,2 mol L ⁻¹
9	4,0	46,0
10	27,5	22,5
11	45,0	5,0
	KCl 0,2 mol L ⁻¹	Hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 mol L ⁻¹
12	50,0	12,0
13	50,0	132,0

* proporções para um volume final de 200 mL de solução tampão.

4.3.3 Reagentes e Solventes

Para a realização da síntese e preparo das soluções não foi realizada nenhuma purificação prévia dos reagentes ou solventes. Os reagentes, solventes e suas especificações estão resumidos na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Reagentes e solventes

Reagentes e solventes	Procedência	Massa molar g mol ⁻¹	Teor %
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Fmaia	46,07	99,3
Ácido cítrico	Fmaia	192,12	99,5
Tiosemicarbazida	Sigma-aldrich	91,14	98
Ácido nítrico (HNO ₃)	Vetec	63,01	65
Hidróxido de sódio (NaOH)	Dinâmica	40	97
Ácido clorídrico (HCl)	Dinâmica	36,5	37
Cloreto de potássio (KCl)	Dinâmica	74,56	99,5
Ácido acético (CH ₃ COOH)	CRQ	60,05	99,5
Acetato de sódio CH ₃ COONa	Riedel-de Haen	136,08	99,5
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	Vetec	105,99	99,5
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Vetec	84	99,5
Fosfato monobásico de sódio (NaH ₂ PO ₄)	Vetec	119,98	99
Fosfato dibásico de sódio (Na ₂ HPO ₄)	Quimex	141,96	99

4.3.4 Amostras

As amostras de água foram obtidas de rios, açude e água potável da região metropolitana do Recife e estão discriminadas como amostras de 1, 2, 3, 4 e 5 na **Tabela 13**. As amostras de cachaça foram obtidas em supermercados locais e estão discriminadas como 6, 7 e 8 na **Tabela 13**.

Todas as amostras foram digeridas com ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio 30%, em um forno de micro-ondas Mars Express fabricado pela CEM corporation de acordo com os procedimentos descritos na literatura (MIRANDA; DIONÍSIO; PEREIRA-FILHO, 2010).

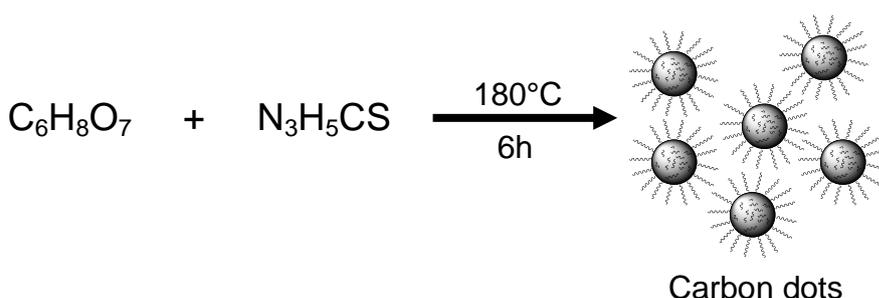
4.4 METODOLOGIA

4.4.1 Síntese do *carbon dots*

A síntese do CD foi realizada a partir da adaptação de métodos citados na literatura, onde os mesmos utilizam ácido cítrico como precursor de carbono para a formação do CD juntamente com substâncias que contenha enxofre e nitrogênio, também conhecido como método de dopagem, utilizado para aumentar o rendimento quântico (CHEN et al., 2017; TIAN et al., 2017; LIU et al., 2016; DONG et al., 2013).

Em um reator de Teflon[®] foram misturados 1,9 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) e 1,1 g de Tiosemicarbazida (aminotiouréia, N_3H_5CS), esta mistura foi colocada em estufa por 6 horas a $180^\circ C$. Posteriormente em temperatura ambiente o produto obtido foi neutralizado com $NaOH$ $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e transferido para um balão volumétrico de 100 mL, o qual foi aferido com água deionizada. O esquema da reação de síntese do CD está demonstrado na **Figura 20**.

Figura 20 - Esquema da síntese de CD usando ácido cítrico e tiosemicarbazida



4.4.2 Procedimento experimental

Em uma cubeta de quartzo foi colocado $990 \mu L$ de solução tampão, em seguida foi adicionado $20 \mu L$ de CD e $990 \mu L$ da solução de referência ou amostra, totalizando um volume final de $2,0 \text{ mL}$. Posteriormente a cubeta contendo a mistura reacional foi levada ao espectrofluorímetro onde foi mensurado a intensidade do sinal analítico com incidência de radiação de comprimento de onda de excitação em 365 nm e de emissão em 440 nm .

4.4.3 Caracterização do CD

4.4.3.1 Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram adquiridos através de medidas de CD em espectrômetro de fluorescência utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os espectros foram obtidos utilizando os valores máximos de intensidade encontrados de excitação e emissão, utilizando abertura de fenda de 5 nm.

4.4.3.2 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV/VIS)

Os espectros de UV-Vis foram obtidos utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e registrados os espectros de absorção entre 190 - 800nm usando-se um espectrofotômetro Agilent UV/VIS 8453.

4.4.3.3 Espectrometria na região do infravermelho (IR)

Os espectros de absorção no infravermelho foram realizados na região do IR médio, entre, 4000 e 400 cm^{-1} . Os materiais foram analisados na forma de pastilhas de KBr a 20°C em um espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), modelo 640-IR (Varian[®] Inc., Palo Alto, Califórnia, USA). Os espectros foram obtidos com resolução 8 cm^{-1} e 32 varreduras espectrais das amostras.

4.4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para realização da microscopia eletrônica de transmissão (MET), também conhecida como TEM, do inglês, *Transmission Electron Microscope*, foi utilizado um microscópio modelo LVEM5 da DeLong Instruments, este instrumento opera com baixa voltagem de aceleração de 5 kV. As telas utilizadas foram de 300 mesh constituídas de cobre e recobertas com filme de carbono de cerca de 5 nm.

4.4.3.5 Rendimento quântico

As medições dos rendimentos quânticos da fotoluminescência absoluta foram realizadas em um espectrômetro Quantaurus QY C11347-11 (Hamamatsu) equipado com uma esfera integradora para medir todo o fluxo luminoso.

4.4.4 Estudo de pH e seletividade

O estudo de pH foi realizado através da variação do pH entre 2,0 e 12,0 com incremento de 1,0. Em cada pH foi adicionado separadamente soluções de referência com concentração de $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos seguintes metais: Al, As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Si, Ti e Zn. Afim de conhecer quais metais e em qual pH o CD apresentavam maior supressão de sinal analítico.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Síntese do *Carbon dots*

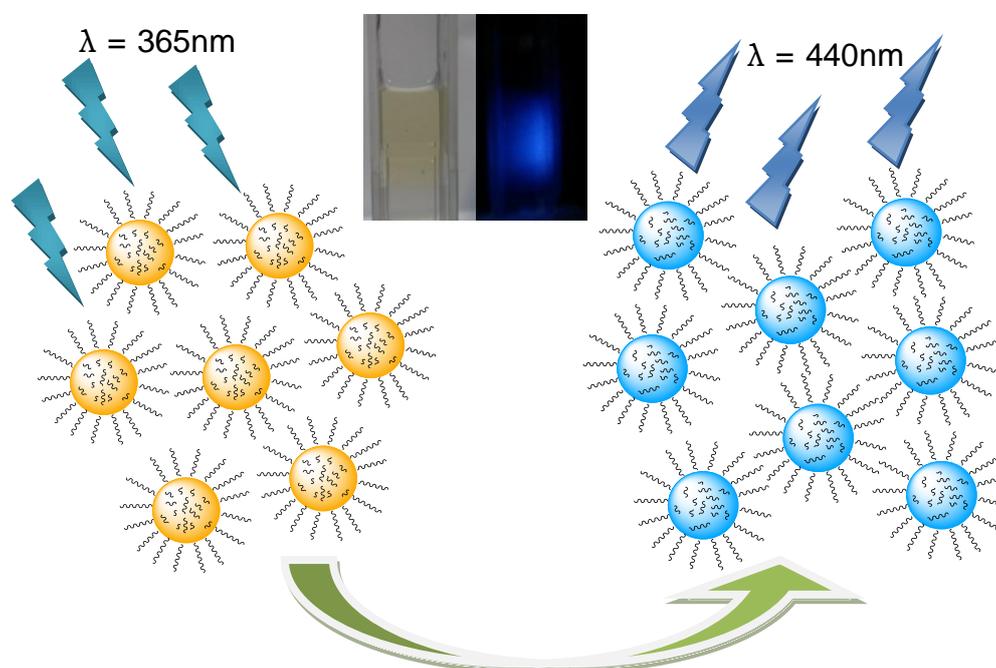
O produto obtido após a primeira etapa, apresentou uma cor castanho escuro e sem luminescência, isto pode ser devido a sua alta concentração, o que leva a auto absorção da própria luminescência (SKOOG; HOLLER; WEST, 2010). Após ser neutralizado e diluído, o CD apresentou coloração castanho claro e intensa luminescência.

4.5.2 Caracterização de CD

4.5.2.1 Espectroscopia de fluorescência

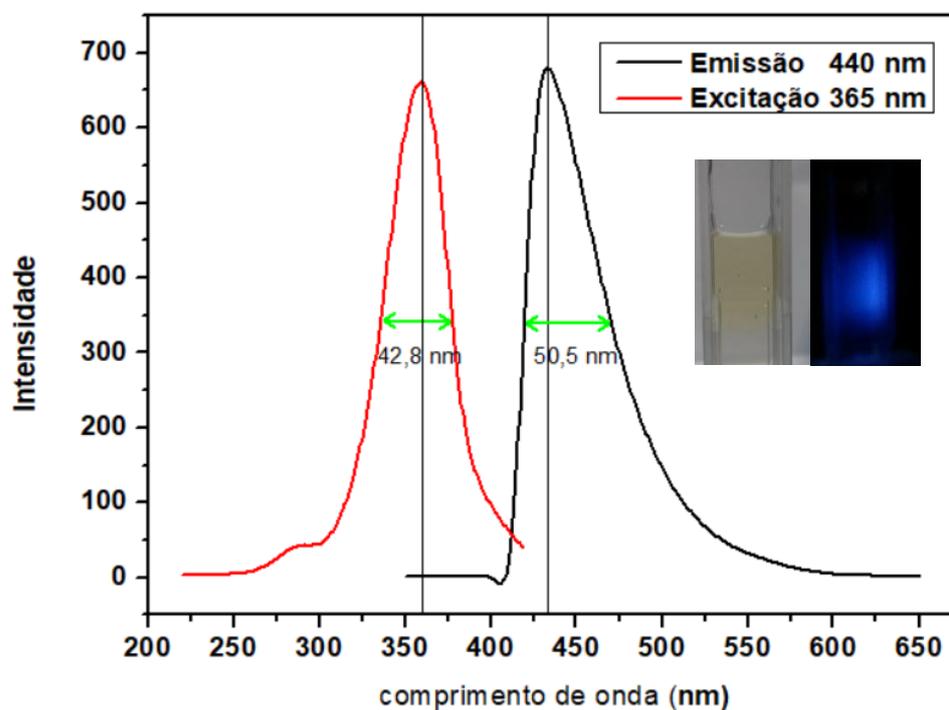
O CD obtido apresentou intensa fluorescência quando excitado no comprimento de onda de 365 nm e apresentou emissão de coloração azulada em 440 nm, como pode ser observado na ilustração apresentada na **Figura 21**.

Figura 21 - Ilustração da excitação e emissão do CD

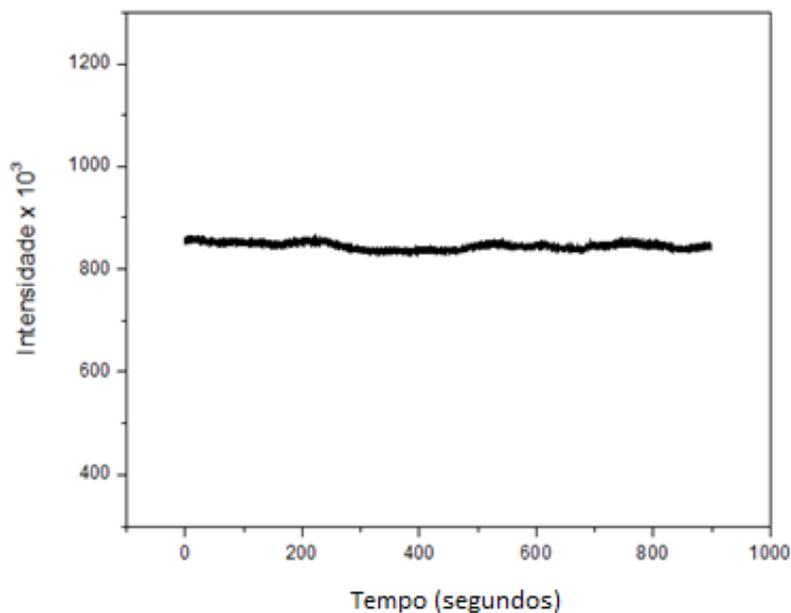


Os espectros de excitação e emissão obtidos para os CD mostram as bandas de excitação (365 nm) e emissão (440 nm) bastante intensas e definidas (**Figura 22**).

Figura 22 - Espectro de excitação e emissão do CD



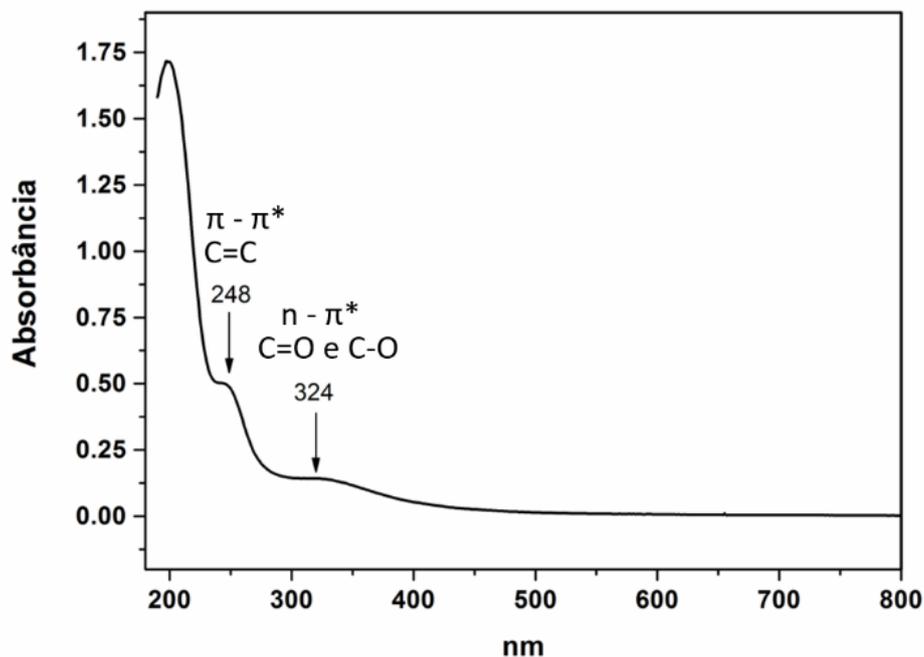
Observa-se, também boa estabilidade do sinal analítico, cuja intensidade permaneceu praticamente a mesma, durante cerca de 900 s, o que contribui para uma melhor precisão do método proposto, **Figura 23**.

Figura 23 - Gráfico de estabilidade do CD

4.5.2.2 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV/VIS)

Na **Figura 24**, é mostrado o espectro de absorção do CD, observa-se a presença de uma banda de absorção intensa em 248nm características de transição $\pi - \pi^*$, típica de ligação C=C. Outra banda que podemos observar é em 324nm, característico de transição $n - \pi^*$, referente a ligações C=O e C-O. O surgimento destas bandas pode ser considerado um forte indicio da formação do *carbon dots* (VAZ et al., 2015; ZHU et al., 2015).

Figura 24 - Espectro de absorção do CD.

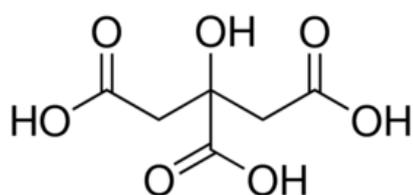


4.5.2.3 Espectrometria na região do infravermelho

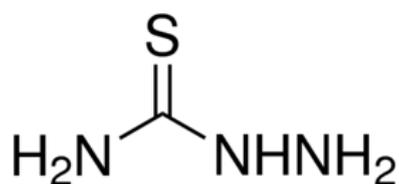
A análise espectral na região do infravermelho é uma técnica muito útil na caracterização de compostos químicos e evidencia a presença de grupos funcionais em números de onda específicos através das mudanças de vibrações dos átomos envolvidos.

Ao analisar o espectro de infravermelho do CD, nota-se algumas bandas bem específicas referente a alguns grupos funcionais. Na **Figura 25** é mostrado a estrutura do ácido cítrico e da tiosemicarbazida.

Figura 25 - Formulas estruturais do ácido cítrico e tiosemicarbazida



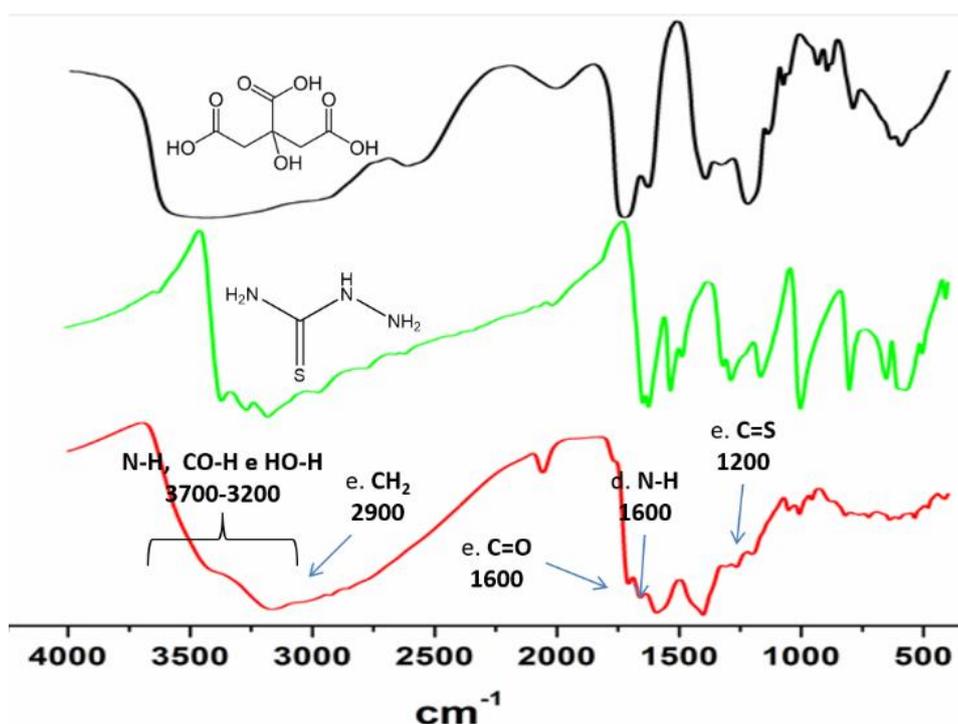
Ácido cítrico



Tiosemicarbazida

O espectro de infravermelho do composto obtido é mostrado na **Figura 26**, onde nota-se a presença de uma banda muito larga característica da vibração de estiramentos O-H de ácidos carboxílicos entre $3500 - 2400 \text{ cm}^{-1}$, grupos esses presentes na superfície do *carbon dots*. Pode-se atribuir as bandas em 3425 e 3171 cm^{-1} a estiramentos de N-H, estiramentos C-H em 2924 e 2850 cm^{-1} , os números de onda em 1708 e 1662 cm^{-1} foram atribuídos a estiramento C=O. Pode ser observado também dobramento N-H em 1600 cm^{-1} , dobramento C-O-H, estiramento C-N em 1311 , 1265 , 1052 , 1006 e 960 cm^{-1} e em 1200 cm^{-1} estiramento C=S. Todas essas bandas de vibração podem ser atribuídas às ligações presentes anteriormente no ácido cítrico e na tiosemicarbazida (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

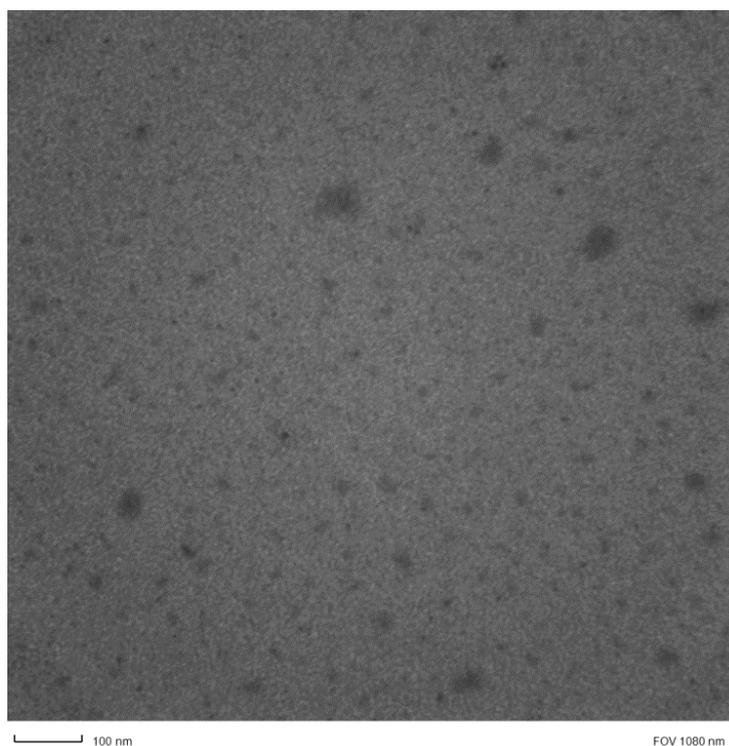
Figura 26 - Espectro de infravermelho (Transmitância x número de onda (cm^{-1}))



4.5.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, **Figura 27**, observa-se a presença de pequenas partículas bem dispersas com morfologia esférica, evidenciando a presença da formação de nanopartículas. Observa-se também, a presença de alguns aglomerados e grandes partículas, os quais podem ser considerados como resíduos da reação. A imagem deixa claro também que a distribuição do tamanho das partículas não é homogênea.

Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão do CD.



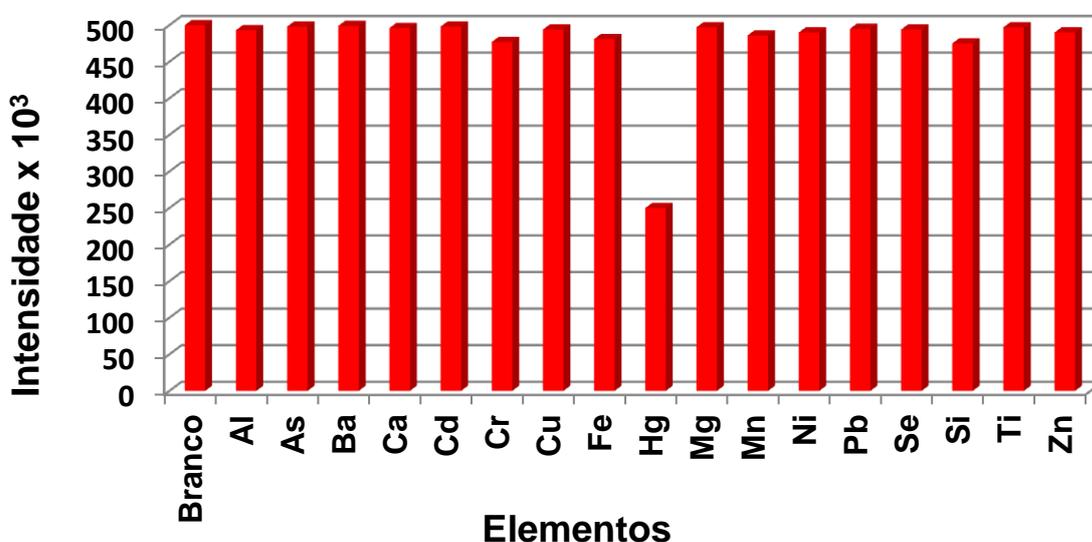
4.5.2.5 Rendimento quântico

O rendimento quântico absoluto (QY, do inglês, *Quantum yield*) foi realizado com comprimento de onda de excitação em 365 nm e emissão em 440 nm. O QY foi realizado em triplicata, apresentando um valor médio de $3,93 \pm 0,06\%$.

4.5.2.6 Estudo de pH e seletividade

A fim de verificar a interação do CD com íons metálicos em diferentes pHs, diferentes analitos foram testados. Nestes ensaios, foram adicionadas concentrações de 2 a 15 mg L⁻¹ dos íons metálicos Al, As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb, Se, Si, Ti e Zn. O CD somente apresentou sensibilidade a Hg²⁺ em pH = 6,0, como pode ser visualizado na **Figura 28**. De acordo com os resultados, em pH 6,0, a alta afinidade do CD por Hg²⁺, pode ser demonstrada pelo alto efeito de supressão obtido, muito mais pronunciado que aquele observado com outros metais testados.

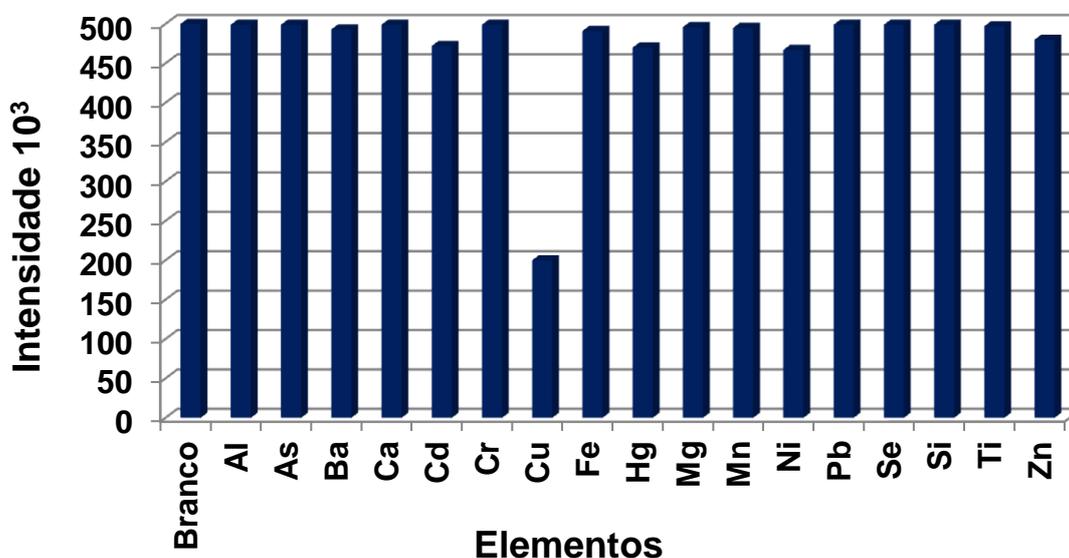
Figura 28 - Efeito de alguns íons metálicos em pH 6,0, na intensidade de luminescência do CD.



Por outro lado, em pH = 10,0, observa-se uma pronunciada supressão de sinal para o Cu²⁺, enquanto que para os demais metais, o sinal praticamente não se altera, como pode ser observado na **Figura 29**. Este comportamento pode ser explicado devido ao fato que em pH = 6,0 a competição entre os íons H⁺ e Hg²⁺ é diminuída devido a concentração de H⁺ ser menor em pH 6,0 que em pHs mais baixo, com isso, grupos contendo nitrogênio e enxofre antes protonados pelos íons H⁺, se encontram livres para interagir com outros íons, neste caso, o íon que apresentou interação nestas condições foi o Hg²⁺. Devido ao fato de que o Hg²⁺ ser um ácido mole supõe-se que o mesmo interaja preferencialmente com grupos contendo enxofre. No caso dos íons Cu²⁺ por ser um ácido duro, esperasse que o

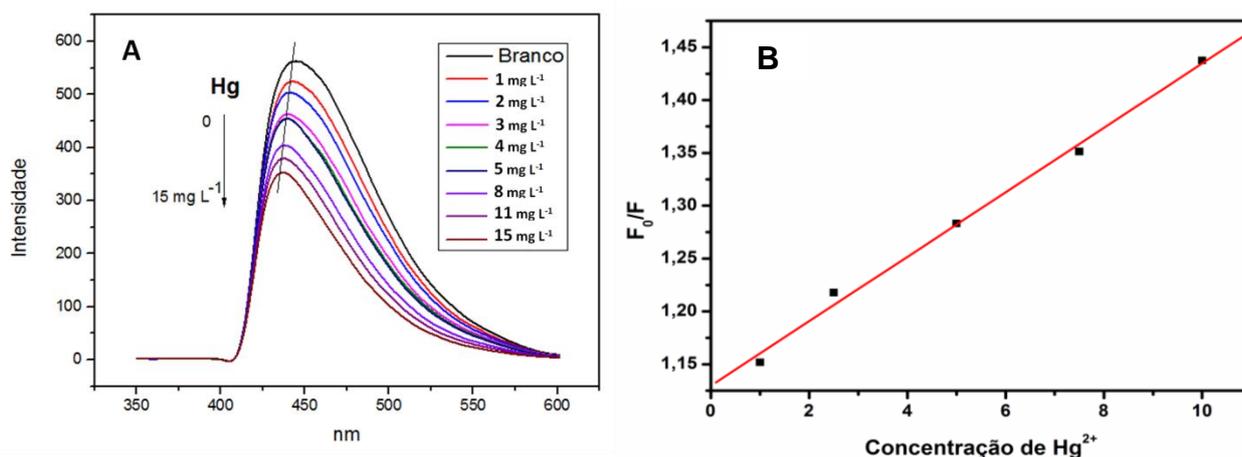
mesmo interagisse preferencialmente com grupos contendo oxigênio e nitrogênio. Isso pode explicar tal comportamento.

Figura 29 - Efeito de alguns íons metálicos em pH 10,0, na intensidade de luminescência do CD.



Com isso, variou-se a concentração do íon Hg^{2+} em pH 6,0, de 1 a 15 mg L^{-1} , afim de verificar se a intensidade do sinal se comportava de maneira proporcional à concentração. Conforme mostrado na **Figura 30A** a luminescência do CD diminui com o aumento da concentração de Hg^{2+} (supressão), ou seja, a intensidade do CD é inversamente proporcional a concentração.

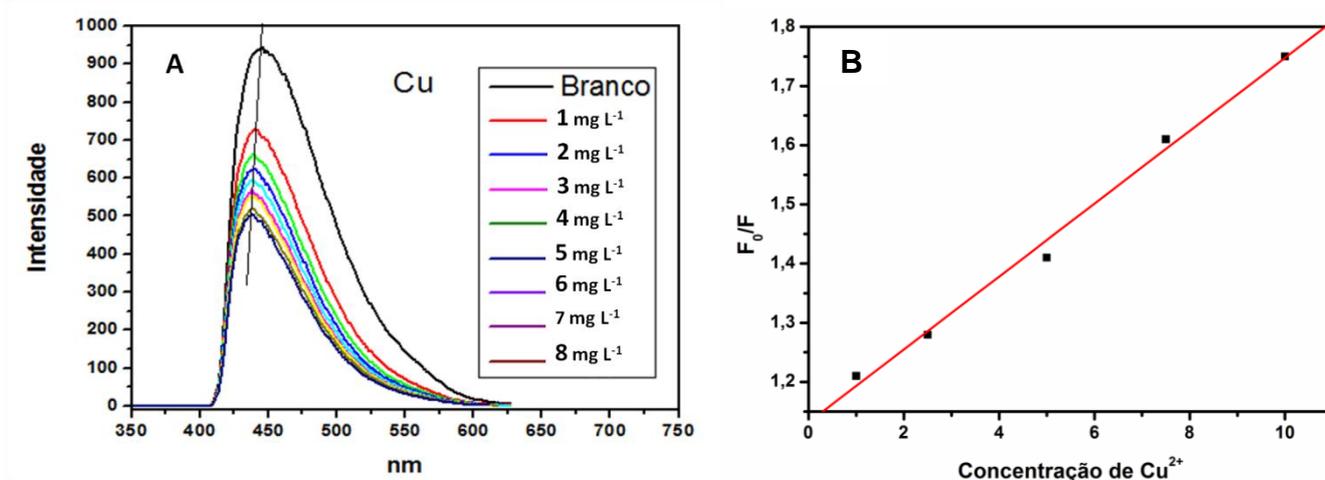
Figura 30 - A - Espectro de fluorescência do CD na presença de Hg^{2+} na faixa de 1 a 15 mg L^{-1} , em pH 6,0; B - curva analítica na faixa de 1 a 10 mg L^{-1} Hg^{2+} .



A curva apresentou a equação $F_0/F = (1,130 \pm 0,008) + (0,030 \pm 0,001) * C$, onde F_0 e F são as intensidades de luminescência na ausência e na presença de Hg^{2+} , respectivamente e C é a concentração, o coeficiente de correlação linear $r = 0,9973$.

O mesmo ocorreu para a concentração do íon Cu^{2+} em $pH = 10,0$. O CD apresentou supressão de sinal com o aumento da concentração do Cu^{2+} , como pode ser percebido na **Figura 31**.

Figura 31 - A: Espectro de fluorescência de CD em presença de várias concentrações de Cu^{2+} na faixa de 1 a 8 $mg L^{-1}$, em $pH 10,0$. **B:** curva analítica na faixa de 1 a 10 $mg L^{-1}$ Cu^{2+} .



A curva apresentou equação $F_0/F = (1,132 \pm 0,019) + (0,062 \pm 0,003) * C$ e coeficiente correlação linear $r = 0,9964$.

4.6 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

4.6.1 Aspectos gerais

O processo de validação do método proposto foi realizado com os parâmetros definidos nas etapas anteriores, os quais estão resumidos na **Tabela 12**. Os cálculos de precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação foram realizados conforme especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), da Inmetro - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2010) e da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 2002).

Tabela 12 - Parâmetros do método proposto por determinação

Parâmetros	Valor fixado	Valor fixado
	Hg ²⁺	Cu ²⁺
Volume da amostra (µL)	990	990
Volume CD (µL)	20	20
Volume tampão (µL)	990	990
pH	6,0	10,0
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	1 - 15	1 - 10
Efluente gerado (mL)	2,0	2,0

4.6.2 Validação

Para a validação do método foram realizados ensaios para calcular a precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação.

A precisão do método proposto foi calculada através de 10 determinações consecutivas de uma solução contendo 5,0 mg L⁻¹ de Hg²⁺ e uma solução contendo 5,0 mg L⁻¹ de Cu²⁺. O RSD% encontrado para a determinação de Hg²⁺ foi de 2,9% e para a determinação de Cu²⁺ foi de 3,2%, demonstrando assim concordância entre os resultados.

Para avaliar a exatidão foi realizado o teste de adição e recuperação de padrão e a comparação de métodos, que consiste na comparação dos resultados de análise das amostras, realizados com o método proposto e com o método de referência. Posteriormente, os resultados são analisados a fim de verificar suas proximidades (RIBANI et al., 2004).

O método proposto apresentou bons resultados nos testes de adição e recuperação e concordância quando comparado com o método de absorção atômica com chama (FAAS, do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometer*). Estes resultados estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Testes de recuperação e comparação dos resultados obtidos com o método proposto e o método oficial para as diferentes amostras analisadas.

Amostra	Concentração Adicionada	Hg ²⁺			Cu ²⁺		
		FAAS	Método Proposto		FAAS	Método Proposto	
	mg L ⁻¹	Encontrado mg L ⁻¹	Encontrado mg L ⁻¹	Recuperado %	Encontrado mg L ⁻¹	Encontrado mg L ⁻¹	Recuperado %
1*	0	<LD	<LD	-	<LD	<LD	-
	2	2,13 ± 0,22	2,21 ± 0,25	110	2,16 ± 0,16	2,18 ± 0,14	109,0
	4	4,22 ± 0,24	4,30 ± 0,33	107,5	4,19 ± 0,11	4,06 ± 0,21	101,5
2*	0	<LD	<LD	-	<LD	<LD	-
	2	2,07 ± 0,11	1,96 ± 0,15	98	2,10 ± 0,18	2,08 ± 0,14	104,0
	4	4,04 ± 0,19	4,19 ± 0,11	105	4,01 ± 0,24	4,23 ± 0,19	105,2
3*	0	<LD	<LD	-	<LD	<LD	-
	2	2,06 ± 0,17	2,08 ± 0,21	104	1,97 ± 0,09	1,91 ± 0,14	95,5
	4	4,35 ± 0,18	4,40 ± 0,32	110	4,04 ± 0,11	3,97 ± 0,24	99,2
4*	0	<LD	<LD	-	<LD	<LD	-
	2	2,01 ± 0,08	1,93 ± 0,16	96,5	2,08 ± 0,18	2,13 ± 0,16	106,5
	4	4,03 ± 0,12	3,95 ± 0,18	98,7	4,02 ± 0,15	4,02 ± 0,19	100,5
5*	0	<LD	<LD	-	<LD	<LD	-
	2	2,28 ± 0,27	2,30 ± 0,35	111,0	2,23 ± 0,32	2,30 ± 0,32	105
	4	4,21 ± 0,31	4,50 ± 0,33	110,5	4,18 ± 0,24	4,40 ± 0,30	102,5
6**	0	-	-	-	<LD	<LD	-
	2	-	-	-	2,02 ± 0,10	2,18 ± 0,29	108
	4	-	-	-	4,01 ± 0,08	4,06 ± 0,37	101
7**	0	-	-	-	<LD	<LD	-
	2	-	-	-	2,01 ± 0,10	2,08 ± 0,21	104
	4	-	-	-	4,02 ± 0,12	4,03 ± 0,17	100,7
8**	0	-	-	-	<LD	<LD	0
	2	-	-	-	1,98 ± 0,18	2,06 ± 0,12	104
	4	-	-	-	4,01 ± 0,12	4,05 ± 0,15	100,7

*Amostras de água: 1, 2, 3, 4 e 5.

**Amostras de cachaça: 6, 7 e 8.

Neste trabalho o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi obtidos através da equação apresentada no item 1.7 no primeiro capítulo.

O método proposto apresentou LD para os métodos de determinação de Hg^{2+} e Cu^{2+} de 0,20 e 0,15 mg L^{-1} , respectivamente e LQ para Hg^{2+} e Cu^{2+} de 0,65 e 0,50 mg L^{-1} , respectivamente.

Os parâmetros analíticos do método proposto estão resumidos na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Figuras de mérito do método proposto para determinar Hg^{2+} e Cu^{2+}

Parâmetros	Hg^{2+}	Cu^{2+}
Faixa de trabalho (mg L^{-1})	1 – 15	1 - 10
Coefficiente de correlação (R)	0,9973	0,9964
Precisão (RSD%) (n=10; 5,0 mg L^{-1})	2,9	3,2
Limite de detecção (mg L^{-1})	0,20	0,15
Limite de quantificação (mg L^{-1})	0,65	0,50
pH	6,0	10,0

5 CONCLUSÃO

A síntese do CD se mostrou bastante simples, o CD obtido é estável e apresentou alto rendimento. As análises de absorção UV/VIS, de infravermelho, de microscopia de transmissão e espectros de luminescência evidenciaram a formação do CD.

O método proposto tem como principal vantagem a determinação de dois metais, cada um, em um pH diferente. O CD quando utilizados em solução tampão pH 6,0 apresentou afinidade com os íons Hg^{2+} , e em pH 10,0 apresenta afinidade com o íon Cu^{2+} , ambos apresentaram ampla faixa de trabalho entre 1 e 15 mg L^{-1} para a determinação Hg^{2+} e 1 e 10 mg L^{-1} para a determinação de Cu^{2+} , boa linearidade com coeficiente de correlação linear de 0,9973 e 0,9964, respectivamente.

Na determinação do íon mercúrio o método proposto apresentou concordância entre as análises com RSD de 2,9%, baixos limite de detecção de 0,20 mg L^{-1} e limite de quantificação de 0,65 mg L^{-1} . Apresentou também recuperação entre 96,5 e 111,0% e demonstrou concordância entre os resultados quando comparado com o método de referência.

Para a determinação do íon Cu^{2+} , o método proposto apresentou boa precisão com RSD de 3,2%, limite de detecção de 0,15 mg L^{-1} e limite de quantificação de 0,50 mg L^{-1} . O método apresentou também uma recuperação satisfatória entre 95,5 e 109% e também demonstrou concordância entre os resultados quando comparado com o método de referência.

Devidos aos resultados obtidos, pode-se concluir que o método proposto apresentou parâmetros analíticos satisfatórios e é mais uma alternativa para a determinação de Hg^{2+} e Cu^{2+} em amostra de água e de Cu^{2+} em amostras de cachaça.

6 PERSPECTIVAS

Otimizar o processo de síntese do CD, variando quantidades e concentrações através de planejamento de experimentos, afim de obter um CD com maior rendimento quântico e conseguir menor limites de detecção e quantificação.

Realizar análise de microscopia de transmissão eletrônica (TEM) e força atômica (FM), para conhecer o tamanho das nanopartículas e sua distribuição de tamanho.

Desenvolver um sistema de análise por injeção em fluxo, a fim de melhorar as características analíticas do método proposto, visto que o mesmo é realizado em bancada e trabalha com volumes muito pequenos, ocasionando erros elevados.

REFERÊNCIAS

ADEGA DOS VINHOS. **Produtores de vinho no Brasil**. Disponível em: <<http://www.adegadovinho.com.br/artigo.php?recordID=31&n=MapadoVinho:Brasil>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

AMARANTE, J. O. A. DO. **Os segredos para iniciantes e iniciados –**, 2005. São Paulo: Mescla, 2005.

AMERINE, M. A.; OUGH, C. . **Methods for the analysis of musts and wines**. 2nd editio ed. New York: John Wiley and Sons, 1987.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, 2003.

ARAÚJO, A. N. et al. Sequential injection system for the spectrophotometric determination of reducing sugars in wines. **Talanta**, v. 52, n. 1, p. 59–66, 31 maio 2000.

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 49, n. 38, p. 6726–44, 10 set. 2010.

BERGAMIN, N.; MEDEIROS, J. X.; REIS, B. F. SOLVENT EXTRACTION IN CONTINUOUS FLOW INJECTION ANALYSIS: Determination of Molybdenum in Plant Material. **Analytica chimica acta**, v. 101, p. 9–16, 1978.

BLASI, T. C. **Análise do Consumo e Constituintes químicos de vinhos produzidos na Quarta Colônia de Imigração Italiana do Rio Grande de Sul e sua relação com as frações lipídicas sanguíneas**. Universidade Estadual de Santa Maria, RS. 2004. Dissertação.

BRASIL. Lei nº 7.678, 8 de novembro de 1988. **Câmara dos deputados**, 1988.

BRASIL. DECRETO Nº 8.198, DE 20 FEVEREIRO DE 2014. **Presidência da república**, 2014.

BRUCH, K. L. **Signos distintivos de origem: entre o velho e o novo mundo vitivinícola**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2011.

BYERS, R. J.; HITCHMAN, E. R. Quantum dots brighten

biological imaging. **Progress in histochemistry and cytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 201–37, fev. 2011.

CAO, L. et al. Carbon dots for multiphoton bioimaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 37, p. 11318–9, 2007.

CERDA, V. et al. Flow techniques in water analysis. **Talanta**, v. 50, n. 4, p. 695–705, 1999.

CHANDRA, S. et al. Synthesis, functionalization and bioimaging applications of highly fluorescent carbon nanoparticles. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1533–1540, 2011.

CHEN, J. et al. One-pot synthesis of nitrogen and sulfur co-doped carbon dots and its application for sensor and multicolor cellular imaging. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 485, p. 167–174, 2017.

CHEN, Y. et al. Facile synthesis of nitrogen and sulfur co-doped carbon dots and application for Fe(III) ions detection and cell imaging. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 223, p. 689–696, 2016.

CONN, E. E. E STUMPT, P. K. **Introdução à bioquímica. 4 ed. Edgard Blücher. 4. ed. São Paulo.**

DA SILVA, L. F. et al. Solid cation exchange phase to remove interfering anthocyanins in the analysis of other bioactive phenols in red wine. **Food Chemistry**, v. 227, p. 158–165, jul. 2017.

DA SILVA, P. H. A et al. Evaluation of the chemical composition of wine produced from jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). **New Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 595–600, 2008.

DANTAS, A. F. “**Avaliação da 2,2’-Biquinolina na separação, preconcentração e determinação de cobre por espectrofotometria de absorção molecular em solução e em fase sólida**”. UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2004. TESE.

DEMIATE, I. M. et al. Analysis of total and reducing sugar in foods. A comparative study between colorimetric and titration techniques. **Exact and Soil Sciences, Agrarian S and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65–78, 2002.

DONG, Y. et al. Extraction of electrochemiluminescent oxidized carbon quantum dots from activated carbon. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 21, p. 5895–5899, 2010.

DONG, Y. et al. Carbon-based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 30, p. 7800–7804, 2013.

DORNEMANN, G. M. **Comparação de Métodos para Determinação de Açúcares Redutores e Não-redutores**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2016.

ESTEVES DA SILVA, J. C. G.; GONÇALVES, H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1327–1336, 2011.

FERNÁNDEZ-NOVALES, J. et al. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. **Food Research International**, v. 42, n. 2, p. 285–291, 2009.

GASPAR, E. S. **Desenvolvimento de Equipamento para Avaliação da Degradação de Semicondutores de Potência**. Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), 2005. dissertação.

GONÇALVES, H. M. R. **Analytical Applications of Fluorescent Carbon Dots**. FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO, 2013. TESE.

GONÇALVES, H. M. R.; DUARTE, A. J.; ESTEVES DA SILVA, J. C. G. Optical fiber sensor for Hg(II) based on carbon dots. **Biosensors & bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1302–6, 2010.

GRANATO, D. **Associação entre atividade antioxidante in vitro e características químicas, sensoriais, cromáticas e comerciais de vinhos tintos Sul- Americanos**. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2011. TESE.

GUERRA, C. C. Aromas: parte essencial da qualidade dos vinhos. **EMBRAPA**, 2006.

HARDMAN, R. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 2, p. 165–172, 2006.

HARTMANN, P.; HASWELL, S. J.; GRASSERBAUER, M. Monitoring of reducing sugars by flow-injection analysis using p-hydroxybenzoic acid hydrazide. **Analytica Chimica Acta**, v. 285, n. 1–2, p. 1–8, 1994.

HASWELL, S. Development and Operating Characteristics of Micro Flow Injection Based on Electroosmotic Flow. **Analyst**, v. 122, p. 1R–10R, 1997.

HILL, Z. D.; MACCARTHY, P. Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 63, n. 2, p. 162, 1986.

IBRAVIN, INSTITUTO B. DE V. **Regiões produtoras de vinho**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/Regioes-Produtoras>>. Acesso

em: 18 maio. 2017.

INMETRO, I. N. DE M. Q. E T. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQ-CGCRE-008. 2010.

IUPAC, U. I. OF A. P. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Application Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

JOHNSON, H. **The Story of Wine**. Londres: Mitchell-Beazley, 1989.

KRONKA, E. A. M. et al. Multicomutação e amostragem binária em análise química em fluxo. Determinação espectrofotométrica de ortofosfato em águas naturais. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 372–376, 1997.

KUO, T. R. et al. One-pot green hydrothermal synthesis of fluorescent nitrogen-doped carbon nanodots for in vivo bioimaging. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 77–82, 2015.

LAI, C.-W. et al. Facile synthesis of highly emissive carbon dots from pyrolysis of glycerol; gram scale production of carbon dots/mSiO₂ for cell imaging and drug release. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 29, p. 14403, 2012.

LEE, G. et al. The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: Total polyphenols determination in wine samples. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 679–686, 2011.

LIM, S. Y.; SHEN, W.; GAO, Z. Carbon quantum dots and their applications. **Chemical Society reviews**, v. 44, n. 1, p. 362–381, 2015.

LIMA, J. L. F. C. et al. Multi-pumping flow systems: An automation tool. **Talanta**, v. 64, n. 5 SPEC. ISS., p. 1091–1098, 2004.

LIN, P.-Y. et al. Eco-friendly synthesis of shrimp egg-derived carbon dots for fluorescent bioimaging. **Journal of biotechnology**, v. 189C, p. 114–119, 2014.

LIU, H.; YE, T.; MAO, C. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 34, p. 6473–6475, 2007.

LIU, Y. et al. Sensors and Actuators B: Chemical Selective and sensitive chemosensor for lead ions using fluorescent carbon dots prepared from chocolate by one-step hydrothermal method. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 237, p. 597–604, 2016.

LOPES, T. I. M. S. et al. Construction and use of a tubular picrate ion-selective electrode for reducing sugar determination in Port wine by flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, n. 1–3, p. 122–

128, 1995.

LUO, Y. et al. Highly visible-light luminescence properties of the carboxyl-functionalized short and ultrashort MWNTs. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 180, n. 6, p. 1928–1933, 2007.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 244–248, 1990.

MAPA. Ministério de Agricultura e Abastecimento (PORTARIA N°43). p. 1–21, 2016.

MAPA, MINISTÉRIO DA A. PECUARIA E A. **PORTARIA SDA N° 342, DE 18 DE SETEMBRO DE 2014.**

MATOSO, E. **Pré-concentração de pb e cu com fosfato de zircônio e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama.** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP), 2001. TESE.

MAZZA, G. et al. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4009–4017, 1999.

MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8–19, 2012.

MENEGUZZO, J.; MANFROI, L.; RIZZON, L. A. **Sistema de Produção de Vinho Tinto.** Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto/introducao.htm>> 2014.

MIRANDA, K.; DIONÍSIO, A. G. G.; PEREIRA-FILHO, E. R. Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 99–101, 2010.

MIRÓ, M.; CERDÀ, V.; ESTELA, J. M. Multisyringe flow injection analysis: Characterization and applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 199–210, 2002.

MOTA, R. V. DA et al. Composição físico-química de uvas para vinho fino em ciclos de verão e inverno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1127–1137, 2010.

OLIVEIRA, A. F.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of reducing sugars using a focalized coiled reactor in a domestic microwave oven. **Talanta**, v. 50, n. 4, p. 899–904, 1999.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução À Espectroscopia**. 4° ed.

PAVONI, J. F.; NEVES-JUNIOR W.F.P.; SPIROPULOS M.A.; DE ARAÚJO D.B. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista brasileira de ensino de física**, v. 36, n. 4, 4501.

PÉREZ-MAGARIÑO, S.; M. ORTEGA-HERAS, M.; JOSÉ, M. L. G.-S. Multivariate classification of rosé wines from different Spanish protected designations of origin. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, n. 1, p. 187–190, 2002.

PERIS-TORTAJADA, M.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. Determination of Reducing Sugars by the Neocuproine Method Using Flow Injection Analysis. **Food Chemistry**, v. 43, n. 1992, p. 65–69, 2000.

RAY, S. C. et al. Fluorescent carbon nanoparticles: Synthesis, characterization, and bioimaging application. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 43, p. 18546–18551, 2009.

REIS, B. F.; BERGAMIN, H. F. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 16, n. 6, p. 570–573, 1993.

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

REIS, B. F.; GINE, M. F.; ZAGATTO, E. A. G. Multicommutation in flow analysis . Part 1 . Binary sampling : concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica chimica acta**, v. 293, p. 129–138, 1994.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIGGS, J. E. et al. Strong luminescence of solubilized carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 24, p. 5879–5880, 2000.

ROSS, T. **COMO O VINHO É FEITO: CONHEÇA AS 8 ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO VINHO**. Disponível em: <<http://vidaevinho.com/processo-de-producao-do-vinho/>>. 2017.

RUZICKA, J. et al. Exchange of Comments : Pumping Pressure and Reagent Consumption in Flow Injection Analysis. **analytical chemistry**, v. 49, n. 12, p. 1858–1861, 1977.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica chimica acta**, v. 78, p. 145–157, 1975.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection : a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays.

Analytica chimica acta, v. 237, p. 329–343, 1990.

SAMOTICHA, J. et al. The effects of enzymatic pre-treatment and type of yeast on chemical properties of white wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 445–453, 2017.

SANTOS, A. C. V.; MASINI, J. C. A análise por injeção sequencial (sia): vinte anos de uma perspectiva brasileira. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1949–1956, 2010.

SARTINI, R. P. et al. Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, n. 1–3, p. 119–125, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. Seventh ed. New York: John Wiley & Sons, inc, 2005.

SKOOG, D. A. .; HOLLER, F. J.; WEST, D. M. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^a ed.

SOYOLLKHAM, B. et al. Total polyphenolic compounds contents (TPC), total antioxidant activities (TAA) and HPLC determination of individual polyphenolic compounds in selected Moravian and Austrian wines. **Open Chemistry**, v. 9, n. 4, 2011.

SRIVASTAVA, S.; GAJBHIYE, N. S. Carbogenic nanodots: Photoluminescence and room-temperature ferromagnetism. **ChemPhysChem**, v. 12, n. 14, p. 2624–2632, 2011.

SUN, Y. et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 24, p. 7756–7, 2006.

TIAN, T. et al. Sensors and Actuators B: Chemical One-pot synthesis of boron and nitrogen co-doped carbon dots as the fluorescence probe for dopamine based on the redox reaction between Cr (VI) and dopamine. v. 240, p. 1265–1271, 2017.

VAZ, R. et al. PREPARATION OF CARBON DOTS AND THEIR OPTICAL CHARACTERIZATION: AN EXPERIMENT OF NANOSCIENCE FOR UNDERGRADUATE COURSE. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 570–574, 2015.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005.

WANG, L. et al. Aqueous phase synthesis of highly luminescent, nitrogen-doped carbon dots and their application as bioimaging agents. **Langmuir**, v. 30, n. 47, p. 14270–14275, 2014.

WANG, Q. et al. Microwave-hydrothermal synthesis of fluorescent

carbon dots from graphite oxide. **Carbon**, v. 49, n. 9, p. 3134–3140, 2011.

WANG, Q. et al. Microwave-assisted synthesis of carbon nanodots through an eggshell membrane and their fluorescent application. **The Analyst**, v. 137, n. 22, p. 5392–7, 2012.

WANG, Y.; HU, A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 34, p. 6921, 2014.

WEE, S. S.; NG, Y. H.; NG, S. M. Synthesis of fluorescent carbon dots via simple acid hydrolysis of bovine serum albumin and its potential as sensitive sensing probe for lead (II) ions. **Talanta**, v. 116, p. 71–76, nov. 2013.

XU, X. et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–7, 2004.

YAN, F. et al. Highly photoluminescent carbon dots-based fluorescent chemosensors for sensitive and selective detection of mercury ions and application of imaging in living cells. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 192, p. 488–495, 2014.

YANG, S.-T. et al. Carbon dots for optical imaging in vivo. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 32, p. 11308–9, 2009a.

YANG, S. T. et al. Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 42, p. 18110–18114, 2009.

YANG, Y. et al. One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosanw. **Chem. Commun. Chem. Commun**, v. 48, n. 48, p. 380–382, 2012.

YEBRA, M. C.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M. Automatic determination of reducing sugars by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 276, n. 2, p. 385–391, 1993.

YU, S. J. et al. Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 50, p. 17604–17605, 2005.

ZHANG, Y. Y. et al. A new hydrothermal refluxing route to strong fluorescent carbon dots and its application as fluorescent imaging agent. **Talanta**, v. 117, p. 196–202, 2013.

ZHOU, JIGANG; BOOKER, CHRISTINA; LI, RUYING; ZHOU, XIANGTAI; SHAM, TSUNKONG; SUN, XUELIANG; DING, Z. An

Electrochemical Avenue to Blue Luminescent Nanocrystals from Multiwalled Carbon Nanotubes (MWCNTs). **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 4, p. 744–745, 2007.

ZHU, H. et al. Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. (Supporting Information). **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 34, p. 5118–20, 2009.

ZHU, S. et al. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. **Nano Research**, v. 8, n. 2, p. 355–381, 2015.

ZORZAN, Cristiano; ZANUS, M. C. **Análise sensorial de vinhos Ancellotta e Tannat**. 4^o Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves. 2006. v. 57. p. 35-35.

ZUO, J. et al. Preparation and Application of Fluorescent Carbon Dots. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1–13, 2015.