

Mestrado	Engenharia Química, Tecnologias de Protecção Ambiental
Instituição acolhimento	Requimte/Instituto Superior de Engenharia do Porto
Título	Monitorização de Cobre em Vinhos Verdes
Autor(a)	Sílvia Marina Gomes da Silva
Orientador	Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales
Data da publicação	15 de Novembro de 2010

Agradecimentos

À Doutora Goreti Sales pela forma como me orientou neste trabalho e pela disponibilidade demonstrada. O meu sincero agradecimento pelo entusiasmo e confiança inculcados.

Às Engenheiras Felismina Moreira e Joana Guerreiro pela simpatia com que me receberam, constante disponibilidade e pela ajuda prestada.

Ao Engenheiro António Crispim Ribeiro por aceitar este projecto como tese de Mestrado e à Doutora Cristina Matos por me acolher no Grupo de Reacção e Análise Química (GRAQ).

Ao Doutor António Cerdeira e à Engenheira Laurentina por me terem recebido e acompanhado durante o estágio na Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes (CVRVV). E o meu mais profundo e sincero agradecimento a todas as técnicas do laboratório pela simpatia e disponibilidade demonstradas assim como pela ajuda prestada.

À minha família e namorado por todo o apoio e compreensão prestados ao longo deste trabalho. E ainda a todas as minhas amigas, em especial à Sílvia Sousa e à Ana Isabel Pereira, pela amizade e ajuda constantes.

Resumo

A presente dissertação descreve o desenvolvimento e a caracterização de sensores potenciométricos com base em polímeros de impressão molecular e de sensores ópticos com base em membranas de poli(cloreto de vinilo), PVC, para a determinação de cobre em vinhos verdes.

Os sensores potenciométricos foram preparados a partir de diferentes solventes (metanol e clorofórmio), tendo o seu crescimento decorrido na presença ou ausência da molécula molde (cobre). Os sistemas sensores selectivos ao cobre continham partículas de polímeros com ou sem impressão molecular como material electroactivo, dispersas em solvente plastificante, PVC e, em alguns casos, aditivo aniónico. A avaliação dos vários sistemas baseou-se na comparação das características operacionais dos diversos eléctrodos onde foram aplicados. Estas características foram obtidas a partir de curvas de calibração, cujos declives e limites de detecção variaram entre $-39,9 - 37,0 \text{ mV decada}^{-1}$ e $4,2 - 29,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os sensores não são independentes do pH uma vez que o complexo formado entre o cobre e a difenilcarbazida é favorecido por valores de pH próximos de 5. Assim, obtiveram-se melhores resultados usando água desionizada ou solução tampão de HEPES revelando-se um método rápido e relativamente eficaz nestas condições.

Os sensores ópticos basearam-se na reacção colorimétrica entre o cobre e um complexante. Os reagentes complexantes escolhidos foram a neocuproína, a difenilcarbazida e o dietilditiocarbamato de sódio. Avaliou-se o efeito de vários parâmetros experimentais na resposta destes sensores, tais como o pH (avaliado para os valores 3,00 e 5,00), a concentração de cobre (que variou entre 0,06 e $317,7 \text{ mg L}^{-1}$) e as próprias características da membrana. Os melhores resultados foram obtidos a pH 3, numa gama de concentrações de 0,06 e $31,8 \text{ mg L}^{-1}$ usando a difenilcarbazida como reagente complexante. A aplicação destes sensores a vinhos requer ainda estudos adicionais, especialmente no que diz respeito à necessidade de implementar algum procedimento de pré-tratamento de amostra.

Palavras-chave: cobre, vinhos verdes, sensores potenciométricos, polímeros de impressão molecular, sensores ópticos.

Abstract

This dissertation describes the development and characterization of potentiometric sensors based on molecularly imprinted polymers and optical sensors based on membranes of poly(vinyl chloride), PVC, for the determination of copper in *Vinho Verde*.

The potentiometric sensors were prepared with different solvents (methanol and chloroform) and its growth was carried out with or without template (copper). The sensor systems were dispersed in plasticizer, PVC, and in some cases, an anionic additive. Characterization of the potentiometric systems was made by comparison of the operational analytical features of the different electrodes. These features were obtained from calibration curves, whose slopes and detection limits ranged from $-39.9 - 37.0 \text{ mV decade}^{-1}$ and 4.2 to 29.1 mg mL^{-1} , respectively. The sensors were not independent from the pH since the complex formed between copper and diphenylcarbazide was favored by pH values near 5, thus, better results were obtained using deionized water or HEPES buffer. This method was considered quick and relatively effective under these conditions.

Optical sensors were based on the colorimetric reaction between copper and a complexing reagent. Three different compounds were tested: neocuproine, diphenylcarbazide and sodium diethyldithiocarbamate. The effect of various experimental parameters on the response of these sensors was evaluated, such as pH (evaluated from 3.00 to 5.00), the copper concentration (varied between 0.06 and 317.7 mg L^{-1}) and the characteristics of the membrane. The best results were obtained with pH 3, in a concentration range of 0.06 and 31.8 mg L^{-1} using diphenylcarbazide as a complexing reagent. The practical application of the present method to wines requires, however, additional elements regarding the need to previous sample pre-treatment procedure.

Key-words: copper, green wines, potentiometric sensors, molecularly imprinted polymers, optical sensors.

Nomenclatura

BPO Peróxido de benzoílo

CIE Comissão Internacional de Iluminação

CLF Clorofórmio

CMY *Cyanide, Magenta e Yellow*

Cu²⁺ Cobre (II)

DDC Dietilditiocarbamato de sódio

DFC Difenilcarbazida

EDGMA Etileno Glicol Dimetacrilato

ESI Eléctrodo Selectivo de Ião

HSL *Hue, Saturation e Luminance*

HSV *Hue, Saturation e Value*

IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LIRL Limite Inferior de Resposta Linear

LD Limite de Detecção

MeOH Metanol

MIP *Molecularly Imprinted Polymers*

NC Neocuproína

NIP *Non Imprinted Polymer*

2-Nitrofeniloctil éter oNFOE

PTN Pressão e Temperatura Normais

PVC Poli(cloreto de vinilo)

RGB Red, Green e Blue

SPE Solid Phase Extraction

TpCIPB Tetrakis (4-clorofenil)borato

Índice

1. Introdução	1
1.1. O Vinho Verde	1
1.2. Produção de Vinho Verde	2
1.2.1. <i>Recepção</i>	2
1.2.2. <i>Desengace/esmagamento</i>	3
1.2.3. <i>Prensagem</i>	3
1.2.4. <i>Decantação</i>	4
1.2.5. <i>Fermentação</i>	4
1.2.6. <i>Colagem</i>	4
1.2.7. <i>Filtração</i>	5
1.2.8. <i>Estabilização</i>	5
1.2.9. <i>Madeira</i>	6
1.3. O Cobre	7
1.4. Métodos de análise do cobre	7
1.4.1. <i>Métodos Electroanalíticos</i>	8
1.4.2. <i>Sistemas sensores</i>	9
1.5. Potenciometria	10
1.5.1. <i>Eléctodos de referência</i>	11
1.5.1.1. <i>Eléctrodo de calomelanos (mercúrio/cloreto de mercúrio)</i>	11
1.5.1.2. <i>Eléctrodo de Prata/Cloreto de Prata</i>	12
1.5.1.3. <i>Eléctrodo de Hidrogénio</i>	13
1.5.2. <i>Eléctodos Indicadores</i>	14

1.5.2.1.	Eléctrodos metálicos	14
1.5.2.2.	Eléctrodos Selectivos de Ião	15
1.5.3.	<i>Equação de Nernst</i>	16
1.6.	Sensores potenciométricos	19
1.6.1.	<i>Polímeros de Impressão Molecular</i>	19
1.6.2.	<i>Preparação dos MIPs</i>	20
1.7.	Sensores Ópticos	24
1.7.1.	<i>O sistema visual humano e a cor</i>	25
1.7.2.	<i>Modelação da cor</i>	28
1.7.3.	<i>Modelos de cores</i>	30
1.7.3.1.	Modelo RGB	30
1.7.3.2.	Modelo CMY (K)	31
1.7.3.3.	Modelo HSV	32
1.7.3.4.	Modelo XYZ	33
1.7.3.5.	Modelo CIELab	34
2.	Descrição Experimental	37
2.1.	Considerações Gerais	37
2.2.	Material e equipamento	37
2.3.	Reagentes e soluções	38
2.4.	Preparação dos eléctrodos	38
2.4.1.	<i>Preparação dos sensores</i>	38
2.4.2.	<i>Preparação das membranas sensoras</i>	39
2.5.	Avaliação dos eléctrodos	40

2.6.	Preparação e desenvolvimento dos sensores ópticos	41
2.6.1.	<i>Optimização da composição da membrana dos sensores</i>	41
2.6.1.1.	Seleccção do agente complexante	41
2.6.1.2.	Seleccção da quantidade de agente complexante	42
2.6.1.3.	Seleccção da quantidade de solvente mediador	42
2.6.1.4.	Seleccção da quantidade de reagente de suporte	42
2.6.2.	<i>Estudo do efeito do pH</i>	42
2.7.	Avaliação dos sensores ópticos	43
3.	Resultados Experimentais e Conclusões	45
3.1.	Sensores potenciométricos	451
3.2.	Sensores ópticos	51
3.2.1.	<i>Seleccção do agente complexante</i>	51
3.2.2.	<i>Optimização da composição da membrana dos sensores</i>	53
3.2.2.1.	<i>Seleccção da quantidade de agente complexante</i>	53
3.2.2.2.	<i>Seleccção da quantidade de solvente mediador</i>	56
3.2.2.3.	<i>Seleccção da quantidade de reagente de suporte</i>	57
3.2.3.	<i>Estudo do efeito do pH</i>	59
3.2.4.	<i>Re-optimização da composição para a membrana de DFC</i>	61
3.2.4.1.	<i>Seleccção da quantidade de agente complexante</i>	61
3.2.4.2.	<i>Seleccção da quantidade de solvente mediador</i>	63
3.2.4.3.	<i>Seleccção da quantidade de reagente de suporte</i>	64
3.2.5.	<i>Avaliação da resposta dos sensores</i>	65
3.3.	Aplicação à análise de vinhos	67

4. Conclusões	71
Bibliografia	73

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema do processo produtivo de vinho branco.	2
Figura 1.2. Parte do processo produtivo de vinho branco.	3
Figura 1.3. Resumo dos métodos electroanalíticos comuns.	9
Figura 1.4. Eléctrodo de Calomelanos.	12
Figura 1.5. Eléctrodo de Prata/Cloreto de Prata.	13
Figura 1.6. Eléctrodo padrão de Hidrogénio.	14
Figura 1.7. Curva de calibração típica para eléctrodos sensíveis a espécies catiónicas. <i>Zona x</i> , zona onde não há variação de potencial com a variação de concentração; <i>zona y</i> , zona de resposta não linear; <i>zona z</i> , zona de resposta linear.	17
Figura 1.8. Representação gráfica do tempo de resposta, $t (\Delta E/\Delta t)$, de uma célula de eléctrodo selectivo de ião.	19
Figura 1.9. Princípio da impressão molecular polimérica.	20
Figura 1.10. Representação do procedimento de preparação do MIP recorrendo ao método de polimerização em “bulk”.	21
Figura 1.11. Monómeros habitualmente usados em moldagem não-covalente. al: ácido metacrílico (MAA); all: ácido p-vinilbenzóico; alll: ácido acrílico (AA); alV: ácido itacónico; aV: ácido 2- (trifluorometil) -acrílico (TFMAA); aVI: ácido acrilamido- (2-metil) -propanosulfónico (AMP SA); bl: 4-vinilpiridina (4-VP); bli: 2-vinilpiridina (2-VP); blll: 4-(5) -vinilimidazol; bIV: 1-vinilimidazol; bV: alilamina; bVI: N, N-dietil-aminoetil-metacrilamida (DEAEM); bVII: N- (2-aminoetil) -metacrilamida; bVIII: N, N,dietil-4-estirilamidina; bIX: N, N, N-trimetil-aminoetil-metacrilato; bX: N-vinilpirrolidona (NVP); bXI: éster-etil-urocanico.	23
Figura 1.12. Agentes de reticulação habitualmente usados em moldagem molecular. xl: p-divinilbenzeno (DVB); xll: 1,3-diisopropenil-benzeno (DIP); xlll: etileno-glicol-dimetacrilato (EDGMA); xIV: tetrametileno-dimetacrilato (TDMA); xV: N, O-bisacriloil-L-fenilalaninol	23
Figura 1.13. Iniciadores de polimerização habitualmente usados em moldagem molecular il: azobisisobutironitrilo (AIBN); ill: azobisdimetilvaleronitrilo (ABDV); illl: dimetilacetalo de benzilo; iIV: benzoilperóxido (BPO); iV: ácido 4,4-azo (4-cianovalérico).	24
Figura 1.14. Anatomia de um olho.	26
Figura 1.15. Espectro electromagnético mostrando as bandas de comprimento de onda principais e a banda correspondente à luz visível.	27
Figura 1.16. Representação das cores primárias (esquerda) e secundárias (direita) do sistema aditivo, onde as intersecções indicam a cor resultante da soma entre as cores dos círculos correspondentes.	28
Figura 1.17. Gama do espectro que corresponde ao visível.	29
Figura 1.18. Saturação: o azul-escuro à esquerda é altamente saturado enquanto o azul esbatido à direita tem baixa saturação.	29
Figura 1.19. Luminosidade.	30
Figura 1.20. Representação do Espaço de Cor.	31
Figura 1.21. Espaço de cor CMY.	32
Figura 1.22. Espaço de cor HSV.	33
Figura 1.23. Espaço de cor CIE.	34
Figura 1.24. Modelo de cor CIELab.	35
Figura 2.1. Potenciómetro da Metrohm 780 pH Meter.	37
Figura 2.2. Eléctrodos selectivos ao Cu^{2+} construídos.	38
Figura 2.3. (A) Suporte dos eléctrodos em Perspex [®] ; (B) Ligação de fio eléctrico à placa de cobre; (C) Preenchimento da cavidade com suporte condutor de grafite e aplicação da membrana sensora; (D) Fixação do fio condutor e ligação de terminal.	40
Figura 3.1. Curvas obtidas para as soluções de água, MES e HEPES às quais se adicionou uma solução de cobre de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ M.	46

Figura 3.2. Curvas obtidas para as soluções de água e HEPES às quais se adicionou uma solução de cobre de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ M e uma solução de DFC:Cu^{2+} de igual concentração.	47
Figura 3.3. Representação das curvas obtidas para os eléctrodos com membranas constituídas apenas por cobre com e sem aditivo.	48
Figura 3.4. Gradiente de cor padrão para as concentrações de cobre mais baixas e pH 3.	65
Figura 3.5. Melhores ajustes matemáticos para cada uma das coordenadas. Membrana com 0,04 g DFC, 0,06 g PVC e 0,04 g de sebacato.	67

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Quadro resumo dos tratamentos de esterilização e estabilização.	6
Tabela 2.1. Quantidade de reagentes utilizada na preparação de cada membrana.	38
Tabela 3.1 Volume de solução de cobre adicionado.	43
Tabela 3.2. Resultados obtidos usando uma solução de água desionizada como solução inicial à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de Cu^{2+} , $1,0 \times 10^{-2}$ M.	44
Tabela 3.3. Resultados obtidos usando uma solução tampão de HEPES (pH 5,18) como solução inicial à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ M.	44
Tabela 3.4. Resultados obtidos usando solução tampão de MES (pH 4,45) como solução inicial à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ M.	45
Tabela 3.5. Resultados obtidos usando solução tampão de HEPES (pH 5,18) como solução inicial à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de DFC: Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ M.	46
Tabela 3.6. Resultados obtidos usando uma solução tampão de HEPES (pH 5,18) como solução inicial e adicionando pequenos volumes de uma solução de DFC: Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ M.	48
Tabela 3.7. Resultados gerais de complexação entre o cobre e vários agentes complexantes.	50
Tabela 3.8. Gradiente de cor dos vários reagentes com o aumento da concentração de cobre.	51
Tabela 3.9. Quantidades dos vários reagentes, entre os quais o agente complexante, utilizados na preparação da membrana sensora.	52
Tabela 3.10-A. Resultados obtidos com as várias quantidades de NC.	52
Tabela 3.10-B. Resultados obtidos com as várias quantidades de DFC.	53
Tabela 3.10-C. Resultados obtidos com as várias quantidades de DDC.	53
Tabela 3.11. Quantidades dos vários reagentes, entre os quais o solvente mediador, utilizados na preparação da membrana sensora.	55
Tabela 3.12-A. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador nos sensores de NC.	55
Tabela 3.12-B. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador nos sensores de DFC.	56
Tabela 3.12-C. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador nos sensores de DDC.	56
Tabela 3.13. Quantidades dos vários reagentes, entre os quais o reagente de suporte, utilizados na preparação da membrana sensora.	57
Tabela 3.14-A. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC nos sensores de NC.	58
Tabela 3.14-B. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC nos sensores de DFC.	58
Tabela 3.14-C. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC nos sensores de DDC.	59
Tabela 3.15. Resultados obtidos para as soluções padrão de cobre a pH 3.	60
Tabela 3.16. Resultados obtidos com as soluções padrão de concentrações mais baixas, a pH 3.	61
Tabela 3.17. Quantidade dos reagentes utilizados na preparação da membrana sensora.	62
Tabela 3.18. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de DFC.	62
Tabela 3.19. Quantidades dos reagentes utilizados na preparação da membrana sensora.	63
Tabela 3.20. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador.	63
Tabela 3.21. Quantidades dos reagentes utilizados na preparação da membrana sensora.	64
Tabela 3.22. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC.	64
Tabela 3.23. Tipo de tratamento matemático realizado.	66
Tabela 3.24. Resultados obtidos para diferentes tipos de solução de vinho com uma gama de concentrações entre $1,26 \times 10^{-5}$ e $1,89 \times 10^{-5}$ M.	68

1.Introdução

O vinho e a sua cultura têm uma importância internacional. É uma actividade com inúmeras ramificações sendo, simultaneamente, um sector económico capital e um dos prazeres capitais da vida.



De entre todas as regiões vitícolas espalhadas pelo Mundo, a Europa é aquela que apresenta maior extensão e a que guarda maior tradição desta cultura. Desde a antiga civilização grega ao império romano, ela faz parte da vida, da história e das tradições de países como a França, Espanha e Portugal [1].

Desde o século XII existem muitas referências à cultura da vinha em Portugal, cujo incremento partiu da iniciativa das corporações religiosas, mas foi a partir do século XIII que o vinho entrou definitivamente nos hábitos das populações portuguesas, especialmente, de Entre-Douro-e-Minho.

Embora a sua exportação fosse ainda muito limitada, a história revela-nos que terão sido os “Vinhos Verdes” os primeiros vinhos portugueses conhecidos nos mercados europeus (Inglaterra, Flandres e Alemanha).

A orientação para a qualidade e a regulamentação da produção e comércio do “Vinho Verde” surgiram no início do século XX, tendo a Carta de Lei de 18 de Setembro de 1908 e o Decreto de 1 de Outubro do mesmo ano, demarcado pela primeira vez a “Região dos Vinhos Verdes”. Questões de ordem cultural, tipos de vinho, encepamentos e modos de condução das vinhas obrigaram à divisão desta região em seis sub-regiões (Monção, Lima, Basto, Braga, Amarante e Penafiel) [2], as quais passaram a ser nove posteriormente (Amarante, Ave, Baião, Basto, Cávado, Lima, Monção e Melgaço, Paiva e Sousa) [3].

1.1. O Vinho Verde

O Vinho Verde é único no mundo [4]. É um vinho naturalmente leve e fresco, produzido na Região Demarcada dos Vinhos Verdes, no noroeste de Portugal, uma região costeira geograficamente bem localizada para a produção de excelentes vinhos brancos. Com baixo teor alcoólico, e portanto menos calórico, o Vinho Verde é um vinho frutado, fácil de beber, óptimo como aperitivo ou em harmonização com refeições leves e equilibradas.

A tipicidade e originalidade destes vinhos são o resultado, por um lado, das características do solo, clima e factores sócio-económicos da Região dos Vinhos Verdes, e, por outro, das peculiaridades das castas autóctones da região e das formas de cultivo da vinha

1.2. Produção de Vinho Verde

O processo de produção de vinho verde é composto por várias etapas, como se encontra esquematizado na figura 1.1. Cada uma destas etapas será detalhada de seguida.

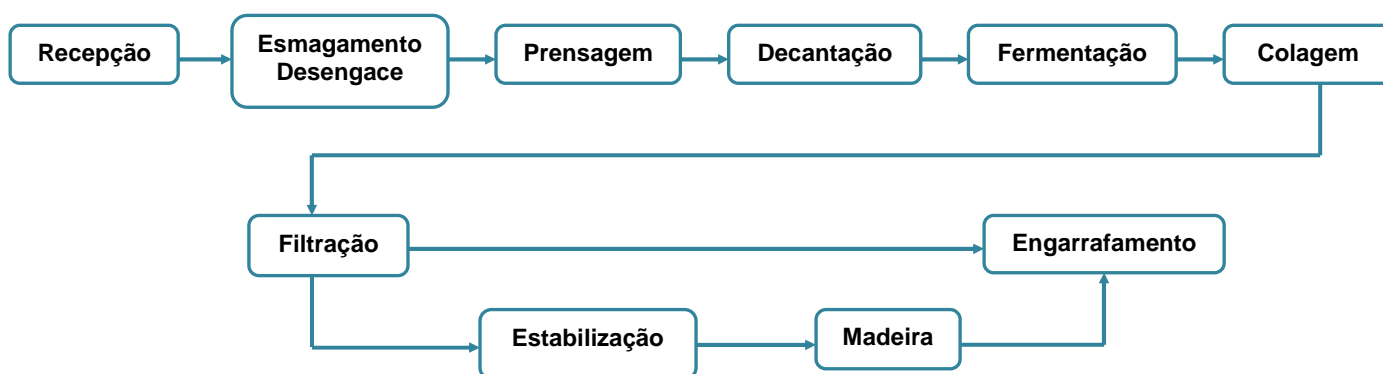


Figura 1.1. Esquema do processo produtivo de vinho branco.

1.2.1. Recepção

Após a colheita, as uvas são colocadas em recipientes adequados de modo a respeitar a sua integridade e permitir que estas se mantenham num estado sanitário adequado até ao seu transporte para a adega, devendo chegar intactas.

Na adega, após a sua chegada, são submetidas a equipamentos de pesagem e amostragem, sendo levadas para um tapete de triagem onde são seleccionadas segundo parâmetros previamente definidos pelo enólogo (tipo de vinho a produzir, casta, sanidade das uvas). Após uma selecção cuidadosa as uvas seguem para o tegão de recepção (Figura 1.2), onde são descarregadas aproveitando a força da gravidade e onde lhes são adicionados produtos enológicos (nomeadamente neve carbónica e anidrido sulfuroso) para as proteger de temperaturas elevadas e de uma rápida oxidação. Posteriormente, são empurradas para a canalização que alimenta os desengaçadores/esmagadores [5].



Figura 1.2.Parte do processo produtivo de vinho branco.

1.2.2. Desengace/esmagamento

O desengace consiste na separação das uvas do cacho, permitindo o esmagamento destas sem o engaço. O processo de desengace é igual tanto para uvas brancas como tintas. Esta operação deve ser sempre anterior ao esmagamento, uma vez que deste modo o engaço não é ferido pelos rolos do esmagador. Os desengaçadores estão geralmente associados aos esmagadores. Um bom desengaçador não deve deixar as uvas por separar, mas deve retirar a totalidade do engaço e respeitar a integridade das películas e dos bagos, sendo importante que estes saiam inteiros [5].

A operação de esmagamento consiste no rompimento da película da uva, de modo a libertar polpa e sumo. Este pode ser mais ou menos intenso, pois a película pode ser esfolada e rasgada ou apenas fendida por calcamento. O grau de esmagamento é definido pelo espaço entre rolos, sendo este mais intenso quanto menor for o espaço. O tipo de esmagamento exerce influência sobre toda a vinificação, a conduta da fermentação e de maceração e ainda sobre a qualidade do vinho que se obtém [5].

1.2.3. Prensagem

A prensagem é uma operação que consiste na extracção do mosto/sumo das uvas, sendo indispensável ao processo de vinificação. Esta é feita através de uma prensa, que esmaga as uvas com o objectivo de retirar todo o líquido que se encontra nos bagos, utilizando o mínimo de força possível para se obter uma extracção suave e eficiente.

Nos vinhos brancos esta operação é efectuada antes da fermentação alcoólica, uma vez que, não há interesse em extrair compostos das películas e das grainhas [5].

1.2.4. Decantação

A decantação consiste em separar duas fases, a líquida e a sólida. Depois de ocorrer a prensagem há, em suspensão, várias partículas como restos de película e engaço, pó, resíduos de pesticidas aplicados na vinha, entre outros. A sedimentação ou decantação consiste na queda dessas partículas. A queda deve-se à força da gravidade e as partículas são eliminadas por trasfega do vinho utilizando bombas. Quanto mais grossos forem os elementos a sedimentar, mais rápido é o processo.

Seguidamente avança-se para a fermentação alcoólica, etapa que a decantação pode influenciar, já que uma decantação longa pode originar uma fermentação mais longa e um provável aumento da acidez volátil (depende do teor de açúcares e da levedura) [5].

1.2.5. Fermentação

A fermentação das uvas esmagadas (nos vinhos tintos), ou somente do mosto (nos vinhos brancos) é um fenómeno complexo que envolve células vivas unicelulares, autónomas do ponto de vista metabólico. Durante esta fase de produção do vinho, o mosto turva, aquece e soltam-se bolhas de gás resultantes dos processos metabólicos associados a estas células.

Foi Pasteur quem demonstrou que a fermentação é realizada por leveduras, quando privadas de ar, e que são estas que, juntamente com fungos microscópicos unicelulares, decompõem o açúcar em álcool e gás carbónico [5].

1.2.6. Colagem

A clarificação por colagem basicamente consiste em adicionar ao vinho um produto clarificante tal como a gelatina, albumina, caseína ou bentonite (argila), entre outros. Esse produto tem uma carga oposta ao elemento a clarificar e, quando adicionado, é capaz de coagular e formar flocos, o que leva ao respectivo aumento de peso e à sua sedimentação. Os flocos, ao sedimentar, atraem e arrastam as partículas de turvação clarificando assim o vinho.

Se o vinho a clarificar tiver um baixo teor em taninos ou determinados catiões, pode não ocorrer floculação e o vinho poderá ser engarrafado com o produto

adicionado. Uma solução para este problema é utilizar a bentonite para adsorver, retirando assim as proteínas adicionadas para a colagem.

Em resumo, alguns factores que podem influenciar a colagem são: a presença dos catiões sódio e ferro; a temperatura, acidez do vinho, colóides protectores e cubas muito altas [5].

1.2.7. Filtração

A filtração é um processo unitário de separação que consiste em fazer passar um líquido turvo através de uma camada filtrante com canais ou poros muito finos, conferindo ao vinho estabilidade. As partículas e impurezas em suspensão são retidas segundo vários processos.

O rendimento de um filtro é o volume clarificado na unidade de tempo e diminui à medida que as impurezas se vão depositando na camada filtrante, produzindo o seu bloqueamento progressivo ou colmatagem [5].

1.2.8. Estabilização

Um dos constituintes do vinho é o ácido tartárico. O problema deste ácido é a instabilidade dos seus sais, especialmente o bitartarato de potássio que cristaliza a baixa temperatura, e ao precipitar dá a impressão de vinho alterado.

Para evitar este problema de precipitação, que é mais de aspecto que de alteração, os vinhos são “estabilizados” por refrigeração, antes de serem colocados no mercado. A técnica consiste em refrigerar rapidamente o vinho até uma temperatura próxima do congelamento. A temperatura de congelamento de uma solução hidroalcoólica está situada abaixo de zero e num valor correspondente a metade da graduação alcoólica. Por exemplo, um vinho de 11% de álcool irá congelar a uma temperatura próxima dos $-5,5^{\circ}\text{C}$ [5]. A refrigeração é seguida de uma filtração para conferir limpidez ao vinho e maior estabilidade à sua cor.

A estabilização do vinho inclui também aquecimento/pasteurização. Os vinhos novos constituem soluções muito saturadas de bitartarato de potássio e de tartarato de cálcio e a lenta cristalização destes sais é possível se o vinho possuir germes de cristalização. O aquecimento, ao destruir esses germes permite manter o estado de supra-maturação no vinho, bloqueando assim a cristalização.

Outro efeito benéfico do aquecimento relaciona-se com os fenómenos de redução e oxidação associados ao vinho. Ao aquecer, em presença de anidrido sulfuroso livre, o excesso de cobre nos vinhos brancos é reduzido e passa para forma

coloidal, que é separável por colagem. Um aquecimento a vinhos arejados, durante semanas, a temperatura não muito elevada, provoca um efeito de envelhecimento. O vinho aproxima-se assim de alguns vinhos de licor, cujas características são obtidas por processos de oxidação. Ou seja, aquecer o vinho a 30°C durante um a três meses, permite obter a cor e o gosto de um vinho velho.

A estabilização enzimática do vinho é hoje em dia muito importante, sendo normalmente obtida pela adição de sulfuroso, mas também pode ser atingida por aquecimento a 75°C durante alguns minutos ou 90°C durante apenas alguns segundos (tabela 1.1) [5].

Tabela 1.1. Quadro resumo dos tratamentos de esterilização e estabilização.

Tratamentos	Fim a atingir	Temperatura e duração
Pasteurização	Esterilização	55°-65°C, alguns minutos
Pasteurização – flash	Esterilização e estabilização	90°-100°C, alguns segundos
Engarrafamento a quente	Esterilização	45°-48°C (na garrafa)
Estabilização térmica	Eliminação de proteínas	60°-75°C, 15 a 30 minutos
	Eliminação de cobre	75°C, 15 a 60 minutos

1.2.9. Madeira

A utilização de madeira em enologia é hoje uma prática corrente, embora em certos casos, a sua utilização seja polémica. À semelhança do que acontece nas mais prestigiadas regiões mundiais, denota-se que em Portugal



há um recurso crescente à utilização desta tecnologia. É uma técnica relativamente recente e dispendiosa, mas é inquestionável o seu contributo no enobrecimento dos vinhos e aguardentes pois esta imprimirá características especiais ao vinho, dependendo do tempo e da superfície de contacto entre ambos e do tipo, origem, idade e tratamento (secagem, queima) da madeira. O tempo óptimo de permanência na madeira é variável, pois depende da composição do vinho e do tipo de compostos extraídos daquela ao longo do tempo [5].

1.3. O Cobre

O cobre (Cu) é um elemento químico metálico pertencente à classe dos metais de transição, mono ou bivalente de cor vermelha-pálida, maleável, dúctil, relativamente macio. Depois da prata, é o metal que possui melhores características de condução eléctrica.



As suas principais aplicações devem-se precisamente às suas características de bom condutor, sendo usado no fabrico de tubos de aquecimento, cabos, telhados e serpentinas de arrefecimento. Visto tratar-se de um metal relativamente macio, é também apropriado para trabalhos de gravação, pelo que se utiliza em artes gráficas. O cobre encontra outra aplicação muito importante como componente de ligas. Destas, as mais importantes são o bronze, o latão e a alpaca.

Apresenta também efeitos fisiológicos [6]. Um relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde indica que os efeitos nocivos sobre a saúde são maiores na deficiência do cobre do que no seu excesso. A sua deficiência pode provocar anemias, anormalidades ósseas, entre outras doenças mais graves. O seu excesso pode provocar, entre outros, estados de envenenamento [7,8].

Como o corpo não pode produzir cobre, este é habitualmente resultante da ingestão de alimentos [7]. Neste sentido, é fundamental o controlo da sua quantidade nos alimentos e bebidas tais como o vinho verde, no qual o cobre está presente em resultado dos fertilizantes utilizados nas vinhas e da sua adição em tratamentos de eliminação de maus odores.

1.4. Métodos de análise do cobre

O controlo analítico de cobre pode ser realizado tendo por base diversas técnicas instrumentais. Os métodos mais comuns recorrem a espectrofotometria com base em reagentes de desenvolvimento de cor ou a espectrofotometria de absorção atómica. Os primeiros estão habitualmente associados a interferências químicas diversas, entre as quais a variação do índice de refração pelo teor de álcool presente no vinho e os últimos requerem a determinação em ambiente laboratorial, não permitindo o despiste dos valores de cobre nas cubas de produção de vinho. Neste sentido, parece interessante o desenvolvimento de um método analítico rápido, de

baixo custo e de elevada selectividade, capaz de monitorar on-line os valores de cobre no vinho, no sentido de permitir a tomada de medidas correctivas, quando possível. Este método pode baseia-se em técnicas electroanalíticas e seus sistemas de sensores.

1.4.1. Métodos Electroanalíticos

A química electroanalítica compreende um conjunto de métodos baseados nas propriedades eléctricas de um analito numa solução. Estas técnicas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem electroquimicamente determinados sistemas. Tais informações incluem estequiometria, velocidade de transferência de massa, a extensão de reacções e constantes de equilíbrio.

Os métodos electroanalíticos apresentam algumas vantagens relativamente a outros métodos instrumentais, tais como:

- A especificidade para um determinado estado de oxidação de um dado elemento;
- Equipamento utilizado relativamente barato;
- Resposta rápida a variações de concentração.

Existe uma ampla variedade de métodos electroanalíticos. Estes estão divididos em métodos interfaciais e métodos de solução como um todo, sendo os primeiros bastante mais utilizados (Figura 1.3). Os métodos interfaciais baseiam-se em fenómenos que ocorrem na interface entre as superfícies dos eléctrodos e a fina camada de solução adjacente a essas superfícies. Os métodos de solução como um todo, pelo contrário, baseiam-se em fenómenos ocorridos no interior da solução [9].

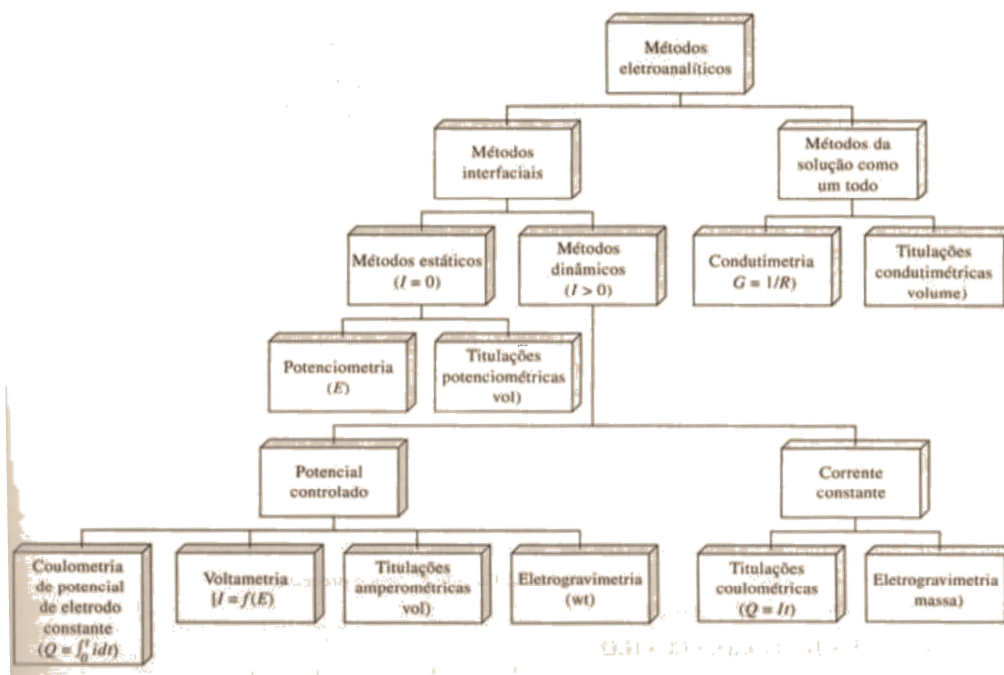


Figura 1.3. Resumo dos métodos electroanalíticos comuns.

1.4.2. Sistemas sensores

Um *sensor* pode ser definido como um dispositivo capaz de registar de forma directa, contínua e reversível um parâmetro físico (*sensor físico*) ou a concentração de uma espécie química (*sensor químico*). Por outras palavras, um sensor baseia-se na transformação de sinais entre diferentes domínios, de um domínio ao qual não podemos aceder directamente para um que possamos medir. Do ponto de vista analítico, constituem ferramentas valiosas para fazer face à crescente exigência de informação química rápida, completa e fiável, em áreas como a segurança alimentar, os estudos ambientais, a biotecnologia, a química clínica, a indústria química e farmacêutica [19].

Os *sensores químicos* são dispositivos que convertem informação química (composição química quantitativa e/ou qualitativa de um sistema) num sinal analítico útil. A informação química pode ter origem numa reacção química do analito ou numa propriedade física do sistema investigado. Estes sensores contêm duas unidades funcionais básicas: um elemento de reconhecimento (*receptor*) e um mecanismo de transdução. O *receptor*, onde o processo de reconhecimento molecular ou iónico tem lugar, é a parte mais importante do sensor, já que define a sua selectividade. O reconhecimento do analito pode dar-se na superfície do elemento sensor ou, em alternativa, no seio do material [19].

Dependendo do fenómeno de interacção/transdução, existe uma grande variedade de sensores químicos, e a sua complexidade pode variar de forma considerável. Geralmente são classificados com base no mecanismo de transdução e divididos em 4 tipos principais:

1. *Sensores ópticos* baseiam-se na medida das propriedades ópticas do analito, ou das resultantes de interacções deste com o receptor;

2. *Sensores electroquímicos* (voltamétricos, potenciométricos e condutimétricos) baseiam-se no efeito de interacção electroquímica à superfície de um eléctrodo, ou seja, na medida do potencial ou corrente eléctrica que se gera entre diferentes eléctrodos na presença do analito. Este efeito pode ser estimulado electricamente ou resultar de uma perturbação espontânea em condições de corrente zero;

3. *Sensores piezoeléctricos* envolvem a geração de corrente eléctrica a partir de um cristal piezoeléctrico em vibração. Estão tipicamente associados a variações de massa;

4. *Sensores térmicos* baseiam-se na medida do calor (produzido ou absorvido) envolvido numa reacção química específica, na qual participa a espécie sob medida [19].

1.5. Potenciometria

A potenciometria tem-se revelado um processo de doseamento exacto, preciso, selectivo, rápido e económico, sendo por isso indicada como alternativa a outros processos. A rapidez e a economia que a caracterizam devem-se ao facto de não ser necessário um tratamento especial da amostra, bastando uma simples diluição, numa solução aquosa ajustadora da força iónica e por vezes também do pH. Desta forma é possível aplicá-la ao doseamento de várias substâncias, sem separação prévia e em muitos casos sem necessidade de clarificação das amostras, porque os excipientes habitualmente utilizados não interferem na resposta dos eléctrodos. Além disso, o material necessário a estas determinações é pouco dispendioso e de fácil utilização em procedimentos de rotina [10].

Nos métodos potenciométricos mede-se o potencial da célula, isto é, a diferença de potencial entre dois eléctrodos mergulhados numa solução a analisar (solução do analito), através da qual não passa corrente (o valor da intensidade de corrente é aproximadamente nulo) [11].

O equipamento necessário para estes métodos inclui os dois eléctrodos e um dispositivo de medida de potencial, sendo desejável que o potencial de um dos eléctrodos seja conhecido, constante e completamente insensível à composição da solução em estudo, sendo este conhecido por eléctrodo de referência. O outro eléctrodo depende da concentração do analito [9].

1.5.1. Eléctrodos de referência

Os eléctrodos de referência devem apresentar várias características [11], tais como:

- Invariabilidade do potencial ao longo do tempo;
- Retornar ao seu potencial original após ter sido submetido a correntes pequenas;
- Exibir baixa histerese sob ciclos de temperatura, isto é, o potencial do eléctrodo deve responder prontamente a uma variação de temperatura, mas assim que a temperatura inicial é restabelecida, o seu potencial deve voltar ao valor inicial;
- Ser reversível e obedecer à equação de Nernst.

A necessidade da sua associação ao eléctrodo indicador deve-se à impossibilidade de medir directamente o potencial do eléctrodo indicador. O eléctrodo indicador, imerso na solução em estudo, é associado, através de uma ponte salina, ao eléctrodo de referência, para que então se tenham condições de medir a força electromotriz (f.e.m.) da célula.

A f.e.m. da célula é a diferença algébrica dos potenciais dos dois eléctrodos, o de referência e o indicador, tomada em qualquer direcção e dada em valor absoluto. Alguns exemplos de eléctrodos de referência usados ao longo dos tempos são o de calomelanos, o de cloreto de prata/prata e o de padrão de hidrogénio.

1.5.1.1. Eléctrodo de calomelanos (mercúrio/cloreto de mercúrio)

Os eléctrodos de referência de calomelanos apresentam mercúrio com solução saturada de cloreto de mercúrio (I) e uma solução de cloreto de potássio com uma concentração definida.

O eléctrodo de calomelanos saturado (SCE) tem sido largamente usado devido à facilidade com que é preparado. No entanto, este eléctrodo tem a desvantagem do seu potencial variar rapidamente com a alteração da temperatura, em virtude das modificações da solubilidade do cloreto de potássio, além da utilização de materiais de elevada toxicidade como é o caso do mercúrio.

O corpo de cada eléctrodo consiste num tubo externo de plástico ou de vidro, que contém uma solução de cloreto de potássio saturada, conectada por uma pequena abertura ao tubo interno onde se encontra a solução de mercúrio/cloreto de mercúrio em cloreto de potássio (Figura 1.4) [9].

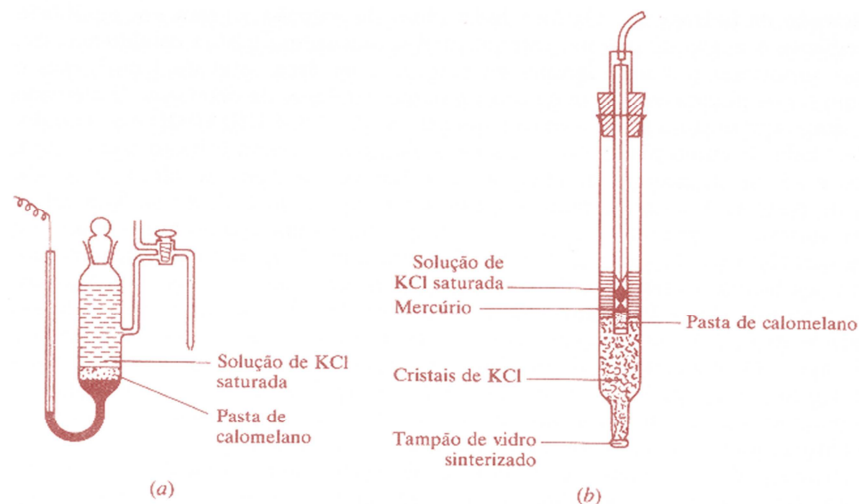


Figura 1.4.Eléctrodo de Calomelanos.

1.5.1.2. Eléctrodo de Prata/Cloreto de Prata

Os modelos comerciais destes eléctrodos são semelhantes, no aspecto externo e no formato, aos eléctrodos de calomelanos apresentados anteriormente. No entanto, nos eléctrodos de prata/cloreto de prata, o tubo interno é substituído por um fio de prata recoberto por uma camada de cloreto de prata. Esse fio está imerso numa solução de cloreto de potássio saturada em cloreto de prata (Figura 1.5). Estes eléctrodos têm a vantagem de poderem ser utilizados a temperaturas superiores a 60 °C, ao contrário dos eléctrodos de calomelanos [9].

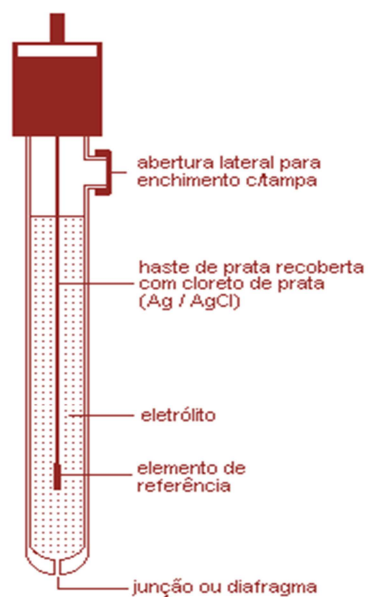


Figura 1.5. Electrodo de Prata/Cloreto de Prata.

1.5.1.3. Electrodo de Hidrogénio

Por convenção internacional foi atribuído um potencial padrão ao electrodo de hidrogénio, o qual nas condições PTN (1 atm, 25 °C, $[H^+] = 1 \text{ M}$) é de 0 V. Este electrodo pode funcionar como ânodo ou cátodo dependendo do electrodo a que estiver ligado.

Um electrodo padrão de hidrogénio é constituído por um tubo fino em vidro com um fio de platina no seu interior ligado a uma pequena placa de platina mergulhados numa solução aquosa $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ de ião H^+ (solução de um ácido forte). Este tubo de vidro tem uma pequena abertura lateral e através desta abertura é injectado hidrogénio gasoso (H_2), à pressão de 1 atm e à temperatura de 25°C, de um modo contínuo, formando uma película de hidrogénio sobre a platina (Figura 1.6) [12].

Este electrodo não é prático em trabalhos de rotina. Ele requer uma corrente de hidrogénio puro a uma pressão determinada e torna-se inactivo por efeito de envenenamento da camada catalítica com o uso de certas substâncias. Além disso, o electrodo não pode ser usado na presença de agentes oxidantes ou redutores.

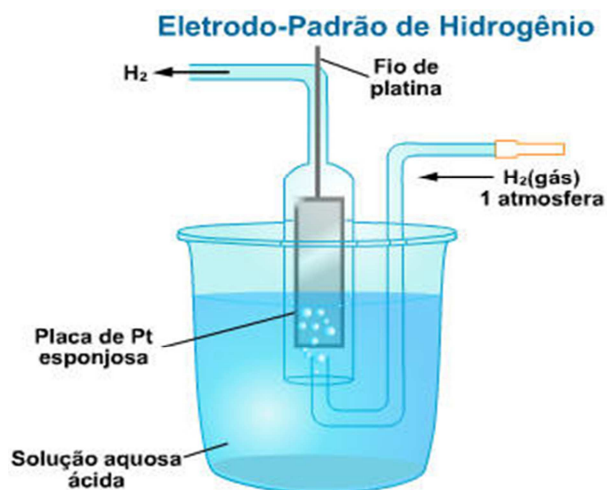


Figura 1.6. Electrodo padrão de Hidrogênio.

1.5.2. Electrodo Indicadores

Os electrodo indicadores, ou selectivos, têm a capacidade de desenvolver um potencial eléctrico proporcional ao logaritmo da actividade de uma espécie iónica, mesmo na presença de outros iões [13]. Este tipo de electrodo deve responder rapidamente e de uma forma reprodutível às variações da actividade do ião a analisar (*analito*). Existem dois tipos de electrodo indicadores: os metálicos e os de membrana (ou electrodo selectivos de iões – *ES/s*) [9].

1.5.2.1. Electrodo metálicos

- **Inertes** - são constituídos por um fio de platina, ouro ou por uma vareta de carbono vítreo que mergulha na solução do analito. Podem ser utilizados quando o objectivo da análise é o estudo de um equilíbrio reversível de oxidação - redução. O único papel deste electrodo é aceitar ou fornecer electrões; isto é, de simples condutor [11];
- **Primeira ordem** - são constituídos por um metal puro que está em equilíbrio com os seus catiões em solução e, nas condições de trabalho, tornam-se mais electronegativos (potenciais mais positivos) do que o hidrogênio. Aplicam-se na determinação da concentração do catião em solução [11];
- **Segunda ordem** - são constituídos por um metal mergulhado numa solução contendo aniões que formam um sal moderadamente solúvel com os iões

metálicos, ou também pode ser um metal revestido com o referido sal. São usados para determinar a concentração do anião em solução. É o caso das titulações potenciométricas de precipitação dos halogenetos [11].

- **Terceira ordem** – são constituídos por um metal em contacto com um sal pouco solúvel (ou um complexo fracamente ionizado) do próprio metal e um sal levemente mais solúvel (ou um complexo levemente mais ionizado) de um segundo metal. São muito pouco utilizados [14].

1.5.2.2. Eléctrodos Selectivos de Ião

Frequentemente, os eléctrodos de membrana são designados por eléctrodos selectivos de ião (ESIs) devido à alta selectividade da maioria destes dispositivos, os quais permitem a determinação rápida de numerosos catiões e aniões por medidas potenciométricas directas [9].

Um ESI é constituído por um eléctrodo de referência interno mergulhado numa solução de referência que está fisicamente separada da solução de analito por uma membrana selectiva de iões. O seu funcionamento baseia-se na passagem de espécies carregadas de uma fase para outra, originando uma diferença de potencial (potencial da membrana), sendo uma das fases a solução de analito e a outra a membrana [11]. As ligações entre ambos são feitas por reacções de cristalização, complexação ou permuta iónica. As membranas e os iões têm propriedades em comum, tais como: a baixa solubilidade, condutividade eléctrica e reactividade selectiva ao analito [9].

Os ESIs possibilitam o estabelecimento de metodologias simples e económicas, fáceis de operar em rotina laboratorial por técnicos não especializados. Recorde-se que estas análises requerem apenas, na maioria dos casos, a diluição da amostra e/ou dissolução da mesma em solvente adequado, usualmente uma solução tampão ajustadora do valor de pH e de força iónica das soluções. Apresentam também intervalos de resposta analítica alargados, geralmente compreendidos entre 10^{-2} e 10^{-5} mol L⁻¹, com limites de detecção da ordem dos 10^{-6} ou 10^{-7} mol L⁻¹. Quando a metodologia envolvida inclui procedimentos de pré-concentração do analito, torna-se possível alcançar limites de detecção para os detectores potenciométricos que igualam ou suplantam aqueles fornecidos por técnicas bem mais sofisticadas e dispendiosas [15].

Com algumas excepções, os ESIs respondem também com grande rapidez, usualmente em períodos de tempo inferiores a 30 segundos, dependendo contudo do tipo de ESI em questão e da concentração do analito.

Além das vantagens enunciadas, é de salientar o baixo custo dos detectores e do equipamento por ele requerido. Neste sentido, o tempo e o custo envolvidos numa determinação analítica com eléctrodos selectivos de membrana são francamente reduzidos [15].

1.5.3. Equação de Nernst

Em electroquímica pode aplicar-se a equação de Nernst, a qual não entra em linha de conta com a velocidade das reacções. Esta pode ter várias aplicações, nomeadamente na determinação de valores de potenciais normais a partir de outros valores tabelados, na previsão de forças electromotrizes de células galvânicas, no cálculo de constantes de equilíbrio e de produtos de solubilidade, etc. [16].

A equação de Nernst relaciona as diferenças de potencial medidas com o logaritmo da actividade de um dado ião em solução de acordo com a equação seguinte,

$$E = \text{"Constante"} - \frac{2,303 RT}{Z_a F} \log a_A$$

Equação 1.1.Equação de Nernst.

em que:

E - Valor experimental de potencial de um ESI;

R - Constante dos gases perfeitos, $8,3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

T - Temperatura termodinâmica, K;

F - Constante de Faraday, $9,64846 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$;

Z_a - Carga do ião principal;

a_A - Actividade do ião principal, mol L^{-1} ou mol kg^{-1} ;

"Constante" - Inclui o potencial normal do eléctrodo selectivo, o potencial do eléctrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV.

A representação gráfica de actividade em função da diferença de potencial é designada de curva de calibração (figura 1.7). Geralmente, ao efectuar-se a representação gráfica da variação da diferença de potencial em função do logaritmo da actividade (ou da concentração) do ião principal, é possível distinguir-se três zonas,

x, y e z. Uma zona onde praticamente não ocorre variação da diferença de potencial entre o eléctrodo selectivo e o de referência com a variação da concentração (*zona x*), uma zona em que a variação dessa diferença de potencial não segue a citada equação de Nernst modificada (*zona y*), esta zona não é apropriada à execução de determinações analíticas e é vulgarmente denominada zona de resposta não linear do eléctrodo. Por último a zona de resposta linear do eléctrodo, onde vulgarmente são executadas as determinações por potenciometria directa (*zona z*), e que corresponde à porção da curva de calibração em que a resposta do eléctrodo varia linearmente em função do logaritmo da actividade (ou concentração) do ião ao qual o eléctrodo é selectivo. Nesta zona linear, a curva de calibração exhibe um declive positivo ou negativo, conforme se trate de um eléctrodo sensível a uma espécie catiónica ou aniónica, e com um valor teórico de 59,16 mV década⁻¹, para iões monovalentes ou 29,58 mV década⁻¹, para iões divalentes, quando a temperatura é fixada a 25°C [10].

As curvas de calibração potenciométrica apresentam três parâmetros relevantes: o limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite de detecção (LD) e o declive [17]. O LIRL é o valor de concentração a partir do qual a resposta potenciométrica típica apresenta um comportamento linear. O LD é o valor de intercepção entre os segmentos que prolongam o comportamento linear e não linear. O declive traduz a qualidade da resposta potenciométrica.

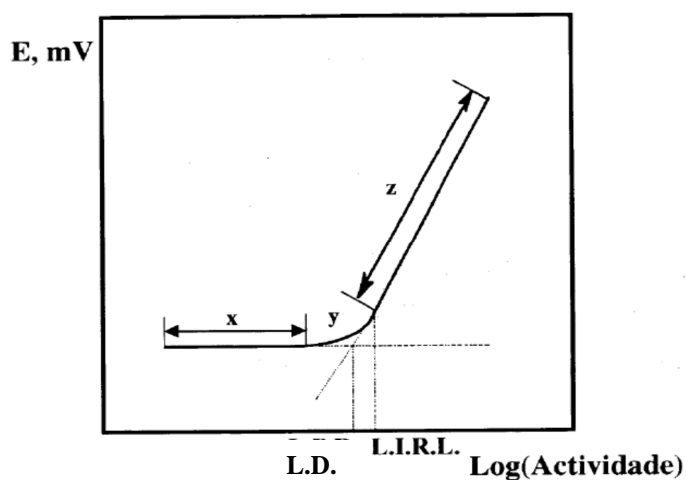


Figura 1.7. Curva de calibração típica para eléctrodos sensíveis a espécies catiónicas. *Zona x*, zona onde não há variação de potencial com a variação de concentração; *zona y*, zona de resposta não linear; *zona z*, zona de resposta linear.

É importante compreender que o potencial de uma célula electroquímica está relacionado com as actividades dos reagentes e produtos da reacção da célula e indirectamente com as suas concentrações molares. Assim, faz-se um ajuste ao valor

da força iónica, contudo é necessário ter em mente que esta aproximação pode gerar erros no potencial calculado.

A força iónica não é mais do que a carga iónica da solução, isto é, a medida da intensidade do campo eléctrico devido à presença dos iões em solução e é determinada através da equação 2.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i Z_i^2$$

Equação 1.2. Cálculo da força iónica.

Em que:

μ - Força iónica;

c_i – Concentração molar dos vários iões em solução;

Z_i - Respectiva carga do ião.

Para além das características gerais das curvas de calibração, importa conhecer outra propriedade do desempenho dos ESIs - o tempo de resposta.

De acordo com as recomendações da IUPAC [18], o tempo de resposta dos eléctrodos é aquele que decorre entre o momento em que os eléctrodos de referência e selectivo de ião são colocados em contacto com uma solução da amostra (ou na qual se varia a actividade ou concentração de ião principal) e o primeiro instante em que o declive $\Delta E/\Delta t$ iguala um valor limite estabelecido (Figura 1.8). Este tempo depende não só da velocidade devido às características das unidades mas de outros factores como sejam o tempo de homogeneização, o volume e composição da solução onde os eléctrodos estão mergulhados, o volume de solução adicionada e o tempo de vida das unidades. Pode-se, portanto, afirmar que este tempo prático de resposta traduz não a resposta das unidades mas a resposta de toda uma célula electroquímica, o que tem maior interesse prático uma vez que é o tempo de resposta de toda uma montagem que condiciona o tempo necessário à execução de uma análise [10].

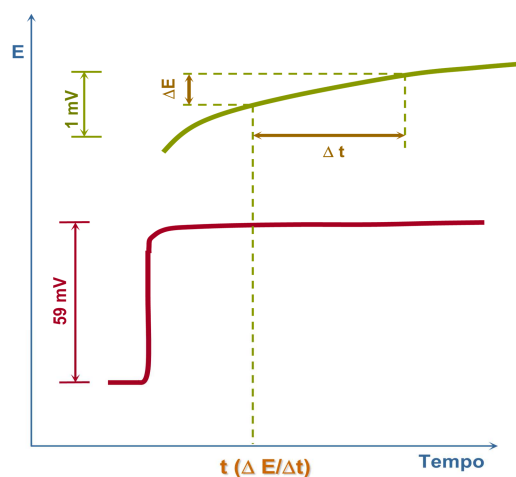


Figura 1.8. Representação gráfica do tempo de resposta, $t(\Delta E/\Delta t)$, de uma célula de electrodo selectivo de ião.

1.6. Sensores potenciométricos

O sensor potenciométrico estabelece um equilíbrio local na interface do sensor, onde os electrodos ou membrana medem o potencial gerado por iões. A informação sobre a composição de uma amostra é obtida pela diferença de potencial entre os electrodos. Essa diferença resulta do material electroquímico presente no sistema sensor. Tipicamente os sistemas sensores potenciométricos são baseados em ionóforos ou permutadores iónicos, responsáveis por acolher selectivamente o ião em estudo na membrana. A selectividade conferida ao sensor depende da extensão de ligação entre o sensor/ião em estudo e sensor/ião interferente. Quanto maior a afinidade do ião a analisar para o sistema sensor constituído, melhores as características de selectividade do electrodo selectivo.

Este fenómeno está habitualmente associado a ligações de natureza electrostática podendo ou não depender das características estereoespecíficas dos iões em estudo. A possibilidade de associar interacções estereoespecíficas na resposta potenciométrica pode originar uma melhoria significativa nas características de selectividade dos electrodos. Estas interacções podem ser conseguidas ou melhoradas através da utilização de polímeros de impressão molecular [20].

1.6.1. Polímeros de Impressão Molecular

Os MIP (do inglês, *Molecularly-Imprinted Polymers*) são polímeros reticulados sintetizados na presença de uma molécula molde, que através de ligações covalentes

ou não covalentes, interage com um monómero. A estes é adicionado um reagente de ligação cruzada que irá promover o crescimento do polímero e as ligações entre as suas cadeias, formando uma matriz sólida. Esta reacção é desencadeada por adição de um iniciador, normalmente radicalar. Após a polimerização, a molécula molde é removida dando origem a microcavidades, que possuem as suas propriedades geométricas e vinculativas. Estas são capazes de reter selectivamente a molécula molde ou moléculas análogas (Figura 1.9) [21].

O reconhecimento molecular constitui já uma ferramenta bem desenvolvida na área analítica, principalmente no que se refere à separação e quantificação de diferentes substâncias presentes em matrizes mais ou menos complexas [22]. Devido à sua alta selectividade, resistência mecânica, resistência a ácidos, bases, solventes orgânicos e altas pressões e temperaturas, os MIP são desenvolvidos para inúmeras aplicações, tais como extracção em fase sólida (SPE), cromatografia, catálise enzimática e tecnologia de sensores [21].

1.6.2. Preparação dos MIPs

A síntese dos MIP é, convencionalmente, realizada pelo método conhecido por polimerização em “bulk”, um procedimento relativamente simples e barato de executar (Figura 1.10). Neste método, o monómero funcional, o analito, o solvente, o reagente de ligação cruzada e o iniciador estão contidos em frascos selados sob o fluxo de N_2 (na ausência de oxigénio pois este composto retarda a reacção). Posteriormente, a mistura neles contida é irradiada com luz ultravioleta ou submetida ao calor, de modo a iniciar a polimerização. O sólido polimérico obtido é moído e submetido a lavagem com solvente para extracção do analito [20].

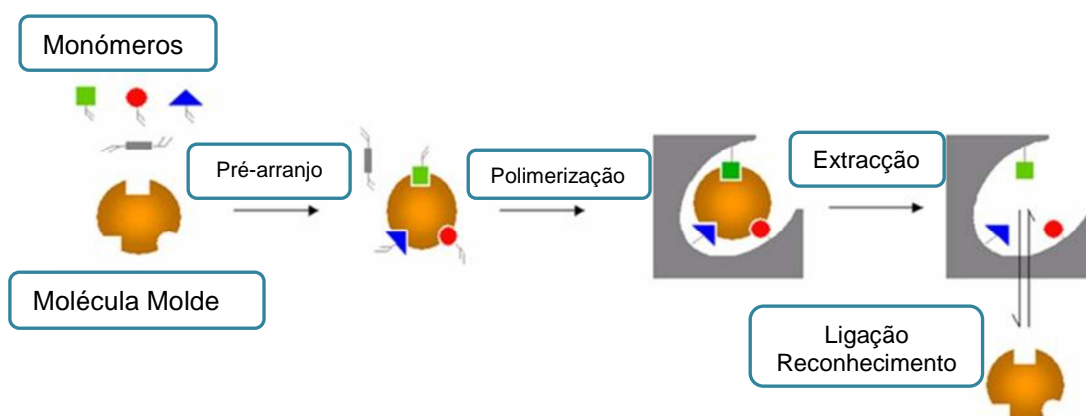


Figura 1.9. Princípio da impressão molecular polimérica.

A concepção e síntese de MIPs constitui por si só um processo complexo, cuja complexidade se torna ainda mais acentuada pelo número de variáveis experimentais que lhe são inerentes como, por exemplo, a natureza e a concentração da molécula molde, monómeros funcionais, agentes de reticulação, solventes, iniciadores e os próprios processos de moldagem molecular [22].

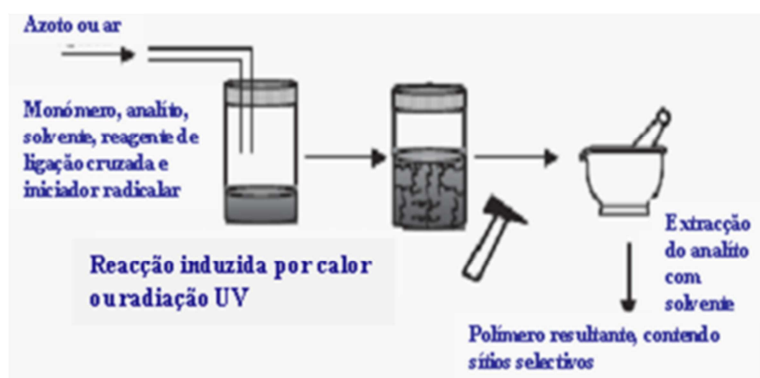


Figura 1.10. Representação do procedimento de preparação do MIP recorrendo ao método de polimerização em “bulk”.

A preparação dos MIP depende de vários factores e a escolha dos reagentes é ditada pela natureza da interacção do analito com o monómero. Assim, a sua escolha deve ser feita criteriosamente.

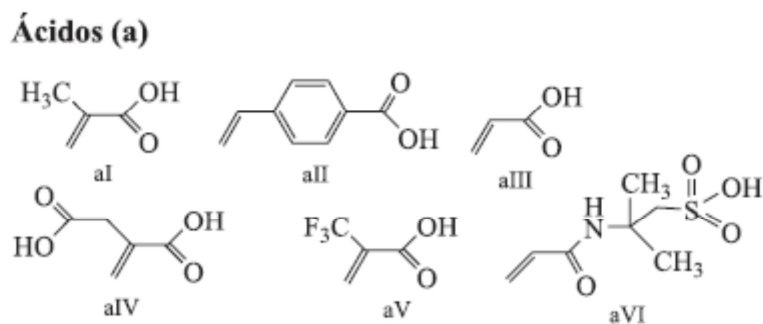
Em todos os processos de moldagem molecular a molécula molde assume uma importância fundamental, já que é responsável pela definição da organização espacial dos grupos funcionais dos monómeros. Por vários motivos, nem todas as moléculas molde se apresentam adequadas para utilização directa na preparação de polímeros com base em processos de moldagem molecular. Para serem compatíveis com processos de polimerização por radicais livres, as moléculas molde ideais devem ser quimicamente inertes.

Os monómeros funcionais são responsáveis pelas interacções que se estabelecem nos locais de reconhecimento. Nos protocolos de moldagem molecular não-covalente, é usado normalmente um excesso de monómeros funcionais em relação ao número de moles de molécula molde, de modo a favorecer a associação entre esta última e o monómero funcional. É muito importante assegurar a complementaridade da funcionalidade da molécula molde com a funcionalidade do monómero funcional (por exemplo, um dador de protões com um aceitador de protões), de modo a maximizar a formação dos complexos e, portanto, o processo de

moldagem molecular do polímero [22]. Na figura 1.11 apresentam-se alguns exemplos de monómeros funcionais.

O agente de reticulação usado na obtenção de um MIP desempenha as funções principais seguintes: controlo da morfologia da matriz polimérica; estabilização dos locais de ligação com capacidade de reconhecimento molecular; estabilização mecânica da matriz polimérica. Do ponto de vista da polimerização é adequada a existência de um elevado grau de reticulação, de modo a obter-se materiais permanentemente porosos (macroporosos) e também para garantir que os materiais apresentem uma estabilidade mecânica adequada. Em regra, os polímeros apresentam graus de reticulação superiores a 80% [22]. Na figura 1.12 encontram-se alguns agentes de reticulação bastante utilizados.

O solvente constitui o meio onde estão presentes todos os componentes que intervêm no processo de polimerização (molécula molde, monómeros funcionais, agente reticulante e iniciador). Desempenha ainda uma segunda função, extremamente importante, já que é responsável pela formação dos poros nos polímeros macroporosos. Por esta razão, na literatura anglo-saxónica o solvente é habitualmente designado *porogen*. Na preparação de polímeros macroporosos, a natureza e a concentração do solvente constituem parâmetros que permitem controlar a morfologia e o volume total dos poros [22].



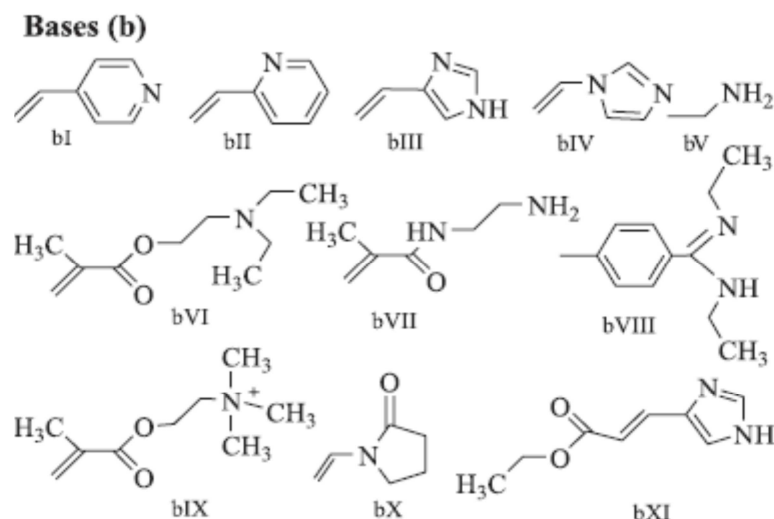


Figura 1.11. Monómeros habitualmente usados em moldagem não-covalente. aI: ácido metacrílico (MAA); aII: ácido p-vinilbenzóico; aIII: ácido acrílico (AA); aIV: ácido itacónico; aV: ácido 2- (trifluorometil) -acrílico (TFMAA); aVI: ácido acrilamido- (2-metil) -propanosulfónico (AMPESA); bI: 4-vinilpiridina (4-VP); bII: 2-vinilpiridina (2-VP); bIII: 4-(5) -vinilimidazol; bIV: 1-vinilimidazol; bV: alilamina; bVI: N, N-dietil-aminoetil-metacrilamida (DEAEM); bVII: N- (2-aminoetil) -metacrilamida; bVIII: N, N.dietil-4-estirilamidina; bIX: N, N, N-trimetil-aminoetil-metacrilato; bX: N-vinilpirrolidona (NVP); bXI: éster-etil-urocanico.

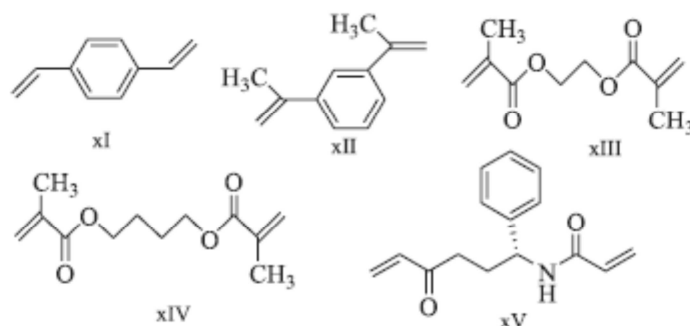


Figura 1.12. Agentes de reticulação habitualmente usados em moldagem molecular. xI: p-divinilbenzeno (DVB); xII: 1,3-diisopropenil-benzeno (DIP); xIII: etileno-glicol-dimetacrilato (EDGMA); xIV: tetrametileno-dimetacrilato (TDMA); xV: N, O-bisacrilóil-L-fenilalaninol

Em princípio, qualquer método de iniciação pode ser usado para iniciar polimerizações por radicais livres em presença de moléculas molde. No entanto, o método seleccionado depende sempre do sistema em estudo. Por exemplo, nos casos em que a molécula molde é fotoquímica ou termicamente instável os iniciadores que podem ser activados por estes factores não são adequados. Nos casos em que a complexação é conduzida por ligações de hidrogénio são preferíveis temperaturas de polimerização inferiores, pelo que, nessas circunstâncias, os iniciadores

fotoquimicamente activos são os mais adequados por serem eficientes a baixas temperaturas [22]. Na figura 1.13 apresentam-se alguns dos iniciadores utilizados.

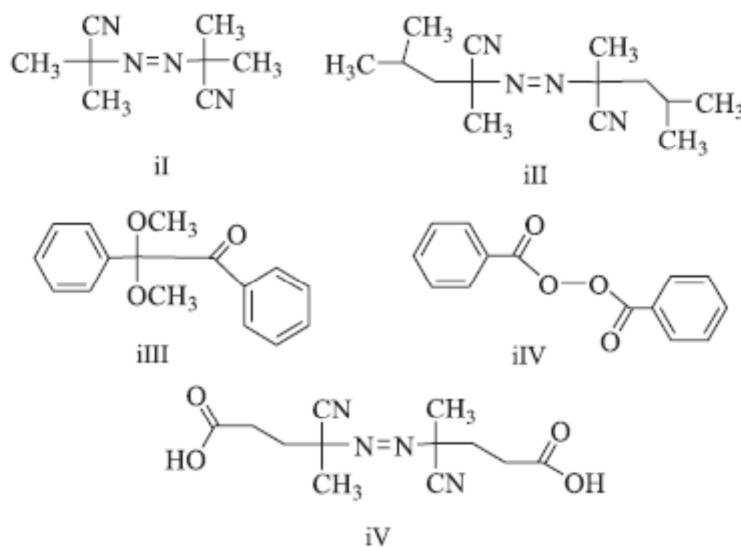


Figura 1.13. Iniciadores de polimerização habitualmente usados em moldagem molecular ii: azobisisobutironitrilo (AIBN); iii: azobisdimetilvaleronitrilo (ABDV); iii: dimetilacetato de benzilo; iV: benzoilperóxido (BPO); iV: ácido 4,4-azo (4-cianovalérico).

1.7. Sensores Ópticos

Os sensores ópticos e electroquímicos constituem as principais categorias de sensores utilizados para extrair informação química, sendo que a importância relativa dos sensores ópticos tem vindo a crescer nos últimos anos. Inicialmente, o uso destes sensores restringia-se à análise de espécies possuidoras de resposta colorimétrica ou de fluorescência intrínseca. No entanto, o aparecimento de novos reagentes, que alteram de forma reversível as suas propriedades ópticas ao interagir com o analito, tornou possível o alargamento do seu campo de aplicação a espécies sem propriedades ópticas mensuráveis de modo directo, como o pH, os metais pesados ou os gases [19].

Os sensores ópticos, ou *optodes* (de "*optical electrode*"), apresentam várias vantagens em relação aos sensores electroquímicos:

- Não requerem um sinal de referência;
- Não sofrem interferências eléctricas ou electromagnéticas;

- São facilmente miniaturizáveis, o que constitui uma vantagem em termos de concepção de dispositivos portáteis e também em situações em que se dispõe de volume reduzido de amostra, ou ainda para aplicações em química clínica;
- Podem transmitir mais informação em paralelo do que um sensor electroquímico; por exemplo, podem responder a mais do que um analito em simultâneo, usando vários reagentes imobilizados com resposta a diferentes comprimentos de onda.

Contudo também apresentam alguns inconvenientes:

- Sofrem interferência da luz exterior, o que obriga muitas vezes à modulação do sinal;
- Os reagentes utilizados são susceptíveis de sofrer fotodecomposição e lixiviação, o que prejudica o tempo de vida do sensor;
- O número de reacções reversíveis é limitado, o que obriga à regeneração dos sensores após cada medida;
- Apresentam um intervalo de resposta analítico limitado (exceptuando os de transdução fluorimétrica) em comparação com os sensores electroquímicos - tipicamente 10^2 , em oposição a 10^6 - 10^{12} para os eléctrodos selectivos a ião [19].

Apesar destas limitações, os sensores ópticos apresentam-se como potenciais alternativas a outros sistemas e têm sido largamente aplicados em várias áreas. Na indústria alimentar, os sensores ópticos representam uma alternativa vantajosa aos métodos analíticos clássicos aplicados no controlo de qualidade, englobando a cadeia produção/processamento/distribuição, já que podem ser facilmente integrados em sistemas automatizados e desenvolvidos como equipamentos portáteis simples. São extremamente úteis na identificação de potenciais fontes de contaminação e na detecção de espécies implicadas na segurança alimentar. De entre os sensores descritos para análise alimentar, aqueles que têm tido aplicação mais alargada são os destinados ao controlo de vinhos e outras bebidas [19], sendo de especial interesse os sensores sólidos. Uma das dificuldades em lidar com este tipo de sensores prende-se, porém, com a necessidade de associar um modelo matemático à monitorização da cor.

1.7.1. O sistema visual humano e a cor

Os seres humanos interagem de forma consciente com o universo que os rodeia através de mecanismos sensitivos, os cinco sentidos. O desenvolvimento dos órgãos sensoriais teve por base um processo evolutivo lento, que envolveu a sua

integração com o cérebro, capaz de processar e armazenar a informação. Se uma melhor consciência do meio circundante constituiu uma força motriz para o processo evolutivo, pode estabelecer-se um paralelismo com o esforço levado a cabo pelo Homem para criar dispositivos e equipamentos que o auxiliem na compreensão do mundo com o qual interage e a ultrapassar as suas próprias limitações sensoriais [19].

O olho humano e o seu funcionamento

O olho é o órgão do corpo que nos permite captar imagens do ambiente. É nele que se inicia o processo chamado de visão, processo esse que, no caso do ser humano, é responsável por mais de 90% das informações que somos capazes de recolher.

A capacidade de ver depende das acções de várias estruturas dentro e ao redor do globo ocular. A figura 1.14 ilustra muitas das componentes essenciais do sistema óptico humano.

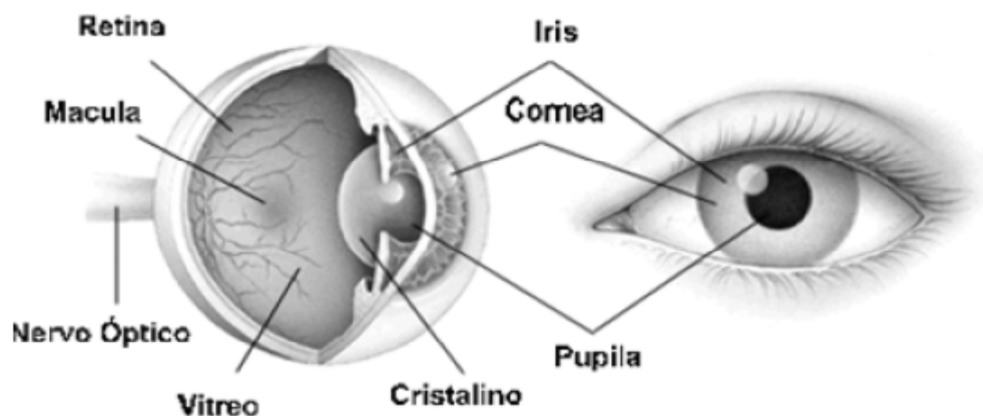


Figura 1.14. Anatomia de um olho.

Quando se olha para um objecto, são reflectidos raios de luz desse objecto para a córnea, lugar onde se inicia o “milagre” da visão. Os raios de luz são refractados e focados pela córnea, cristalino e vítreo. A função do cristalino é fazer com que esses raios sejam focados de forma nítida sobre a retina. A imagem daí resultante apresenta-se invertida na retina. Ao atingi-la, os raios de luz são convertidos em impulsos eléctricos que, através do nervo óptico, são transmitidos para o cérebro, onde a imagem é interpretada pelo córtex cerebral [23].

Cor e luz

O espectro de radiação electromagnética ocupa uma grande gama de frequências (ou comprimentos de onda) que se estende desde as baixas frequências das ondas de rádio às frequências muito altas correspondentes aos raios gama. O espectro electromagnético é habitualmente dividido em bandas segundo os efeitos ou o tipo de utilização de cada banda. A figura 1.15 apresenta algumas destas bandas em função do comprimento de onda.

O olhos são sensíveis à radiação electromagnética numa banda estreita de comprimentos de onda denominada espectro visível, pois estes órgãos interpretam como luz a radiação electromagnética dentro desta banda. Os limites do espectro visível variam consoante a espécie. A banda visível pelo olho humano situa-se entre 350 nm e 700 nm, mas estes limites variam de pessoa para pessoa [24].

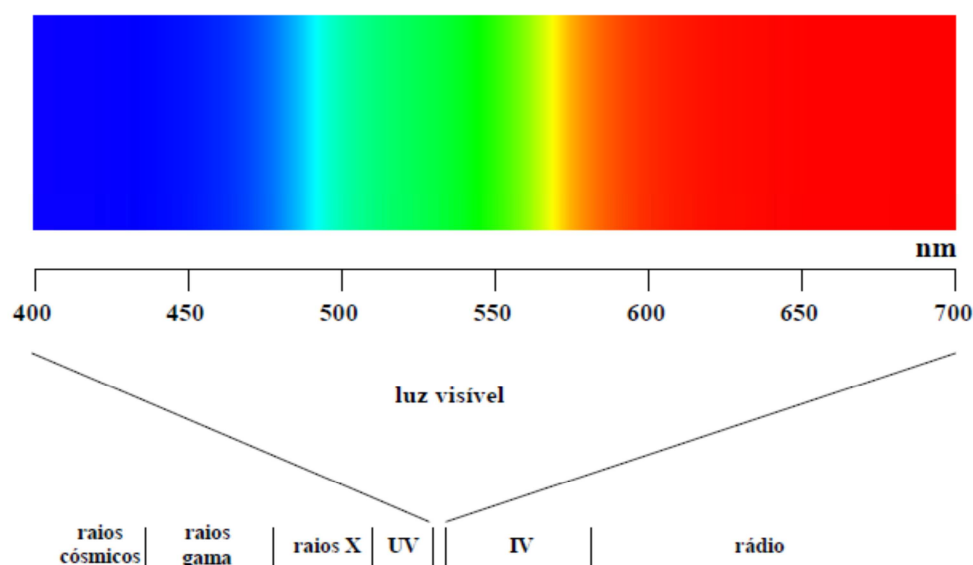


Figura 1.15. Espectro electromagnético mostrando as bandas de comprimento de onda principais e a banda correspondente à luz visível.

O ser humano interpreta os efeitos da absorção dos fotões como algo a que chama luz. A cor é essencialmente um conceito subjectivo próprio do ser humano e consiste na interpretação que o sistema sensorial e o cérebro atribuem aos diferentes comprimentos de onda da luz recebida ao interpretarem os estímulos nervosos provocados pela absorção dos fotões da radiação electromagnética com comprimento de onda compreendido entre 350 e 700 nm [24].

Embora a luz branca seja constituída por sete cores (vermelho, alaranjado, amarelo, verde, azul, anil e violeta), não é necessário combinar todas estas cores para se obter novamente luz branca. Basta misturar as chamadas cores primárias da luz (vermelho, verde e azul) para obter esse efeito. As cores primárias da luz, misturadas em determinadas proporções, originam outras cores, que se designam por cores secundárias (magenta, ciano e amarelo). Na realidade, da mistura de duas ou mais radiações primárias da luz, resulta uma nova radiação, de cor diferente das que lhe deu origem. Este processo designa-se de síntese aditiva, pois a radiação obtida resulta da soma das ondas das radiações iniciais [23].

Tal como se pode observar na figura 1.16, a mistura das 3 cores primárias, ou de uma secundária com a sua cor primária oposta, em intensidade correcta produz a luz branca. Pelo contrário, a mistura das cores secundárias com o seu primário oposto produz o preto.

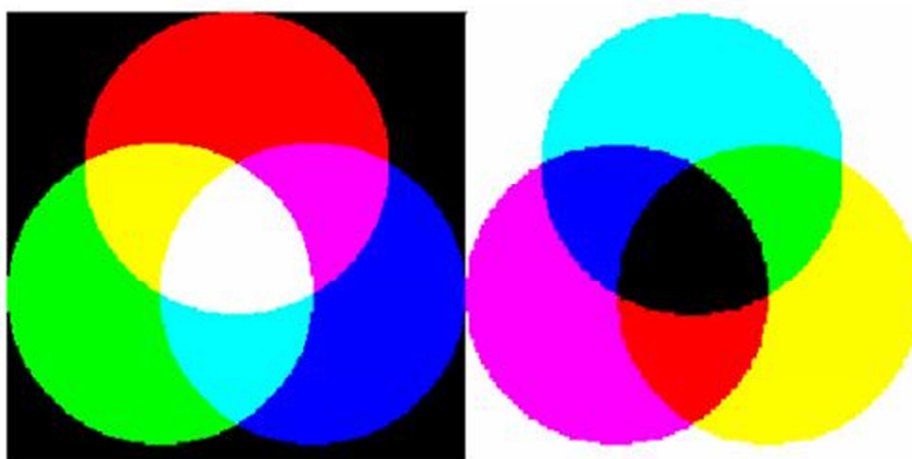


Figura 1.16. Representação das cores primárias (esquerda) e secundárias (direita) do sistema aditivo, onde as intersecções indicam a cor resultante da soma entre as cores dos círculos correspondentes.

1.7.2. Modelação da cor

A modelação da cor assume extrema importância pois a apresentação de imagens em dispositivos de saída gráfica (monitores, televisões, etc.) necessita de informação sobre a cor dos objectos. Os formatos intermédios têm então que guardar esta informação de uma forma coerente e precisa que introduza o menor número de erros ou falhas de precisão.

A teoria dos três estímulos indica que basta emitir três cores primárias que sejam detectáveis pelos três tipos de cones da retina para que se possam reproduzir todas as cores visíveis, variando simplesmente a proporção das quantidades de luz

emitida por cada uma das fontes primárias. Estas proporções seriam determinadas pelas curvas de resposta característica de cada um dos três tipos de cones. Então é imediato que qualquer modelo de cor deverá possuir três parâmetros. O problema essencial da modelação da cor está na definição de que grandezas devem ser associadas a cada um dos três parâmetros, o que tem originado o aparecimento de vários sistemas de cor [24].

O termo *cor* é o atributo mais estreitamente relacionado com o estímulo do comprimento de onda e pretende distinguir entre azul, verde, amarelo, etc. (Figura 1.17). Diferentes cores têm tonalidades diferentes [24].



Figura 1.17. Gama do espectro que corresponde ao visível.

A *saturação* da cor, por vezes denominada pureza da cor ou simplesmente saturação, indica o afastamento da cor observada de um cinzento com a mesma intensidade luminosa, isto é, indica a vivacidade da cor e o quanto de concentração de cor que o objecto contém. Quanto mais alta é a saturação, mais intensa é a cor.

Uma cor vermelha ou azul puras são cores altamente saturadas, enquanto um rosa e as cores denominadas de pastéis são cores pouco saturadas [24] (Figura 1.18).



Figura 1.18. Saturação: o azul-escuro à esquerda é altamente saturado enquanto o azul esbatido à direita tem baixa saturação.

A *luminosidade* é a intensidade da luz reflectida pela superfície dos objectos, enquanto o *brilho* é a quantidade de luz emitida pelas superfícies de objectos luminosos como o Sol ou uma lâmpada. Esta diferenciação não é exacta na língua portuguesa pois, por exemplo, é comum falar do brilho de um espelho que, na verdade, é um objecto reflector perfeito [24] (Figura 1.19).



Figura 1.19.Luminosidade.

1.7.3. Modelos de cores

Os modelos de cor foram criados de modo a uniformizar a forma como são especificadas as cores em formato digital, de modo a reproduzir com rigor a cor pretendida, quer seja pelo scanner, monitor ou impressora [25].

Um espaço de cor (ou *gamut*) é um modelo matemático usado para descrever cada cor a partir de fórmulas. O resultado deste tratamento gera uma representação geométrica, tridimensional, onde as cores podem ser visualizadas utilizando um determinado modelo de cor. Os espaços de cor gerados são diferentes e os mais conhecidos são: o RGB, o CMY (K), o HSB, o XYZ e o CIE Lab. Alguns modelos conseguem representar mais cores do que outros [26].

1.7.3.1. Modelo RGB

O modelo RGB é um modelo de cor concebido com base nos dispositivos de saída gráfica com três cores primárias: vermelho, verde e azul (Figura 1.20). A sigla RGB deriva da junção das primeiras letras dos nomes destas cores primárias em língua inglesa: Red, Green e Blue.

O modelo RGB descreve as cores como o resultado da adição das três cores primárias, cada uma delas com uma intensidade que pode variar entre 0 e 1. O valor 1 corresponde à intensidade máxima com que a cor pode ser apresentada no dispositivo gráfico e o valor 0 à intensidade mínima. A cor branca corresponde à representação simultânea das três cores primárias, todas à sua intensidade máxima, e a cor preta à cor que é obtida quando todas as cores primárias apresentam intensidade mínima (0). Este modelo está intimamente associado às superfícies emissoras de luz. É por esta razão que este modelo é quase universalmente empregue pelos equipamentos que manipulam a emissão de luz, tais como os monitores e os televisores a cores [24].

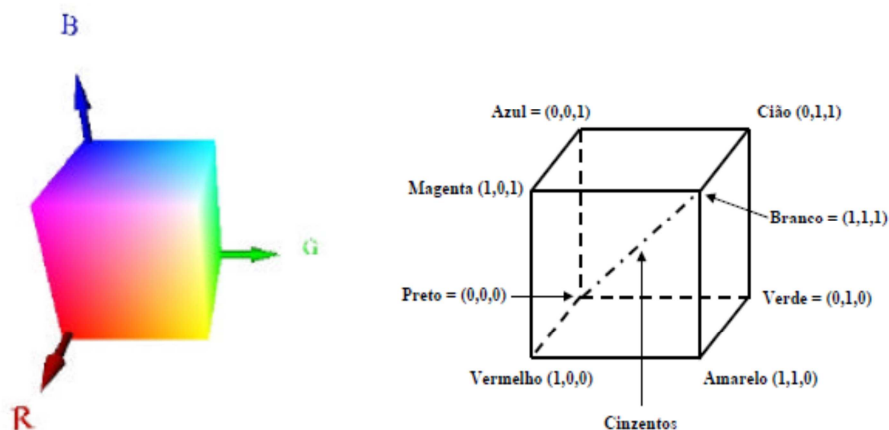


Figura 1.20. Representação do Espaço de Cor.

1.7.3.2. Modelo CMY (K)

O modelo CMY é um modelo de cor baseado nas cores complementares: ciano, magenta e amarelo (do inglês: *Cyanide*, *Magenta* e *Yellow*) (Figura 1.21). O modelo CMYK é constituído a partir deste acrescentado a cor K (preto).

Este modelo tem por base os fenómenos que se verificam quando a luz incide em superfícies. Estas podem absorver, reflectir ou refractar a luz de forma desigual consoante o comprimento de onda. Quando uma luz branca incide sobre uma superfície, existem gamas de comprimento de onda em que a luz é absorvida pela superfície. A luz correspondente às gamas de comprimento de onda não absorvidas é, em geral, reflectida. A nossa percepção visual da cor da superfície é dada pela cor dessa luz reflectida. Assim, quando a luz natural incide numa superfície que absorve os comprimentos de onda na zona do vermelho, a luz reflectida não terá quaisquer componentes nessa gama e será constituída por apenas verdes e azuis, ou seja, o olho humano detectará a superfície como sendo da cor ciano. Esta subtracção (por absorção) da luz em determinados comprimentos de onda é a razão pela qual o modelo CMY é também designado por modelo substractivo da cor, em oposição ao modelo RGB que é designado por modelo aditivo da cor. As cores ciano, magenta e amarelo são designadas por cores primárias complementares ou cores primárias substractivas dada a forma como resultam da subtracção do, respectivamente, vermelho, verde e azul à cor branca [24].

Este modelo utiliza-se em impressoras, fotocopiadoras, pintura e fotografia.

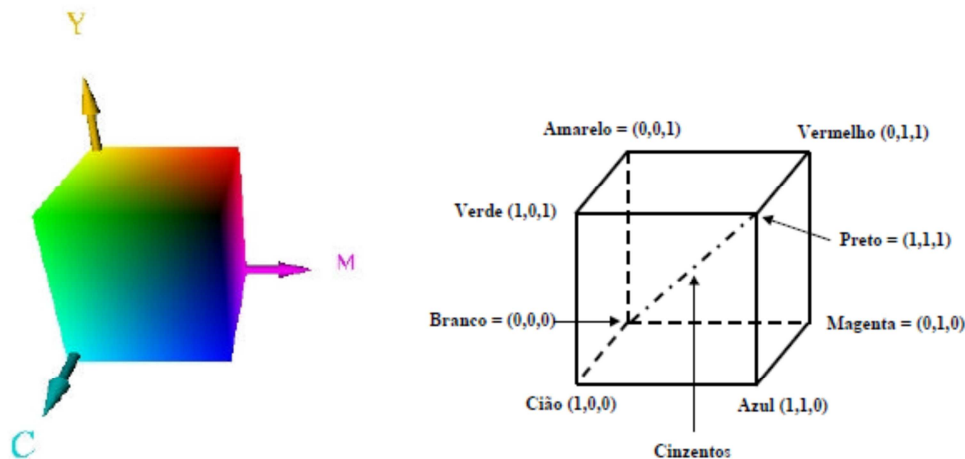


Figura 1.21. Espaço de cor CMY.

1.7.3.3. Modelo HSV

O modelo de cor HSV é mais intuitivo que os modelos RGB e CMY. A sua sigla é formada pela primeira letra das palavras de língua inglesa correspondentes às três variáveis do modelo: Hue (cor, matiz, cambiante de cor), Saturation (saturação) e Value (valor). Com estas variáveis, o modelo HSV aproxima-se muito do modelo intuitivo empregue em artes visuais que emprega os conceitos qualitativos de matiz, luz e tonalidade (HSB).

A representação do espaço de cor do modelo HSV pode ser facilmente compreendida a partir do cubo do modelo RGB. Colocando o ponto de vista sobre a linha contendo a diagonal principal do cubo RGB e orientando a visão na direcção da origem do espaço RGB, o cubo RGB apresentará uma secção diagonal onde, intercaladas e em planos diferentes, se encontram as cores primárias aditivas e as cores primárias subtractivas. A cor branca ocupará o centro (Figura 1.22).

A saturação de uma cor corresponde à quantidade de cor branca que a cor apresenta. Uma saturação de 1 significa que a cor é pura (está na periferia), enquanto uma saturação de 0 significa que a cor é totalmente branca e, neste caso, o valor do parâmetro H é irrelevante.

O parâmetro V (valor) corresponde à intensidade da cor e varia entre 0 (intensidade nula, ou seja, cor negra em que os valores de H e S são irrelevantes) e 1 (intensidade máxima). Naturalmente, os tons cinzentos encontram-se localizados sobre o eixo da pirâmide [24].

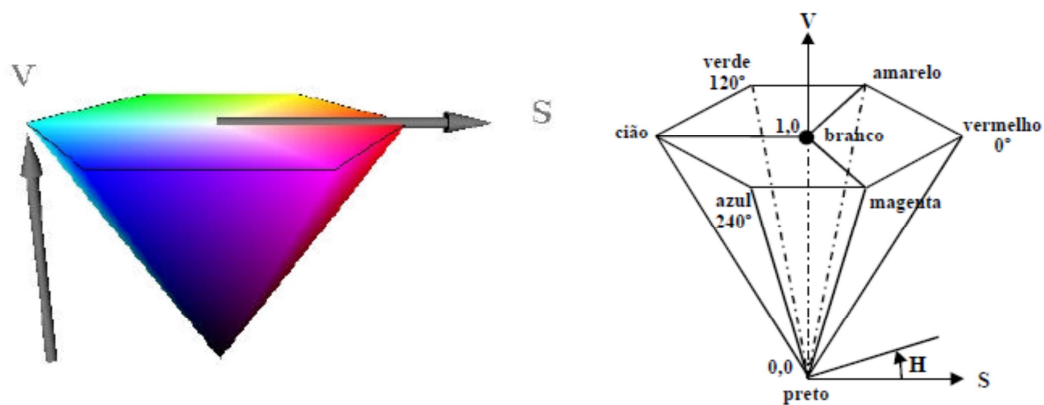


Figura 1.22. Espaço de cor HSV.

1.7.3.4. Modelo XYZ

O sistema XYZ de cores primárias da CIE (Comissão Internacional de Iluminação) descreve as cores através de 3 cores primárias virtuais X, Y e Z. Esse sistema foi criado devido à inexistência de um conjunto finito de cores primárias que produza todas as cores visíveis possíveis. Nesse sistema, as cores C_i podem ser expressas pela seguinte equação:

$$C_i = x.X + y.Y + z.Z$$

em que X, Y e Z especificam as quantidades das primárias padrões necessárias para descrever uma cor espectral. A normalização dessa quantidade em relação à luminância ($X+Y+Z$) possibilita a caracterização de qualquer cor. As cores desse sistema podem ser expressas como combinações das quantidades normalizadas abaixo:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad z = \frac{Z}{X+Y+Z}$$

com $x+y+z = 1$. Assim, qualquer cor pode ser definida apenas pelas quantidades de x e y que, por dependerem apenas do matiz e da saturação, são chamadas de coordenadas de cromaticidade. A descrição completa de uma cor é dada pelas coordenadas de cromaticidade e pelo valor de um dos 3 estímulos originais, normalmente do Y, que contém a informação de luminância. Essa descrição possibilita a obtenção das quantidades de X e Z com as equações abaixo:

$$X = \frac{x}{y} Y$$

$$Z = \frac{z}{y} Y$$

Onde $z = 1 - x - y$.

O sistema XYZ é formado por cores imaginárias que são definidas matematicamente. Nesse sistema, as combinações de valores negativos e outros problemas relacionados com a selecção de um conjunto de primárias reais são eliminados. As coordenadas de cromaticidade x e y permitem representar todas as cores num gráfico bidimensional. O traçado dos valores normalizados de x e y para as cores no espectro visível resulta na curva ilustrada na figura 1.23 [27].

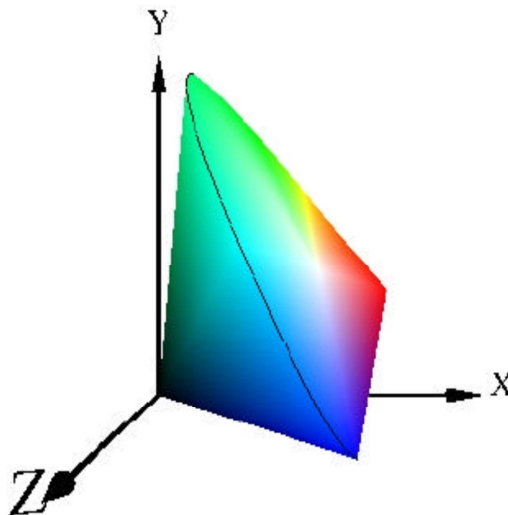


Figura 1.23. Espaço de cor CIE.

1.7.3.5. Modelo CIELab

O modelo de cor CIELab permite a especificação de percepção de cores em termos de um espaço tridimensional. A componente axial L é conhecida como luminosidade e estende-se de 0 (preto) a 100 (branco). As outras duas coordenadas são a* que se estende de -100 a +100 (passando do azul ao amarelo) e b* de -100 a +100 (variando do verde ao vermelho) (Figura 1.24). O espaço de cores CIE 1976 (L*a*b*) proporciona uma representação tridimensional para a percepção do estímulo de cores. Conforme aumenta a distância entre os dois pontos no espaço é razoável assumir que a diferença de cor percebida entre os estímulos representa aumentos

correspondentes. Uma medida da diferença na cor entre dois estímulos é, portanto, proporcional à distância Euclidiana entre os dois pontos no espaço tridimensional.

O modelo CIE Lab é um espaço de cor absoluto, isto é, define exactamente as cores, ao contrário, do RGB ou do CMYK, por exemplo, que dependem da recepção de luz ou tinta, respectivamente [27].

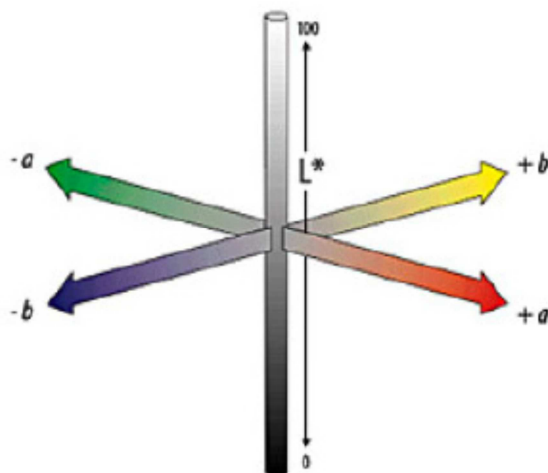


Figura 1.24. Modelo de cor CIE Lab.

Considerando os pressupostos anteriores, a avaliação da cor é complexa e pode ser efectuada com base em vários modelos. O seu emprego deve ser *moderado e adequado* aos fins em vista. Uma forma simples de monitorizar a cor nos sensores ópticos pressupõe a utilização de um sistema rápido, barato e simples, disponível em todos os laboratórios de análise, tais como os espaços RGB (ou o similar HSL) associados aos programas do Windows. Para este efeito torna-se necessário fotografar os resultados obtidos e adquirir as coordenadas da cor num qualquer software de manipulação de imagem.

Face ao exposto anteriormente, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de sensores potenciométricos e ópticos para a determinação de cobre em vinhos. Estas duas metodologias podem ser complementares e apresentam, ambas, a possibilidade de aplicação *in situ*, uma característica fundamental para acompanhar o processo de vinificação em tempo real.

2. Descrição Experimental

2.1. Considerações Gerais

O trabalho desenvolvido foi dividido em duas partes distintas, tendo início na construção e caracterização de eléctrodos de configuração convencional, selectivos a Cu^{2+} , procedendo-se, posteriormente, ao desenvolvimento e optimização das características de sensores ópticos sensíveis ao mesmo catião.

Este capítulo visa uma descrição dos aspectos experimentais envolvidos na construção e/ou desenvolvimento, na avaliação e na aplicação de ambos os métodos.

2.2. Material e equipamento

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 20,00 a 100,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 5,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas Gilson[®], modelos P20, P200, P1000 e P5000, de volume regulável. As pesagens foram realizadas numa balança Kern 770, com precisão igual a 0,00001g e uma Mettler Toledo, com precisão igual a 0,00001g.

Aquando da dissolução de substâncias sólidas, na tentativa de reduzir o tempo envolvido nesse processo, foi usado um banho de ultra-sons termostaticado, da marca Raypa, *ultrasonic cleaner*.

As diferenças de potencial foram medidas com um decimilivoltímetro Metrohm, 780 pH Meter (sensibilidade $\pm 0,1$ mV) (Figura 2.24), estabelecidas entre o eléctrodo indicador (Figura 2.25) e o eléctrodo de referência.



Figura 2.1. Potenciómetro da Metrohm 780 pH Meter.



Figura 2.2.Eléctrodos selectivos ao Cu^{2+} construídos.

2.3. Reagentes e soluções

A preparação das soluções aquosas foi realizada com água ultra-pura com uma condutividade igual ou inferior a $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Estas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes e algumas posteriormente diluídas em solução de ajuste de pH.

A Difenilcarbazida, o Tetrakis (4-clorofenil) borato (TpCIPB), o 2-nitrofeniloctil éter (oNFOE), o Poli(cloreto de vinilo) de alto peso molecular (PVC), o Etileno Glicol Dimetacrilato (EGDMA) e o Vinilimidazole foram comercializados pela Fluka. O Peróxido de Benzoílo (BPO), o Metanol, o Clorofórmio (CLF), o Tetrahydrofurano (THF), o ácido acético (AAc) e o Dietilditiocarbamato de Sódio foram produzidos pela Riedel-deHäen. A Neocuproína foi comercializada pela Sigma.

O Sulfato de Cobre utilizado foi comercializado pela Panreac Química Sau, o Poli (cloreto de vinilo) de alto peso molecular (PVC), o Bis (2-ethylhexyl) sebacato e a Difenilcarbazida pela Fluka. A Neocuproína foi produzida pela Sigma e o Dietilditiocarbamato de Sódio e o Tetrahydrofurano (THF) pela Riedel-deHäen.

2.4. Preparação dos eléctrodos

A capacidade de detecção dos eléctrodos para um determinado ião está na sua membrana sensora, a qual é constituída por um sensor (MIP). A preparação de ambos é simples e relativamente rápida.

2.4.1. Preparação dos sensores

Para preparar os MIP, que constituem a membrana sensora dos eléctrodos, colocou-se o ião molde (Cu^{2+} ; 0,5 mmol) num frasco de vidro juntamente com o monómero funcional (Vinilimidazole; 2,0 mmol), o agente de ligação cruzada (EDGMA; 20,0 mmol) e o iniciador (BPO; 0,070 mmol). Esta mistura foi dissolvida em 3,0 mL de metanol ou clorofórmio, que actuaram como solventes porogénicos, e colocada num banho de ultra-sons termostaticado para ajudar a sua dissolução, quando necessário. Em seguida foi desgaseificada com nitrogénio durante 5 minutos e maturada a 70 °C durante 30 minutos. O polímero sem impressão molecular (NIP) foi preparado de forma semelhante excluindo o ião molde do procedimento.

Todos os polímeros foram reduzidos a partículas entre 50 e 150 nm e lavados posteriormente com uma solução de CLF/AAC (3:1 v/v), para a extracção do analito. Todos os polímeros (MIP/MeOH, NIP/MeOH, MIP/CLF, NIP/CLF) foram secos a 60 °C na estufa, até obtenção de peso constante.

Posteriormente prepararam-se novos MIP, cuja diferença se encontrava na molécula molde, constituída por um complexo de Cu^{2+} ·DFC na proporção de 1:2.

2.4.2. Preparação das membranas sensoras

As membranas foram obtidas misturando PVC, solvente mediador (oNFOE) e sensor em determinadas quantidades (Tabela 2.1). Em alguns casos foi adicionado TpCIPB como aditivo, o qual favorece as ligações. A mistura foi agitada até o PVC estar dissolvido em cerca de 3,5 mL THF.

Tabela 2.1. Quantidade de reagentes utilizada na preparação de cada membrana.

ESI	Composição Sensor	Quantidade Sensor (mg)	Solvente Mediador (mg)	Aditivo (mg)	PVC (mg)
I	MIP (MeOH)	23	366	-	186
II	MIP (MeOH)	22,5	354	5,8	174
III	NIP (MeOH)	23	366	-	186
IV	MIP (CHCl_3)	23	366	-	186
V	MIP (CHCl_3)	22,5	354	5,8	174
VI	NIP (CHCl_3)	23	366	-	186
VII	MIP/DFC (MeOH)	23	366	-	186
VIII	MIP/DFC (MeOH)	22,5	354	5,8	174
IX	NIP/DFC (MeOH)	23	366	-	186
X	MIP/DFC (CHCl_3)	23	366	-	186
XI	MIP/DFC (CHCl_3)	22,5	354	5,8	174
XII	NIP/DFC (CHCl_3)	23	366	-	186

As membranas preparadas foram aplicadas directamente sobre a superfície condutora dos eléctrodos (Figura 2.27), a qual foi previamente desgastada e alisada até ao aparecimento de uma cavidade com cerca de 1 a 2 mm de profundidade. Cada uma das aplicações foi efectuada após a película aplicada anteriormente ter evaporado totalmente. Uma vez terminada a deposição, as membranas foram secas à temperatura ambiente, durante 24h, e posteriormente condicionadas em solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu^{2+} . Era também nesta solução que os eléctrodos eram mantidos quando não estavam a ser utilizados.

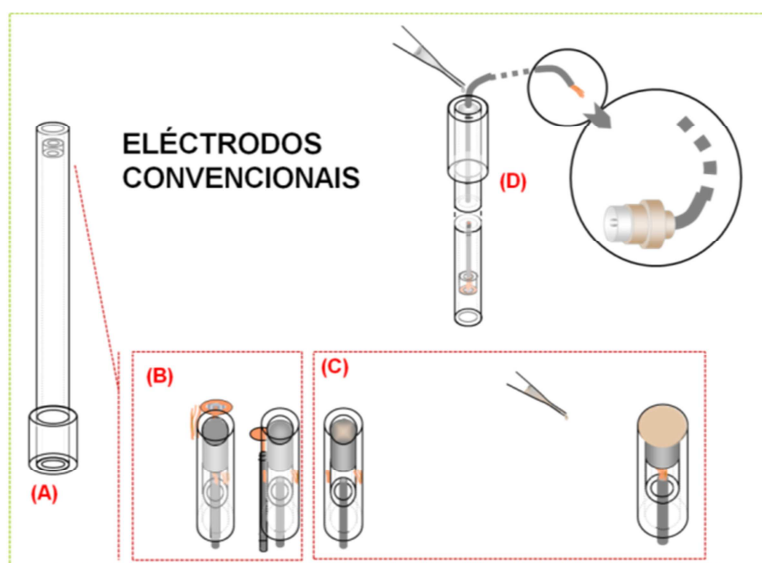


Figura 2.3. (A) Suporte dos eléctrodos em Perspex®; (B) Ligação de fio eléctrico à placa de cobre; (C) Preenchimento da cavidade com suporte condutor de grafite e aplicação da membrana sensora; (D) Fixação do fio condutor e ligação de terminal.

2.5. Avaliação dos eléctrodos

O procedimento experimental de calibração de eléctrodos selectivos teve por base o método da adição da quantidade conhecida. Para o efeito, os eléctrodos selectivos de ião e o electrodo de referência foram mergulhados num volume, rigorosamente conhecido, de solução, que se encontrava em agitação constante. De acordo com o ensaio pretendido, esta solução era constituída por ajustador de pH e/ou força iónica ou apenas por água desionizada. A esta solução adicionaram-se volumes crescentes de uma solução padrão de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. O valor de concentração de ião principal no interior do vaso era calculado tendo em conta o efeito de diluição proveniente das adições efectuadas. A leitura do sinal analítico correspondente a cada valor de concentração era efectuada quando ocorria a estabilização do potencial da

célula de eléctrodo selectivo, isto é, quando a variação de potencial não ultrapassava $\pm 0,1$ mV.

Para avaliar as características gerais de funcionamento destes eléctrodos foi efectuado o traçado de várias curvas de calibração com os valores obtidos experimentalmente, nas quais se representa a variação dos valores de ΔE (mV), fornecidos pela célula potenciométrica, em função do logaritmo da concentração de Cu^{2+} . Esse traçado foi realizado utilizando o programa de computador, Microsoft Excel 2007 e os parâmetros das curvas de calibração avaliados foram o LIRL, o LD e o declive. Estes foram calculados com base no traçado de, pelo menos, três curvas de calibração consecutivas ou intercaladas. Os valores de tempo de resposta foram também estimados a partir destas curvas.

2.6. Preparação e desenvolvimento dos sensores ópticos

Os sensores ópticos são constituídos por uma membrana sensível ao composto a determinar, a qual é formada por um reagente de imobilização, um solvente mediador e um reagente que garanta a formação de cor na presença do composto a ser detectado.

As membranas sensoras foram inicialmente preparadas com 0,050 g de PVC, 0,10 g de solvente mediador (Bis (2-ethylhexyl) sebacate) e 0,050 g de agente complexante. A mistura foi agitada até o PVC se encontrar dissolvido em cerca de 2 mL de THF. O sensor óptico foi obtido por deposição de 40 μL de solução de membrana sensora na cavidade de uma placa de cerâmica com 12 poços e posterior secagem, na *hotte*, para evaporação do THF.

A reacção de complexação foi efectuada por deposição de 40 μL de uma solução com concentrações variáveis de cobre, com um determinado valor de pH, na membrana sensora depositada na placa. A gama de concentrações de Cu^{2+} utilizada estava compreendida entre $1,0 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} .

2.6.1. Optimização da composição da membrana dos sensores

2.6.1.1. Selecção do agente complexante

Para encontrar o melhor reagente de complexação a utilizar no sensor, prepararam-se soluções de vários reagentes que complexam com o catião em estudo e verificou-se se estes originavam cor após adição de uma solução de cobre de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} . Os reagentes testados foram: Neocuproína,

Difenilcarbazida, Dietilditiocarbamato de Sódio, Trietilamina e α – Benzoinoxim (Cupron).

A escolha do reagente que ofereceu melhores condições de complexação com o Cu^{2+} foi feita com base na intensidade da cor formada e na estabilidade da solução. Assim, foram escolhidos três reagentes: a Difenilcarbazida, a Neocuproína e o Dietilditiocarbamato de Sódio.

2.6.1.2. Seleção da quantidade de agente complexante

Prepararam-se várias membranas de PVC de igual modo ao descrito anteriormente, com base em quantidades variáveis dos agentes complexantes. As quantidades de reagente estudadas individualmente foram de 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g e de 0,01 g.

2.6.1.3. Seleção da quantidade de solvente mediador

O procedimento foi realizado de igual modo ao descrito nos pontos anteriores, com base em quantidades variáveis de solvente mediador. As quantidades de solvente estudadas foram de 0,12 g, 0,10 g, 0,08 g; 0,06 g e de 0,04 g.

2.6.1.4. Seleção da quantidade de reagente de suporte

O procedimento foi semelhante aos já descritos, com base em quantidades variáveis do reagente de suporte ou imobilização (PVC). As quantidades de reagente estudadas foram de 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g; 0,02 g e de 0,01 g.

2.6.2. Estudo do efeito do pH

Relativamente ao efeito do pH foram testados os valores de pH 5 (favorável à formação dos complexos de Cu^{2+}) e 3 (pH próximo do vinho).

2.7. Avaliação dos sensores ópticos

Os resultados obtidos foram fotografados e manipulados pelo programa PAIN'T do Windows utilizando-se as coordenadas Tonalidade, Saturação e Luminosidade (espaço HSL). Os valores destas coordenadas foram sujeitos a tratamento matemático e representados graficamente em função da concentração de Cu^{2+} , utilizando o programa de computador, Microsoft Excel 2007. Os resultados obtidos e apresentados ao longo deste documento corresponderam à média de, pelo menos, três leituras em cada sensor.

3. Resultados Experimentais e Discussão

3.1. Sensores potenciométricos

A avaliação das características gerais de funcionamento dos eléctrodos preparados foi efectuada através do traçado das respectivas curvas de calibração ao longo do intervalo de concentrações de $4,00 \times 10^{-6}$ a $1,65 \times 10^{-3}$ M, em soluções sem e com ajuste de pH através de uma solução tampão. Seguidamente, procede-se à avaliação e à discussão dessas características.

Numa fase inicial, a solução de volume rigoroso (50,00 mL) na qual os eléctrodos foram mergulhados era apenas água desionizada. Após a estabilização do potenciómetro, foram-se adicionando pequenos volumes de uma solução de cobre de concentração conhecida (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Volume de solução de cobre adicionado.

Concentração solução Cu^{2+} (mol L^{-1})	Volume adicionado (μL)
1×10^{-2}	0
	20
	20
	40
	70
	100
	200
	350
	600
	1000
	2500
	5000

À medida que a solução era adicionada, liam-se os potenciais dos vários eléctrodos em estudo até estabilização de ± 1 mV. Estes valores foram submetidos ao tratamento matemático referido anteriormente, obtendo-se assim os valores de declive, LIRL e LD para cada eléctrodo (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Resultados obtidos usando uma solução de água desionizada como solução inicial à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de Cu^{2+} , $1,0 \times 10^{-2}$ M.

ESI	Composição Sensor	LD (mol L ⁻¹)	LIRL (mol L ⁻¹)	Declive (mV década ⁻¹)	r ²	t resposta (s)
I	MIP/MeOH	4,97E-05	2,99E-05	28,000	> 0,9923	< 15
II	MIP/MeOH+aditivo	6,61E-05	6,61E-05	10,314	> 0,9766	< 15
III	NIP/MeOH	2,99E-05	1,60E-05	2,8598	> 0,9066	< 15
IV	MIP/CLF	2,99E-05	1,60E-05	12,058	> 0,8958	< 15
V	MIP/CLF+aditivo	4,97E-05	2,99E-05	11,003	> 0,9900	< 15
VI	NIP/CLF	4,97E-05	2,99E-05	33,147	> 0,9672	< 15

De um modo geral, os valores obtidos de LIRL e LD foram semelhantes em todos os eléctrodos, e suficiente baixos para o objectivo proposto. Contudo, apenas dois tipos de eléctrodos apresentaram valores de declive próximos do esperado para um catião bivalente (≈ 30 mV década⁻¹).

Numa tentativa de ultrapassar este problema substituiu-se a solução de água desionizada por uma solução tampão de pH próximo de 5. Por um lado, a ausência de hidróxidos de cobre é fundamental para que os iões de cobre estejam disponíveis em solução, e por outro é este o valor de pH óptimo de formação do complexo DFC: Cu^{2+} , implícito nos eléctrodos VII a XII. Para este efeito, preparou-se uma solução de HEPES de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Neste ensaio usaram-se todos os eléctrodos existentes. Os resultados obtidos encontram-se indicados na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Resultados obtidos usando uma solução tampão de HEPES (pH 5,18) como solução inicial à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ M.

ESI	Composição Sensor	LD (mol L ⁻¹)	LIRL (mol L ⁻¹)	Declive (mV década ⁻¹)	r ²	t resposta (s)
I	MIP/MeOH	1,57E-04	1,57E-04	-1,2153	> 0,9682	< 15
II	MIP/MeOH+aditivo	4,97E-05	2,99E-05	-1,3853	> 0,8727	< 15
III	NIP/MeOH	-	-	-	-	-
IV	MIP/CLF	2,99E-05	1,60E-05	-6,9124	> 0,9538	< 15
V	MIP/CLF+aditivo	4,58E-04	8,92E-04	3,8182	> 0,9944	< 15
VI	NIP/CLF	4,97E-05	2,99E-05	-0,9518	> 0,7293	< 15
VII	MIP/DFC	4,58E-04	8,92E-04	2,7487	> 0,9000	< 15
VIII	MIP/DFC+aditivo	-	-	-3,2564	> 0,9367	< 15
IX	NIP/DFC	4,97E-05	2,99E-05	-1,9519	> 0,8521	< 15
X	MIP/DFC	4,97E-05	1,60E-05	10,3430	> 0,9533	< 15
XI	MIP/DFC+aditivo	2,72E-04	4,58E-04	5,9995	> 0,9913	< 15
XII	NIP/DFC	2,99E-05	1,60E-05	14,7600	> 0,9959	< 15

Nota: o eléctrodo III não foi utilizado neste ensaio por mau funcionamento.

De uma forma geral, o comportamento dos eléctrodos indicou uma interferência grave de um anião, provavelmente o contra-íão adicionado com o catião de cobre, aquando da adição de solução mãe ao meio ensaiado. A formação de hidróxidos de cobre, que não está completamente excluída a pH 5, não justifica o comportamento observado. Em virtude da sua composição, o tampão também não deve ter exercido uma influência significativa neste contexto. No entanto, não descurando esta possibilidade, foram testados alguns dos eléctrodos em tampão MES ao mesmo valor de pH (Tabela 3.4).

Comparativamente aos resultados obtidos em meio HEPES, o tampão MES não promoveu alterações significativas nos valores de LIRL e de LD observados. Porém, de uma forma geral, as curvas obtidas foram muito diferentes das teoricamente previstas, não apresentando comportamento linear ao longo do intervalo de pH estudado.

Tabela 3.4. Resultados obtidos usando solução tampão de MES (pH 4,45) como solução inicial á qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ M.

ESI	Composição Sensor	LD (mol L ⁻¹)	LIRL (mol L ⁻¹)	Declive (mV década ⁻¹)	r ²	t resposta (s)
II	MIP/MeOH+aditivo	4,97E-05	8,92E-05	-4,2176	> 0,9872	< 15
IV	MIP/CLF	2,99E-05	2,51E-05	-15,5460	> 0,9723	< 15
VIII	MIP/DFC+aditivo	8,92E-05	6,31E-05	-5,8109	> 0,9732	< 15
X	MIP/DFC	1,57E-04	2,72E-04	2,0153	> 0,7879	< 15
XI	MIP/DFC+aditivo	4,97E-05	2,99E-05	7,1614	> 0,9885	< 15

A título de exemplo, comparam-se na figura 3.1 três curvas de calibração testadas nos diferentes meios considerados. Tal como se pode observar, apenas a água desionizada originou um comportamento próximo ao valor teórico esperado. Para os demais eléctrodos, o potencial poderia baixar (comportamento típico de um anião) ou permanecer quase invariável. Os resultados obtidos estavam, seguramente, associados ao meio iónico presente, que, de alguma forma, impedia a disponibilização do íão cobre para as membranas selectivas dos eléctrodos.

Neste sentido, optou-se pela preparação de um novo sistema sensor, que não dependesse exclusivamente da espécie Cu^{2+} . A leitura de uma espécie iónica de carácter inorgânico pode ser realizada indirectamente através de um seu complexo, desde que este seja estável e apresente carga positiva ou negativa. Para este efeito, substitui-se a solução de cobre inicialmente usada por uma solução de complexo

DFC:Cu²⁺ de concentração 1,0x10⁻² mol L⁻¹. Neste caso, utilizou-se a solução de HEPES, uma vez que este tinha originado eléctrodos com potenciais mais estáveis do que o tampão MES. Os resultados encontram-se indicados na tabela 3.5.

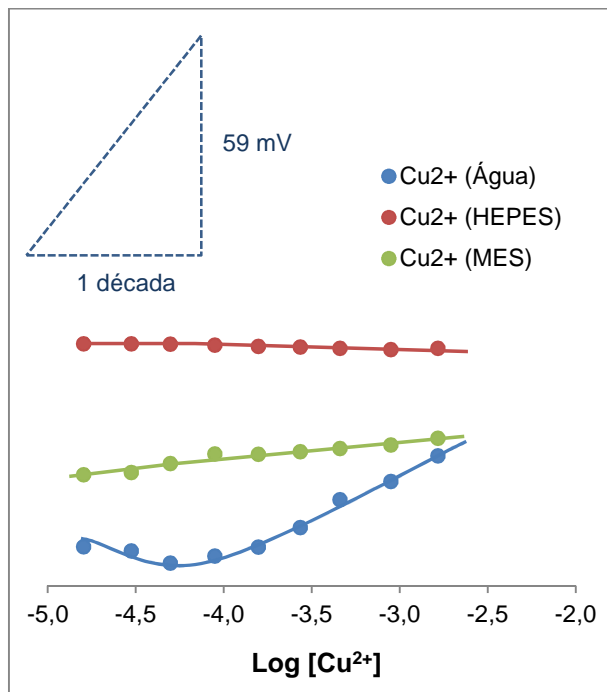


Figura 3.1. Curvas obtidas para as soluções de água, MES e HEPES às quais se adicionou uma solução de cobre de concentração 1,0x10⁻² M.

Tabela 3.5. Resultados obtidos usando solução tampão de HEPES (pH 5,18) como solução inicial à qual se adicionaram pequenos volumes de uma solução de DFC:Cu²⁺ 1,0x10⁻² M.

ESI	Composição Sensor	LD (mol L ⁻¹)	LIRL (mol L ⁻¹)	Declive (mV década ⁻¹)	r ²	t resposta (s)
I	MIP/MeOH	8,92E-05	6,31E-05	-23,179	> 0,9735	< 15
II	MIP/MeOH+aditivo	-	-	-	-	-
III	NIP/MeOH	-	-	-	-	-
IV	MIP/CLF	2,51E-05	3,16E-05	-39,917	> 0,9892	< 15
V	MIP/CLF+aditivo	4,97E-05	2,99E-05	-31,227	> 0,9955	< 15
VI	NIP/CLF	2,99E-05	2,51E-05	-15,927	> 0,9861	< 15
VII	MIP/DFC	2,99E-05	1,60E-05	-7,7523	> 0,9599	< 15
VIII	MIP/DFC+aditivo	-	-	-	-	-
IX	NIP/DFC	4,97E-05	2,99E-05	-8,3034	> 0,9711	< 15
X	MIP/DFC	2,99E-05	1,60E-05	-10,1510	> 0,9839	< 15
XI	MIP/DFC+aditivo	-	-	-	-	-
XII	NIP/DFC	4,97E-05	3,16E-05	-22,0380	> 0,9969	< 15

No presente ensaio, foi possível verificar que grande parte dos declives tomou valores negativos apesar de terem aumentado em valor absoluto. Estes resultados estariam provavelmente relacionados com a carga do complexo final. Assim, os valores obtidos sugerem que este terá carga negativa, o que terá como consequência a mudança do sinal do declive da curva (Figura 3.2). Note-se que os eléctrodos III e VIII não foram utilizados neste ensaio por não apresentarem condições de operacionalidade (não relacionadas com a variável em estudo) e os eléctrodos II e XI estavam muito instáveis por questões de ruído eléctrico (também não relacionados com a variável em estudo).

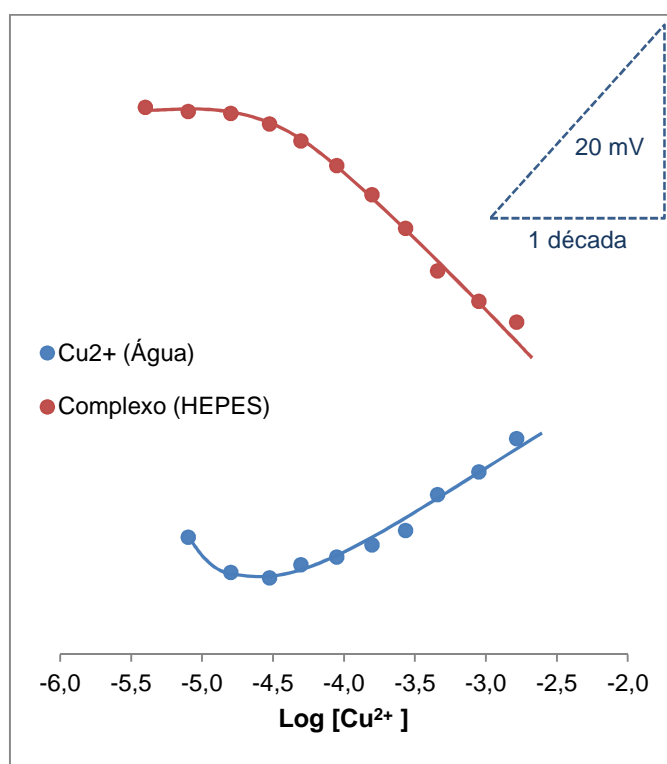


Figura 3.2. Curvas obtidas para as soluções de água e HEPES às quais se adicionou uma solução de cobre de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ M e uma solução de DFC: Cu^{2+} de igual concentração.

Face aos resultados obtidos, optou-se pela repetição destes ensaios com novas unidades potenciométricas. Para este efeito, prepararam-se e aplicaram-se novas membranas e realizaram-se ensaios usando a solução de complexo DFC: Cu^{2+} 1×10^{-2} M em meio HEPES. Os resultados obtidos foram indicados na tabela 3.6 e confirmam a prevalência de declives negativos, com excepção das unidades que continham aditivo na sua membrana (Figura 3.3). O aditivo carregado condicionou, tal

como previsto, a resposta do eléctrodo a espécies de carga contrária. Nalguns eléctrodos não foi possível retirar informação alguma devido à instabilidade eléctrica verificada.

Tabela 3.6 Resultados obtidos usando uma solução tampão de HEPES (pH 5,18) como solução inicial e adicionando pequenos volumes de uma solução de DFC:Cu²⁺ 1,0x10⁻² M.

ESI	Composição Sensor	LD (mol L ⁻¹)	LIRL (mol L ⁻¹)	Declive (mV década ⁻¹)	r ²	t resposta (s)
I	MIP/MeOH	4,97E-05	2,99E-05	-28,393	> 0,9900	< 15
II	MIP/MeOH+aditivo	1,60E-05	1,00E-05	36,976	> 0,9824	< 15
III	NIP/MeOH	-	-	-	-	< 15
IV	MIP/CLF	2,99E-05	1,58E-05	-20,495	> 0,9654	< 15
V	MIP/CLF+aditivo	4,97E-05	1,60E-05	20,409	> 0,0977	< 15
VI	NIP/CLF	4,97E-05	2,99E-05	-24,721	> 0,9841	< 15
VII	MIP/DFC	4,97E-05	2,99E-05	-24,951	> 0,9788	< 15
VIII	MIP/DFC+aditivo	8,92E-05	4,58E-04	6,087	> 0,8889	< 15
IX	NIP/DFC	-	-	-9,757	> 0,9923	< 15
X	MIP/DFC	4,97E-05	2,99E-05	-18,369	> 0,9899	< 15
XI	MIP/DFC+aditivo	-	-	-	-	< 15
XII	NIP/DFC	4,97E-05	2,99E-05	-30,365	> 0,9959	< 15

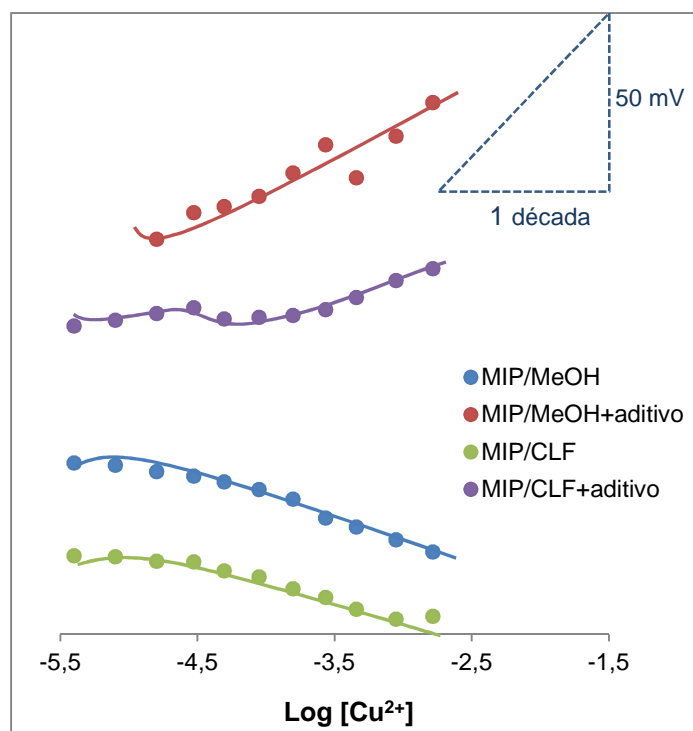


Figura 3.3. Representação das curvas obtidas para os eléctrodos com membranas constituídas apenas por cobre com e sem aditivo.

Perante todos resultados obtidos, pensou-se que a existência de um sensor potenciométrico adequado requereria muitos estudos adicionais, no sentido de se esclarecer as constantes de estabilidade e as cargas iónicas de complexos de cobre com diversos agentes de transferência de carga e a sua possível integração sensorial numa impressão iónica adequada. Neste sentido, optou-se por avançar para a preparação de um sensor óptico, cuja aplicação prática típica ao longo dos tempos permite concretizar o objectivo proposto de um modo mais simples e eficaz.

3.2. Sensores ópticos

Nesta secção apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos no desenvolvimento de sensores ópticos para monitorização de cobre em vinhos verdes. Estes sensores apresentam um reagente capaz de formar um complexo corado com o catião em estudo. Assim, os estudos efectuados começaram pela selecção desse mesmo reagente, prosseguindo com a caracterização e selecção das condições mais adequadas à sua formação no sentido de permitir a sua aplicação em análise quantitativa baseada em curvas de calibração.

3.2.1. Selecção do agente complexante

O cobre pode formar complexos corados com várias espécies, permitindo assim a sua identificação visual. O tipo e intensidade de cor formada dependem, entre outros, do reagente utilizado e do pH/constituição do meio. Neste estudo, optou-se por averiguar vários reagentes, nomeadamente a Neocuproína, a Difenilcarbazida, o Dietilditiocarbamato de Sódio, a Trietilamina e o α – Benzoinoxim (Cupron), no sentido de seleccionar aquele que se revelou capaz de formar um complexo de coloração mais intensa.

Os resultados foram obtidos por mistura de 2 mL de solução de metal 1×10^{-2} M com 2 mL da solução reagente de igual concentração. Na tabela 3.7, encontram-se os resultados relativos a este estudo.

Tabela 3.7. Resultados gerais de complexação entre o cobre e vários agentes complexantes.

Formação de complexo	Reagente	Especificação da cor	Complexo formado
✓	NC	Amarelo claro	
✓	DFC	Rosa escuro	
✓	DDC	Amarelo-torrado	
X	Trietilamina	Azul ténue	-
X	α – Benzoinoxim (Cupron)	Verde-claro	-

Os resultados mostraram que todos os reagentes foram capazes de formar complexos corados com o Cu^{2+} , mas nem todos se revelaram com características que permitissem a sua incorporação em sensores ópticos.

A neocuproína formou um complexo amarelado e a difenilcarbazida originou um complexo rosa escuro quando a solução de cobre Ihe foi adicionada (tabela 3.7), verificando-se porém o aparecimento de um ligeiro precipitado. De forma a evitar esta precipitação, experimentou-se ainda a mistura de soluções de difenilcarbazida e de cobre em proporções inversas. As proporções testadas de DFC: Cu^{2+} foram 1:2 e 2:1, tendo-se verificado que esta última minimiza o aparecimento de precipitado. O dietilditiocarbamato de sódio formou um complexo amarelo-torrado com o cobre (tabela 3.7). Contudo, a solução de reagente complexante teve de ser diluída, uma vez que esta também tendia a precipitar com a solução de cobre.





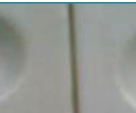













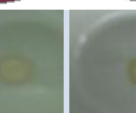


Os restantes agentes complexantes deram origem a colorações muito ténues que não permitiriam a sua aplicação analítica com base em comparação visual. A trietilamina reagiu com o cobre originando uma solução de cor azul muito ténue. O α – Benzoinoxim (Cupron), dissolvido em etanol por não ser solúvel em água, originou um complexo com o cobre muito ténue em tons de verde.

Perante os resultados obtidos escolheram-se os reagentes que apresentaram cores mais intensas para facilitar a sua utilização e identificação, sendo eles: a neocuproína, a difenilcarbazida e o dietilditiocarbamato de sódio.

Posteriormente, realizou-se um estudo quantitativo com o objectivo de averiguar se cada um dos reagentes escolhidos reagia a variações de concentração. Para tal utilizaram-se várias soluções padrão de cobre de concentrações

compreendidas entre $5,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ M (Tabela 3.8). Os resultados obtidos permitiram concluir que cada um dos três reagentes era capaz de desenvolver um gradiente de cor que variava com o aumento da concentração de cobre.

Tabela 3.8. Gradiente de cor dos vários reagentes com o aumento da concentração de cobre.

Componentes	Branco	$1,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-3} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-3} \text{M}$
NC							
DFC							
DDC							

3.2.2. *Optimização da composição da membrana dos sensores*

3.2.2.1. *Seleção da quantidade de agente complexante*

A quantidade de agente complexante na membrana influencia a extensão da complexação e, conseqüentemente, a cor obtida. Assim, testaram-se várias quantidades dos diferentes agentes de complexação com o intuito de descobrir a quantidade óptima de cada um deles para a preparação do sensor.

Cada membrana foi preparada com 0,05 g de PVC, 0,10 g de sebacato e quantidades decrescentes do agente de complexação, como indicado na tabela 3.9. As membranas preparadas com NC e DDC apresentaram uma coloração menos intensa ou mesmo ausente, relativamente àquelas preparadas com DFC. Posteriormente, adicionou-se 40 μL de cada uma das soluções padrão de cobre às várias membranas, obtendo os resultados indicados nas tabelas 3.10 A, B e C.

Tabela 3.9. Quantidades dos vários reagentes, entre os quais o agente complexante, utilizados na preparação da membrana sensora.

Componentes	Sensor				
	1	2	3	4	5
NC (g)	0,0501	0,0403	0,0300	0,0200	0,0100
PVC (g)	0,0502	0,0500	0,0503	0,0501	0,0503
Sebacato (g)	0,1038	0,1044	0,1044	0,1096	0,1115
THF (mL)	2	2	2	2	2
DFC (g)	0,0503	0,0403	0,0304	0,0200	0,0102
PVC (g)	0,0505	0,0504	0,0501	0,0500	0,0504
Sebacato (g)	0,1107	0,1008	0,1005	0,1024	0,1044
THF (mL)	2	2	2	2	2
DDC (g)	0,0501	0,0401	0,0302	0,0203	0,0100
PVC (g)	0,0500	0,0500	0,0501	0,0500	0,0548
Sebacato (g)	0,1059	0,1120	0,1099	0,1074	0,1032
THF (mL)	2	2	2	2	2

Tabela 3.10-A. Resultados obtidos com as várias quantidades de NC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-3} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-3} \text{M}$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							

Tabela 3.10-B. Resultados obtidos com as várias quantidades de DFC.








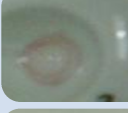






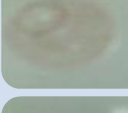
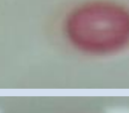
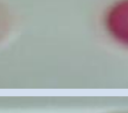
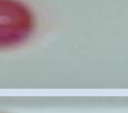
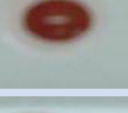
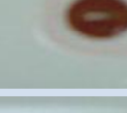
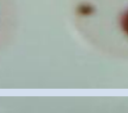

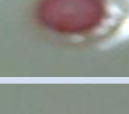
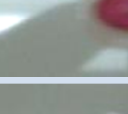
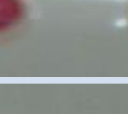
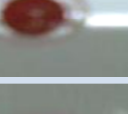
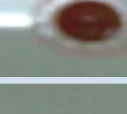
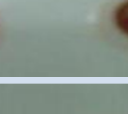

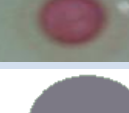












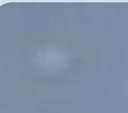






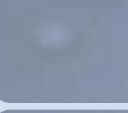

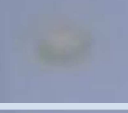

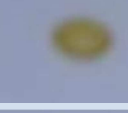

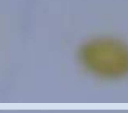


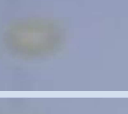





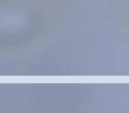









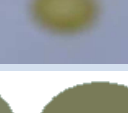









Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							

Tabela 3.10-C. Resultados obtidos com as várias quantidades de DDC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							

O aumento da quantidade de agente complexante incorporado na membrana não conduziu a diferenças que pudessem ser consideradas significativas do ponto de vista de um qualquer observador. Este resultado indicou que a quantidade de reagente complexante era suficiente para reagir com todo o cobre presente, mesmo nas soluções mais concentradas, devendo estar em claro excesso em toda a gama ensaiada (0,01 a 0,05 g).

De uma forma geral, as colorações obtidas com a NC não foram muito intensas, ao contrário do observado com a DDC ou a DFC. O aumento da intensidade de coloração com o aumento da concentração de cobre foi notório para estes dois últimos reagentes, especialmente para a DFC. Os resultados obtidos com uma quantidade intermédia de cada um dos agentes complexantes foram tipificados como “padrão” e a sua imagem recolhida e comparada. Em todos os casos foi visível o gradiente de coloração decorrente do aumento da concentração de cobre.

3.2.2.2. Selecção da quantidade de solvente mediador

Uma vez que o solvente mediador condiciona as características plastificantes do polímero de PVC, as quais, por sua vez, interferem na difusão do composto em estudo para o interior da membrana, avaliou-se o efeito da sua quantidade na intensidade da cor formada.

A quantidade de solvente incorporado nas membranas preparadas com 0,05 g de PVC e 0,05 g de agente complexante foi variada entre 0,12 e 0,04 g (Tabela 3.11). A cada uma destas membranas adicionou-se 40 µL de cada uma das soluções padrão de cobre, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 3.12.

Comparando os resultados obtidos com o comportamento padrão indicado, verificou-se que os sensores com maior quantidade de solvente mediador originam um gradiente mais intenso e mais próximo do esperado. Este comportamento foi mais visível para a NC, facto que resulta da sua coloração ser genericamente muito ténue.

De uma forma geral, os resultados obtidos não originaram diferenças muito significativas entre os vários sensores. A comparação com o comportamento padrão indicou pequenas diferenças de cor, observadas sobretudo nos sensores de concentrações mais elevadas. No caso do DDC, os sensores com menores quantidades de solvente mediador apresentaram maior intensidade de cor do que aqueles que continham as quantidades maiores deste componente. Para a NC o comportamento observado foi o inverso enquanto para a DFC o comportamento registado foi intermédio entre estes dois.

Tabela 3.11. Quantidades dos vários reagentes, entre os quais o solvente mediador, utilizados na preparação da membrana sensora.

Componentes	Sensor				
	1	2	3	4	5
NC (g)	0,0501	0,0500	0,0501	0,0502	0,0500
PVC (g)	0,0500	0,0500	0,0502	0,0500	0,0502
Sebacato (g)	0,1213	0,1019	0,0866	0,0695	0,0405
THF (mL)	2	2	2	2	2
DFC (g)	0,0500	0,0500	0,0501	0,0500	0,0509
PVC (g)	0,0501	0,0501	0,0501	0,0500	0,0501
Sebacato (g)	0,1288	0,1062	0,0909	0,0611	0,0472
THF (mL)	2	2	2	2	2
DDC (g)	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
PVC (g)	0,0500	0,0500	0,0500	0,0501	0,0501
Sebacato (g)	0,1210	0,1022	0,0832	0,0625	0,0472
THF (mL)	2	2	2	2	2

Tabela 3.12-A. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador nos sensores de NC.














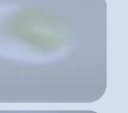
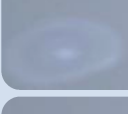
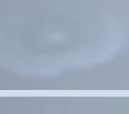



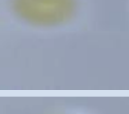
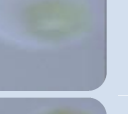
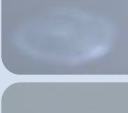
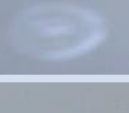
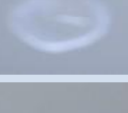
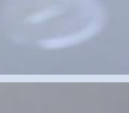
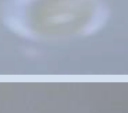
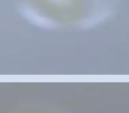
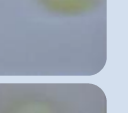






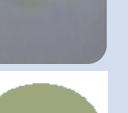






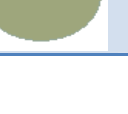
Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,12 g							
0,10 g							
0,08 g							
0,06 g							
0,04 g							
Padrão							

Tabela 3.12-B. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador nos sensores de DFC.
























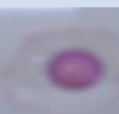
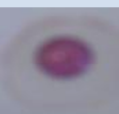
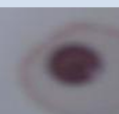








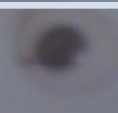


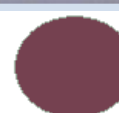


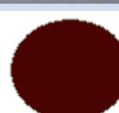















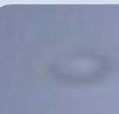






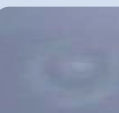




















Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,12 g							
0,10 g							
0,08 g							
0,06 g							
0,04 g							
Padrão							

Tabela 3.12-C. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador nos sensores de DDC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,12 g							
0,10 g							
0,08 g							
0,06 g							
0,04 g							
Padrão							

3.2.2.3. Selecção da quantidade de reagente de suporte

Na tentativa de encontrar as condições óptimas para todos os reagentes, optimizou-se, também, a quantidade de polímero PVC que serviu de suporte ao material sensor. Para este efeito, testaram-se várias quantidades de PVC, as quais variaram entre 0,05 e 0,01 g (tabela 3.13).

Depois da preparação das membranas seguiu-se o procedimento realizado anteriormente, ou seja, a adição de 40 µL de cada uma das soluções padrão de cobre, tendo-se obtido os resultados apresentados na tabela 3.14.

Tabela 3.13. Quantidades dos vários reagentes, entre os quais o reagente de suporte, utilizados na preparação da membrana sensora.

Componentes	Sensor				
	1	2	3	4	5
NC (g)	0,0500	0,0501	0,0500	0,0502	0,0501
PVC (g)	0,0501	0,0402	0,0301	0,0200	0,0102
Sebacato (g)	0,1099	0,1102	0,1082	0,1028	0,1065
THF (mL)	2	2	2	2	2
DFC (g)	0,0500	0,0501	0,0500	0,0501	0,0501
PVC (g)	0,0500	0,0401	0,0301	0,0200	0,0100
Sebacato (g)	0,1110	0,1056	0,1016	0,1020	0,1132
THF (mL)	2	2	2	2	2
DDC (g)	0,0499	0,0501	0,0500	0,0501	0,0500
PVC (g)	0,0500	0,0401	0,0300	0,0200	0,0100
Sebacato (g)	0,1015	0,1024	0,1056	0,1016	0,1010
THF (mL)	2	2	2	2	2

Com excepção dos ensaios com NC, verificou-se que uma maior quantidade de PVC conduzia a um comportamento mais próximo do gradiente padrão. Apesar de não existirem diferenças muito perceptíveis entre os vários sensores, as concentrações mais elevadas apresentaram, generalizadamente, cores mais intensas, quase indistinguíveis entre si.





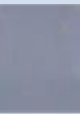





































Tabela 3.14-A. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC nos sensores de NC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							

Tabela 3.14-B. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC nos sensores de DFC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							

Tabela 3.14-C. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC nos sensores de DDC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							


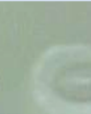



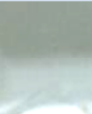








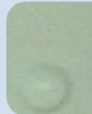
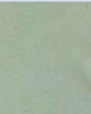





Os sensores com maiores quantidades de PVC apresentam uma cor mais escura e aqueles com menor quantidade não apresentaram bom aspecto ou coloração. Neste sentido, optou-se pela utilização de 0,05 g de PVC.

3.2.3 Estudo do efeito do pH

De um modo geral, o pH constitui um factor preponderante na escolha de um sistema sensor colorimétrico em virtude de condicionar a estabilidade e a quantidade de produto formado e o tipo e concentração de espécies de cobre presentes.

Inicialmente o valor de pH foi próximo de 5, no entanto o pH dos vinhos verdes é um pouco mais ácido, encontrando-se entre 3 e 4 unidades. Assim, prepararam-se outras soluções padrão de cobre com um pH de 3, aproximadamente, de forma a garantir a máxima eficiência do método no intervalo de pH em que os vinhos se encontram. Estas soluções foram testadas em membranas preparadas com os três reagentes complexantes, individualmente, e os resultados obtidos foram os indicados na tabela 3.15.






















Tabela 3.15. Resultados obtidos para as soluções padrão de cobre a pH 3.

Componentes	Branco	$1,0 \times 10^{-5} M$	$5,0 \times 10^{-5} M$	$1,0 \times 10^{-4} M$	$5,0 \times 10^{-4} M$	$1,0 \times 10^{-3} M$	$5,0 \times 10^{-3} M$
NC							
DFC							
DDC							

Observando a tabela 3.15 verificou-se que o gradiente de cor associado a cada um dos reagentes sofreu alterações. Os sensores de NC mantiveram-se incolores, excepto naqueles cuja concentração de cobre era mais elevada. No caso da DFC, todos os sensores apresentaram cor com excepção do sensor de concentração mais baixa, tendo os sensores de concentrações mais elevadas apresentado cores muito intensas e próximas entre si. Para a DDC verificou-se que grande parte dos seus sensores era sensível ao cobre, mas o gradiente de concentrações observado era pouco intenso.

De forma a garantir melhores resultados na região de concentrações associadas ao cobre no vinho, diminuíram-se ainda as concentrações das soluções padrão e realizaram-se ensaios adicionais mantendo o valor de pH 3 (Tabela 3.16).

Tabela 3.16. Resultados obtidos com as soluções padrão de concentrações mais baixas, a pH 3.

Componentes	Branco	$1,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-4} \text{M}$
NC							
DFC							
DDC							

Analisando os resultados obtidos para a gama de concentrações mais baixa ($1,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ M) e comparando-os com os padrões tornou-se perceptível que a NC praticamente não reagiu. A DFC e o DDC apresentaram cor apenas nos sensores de concentração mais elevada, apesar de não serem colorações tão intensas como as dos respectivos padrões, e os sensores de concentrações mais baixas foram quase incolores. Entre a DFC e o DDC, e tal como tinha vindo a ser registado, a DFC apresentou uma cor mais intensa e fácil de detectar. Assim, decidiu-se trabalhar apenas com a difenilcarbazida, ajustando-se novamente a composição da membrana a esta região de calibração.

3.2.4. Re-optimização de composição para a membrana de DFC

3.2.4.1 Selecção da quantidade de agente complexante

Este processo de selecção foi executado exactamente da mesma forma como havia sido feito anteriormente, ou seja, as membranas foram preparadas com 0,05 g de PVC, 0,10 g de sebacato e diferentes quantidades de agente de complexação,

como indicado na tabela 3.17. Posteriormente, adicionaram-se 40 µL de cada uma das novas soluções padrão de cobre às membranas obtendo os resultados referidos na tabela 3.18.

Tabela 3.17. Quantidade dos reagentes utilizados na preparação da membrana sensora.

Componentes	Sensor				
	1	2	3	4	5
DFC (g)	0,0503	0,0403	0,0304	0,0200	0,0102
PVC (g)	0,0505	0,0504	0,0501	0,0500	0,0504
Sebacato (g)	0,1107	0,1008	0,1005	0,1024	0,1044
THF (mL)	2	2	2	2	2

Tabela 3.18. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de DFC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-4} \text{M}$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							

Analisando os resultados obtidos verificou-se que o gradiente de cor dos sensores se tornou menos intenso com o decrescer da quantidade de difenilcarbazida, no entanto, aproximou-se do gradiente de cor padrão.







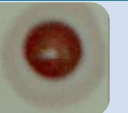


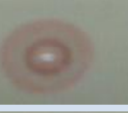



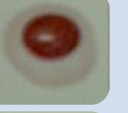






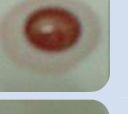


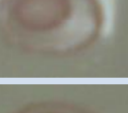

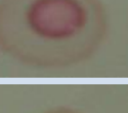

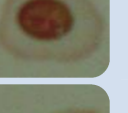

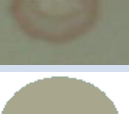
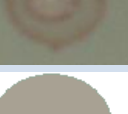
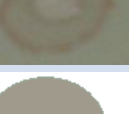
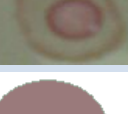
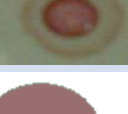








3.2.4.2. Selecção da quantidade de solvente mediador

A selecção da quantidade óptima de solvente mediador foi feita variando a sua quantidade nas membranas entre 0,12 e 0,04 g (Tabela 3.19). Após a preparação das membranas adicionaram-se 40 μL de cada uma das soluções padrão de cobre. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.20.

Tabela 3.19. Quantidades dos reagentes utilizados na preparação da membrana sensora.

Componentes	Sensor				
	1	2	3	4	5
DFC (g)	0,0500	0,0500	0,0501	0,0500	0,0509
PVC (g)	0,0501	0,0501	0,0501	0,0500	0,0501
Sebacato (g)	0,1288	0,1062	0,0909	0,0611	0,0472
THF (mL)	2	2	2	2	2

Tabela 3.20. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de solvente mediador.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-4} \text{M}$
0,12 g							
0,10 g							
0,08 g							
0,06 g							
0,04 g							
Padrão							

Comparando os resultados obtidos verificou-se que os sensores com menor quantidade de solvente se aproximaram mais do gradiente de cor padrão. A

quantidade de solvente seleccionada foi igual a 0,06 g já que permitia detectar as concentrações mais baixas de cobre.


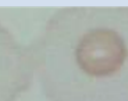











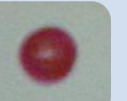
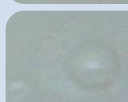
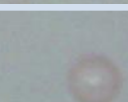




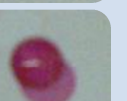






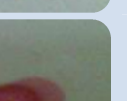
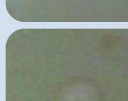
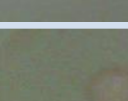
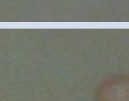
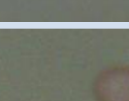
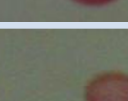
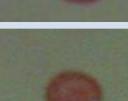
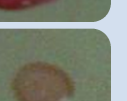







3.2.4.3. Selecção da quantidade de reagente de suporte

Para otimizar a quantidade de reagente que serviu de suporte ao sensor testaram-se várias quantidades de PVC, como mostra a tabela 3.21. Depois da preparação das membranas seguiu-se o procedimento executado anteriormente, ou seja, a adição de 40 μ L de cada uma das soluções padrão de cobre e obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 3.22.

Tabela 3.21. Quantidades dos reagentes utilizados na preparação da membrana sensora.

Componentes	Sensor				
	1	2	3	4	5
DFC (g)	0,0500	0,0501	0,0500	0,0501	0,0501
PVC (g)	0,0500	0,0401	0,0301	0,0200	0,0100
Sebacato (g)	0,1110	0,1056	0,1016	0,1020	0,1132
THF (mL)	2	2	2	2	2

Tabela 3.22. Resultados obtidos com as diferentes quantidades de PVC.

Quantidades	Branco	$1,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-6} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-5} \text{M}$	$1,0 \times 10^{-4} \text{M}$	$5,0 \times 10^{-4} \text{M}$
0,05 g							
0,04 g							
0,03 g							
0,02 g							
0,01 g							
Padrão							

Ao analisar os resultados obtidos verificou-se que os sensores com maior quantidade de PVC apresentaram uma cor mais intensa, contudo aqueles com menores quantidades aproximam-se mais do gradiente de cor padrão. Selecionou-se nesta fase uma quantidade de PVC igual 0,04 g.

3.2.5. Avaliação da resposta dos sensores

Cada membrana sensora foi adicionada de pequenos volumes de soluções padrão de cobre, obtendo-se um gradiente de cor relativo à variação da intensidade de coloração da solução à medida que a concentração de Cu^{2+} aumentava (Figura 3.4).



Figura 3.4. Gradiente de cor padrão para as concentrações de cobre mais baixas e pH 3.

Para facilitar a avaliação do seu desempenho, aquando do processo de optimização, traçaram-se curvas de calibração com base no cálculo da média de três leituras consecutivas de coordenadas do modelo HSL (disponível no PAINT), em função da concentração de Cu^{2+} .

Inicialmente as curvas traçadas apresentaram ajustes lineares, contudo, este tipo de ajuste não se mostrou muito favorável em muitos dos registos obtidos. Assim, optou-se por testar várias abordagens de tratamento matemático sobre os valores das coordenadas (Tabela 3.23).

Tabela 3.23. Tipo de tratamento matemático realizado.

Tipo de ajuste
Concentração vs A^*
Log Concentração vs A^*
Concentração vs Log $(A)^*$
Log Concentração vs Log $(A)^*$
Log Concentração vs Log $(A+B)^*$
Concentração vs Log $(A+B)^*$
Concentração vs $(A*B)^*$
Log Concentração vs $(A*B)^*$
Concentração vs Log $(A*B)^*$
Log Concentração vs Log $(A*B)^*$

Nota: *A = corresponde à Tonalidade ou Saturação ou Luminosidade

B = corresponde a uma das propriedades diferente da de A

À medida que se traçavam as curvas com as novas funções matemáticas percebeu-se que estas apresentaram um comportamento polinomial e não linear. Desta forma, optou-se pelos ajustes polinomiais e escolheu-se a função matemática com os melhores resultados para cada uma das coordenadas. Na figura 3.5 apresentam-se os melhores ajustes para a otimização da quantidade de DFC, a pH 3. Os restantes resultados encontram-se no [anexo A](#).

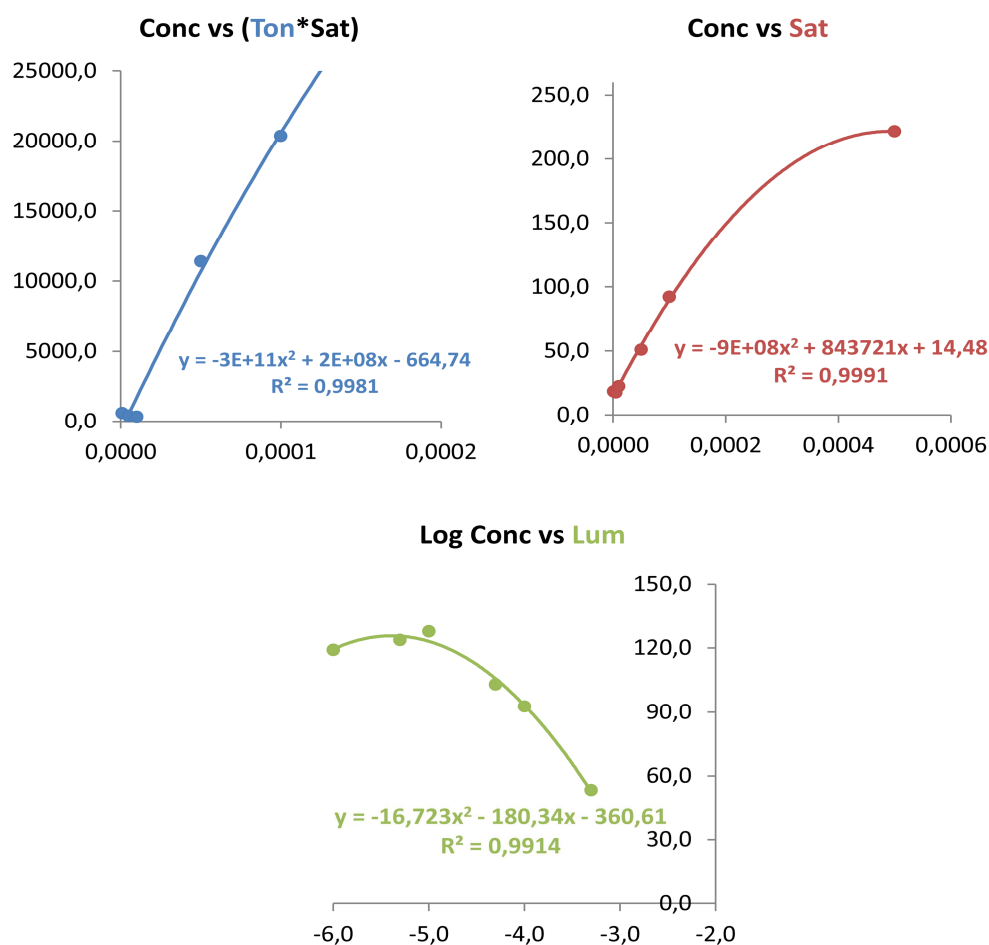


Figura 3.5. Melhores ajustes matemáticos para cada uma das coordenadas. Membrana com 0,04 g DFC, 0,06 g PVC e 0,04 g de sebacato.






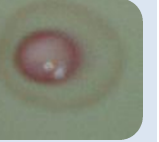












3.3. Aplicação à análise de vinhos

As membranas seleccionadas foram preparadas em série para permitir a realização de uma curva de calibração em paralelo com a análise de amostras de vinho. Esta condição permitiria aferir um intervalo de concentração para a quantidade de cobre na amostra apenas por comparação visual. A análise das três coordenadas obtidas na aquisição da imagem permitiria, por sua vez, uma leitura quantitativa supostamente mais precisa.

A análise de vinho foi realizada por adição directa de 40 µL de vinho verde sobre a membrana. Usaram-se nesta fase vinhos com níveis de cobre inferiores e superiores ao limite legal. De um modo geral, os vinhos não produziram qualquer alteração de coloração, nem de modo imediato nem ao fim de quinze minutos. Estes

resultados sugeriram a presença de algum constituinte no vinho ao qual o cobre se liga, impedindo a sua complexação com a DFC (Tabela 3.24).

Tabela 3.24. Resultados obtidos para diferentes tipos de solução de vinho com uma gama de concentrações entre $1,26 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $1,89 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Tipo de solução	Branco	$1,26 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,42 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,57 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,73 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,26 \times 10^{-5} \text{ M}$
Padrões Sintéticos Vinho						
Padrões Vinho						
Vinho						

Neste sentido, o presente estudo abriu a possibilidade de uma avaliação rápida de cobre presente no vinho, mas este deve, provavelmente, ter que ser sujeito a uma “digestão” ácida, para garantir que todo o cobre presente em solução esteja sob a forma de Cu^{2+} .

Estes ensaios preliminares não são incluídos neste trabalho, que terá continuidade na Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, por este se encontrar já demasiado extenso...

4. Conclusões

Os sensores potenciométricos apresentaram boas características analíticas e foram capazes de discriminar o cobre em solução aquosa. Apresentaram diversas vantagens como a simplicidade de concepção, o baixo tempo de resposta e o baixo limite de detecção.

A preparação das várias membranas teve como objectivo encontrar uma unidade potenciométrica adequada para o doseamento de cobre. Estas foram preparadas pela técnica de polimerização molecular usando dois solventes diferentes (MeOH e CLF). Assim, após a realização deste trabalho pode concluir-se que os eléctrodos preparados com CLF apresentaram melhor desempenho do que aqueles preparados com MeOH. Relativamente à espécie contida na membrana, conclui-se que o sensor mais adequado deveria conter complexo de cobre e difenilcarbazida. Verificou-se ainda que os resultados de ambos melhoraram aquando do uso da solução tampão e da água desionizada, respectivamente.

Estes sensores não foram explorados do ponto de vista analítico em virtude de se ter verificado um comportamento muito diferente do previsto pela equação de Nernst. No entanto, os valores típicos de calibração obtidos ofereciam características capazes de conduzir a uma aplicação eficaz de alguns dos eléctrodos na análise de vinhos.

Relativamente aos sensores ópticos, optou-se pela preparação de uma membrana sensível ao cobre que possibilitasse a detecção visual deste elemento no vinho. Entre os vários agentes complexantes testados, concluiu-se que a difenilcarbazida originou os melhores resultados, reagindo com o Cu^{2+} favoravelmente a pH 3 e numa proporção de 1:1. Para composição óptima desta membrana sensora, a pH 3, definiu-se 0,04 g de difenilcarbazida, 0,06 g de solvente mediador (sebacato) e 0,04 g de PVC.

A aplicação em análise quantitativa do método proposto pode ser realizada com base em funções matemáticas simples, que recorrem a três coordenadas da cor: tonalidade, saturação e luminosidade. As funções seleccionadas foram: Concentração vs. (Tonalidade*Saturação), Concentração vs. Saturação e Log Concentração vs. Luminosidade, respectivamente.

A aplicação deste método em vinho requer ainda ensaios adicionais, sobretudo no que diz respeito ao estado em que se encontra o cobre nas amostras de vinho: livre ou não?!

Bibliografia

- [1] Comissão Viticultura da Região dos Vinhos Verdes. "Catálogo Institucional: *A Região Demarcada dos Vinhos Verdes - Um Século de História*", página 4. 2002. Disponível em: <http://www.vinhoverde.pt/pt/vinhoverde/historia/umSeculoHistoria/Cap02.pdf> (acedido em 22 de Julho de 2010).
- [2] Comissão Viticultura da Região dos Vinhos Verdes. "*História do Vinho Verde*". Disponível em: <http://www.vinhoverde.pt/pt/vinhoverde/historia/default.asp> (acedido em 22 de Julho de 2010).
- [3] Comissão Viticultura da Região dos Vinhos Verdes. "*Região – Localização*". Disponível em: <http://www.vinhoverde.pt/pt/vinhoverde/regiao/default.asp> (acedido em 22 de Julho de 2010).
- [4] Comissão Viticultura da Região dos Vinhos Verdes. "*Vinho verde*". Disponível em: <http://www.vinhoverde.pt/pt/vinhoverde/default.asp> (acedido em 22 de Julho de 2010).
- [5] Curso de Especialização em Produção Enológica. "*Vinificação em vinho branco*". Disponível em: <http://www.aesbuc.pt/twt/ETGI/MyFiles/MeusSites/Enologia/2005/VinhoBranco.htm> (acedido em 25 de Julho de 2010).
- [6] *Cobre*, in Infopédia. Porto: Porto Editora, 2003-2010. Disponível em: [http://www.infopedia.pt/\\$cobre](http://www.infopedia.pt/$cobre) (acedido em 27 de Julho de 2010).
- [7] Pro Cobre – Connects Life. Sobre o cobre/Principais usos do Cobre: "*Como o corpo humano obtém cobre?*" Disponível em: http://www.procobre.org/pr/sobre_o_cobre/pu_saude_01.html (acedido em 27 de Julho de 2010).
- [8] Pro Cobre – Connects Life. Sobre o cobre/Principais usos do Cobre/Saúde: "*Doenças causadas por falta ou excesso de cobre*". Disponível em: http://www.procobre.org/pr/pdf/01_saude04_pr.pdf (acedido em 27 de Julho de 2010).
- [9] Skoog D., Holler F. James, Nieman T. *Princípios de Análise Instrumental (5ª ed)*. Bookman, 2002.
- [10] Alçada, M. 1995. *Construção e avaliação de eléctrodos de iões para determinação de alcalóides em formulações farmacêuticas*. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. 312pp. Versão PDF do documento descarregada em 10 de Agosto de 2010.

- [11] Godinho, M. Fevereiro de 2005. *Análise Instrumental II – Parte Teórica*. Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL). Versão PDF do documento descarregada em 10 de Agosto de 2010.
- [12] Silva. 2001. *Pilha de Daniell*. Disponível em: <http://educa.fc.up.pt/ficheiros/fichas/881/Introdu%E7%E3o.pdf>. Versão PDF do documento descarregada em 18 de Agosto de 2010.
- [13] Centro Federal de Educação Tecnológica de Química - Rio de Janeiro. *Análise Experimental - Potenciometria*. Disponível em: <http://www.ifrj.edu.br/aluno/a/instrumental/potencimetria.pdf> (acedido em 18 de Agosto de 2010).
- [14] Juliano, Valmir F. 2010. "*Introdução aos métodos electroanalíticos*". Disponível em: <http://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/Potenciometria.pdf>. Versão PDF do documento descarregada em 18 de Agosto de 2010.
- [15] Sales, M. Goreti. 1999. *Desenvolvimento de detectores tubulares potenciométricos e de metodologias automáticas de fluxo contínuo com detecção potenciométrica destinados ao controlo químico de produtos farmacêuticos*. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. 335pp
- [16] Sadler, M. L. 2001. *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções (4ª edição)*. Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa, Capítulo 6, página 255.
- [17] M. G. F. Sales, *Potenciometria*, 2003 (tese de doutoramento).
- [18] R. P. Buck, E. Lindner, IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division Commission on Electroanalytical Chemistry, Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. *Pure Appl. Chem.*, 66 (12), 1994, 2527-2536.
- [19] Jerónimo, P. C. A. 2005. *Sensores ópticos de matriz sol-gel com interesse na análise farmacêutica e clínica*. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. 209pp
- [20] Moreira, F. 2009. *Determinação de Norfloxacin em Aquacultura*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. 99pp
- [21] Schweiger, B. Bahnweg, L. entre outros. 2009. Development of Molecular Imprinted Polymers (MIPs) for the Selective Removal of Carbamazepine from Aqueous Solution. World Academy of Science, Engineering and Technology. (acedido a 24 de Setembro de 2010).

- [22] Sousa, M. D. Barbosa, C. M. 2009. Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. Porto, Portugal: Química Nova, Vol. 32, No. 6, 1609-1619. Versão PDF do documento descarregada em 27 de Setembro de 2010.
- [23] *Teoria física sobre a luz, a cor e a visão*. Disponível em: <http://nautilus.fis.uc.pt/cec/lar/sara/doc/teoria.pdf>. Versão PDF do documento descarregada em 15 de Setembro de 2010.
- [24] Lopes, J. M. Brisson. Computação gráfica: *Cor e Luz*.
Disponível em: <http://www.visual.pro.br/cg1/pdf/capitulocores.pdf>. Versão PDF do documento descarregada em 15 de Outubro de 2010.
- [25] Ribeiro, M. Desenho e Computação Gráfica: *Modelos e Modos de Cor*.
Disponível em: http://www.est.ipcb.pt/tecnologias/tec_DCG/Teorica/Sebenta%202004%20-%20Cap%20VI.pdf. Versão PDF do documento descarregada em 15 de Outubro de 2010.
- [26] Silva, T. 2010. *Desenvolvimento de um sensor óptico para determinação da Norfloxacina*. Dissertação de Mestrado em Optimização de Energia na Indústria Química. Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto. 87pp
- [27] Leite, F. N. 2006. *Calibração de dispositivos a cores utilizando uma câmara digital*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Eléctrica. Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília. 73pp

Anexos

Anexo A

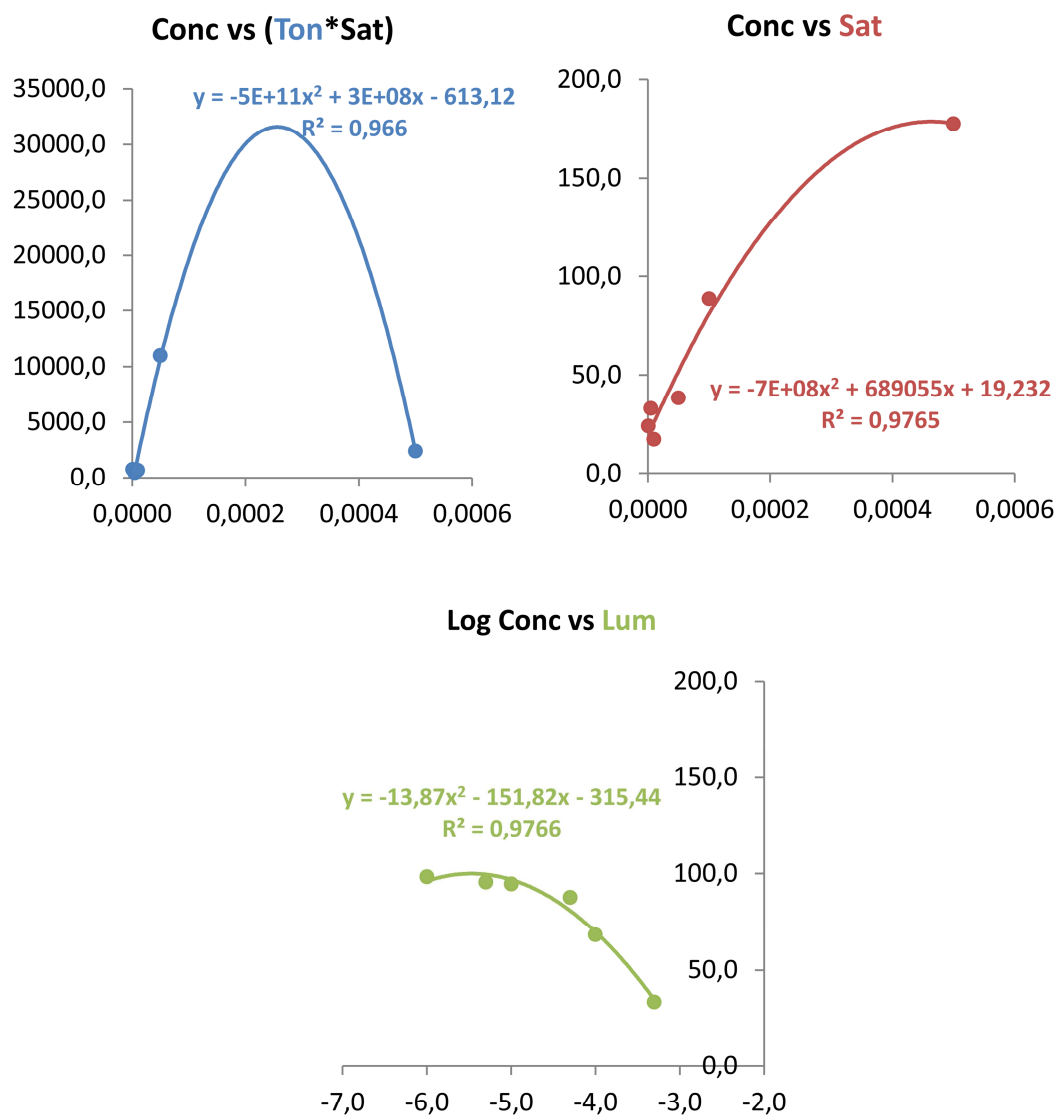


Figura A.1. Funções matemáticas mais favoráveis para cada uma das coordenadas (tonalidade, saturação e luminosidade) utilizadas na otimização do solvente mediador

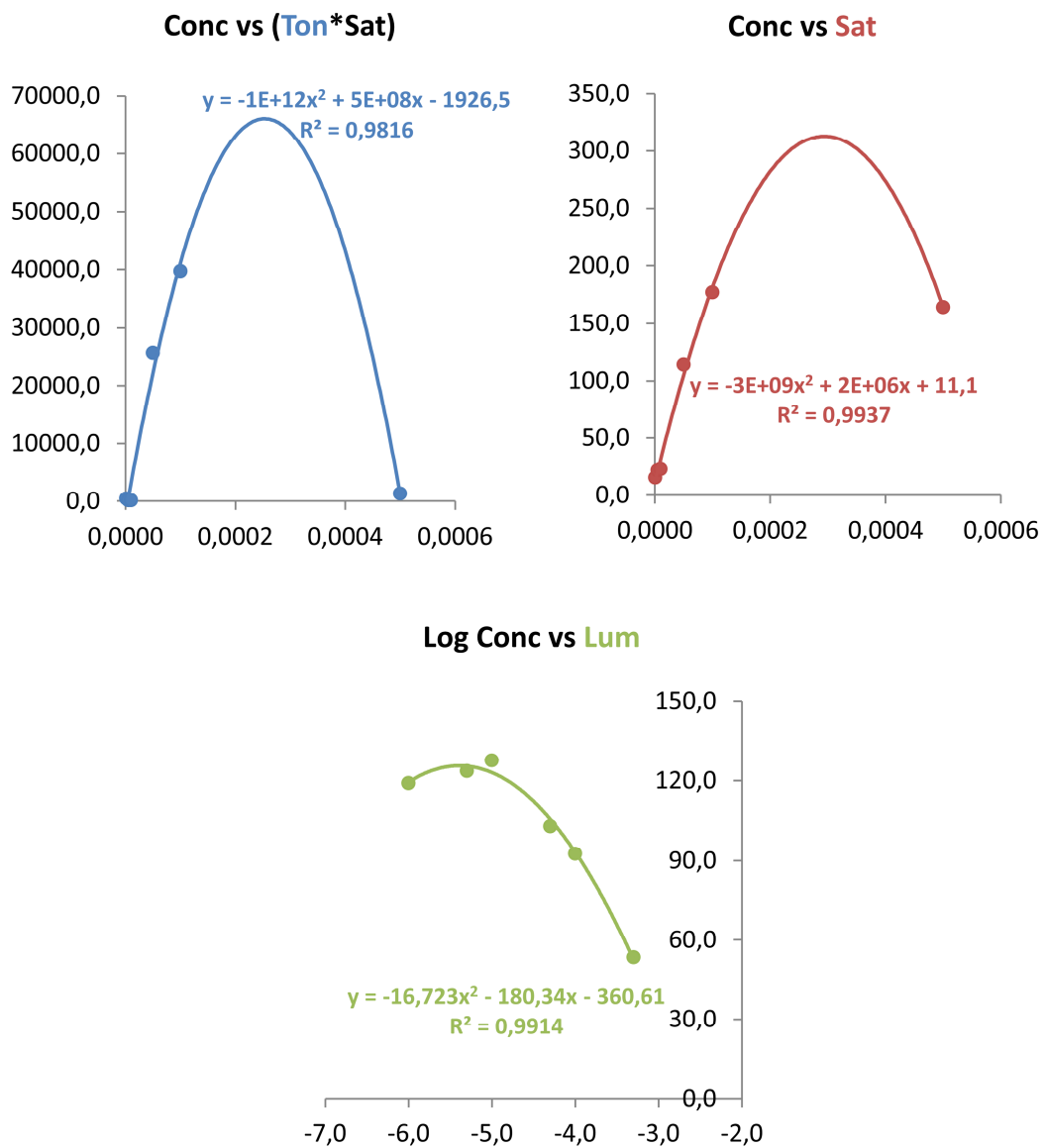


Figura A.2. Funções matemáticas mais favoráveis para cada uma das coordenadas (tonalidade, saturação e luminosidade) utilizadas na otimização do PVC.