

# Determinações analíticas efetuadas por meio da colorimetria

Luiz Antenor Rizzon | Magda Beatris Gatto Salvador

## Introdução

Muitos métodos de análise de mostos e sucos de uva estão baseados na medida quantitativa da absorção da luz por uma solução (GAROGLIO, 1973; BLOUIN, 1977; RIBÉREAU-GAYON et al., 1976; UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II, 1982). A concentração na solução da substância absorvente é proporcional à quantidade de luz absorvida. Essas medidas são efetuadas por instrumentos denominados fotocolorímetros ou espectrofotômetros.

As radiações eletromagnéticas com comprimento de onda compreendido entre 380 nm e 750 nm (1 nm = nanômetro =  $10^{-9}$  m ou  $10^{-7}$  cm) são visíveis ao olho humano. A luz visível constitui uma parcela muito pequena no espectro eletromagnético. A região do espectro cujas radiações possuem um comprimento de onda inferior a 380 nm é denominada de ultravioleta (UV). Comprimentos de onda acima de 750 nm *correspondem à região do infravermelho (IR)*.

A irradiação de uma substância por uma luz branca (luz solar) desencadeia a seguinte reação, segundo a estrutura e o estado da superfície dessa substância:

- Se todas as radiações incidentes são refletidas ou difusas, a substância apresenta cor branca.

- Se todas as radiações são absorvidas, a substância apresenta cor preta.
- Se uma parte das radiações são absorvidas seletivamente, a substância apresenta-se colorida.

Quando uma solução aparece colorida para o olho humano, é porque a mesma absorve toda a luz incidente, com exceção do intervalo de comprimento de onda observado pela visão.

Segundo a natureza da radiação colorida, obtêm-se os espectros de absorção da luz, de tal modo que a imagem espectral pode servir para identificar uma determinada substância.

As medidas são efetuadas por meio da transmitância, que corresponde à relação existente entre a intensidade do raio de luz monocromático que incide sobre uma solução colorida e a intensidade de luz emergente, ou seja, a luz que foi absorvida. Quando a intensidade de luz incidente é igual a 100%, a intensidade de luz emergente pode ser medida como percentagem de transmitância (%T). A absorbância corresponde à relação entre intensidade de luz absorvida por uma solução corada e a redução da intensidade de luz transmitida. A medida de absorção é a absorbância (A).

Os princípios gerais da colorimetria seguem a lei de Bouguer-Lambert, que cita que

[...] ao incidir um raio de luz sobre diversas camadas opticamente homogêneas e de espessuras conhecidas, a transmissão da luz decresce logaritmicamente com o aumento linear da espessura da camada. (OHLWEILER, 1981, p. 169).

e a de Lambert-Beer, que cita que “a absorbância é proporcional à concentração” (OHLWEILER, 1981, p. 63).

## Prolina

### Definição

A prolina é um dos principais aminoácidos encontrados nos mostos e no suco de uva. Durante o processo fermentativo, a prolina não sofre variações acentuadas, uma vez que seu nitrogênio não é utilizado normalmente pelas leveduras na fermentação alcoólica. Os mostos de algumas cultivares de *Vitis vinifera* se caracterizam por apresentar teores mais elevados de prolina em relação àqueles de uvas do grupo das americanas.

### Princípio do método

A prolina existente na amostra de mosto ou suco de uva reage à temperatura de ebulição, em meio ácido e em presença de ninidrina, originando uma coloração violeta, com um máximo de absorção a 517 nm, proporcional à quantidade existente na amostra.

### Material

- Tubos de ensaio de 20 mL com tampa de rosca.
- Pipetas de 0,25 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 5,0 mL e 10,0 mL.
- Balão volumétrico de 50 mL.
- Banho-maria.
- Espectrofotômetro.

### Reagentes

- Ninidrina a 3% em metilcelosolve (glicol etileno monometil éter).
- Isopropanol diluído a 50% com água destilada.
- Ácido fórmico puro.
- Padrão de prolina a 500 mg L<sup>-1</sup>.

### **Preparo da curva padrão**

Apartir de uma solução de 500 mg L<sup>-1</sup> de prolina preparar os padrões de 0 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup>, 30 mg L<sup>-1</sup>, 40 mg L<sup>-1</sup> e 50 mg L<sup>-1</sup>, completando o volume com água destilada.

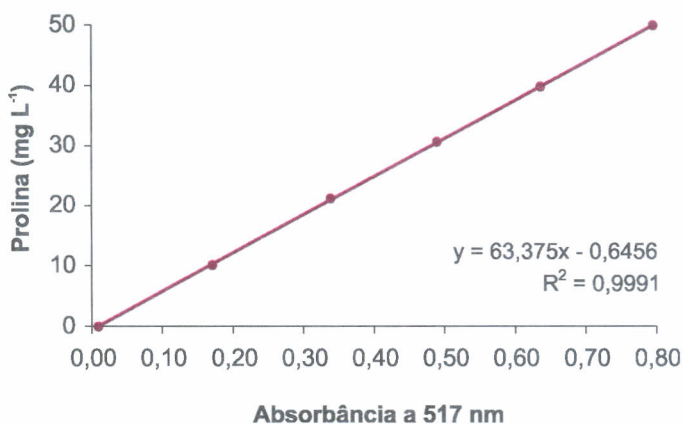
### **Preparo da amostra**

O mosto ou suco de uva a ser analisado deve ser diluído a 10% para ficar no limite em que apresenta uma resposta linear na leitura espectrofotométrica. Retira-se uma quantidade de 0,5 mL, coloca-se no tubo de ensaio de 20 mL com tampa de rosca, acrescenta-se 0,25 mL de ácido fórmico e 1,0 mL de solução de ninidrina. Enrosca-se a tampa, agita-se e coloca-se o tubo em banho-maria em ebulição por 15 minutos. A seguir, esfria-se o tubo a 20 °C por 5 a 10 minutos. Durante o resfriamento acrescenta-se 5,0 mL da solução de isopropanol e faz-se a leitura a 517 nm no período compreendido até 30 minutos do fim do aquecimento. Proceda-se da mesma maneira com relação às soluções para estabelecimento da curva padrão. O branco é preparado do mesmo modo, substituindo-se a amostra pelo mesmo volume de água destilada.

### **Cálculo do resultado**

A partir dos padrões estabelecidos e da sua leitura no espectrofotômetro, traçar a curva colocando os valores obtidos da absorbância na ordenada e as concentrações da prolina na abscissa, conforme a Figura 1.

O resultado é expresso em mg L<sup>-1</sup> de prolina, multiplicando o valor encontrado na curva padrão pelo fator de diluição da amostra.



**Figura 1.** Curva de calibração para determinação da prolina.

## Ácido sórbico

### Definição

O ácido sórbico é um ácido graxo insaturado, cuja fórmula química é:



É permitida a sua utilização no suco de uva até o limite máximo de 1,0 g L<sup>-1</sup>. É um produto fungistático (inibe o crescimento das leveduras) e não apresenta reduzida ação inibidora contra as bactérias acéticas e lácticas que podem degradar o produto, causando cheiro desagradável. Não apresenta ação antioxidante. Apresenta eficiência prática em associação com uma proporção de álcool e uma certa dose de dióxido de enxofre.

### Princípio do método

O ácido sórbico é separado do suco de uva por meio do arraste com vapor d'água e sua concentração é determinada por espectrofotometria a 256 nm.

## Material

- Espectrofotômetro ultravioleta.
- Aparelho Cazenave-Ferré (utilizado para determinação da acidez volátil).
- Balão volumétrico de 100 mL.
- Pipeta automática de 1 mL.

## Reagente

- Padrão de ácido sórbico a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  ( $268 \text{ mg L}^{-1}$  de sorbato de potássio).
- Ácido clorídrico  $0,1 \text{ N}$ .

## Preparo da curva padrão

A partir de uma solução de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido sórbico ( $268 \text{ mg L}^{-1}$  de sorbato de potássio), preparar os padrões de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido sórbico, em balões volumétricos de 100 mL com  $0,3 \text{ mL}$  de ácido clorídrico  $0,1 \text{ N}$ , completando o volume com água deionizada, e homogeneizar.

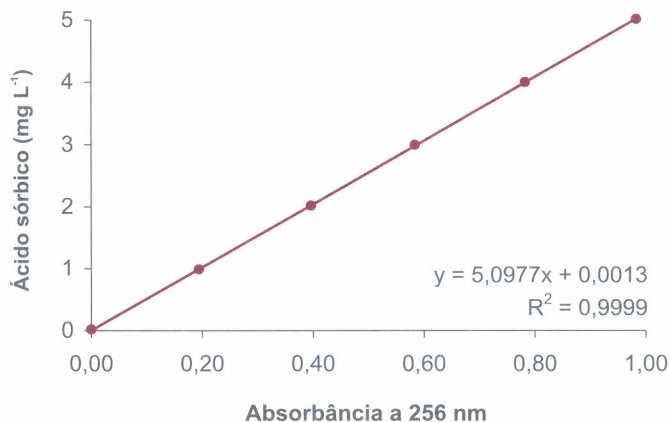
## Preparo da amostra

Pipetar  $1 \text{ mL}$  de suco de uva no aparelho de destilação (Cazenave-Ferré). Recolher o destilado num balão volumétrico de 100 mL, que contém  $0,3 \text{ mL}$  de ácido clorídrico  $0,1 \text{ N}$ . Quando o volume estiver próximo ao traço de aferição, parar a destilação, retirar o balão e completar o nível com água deionizada. Fazer a leitura em espectrofotômetro a  $256 \text{ nm}$  (UV).

## Modo operatório

A partir dos padrões estabelecidos e da sua leitura no espectrofotômetro, utilizando a água deionizada como branco, traçar a curva

colocando os valores obtidos da absorvância na ordenada e as concentrações de ácido sórbico na abscissa conforme a Figura 2.



**Figura 2.** Curva de calibração para determinação do ácido sórbico.

## Cálculo

O resultado é expresso em mg L<sup>-1</sup> de ácido sórbico, multiplicando o valor encontrado na curva padrão pelo fator de diluição da amostra.

Para indicar os valores em sorbato de potássio, multiplicar o teor de ácido sórbico por 1,34.

## Fósforo

### Definição

O fósforo existe naturalmente no mosto e no suco de uva, nas formas mineral e orgânica. Esse elemento tem participação importante – principalmente quando os teores são elevados – na formação de precipitados de fosfato férrico, causando turvação. Muitas vezes, ele é adicionado ao mosto na forma de fosfato de amônio, com o objetivo de facilitar a fermentação alcoólica.

## Princípio do método

Fotocolorimetria.

## Reagente

- Padrão de fósforo com concentração conhecida.
- Ácido ascórbico a 2%.
- Solução sulfomolibdica: dissolver 1 g de subcarbonato de bismuto em 200 mL de água deionizada, acrescentar 138 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitar até dissolver e deixar esfriar; dissolver 20 g de molibdato de amônio em 300 mL de água deionizada.
- Transferir as duas soluções para um balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada a 20 °C.

## Aparelhagem

Espectrofotômetro.

## Parâmetros de operação do espectrofotômetro

Comprimento de onda: 725 nm.

## Preparo da curva padrão

Em balão volumétrico de 50 mL, adicionar 10 mL de água deionizada, 5 mL de solução sulfomolibdica, 2 mL de ácido ascórbico a 2% e os padrões de fósforo de 0,2 mg L<sup>-1</sup>, 0,4 mg L<sup>-1</sup>, 0,6 mg L<sup>-1</sup>, 0,8 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, obtidos a partir de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup>, completar o volume com água deionizada, agitar e esperar 15 minutos para efetuar a leitura, utilizando cubetas de 10 mm de espessura ótica. Tratar o branco da mesma forma que a curva padrão, substituindo a solução de fósforo por água deionizada.

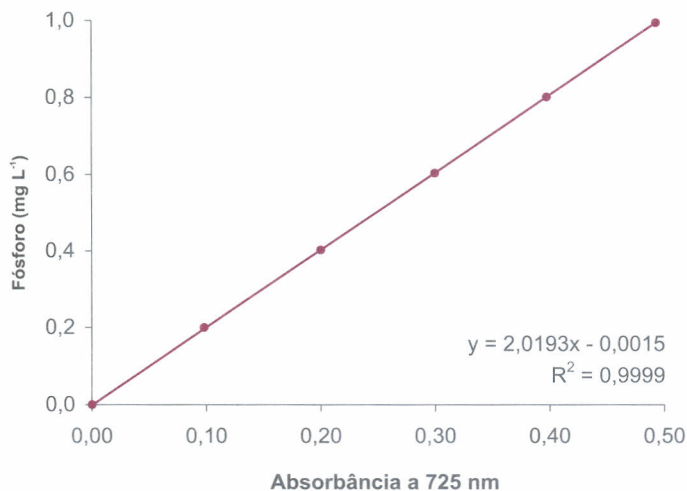


## Preparo da amostra

Seguir o mesmo procedimento da curva padrão, substituindo a solução de fósforo por 2 mL do mosto ou do suco de uva diluído a 20%.

## Modo operatório

A partir dos padrões estabelecidos e da sua leitura no aparelho, traçar a curva, colocando os valores obtidos da absorbância na ordenada e as concentrações de fósforo na abscissa, conforme a Figura 3.



**Figura 3.** Curva de calibração para determinação do fósforo.

## Cálculo da concentração

O resultado é expresso em  $\text{mg L}^{-1}$ , multiplicando o valor encontrado na curva padrão pelo fator de diluição da amostra.

Para expressar os valores obtidos em fosfato, multiplicar o valor obtido por 3,065.