

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE ELETRODOS COMPÓSITOS  
QUIMICAMENTE MODIFICADOS COM HIDRÓXIDO E FOSFATO DE CÁTIONS  
METÁLICOS PARA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ANALITOS  
DE INTERESSE ALIMENTÍCIO E FARMACÊUTICO**

**Kellen Heloizy Garcia Freitas\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de  
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

\* Bolsista CAPES

**SÃO CARLOS - SP  
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F866da

Freitas, Kellen Heloizy Garcia.

Desenvolvimento e aplicação de eletrodos compósitos quimicamente modificados com hidróxido e fosfato de cátions metálicos para determinação voltamétrica de analitos de interesse alimentício e farmacêutico / Kellen Heloizy Garcia Freitas. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 143 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

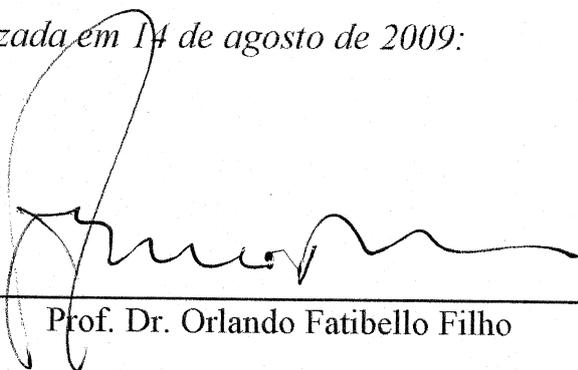
1. Química analítica. 2. Eletroanalítica. 3. Antioxidantes. 4. Eletrodos modificados. I. Título.

CDD: 543 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

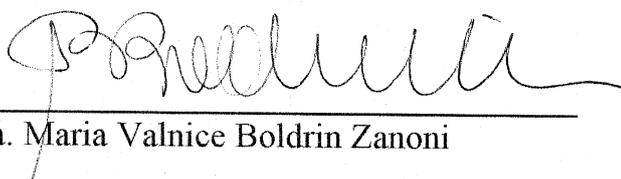
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Kellen Heloizy Garcia Freitas** realizada em 14 de agosto de 2009:*



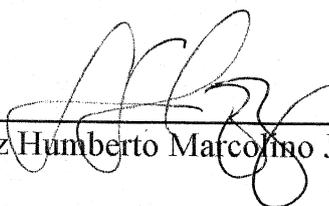
---

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



---

Profa. Dra. Maria Valnice Boldrin Zanoni



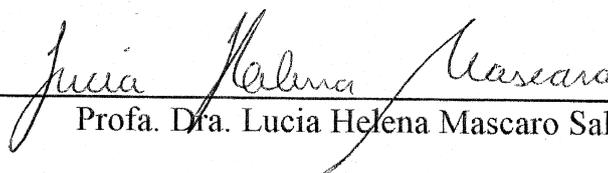
---

Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Junior



---

Profa. Dra. Ivani Aparecida Carlos



---

Profa. Dra. Lucia Helena Mascaro Sales

*Dedico este trabalho,*

*A minha família e a todas as pessoas que estiveram  
junto a mim no decorrer deste trabalho dando-me  
força para continuar e em especial ao meu marido  
Marcelo Levy, pelo companheirismo, compreensão e  
amor dedicado a mim durante todos estes anos  
In memória de Mercedes Rodrigues de Freitas e  
Maria do Carmo Ribeiro Fiel, mãe, avó, e amiga.*

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo  
começo, qualquer um pode começar agora e fazer  
um novo fim*

*Chico Xavier*

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente agradeço a Deus por ter me abençoado nesta jornada com força, coragem e persistência para concluir este trabalho*

*Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela orientação, paciência e incentivo durante todo decorrer do trabalho, contribuindo para o meu aprendizado e crescimento profissional.*

*Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pelas dúvidas acadêmicas respondidas durante o curso*

*Aos professores membros da banca pela presença e correções sugeridas.*

*Aos órgãos de financiamento: CAPES, CNPq e FAPESP.*

*Ao meu querido marido Marcelo Levy, pelo amor, compreensão, paciência e carinho a mim dedicado durante o desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao pessoal do LABBES e LABIE: Bruna, Débora (Lilo), Elen, Érica, Estela, Fernandinha, Marina (Garça), Natália, Quésia, Viviane, André, Bruno, Fernando (Avaré), Geiser, Humberto, Luiz Carlos (Cyber), Luiz Humberto (Luizinho), Osmundo, Thiago, Vagner, Willian (Cabelo) e em especial a Roberta pela ajuda no HPLC.*

*Às amigas Carol, Alessandra, Mônica por ter me ajudado nos momentos difíceis e à Joana pela grata convivência.*

*Aos meus pais José Norival e Célia Maria, em especial aos meus irmãos Alisson e Kelcy por estar comigo em todos os momentos importantes de minha vida e aos amigos que mesmo estando distantes sempre me deram carinho e apoio.*

*In memória de uma mulher que não me gerou, mas que me acolheu como filha, referência de afeto para mim. À Maria do Carmo, meu mais emocionado obrigado.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

Eletrodo compósito de carbono modificado – ECCM  
Eletrodo compósito de carbono não modificado - ECCNM  
Eletrodo quimicamente modificado – EQM  
Catequina – CAT  
Quercetina – QCT  
Rutina – Rut  
Voltametria cíclica – CV  
Voltametria de onda quadrada – SWV  
Voltametria de varredura linear – LV  
Microscopia eletrônica de varredura – MEV  
Energia dispersiva de raio x – EDX ou EDS  
Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE ou HPLC  
Corrente de pico anódico –  $I_{pa}$   
Corrente de pico catódico –  $I_{pc}$   
mV – milivolts  
 $\mu A$  – microAmper  
 $E_p$  – potencial de pico  
Velocidade de varredura -  $v$   
Amplitude de pulso de potencial –  $a$   
Frequência de pulso de potencial –  $f$   
Incremento de varredura -  $\Delta E$   
SE – detector de elétrons secundários  
BSE – detector de elétrons retroespalhados  
Eletrodo de calomelano saturado - ECS  
RSD – desvio padrão relativo  
Er% - erro relativo percentual  
LD – limite de detecção  
L – linearidade  
b – coeficiente angular da reta

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	iv
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ESQUEMA E FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. CAPÍTULO 1-INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Antioxidantes.....	1
1.1.1. Antioxidantes em alimentos .....	2
1.1.2. Histórico .....	3
1.2. Antioxidantes naturais.....	4
1.2.1. Catequina .....	4
1.2.2. Quercetina .....	5
1.2.3. Rutina.....	6
1.3. Antioxidantes sintéticos .....	7
1.4. Objetivos.....	10
2. CAPÍTULO 2- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	11
2.1. Eletrodos quimicamente modificados.....	11
2.2. Métodos de modificação da superfície do eletrodo.....	13
2.2.1. Adsorção .....	13
2.2.2. Ligação covalente.....	14
2.2.3. Recobrimento com membrana polimérica.....	14
2.2.4. Materiais compósitos.....	15
2.3. Modificadores.....	17
2.3.1. Fosfato de cobre (II) – $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	17
2.3.2. Hidróxido de níquel – $\text{Ni}(\text{OH})_2$ .....	19
2.3.3. Resina de troca iônica.....	20
2.4. Métodos eletroquímicos.....	20
2.4.1. Voltametria.....	21
2.4.1.1. Voltametria cíclica .....	21
2.4.1.2. Voltametria de onda quadrada .....	22
2.5. Microscopia eletrônica de varredura e EDX.....	25

3. CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1. Instrumentação .....	27
3.1.2. Vidraria.....	27
3.1.3. Medidas voltamétricas .....	27
3.1.4. Eletrodo de referência e eletrodo auxiliar .....	28
3.2. Construção dos ECCMs para determinação de antioxidante em alimentos e em formulações farmacêuticas.....	28
3.2.1. Síntese e imobilização do $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	28
3.2.2. Síntese e imobilização do $\text{Ni}(\text{OH})_2$ .....	29
3.2.3. Imobilização do $\text{Cu}^{2+}$ na resina de troca catiônica.....	29
3.3. Construção dos eletrodos de trabalho.....	30
3.4. Preparo de amostra e determinação dos analitos.....	31
3.4.1. Catequina e Quercetina.....	31
3.4.2. Rutina .....	32
3.4.3. BHA e BHT .....	32
3.5. Métodos voltamétricos .....	33
3.5.1. Voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.....	33
3.5.2. Estudo de interferentes em potencial.....	33
3.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	34
4. CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Caracterizações da superfície dos eletrodos.....	35
4.2. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de catequina em chás.....	39
4.2.1. Estudo da composição do eletrodo.....	39
4.2.2. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	40
4.2.3. Estudo do efeito do pH .....	41
4.2.4. Estudo do efeito da velocidade de varredura.....	42
4.2.5. Comportamento eletroquímico de CAT sobre o ECCM - $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	43
4.2.6. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada (SWV).....	46
4.2.7. Estudo de repetibilidade .....	48
4.2.8. Estudo de interferentes em potencial .....	48
4.2.9. Curva analítica e aplicações.....	50
4.3. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de quercetina em chás.....	53
4.3.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	53
4.3.2. Estudo do efeito do pH .....	53
4.3.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura .....	53
4.3.4. Comportamento eletroquímico de QCT sobre o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	54

4.3.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto.....	56
4.3.6. Estudo de repetibilidade .....	57
4.3.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	57
4.3.8. Curva analítica e aplicações.....	58
4.4. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de rutina em formulações farmacêuticas.....	60
4.4.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	60
4.4.2. Estudo do efeito do pH .....	60
4.4.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura.....	60
4.4.4. Comportamento eletroquímico de Rut sobre o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	61
4.4.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto.....	62
4.4.6. Estudo da repetibilidade.....	63
4.4.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	63
4.4.8. Curva analítica e aplicações.....	64
4.5. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de BHA em maionese .....	66
4.5.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	66
4.5.2. Estudo do efeito do pH .....	66
4.5.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura .....	67
4.5.4. Comportamento eletroquímico de BHA sobre o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	67
4.5.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto.....	69
4.5.6. Estudo de repetibilidade.....	70
4.5.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	71
4.5.8. Curva analítica e aplicações.....	71
4.6. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de BHT em amostras de maionese e margarina.....	73
4.6.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	73
4.6.2. Estudo do efeito do pH .....	73
4.6.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura.....	73
4.6.4. Comportamento eletroquímico de BHT sobre o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .....	74
4.6.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto.....	75
4.6.6. Estudo de repetibilidade.....	76
4.6.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	76
4.6.8. Curva analítica e aplicações.....	77
4.7. Determinação simultânea de BHA e BHT.....	78
4.7.1. Estudo da repetibilidade .....	81
4.7.2. Estudo de adição e recuperação.....	82
4.8. ECCM com $\text{Ni}(\text{OH})_2$ para determinação de catequina em chás.....	84

4.8.1. Estudo da composição do eletrodo.....	84
4.8.2. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	85
4.8.3. Estudo do efeito do pH .....	86
4.8.4. Estudo do efeito da velocidade de varredura .....	87
4.8.5. Comportamento eletroquímico de CAT sobre o ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	88
4.8.6. Otimização dos parâmetros estudados.....	89
4.8.7. Estudo de Repetibilidade .....	90
4.8.8. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	91
4.8.9. Curva analítica e aplicações.....	91
4.9. ECCM com Ni(OH) <sub>2</sub> para determinação de quercetina em chás.....	93
4.9.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	93
4.9.2. Estudo do efeito do pH .....	93
4.9.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura .....	93
4.9.4. Comportamento eletroquímico de QCT sobre o ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	94
4.9.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto.....	96
4.9.6. Estudo da Repetibilidade .....	97
4.9.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	97
4.9.8. Curva analítica e aplicações.....	97
4.10. ECCM com Ni(OH) <sub>2</sub> para determinação de rutina em formulações farmacêuticas.....	99
4.10.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	99
4.10.2. Estudo do efeito do pH .....	99
4.10.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura .....	99
4.10.4. Comportamento eletroquímico de Rut sobre o ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	100
4.10.5. Otimização dos parâmetros estudados para o método proposto.....	102
4.10.6. Estudo de Repetibilidade .....	102
4.10.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	103
4.10.8. Curva analítica e aplicações.....	103
4.11. ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> para determinação de BHA em maionese.....	105
4.11.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	105
4.11.2. Estudo do efeito do pH.....	105
4.11.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura .....	106
4.11.4. Comportamento eletroquímico de BHA sobre o ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	106
4.11.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto .....	108
4.11.6. Estudo da Repetibilidade .....	109
4.11.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	109
4.11.8. Curva analítica e aplicações.....	109

4.12. ECCM com Ni(OH) <sub>2</sub> para determinação de BHT em amostras de maionese e margarina.....	111
4.12.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	111
4.12.2. Estudo do efeito do pH .....	111
4.12.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura .....	111
4.12.4. Comportamento eletroquímico de BHT sobre o ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	112
4.12.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto .....	113
4.12.6. Estudo da Repetibilidade .....	114
4.12.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	114
4.12.8. Curva analítica e aplicações.....	115
4.13. ECCM com resina de troca iônica para determinação de rutina em formulações farmacêuticas.....	119
4.13.1. Estudo da composição do eletrodo.....	119
4.13.2. Estudo do efeito do eletrólito suporte.....	120
4.13.3. Estudo do efeito do pH .....	121
4.13.4. Estudo do efeito da velocidade de varredura.....	122
4.13.5. Comportamento eletroquímico de Rut sobre o ECCM-resina-Cu (II) ...	123
4.13.6. Estudo de Repetibilidade .....	125
4.13.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação.....	125
4.13.8. Curva analítica e aplicações.....	128
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....	130
CAPÍTULO 6 – ATIVIDADES FUTURAS.....	132
CAPITULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Composição de cada ECCM construído.....	30
TABELA 4.1. Estudo de adição e recuperação de catequina em chás verde e preto usando o método proposto.....	49
TABELA 4.2. Determinação de catequina em chás por HPLC e pelo método proposto.....	52
TABELA 4.3. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	57
TABELA 4.4. Determinação de quercetina em chás por HPLC e o método proposto.....	59
TABELA 4.5. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	63
TABELA 4.6. Determinação de rutina em formulações farmacêuticas por HPLC e pelo método proposto.....	65
TABELA 4.7. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	70
TABELA 4.8. Determinação de BHA em maionese por HPLC e pelo método proposto.....	72
TABELA 4.9. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	76
TABELA 4.10. Determinação de BHT em amostras de maioneses e margarinas por HPLC e pelo método proposto.....	78
TABELA 4.11. Parâmetros estudados para determinação simultânea de BHA e BHT por SWV.....	79
TABELA 4.12. Determinação de BHA e BHT em amostras de maioneses e margarinas usando o método proposto e HPLC.....	83
TABELA 4.13. Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e alguns autores.....	83
TABELA 4.14. Determinação de catequina em chás por HPLC e pelo método proposto.....	92
TABELA 4.15. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	96
TABELA 4.16. Determinação de QCT em chás por HPLC e pelo método proposto.....	97
TABELA 4.17. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	102
TABELA 4.18. Determinação de rutina em formulações farmacêuticas por HPLC e o método proposto.....	104
TABELA 4.19. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	108
TABELA 4.20. Determinação de BHA em maionese por HPLC e o método proposto.....	110

TABELA 4.21. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	114
TABELA 4.22. Determinação de BHT em maionese e margarina por HPLC e o método proposto.....	116
TABELA 4.23. Resultados obtidos para a quantificação de CAT, QCT, BHA e BHT utilizando o ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> e ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	117
TABELA 4.24. Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e alguns autores.....	118
TABELA 4.25. Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto.....	119
TABELA 4.26. Determinação de rutina em formulações farmacêuticas por HPLC e o método proposto.....	127
TABELA 4.27. Resultados obtidos para a quantificação de Rut utilizando os ECCMs propostos.....	128

## LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

ESQUEMA 2.1. Linhas gerais do desenvolvimento dos EQMs.....	12
FIGURA 1.1. Estrutura molecular da Catequina.....	5
FIGURA 1.2. Estrutura molecular da Quercetina.....	6
FIGURA 1.3. Estrutura molecular da Rutina.....	7
FIGURA 1.4. Estrutura molecular de BHA e BHT.....	8
FIGURA 2.1. Representação do processo de equilíbrio da adsorção e dessorção na superfície do eletrodo.....	13
FIGURA 2.2. Representação da modificação por ligação covalente sobre eletrodos metálico ou de carbono. ....	14
FIGURA 2.3. Classificação dos eletrodos compósitos empregados em eletroanalítica .....	16
FIGURA 2.4. Esquema da aplicação do potencial vs. tempo para a CV.....	22
FIGURA 2.5. Forma de aplicação de potencial na SWV.....	24
FIGURA 2.6. Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (a) e para um sistema totalmente irreversível (b).....	24
FIGURA 3.1. Representação esquemática de uma célula eletroquímica usada nas medidas voltamétricas. ....	28
FIGURA 3.2. Esquema do eletrodo proposto .....	31
FIGURA 4.1. MEV da superfície do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (A) e (B) micrografia obtida na ausência, (C) e (D) na presença de rutina.....	35
FIGURA 4.2. EDX da superfície do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (A) micrografia obtida na ausência e (B) na presença de rutina.....	36
FIGURA 4.3. MEV da superfície do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> (A) micrografia obtida na ausência e (B) na presença de rutina.....	37
FIGURA 4.4. MEV da superfície do ECCM-resina-Cu (A) micrografia obtida na ausência e (B) na presença de rutina.....	38
FIGURA 4.5. Efeito da percentagem m/m de Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -resina poliéster na composição do ECCM na presença de catequina.....	39
FIGURA 4.6. Ciclo voltamogramas obtidos com ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em diferentes eletrólitos suportes na presença e na ausência de catequina.....	41
FIGURA 4.7. Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> na presença de catequina.....	42
FIGURA 4.8. Resposta voltamétrica do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de CAT.....	43

FIGURA 4.9. Voltamograma cíclico para CAT (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	44
FIGURA 4.10. Dependência do potencial de pico com o pH.....	45
FIGURA 4.11. Mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> para a determinação de CAT.....	46
FIGURA 4.12. Dependência da corrente de pico com frequência de aplicação de pulso para CAT.....	47
FIGURA 4.13. Dependência da corrente de pico com a variação da amplitude de onda quadrada para CAT.....	47
FIGURA 4.14. Influência da variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico anódica para CAT.....	48
FIGURA 4.15. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de catequina, em detalhe a curva analítica obtida.....	50
FIGURA 4.16. Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> para a determinação de CAT em chá verde.....	51
FIGURA 4.17. Resposta voltamétrica do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de QCT.....	54
FIGURA 4.18. Voltamogramas cíclicos para QCT (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	54
FIGURA 4.19. Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.....	55
FIGURA 4.20. Voltamogramas de onda SW obtidos em diferentes concentrações de QCT; Em detalhe a curva analítica obtida .....	58
FIGURA 4.21. Resposta voltamétrica do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de Rut.....	61
FIGURA 4.22. Voltamograma cíclico para Rut (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	61
FIGURA 4.23. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de Rut, em detalhe a curva analítica obtida .....	64
FIGURA 4.24. Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> na presença de BHA.....	66
FIGURA 4.25. Resposta voltamétrica do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de BHA.....	67
FIGURA 4.26. Voltamogramas cíclicos para BHA (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	68
Figura 4.27. Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.....	69

FIGURA 4.28. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de BHA; Em detalhe a curva analítica obtida.....	72
FIGURA 4.29. Resposta voltamétrica do ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de BHT.....	74
FIGURA 4.30. Voltamograma cíclico para BHT (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	74
FIGURA 4.31. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de BHT; em detalhe a curva analítica obtida.....	77
FIGURA 4.32. Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em várias concentrações BHA na presença de BHT.....	80
FIGURA 4.33. Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em várias concentrações de BHT na presença de BHA.....	80
FIGURA 4.34. (A) Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> em várias concentrações de BHA e BHT.....	81
FIGURA 4.35. Efeito da percentagem m/m de Ni(OH) <sub>2</sub> -resina poliéster na composição do ECCM na presença de catequina.....	84
FIGURA 4.36. Efeito das soluções de eletrólito suporte estudadas para a determinação de CAT utilizando ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	86
FIGURA 4.37. Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> na presença de CAT.....	87
FIGURA 4.38. Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de CAT.....	87
FIGURA 4.39. Voltamograma cíclico para CAT (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	88
FIGURA 4.40. Dependência da corrente de pico com frequência de aplicação de pulso para CAT.....	90
FIGURA 4.41. Dependência da corrente de pico com a variação da amplitude de onda quadrada para CAT.....	90
FIGURA 4.42. Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de catequina; Em detalhe a curva analítica obtida.....	92
FIGURA 4.43. Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de QCT.....	94
FIGURA 4.44. Voltamogramas cíclicos para QCT (A) ECC não modificado e (B) ECCM- Ni(OH) <sub>2</sub> .....	95
FIGURA 4.45. Mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> na presença de QCT.....	96

FIGURA 4.46. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de QCT; Em detalhe a curva analítica obtida.....	98
FIGURA 4.47. Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de Rut.....	100
FIGURA 4.48. Voltamograma cíclico para Rut (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	100
FIGURA 4.49. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de Rut; Em detalhe a curva analítica obtida.....	104
FIGURA 4.50. Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> na presença de BHA.....	105
FIGURA 4.51. Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de BHA.....	106
FIGURA 4.52. Voltamograma cíclico para BHA (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	107
FIGURA 4.53. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de BHA Em detalhe a curva analítica obtida.....	110
FIGURA 4.54. Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de BHT.....	111
FIGURA 4.55. Voltamograma cíclico para BHT (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub> .....	112
FIGURA 4.56. Voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de BHT; Em detalhe a curva analítica obtida. ....	115
FIGURA 4.57. Efeito da composição do compósito do eletrodo sobre resposta voltamétrica do ECCM-resina-Cu (II) .....	120
FIGURA 4.58. Efeito das soluções de eletrólito suporte estudadas para a determinação de rutina utilizando ECCM com Resina-Cu (II).....	121
FIGURA 4.59. Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-resina-Cu (II) na presença de rutina. ....	122
FIGURA 4.60. Resposta voltamétrica do ECCM-resina-Cu (II) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.....	123
FIGURA 4.61 - Comportamento voltamétrico da rutina (A) ECC não modificado (B) ECCM-resina-Cu (II) na ausência; (C) na presença de rutina. ....	124
FIGURA 4.62. Mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-resina-Cu (II) para a determinação de Rut.....	125
FIGURA 4.63. Voltamograma de varredura linear obtido com ECCM-resina-Cu (II); Em detalhe curva analítica obtida.....	127

## Resumo

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE ELETRODOS COMPÓSITOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS COM HIDRÓXIDOS E FOSFATOS DE CÁTIOS METÁLICOS PARA DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ANALITOS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO E FARMACÊUTICO.** No presente trabalho descreve-se a construção e avaliação de três eletrodos compósitos de carbono modificados (ECCMs): ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> e ECCM-resina-Cu(II). Esses eletrodos foram aplicados na determinação de antioxidantes em amostras de alimentos como chás, maioneses e margarinas e, em formulações farmacêuticas, utilizando técnicas de voltametria cíclica, de onda quadrada e linear. Para tanto foram estudados alguns parâmetros como: o eletrólito suporte a ser utilizado em cada determinação, concentração do eletrólito suporte, pH, solubilidade das amostras, além dos parâmetros instrumentais para a técnica de voltametria cíclica usada para obtenção de informações sobre a reversibilidade dos sistemas e transferência de massa; parâmetros de onda quadrada (frequência de onda quadrada, amplitude de onda quadrada e incremento de varredura), e de voltametria linear (velocidade de varredura) usadas para a quantificação dos analitos estudados. O primeiro eletrodo estudado foi o ECCM com Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, onde a composição percentual deste eletrodo foi 40% (m/m) de pó de grafite, 40% (m/m) do modificador químico Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e 20% (m/m) de parafina sólida. Este eletrodo foi aplicado na determinação de antioxidantes naturais catequina (CAT), quercetina (QCT) e rutina (Rut) e, as melhores condições de trabalho obtidas foram: eletrólito suporte; tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH condicional 6,8) contendo 5, 20 e 10% de etanol (v/v) para CAT, QCT e Rut, respectivamente. Ademais, este eletrodo também foi aplicado na determinação dos antioxidantes artificiais BHA e BHT estudados nas seguintes condições: eletrólito suporte; KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (v/v) (pH 6,7) para ambos. Também foi possível determinar simultaneamente BHA e BHT utilizando o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> com bom desempenho analítico. As curvas analíticas obtidas para todas as determinações apresentaram uma boa linearidade, em torno de duas décadas e, limites de detecção da ordem de 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> para Rut e 10<sup>-8</sup> para os demais analitos. O segundo eletrodo proposto foi o ECCM modificado com

Ni(OH)<sub>2</sub>, para a determinação de antioxidantes naturais e artificiais já mencionados. As condições de trabalho para determinação de CAT, QCT e Rut foram: tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH condicional 6,9) contendo 5, 20 e 10% de etanol (v/v) para CAT, QCT e Rut, respectivamente. Para a determinação de BHA e BHT, as condições foram: eletrólito suporte: KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (v/v) (pH 6,7) para ambos. As curvas analíticas obtidas para todas as determinações de antioxidantes usando o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> apresentaram uma boa linearidade com intervalo de concentração em torno de duas décadas e limite de detecção da ordem de 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> para QCT, Rut e BHA e 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> para CAT e BHT. Os resultados obtidos empregando-se os métodos propostos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC sendo que todos os erros relativos foram menores que 5% para todas as determinações usando o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>. Também foi aplicado o teste t pareado para os resultados obtidos para cada analito estudado, sendo que nenhum obteve t<sub>experimental</sub> maior que o t<sub>tabelado</sub>, não havendo assim diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos a um nível de confiança de 95%. Finalmente, utilizou-se uma resina de troca catiônica carregada com íons Cu<sup>2+</sup> na modificação de um eletrodo, sendo este aplicado na determinação voltamétrica de rutina. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de Rut entre 9,90 × 10<sup>-7</sup> e 8,07 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, com limite de detecção de 2,65 × 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Neste trabalho destaca-se o aumento na seletividade desses eletrodos para determinação de antioxidantes em amostras de alimentos e fármacos, fato este observado pela diminuição dos potenciais de trabalho obtidos com os ECCMs para cada analito estudado em comparação aos potenciais de trabalho obtido para os mesmos analitos usando um ECC não modificado.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF CARBON COMPOSITE ELECTRODE MODIFIED WITH HYDROXIDE AND PHOSPHATE OF METALLIC CATIONS FOR VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF ANTIOXIDANTS IN FOOD AND PHARMACEUTICAL FORMULATIONS. The construction and evaluation of three modified carbon composite electrode (MCCE): MCCE-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, MCCE -Ni(OH)<sub>2</sub> and MCCE-resin-Cu(II) are described. These electrodes were applied for the determination of antioxidants in some food samples as teas, mayonnaise and margarine and in pharmaceutical formulations using: cyclic voltammetry (CV), linear sweep voltammetry (LSV) and square wave voltammetry (SWV). Several parameters were investigated such as: carbon composite composition, supporting electrolyte used in each determination, concentration of electrolyte, pH, solubility of the samples, besides the instrumental parameters for the technique used: cyclic voltammetry to get information about reversibility of the systems and mass transference (scan rate), parameters of square wave voltammetry (square wave frequency, square wave amplitude and sweep increment), and linear voltammetry (scan rate), both used for quantification of the antioxidants studied. The first electrode developed was MCCE with Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> immobilized in a polyester resin. The best voltammetric response was observed in a composite composition of 40% (m/m) of Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 40% (m/m) of graphite powder and 20% (m/m) of paraffin solid; 0.10 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (conditional pH 6.8) as the supporting electrolyte containing 5, 20 and 10% of ethanol (v/v) for determination of natural antioxidants: catechin (CAT), quercetin (QCT) and rutin (Rut) respectively. This electrode was also applied in the determination of artificial antioxidants BHA and BHT in the following conditions: 0.10 mol L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> (pH 6.7) containing 10% of ethanol (v/v) as the supporting electrolyte, with good analytical performance. The analytical curves obtained for all the determinations showed a good linear response in the concentration range around two decades and detection limits of magnitude 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> for Rut and 10<sup>-8</sup> for the other antioxidants. The second electrode proposed was MCCE with Ni(OH)<sub>2</sub> immobilized in a polyester resin for determination of natural and artificial antioxidants already mentioned. The best voltammetric response was observed in a composite composition of 20% (m/m) of Ni(OH)<sub>2</sub>, 60% (m/m) of graphite powder and 20% (m/m) of paraffin solid; 0.05 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (conditional pH 6.9) as the supporting electrolyte containing 5, 20

and 10% of ethanol (v/v) for determination of CAT, QCT and Rut respectively. For the determination of BHA and BHT, the conditions were: 0.10 mol L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> (pH 6.7) containing 10% of ethanol (v/v) as the supporting electrolyte for both. The analytical curves obtained for all the determination of antioxidants showed a good linear response in the concentration range around two decades and detection limits of magnitude 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> for QCT, Rut and BHA and 10<sup>-8</sup> for CAT and BHT. The results obtained by proposed methods were compared with the results obtained by HPLC and the relative errors were less than 5% for all the determination using MCCE-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and MCCE-Ni(OH)<sub>2</sub>. Student's t-test was applied for the results obtained for each antioxidants investigated. The results showed good accuracy of the methods. According to the t-test, the  $t_{\text{experiment}}$  was less than  $t_{\text{label}}$ , thus there are not significant differences between the results obtained by either procedure at 95% confidence level. Finally, a cationic exchange resin modified with Cu<sup>2+</sup> ions was used as modifier material in a CCEM, which was applied in the voltammetric determination of rutin. The analytical curve was linear in the rutin concentration range 9.90 x 10<sup>-7</sup> and 8.07 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, with a detection limit of 2.65 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. In this work was pointed out the increase in the selectivity of proposed electrodes for antioxidant determination in food samples and pharmaceutical formulations, due to the decrease of work potentials observed to proposed CCEMs for each antioxidant investigated in comparison to the ones obtained for the same antioxidant using a not modified CCE.

## **Capítulo 1 – INTRODUÇÃO**

---

## **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**

### **1. INTRODUÇÃO**

A oxidação é um processo inerente ao organismo animal e extremamente importante no seu metabolismo; contudo, ao mesmo tempo em que o oxigênio é essencial, sua presença pode ser perigosa devido à possibilidade de ocorrência de reações de oxidação, um processo de difícil controle, que pode causar a destruição de componentes importantes dos alimentos, como ácidos graxos essenciais, vitaminas lipossolúveis e pigmentos, além de danos às estruturas celulares e tecidos<sup>1</sup>.

Os aditivos alimentares têm sido usados por séculos para melhorar o sabor de alimentos como, por exemplo, sal em carnes, açúcar em frutas entre outros que geralmente são encontrados no cotidiano. Entretanto, com o advento da vida moderna, mais aditivos têm sido empregados, a cada ano. A existência de vários produtos modernos, tais como: os de baixo valor calórico, fast-food, salgadinhos embalados (snaks), não seriam possíveis sem os aditivos atuais. Estes são usados para preservar os alimentos, melhorar o seu aspecto visual, seu sabor e odor, e estabilizar sua composição. Além disso, são empregados para aumentar o valor nutricional e evitar a sua decomposição ou oxidação com o passar do tempo. O número de aditivos atualmente empregados cresce a cada dia, mas todos eles sofrem uma regulamentação federal no seu uso, alguns são permitidos somente em certas quantidades, enquanto que outros foram proibidos para consumo humano e de animais.

Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, são empregados na indústria de alimentos, compostos químicos conhecidos como antioxidantes.

#### **1.1. Antioxidantes**

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), antioxidantes são substâncias que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios e/ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação.<sup>2</sup> Pode-se definir antioxidante, de modo mais amplo, como substâncias que em

pequenas concentrações (0,01% ou menos), na presença de substratos oxidáveis, retardam ou previnem significativamente a oxidação dos mesmos<sup>3,4</sup>. Todavia, do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contem pelo menos uma hidroxila.

De acordo com seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados como terminadores de radicais livres (reagem com radicais livres interrompendo a propagação de reações); como varredores de oxigênio (desativam o oxigênio singlete que pode iniciar uma nova cadeia de propagação de radicais livres); ou como quelantes de íons metálicos capazes de catalisar a peroxidação lipídica.<sup>5</sup>

Os antioxidantes têm chamado atenção de pesquisadores na área nutricional e médica, devido ao seu potencial efeito na prevenção de doenças crônicas e degenerativas.<sup>6</sup> Dentre eles, os flavonóides constituem uma grande e importante classe de compostos com atividade biológicas como atividades antioxidante, antimalarial, anticarcinogênica, citotóxica, mutagênica e antimicrobial, as quais são atribuídas a sua capacidade redutora.<sup>7</sup>

### **1.1.1 Antioxidantes em alimentos**

O emprego de agentes antioxidantes visando o aumento do prazo de validade de produtos alimentícios é uma constante na área da tecnologia de alimentos. A Resolução n° 04 de 24/11/88 relaciona um total de 13 aditivos permitidos classificados como antioxidantes, possíveis de serem adicionados em aproximadamente 40 a 50 alimentos.<sup>8</sup>

A adição de antioxidantes em alimentos é um método simples de assegurar a estabilidade oxidativa dos produtos alimentícios,<sup>8</sup> como por exemplo inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos.<sup>9</sup>

Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes constituintes é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo. A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à

degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos.<sup>10-12</sup>

### **1.1.2. Histórico**

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados. O retardamento das reações oxidativas por certos compostos foi primeiramente registrado por BERTHOLLET, em 1797, e depois esclarecido por DAVY, em 1817<sup>13</sup>.

O curso da rancificação de gorduras permaneceu desconhecido até DUCLAUX demonstrar que o oxigênio atmosférico era o maior agente causador de oxidação do ácido graxo livre. Vários anos mais tarde, TSUJIMOTO descobriu que a oxidação de triglicerídeos altamente insaturados poderia provocar odor de ranço em óleo de peixe<sup>13</sup>.

WRIGHT, em 1852, observou que índios americanos do vale de Ohio preservavam gordura de urso usando casca de omeiro. Esse produto foi patenteado como antioxidante, 30 anos mais tarde<sup>13</sup>.

O conhecimento atual das propriedades de vários produtos químicos para prevenir a oxidação de gorduras e alimentos gordurosos começou com estudos clássicos de MOUREU e DUFRAISE, durante a I guerra mundial, sendo investigada a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. Esta pesquisa básica, combinada com a vasta importância da oxidação em praticamente todas as operações de manufatura, desencadeou uma busca por aditivos químicos para controlar a oxidação, que ainda hoje está em curso<sup>13</sup>.

Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano<sup>9</sup>.

Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento do alimento e este antioxidante adicionado e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que

normalmente seriam ingeridas no alimento. Além disso, na escolha de um antioxidante devem-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais.<sup>9</sup>

Atualmente a utilização de antioxidantes estende-se aos mais diferentes produtos como alimentos, cosméticos e fármacos.

Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos.<sup>14-19</sup>

## **1.2. Antioxidantes naturais**

Os flavonóides são considerados agentes antioxidantes amplamente distribuídos em alimentos. A dieta média de flavonóides para humanos é estimada em 16 a 1000 mg/dia.<sup>20</sup> Sob o ponto de vista nutricional, os flavonóides são reconhecidamente agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade LDL, além disso, reduzem significativamente a tendência a doenças trombóticas.<sup>21</sup>

### **1.2.1. Catequina**

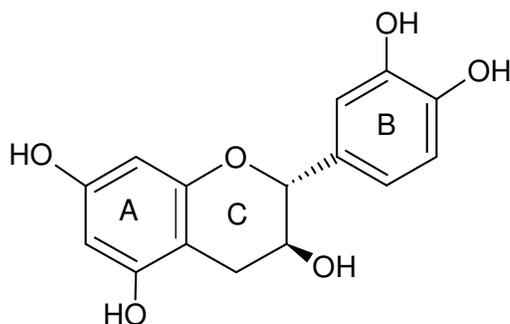
A catequina (CAT) pertence a classe dos antioxidantes naturais e está presente em uma variedade de alimentos como frutas, cereais, hortaliças, chocolate e bebidas como vinho tinto e chás,<sup>19, 22</sup> sendo mais comum em chá verde e chá preto.<sup>23</sup>

Freqüentemente, a catequina (FIGURA 1.1) é utilizada na prevenção da oxidação lipídica de óleos e gorduras em alimentos,<sup>24</sup> como suplemento para alimentação animal e como agente antimicrobiano em alimentos funcionais.<sup>25</sup>

Várias epidemiologias e estudos *in vitro* sugerem que a catequina possui efeitos benéficos à saúde humana agindo na prevenção de câncer,<sup>23</sup> diminuição da fragilidade capilar,<sup>20</sup> falência renal aguda, redução da incidência de isquemia miocárdica e casos de mortalidade por isquemia.<sup>23</sup> Entretanto, a predominância desses compostos em um dado alimento não necessariamente impõe um forte efeito antioxidante, podendo ocorrer alguns fenômenos como sinergismo, antagonismo etc.<sup>26</sup>

Diversos procedimentos são relatados na literatura para a determinação de catequina por métodos cromatográficos como HPLC com detecção na região do UV visível,<sup>27-29</sup> espectrometria de massa,<sup>30</sup> fluorescência<sup>31</sup> e detecção eletroquímica<sup>22, 30-34</sup>

JANEIRO & BRETT<sup>34</sup> investigaram a oxidação eletroquímica da (+)-catequina utilizando as técnicas de voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV), onde o mecanismo de oxidação relatado para os grupos catecol e resorcinol é dependente do pH.



**FIGURA 1.1.** Estrutura molecular da catequina

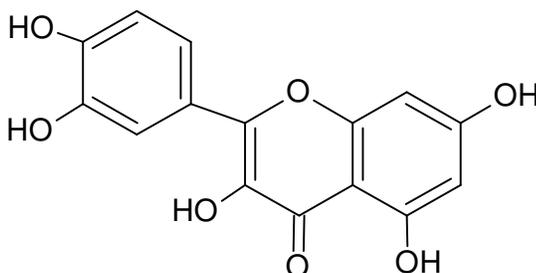
### 1.2.2. Quercetina

A quercetina, 3, 3', 4', 5, 7-pentaidroxilflavona (QCT) é um flavonóide de comum ocorrência em varias plantas<sup>26</sup> e também pertence a classe dos antioxidantes naturais. É o flavonóide mais abundante na dieta humana,<sup>35</sup> estando presente em chás, como o matte e camomila,<sup>23</sup> em alimentos sólidos (frutas, cereais, grãos, condimentos e nozes) e líquidos (suco de uva, cerveja e vinho tinto).<sup>36</sup> Devido à sua propriedade benéfica à saúde, as atividades químicas e biológicas desse flavonóide são amplamente estudadas.<sup>37</sup> Assim como outros flavonóides, a quercetina impede a oxidação do colesterol ruim LDL. A ação antiinflamatória da quercetina é causada pela inibição de enzimas, tais como o lipoxigenase, e pela inibição de mediadores inflamatórios. Inibe também a liberação de histamina.

Alguns estudos mostram que QCT (FIGURA 1.2) reduz o risco do câncer de próstata, ovário, mama e estomago. A quercetina parece também reduzir a produção do ácido úrico, melhorando os sintomas de gota, possui efeitos antiinflamatório e antialérgico. Todas estas atividades são causadas por sua ação antioxidante.<sup>35</sup>

É de grande importância o estudo do potencial tóxico da quercetina porque em algumas condições ela possui atividade genotóxica.<sup>20</sup>

Na literatura encontram-se alguns artigos sobre a determinação de quercetina por métodos eletroquímicos,<sup>38-44</sup> porém o método mais usado para a determinação de quercetina são os métodos cromatográficos principalmente HPLC com detecção UV-Vis.<sup>27, 45-50</sup> Contudo, BRETT e colaboradores<sup>41, 43</sup> investigaram o comportamento eletroquímico da interação da quercetina com o DNA. NEMATOLLAHI *et al.*<sup>49</sup> descreveram a eletrooxidação da quercetina na ausência e presença de ácido benzenosulfínico e ácido 4-toluenosulfínico como nucleófilos.



**FIGURA 1.2.** Estrutura molecular da quercetina

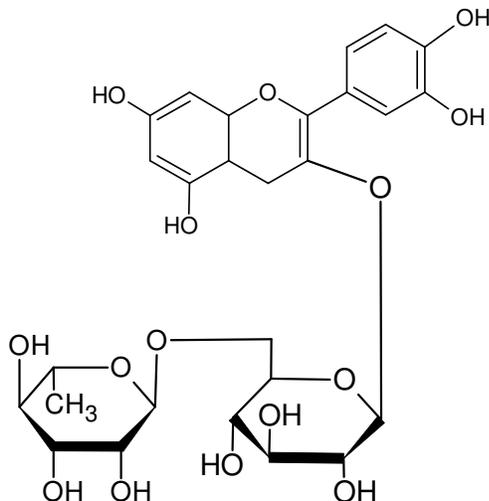
### 1.2.3. Rutina

A rutina (Rut), assim como a catequina e quercetina pertence à classe dos antioxidantes naturais e também é abundante na dieta humana.<sup>51</sup> Rut é um tipo de flavonóide glicosídico, denominada como vitamina P<sup>52</sup> (FIGURA 1.3) e, é amplamente encontrada em plantas, principalmente em *Flos Sophorae* e as folhas de outras espécies de plantas.<sup>53, 54</sup>

A rutina tem sido usada clinicamente na medicina terapêutica,<sup>52, 55</sup> sendo que há mais de 130 preparações registradas contendo este antioxidante a nível mundial.<sup>56</sup> Alguns estudos mostram que a rutina tem uma ampla gama de atividades fisiológicas, a saber: antiinflamatórios,<sup>57</sup> antitumorais e antibacteriana.<sup>58</sup>

Nos últimos anos, BRETT e colaboradores estudaram a eletrooxidação da rutina<sup>59</sup>, quercetina<sup>42</sup> e catequina<sup>34</sup> utilizando várias técnicas voltamétricas, sendo observado que os grupos hidroxilas destes compostos podem ser oxidados em diferentes potências dependentes do pH. Os mecanismos de oxidação são muito complicados devido à formação de múltiplos produtos.<sup>51, 55</sup>

VOLIKAKIS e EFSTATHIOU<sup>60</sup> examinaram a possibilidade de determinar doze flavonóides utilizando voltametria de redissolução adsortiva em um sistema de injeção em fluxo (FIA). Neste estudo foi utilizado eletrodos de pasta de carbono à base de grafite-Nujol e grafite-difeniléter.



**FIGURA 1.3.** Estrutura molecular da rutina

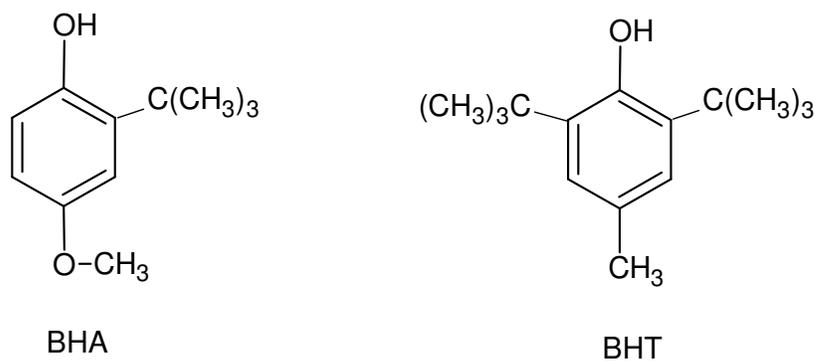
### 1.3. Antioxidantes sintéticos

BHA e BHT são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. A estrutura fenólica destes compostos (FIGURA 1.4) permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação.

BHT possui propriedades similares ao BHA, porém, enquanto o BHA é um sinergista para propilgalatos, o BHT não o é. BHA e BHT podem conferir odor em alimentos quando aplicados em altas temperaturas em condição de fritura, por longo período<sup>13</sup>.

O BHA e o BHT são sinergistas entre si. O BHA age como sequestrante de radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista,<sup>61</sup> e apresenta resultados efetivos em baixas concentrações, como em dosagens de 0,03% a 0,1% em óleos e gorduras e de 0,01% a 0,02% em óleos essenciais ou regenerador de radicais BHA<sup>9</sup>.

Sob o aspecto farmacológico uma das grandes vantagens associadas ao uso de BHA é que, além de evitar a oxidação dos medicamentos, esse aditivo também auxilia na estabilização da vitamina E e, aumenta a estabilidade da vitamina A e de seus derivados, trazendo benefícios para a saúde humana.



**FIGURA 1.4.** Estruturas moleculares de BHA e BHT

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais.<sup>62</sup> Em outros estudos, o BHA mostrou induzir a hiperplasia gastrintestinal em roedores por um mecanismo desconhecido; em humanos, a relevância dessa observação não está clara.<sup>63</sup>

No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita em 200 mg/kg para BHA e em 100 mg/kg para BHT como concentrações máximas permitidas.<sup>8</sup> Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, a partir do início da década de 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos devido ao seu potencial carcinogênico, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático.<sup>4, 9, 18, 19, 25</sup>

Há diversos artigos sobre métodos de determinação de BHA e BHT em várias amostras de alimento, principalmente em óleos e gorduras, a saber: métodos cromatográficos como: HPLC com detecção no UV visível,<sup>64-67</sup> cromatografia gasosa,<sup>68</sup> HPLC-espectrometria de massas,<sup>69</sup> HPLC com detecção amperométrica,<sup>70</sup>

análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica<sup>71-74</sup> e métodos voltamétricos<sup>75-77</sup> usando microeletrodos.<sup>78, 79</sup>

JAYASRI & NARAYANAN<sup>76</sup> determinaram BHA em batatas industrializadas usando um eletrodo compósito de grafite-parafina quimicamente modificados com hexacianoferrato de prata. Neste estudo foi usado técnicas de voltametria cíclica e amperometria acoplada a um sistema em fluxo, em solução de nitrato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , onde o limite de detecção foi de  $3,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . O mecanismo proposto ocorre em duas etapas de oxidação. Primeiramente uma etapa eletroquímica referente à eletrooxidação do hexacianoferrato(II) a hexacianoferrato(III) e a segunda referente à oxidação química BHA à TBQ.

Outro estudo interessante sobre a determinação de BHA e BHT presente na literatura foi desenvolvido por RAYMUNDO e colaboradores.<sup>75</sup> Neste trabalho são utilizados métodos voltamétricos de onda quadrada (SWV), pulso diferencial (DPV) e voltametria cíclica (CV) para a determinação simultânea de três antioxidante BHA, BHT e TBHQ, utilizando dois eletrodos de trabalho, um eletrodo de carbono vítreo e um eletrodo de platina. Os resultados obtidos usando os dois eletrodos e técnicas voltamétricas diferentes foram comparados considerando-se a sensibilidade e o limite de detecção obtidos com cada eletrodo e técnicas diferentes.

#### **1.4. Objetivos**

Este trabalho teve como objetivo a construção e avaliação de três eletrodos sendo estes: eletrodo compósito de carbono quimicamente modificado (ECCM) com fosfato de cobre; ECCM- hidróxido de níquel e ECCM-resina de troca iônica modificada com íons  $\text{Cu}^{2+}$  e posterior aplicação desses eletrodos na determinação e quantificação de antioxidantes em amostras de alimentos e formulações farmacêuticas empregando técnicas de voltametria cíclica, linear e de onda quadrada.

## **Capítulo 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

---

## CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. Eletrodos quimicamente modificados

A denominação eletrodos quimicamente modificados (EQMs) surgiu na década de 70,<sup>80</sup> para definir eletrodos com espécies quimicamente ativas devidamente imobilizadas na superfície desses dispositivos. A imobilização destes modificadores na superfície do eletrodo permite controlar as propriedades físico-químicas da interface eletrodo-solução para promover características desejáveis ao eletrodo, como por exemplo, melhorar a transferência eletrônica entre o eletrodo e o analito em solução,<sup>81</sup> aumentar a seletividade das determinações pela diminuição do potencial de trabalho ou atuando como uma barreira entre a superfície do eletrodo e certas espécies químicas concomitantes. Ademais, a maioria destes eletrodos modificados apresentam um aumento da sensibilidade das determinações (aumento do coeficiente angular da curva analítica).

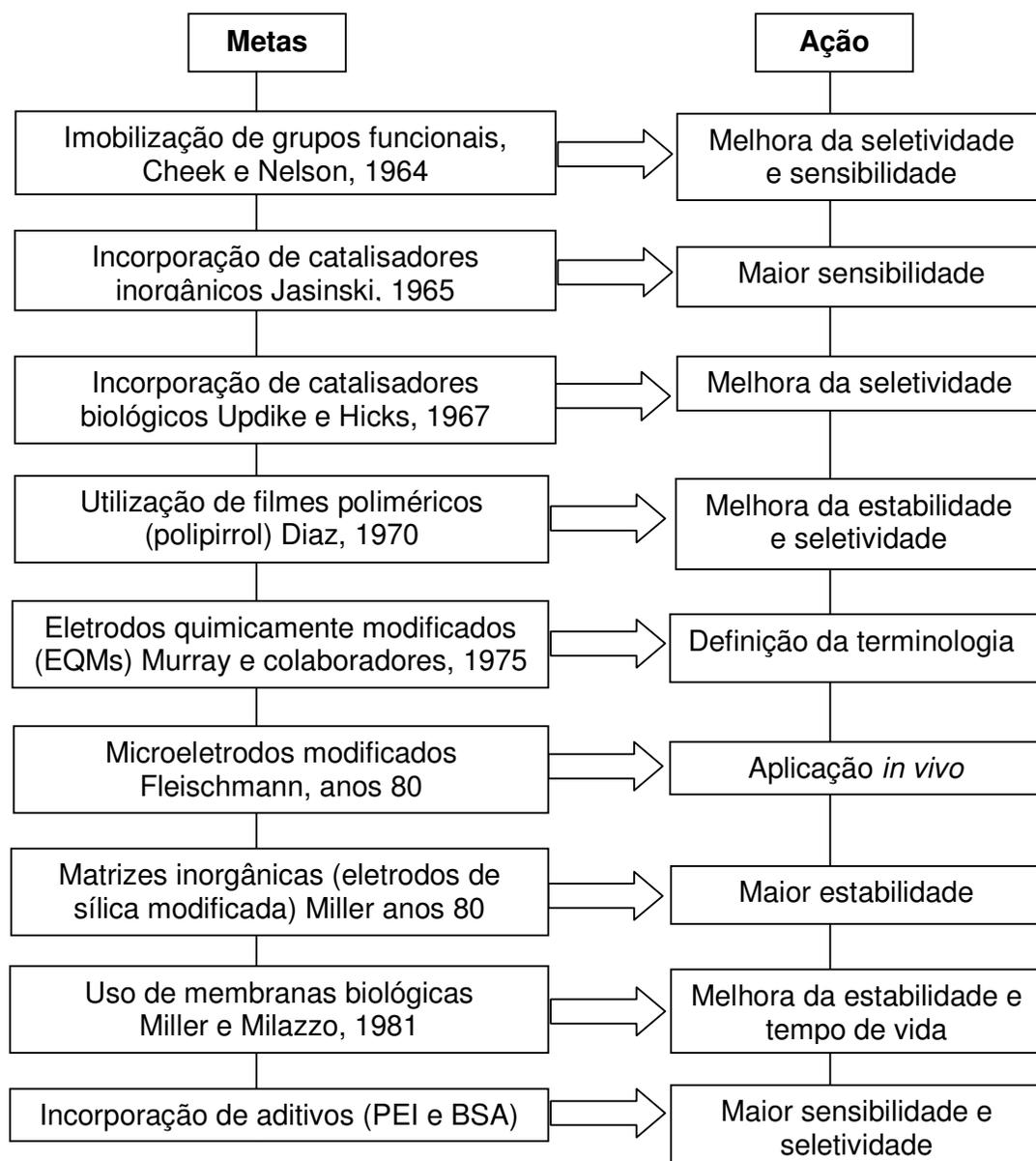
O primeiro exemplo de uma modificação da superfície de um eletrodo foi o trabalho de LANE E HUBBARD.<sup>82</sup> Estes pesquisadores adsorveram na superfície de eletrodos de platina várias olefinas funcionalizadas, explorando a propensão de grupos alceno quimisorverem-se sobre este metal. Um tópico deste artigo foi a verificação da capacidade do ácido 3-*alil*-salicílico coordenar ferro seletivamente, em função do potencial aplicado. Estes estudos mostraram a grande utilidade analítica dos EQMs, pois demonstraram a capacidade de um grupo imobilizado complexar um íon metálico, e também a possibilidade de se direcionar a coordenação através da escolha do potencial aplicado.

Em 1975<sup>83</sup> foi publicado um trabalho descrevendo a construção de um eletrodo quiral para eletrossíntese de álcoois a partir da redução de cetonas. Também em 1975<sup>80</sup> foi publicado o clássico artigo de MURRAY e colaboradores descrevendo a modificação química da superfície de eletrodos de SnO<sub>2</sub> via organosilanos.

A partir desses trabalhos pioneiros, a preparação e utilização de EQMs têm se expandindo de forma bastante acentuada, como pode ser ratificado pelo expressivo número de artigos publicados sobre este tema nos últimos anos. Além da eletroanálise, que se destaca como uma das áreas mais ativas nesse campo, os EQMs têm sido utilizados em outras áreas como: química ambiental, controle de qualidade, análise clínica, indústria de alimentos, etc.

PEREIRA *et al.*<sup>84</sup> estudaram a evolução dos eletrodos modificados e sintetizaram um quadro esquemático considerando a construção do eletrodo e os melhoramentos alcançados com o passar do tempo (esquema 2.1).

Dois pontos importantes devem ser lembrados, o porquê de modificar eletrodos, ou seja, a busca da melhoria na cinética de transferência eletrônica, sensibilidade, seletividade entre outras, e como realizar a modificação do eletrodo.



**Esquema 2.1-** Linhas gerais do desenvolvimento dos EQMs<sup>84</sup>

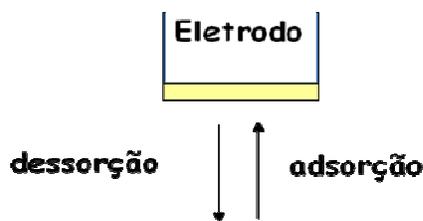
## 2.2. Métodos de modificação da superfície do eletrodo

Uma área de pesquisa ativa na eletroquímica é o desenvolvimento de eletrodos que são produzidos por meio de modificação química de vários substratos condutores. As modificações incluem a presença de substratos adsorvidos irreversivelmente com funcionalidades desejadas.<sup>85</sup>

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Esse substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podem ser citados o ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio, na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono.<sup>84</sup>

### 2.2.1. Adsorção

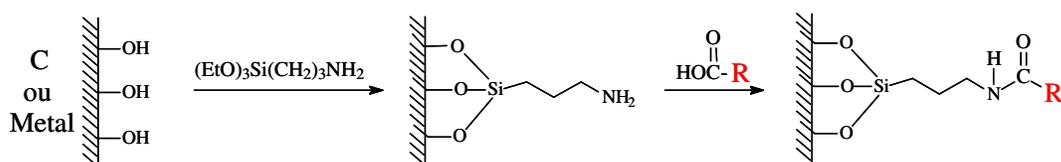
A adsorção, ou mais apropriadamente quimisorção foi o processo pioneiro de modificação de eletrodos e é a mais simples maneira de fixar um modificador ao substrato. Este consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução com posterior evaporação do solvente. Os substratos mais utilizados são o carbono vítreo, carbono pirolítico, pasta de carbono, compósitos, grafite, mas diversos outros materiais eletródicos podem ser empregados nesse procedimento, como ouro, prata, platina, entre outros. Embora simples, a adsorção apresenta a desvantagem de produzir apenas uma monocamada do modificador imobilizado, o que limita a faixa de resposta linear. Outra desvantagem é o processo de equilíbrio da adsorção com a dessorção (FIGURA 2.1) do modificador o que resulta na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do EQM.<sup>84, 86</sup>



**FIGURA 2.1.** Representação do processo de equilíbrio da adsorção e dessorção na superfície do eletrodo

### 2.2.2. Ligação covalente

Esse tipo de modificação é realizado com base na reatividade da superfície do eletrodo, sendo empregada para a incorporação de um grande número de substâncias.<sup>87-89</sup> É formada por uma ligação covalente entre o substrato e o modificador. Para exemplificar; um eletrodo metálico ou de carbono pode ser oxidado para promover a formação de grupos hidroxilas na superfície e depois ser submetido a reações de silanização envolvendo organossilanos para posteriormente reagir com outras moléculas do modificador, levando a incorporação do grupo funcional que se queira imobilizar.<sup>90</sup> A FIGURA 2.2 representa a modificação da superfície do eletrodo por ligação covalente.



**FIGURA 2.2.** Representação da modificação por ligação covalente sobre eletrodos metálico ou de carbono.

O silano atua como um tipo de ponte para fixar o grupo funcional específico da superfície do eletrodo.<sup>86</sup> Este método é bastante estável, mas requer maior tempo para sua execução; geralmente é empregado na imobilização de enzimas,<sup>88-91</sup> mas também pode ser aplicado para outras substâncias.<sup>92</sup>

Da mesma forma que a modificação por adsorção, este método também gera a formação de no máximo uma monocamada imobilizada o que limita a faixa de resposta linear.<sup>86</sup>

### 2.2.3. Recobrimento com membrana polimérica

Esta técnica consiste no recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito suporte e a espécie de interesse. Ao contrário dos métodos de adsorção e ligação covalente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie

ativa na superfície modificada, o que resulta na ampliação da resposta eletroquímica.<sup>84, 86</sup>

Em geral, os filmes poliméricos são classificados em quatro classes: condutores, não condutores, de troca iônica e de membranas compostas.<sup>84</sup> Dependendo da aplicação pode ser escolhido um polímero eletroativo (se o objetivo é a eletrocatalise), quimicamente ativo (propriedade ligante ou de troca iônica para pré concentração), ou inerte (apenas exclusão de interferentes ou imobilização de um modificador).<sup>86</sup>

Desta forma, filmes poliméricos têm sido empregados em EQMs e usados no desenvolvimento de sensores para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes ou outro material ativo, incorporar mediadores de elétrons e fornecer biocompatibilidade.<sup>84</sup>

#### **2.2.4 Materiais compósitos**

Os materiais compósitos como o próprio nome indica são formados pela combinação de duas ou mais fases de diferente natureza. Cada fase mantém suas características individuais, mas a mistura pode apresentar novas características físicas, químicas, mecânicas ou biológicas diferentes daquelas apresentadas pelo material original.<sup>93</sup> Compósitos com características condutoras são utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos com excelentes resultados. Como exemplos tem-se o emprego de compósitos de grafite-epóxi na determinação amperométrica de pesticidas<sup>94</sup> e, o emprego de compósito grafite-borracha de silicone na determinação voltamétrica de rutina em fármacos.<sup>95</sup>

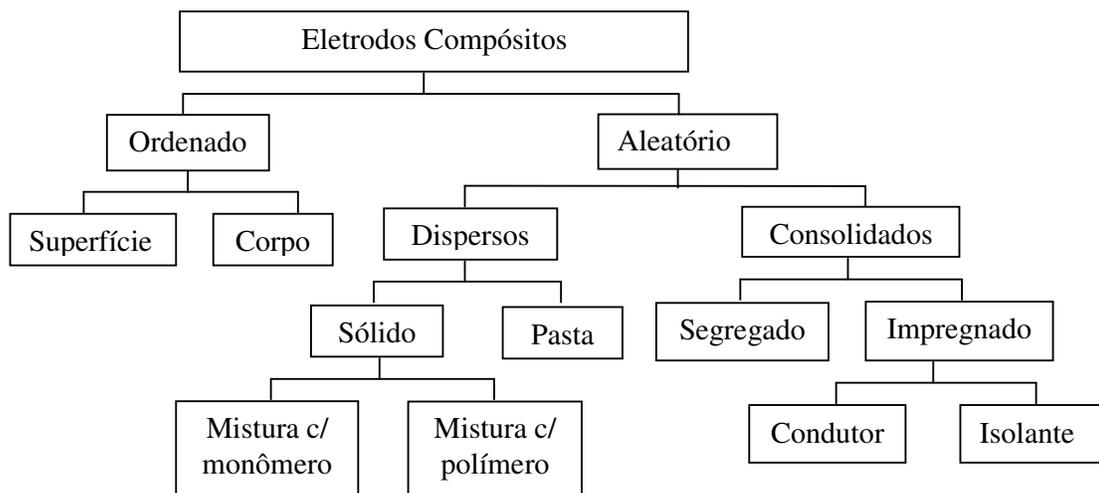
As propriedades elétricas dos compósitos dependem da natureza de cada componente, sua quantidade relativa e distribuição. A resistividade elétrica é determinada pela conectividade das partículas condutoras dentro da matriz polimérica. Isto significa que a quantidade relativa de cada componente do compósito deve ser estudada para se determinar as condições ótimas.<sup>93</sup>

Os compósitos são formados, de pelo menos uma fase condutora (geralmente à base de carbono) e uma fase aglutinante (material polimérico ou um líquido orgânico). Os eletrodos construídos empregando-se o uso de materiais poliméricos, como agente aglutinante, geralmente fornecem um aspecto rígido para o eletrodo, como é o caso da resina epóxi,<sup>96, 97</sup> silicone,<sup>95, 98</sup> resina poliéster,<sup>99</sup>

poliuretana,<sup>100, 101</sup> enquanto o uso de um solvente orgânico ou óleo mineral fornece um material eletródico com uma consistência pastosa, destacando-se o eletrodo de pasta de carbono.

Os polímeros envolvidos nestes materiais fornecem certa estabilidade, da mesma forma que os compósitos gerados passam a adquirir características eletroquímicas particulares. Materiais à base de carbono são fases condutoras ideais na elaboração de materiais compósitos.<sup>84, 86</sup> Estes materiais são bastante inertes quimicamente, apresentam grande intervalo de potencial de trabalho; baixa resistência e baixa corrente residual.<sup>102</sup>

TALLMAN E PETERSEN<sup>103</sup> classificaram os eletrodos compósitos de acordo com a distribuição do condutor e isolante no material eletródico, como apresentado na FIGURA 2.3.



**FIGURA 2.3.** Classificação dos eletrodos compósitos empregados em eletroanalítica.<sup>103</sup>

De acordo com essa classificação, o arranjo do condutor e isolante no material eletródico é ordenado ou aleatório. Segundo esses autores, se ordenado, o condutor está confinado à superfície de um isolante (ou o contrário), ou o condutor ordenado atravessa o interior do material, que é mais raro. Os materiais compósitos classificados como aleatório, são os mais numerosos, pois são de fácil preparação. Esses compósitos podem ser classificados de acordo com o arranjo da fase condutora na matriz polimérica, tais como compósitos de dispersão (quando o

material condutor esta aleatoriamente distribuído e suas partículas ocupam espaços iguais na matriz) e compósitos de consolidação (quando o condutor é dominante em áreas claramente definidas e o isolante está em maior teor).<sup>93</sup>

A facilidade de preparação desses materiais eletródicos permite construir sensores de tamanhos e formas diferentes, e a incorporação de uma variedade de modificadores, os quais podem aumentar a seletividade e sensibilidade do eletrodo.

Durante a última década, o desenvolvimento de eletrodos compósitos utilizando polímeros como aglutinantes mostrou um crescente interesse em eletroanalítica. O número de artigos publicados sobre eletrodos compósitos é grande, podendo-se ser citados os eletrodos de grafite-epóxi,<sup>96, 97, 104, 105</sup> grafite-poliéster,<sup>99, 106-108</sup> grafite-PVC,<sup>109</sup> grafite-polipirrol,<sup>110</sup> grafite-polietileno,<sup>111</sup> grafite- parafina<sup>76, 112-115</sup> entre outros, os quais tem sido propostos para determinação voltamétrica e amperométrica de vários analitos de interesse.

### **2.3. Modificadores**

A facilidade de modificação é uma vantagem adicional dos compósitos sobre os condutores metálicos tradicionais. A modificação de superfície de sensores eletroquímicos à base de condutores puros é geralmente difícil e cara. Os eletrodos à base de compósitos são de fácil modificação da superfície; devido sua natureza plástica. Essa modificação pode ser feita durante a preparação da matriz do compósito. O modo de ação pode ser direcionado de acordo com o objetivo, por exemplo, agir no analito, pré-concentrando-o na superfície do eletrodo; ou agir como catalisadores ou imobilizadores de algumas moléculas envolvidas nas reações eletroquímicas ou ainda alterar as propriedades físicas da superfície do eletrodo.

O principal objetivo dos modificadores (catalisadores, mediadores redox, materiais inertes etc.) é diminuir o potencial de trabalho do sensor voltamétrico de modo a aumentar a seletividade analítica e, também, aumentar o sinal analítico.

#### **2.3.1. Fosfato de cobre (II) – $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$**

Uma das mais importantes técnicas de modificação de um eletrodo envolve a formação de um sistema electrocatalítico em que uma espécie redox é incorporada

na superfície do eletrodo. Estes eletrodos reduzem o potencial de oxidação ou de redução dos compostos analisados.

A química da superfície do cobre metálico é muito complexa e existem alguns estudos de voltametria em diferentes intervalos de pH das soluções.<sup>116-118</sup> Alguns compostos como óxidos<sup>119-121</sup>, complexos, ou ligas de cobre<sup>122, 123</sup> possuem propriedades eletrocatalíticas. A ação catalítica do cobre tem sido relatada na literatura como sendo o resultado do par redox Cu (II)/Cu (I) ou em potencial positivo mais elevado é relatado o sistema redox do Cu (III) /Cu (II).<sup>124</sup>

A literatura traz alguns trabalhos, principalmente na determinação de aminoácidos<sup>125, 126</sup> e carboidratos<sup>127-130</sup>, onde eletrodo de cobre usado em meios tamponantes como fosfato e carbonato, possibilita a análise de substâncias orgânicas. Atualmente, o eletrodo de cobre é muito utilizado, tanto na forma de ligas metálicas (que aumentam o seu poder catalítico)<sup>131</sup> como substratos para depósitos de filmes<sup>132</sup> quanto na forma de eletrodos modificados com óxidos<sup>124</sup> e fosfato de cobre.<sup>133</sup>

O comportamento eletroquímico de um eletrodo de pasta de carbono modificado com óxido de cobre (I) (Cu<sub>2</sub>O) foi investigado por DURSUN e NISLI<sup>124</sup> em diferentes soluções tampão na presença do ácido ascórbico e de cisteína. Os resultados voltamétricos revelaram que a cisteína formou um complexo pouco estável com Cu (I) em -0,65V vs eletrodo de calomelano saturado (ECS) em tampão borato (pH 9.2) e o ácido ascórbico formou um complexo com Cu (II) na superfície do eletrodo em -0,07 V vs ECS em tampão fosfato (pH 6.9).

Encontra-se também na literatura a utilização do fosfato de cobre na construção de reatores de fase sólida utilizados em sistemas de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação de ácido ascórbico em formulações farmacêuticas<sup>51</sup> e aspartame em adoçantes.<sup>134</sup> Nestes trabalhos, o fosfato de cobre é imobilizado em resina de poliéster e depois são utilizados na construção dos reatores em fase sólida.

Além de todas estas aplicações de compostos de cobre também está em processo de patente um eletrodo de cobre/fosfato de cobre para ser utilizado como eletrodo de referência. Cujo título e texto do processo de patente são respectivamente: "*Processo de preparação de um eletrodo de cobre/fosfato de cobre e sua aplicação como eletrodo de referência*" (n.º patente:PI0402392-7); "A presente invenção tem por objetivo a preparação de um eletrodo de referência de cobre/fosfato

de cobre dopado com íon cloreto, para obter um eletrodo que apresente grande estabilidade nas medições ao longo do tempo e capaz de atuar com potencial estável em qualquer tipo de ambiente, inclusive naqueles contendo íons cloreto” .<sup>135</sup>

### 2.3.2. Hidróxido de níquel – Ni(OH)<sub>2</sub>

O níquel é um metal bastante utilizado em diversas aplicações tecnológicas, devido à sua resistência a meios fortemente alcalinos e suas características catalíticas. O níquel é largamente empregado tanto como eletrodo quanto em baterias alcalinas e células combustíveis.<sup>136</sup>

Eletrodos modificados com níquel e/ou seus compostos tais como: hexacianoferratos de níquel, hidróxidos e complexos de níquel têm sido usados na oxidação e determinação de compostos orgânicos.<sup>137-139</sup> Estudos eletroquímicos usando eletrodos a base de níquel mostraram que várias espécie eletroativas podem ser determinadas em um processo heterogêneo de transferência de elétron, com boa sensibilidade e reprodutibilidade. Nestes estudos, ocorre a presença de várias espécies na superfície do eletrodo, tais como: NiO, e o Ni(OH)<sub>2</sub>.<sup>137, 139</sup>

MANI E NEUFVILLE<sup>140</sup> estudaram o hidróxido de níquel quimicamente e eletroquimicamente impregnado nos poros de placas de níquel sintetizado, empregando análise termogravimétrica (TGA) e análise termogravimétrica diferencial (DTG) em amostras de ar, nitrogênio e vácuo. Concluíram que com o aumento da temperatura ocorrem dois tipos de reações químicas em ambos os tipos de eletrodos (quimicamente e eletroquimicamente impregnados). Uma reação é devida a desidratação de Ni(OH)<sub>2</sub> e a outra é devida a decomposição de Ni(OH)<sub>2</sub> à oxido.

O hidróxido de níquel é um importante material eletroativo para muitas aplicações de interesse.<sup>137,141-144</sup> Um esquema que representa as reações eletroquímicas do hidróxido de níquel e a presença de diferentes formas cristalizadas foi proposto por BODE *et al.*<sup>145</sup> Além disso, outros eletrodos como eletrodo de carbono vítreo modificados com hidróxido de níquel, eletrodos de carbono modificados com complexos de níquel, ou ligas de níquel tem sido estudados e aplicados em determinações amperométricas de carboidratos, amins e aminoácidos,<sup>131, 146, 147</sup> oxidação eletrocatalítica do álcool<sup>148, 149</sup> e peróxido de hidrogênio,<sup>150</sup> sendo também são relatados para o desenvolvimento de tecnologia para célula combustível.<sup>151</sup>

### 2.3.3. Resina de troca iônica

O uso de resina de troca iônica tem se tornado uma das técnicas mais amplamente empregada no tratamento de efluentes industriais. Existem muitas razões para o uso desta técnica como, por exemplo; a possibilidade de regeneração da resina e fácil processo de operação. O maior problema do trocador iônico convencional é a dificuldade de alteração da razão da adsorção química. Um possível caminho para superar este problema, é incorporar um trocador iônico em um eletrodo, o que resulta em um eletrodo quimicamente modificado.

O desenvolvimento de eletrodos modificados com trocadores iônicos varia de acordo com a aplicação. Geralmente, três métodos são utilizados para incorporar trocadores iônicos na superfície do eletrodo: a) adição de resinas de troca iônica a uma mistura de grafite e aglutinante; b) adsorção de filmes trocadores iônicos na superfície do eletrodo e c) geração eletroquímica de polímeros com propriedades de troca iônica na superfície do eletrodo.

Muitos artigos são descritos na literatura utilizando eletrodos modificados com resina de troca iônica,<sup>115, 152-159</sup> com objetivo de acumular e pré-concentrar diferentes cátions metálicos na superfície do eletrodo.

LUPETTI *et al.*<sup>152</sup> desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono modificado (EPCM) com íons triiodeto imobilizado em resina aniônica (Lewatit M500) que foi utilizada para a determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV). Este procedimento foi satisfatório para determinação de adrenalina em formulações farmacêuticas com limite de detecção de  $4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ .

Mais recentemente, FREITAS *et al.*<sup>115</sup> desenvolveram um eletrodo compósito de carbono modificado com resina de troca catiônica carregada com íons Cu(II) (Amberlite IRA 120) para determinar rutina em formulações farmacêuticas utilizando técnicas de voltametria linear e cíclica.

### 2.4. Métodos Eletroquímicos

Uma grande variedade de técnicas eletroquímicas tem sido utilizada na eletroanálise. Esses métodos podem ser divididos em duas classes: métodos eletrolíticos e métodos não eletrolíticos. Os métodos eletrolíticos são baseados em

fenômenos físico-químicos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo e a solução da amostra. Já os métodos não eletrolíticos são baseados nos fenômenos que ocorrem no seio da solução. As técnicas voltamétricas são exemplos de métodos eletrolíticos.<sup>160</sup>

### **2.4.1. Voltametria**

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise de uma espécie em uma cela eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos.<sup>161</sup> Baseia-se na medida da corrente sob condições de completa polarização de concentração, na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo.<sup>161</sup>

A voltametria apresenta algumas vantagens, principalmente com relação à possibilidade de realizar determinações analíticas em matrizes com alta concentração salina (como águas marinhas e soluções salinas para hemodiálise) e baixos limites de detecção alcançados. Além disso, os métodos voltamétricos são vantajosos com relação ao custo da análise, principalmente no que se refere à aquisição e manutenção do equipamento, além do tempo necessário para a análise ser significativamente menor em relação a outros métodos.<sup>162, 163</sup>

#### **2.4.1.1. Voltametria cíclica**

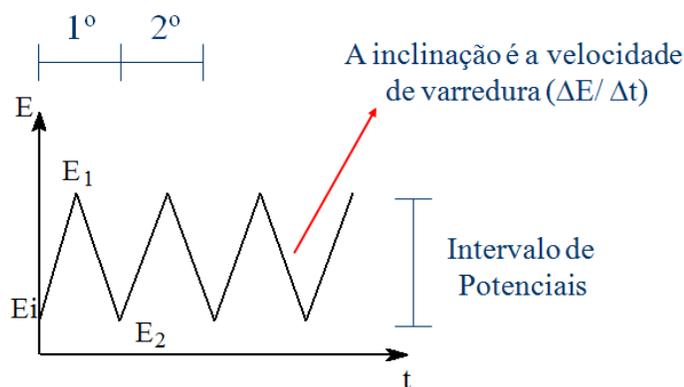
Embora não seja utilizada com frequência em análise quantitativa, a voltametria cíclica (VC) é amplamente aplicada para obter informações qualitativas sobre reações eletroquímicas, devido a sua habilidade de obter rapidamente informações termodinâmicas consideráveis do processo redox, da cinética de reações de transferência de elétrons, da detecção de intermediários de reação e de reações químicas acopladas ou processo adsorptivos, como também determinar o processo pelo qual as espécies chegam a superfície do eletrodo (adsorção ou difusão).<sup>85, 162-164</sup>

Na voltametria cíclica, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia continuamente com o tempo na forma de onda triangular (FIGURA 2.4), partindo de um valor inicial  $E_i$ , até um valor limite pré-determinado,  $E_1$ . Ao alcançar  $E_1$ , a direção

da varredura é invertida e um caminho inverso é percorrido até chegar a  $E_2$ , que pode ser o valor do potencial inicial  $E_i$ , ou outro valor de potencial pré-estabelecido. O sinal de corrente registrado dá origem ao voltamograma que se trata de uma curva de potencial vs corrente. Um estudo do voltamograma pode fornecer informações do comportamento eletroquímico da espécie em estudo.<sup>160</sup>

Para sistemas reversíveis e controlados por difusão, os voltamogramas devem conter ondas distintas de picos anódico e catódico para espécies eletrizadas desde que nenhuma transferência convectiva de massa seja empregada. A corrente de pico é proporcional à concentração da espécie oxidada ou reduzida e também é proporcional a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ); a razão entre as correntes de pico anódica e catódica é igual a unidade e o potencial de pico independe da velocidade de varredura. Para sistemas irreversíveis, os voltamogramas não apresentam pico inverso, o potencial de pico é dependente da velocidade de varredura e desloca-se para potenciais mais positivos.<sup>165-168</sup>

Uma das aplicações mais importantes da voltametria cíclica é para análise qualitativa de reações químicas que precedem ou sucedem o processo redox. Tais mecanismos de reação geralmente são classificados usando a nomenclatura E e C, do inglês electrochemistry and chemistry, para etapas eletroquímicas e químicas, respectivamente.<sup>160, 164</sup>



**FIGURA 2.4.** Esquema da aplicação do potencial vs. tempo para a CV

#### 2.4.1.2. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada, do inglês square wave voltammetry (SWV) foi primeiramente relatada por BARKER em 1957, sendo pouco utilizada até que RAMALEY e KRAUSE desenvolveram a teoria para essa técnica e apresentaram

algumas aplicações usando eletrodo gotejante de mercúrio.<sup>169, 170</sup> As discussões de RAMALEY e KRAUSE<sup>171,172</sup> foram limitadas a pequenas amplitudes e, conseqüentemente, para pequenas velocidades de varredura.

Estes mesmos autores substituíram o eletrodo gotejante de mercúrio por eletrodos estacionários eliminando os ruídos provenientes do capilar de mercúrio, e também substituíram a rampa linear de potencial por uma rampa de potencial na forma de escada.

Em 1977, CHRISTIE, TURNER e OSTERYOUNG,<sup>169, 173, 174</sup> desenvolveram um estudo onde a medida de corrente era realizada ao final do pulso de potencial, o que possibilitou que as varreduras de corrente em função dos pulsos de potenciais aplicados fossem feitas em velocidades superiores a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , este é o modelo mais atual de SWV.

A SWV é uma técnica voltamétrica de pulso onde a forma do pico de corrente resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura  $a$  (amplitude de pulsos), a uma escada de potenciais de largura  $\Delta E_s$  (incremento de varredura de potenciais) e duração  $2t$  (período). A FIGURA 2.5 apresenta a forma de aplicação do potencial da SWV.<sup>175</sup>

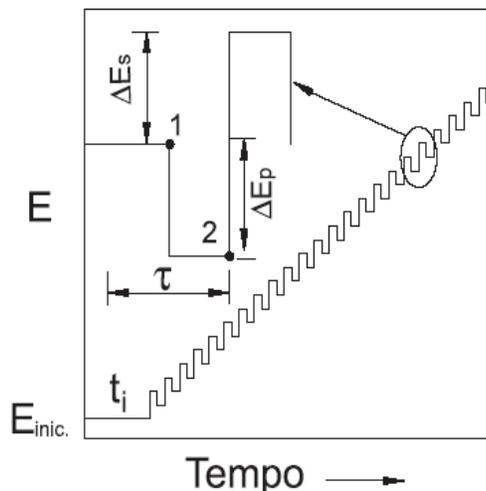
As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos (no sentido da varredura) e reversos (no sentido oposta da varredura) e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas.<sup>176</sup>

Na FIGURA 2.6 estão representados os voltamogramas teóricos que podem ser obtidos em um sistema reversível (A) e um sistema totalmente irreversível (B). O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox.

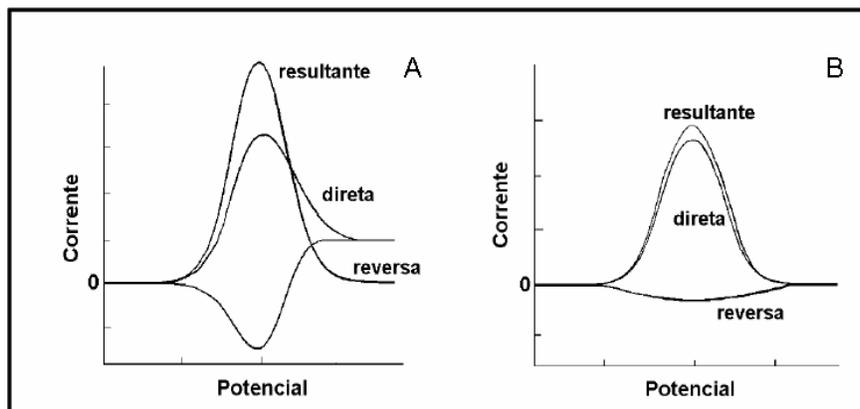
Atualmente, a SWV é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis entre todas as outras. Os limites de detecção obtidos com a sua utilização podem ser comparados àqueles das técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

A voltametria de onda quadrada apresenta algumas vantagens com relação a outras técnicas voltamétricas. Uma dessas vantagens é a diminuição da interferência proveniente da corrente capacitiva, uma vez que, na SWV, assim como em outras técnicas de pulso, como a corrente capacitiva é proporcional a  $e^{-t/RC}$ , onde  $t$  é o tempo,  $R$  a resistência da solução e  $C$  a capacitância da dupla camada, e a corrente faradaica é aproximadamente proporcional a  $t^{1/2}$ , a variação de corrente

diminui mais rapidamente que a corrente faradaica. Assim, as medidas de corrente são realizadas após a corrente capacitiva ter se tornado negligenciável, melhorando a resolução dos dados experimentais.<sup>176</sup>



**FIGURA 2.5** - Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada.



**FIGURA 2.6** - Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B).

Outra vantagem importante está relacionada com a velocidade de varredura (produto da freqüência de aplicação dos pulsos de potenciais ( $f$ ) pelo incremento de varredura de potencial ( $\Delta E_s$ )). Como é possível trabalhar até uma velocidade de  $1 \text{ V s}^{-1}$ , e como a corrente de pico é função da velocidade de varredura, a sensibilidade desta técnica pode aumentar significativamente, alcançando limites de detecção de  $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ .<sup>160</sup>

Os critérios de diagnóstico para processos redox foram desenvolvidos por JANET OSTERYOUNG em New York, e pelo grupo de MILIVOJ LOVRIC na Iugoslávia sendo:<sup>177, 178</sup>

1) Se não ocorrer adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo e se o coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ) for considerado igual a 0,5, a intensidade de corrente de pico para sistemas reversíveis é cerca de três vezes maior que para sistemas irreversíveis. Isso ocorre porque a corrente resultante é a diferença entre as correntes diretas e inversas, e quanto maior a reversibilidade da reação maior é a contribuição da corrente inversa, aumentando significativamente a corrente resultante.

2) A dependência dos potenciais de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais para reações irreversíveis é linear, com uma inclinação de:

$$\Delta E_p / \Delta \log f = -2,3RT / \alpha n F \quad (\text{ou } \Delta E_p / \Delta \log f = -59 / \alpha n \text{ mV}) \quad (2.1)$$

Para sistemas reversíveis, a relação também é linear, mas com uma inclinação de.

$$\Delta E_p / \Delta \log f = -2,3RT / 2n F \quad (\text{ou } \Delta E_p / \Delta \log f = -29 / n \text{ mV}) \quad (2.2)$$

3) A amplitude dos pulsos de potencial, também influencia nos valores de corrente de pico. Para reações redox totalmente irreversíveis, a sensibilidade analítica aumenta com o aumento da amplitude, e para reações reversíveis com adsorção de reagentes e/ou produto, a corrente de pico aumenta proporcionalmente somente para valores de amplitudes menores que 60 mV.

A utilização destas equações desenvolvidas por LOVRIC e OSTERYOUNG é suficiente para fornecer informações sobre o número de elétrons envolvidos no processo redox.

## 2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura e EDX

A microscopia eletrônica de varredura (Scanning Electron Microscopy-SEM ou MEV) é uma técnica capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 vezes) e resolução.

O princípio desta técnica consiste na emissão de feixes de elétrons de alta energia na superfície da amostra, o que causa a emissão de elétrons com grande espalhamento de energia. Que são coletados e amplificados para fornecer um sinal elétrico que pode ser detectado por BSE (elétrons retroespalhados) ou por SE (elétrons secundários)<sup>179</sup>. O detector SE fornece informações da topografia da superfície da amostra e o detector BSE fornece informações da composição da amostra.<sup>180,181</sup>

Espectroscopia de dispersão de raios-X (EDX), também conhecida por espectroscopia por dispersão de energia (EDS), é muito importante na caracterização microscópica de materiais, pois permite verificar informações acerca da composição química da amostra. Quando o feixe de elétrons atinge a amostra, seus átomos são excitados e, ao voltarem para o estado fundamental, emitem fótons com energia característica. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar em instantes que mineral está sendo observado.<sup>180</sup>

## **Capítulo 3 – PARTE EXPERIMENTAL**

---

## CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Instrumentação

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Metter, modelo H10 com precisão de  $\pm 0,1$  mg.

As medidas de pH das soluções foram realizadas utilizando-se um pHmetro Orion EA 940 e um eletrodo de vidro combinado Analion, modelo V620 com eletrodo interno Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3 \text{ molL}^{-1}$ ) como eletrodo de referência.

A morfologia e composição da superfície dos eletrodos foram investigadas usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDX) Philips modelo XL30 TMP. O equipamento foi calibrado com níquel metálico.

#### 3.1.2. Vidraria

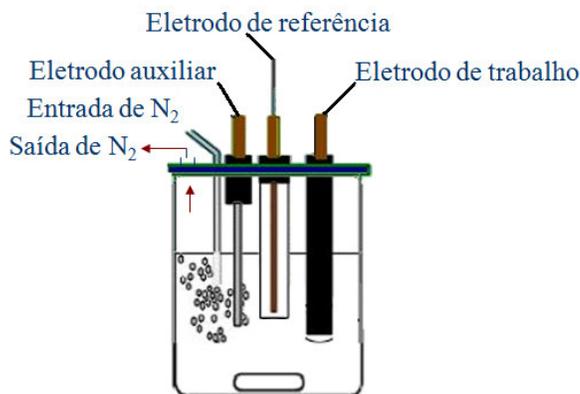
A vidraria de laboratório usada nos experimentos foi previamente descontaminada com solução de  $\text{HNO}_3$  10 % v/v por 2h e, posterior lavagem com água deionizada para assegurar a ausência de quaisquer resíduos que pudessem interferir nas medidas.

Foram utilizadas pipetas automáticas eppendorf de 10, 50, 1000  $\mu\text{L}$  e de 5 mL, todas com ponteiros descartáveis de polietileno.

#### 3.1.3. Medidas voltamétricas

Para a determinação dos antioxidantes em amostras de alimentos e formulações farmacêuticas foram realizados estudos utilizando-se a voltametria cíclica (CV) e a voltametria de onda quadrada (SWV). Para tanto, foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie) gerenciado por um programa computacional GPES 4.9.

As medidas voltamétricas foram feitas em uma célula eletroquímica de compartimento único, volume máximo de 10 mL, equipada com uma tampa de Teflon<sup>®</sup>, contendo orifícios para a desoxigenação da amostra com gás nitrogênio e posicionamento dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar (FIGURA 3.1).



**FIGURA 3.1.** Representação esquemática de uma célula eletroquímica usada nas medidas voltamétricas.

### 3.1.4. Eletrodo de Referência e Eletrodo Auxiliar (contra eletrodo)

O eletrodo de referência utilizado em todas as medidas voltamétricas foi o eletrodo Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). Para a sua obtenção, um fio de prata foi anodizado até ser recoberto por  $\text{AgCl}_{(s)}$ . Após lavagem com água deionizada, o fio de prata recoberto foi introduzido em um capilar de vidro contendo solução de  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$  saturada  $\text{Ag}^+$ , em seguida o corpo de vidro do eletrodo foi fechado e deixado em repouso por algumas horas. A extremidade desse eletrodo foi mantida em solução de  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$  para evitar a diluição do eletrólito interno por osmose.

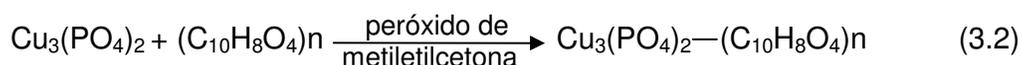
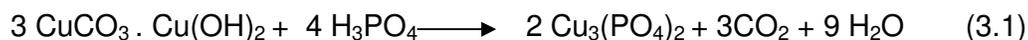
O eletrodo auxiliar empregado nas medidas voltamétricas foi um eletrodo de placa de platina de 0,5 cm de largura e 1 cm de comprimento, fixada em um tubo de vidro contendo um fio de cobre.

## 3.2. Construção dos ECCMs para determinação de antioxidante em alimentos e em formulações farmacêuticas

### 3.2.1. Síntese e imobilização do $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$

O modificador químico  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2(s)$  foi obtido pela reação entre 17,5 g de  $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$  (Vetec) com 8,0 mL de ácido fosfórico concentrado (Merck) como mostrado na equação 3.1. O precipitado azul foi coletado, lavado com água deionizada e seco em estufa a  $110^\circ\text{C}$  por 4 horas. Este sal foi imobilizado em resina

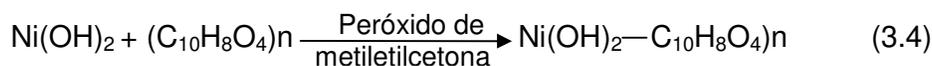
poliéster (Resapol T-208) de acordo com o método proposto por PEREIRA & FATIBELLO-FILHO.<sup>134</sup> Misturou-se 5 g da resina poliéster a 5g de  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2(\text{s})$  (proporção 1:1 m/m) conforme a equação 3.2. Após a homogeneização manual, 0,3 mL do catalisador da resina, peróxido de metiletilcetona (Ibere, Ramines and Cia.), foi adicionado a mistura.



O tempo de secagem deste compósito foi de 10 h formando um sólido rígido que foi inicialmente quebrado com auxílio de um martelo e posteriormente triturado em moinho de facas Tecnal (modelo TE 631/1). A seleção do tamanho das partículas foi controlada com auxílio de peneiras de granulometria apropriada.

### 3.2.2. Síntese e imobilização do $\text{Ni}(\text{OH})_2$

O modificador químico  $\text{Ni}(\text{OH})_2(\text{s})$  foi obtido pela reação de uma solução aquosa saturada de  $\text{NiCl}_2$  (Vetec) com 20,0 mL de uma solução aquosa saturada de hidróxido de sódio (Vetec) como mostrado na equação 3.3. O sal verde precipitado foi coletado, lavado com água deionizada e seco em estufa a 110 °C por 4 horas. Este sal foi imobilizado em resina poliéster (Resapol T-208) da mesma maneira descrita no item 3.2.1 segundo a equação 3.4. O tempo de secagem e obtenção do modificador é similar ao descrito no item 3.2.1.



### 3.2.3. Imobilização do $\text{Cu}^{2+}$ na resina de troca catiônica

Para realizar a troca do cátion  $\text{Na}^+$  presente na resina de troca iônica pelo cátion  $\text{Cu}^{2+}$ , um volume de 10 mL de resina de troca catiônica Amberlite IRA 120 (Röhm and Haas) foi transferida para uma coluna de vidro (200 mm x 10 mm). Em

seguida, percolaram-se pela coluna 100 mL de solução de sulfato de cobre (II) 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Após a troca dos íons, a coluna foi lavada com água deionizada em excesso para assegurar a retirada completa dos íons não imobilizados. A resina de troca catiônica carregada com íons Cu<sup>2+</sup> foi coletada e seca em estufa a 100 °C durante 2 h. Após secagem, esta resina foi usada como modificador químico na composição do eletrodo compósito de carbono proposto.

### 3.3. Construção dos eletrodos de trabalho

O aglutinante utilizado para a construção do ECCMs foi a parafina sólida ultra pura (Aldrich).

Homogenizou-se manualmente por 30 minutos em um almofariz de ágata as proporções de modificador e pó de grafite (Fischer Chemical Grade #38) apresentadas na TABELA 3.1 para cada eletrodo construído. A granulometria foi selecionada com auxílio de peneiras. Esta mistura foi adicionada a 0,20 g (20% m/m) de parafina sólida fundida a 60°C, antes que a nova mistura enrijecesse, esta foi inserida na cavidade de uma seringa para insulina de 90 mm de altura e diâmetro interno aproximado de 4 mm contendo uma haste de cobre para fazer o contato elétrico externo (FIGURA 3.2).

**TABELA 3.1.** Composição de cada ECCM construído

<b>Eletrodos</b>	<b>Pó de grafite (%m/m)</b>	<b>Modificador (%m/m)</b>	<b>Parafina (%m/m)</b>
ECCM-Cu <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	40	40	20
ECCM- Ni(OH) <sub>2</sub>	60	20	20
ECCM-(RSO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cu <sup>2+</sup>	60	20	20



**FIGURA 3.2.** Esquema do eletrodo proposto

### 3. 4. Preparo de amostra e determinação dos analitos

As amostras contendo CAT, QCT, Rut, BHA e BHT foram obtidas no comércio local, sendo os analitos determinados pelos métodos propostos e por HPLC (método comparativo). O pH das soluções de eletrólito suporte foi ajustado utilizando soluções de  $\text{H}_3\text{PO}_4$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{HNO}_3$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e/ou  $\text{KOH}$   $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 3.4.1. Catequina e Quercetina

Para catequina, seis amostras de chá foram analisadas usando o método proposto, sendo três marcas comerciais de chá verde (Golpará, Real e Feel Good) e três de chá preto (Dr. Oetker, Leão e Nestea) ambos contendo folhas e brotos de *Camélia sinensis*. A diferença entre o chá preto e o chá verde é que o primeiro é fermentado e o último não.

Para quercetina, também seis amostras de chá foram analisadas usando o método proposto, sendo três marcas comerciais de chá matte (Real, Hikari e Leão) e três de chá de camomila (Real, Dr. Oetker e Leão), da seguinte maneira descrita abaixo para ambos CAT e QCT.

Dois gramas do extrato de chá verde ou preto (para CAT) e dois gramas do extrato de chá matte ou camomila (para QCT) foram transferidos para um béquer contendo 50 mL de água deionizada aquecida a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 minutos (tempo de efusão). A efusão dos chás foi filtrada em filtro de seringa 0,22 mm (Millipore, Bedford, MA, USA). Alíquotas de 1 mL desta solução foram transferidas com auxílio de

micropipetas para a cela eletroquímica contendo 5 mL do eletrólito suporte e as medidas voltamétricas foram realizadas.

### **3.4.2. Rutina**

Duas formulações farmacêuticas foram analisadas usando o método proposto: Novarrutina gotas (Zurita laboratórios farmacêuticos) e Venocur Triplex comprimidos (laboratório KNOLL).

Solução: Uma alíquota de 500 µL da solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL com auxílio de uma micropipeta e aferida para o volume com uma solução de tampão fosfato/etanol 90/10% v/v (pH condicional 6,9) para o método utilizando os ECCMs com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  ou  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  ou aferida para o volume com uma solução de  $\text{KNO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH condicional 6,0) para o método utilizado o ECCM com  $(\text{RSO}_3)_2\text{Cu}^{2+}$ .

Comprimidos: três comprimidos foram triturados e a granulometria ajustada com auxílio de peneiras até a obtenção de um pó fino homogêneo deste pó. Uma massa de 122 mg da amostra em pó foi então dissolvida em 10 mL de uma solução tampão fosfato/etanol 90/10% v/v (pH condicional 6,9), sendo o analito destas soluções determinado voltametricamente empregando-se os ECCMs com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  ou  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  ou aferida para o volume com uma solução de  $\text{KNO}_3$  0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH condicional 6,0) para o método utilizado o ECCM contendo o  $(\text{RSO}_3)_2\text{Cu}$ .

As soluções foram filtradas em filtro de seringa 0,22 mm (Millipore, Bedford, MA, USA) para remoção dos incipientes insolúveis contido na solução. Uma alíquota de 500 µL de cada uma destas soluções foi transferida com auxílio de uma micropipeta para a cela eletroquímica contendo 5 mL do eletrólito suporte e as medidas voltamétricas foram realizadas.

### **3.4.3. BHA e BHT**

Para BHA, três marcas de maionese (Hellmans, Soya e Arisco) foram analisadas e para BHT, duas marcas de maionese (Soya e Arisco) e duas marcas de margarina (Vigor e Dorina) foram analisadas usando o método proposto.

Pesaram-se 2 g de cada uma das maioneses e margarinas sendo estas suspensas em 5 mL de etanol PA em um tubo para centrífuga. A suspensão foi

submetida a um banho ultra-sônico (Aqua Wave 9374-Brnstead/Lab-Line) à temperatura ambiente por 15 minutos e depois centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. Este procedimento foi repetido duas vezes. O sobrenadante foi coletado em balão volumétrico de 10 mL e seu volume foi completado com etanol. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da solução foi transferida com auxílio de uma micropipeta para a cela eletroquímica contendo 5 mL de  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  considerando a proporção de 10% de etanol, sendo então as medidas voltamétricas realizadas.<sup>75</sup>

### **3.5. Métodos Voltamétricos**

#### **3.5.1. Voltametria Cíclica e Voltametria de Onda Quadrada**

Inicialmente, utilizou-se a voltametria cíclica para estudar o perfil voltamétrico dos seguintes analitos: CAT, QCT, Rut, QCT, BHA e BHT como também, determinar o melhor eletrólito suporte a ser usado nas determinações, concentração do eletrólito e melhor faixa de pH a ser utilizada. A voltametria de onda quadrada foi utilizada para propor um procedimento eletroanalítico para a determinação de antioxidante em amostra de alimentos e em formulações farmacêuticas com os eletrodos propostos.

Para a realização das medidas adicionaram-se a célula eletroquímica 5 mL do eletrólito suporte respectivo para cada determinação e, então, a solução foi desoxigenada durante 10 minutos com gás nitrogênio. Após a otimização do sistema, as curvas analíticas foram obtidas pela adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica. Após cada adição, os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. As amostras foram analisadas pelo método da adição de padrão.

#### **3.5.2. Estudo de Interferentes em Potencial**

As medidas para a determinação de possíveis interferentes foram efetuadas nas mesmas condições experimentais estabelecidas para cada analito.

Para catequina e quercetina não foram verificados os possíveis interferentes por se tratarem de amostras de chás, as quais não possuem composição química completamente definida.

Para rutina, inicialmente os interferentes em potencial foram: sacarina sódica, metilparabeno, amido, carbonato de cálcio e estearato de magnésio e para

BHA e BHT: ácido cítrico, EDTA, benzoato de sódio, amido, sorbato de potássio e lactose. Estes foram determinados separadamente para observar quais seriam eletroativos sobre a superfície dos eletrodos propostos e se haveria sobreposição de picos entre estes concomitantes e os analitos.

Posteriormente, somente as substâncias que apresentaram eletroatividade sobre o eletrodo foram analisadas sobre uma concentração constante de Rutina, BHA e BHT, sendo feitas adições sucessivas de diferentes concentrações destes interferentes a célula eletroquímica.

### **3.5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada como método comparativo para todas as determinações.

Para a determinação de Cat, QCT e Rut foi empregado um método proposto por ZU *et al.*<sup>27</sup> com algumas modificações realizadas e para BHA e BHT foi empregado um método proposto por SAAD e colaboradores<sup>64</sup> também com modificações descritas abaixo:

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-VIS, modelo SPD-M10AVP e coluna Shim-Pack CLC-ODS (60 mm x 150 mm, 5 µm), a fase móvel utilizada foi metanol/acetonitrila /água (40/15/45%, v/v/v) contendo 1,0% de ácido acético com vazão de 1 mL por minuto e volume de injeção de 20 µL, método isocrático para CAT, QCT e Rut, sendo que os seguintes comprimentos de ondas foram monitorados: 279 nm para CAT, 368 nm para QCT e 257 nm para Rut.

Para a determinação de BHA e BHT a fase móvel utilizada foi metanol/acetonitrila (1:1 v/v) contendo 1,0% de ácido acético com vazão de 1 mL por minuto e volume de injeção de 30 µL, método isocrático. O comprimento de onda monitorado foi de 209 nm para ambos BHA e BHT.

## **Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

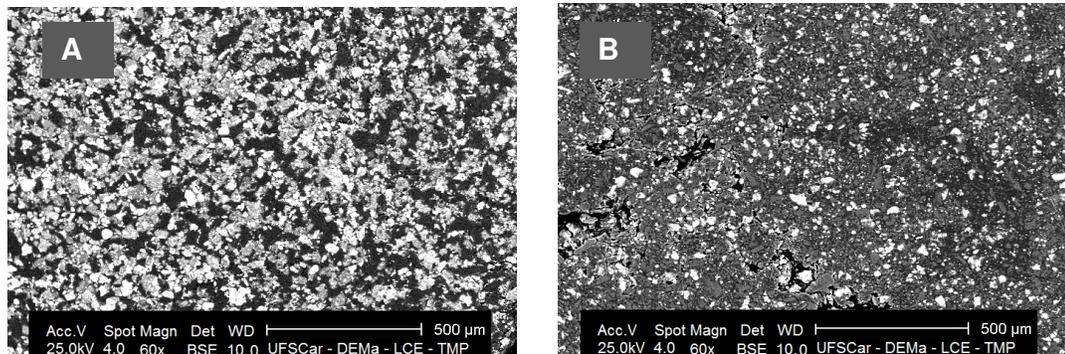
---

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados a caracterização da superfície dos eletrodos e os resultados voltamétricos obtidos empregando-se eletrodos compostos de carbono modificados (ECCMs) com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  e  $\text{Cu}(\text{II})$  imobilizado em resina de troca catiônica. Nestes estudos foram determinados catequina (CAT), quercetina (QCT), BHA e BHT em alimentos e rutina (Rut) em fármacos utilizando as técnicas de voltametria cíclica, linear e de onda quadrada. Os resultados são acompanhados de uma breve discussão e observações experimentais.

### 4.1. Caracterizações da superfície dos eletrodos

Na FIGURA 4.1 são apresentadas as micrografias da superfície do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ , obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise da morfologia foi realizada antes e depois do eletrodo ser utilizado para determinação de rutina na concentração de  $1,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  / 10% etanol (v/v).



**FIGURA 4.1.** MEV da superfície do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  (A) micrografia obtida na ausência de rutina; (B) micrografia obtida após a determinação de  $1,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  rutina; detector BSE respectivamente. Escala  $500 \mu\text{m}$ ; zoom 60 vezes.

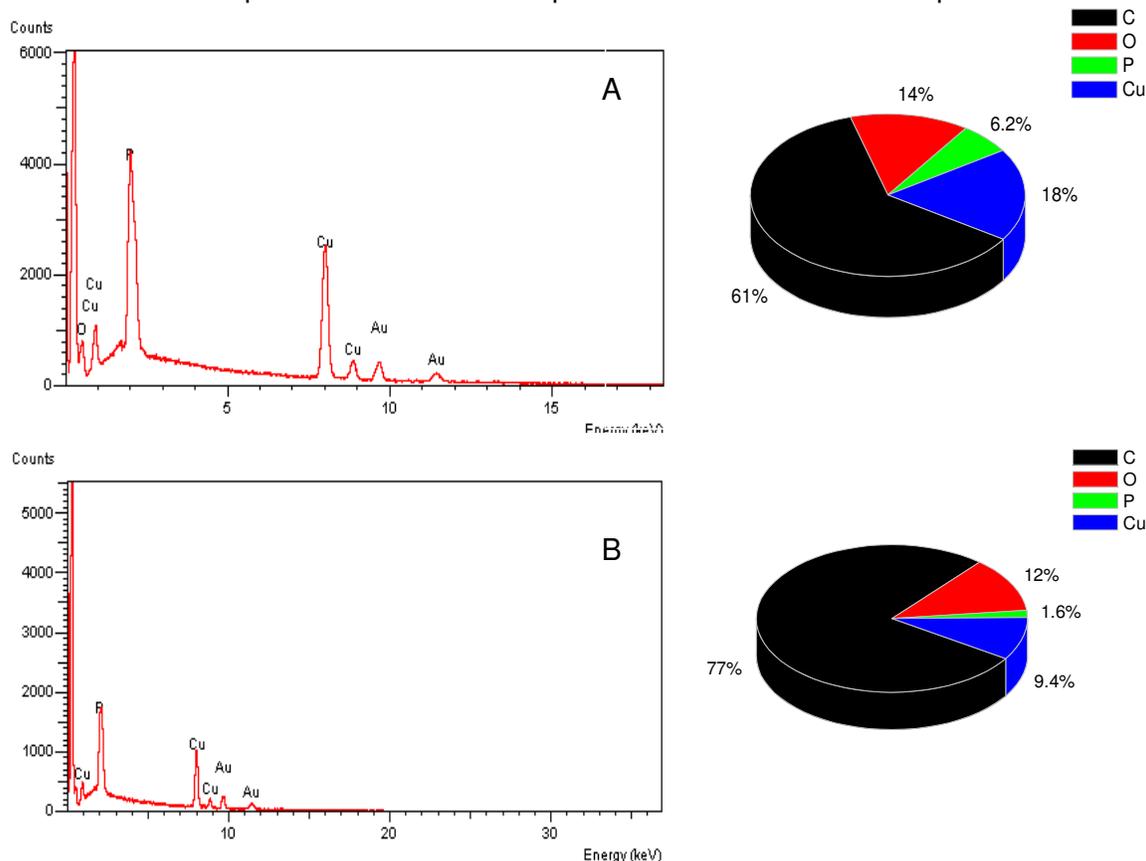
Observa-se que a superfície do eletrodo apresenta-se uniforme e pouco porosa demonstrando que a homogeneização do eletrodo foi adequada no momento da construção, sendo que este eletrodo pode ser classificado segundo ALEGRET e colaboradores<sup>93</sup> em composto de dispersão devido o material condutor está aleatoriamente distribuído e suas partículas ocuparem o mesmo espaço na superfície

do eletrodo como observado na FIGURA 4.59. As microscopias obtidas utilizando o detector BSE (backscatter, ou em português retro-espalhamento de elétrons) permitem o contraste químico da superfície do eletrodo, onde observa que as partes mais claras representam os elementos mais pesados. Assim pode-se afirmar que o cobre está bem distribuído na superfície do eletrodo.

Na FIGURA 4.2 são apresentados os resultados obtidos por EDX para composição percentual da superfície. O erro relativo Er% entre as composições foram calculados de acordo com a equação 4.1.

$$\text{Er}\% = [(m\text{Ma} - m\text{Mb})/m\text{Ma}] \times 100 \quad (4.1)$$

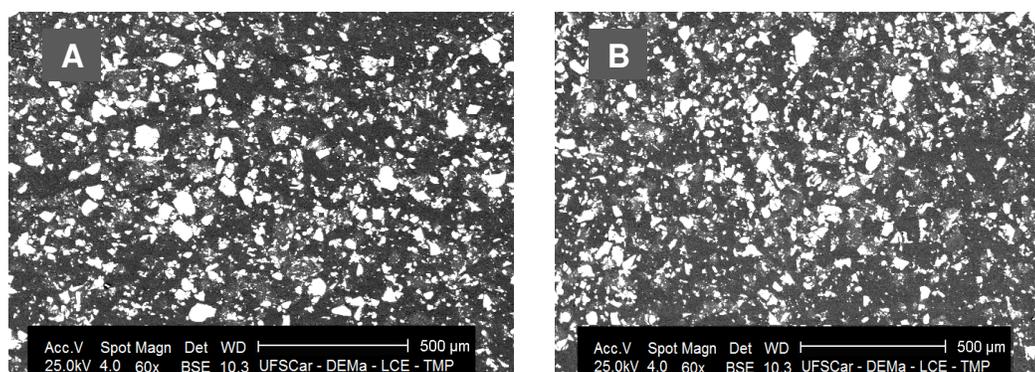
Onde mMa é a massa percentual do modificador usada na construção do eletrodo e mMb é a massa percentual calculada a partir dos resultados obtidos por EDX.



**FIGURA 4.2.** EDX da superfície do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  (A) na ausência de rutina e (B) na presença de  $1,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  rutina.

Observa-se que a composição do ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> obtida (FIGURA 4.2 A) concorda com a composição do eletrodo sendo 40 % do modificador, as proporções de oxigênio, fósforo e cobre de acordo com cálculos de fórmula mínima são referentes ao fosfato de cobre, assim a percentagem total do fosfato de cobre foi igual a 38,2 % e o erro relativo obtido de acordo com a equação 4.6 foi igual a 4,5%. Como a percentagem de oxigênio na superfície do eletrodo não aumentou, a formação de óxido na superfície do eletrodo não foi favorecida.

Na FIGURA 4.3 são apresentadas as micrografias da superfície do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> realizada antes e depois do eletrodo ser utilizado para determinação de rutina na concentração de 1,92 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 10% etanol (v/v).



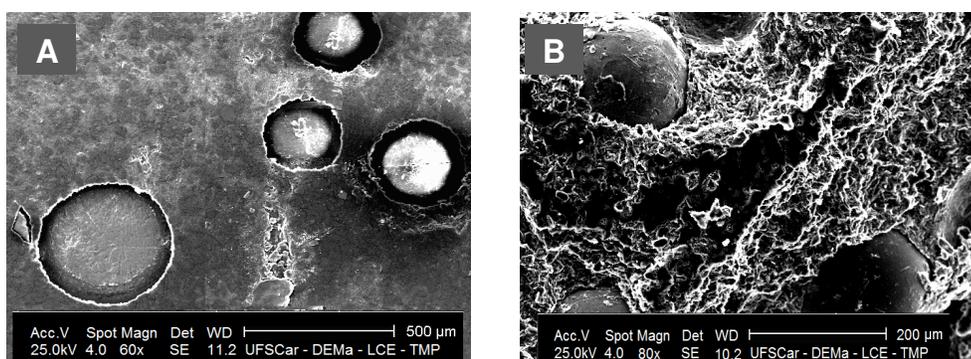
**FIGURA 4.3.** MEV da superfície do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> (A) micrografia obtida na ausência de rutina e (B) após a determinação de 1,92 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> rutina; detector BSE; Escala 500 μm; zoom 60 vezes.

Observa-se que a superfície é homogênea e pouco porosa mesmo depois de ser utilizado na determinação de rutina, também pode ser caracterizado como um composto de dispersão. A composição percentual obtida por EDX antes e depois da determinação de rutina foi 67,91: C; 17,7: O; 14,39: Ni; e 67,57: C; 17,51: O; 14,75: Ni. Observa-se que as percentagens de oxigênio não variaram significativamente antes e depois da determinação da rutina, provavelmente não ocorre a formação de óxido na superfície do eletrodo.

Na FIGURA 4.4 são apresentadas as micrografias da superfície do ECCM-resina-Cu(II) realizada antes e depois do eletrodo ser utilizado para determinação de rutina na concentração de 1,92 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> / 10% etanol (v/v).

Observa-se que as esferas de resina de troca catiônica estão encapsuladas na superfície do eletrodo e depois que o eletrodo foi utilizado para a determinação de rutina (FIGURA 2.4 B) a resina de troca catiônica apresenta-se envolvida por uma camada entrelaçada, atribuída provavelmente ao complexo formado. A composição química percentual da superfície do eletrodo obtido por EDX antes e depois do eletrodo ser utilizado na determinação de rutina foi: 80,7: C; 17,4:O; 0,5:K; 1,32:Cu e 64,7: C; 30,2:O; 3,83:K; 1,3:Cu respectivamente.

Atribui-se a percentagem de potássio encontrada ao eletrólito suporte ( $\text{KNO}_3$ ) utilizado na determinação de rutina.



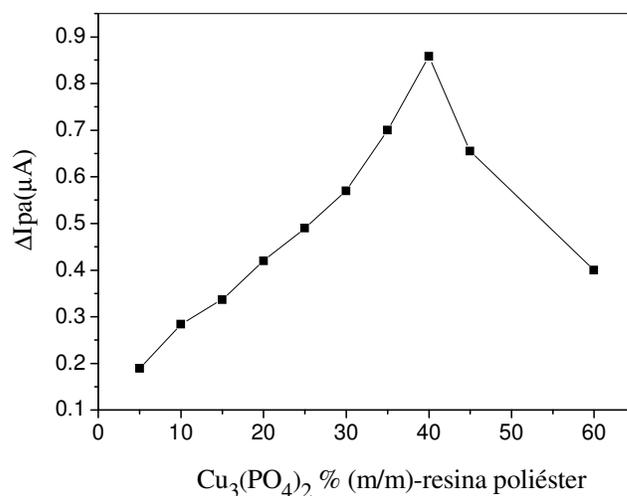
**FIGURA 4.4.** MEV da superfície do ECCM-resina-Cu (A) micrografia obtida na ausência de rutina e (B) após a determinação de  $1,92 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  rutina; detector BSE; Escala 200  $\mu\text{m}$ ; zoom 80 vezes.

## 4.2. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de catequina em chás

### 4.2.1. Estudo da composição do eletrodo

O efeito da composição do eletrodo foi estudado por voltametria cíclica, fixando-se primeiramente a percentagem de aglutinante (parafina) em 20%, quantidade mínima necessária para obter um compósito homogêneo e, variaram-se as quantidades de pó de grafite e  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  imobilizado em resina poliéster nas seguintes proporções de pó de grafite/parafina: 75:20; 70:20; 65:20, 60:20, 55:20, 50:20, 45:20, 40:20, 35:20 e 20:20 (% m/m) e  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ -resina poliéster: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 60% m/m em relação à massa total do compósito.

A FIGURA 4.5 mostra o efeito da percentagem (m/m) do modificador na composição do eletrodo. As medidas ciclovoltagemétricas foram realizadas em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /5% etanol (v/v) (pH condicional 6,8), velocidade de varredura igual a  $50 \text{ mVs}^{-1}$ ; na presença e na ausência de catequina  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Os valores de  $\Delta I_p$  correspondem à diferença da corrente obtida na presença e na ausência de catequina.



**FIGURA 4.5.** Efeito da percentagem m/m de  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ -resina poliéster na composição do ECCM; eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /5% etanol (v/v) (pH condicional 6,8) na presença de  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  catequina.

A concentração de  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  presente no ECCM apresentou influência significativa na resposta voltamétrica do eletrodo proposto. Os picos de corrente

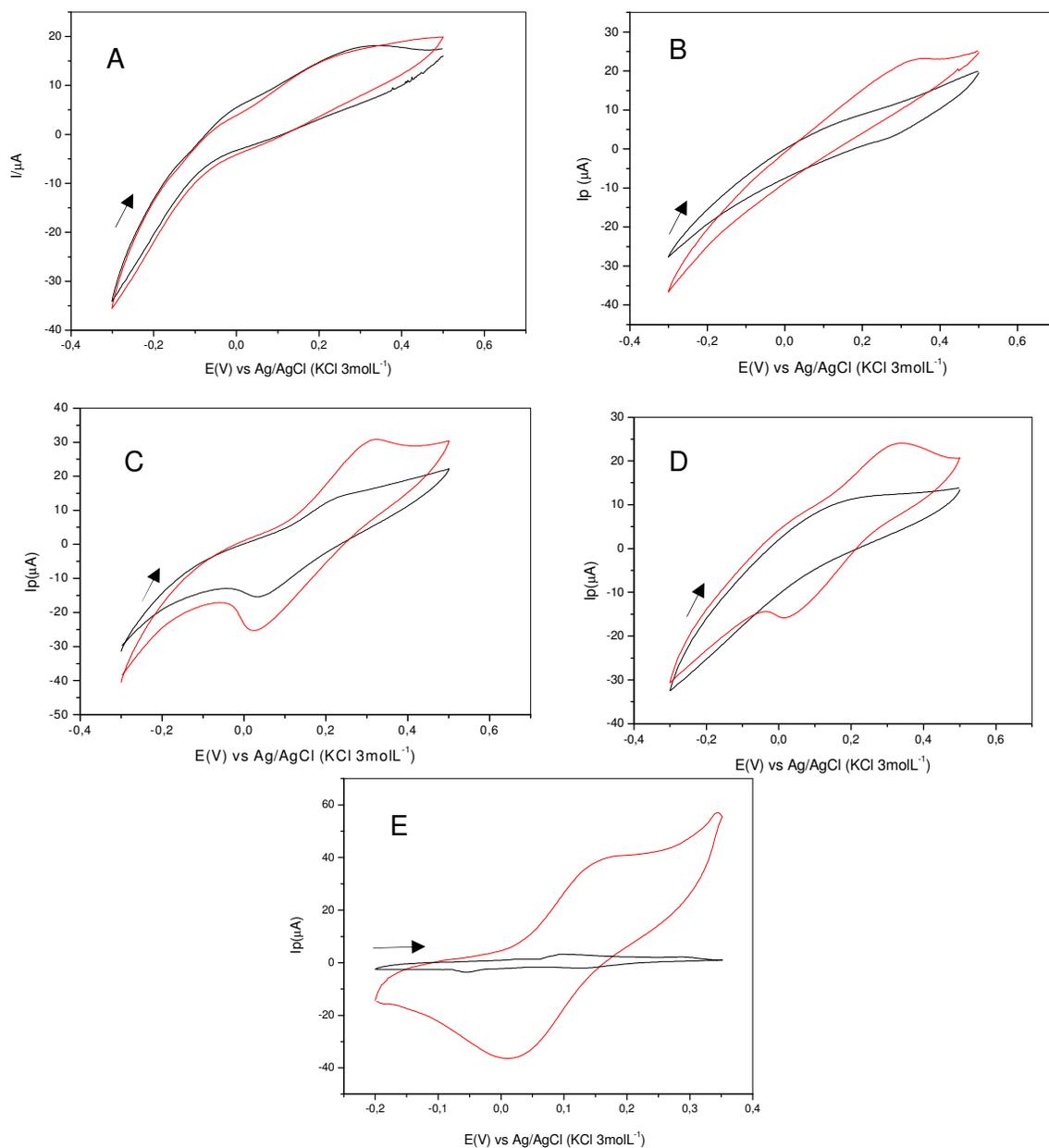
aumentaram com o aumento da percentagem do modificador até 40% m/m. Para percentagens maiores que 40 % foi observado que a magnitude do pico de corrente diminui acentuadamente e, em percentagens de modificador maiores que 60% m/m, a resposta do eletrodo modificado foi desprezível. Isso ocorre devido à diminuição da percentagem de pó de grafite na composição do eletrodo e, conseqüentemente, há uma diminuição significativa da condutividade do compósito. Como observado na FIGURA 4.1, a melhor composição para o ECCM com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  foi: 40% (m/m) de pó de grafite, 20% (m/m) de parafina sólida e 40% (m/m) do modificador.

Comparando-se um ECCM com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  não imobilizado em resina poliéster com um ECCM contendo  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  imobilizado em resina poliéster, a principal característica atribuída a esta imobilização é o aumento de vida útil desse eletrodo modificado. Foi observado nestes estudos que o eletrodo modificado com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  não imobilizado apresentou um tempo de vida de aproximadamente 46 dias (em torno de 500 determinações) e o eletrodo modificado com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  imobilizado em resina poliéster apresentou um tempo de vida maior do que 2 anos (mais de 2000 determinações), sendo que o eletrodo modificado ainda apresenta a mesma resposta analítica que aquela inicial.

#### **4.2.2. Estudo do efeito do eletrólito suporte**

O comportamento voltamétrico do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  imobilizado em resina poliéster foi investigado em cinco diferentes eletrólitos suportes (tampão fosfato,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  e  $\text{KCl}$ ) (FIGURA 4.6). Em todas as soluções, com exceção de  $\text{KCl}$ , foram verificadas a presença de picos voltamétricos. No entanto, em tampão fosfato o voltamograma apresentou melhor definição de pico e maiores magnitudes de correntes anódica e catódica, sendo assim escolhido como eletrólito suporte para todas as determinações de catequina em chás.

A boa estabilidade obtida em tampão fosfato é devida provavelmente a estabilidade do complexo  $\text{Cu(I)}$ -fosfato.<sup>182</sup> Embora alguns estudos descrevam a influência do fosfato no potencial do par redox  $\text{Cu(II)}/\text{Cu(I)}$ ,<sup>182-184</sup> o mecanismo de redução dessas espécies não é ainda muito bem conhecido. A resposta voltamétrica do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  não foi influenciada significativamente pela concentração do eletrólito suporte. Assim, uma solução de tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ /5% etanol (v/v) foi escolhida como eletrólito suporte para este experimento.

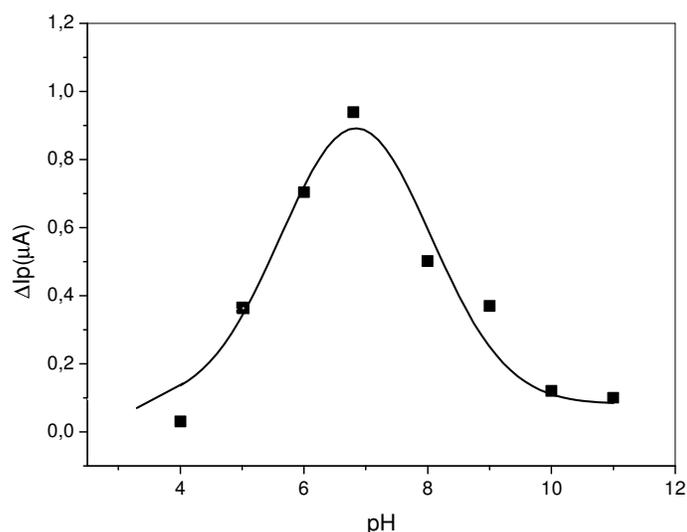


**FIGURA 4.6.** Ciclo voltamogramas obtidos com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em diferentes eletrólitos suportes: (A) KCl; (B) NaCl; (C) KNO<sub>3</sub>; (D) NaNO<sub>3</sub>; (E) tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença (—) e na ausência (---) de 3,4 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de catequina;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.2.3. Estudo do efeito do pH

Outro parâmetro importante estudado foi a influência do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, no intervalo de pH de 4 a 11. A FIGURA 4.7 mostra o efeito do pH sobre a corrente de pico anódica do eletrodo modificado. A

corrente de pico anódica ( $\Delta I_p/\mu A$ ) foi obtida pela diferença das correntes na presença e na ausência de CAT.



**FIGURA 4.7.** Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM- $Cu_3(PO_4)_2$ ; eletrólito suporte: Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /5% etanol (v/v) na presença de  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  catequina.

De acordo com a FIGURA 4.7 no intervalo de pH de 4 a 7, a corrente de pico aumenta e em valores de pH maiores que 7, a corrente de pico diminui. Neste intervalo de 7 a 10 existe um decréscimo de magnitude de corrente, o qual pode ser explicado pela formação de hidróxido de Cu(II) em equilíbrio com  $Cu_3(PO_4)_2$  na superfície do eletrodo segundo a equação 4.2. Porém, mesmo em pH 8,0 ou 9,0, observa-se resposta eletroquímica para catequina, o que sugere que a formação de hidróxido de cobre na superfície não desativa completamente o eletrodo.

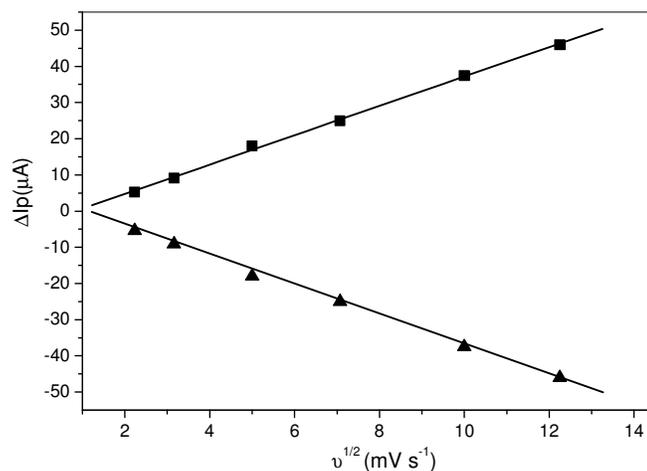


A melhor definição de pico e maior sinal analítico foram observados em pH 6,8. Sendo assim, optou-se em trabalhar com uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em (pH 6,8) para a otimização e seleção dos parâmetros voltamétricos.

#### 4.2.4. Estudo do efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a

150  $\text{mV s}^{-1}$  para uma solução  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de catequina em tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  / 5 % etanol (v/v) (pH condicional 6,8) (FIGURA 4.8).



**FIGURA 4.8.** Resposta voltamétrica do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (■)  $I_{pa}$  anódica (▲)  $I_{pc}$  catódica na presença de CAT  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

As correntes de pico anódica e catódica variaram lineamente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. As equações das retas obtidas foram  $I_{pa} (\text{A}) = -3,37 \times 10^{-6} + 4,05 \times 10^{-6} v^{1/2}$  ( $R=0,999$ ) e  $I_{pc} (\text{A}) = 3,34 \times 10^{-6} - 4,05 \times 10^{-6} v^{1/2}$  ( $R=0,999$ ) para corrente anódica e catódica respectivamente, sugerindo que os processos de oxidação e redução da catequina é controlado por difusão.

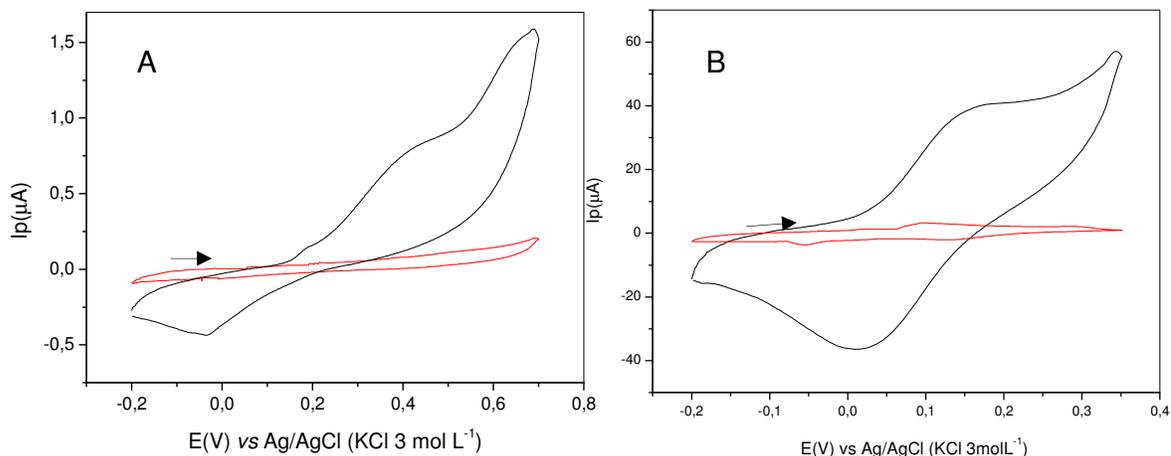
#### 4.2.5. Comportamento eletroquímico de CAT sobre o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$

Um eletrodo compósito de carbono (ECC) não modificado na mesma composição percentual de parafina foi construído para comparação com o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ . Na FIGURA 4.9 é apresentado o perfil voltamétrico da catequina em ambos os eletrodos

O perfil voltamétrico da catequina em tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  / 5% etanol (v/v) (pH condicional 6,8) determinado com ECC não modificado apresentou um pico anódico em 408 V e um pico catódico em -34 mV e a diferença entre os potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ) foi igual a 442 mV.

O voltamograma da catequina em tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  / 5% etanol v/v (pH condicional 6,8) determinado com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  apresentou um pico anódico

(160 mV) e um pico catódico (11mV), sendo a razão entre a corrente de pico anódica e a corrente de pico catódica ( $I_{pa}/I_{pc}$ ) igual a unidade.  $\Delta E_p$  foi maior que 59 mV, e de acordo com a teoria da voltametria cíclica,<sup>160</sup> trata-se de um sistema quase-reversível.



**FIGURA 4.9.** Voltamograma cíclico para CAT  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}/5\%$  etanol (v/v) (pH condicional 6,8); (A) ECC não modificado e (B) ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

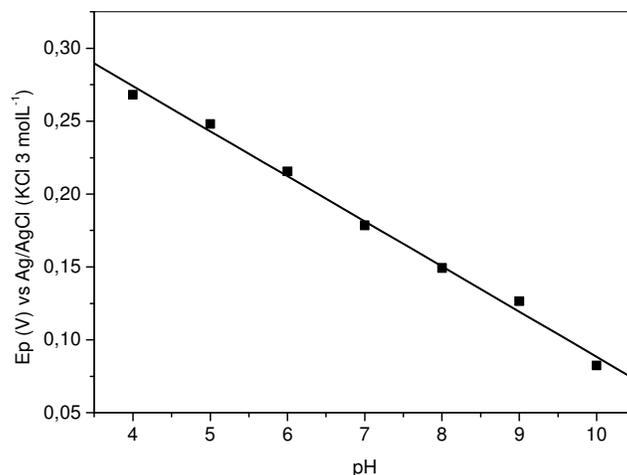
Comparando os perfis voltamétricos da catequina obtido com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  e ECC não modificado, observa-se que houve um ganho significativo em relação a magnitude de corrente obtida com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em relação ao eletrodo não modificado. Esse valor de  $\Delta E_p$  obtido empregando-se o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  é muito menor do que aquele obtido com o eletrodo não modificado, indicando a existência de processo eletrocatalítico, sendo a transferência de elétrons naquele eletrodo favorecida. Uma vantagem do eletrodo modificado é a possibilidade de se trabalhar em potenciais menores (menos positivos) com um sinal analítico bem maior que aquele obtido com o eletrodo não modificado, diminuído assim a possível interferência eletroquímica de concomitantes da matriz da amostra de interesse.

O efeito do pH sobre os potenciais de pico é uma das ferramentas que pode fornecer informações sobre o número de elétrons envolvidos na reação redox, segundo a equação:

$$E = E_0 - \frac{0,059}{n} \log [\text{H}^+]^2 \quad (4.3)$$

onde  $E$  = potencial da célula,  $E_0$  = potencial padrão de redução e  $n$  = número de elétrons envolvidos.

Na FIGURA 4.10 é apresentada a relação  $E_p$  vs. pH, para uma solução de CAT  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  num intervalo de pH de 4 a 10.

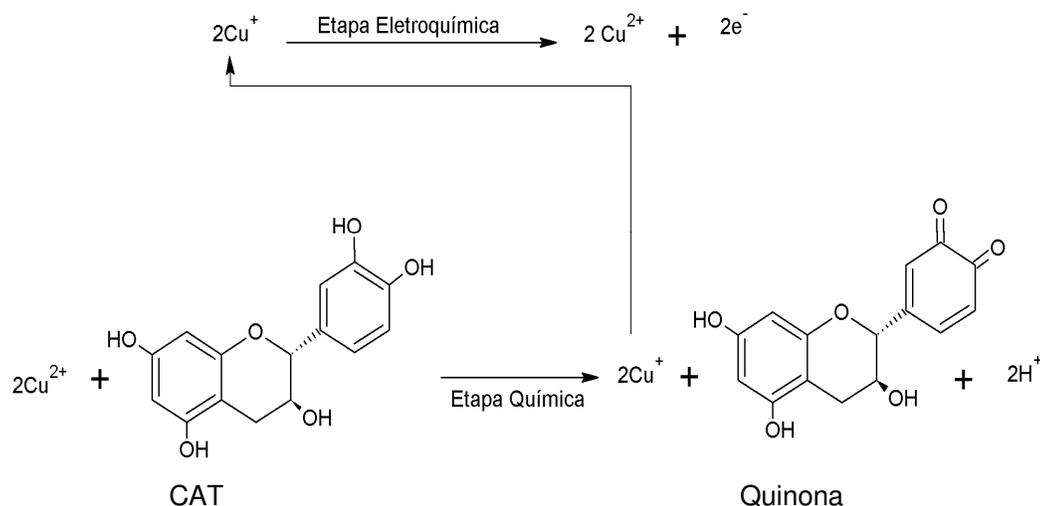


**FIGURA 4.10.** Dependência do potencial de pico com o pH

A variação do potencial de pico anódico com o pH exibe uma relação linear com inclinação de  $29,9 \text{ mV pH}^{-1}$  o que indica um mecanismo que envolve a transferência de 2 elétrons e um próton por molécula de catequina oxidada.

Considerando o estudo da dependência do potencial de pico anódico com pH, e o mecanismo proposto por alguns autores <sup>34,185</sup> foi possível propor um mecanismo de funcionamento do ECCM estudado. A FIGURA 4.11 apresenta o mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  na presença de catequina.

O mecanismo do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  é dividido em duas etapas, uma química e outra eletroquímica, caracterizando-se como um mecanismo CE. Inicialmente, catequina é oxidada quimicamente a quinona correspondente na superfície do eletrodo e,  $\text{Cu(II)}$  é reduzido a  $\text{Cu(I)}$ , sendo então  $\text{Cu(I)}$  oxidado eletroquimicamente a  $\text{Cu(II)}$  gerando o sinal analítico.

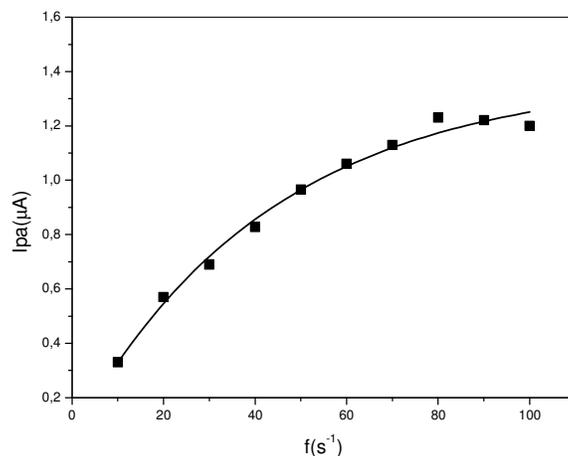


**FIGURA 4.11.** Mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  para a determinação de CAT.

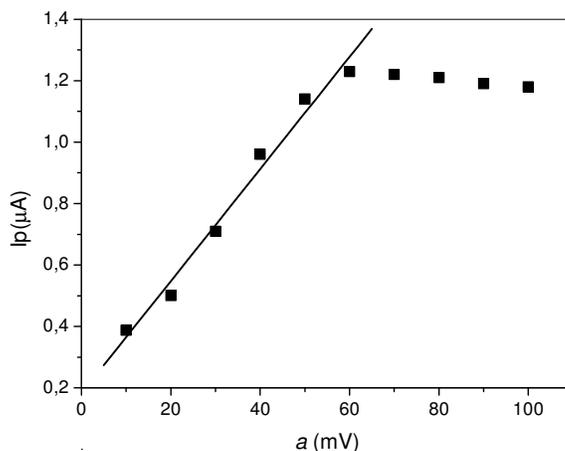
#### 4.2.6. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada (SWV)

Foram otimizados os parâmetros como a frequência de onda quadrada ( $f$ ), amplitude de pulso de potencial ( $a$ ) e o incremento de varredura de potencial ( $\Delta E_s$ ), para desenvolver um procedimento analítico empregando a voltametria de onda quadrada. A frequência de onda quadrada é uma das mais importantes variáveis na SWV, pois é ela que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a sensibilidade do método, e ainda fornece informações a respeito do processo mecanístico do sistema. A FIGURA 4.12 mostra a dependência da corrente de pico anódica com a frequência, sendo selecionada para a determinação de catequina, a frequência de  $20 \text{ s}^{-1}$ , por proporcionar a menor linha base em relação a demais frequências estudadas. Outro parâmetro estudado foi a influência da variação da amplitude de pulso de potencial na corrente de pico para a oxidação da catequina. Na FIGURA 4.13 é apresentada a dependência da corrente de pico com a amplitude de onda quadrada.

Observa-se que para valores de amplitudes menores que  $60 \text{ mV}$ , o aumento da intensidade de corrente é linear e a partir desse valor de amplitude as correntes de pico tornam-se quase constante deixando de interferir significativamente na sensibilidade para o método proposto. A amplitude selecionada para o desenvolvimento deste trabalho foi de  $40 \text{ mV}$  por apresentara melhor definição de pico.



**FIGURA 4.12.** Dependência da corrente de pico com freqüência de aplicação de pulso para CAT  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$ ;  $\Delta E = 2 \text{ mV}$ .

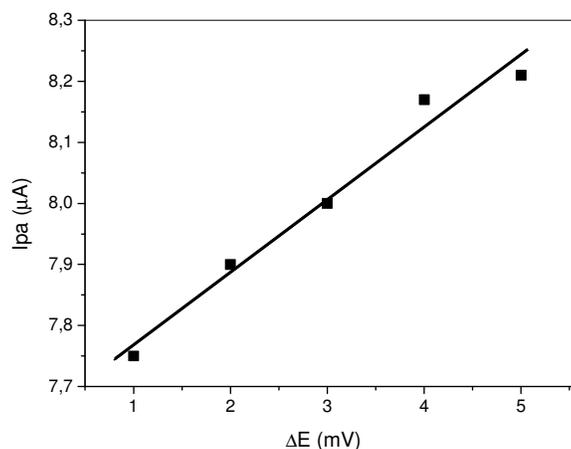


**FIGURA 4.13.** Dependência da corrente de pico com a variação da amplitude de aplicação de pulso para CAT  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $f = 20 \text{ mV}$ ;  $\Delta E = 2 \text{ mV}$ .

Na voltametria de onda quadrada a velocidade efetiva é o resultado do produto da freqüência pelo incremento de varredura. Deste modo, um incremento de varredura maior pode aumentar o sinal obtido e assim melhorar a sensibilidade do método. No entanto, com incrementos maiores podem ocorrer alargamentos nos picos obtidos e assim a resolução pode ser comprometida, desta forma o incremento de varredura é um parâmetro que também deve ser analisado.

Na FIGURA 4.14 é apresentada a dependência da intensidade de corrente de pico em função da variação do incremento de varredura para a catequina. Pode-se observar que a corrente de pico varia linearmente com o incremento de varredura, um

incremento de varredura de 2 mV foi escolhido para todas as determinações de catequina por apresentar melhor definição de pico.



**FIGURA 4.14.** Influência da variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico anódica para a CAT  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$ ;  $f = 20 \text{ mV}$ .

#### 4.2.7. Estudo de Repetibilidade

Os estudos de repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de catequina  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  /5% etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método.

Para o estudo da repetibilidade intra dias foram realizadas dez medidas voltamétricas ( $n = 10$ ) no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível. Entre cada medida voltamétrica, a superfície do eletrodo não foi renovada. O desvio padrão relativo (RSD) obtido para este estudo foi de 0,89 %. Para o estudo de repetibilidade inter dias foram realizadas 5 medidas de corrente em dias alternados com diferentes soluções de catequina  $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . O desvio padrão relativo (RSD) obtido para o estudo de repetibilidade inter dias foi de 1,67 %.

#### 4.2.8. Estudo de interferentes em potencial

Como a matriz de chás pode conter muitas substâncias fenólicas, neste trabalho empregou-se o método de adição e recuperação de padrão. Para esse estudo foram realizados experimentos em triplicata para amostras de chás verde e

preto por meio da adição de alíquotas de solução padrão de CAT em três concentrações diferentes as soluções dessas amostras e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas do padrão. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 4.1.

As recuperações variaram entre 96,0 % e 103 %; estes valores obtidos indicam que não houve interferência da matriz das amostras na determinação de catequina pelo procedimento analítico proposto.

**TABELA 4.1.** Estudo de adição e recuperação de catequina em chás verde e preto usando o método proposto

Amostra	Catequina (mg/100mL)		Recuperado %	
	Adicionado	Encontrado		
Golpará	12,00	11,71 ± 0,04	97,6	
	28,00	27,40 ± 0,04	97,8	
	34,00	33,72 ± 0,04	99,2	
Chá Verde	12,00	12,00 ± 0,07	100	
	Real	28,00	28,10 ± 0,07	100
		34,00	34,60 ± 0,05	102
	Feel good	12,00	12,41 ± 0,05	103
		28,00	28,89 ± 0,05	103
		34,00	34,81 ± 0,05	102
Chá Preto	12,00	11,54 ± 0,10	96,2	
	Dr. Oetker	28,00	26,89 ± 0,10	96,0
		34,00	33,28 ± 0,06	97,9
		12,00	11,78 ± 0,10	98,2
	Leão	28,00	27,69 ± 0,08	98,9
		34,00	33,79 ± 0,05	99,4
		12,00	12,26 ± 0,08	102
	Nestea	28,00	28,29 ± 0,08	101
		34,00	35,01 ± 0,09	103

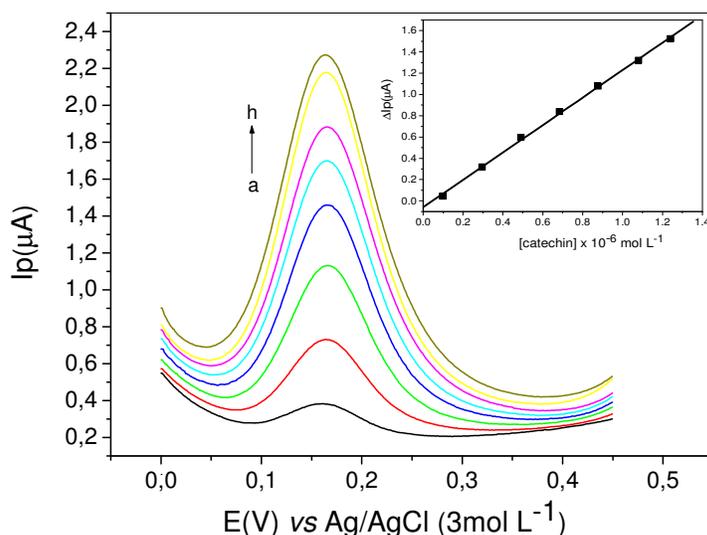
*n=3.*

#### 4.2.9. Curva analítica e aplicações

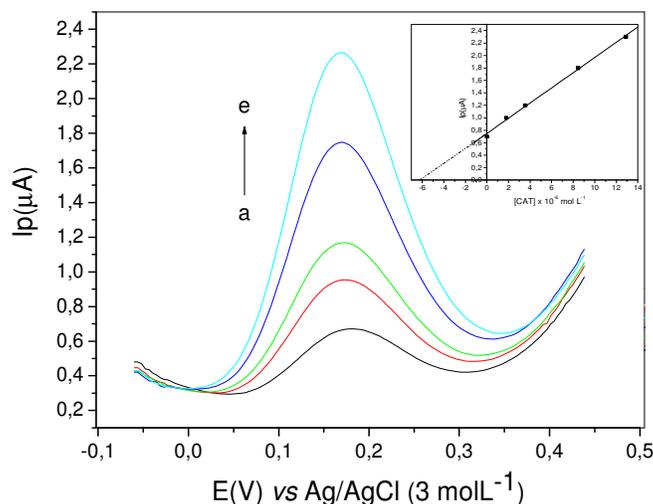
Na FIGURA 4.15 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de catequina nas condições otimizadas para o método proposto. O limite de detecção (LD) foi calculado de acordo com a equação 4.4 onde SD é o desvio padrão dos valores de corrente obtido para 10 determinações na ausência do analito (branco) em mesmo potencial de oxidação do analito e b é o valor do coeficiente angular da curva analítica.

$$LD = 3 SD / b \quad (4.4)$$

A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de CAT entre  $9,9 \times 10^{-7}$  a  $1,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> com um limite de detecção igual a  $5,8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa}(A) = -6,01 \times 10^{-8} + 1,28 [CAT] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9995$ .



**FIGURA 4.15.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de CAT; (a) eletrólito suporte; (b)  $9,90 \times 10^{-7}$ ; (c)  $2,96 \times 10^{-6}$ ; (d)  $4,91 \times 10^{-6}$ ; (e)  $6,84 \times 10^{-6}$ ; (f)  $8,76 \times 10^{-6}$ ; (g)  $1,08 \times 10^{-5}$ ; (h)  $1,24 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8);  $f = 20 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva analítica obtida.



**FIGURA 4.16.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> para a determinação de CAT em chá verde (Golpará); (a) amostra; (b) amostra + 1,0 x 10<sup>-6</sup>; (c) amostra + 1,2 x 10<sup>-6</sup>; (d) amostra + 1,8 x 10<sup>-6</sup>; (e) amostra + 2,3 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> de solução padrão de CAT; ( $f = 20 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva obtida.

O método proposto foi aplicado na determinação de catequina em chás para isto utilizou-se o método de adições múltiplas de padrão. A FIGURA 4.16 mostra os voltamogramas obtidos pelo método de adição de padrão para uma amostra de chá verde.

Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) nas condições experimentais descritas anteriormente, a qual a catequina apresentou um tempo de retenção de 3,70 minutos. Na TABELA 4.2 são apresentados os resultados obtidos empregando-se o método proposto e HPLC. Observa-se que os resultados obtidos pelo método proposto empregando SWV estão em concordância com os resultados obtidos pelo método de HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos também foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{\text{exp}} = 1,942$  e  $t_{\text{tabelado}} = 2,571$ ). Como o  $t_{\text{exp}}$  obtido é menor que o  $t_{\text{tabelado}}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de catequina pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%, podendo assim o método proposto ser usado na determinação de catequina em chás.

**TABELA 4.2.** Determinação de CAT em chás por HPLC e pelo método proposto.

Amostras (mg/L)		HPLC	SWV	Er%
	Golpará	9,99 ±0,06	10,03 ± 0,04	+3,10
<b>Chá Verde</b>	Real	6,82 ±0,05	6,66 ± 0,06	- 2,34
	Feel good	7,00 ± 0,07	6,90 ± 0,05	-1,42
	Dr. Oetker	4,15 ±0,05	4,27 ± 0,06	+4,87
<b>Chá Preto</b>	Leão	4,89 ±0,03	4,86 ± 0,06	-0,61
	Nestea	4,02 ± 0,05	4,10 ± 0,06	+1,99

*n = 3; nível de confiança de 95%*

*Er%* (Erro relativo %) = método proposto versus HPLC.

Além do ganho na seletividade, ressalta-se também a facilidade inerente de construção do ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> além do baixo custo tanto na construção do eletrodo quanto no custo total da determinação em relação a outros métodos, como por exemplo o método cromatográfico utilizado neste trabalho.

Outra vantagem do método proposto que pode ser destacada é a economia de reagentes e o emprego de reagentes de baixa toxicidade. Enquanto no método proposto foi empregado aproximadamente 200 mL de soluções aquosas, incluindo soluções padrão, da amostra e do eletrólito suporte, no método comparativo (HPLC) foram gastos aproximadamente 8 litros de soluções de reagentes e amostras, incluindo metanol, um reagente de alta toxicidade. Estes valores de quantidades de reagentes gastos referem-se a todo o procedimento analítico para ambos, o método proposto e o método comparativo. Estes reagentes foram todos tratados e/ou enviados para tratamento

### **4.3. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de quercetina em chás**

#### **4.3.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte**

O comportamento voltamétrico do ECCM com  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  imobilizado em resina poliéster foi investigado em cinco diferentes eletrólitos suportes, a saber: tampão fosfato, nitrato de sódio, nitrato de potássio, cloreto de sódio e cloreto de potássio. Em todas as soluções foram verificadas a presença de picos voltamétricos, porém a solução de tampão fosfato apresentou melhor definição de pico e intensidade de corrente (TABELA 4.3), sendo assim escolhida como eletrólito suporte para todas as determinações de quercetina em chás.

#### **4.3.2. Estudo do efeito do pH**

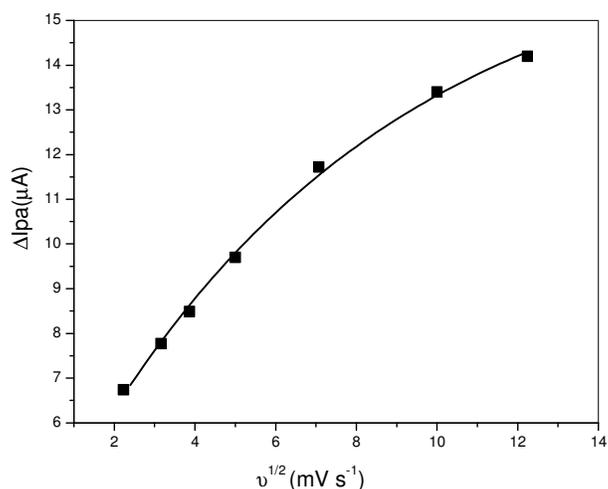
A influência do pH na resposta voltamétrica do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  foi estudada no intervalo de pH de 4 a 11, em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de quercetina.

O comportamento da quercetina em tampão fosfato neste intervalo de pH é semelhante ao comportamento obtido para catequina no mesmo intervalo de pH e mesmo eletrólito, sendo assim a discussão sobre o efeito do pH na determinação de quercetina em chás é similar a do item 4.2.3.

A melhor definição de pico e máximo de corrente também foi observada em pH 6,8 e, considerando-se os resultados obtidos, escolheu-se trabalhar com uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /20% etanol (v/v) (pH 6,8) para a otimização de outros parâmetros para esta determinação.

#### **4.3.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura**

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a  $150 \text{ mV s}^{-1}$  para uma solução  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de quercetina em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 20% etanol (v/v) (pH condicional 6,8) (FIGURA 4.17).

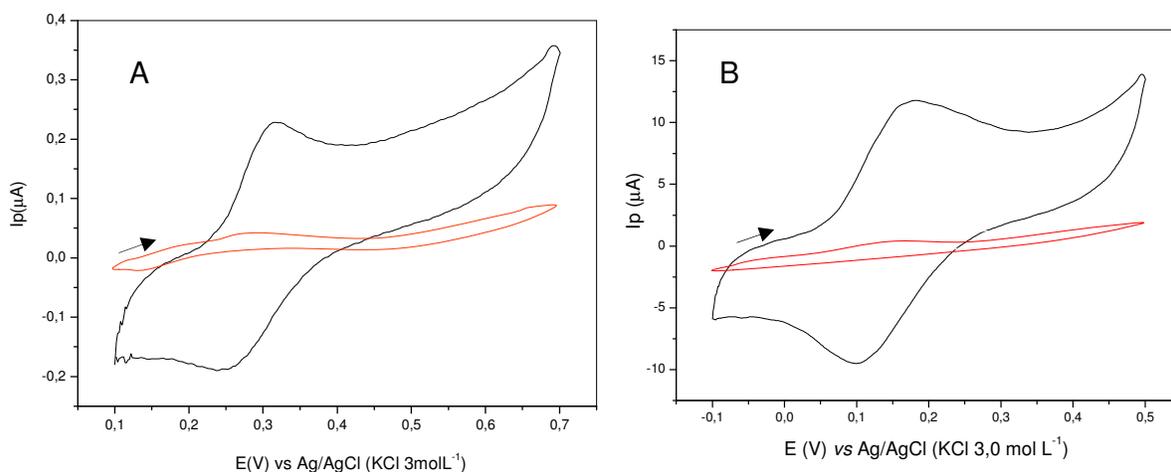


**FIGURA 4.17.** Resposta voltamétrica do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de QCT

As correntes de pico anódica não variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura como observado na FIGURA 4.17, sugerindo que a oxidação da quercetina é controlada por adsorção das espécies na superfície do eletrodo.

#### 4.3.4. Comportamento eletroquímico de QCT sobre o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$

Na FIGURA 4.18 é apresentado o perfil voltamétrico da quercetina obtida com o ECC não modificado e ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ .



**FIGURA 4.18.** Voltamogramas cíclicos para QCT  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 20% etanol (v/v) (pH condicional 6,8); (A) ECC não modificado e (B) ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

O voltamograma da quercetina obtida com ECC não modificado apresentou dois picos, sendo um anódico em 315 mV e outro catódico em 257 mV.

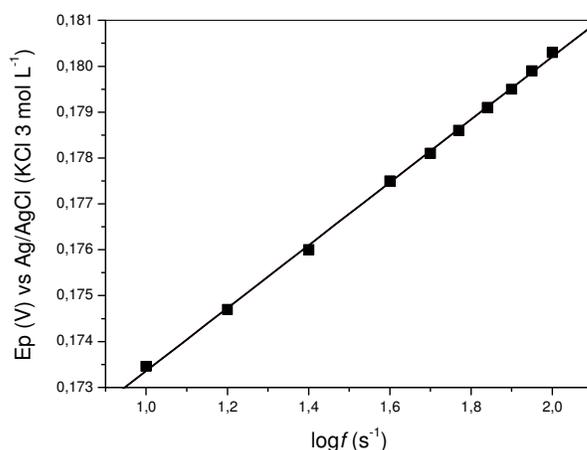
O voltamograma da quercetina em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 20% etanol (v/v) (pH condicional 6,8) determinado com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> mostra um pico anódico em 157 mV e um pico catódico em 100 mV vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>), a razão  $I_{pa}/I_{pc}$  foi igual a unidade e  $\Delta E_p$  foi igual a 57 mV, o que de acordo com a teoria da voltametria cíclica,<sup>160</sup> trata-se de um sistema reversível.

Assim, como verificado para a catequina, o pico de oxidação obtido empregando-se o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, para determinação de QCT foi muito maior (maior magnitude de corrente) em relação ao ECC não modificado e houve uma diminuição do potencial de oxidação, como pode ser observado na FIGURA 4.18.

A variação do potencial anódico com o pH mostrou uma relação linear com inclinação de 29,6 mV pH<sup>-1</sup> o que indica um mecanismo que envolve a transferência de dois elétrons e um prótons.

Também é possível prever o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação da quercetina utilizando a teoria da SWV onde a dependência dos potenciais de pico com o logaritmo da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial para sistemas reversíveis é linear (equação 2.2).

Na FIGURA 4.19 é apresenta o comportamento do potencial de pico em função do logaritmo da freqüência no intervalo de 10 a 100 s<sup>-1</sup> para QCT.



**FIGURA 4.19.** Dependência do potencial de pico com o logaritmo da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial.

A inclinação da curva de acordo com a FIGURA 4.19 é igual a 0,013. Substituindo este valor na equação 2.2, o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação da catequina é igual a 2, confirmando os cálculos obtidos empregando-se a equação 2.2.

Considerando a teoria desenvolvida para a voltametria de onda quadrada<sup>160, 173, 174, 176</sup> para sistemas reversíveis controlado por adsorção (equação 2.2) e o estudo da dependência do potencial de pico anódico com pH, foi possível propor um mecanismo de funcionamento do ECCM estudado. O mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> na presença de QCT, é similar ao mecanismo proposto na presença de CAT, sendo que o funcionamento do eletrodo proposto é dividido em duas etapas: uma química e outra eletroquímica, caracterizando-se como um mecanismo CE. Inicialmente, quercetina é oxidada quimicamente a *o*-quinona correspondente na superfície do eletrodo e Cu(II) é reduzido a Cu(I), sendo então Cu(I) reoxidado eletroquimicamente a Cu(II) gerando o sinal analítico.

#### **4.3.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto**

Na TABELA 4.3 estão apresentados os parâmetros estudados e otimizados para determinação de quercetina em chás matte e camomila.

A frequência escolhida para todas as determinações de quercetina foi igual a de 30 s<sup>-1</sup>, devido apresentar menor linha base em relação as demais frequências estudadas. A amplitude de 40 mV foi escolhida por apresentar melhor definição de pico, assim como maior intensidade de corrente. O incremento de varredura de potencial também foi escolhido por apresentar melhor definição de pico, aumentando assim além da resposta analítica, a resolução dos sinais.

**TABELA 4.3.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	NaNO <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> , NaCl, KCl, Tampão fosfato	Tampão fosfato
Solubilidade da amostra eletrólito/ etanol % v/v	95/5% - 70/30%	80/20%
pH do eletrólito	4 – 11	6,8
Concentração de tampão fosfato (mol L <sup>-1</sup> )	0,01 – 1	0,1
Frequência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 100	30
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	40
Incremento de varredura (ΔEs) (mV)	1 – 5	1

#### 4.3.6. Estudo de Repetibilidade

Os estudos da repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de quercetina  $4,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/20% etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método. A repetibilidade intra e inter dias foram realizadas conforme descrito anteriormente (item 4.2.7). O RSD obtido para a repetibilidade intra dias foi de 1,24 % e para repetibilidade inter dias foi de 2,57 %.

#### 4.3.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação

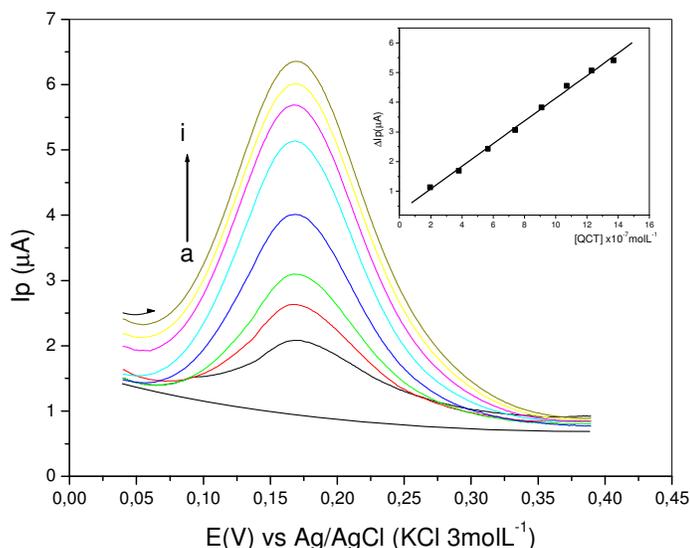
Foram realizados experimentos em triplicata para amostras de chás matte e camomila por meio da adição de alíquotas de solução padrão de QCT em três concentrações diferentes nas soluções dessas amostras e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com amostras não adicionadas do padrão. As

recuperações variaram entre 94,5 % e 102 %. Esses valores de recuperação obtidos indicam que não houve interferência da matriz das amostras na determinação de quercetina pelo procedimento analítico proposto.

#### 4.3.8. Curva analítica e aplicações

Na FIGURA 4.20 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de QCT nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.3. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de QCT entre  $1,96 \times 10^{-7}$  e  $1,37 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> com limite de detecção determinado conforme a equação 4.4 igual a  $8,61 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. A equação de regressão linear obtida foi:  $I_{pa}(A) = 3,15 \times 10^{-7} + 3,81 [QCT] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9985$ .

O método proposto foi aplicado na determinação de quercetina em chás. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a quercetina apresentou um tempo de retenção de 8,45 minutos. Na TABELA 4.4 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.



**FIGURA 4.20.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de QCT; (a) eletrólito suporte; (b)  $1,96 \times 10^{-7}$ ; (c)  $3,80 \times 10^{-7}$ ; (d)  $5,66 \times 10^{-7}$ ; (e)  $7,40 \times 10^{-7}$ ; (f)  $9,09 \times 10^{-7}$ ; (g)  $1,07 \times 10^{-6}$ ; (h)  $1,23 \times 10^{-6}$ ; (i)  $1,37 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> / 20% etanol (v/v) (pH 6,8);  $f = 30 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva analítica obtida

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{exp} = 2,44$  e  $t_{tabelado} = 2,571$ ). Como o  $t_{exp}$  obtido é menor que o  $t_{tabelado}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de quercetina pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95% e pode ser usado na determinação de QCT em chás.

**TABELA 4.4.** Determinação de quercetina em chás por HPLC e o método proposto.

<b>Amostras</b> (mg/100g)	<b>HPLC</b>	<b>SWV</b>	<b>Er%</b>	
	Real	3,12 ± 0,03	3,08 ± 0,08	-1,28
<b>Chá Matte</b>	Hikari	3,19 ± 0,04	3,21 ± 0,05	+0,63
	Leão	2,89 ± 0,02	2,80 ± 0,06	-3,11
	Real	2,76 ± 0,02	2,87 ± 0,04	+3,98
<b>Chá Camomila</b>	Dr. Oetker	2,15 ± 0,05	2,18 ± 0,04	+1,39
	Leão	2,46 ± 0,04	2,49 ± 0,05	+1,22

*n = 3; nível de confiança de 95%;*

*Er%* (Erro relativo %) = método proposto versus HPLC.

#### **4.4. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de rutina em formulações farmacêuticas**

##### **4.4.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte**

O eletrólito suporte utilizado para todas as determinações de rutina foi o tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) (pH condicional 6,9). Assim como para CAT e QCT, foram estudados cinco diferentes eletrólitos suportes sendo estes: tampão fosfato, nitrato de sódio, nitrato de potássio, cloreto de sódio e cloreto de potássio para a determinação de rutina. Em todas as soluções foram verificadas a presença de picos voltamétricos, porém a solução de tampão fosfato apresentou melhor definição de pico e intensidade de corrente (TABELA 4.5.).

##### **4.4.2. Estudo do efeito do pH**

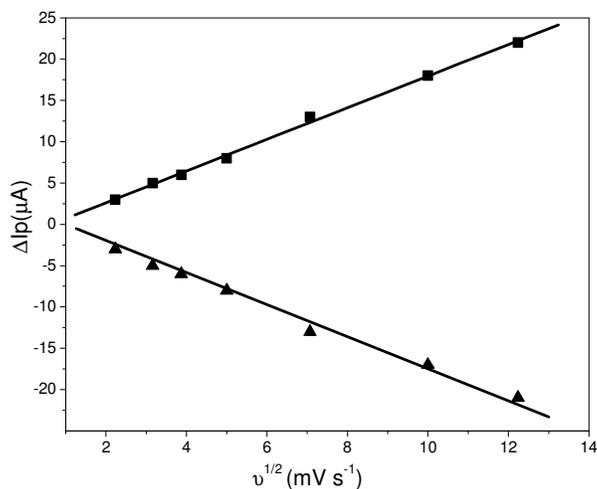
O efeito do pH foi estudado no intervalo de pH de 4 a 11 em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> / 10% etanol (v/v) na presença de  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de rutina. Assim como para CAT e QCT a rutina apresentou o mesmo comportamento em tampão fosfato, sendo assim a discussão apresentada nos item 4.2.3 é válida também para rutina.

A melhor definição de pico e máximo de corrente também foi observada em pH 6,9, sendo este pH selecionado para os estudos posteriores de otimização de parâmetros para esta determinação.

##### **4.4.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura**

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a 150 mV s<sup>-1</sup> para uma solução  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de rutina em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,9) (FIGURA 4.21).

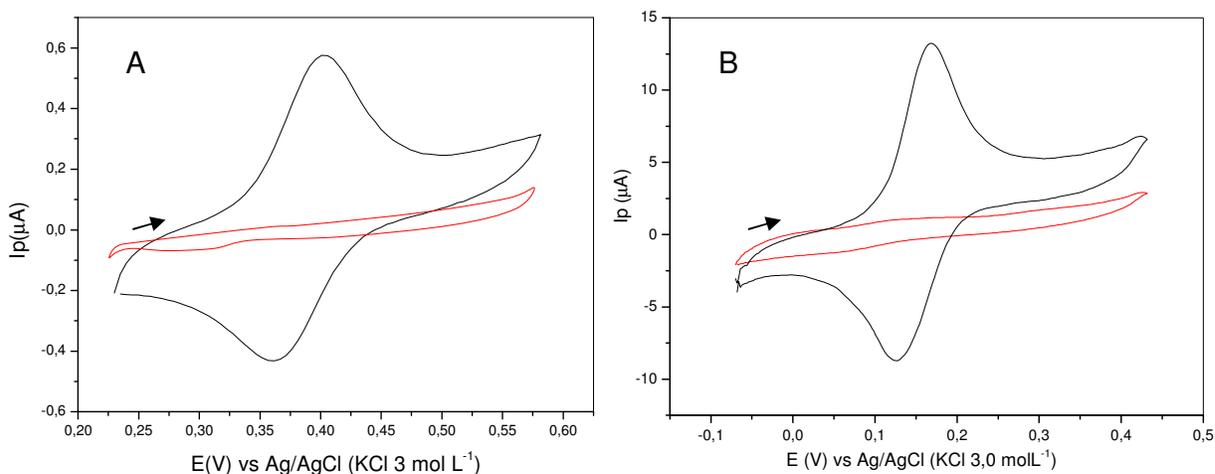
As correntes de pico anódico variaram lineamente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, sugerindo que o processo de oxidação da rutina é controlado por difusão.



**FIGURA 4.21.** Resposta voltamétrica do ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (■)  $I_p$  anódico (▲)  $I_p$  catódico na presença de Rut.

#### 4.4.4. Comportamento eletroquímico de Rut sobre o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Na FIGURA 4.22 são apresentados os perfis voltamétricos da rutina em tampão fosfato utilizando um ECC não modificado e o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e para efeito de comparação.



**FIGURA 4.22.** Voltamograma cíclico para Rut  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em Tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% de etanol (v/v) (pH condicional 6,8) utilizando (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>;  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>

Como pode ser observado na FIGURA 4.22, o perfil voltamétrico da rutina obtida com ECC não modificado em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,9) apresentou um pico anódico em 400 mV e outro catódico em 340 mV. E o voltamograma obtido para a rutina no mesmo eletrólito suporte usando o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> apresentou um pico anódico em 168 mV e um pico catódico em 112 mV vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>), a razão  $I_{pa}/I_{pc}$  foi igual a unidade e  $\Delta E_p$  foi igual a 56 mV evidenciando se tratar de um sistema reversível.<sup>160</sup>

A presença do modificador Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> imobilizado em resina poliéster aumentou a eficiência eletrocatalítica do eletrodo como pode ser observado na FIGURA 4.22, uma vez que os potenciais de pico de oxidação e de redução diminuíram significativamente além disso houve um aumento considerável das magnitudes de correntes anódica e catódica para rutina 4,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>.

A variação de potencial anódico com o pH mostrou uma relação linear com inclinação de 28,9 mV pH<sup>-1</sup> o que indica um mecanismo que envolve a transferência de dois elétrons e um próton o que também foi confirmado utilizando a equação 2.2 para sistemas reversíveis.

O mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> na presença de rutina é similar ao mecanismo proposto para o mesmo eletrodo na presença de CAT (FIGURA 4.11) sendo este dividido em duas etapas uma química e outra eletroquímica, caracterizando-se como um mecanismo CE. Inicialmente, rutina é oxidada quimicamente a 3'4'diquinona correspondente na superfície do eletrodo e Cu(II) é reduzido a Cu(I), sendo então Cu(I) reoxidado eletroquimicamente a Cu(II) gerando o sinal analítico.

#### **4.4.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto**

Na TABELA 4.5 estão apresentados os parâmetros estudados e otimizados para determinação de rutina em formulações farmacêuticas. A frequência escolhida para todas as determinações de rutina foi igual a 50 s<sup>-1</sup>, em virtude desta apresentar menor linha base em relação a demais frequências estudadas. A amplitude de 40 mV foi escolhida por apresentar melhor definição de pico.

**TABELA 4.5.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	NaNO <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> , NaCl, KCl, Tampão fosfato	Tampão fosfato
Solubilidade da amostra eletrólito/ etanol % v/v	95/5% - 70/30%	90/10%
pH do eletrólito	4 – 11	6,9
Concentração de Tampão fosfato (mol L <sup>-1</sup> )	0,01 – 1	0,1
Frequência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 100	50
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	40
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) (mV)	1 – 5	1

#### 4.4.6. Estudo da Repetibilidade

Os estudos da repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando-se soluções de rutina  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> /10% etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método proposto. A repetibilidade intra e inter dias foram realizadas conforme descrito anteriormente (item 4.2.7). O RSD obtido para a repetibilidade intra dias foi de 0,78 % e pra repetibilidade inter dias foi de 1,92 %.

#### 4.4.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação

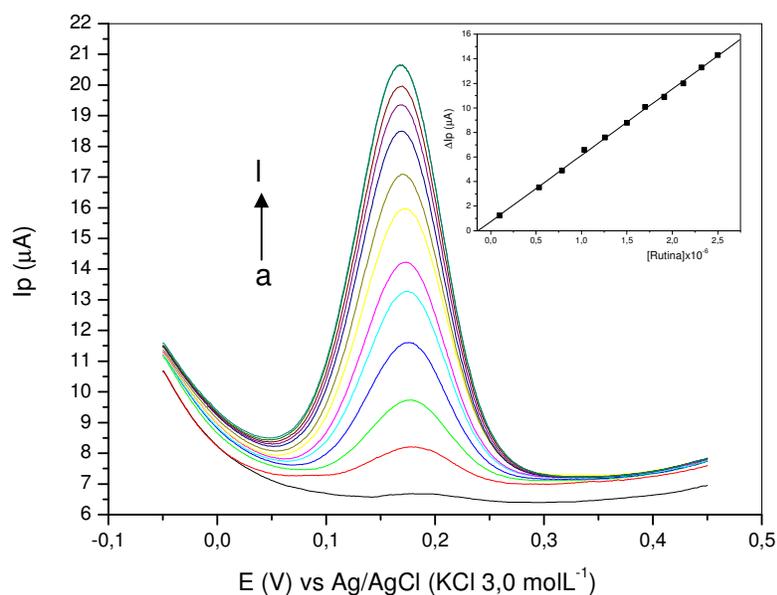
Foram avaliados alguns excipientes presentes em amostras comerciais que pudessem interferir na determinação de rutina. As substâncias avaliadas foram: sacarina sódica, metilparabeno, amido, carbonato de cálcio e estearato de magnésio em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) (pH condicional 6,9) na mesma concentração (1:1 interferente: analito) e dez vezes maior (10:1 interferente:analito) sendo a concentração de rutina igual a  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>.

Nenhuma substância investigada causou interferência na determinação de rutina nestas concentrações investigadas.

Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão. As recuperações variaram entre 98,2% e 104%, estes valores obtidos indicam que não houve interferência da matriz das amostras na determinação de rutina pelo procedimento analítico proposto.

#### 4.4.8. Curva analítica e aplicações

Na FIGURA 4.23 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de rutina nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.5. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de Rut entre  $9,97 \times 10^{-8}$  e  $2,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, LD =  $4,15 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> conforme a equação 4.4. A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa}(A) = 7,36 \times 10^{-7} + 5,40 [Rut] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9994$ .



**FIGURA 4.23.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de Rut; (a) eletrólito suporte; (b)  $9,97 \times 10^{-8}$ ; (c)  $5,34 \times 10^{-7}$ ; (d)  $7,86 \times 10^{-7}$ ; (e)  $1,03 \times 10^{-6}$ ; (f)  $1,26 \times 10^{-6}$ ; (g)  $1,5 \times 10^{-6}$ ; (h)  $1,70 \times 10^{-6}$ ; (i)  $1,91 \times 10^{-6}$ ; (j)  $2,12 \times 10^{-6}$ ; (k)  $2,32 \times 10^{-6}$ ; (l)  $2,50 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) (pH 6,9);  $f = 50 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva analítica obtida

O método proposto foi aplicado na determinação de rutina em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a rutina apresentou um tempo de retenção de 4,2 minutos. Na TABELA 4.6 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{exp} = 2,254$  e  $t_{tabelado} = 2,571$ ). Como o  $t_{exp}$  obtido é menor que o  $t_{tabelado}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de rutina pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

**TABELA 4.6.** Determinação de rutina em formulações farmacêuticas por HPLC e pelo método proposto.

Rutina					
Amostras	Valor rotulado	HPLC	SWV	$E_{r1}\%$	$E_{r2}\%$
Venocur*	300	299 ± 2	306 ± 1	+ 2,0	+2,3
Nova Rutina**	20,0	19,9 ± 0,2	19,7 ± 0,2	- 1,5	-1,0

*n = 3; nível de confiança de 95%*

*\* mg Rutina por comprimido; \*\* mg Rutina por mL*

*$E_{r1}$  = método proposto vs. valor rotulado;  $E_{r2}$  = método proposto vs. HPLC.*

## 4.5. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de BHA em maionese

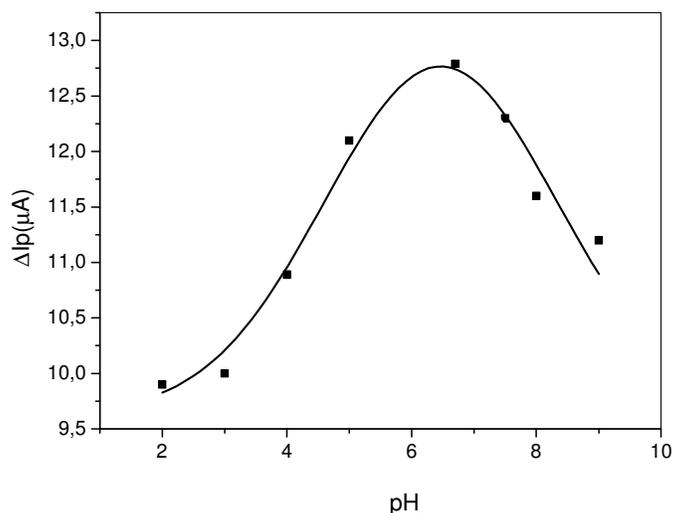
### 4.5.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte

O eletrólito suporte utilizado para todas as determinações de BHA foi o nitrato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo 10% de etanol (pH condicional 6,7)

Foram estudados cinco diferentes eletrólitos suportes (tampão fosfato, nitrato de sódio, nitrato de potássio, cloreto de sódio e cloreto de potássio) para ser usados nas determinações. Em todas as soluções com exceção do tampão fosfato, foi verificada a presença de picos voltamétricos, porém a solução de nitrato de potássio apresentou melhor definição de pico e intensidade de corrente sendo assim uma solução de  $\text{KNO}_3$  foi escolhida para todas as determinações de BHA.

### 4.5.2. Estudo do efeito do pH

O comportamento eletroquímico do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  foi estudado no intervalo de pH de 2 a 9 em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) na presença e na ausência de  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de BHA. A FIGURA 4.24 mostra o efeito do pH sobre a corrente de pico anódica do eletrodo modificado. A corrente de pico anódico ( $\Delta I/\mu\text{A}$ ) foi obtida pela diferença das correntes na presença e na ausência de BHA.



**FIGURA 4.24.** Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ; eletrólito suporte:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) na presença de BHA.

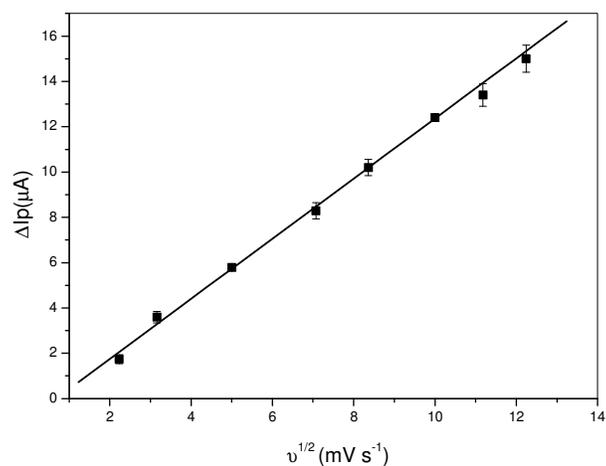
Observa-se um aumento significativo da corrente de pico para valores de pH entre 2 e 6,7 o que provavelmente se deve a influencia dos íons  $\text{H}^+$  na cinética de

reação entre BHA e  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  na superfície do eletrodo. Para valores de pH acima de 6,7 observa-se um decréscimo na intensidade de corrente. A melhor definição de pico e máximo de corrente foi observado em pH 6,7 em virtude dos resultados obtidos escolheu-se trabalhar com um solução de  $\text{KNO}_3$  em pH 6,7 para a otimização de outros parâmetros para esta determinação.

#### 4.5.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a 150  $\text{mV s}^{-1}$  para uma solução  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHA em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  / 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,7) (FIGURA 4.25).

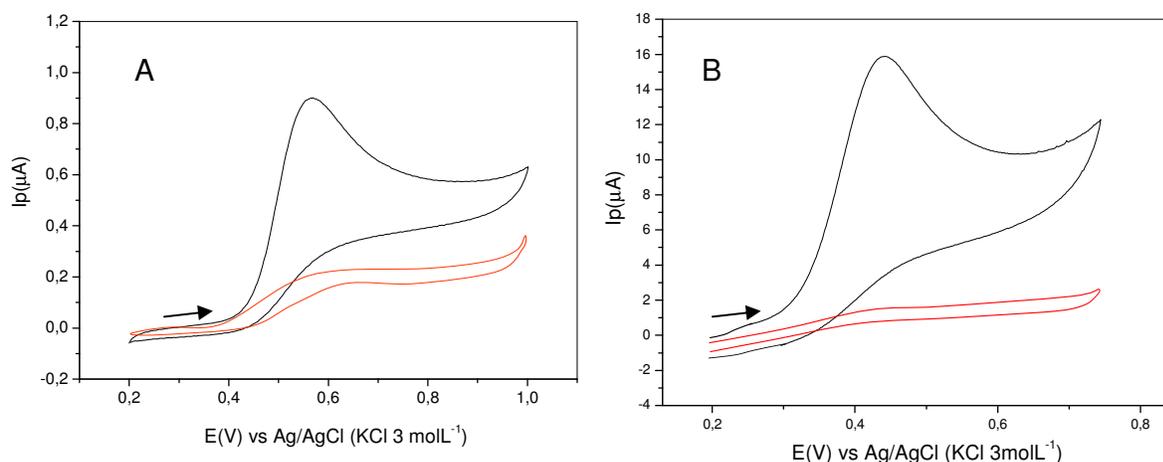
As correntes de pico anódica variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, sugerindo que o processo de oxidação de BHA é controlado por difusão.



**FIGURA 4.25.** Resposta voltamétrica do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHA em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  / 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,7) .

#### 4.5.4. Comportamento eletroquímico de BHA sobre o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$

Na FIGURA 4.26 são apresentados os perfis voltamétricos de BHA em  $\text{KNO}_3$  utilizando os ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  e um ECC não modificado na mesma composição percentual de parafina para vias de comparação.



**FIGURA 4.26.** Voltamogramas cíclicos de BHA  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 10% de etanol (v/v) (pH 6,7) utilizando (A) ECC não modificado e (B) ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

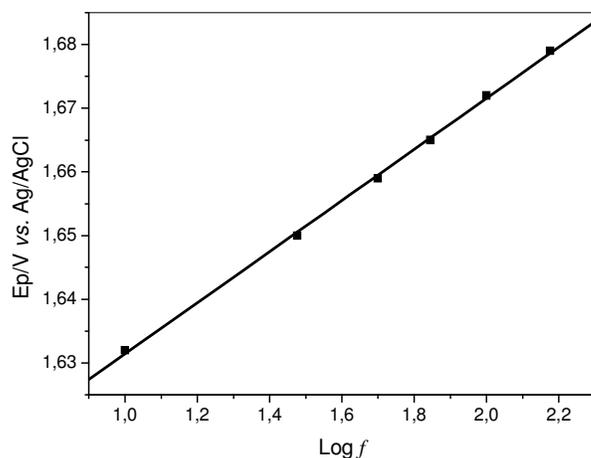
Como pode ser observado na FIGURA 4.26, o perfil voltamétrico de BHA obtido com ECC não modificado em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 10% etanol (pH 6,7) apresentou um pico anódico em 582 mV vs Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ) e o perfil voltamétrico de BHA em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 10% etanol (pH 6,7) determinado com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  mostram um pico anódico em 440 mV vs Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ), a ausência de um pico catódico no sentido inverso de varredura e o deslocamento para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura evidencia se tratar de um sistema irreversível de acordo com a teoria da voltametria cíclica.<sup>160</sup>

O potencial de trabalho utilizando ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  foi deslocado para potenciais menos positivos, podendo assim aumentar a seletividade do eletrodo. A magnitude de corrente também aumentou significativamente para a mesma concentração de BHA empregada nestas determinações voltamétricas, sugerindo assim tratar-se de um processo eletrocatalítico.

A variação de potencial anódico com o pH mostrou uma relação linear com inclinação de  $29,5 \text{ mV pH}^{-1}$  o que indica um mecanismo que envolve a transferência de dois elétrons e um próton.

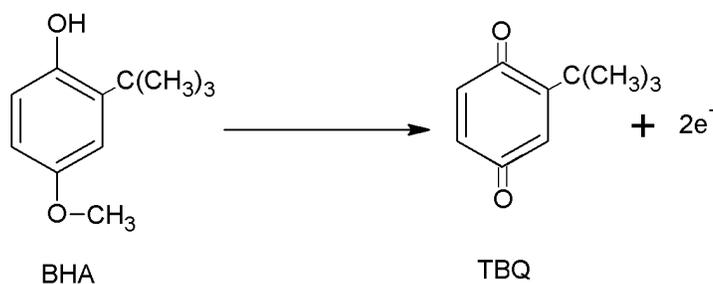
Utilizando-se os critérios de diagnósticos disponíveis para a técnica de voltametria de onda quadrada,<sup>172, 173, 187</sup> também foi possível prever o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação de BHA. De acordo com estes critérios, a dependência dos potenciais de pico com o logaritmo da frequência de onda quadrada para reações totalmente irreversíveis (equação 2.1) é linear.

A Figura 4.27 apresenta o comportamento do potencial de pico em função do logaritmo da frequência para BHA. Como pode ser observado, há uma relação linear entre o potencial de pico de oxidação de BHA e o logaritmo da frequência, com uma inclinação da curva de 0,088. Empregando-se a equação 2.1 e, considerando o coeficiente de transferência de carga igual a 0,5, que é o valor comumente utilizado para moléculas orgânicas, o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação de BHA é igual a 2.



**Figura 4.27.** Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência de aplicação de pulso de potencial.

Considerando os estudos realizados os quais indicam que no processo de oxidação de BHA estão envolvidos dois elétrons, sugere-se que em  $\text{KNO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ / 10% etanol (pH 6,7), BHA é oxidado a TBQ liberando dois elétrons, como mostra a reação a seguir:



#### 4.5.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto

Na TABELA 4.7 estão apresentados todos os parâmetros estudados e otimizados para determinação de BHA em amostras de alimentos.

A frequência escolhida para todas as determinações de BHA foi igual a  $80 \text{ s}^{-1}$ , em virtude desta frequência apresentar menor linha base em relação as demais frequências estudadas e melhor definição de pico. A amplitude de 60 mV foi escolhida por apresentar melhor definição de pico, assim como maior magnitude de corrente, este critério também foi utilizado para selecionar o incremento de varredura potencial igual a 5 mV.

**TABELA 4.7.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	NaNO <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> , NaCl, KCl, tampão fosfato	KNO <sub>3</sub>
Solubilidade da amostra eletrólito/ etanol % v/v	95/5%-70/30%	90/10%
pH do eletrólito	2 – 9	6,7
Concentração de KNO <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	0,01 – 1	0,1
Frequência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 100	80
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	60
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) (mV)	1 – 6	5

#### 4.5.6. Estudo de Repetibilidade

Os estudos de repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de BHA  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em KNO<sub>3</sub>/10% etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método.

A repetibilidade inter e intra dias foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 4.2.7. O RSD obtido para a repetibilidade inter dias foi de 0,86 % e para repetibilidade intra dias foi de 2,79 %.

#### 4.5.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação

Foram avaliadas algumas substâncias presentes em amostras de maionese que podem interferir na determinação de BHA. As substâncias avaliadas foram: ácido cítrico, EDTA, benzoato de sódio, amido, sorbato de potássio e lactose em solução de  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) (pH condicional 6,7) na mesma concentração (1:1 interferente: analito) e dez vezes maior (10:1 interferente: analito) sendo a concentração de BHA  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Nenhuma substância investigada apresentou interferência na determinação de BHA em maionese.

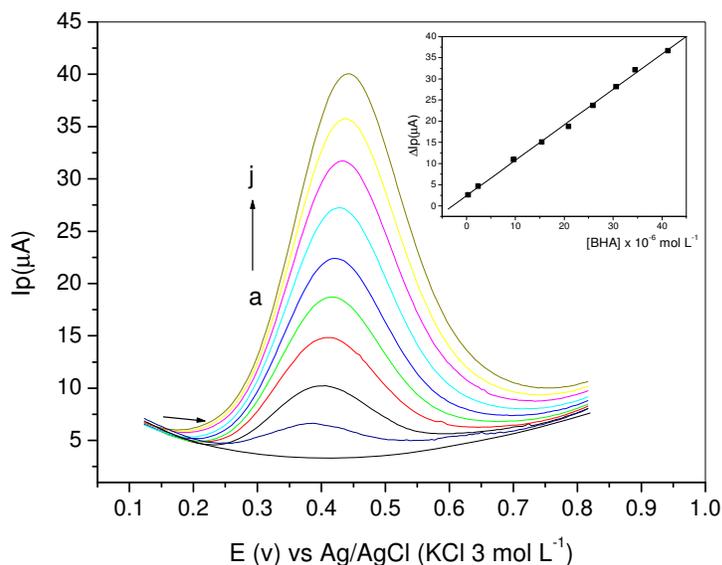
Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão. As recuperações variaram entre 95,8% e 104%, estes valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de BHA pelo procedimento analítico proposto.

#### 4.5.8. Curva analítica e aplicações

Na FIGURA 4.28 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de BHA nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.7. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de BHA entre  $3,40 \times 10^{-7}$  e  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  com  $\text{LD} = 5,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (segundo equação 4.4). A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa}(A) = 2,41 \times 10^{-6} + 0,83 [\text{BHA}] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9989$ .

O método proposto foi aplicado na determinação de BHA em amostras de maionese. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente, o qual BHA apresentou um tempo de retenção de 6,7 minutos. Na TABELA 4.8 são apresentados os resultados obtidos empregando-se os métodos proposto e HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{\text{exp}} = 2,482$  e  $t_{\text{tabelado}} = 2,571$ ). Como o  $t_{\text{exp}}$  obtido é menor que o  $t_{\text{tabelado}}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de BHA pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.



**FIGURA 4.28.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de BHA; (a) eletrólito suporte; (b) 3,40 × 10<sup>-7</sup>; (c) 2,37 × 10<sup>-6</sup>; (d) 9,62 × 10<sup>-6</sup>; (e) 1,54 × 10<sup>-5</sup>; (f) 2,09 × 10<sup>-5</sup>; (g) 2,59 × 10<sup>-5</sup>; (h) 3,06 × 10<sup>-5</sup>; (i) 3,45 × 10<sup>-5</sup>; (j) 4,12 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>; eletrólito suporte: KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> / 10 % etanol (v/v) (pH 6,7);  $f = 80 \text{ s}^{-1}$ ,  $a = 60 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva analítica obtida.

**TABELA 4.8.** Determinação de BHA em maionese por HPLC e pelo método proposto.

Amostras	BHA (mg/100g)		
	HPLC	SWV	E <sub>r</sub> %
Hellmans	2,40 ± 0,05	2,55 ± 0,09	+6,25
Soya	5,96 ± 0,06	6,10 ± 0,05	+2,35
Arisco	1,60 ± 0,04	1,64 ± 0,09	+2,50

$n = 3$ ; nível de confiança de 95%

## **4.6. ECCM com $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ para determinação de BHT em amostras de maionese e margarina**

### **4.6.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte**

O eletrólito suporte utilizado para todas as determinações de BHT foi o nitrato de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  / 10 % etanol (v/v) (pH 6,7)

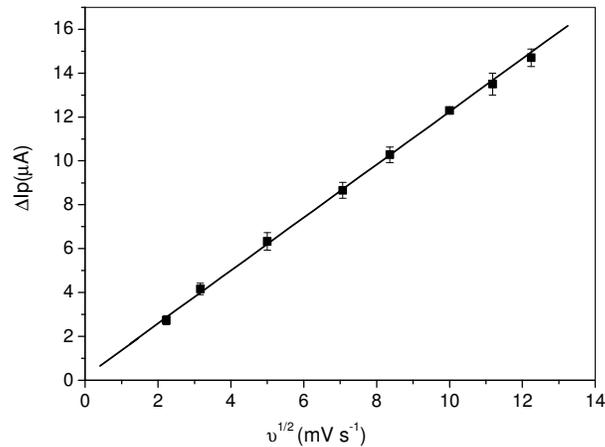
Assim como para BHA, foram estudados cinco diferentes eletrólitos suportes (tampão fosfato, nitrato de sódio, nitrato de potássio, cloreto de sódio e cloreto de potássio) para ser usados nas determinações. Em todas as soluções com exceção do tampão fosfato, foi verificada a presença de picos voltamétricos, porém a solução de nitrato de potássio apresentou melhor definição de pico e intensidade de corrente sendo assim escolhida para todas as determinações de BHT.

### **4.6.2. Estudo do efeito do pH**

O comportamento eletroquímico do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  foi estudado no intervalo de pH de 2 a 9, em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) na presença e na ausência de  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT. O comportamento do ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  na presença de BHT variando o pH foi similar ao obtido na presença de BHA, assim a discussão é similar ao item 4.5.2. A melhor definição de pico e máximo de corrente foi observada em pH 6,7, sendo assim essa solução selecionada para os estudos futuros.

### **4.6.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura**

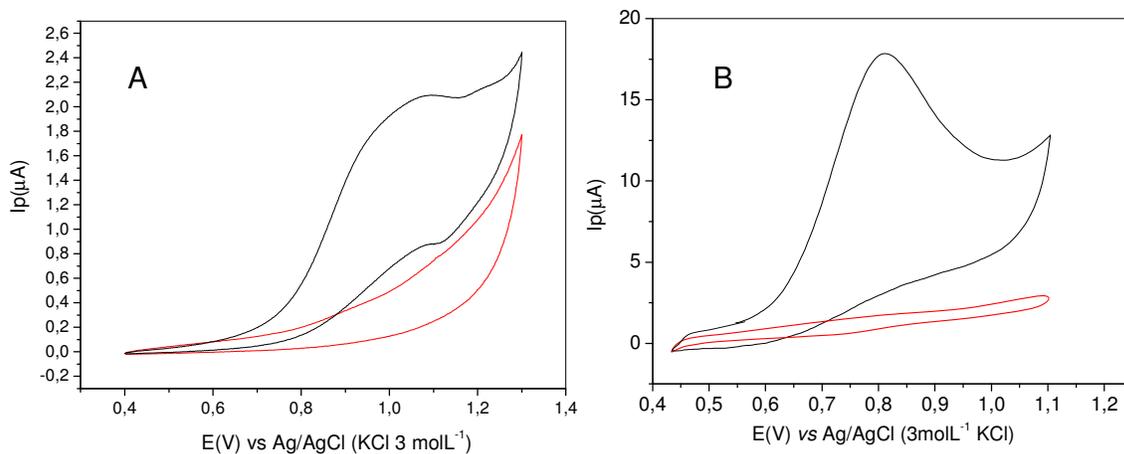
O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a  $150 \text{ mV s}^{-1}$  para uma solução  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  / 10% etanol (v/v) (pH 6,7) (FIGURA 4.29). As correntes de pico anódicas variaram lineamente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, sugerindo que o processo de oxidação de BHT é controlado por difusão.



**FIGURA 4.29.** Resposta voltamétrica do ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de BHT.

#### 4.6.4. Comportamento eletroquímico de BHT sobre o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Na FIGURA 4.30 são apresentados os perfis voltamétricos de BHT em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) utilizando os ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e um ECC não modificado na mesma composição percentual de parafina para efeito de comparação.



**FIGURA 4.30.** Voltamograma cíclico para BHT  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> /10% de etanol (v/v) (pH 6,7) utilizando (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>;  $\nu = 50$  mV s<sup>-1</sup>

Como pode ser observado na FIGURA 4.30, o perfil voltamétrico de BHT em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (pH 6,7) determinado ECC não modificado apresentou um pico anódico em 1,08 V vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>).



**TABELA 4.9.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	NaNO <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> , NaCl, KCl, Tampão fosfato	KNO <sub>3</sub>
Solubilidade da amostra eletrólito/ etanol % v/v	95/5% - 70/30%	90/10%
pH do eletrólito	2 – 9	6,7
Concentração de KNO <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	0,01 – 1	0,1
Freqüência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 100	80
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	70
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) (mV)	1 – 6	5

#### 4.6.6. Estudo de Repetibilidade

Os estudos de repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de BHT  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) nos mesmo parâmetros de SWV otimizados para o método. A repetibilidade inter e intra dias foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 4.2.7. O RSD obtido para a repetibilidade inter dias foi de 1,97 % e pra repetibilidade intra dias foi de 2,33 %.

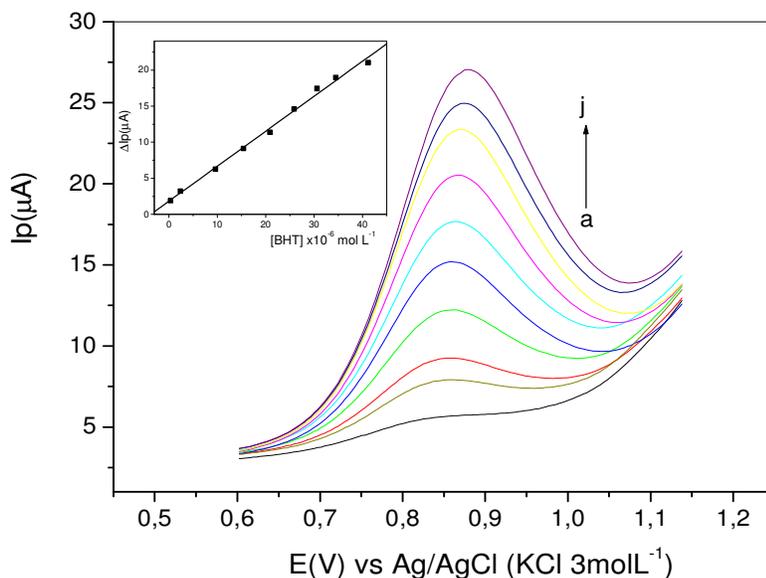
#### 4.6.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação

Foram avaliadas algumas substâncias presentes em amostras de alimentos que podem interferir na determinação de BHT. As substâncias avaliadas foram: ácido cítrico, EDTA, benzoato de sódio, amido, sorbato de potássio e lactose em solução de KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) (pH 6,7) na mesma concentração (1:1 interferente: analito) e dez vezes maior (10:1 interferente: analito) sendo a concentração de BHT  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Nenhuma substância investigada apresentou

interferência na determinação de BHT em amostras de alimentos. Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão. As recuperações variaram entre 95,1% e 104%. Esses valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de BHT pelo procedimento analítico proposto.

#### 4.6.8. Curva analítica e aplicações

Na FIGURA 4.31 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de BHT nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.9. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de BHT entre  $3,40 \times 10^{-7}$  a  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  com  $LD = 6,72 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (de acordo com a equação 4.4). A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa} (\text{A}) = 1,82 \times 10^{-6} + 0,48 [\text{BHT}] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9986$ .



**FIGURA 4.31.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em diferentes concentrações de BHT; (a) eletrólito suporte; (b)  $3,40 \times 10^{-7}$ ; (c)  $2,37 \times 10^{-6}$ ; (d)  $9,62 \times 10^{-6}$ ; (e)  $1,54 \times 10^{-5}$ ; (f)  $2,09 \times 10^{-5}$ ; (g)  $2,59 \times 10^{-5}$ ; (h)  $3,06 \times 10^{-5}$ ; (i)  $3,45 \times 10^{-5}$ ; (j)  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; eletrólito suporte:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) (pH 6,7);  $f = 80 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $a = 70 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva analítica obtida.

O método proposto foi aplicado na determinação de BHT em amostras de maioneses e margarinas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a BHT apresentou um tempo de retenção de 8,8 minutos. Na TABELA 4.10 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{exp} = 2,381$  e  $t_{tabelado} = 2,571$ ). Como o  $t_{exp}$  obtido é menor que o  $t_{tabelado}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de BHT pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

**TABELA 4.10.** Determinação de BHT em amostras de maioneses e margarinas por HPLC e pelo método proposto.

Amostras	BHT (mg/100g)		E, %
	HPLC	SWV	
Vigor	1,20 ± 0,05	1,22 ± 0,06	+1,66
Doriana	2,07 ± 0,04	2,00 ± 0,07	- 3,38
Soya	3,37 ± 0,05	3,24 ± 0,09	- 3,85
Arisco	1,04 ± 0,06	1,09 ± 0,08	+ 4,80

*n = 3; nível de confiança de 95%*

#### 4.7. Determinação Simultânea de BHA e BHT

O interesse em desenvolver um procedimento eletroanalítico para a determinação simultânea dos antioxidantes artificiais BHA e BHT é de grande interesse uma vez que estas substâncias são adicionadas em muitos produtos alimentícios gordurosos como maioneses, óleos, margarinas, biscoitos entre outros. A cromatografia líquida de alta eficiência é o método mais empregado para a determinação destes antioxidantes. No entanto, este método possui algumas desvantagens como o tempo de análise, a quantidade elevada de solventes empregados e, o alto custo inerente da técnica, justificando assim o desenvolvimento

do método voltamétrico proposto, que se mostrou mais rápido, simples e de menor custo por determinação.

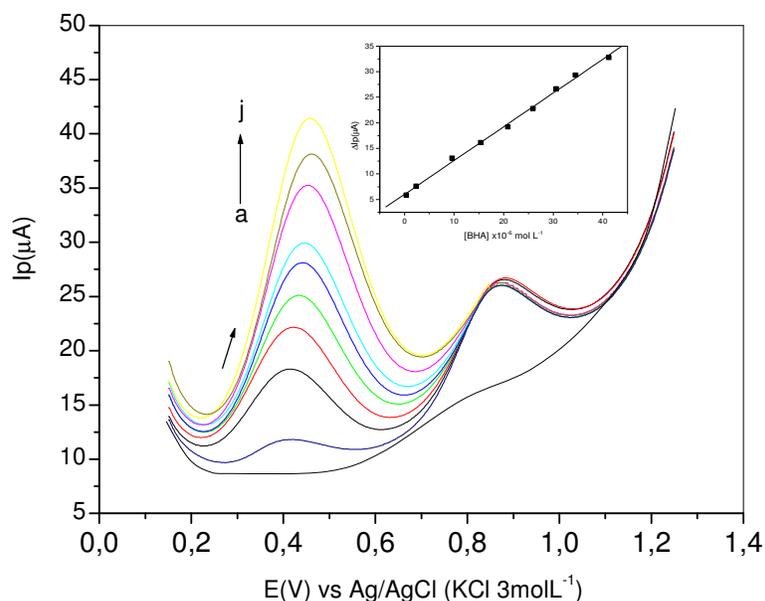
A determinação simultânea de BHA e BHT foi investigada por voltametria de onda quadrada, uma vez que os potenciais de pico de oxidação de BHA (440 mV) e de BHT (870 mV) são distintos. Após otimizar as melhores condições de trabalho para a determinação de BHA e BHT separadamente, realizou-se as medidas voltamétricas de onda quadrada para determinação simultânea destes antioxidantes. As condições de trabalho foram selecionadas e estão apresentadas na TABELA 4.11.

**TABELA 4.11.** Parâmetros estudados para determinação simultânea de BHA e BHT por SWV.

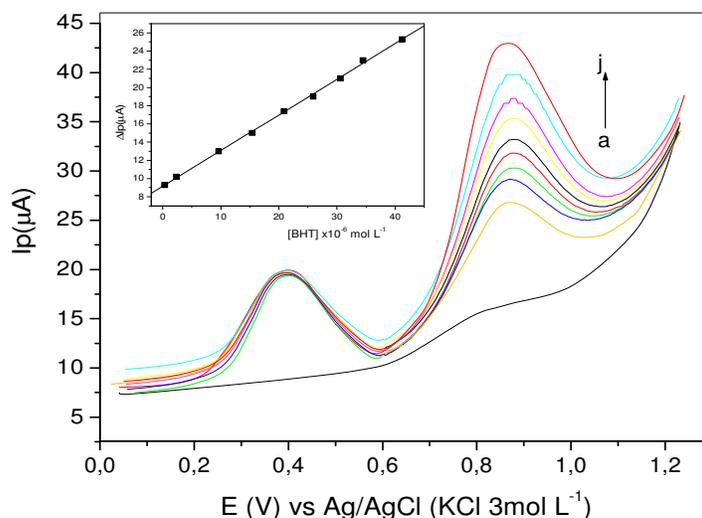
Parâmetros	Estudados	Selecionado
Frequência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 80	50
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	70
Incremento de varredura (ΔEs) (mV)	1 – 5	5

Na FIGURA 4.32 são apresentados os voltamogramas de SW obtidos no intervalo de potencial de 0,15 a 1,25 V, onde foram feitas adições sucessivas de BHA em diferentes concentrações mantendo a concentração de BHT em  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Observa-se que BHT não interfere na quantificação de BHA. Em detalhe a curva analítica obtida. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de BHA entre  $3,40 \times 10^{-7}$  e  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  com LD =  $7,26 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (de acordo com a equação 4.4). A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa}(A) = 6,00 \times 10^{-6} + 0,66 [\text{BHA}] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9987$ .

Na FIGURA 4.33 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos no mesmo intervalo de potencial, onde foram feitas adições sucessivas de BHT num intervalo de concentração entre  $3,40 \times 10^{-7}$  e  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mantendo a concentração de BHA constante em  $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Com pode ser observado, BHA também não interfere na quantificação de BHT. Em detalhe a curva analítica obtida para BHT. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de BHT entre  $3,40 \times 10^{-7}$  e  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  com LD =  $9,31 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa}(A) = 9,15 \times 10^{-8} + 0,39 [\text{BHT}] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9994$ .

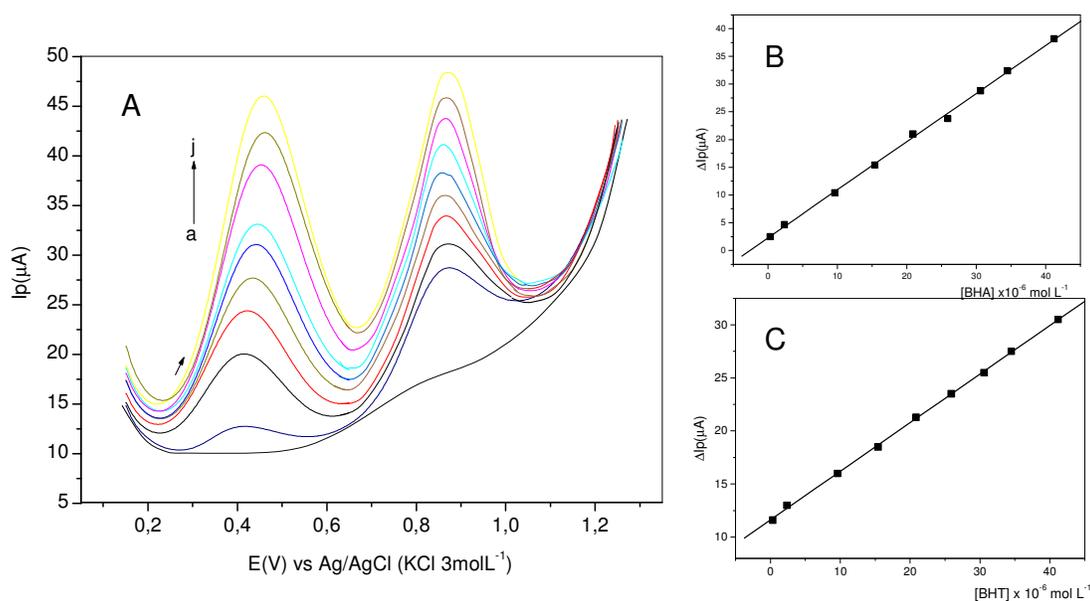


**FIGURA 4.32.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em várias concentrações de BHA na presença de  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de BHT; (a) eletrólito suporte; (b)  $3,40 \times 10^{-7}$ ; (c)  $2,37 \times 10^{-6}$ ; (d)  $9,62 \times 10^{-6}$ ; (e)  $1,54 \times 10^{-5}$ ; (f)  $2,09 \times 10^{-5}$ ; (g)  $2,59 \times 10^{-5}$ ; (h)  $3,06 \times 10^{-5}$ ; (i)  $3,45 \times 10^{-5}$ ; (j)  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; eletrólito:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 10% etanol (v/v) (pH 6,7);  $f = 50 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 70\text{mV}$ ;  $\Delta E_s = 5\text{mV}$ ; Em detalhe a curva analítica obtida.



**FIGURA 4.33.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em várias concentrações de BHT na presença de  $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de BHA; (a) eletrólito suporte; (b)  $3,40 \times 10^{-7}$ ; (c)  $2,37 \times 10^{-6}$ ; (d)  $9,62 \times 10^{-6}$ ; (e)  $1,54 \times 10^{-5}$ ; (f)  $2,09 \times 10^{-5}$ ; (g)  $2,59 \times 10^{-5}$ ; (h)  $3,06 \times 10^{-5}$ ; (i)  $3,45 \times 10^{-5}$ ; (j)  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; eletrólito:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 10% etanol (v/v) (pH 6,7);  $f = 50 \text{ s}^{-1}$ ;  $a = 70\text{mV}$ ;  $\Delta E_s = 5\text{mV}$ ; Em detalhe a curva analítica obtida.

Também foram realizadas medidas voltamétricas de SW adicionando simultaneamente BHA e BHT na célula eletroquímica contendo 5 mL de  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v). A Figura 4.34 mostra os voltamogramas de SW obtidos variando-se a concentração de BHA e BHT no intervalo de concentração entre  $3,40 \times 10^{-7}$  e  $4,12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  para ambos. As curvas analíticas obtidas estão apresentadas na FIGURA 4.34 B e C. As equações das retas obtidas foram para BHA:  $\Delta I_{pa} (\mu\text{A}) = 2,24 \times 10^{-6} + 0,86 [\text{BHA}]$  ( $R= 0,9994$ ), com LD igual  $6,89 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  e para BHT:  $\Delta I_{pa} (\mu\text{A}) = 1,16 \times 10^{-5} + 0,45 [\text{BHT}]$  ( $R= 0,9997$ ), com LD igual  $9,11 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .



**FIGURA 4.34.** (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  em várias concentrações de BHA e BHT; eletrólito:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) (pH 6,7);  $f = 50 \text{ mV/s}$ ;  $a = 70 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ; (B) curva analítica obtida para BHA; (C) curva analítica obtida para BHT.

#### 4.7.1. Estudo da Repetibilidade

Os estudos da repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de BHA  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e BHT  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método. A repetibilidade inter e intra dias foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 4.2.7. O desvio padrão relativo obtido para repetibilidade intra dias foi de 1,2 %

para BHA e 2,3 % para BHT e o RSD obtido para o estudo de repetibilidade inter dias foi de 2,77 e 3,2 % para BHA e BHT respectivamente.

#### 4.7.2. Estudo de Adição e Recuperação

Foram obtidas recuperações variando entre 96,2 e 102 % para BHA na presença de BHT e entre 98,0 a 102 % para BHT na presença de BHA, indicando assim que não houve efeito de matriz nessas determinações voltamétricas. O método proposto foi aplicado na determinação simultânea de BHA e BHT em amostras de maioneses e margarinas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente. Nas TABELAS 4.12 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.

Observa-se que os resultados obtidos por SWV estão em concordância com os resultados obtidos por HPLC. Aplicou-se o teste  $t$  pareado<sup>186</sup> para os resultados obtidos empregando-se o procedimento proposto e HPLC. Para BHA o  $t_{exp} = 1,51$  e para BHT o  $t_{exp} = 1,99$ , ambos os valores são menores que o  $t_{tabelado} = 2,57$ , portanto, os resultados da determinação simultânea de BHA e BHT pelo procedimento proposto e HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95 % e estão dentro de um erro relativo aceitável.

Na TABELA 4.13 são apresentados os resultados obtidos para todos os antioxidantes pelo método proposto utilizando o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e os resultados obtidos por alguns autores, também é apresentado nesta tabela os potenciais de pico obtidos com um eletrodo compósito de carbono não modificado (ECCNM). Observa-se que os potenciais de trabalho obtidos para todos os antioxidantes determinados usando o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> foram menores em relação aos autores citados, com destaque para a rutina em relação a FRANZOI *et al.*<sup>188</sup>

Esses autores empregaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com polivinilpirolidona (PVP) para determinar rutina em fármacos usando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria linear. Em relação ao limite de detecção, o antioxidante BHA e CAT foram o que obtiveram maior variação comparada aos três autores citados na TABELA 4.13, sendo que LD obtido pelo método proposto foi quase duas décadas menor.

**TABELA 4.12.** Determinação simultânea de BHA e BHT em amostras de maioneses e margarinas usando o método proposto e HPLC

<b>BHA (mg/100g)</b>			
<b>Amostras</b>	<b>HPLC</b>	<b>SWV</b>	<b>E<sub>r</sub>%</b>
Hellmans	2,40 ± 0,05	2,50 ± 0,09	+4,16
Soya	5,96 ± 0,06	5,87 ± 0,05	- 1,51
Arisco	1,60 ± 0,04	1,59 ± 0,09	-0,62
<b>BHT (mg/100g)</b>			
<b>Amostras</b>	<b>HPLC</b>	<b>SWV</b>	<b>E<sub>r</sub>%</b>
Vigor	1,20 ± 0,05	1,18 ± 0,06	-1,66
Doriana	2,07 ± 0,04	1,98 ± 0,05	- 4,34
Soya	3,37 ± 0,05	3,32 ± 0,09	-1,48
Arisco	1,04 ± 0,06	1,10 ± 0,09	+ 5,76

n=3

**TABELA 4.13.** Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e alguns autores.

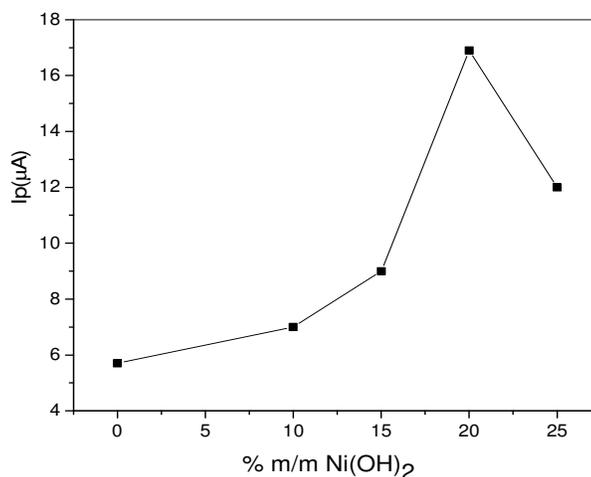
<b>ECCNM</b>		<b>ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>		<b>Referências</b>	
<b>Ep (V)</b>		<b>Ep (V)</b>	<b>LD (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ep (V)</b>	<b>LD(mol L<sup>-1</sup>)</b>
CAT	0,40	0,16	5,8 x10 <sup>-8</sup>	0,23	---- <sup>33</sup>
				0,20	4,65x10 <sup>-6</sup> <sup>24</sup>
QCT	031	0,16	8,6 x10 <sup>-8</sup>	0,31	8,0 x10 <sup>-8</sup> <sup>189</sup>
				0,36	2x10 <sup>-8</sup> <sup>40</sup>
Rut	0,40	0,16	4,1 x10 <sup>-8</sup>	0,87	1,5 x10 <sup>-7</sup> <sup>188</sup>
				0,37	1,8 x10 <sup>-8</sup> <sup>95</sup>
BHA	0,58	0,44	5,9x10 <sup>-8</sup>	0,64	1,0x10 <sup>-6</sup> <sup>190</sup>
				0,65	3,7x10 <sup>-6</sup> <sup>76</sup>
BHT	1,08	0,87	6,7x10 <sup>-8</sup>	0,84	6,8 x10 <sup>-7</sup> <sup>190</sup>

## 4.8. ECCM com Ni(OH)<sub>2</sub> para determinação de catequina em chás

### 4.8.1. Estudo da composição do eletrodo

O efeito da composição do eletrodo foi estudado por voltametria cíclica, fixando primeiramente a percentagem de aglutinante (parafina) em 20%, quantidade mínima necessária para obter um compósito homogêneo, e variaram-se as quantidades de pó de grafite e Ni(OH)<sub>2</sub> imobilizado em resina poliéster nas seguintes proporções de pó de grafite/parafina: 80:20; 60:20; 65:20, 60:20 e 55:20 (% m/m) e Ni(OH)<sub>2</sub>-resina poliéster: 0, 10, 15, 20 e 25% m/m em relação à massa total do compósito.

A FIGURA 4.35 mostra o efeito da percentagem m/m do modificador na composição do eletrodo. As medidas ciclovoltagemétricas foram realizadas em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 5% etanol (v/v) (pH condicional 6,9), velocidade de varredura igual a 50 mVs<sup>-1</sup>; na presença e na ausência de catequina 2,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. Os valores de ΔI<sub>p</sub> correspondem à diferença da corrente obtida na presença e na ausência de catequina



**FIGURA 4.35.** Efeito da percentagem m/m de Ni(OH)<sub>2</sub>-resina poliéster na composição do ECCM; eletrólito suporte: tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 5% etanol (v/v) (pH condicional 6,9) na presença de 2,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> catequina.

A quantidade de Ni(OH)<sub>2</sub> presente no ECCM possui influência significativa na resposta voltamétrica do eletrodo proposto. Os picos de corrente aumentam com o aumento da percentagem do modificador até 20% m/m. Para percentagens maiores

do que 20 % foi observado que a intensidade do pico de corrente diminui consideravelmente e em percentagens de modificador maiores que 25% m/m não há resposta do eletrodo. Isso ocorre provavelmente devido a diminuição da percentagem de pó de grafite na composição do eletrodo e, conseqüentemente, há uma diminuição significativa da condutividade do compósito. Como observado na FIGURA 4.35, a melhor composição para o ECCM com  $\text{Ni(OH)}_2$  foi: 20% (m/m) de pó de grafite, 20% (m/m) de parafina sólida e 60% (m/m) do modificador.

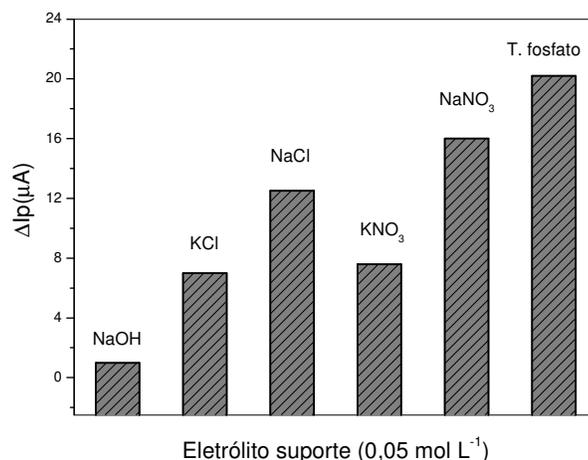
Assim como discutido no item 4.2.1 a principal característica atribuída a imobilização do modificador em resina poliéster é o aumento de vida útil do eletrodo modificado. Comparando-se um ECCM com  $\text{Ni(OH)}_2$  não imobilizado e o ECCM com  $\text{Ni(OH)}_2$  imobilizado em resina poliéster, observou-se que o eletrodo modificado com  $\text{Ni(OH)}_2$  não imobilizado foi eletroativo aproximadamente 35 dias (em torno de 400 determinações) e o eletrodo modificado com  $\text{Ni(OH)}_2$  imobilizado continua eletroativo sendo sua vida útil até o presente momento aproximadamente três anos (mais de 2000 determinações).

#### **4.8.2. Estudo do efeito do eletrólito suporte**

O comportamento voltamétrico do ECCM com  $\text{Ni(OH)}_2$  imobilizado em resina poliéster foi investigado em seis diferentes eletrólitos suportes (hidróxido de sódio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, nitrato de sódio e tampão fosfato). Foi verificada a presença de picos voltamétricos em todas as soluções com exceção da solução de hidróxido de sódio. Na FIGURA 4.36 é apresentado um resumo dos eletrólitos suportes estudados,  $\Delta I_p$  corresponde à diferença entre a corrente de pico anódica obtida na presença e na ausência de  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de catequina.

Como pode ser observado na FIGURA 4.36, ocorre um possível efeito do contra íon dos sais empregados de sódio e potássio, sendo que o íon sódio parece favorecer o sinal analítico para a determinação de CAT, uma vez que as correntes obtidas em solução contendo o contra íon sódio são relativamente maiores do que as correntes obtidas na presença de íons potássio. No entanto, em tampão fosfato o voltamograma apresentou melhor definição de pico e maiores magnitudes de correntes (FIGURA 4.36), sendo assim escolhido como eletrólito suporte para todas as determinações de catequina em chás.

A resposta voltamétrica do ECCM com  $\text{Ni(OH)}_2$  não foi influenciada significativamente pela concentração do eletrólito suporte. Assim uma solução de tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  / 5% etanol (v/v) foi escolhida como eletrólito suporte para este experimento.

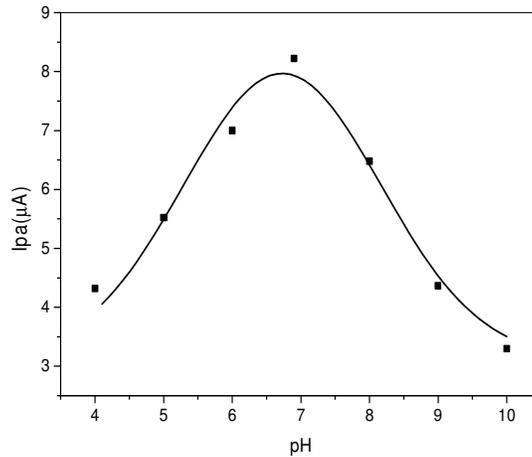


**FIGURA 4.36.** Efeito das soluções de eletrólito suporte estudadas para a determinação de CAT utilizando ECCM- $\text{Ni(OH)}_2$ ; dados de corrente obtidos por voltametria cíclica na presença de  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de CAT;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.8.3. Estudo do efeito do pH

Outro parâmetro importante estudado foi a influência do pH na resposta voltamétrica do ECCM com  $\text{Ni(OH)}_2$  no intervalo de pH de 4 a 10 em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  / 5% etanol (v/v) na presença de  $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de catequina.

A FIGURA 4.37 mostra o efeito do pH sobre a corrente de pico anódica do eletrodo modificado. A corrente de pico anódica ( $\Delta I/\mu\text{A}$ ) foi obtida pela diferença das correntes na presença e na ausência de CAT. De acordo com a FIGURA 4.37 no intervalo de pH de 4 a 7, a corrente de pico aumenta e no intervalo de 7 a 10 existe um decréscimo da magnitude de corrente. A melhor definição de pico e máximo de corrente foi observado em pH 6,9, em virtude dos resultados obtidos escolheu-se trabalhar com uma solução de tampão fosfato em pH 6,9 para a otimização de outros parâmetros para esta determinação.

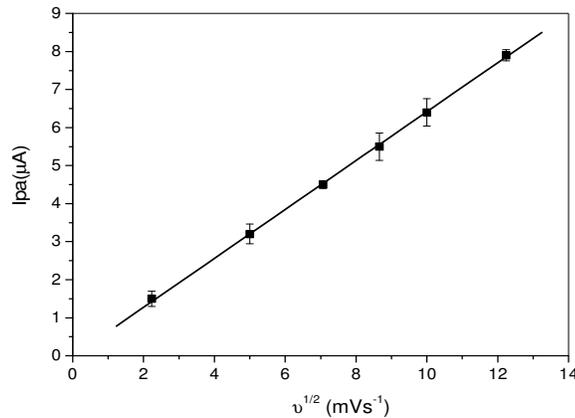


**FIGURA 4.37.** Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>; eletrólito suporte: tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 5 % etanol (v/v) na presença de 6,0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> CAT.

#### 4.8.4. Estudo do efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a 150 mV s<sup>-1</sup> para uma solução 6,0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> de catequina em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 5% etanol (v/v) (pH condicional 6,9) (FIGURA 4.38).

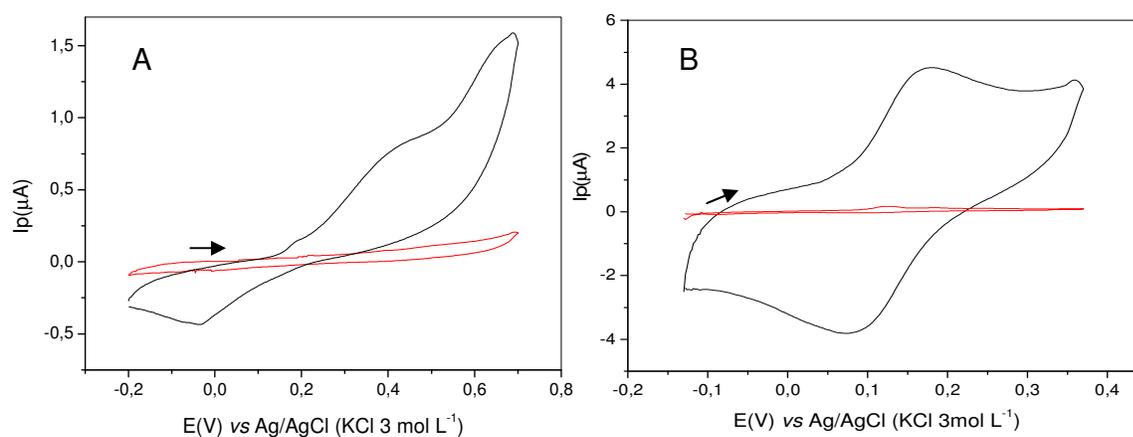
As correntes de pico anódicas variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. A equação da reta obtida foi  $I_{pa}$  (A) = -1,09 × 10<sup>-8</sup> + 6,42 × 10<sup>-7</sup> v<sup>1/2</sup> (R=0,9998), sugerindo que o processo de oxidação da catequina é controlado por difusão.



**FIGURA 4.38.** Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de CAT.

#### 4.8.5. Comportamento eletroquímico de CAT sobre o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>

Um ECC não modificado na mesma composição percentual de parafina foi construído para comparação com o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>. Na FIGURA 4.39 é apresentado o perfil voltamétrico da catequina em (A) ECC não modificado e (B) ECCM com Ni(OH)<sub>2</sub>



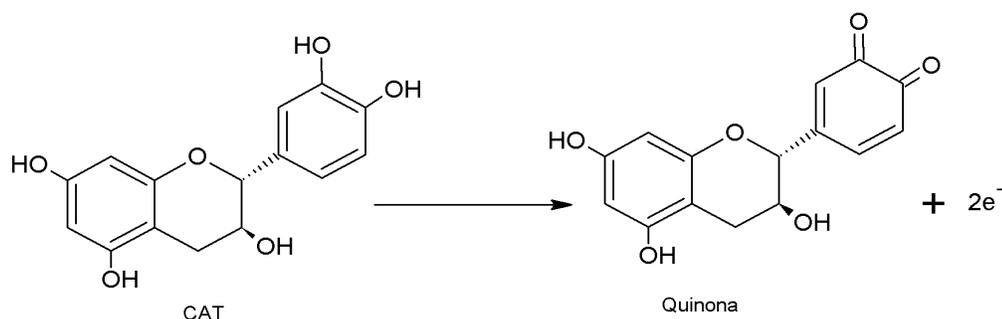
**FIGURA 4.39.** Voltamograma cíclico para CAT  $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ / 5% de etanol (v/v) (pH condicional 6,9) utilizando (A) ECC não modificado e (B) ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

O voltamograma para catequina em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ / 5% etanol (pH condicional 6,9) determinado com ECC não modificado apresentou um pico anódico em 408 mV e um pico catódico em - 34 mV.

O voltamograma para catequina em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ / 5% etanol (pH condicional 6,9) determinado com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> mostrou um pico anódico em 175 mV e um pico catódico em 74 mV, a razão  $I_{pa}/I_{pc}$  foi igual a unidade e a diferença entre os potenciais de pico ( $\Delta E_p$ ) foi maior que 59 mV e de acordo com a teoria da voltametria cíclica, trata-se de um sistema quase - reversível.<sup>160, 163</sup>

No caso do eletrodo modificado, observa-se que houve um deslocamento do potencial de pico para valores de potenciais menores (menos positivos), o que pode levar a um aumento da seletividade do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para CAT em comparação com o eletrodo não modificado. Além disso, a modificação do eletrodo levou a um aumento considerável da magnitude de corrente para os dois processos (oxidação e redução), indicativo de um processo eletrocatalítico, como pode ser observado na FIGURA 4.39.

O número de elétrons envolvidos no mecanismo de oxidação da catequina foi calculado usando as equações 4.3, onde a variação do potencial de pico anódico com o pH exibiu uma relação linear com inclinação de  $28,8 \text{ mV pH}^{-1}$  sugerindo que ocorre a transferência de 2 elétrons no mecanismo de oxidação assim segundo a equação abaixo o que concorda com o mecanismo proposto por JANEIRO & BRETT<sup>34</sup> para oxidação de catequina.

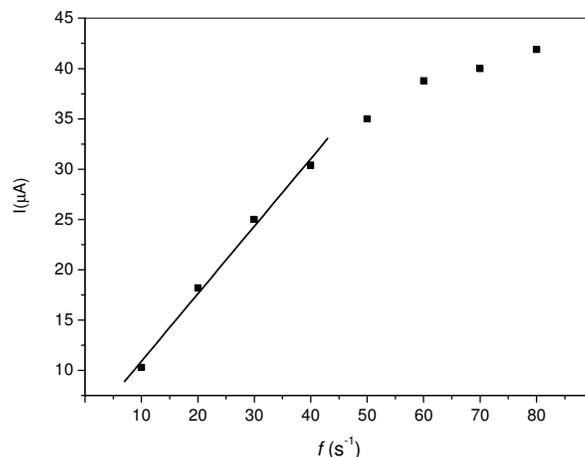


#### 4.8.6. Otimização dos parâmetros estudados

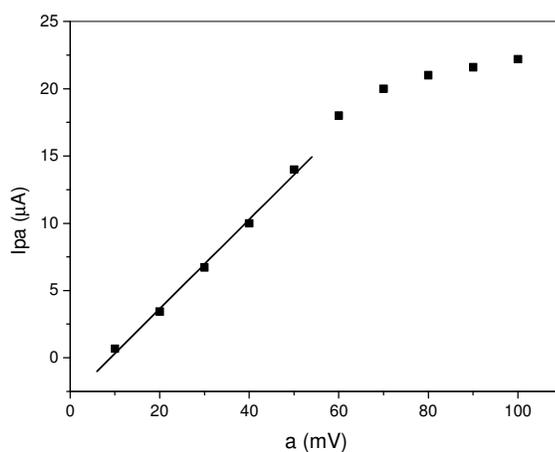
Para otimizar as condições experimentais de determinação de catequina por SWV foram realizados estudos para escolha da amplitude de potencial, frequência de onda quadrada e incremento de potencial para o método proposto considerando a teoria da voltametria de onda quadrada.

A variação da frequência de oscilação da onda quadrada foi estudada entre  $10$  e  $80 \text{ s}^{-1}$ . A dependência de frequência com a corrente de pico está apresentada na FIGURA 4.40 na presença de  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de catequina em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}/5\%$  etanol (pH condicional 6,9). Observa-se na FIGURA 4.40 um aumento linear com a corrente de pico até o valor de frequência de  $40 \text{ s}^{-1}$ . Porém, foi escolhida uma frequência de  $30 \text{ s}^{-1}$ , por apresentar menor linha base associada a uma baixa corrente residual e boa definição do pico.

A dependência da corrente com a amplitude está representada na FIGURA 4.41. De acordo com essa figura, observa-se que para valores de amplitudes menores que  $50 \text{ mV}$ , o aumento da intensidade de corrente é linear, a partir desse valor de amplitude, as correntes de pico obtidas tendem a ficarem constantes não colaborando assim significativamente no aumento do sinal analítico. A amplitude selecionada para o desenvolvimento deste trabalho foi de  $40 \text{ mV}$  por apresentar uma melhor definição de pico.



**FIGURA 4.40.** Dependência da corrente de pico com frequência de aplicação de pulso para CAT  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $a = 40 \text{ mV}$ ;  $\Delta E = 1 \text{ mV}$



**FIGURA 4.41.** Dependência da corrente de pico com a variação da amplitude de onda quadrada para CAT  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $f = 30 \text{ s}^{-1}$ ;  $\Delta E = 1 \text{ mV}$

#### 4.8.7. Estudo de Repetibilidade

Os estudos de repetibilidade intra e inter dias foram realizados utilizando soluções de catequina  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}/5\%$  etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método.

Para o estudo da repetibilidade intra dias foram realizados dez medidas voltamétricas ( $n = 10$ ) no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível e, entre cada medida voltamétrica, a superfície do eletrodo não foi renovada. O desvio padrão relativo (RSD) obtido para este estudo foi de 1,0 %. Para o estudo de repetibilidade inter dias foram realizadas 5 medidas de corrente em dias alternados

com diferentes soluções de catequina  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . O desvio padrão relativo (RSD) obtido para o estudo de repetibilidade inter dias foi de 1,4 %.

#### **4.8.8. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação**

Foi realizado o estudo de adição e recuperação para fornecer informações da influência de possíveis interferentes existentes na matriz desses produtos sobre o procedimento proposto. Para esse estudo foram feitos experimentos em triplicata para amostras de chás verde e preto por meio da adição de alíquotas de solução padrão de catequina em três concentrações diferentes nas soluções das amostras e os resultados são comparados com aqueles obtidos com as amostras não adicionadas de soluções de padrão.

As recuperações variaram entre 96.0 % e 102 %, estes valores obtidos indicam que não houve interferência da matriz das amostras na determinação de catequina pelo procedimento analítico proposto.

#### **4.8.9. Curva analítica e aplicações**

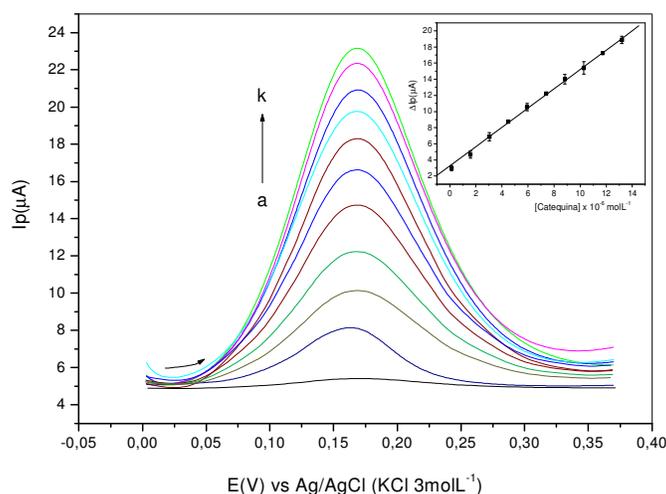
Na FIGURA 4.42 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de catequina nas condições otimizadas para o método proposto.

A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de CAT entre  $1,31 \times 10^{-7}$  e  $1,32 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , com limite de detecção determinado conforme a equação 4.4 igual a  $5,53 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa} (A) = 3,25 \times 10^{-6} + 1,19 [\text{CAT}] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9993$ .

O método proposto foi aplicado na determinação de catequina em chás. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a catequina apresentou um tempo de retenção de 3,70 minutos. Na TABELA 4.14 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.

Observa-se que os resultados obtidos pelo método proposto empregando SWV estão em concordância com os resultados obtidos pelo método de HPLC. O teste t pareado<sup>186</sup> foi aplicado onde ( $t_{\text{exp}} = 1,993$  e  $t_{\text{tabelado}} = 2,571$ ). Como o  $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabelado}}$ , conclui-se que os resultados obtidos na determinação de catequina pelo

método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95% e pode ser usado na determinação de catequina em chás.



**FIGURA 4.42.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de CAT; (a) eletrólito suporte; (b)  $1,31 \times 10^{-7}$ ; (c)  $1,58 \times 10^{-6}$ ; (d)  $3,03 \times 10^{-6}$ ; (e)  $4,48 \times 10^{-6}$ ; (f)  $5,93 \times 10^{-6}$ ; (g)  $7,38 \times 10^{-6}$ ; (h)  $8,83 \times 10^{-6}$ ; (i)  $1,03 \times 10^{-5}$ ; (j)  $1,17 \times 10^{-5}$ ; (k)  $1,32 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; eletrólito suporte: tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  /5% etanol (v/v) (pH 6,9);  $f = 40 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $a = 40 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva analítica obtida.

**TABELA 4.14.** Determinação de catequina em chás por HPLC e pelo método proposto.

Amostras	(mg/100mL)	HPLC	SWV	Er %
Chá Verde	Golpará	$6,73 \pm 0,09$	$6,61 \pm 0,09$	-1,78
	Real	$6,72 \pm 0,08$	$6,89 \pm 0,07$	+2,53
Chá Preto	Dr. Oetker	$4,15 \pm 0,06$	$4,21 \pm 0,06$	+1,44
	Leão	$4,89 \pm 0,08$	$4,75 \pm 0,10$	-2,86

$n = 3$ ; nível de confiança de 95%

Er% (Erro relativo %) = método proposto versus HPLC.

## **4.9. ECCM com Ni(OH)<sub>2</sub> para determinação de quercetina em chás**

### **4.9.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte**

O comportamento voltamétrico do ECCM com Ni(OH)<sub>2</sub> imobilizado em resina poliéster também foi investigado em seis diferentes eletrólitos suportes, são eles: cloreto de potássio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, nitrato de sódio, tampão fosfato e hidróxido de sódio. O comportamento do eletrodo na presença de quercetina foi muito similar ao comportamento obtido com o mesmo eletrodo na presença de catequina. Foi verificada a presença de picos voltamétricos em todas as substâncias estudadas com exceção de hidróxido de sódio. A solução de tampão fosfato apresentou melhor definição de pico e intensidade de corrente, sendo assim escolhida como eletrólito suporte para todas as determinações de QCT em chás.

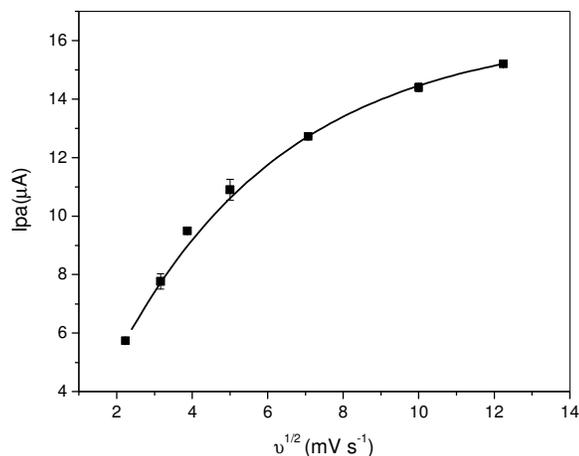
### **4.9.2. Estudo do efeito do pH**

A influência do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> imobilizado em resina poliéster foi investigada no intervalo de pH de 4 a 11 em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> /20% etanol (v/v) na presença de 5,0 x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de quercetina e foi semelhante ao comportamento obtido para catequina no mesmo intervalo de pH e mesmo eletrólito, sendo assim a discussão sobre o efeito do pH na determinação de quercetina em chás é similar aquela do item 4.8.3.

A melhor definição de pico e máximo de corrente também foi observada em pH 6,9 e, em virtude dos resultados obtidos, escolheu-se trabalhar com uma solução de tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>/10%etanol (v/v) em pH 6,9 para a otimização de outros parâmetros para esta determinação.

### **4.9.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura**

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a 150 mV s<sup>-1</sup> para uma solução 5,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de quercetina em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>/ 20% etanol (v/v) (pH condicional 6,9) (FIGURA 4.43).



**FIGURA 4.43.** Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de QCT.

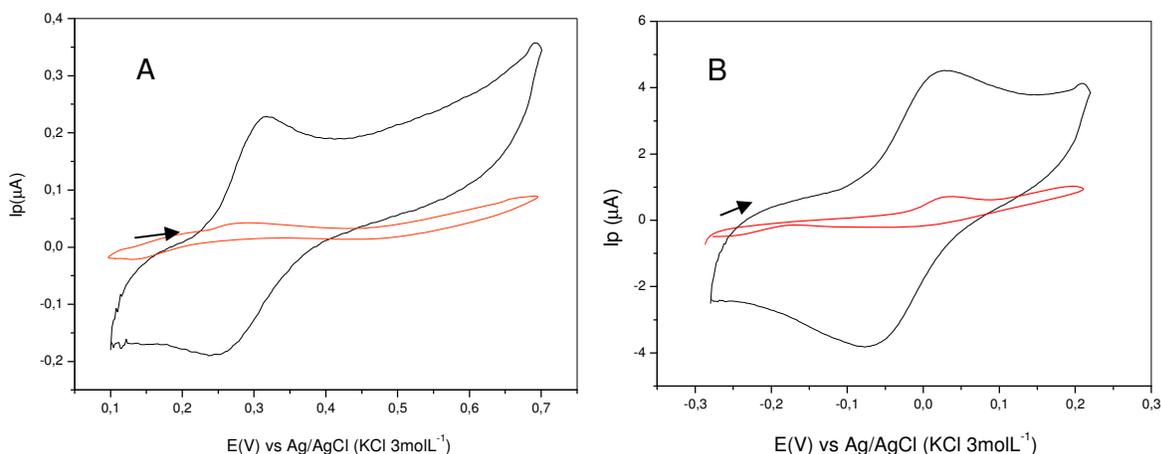
As correntes de pico anódicas não variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura como observado na FIGURA 4.43. Isto sugere que a oxidação da quercetina é realizada por um mecanismo misto controlado por adsorção e difusão das espécies até a superfície do eletrodo. A equação da reta obtida foi  $\Delta I_{pa}$  (A) = 5,27 + 0,78  $v^{1/2}$  (mV s<sup>-1</sup>), sendo que o coeficiente linear está muito afastado da origem, indicando que há algum processo adsorvido no eletrodo ocorrendo em paralelo ao processo de difusão das espécies.

#### 4.9.4. Comportamento eletroquímico de QCT sobre o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>

Na FIGURA 4.44 é apresentado o perfil voltamétrico da quercetina obtida com um ECC não modificado e o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>.

Pode-se observar na FIGURA 4.44 que o perfil voltamétrico da quercetina em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>/ 20% etanol (pH condicional 6,9) obtido com ECC não modificado apresentou dois picos, sendo um anódico em 315 mV e outro catódico em 247 mV e o perfil voltamétrico da quercetina no mesmo eletrólito determinado com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> apresentou um pico anódico em 45 mV e um pico catódico em - 65 mV vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>), a razão  $I_{pa}/I_{pc}$  foi igual a unidade e  $\Delta E_p$  obtido foi maior que 59 mV, o que de acordo com a teoria da voltametria cíclica, trata-se de um sistema quase-reversível.<sup>160, 163</sup>

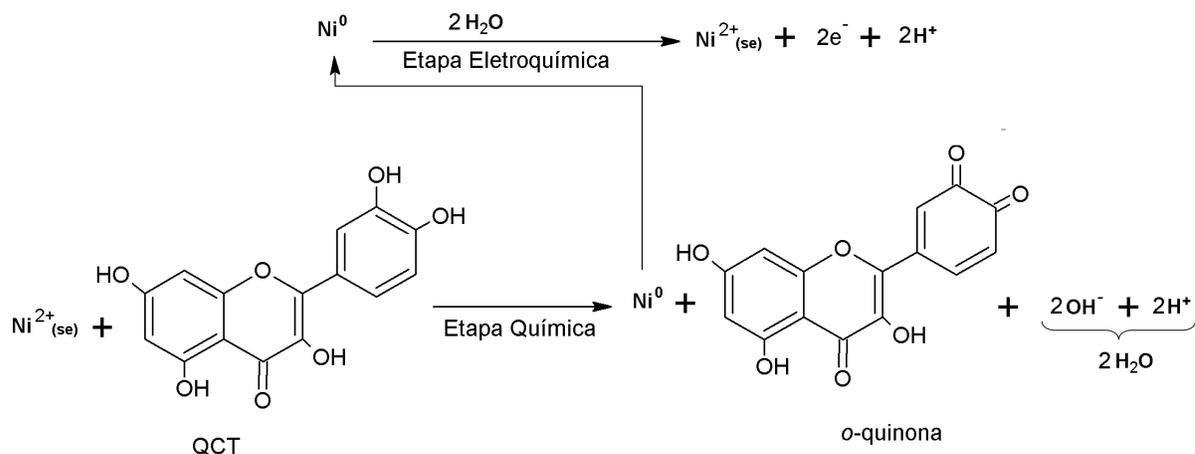
Assim como para catequina, houve um deslocamento dos potenciais de pico para valores de potenciais menores (menos positivos) obtidos com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para a determinação de quercetina, o que pode levar a um aumento da seletividade do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para QCT em comparação com o eletrodo não modificado. Além disso, a modificação do eletrodo levou a um aumento considerável da magnitude de corrente para os dois processos (oxidação e redução), indicativo de um processo eletrocatalítico, como pode ser observado na FIGURA 4.44.



**FIGURA 4.44.** Voltamogramas cíclico para QCT  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  / 20% de etanol (v/v) (pH condicional 6,9); (A) ECC não modificado e (B) ECCM- Ni(OH)<sub>2</sub>;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

A variação de potencial anódico com o pH mostrou uma relação linear com inclinação de  $28,6 \text{ mV pH}^{-1}$  o que indica um mecanismo que envolve a transferência de dois elétrons e um próton.

O mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> na presença de QCT é dividido em duas etapas, uma química e outra eletroquímica, caracterizando-se como um mecanismo CE. Inicialmente, QCT é oxidada quimicamente a *o*-quinona correspondente na superfície do eletrodo e, Ni(OH)<sub>2</sub> é reduzido a Ni<sup>0</sup>, sendo então Ni<sup>0</sup> oxidado eletroquimicamente a Ni(OH)<sub>2</sub> gerando o sinal analítico. (FIGURA 4.45).



**FIGURA 4.45.** Mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> na presença de QCT.

#### 4.9.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto

A frequência escolhida para todas as determinações de QCT foi igual a 10 s<sup>-1</sup>, por apresentar menor linha base em relação a demais frequências estudadas. A amplitude de 20 mV foi escolhida por apresentar melhor definição de pico, assim como o incremento de varredura de potencial (TABELA 4.15).

**TABELA 4.15.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	KCl, NaCl, KNO <sub>3</sub> , NaOH NaNO <sub>3</sub> , tampão fosfato,	Tampão fosfato
pH do eletrólito	4 – 11	6,9
Solubilidade da amostra (eletrólito/ etanol % v/v)	99/10% - 70/30%	80/20%
Concentração de tampão fosfato (mol L <sup>-1</sup> )	0,01 – 1	0,05
Frequência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 80	10
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	20
Incremento de varredura (ΔEs) (mV)	1 – 5	2

#### 4.9.6. Estudo da Repetibilidade

Os estudos da repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de QCT  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}/20\%$  etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método. A repetibilidade intra e inter dias foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 4.8.7. O RSD obtido para a repetibilidade intra dias foi de 2,4 % e pra repetibilidade inter dias foi de 3,0 %.

#### 4.9.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação

O método de adição e recuperação de padrão foi aplicado a fim de obter resposta sobre a possível interferência dos concomitantes presentes na amostra sobre a determinação de QCT utilizando o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>.

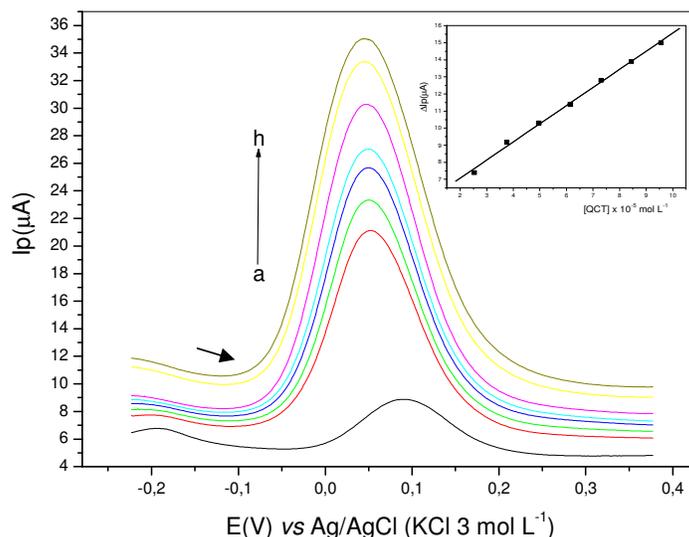
Para esse estudo foram realizados experimentos em triplicata para amostras de chás matte e camomila por meio da adição de alíquotas de solução padrão de QCT em três diferentes concentrações nas soluções dessas amostras e os resultados foram comparados com aqueles obtidos com amostras não adicionadas do padrão. As recuperações variaram entre 94,5 % e 104 %. Esses valores obtidos indicam que não houve interferência da matriz das amostras na determinação de quercetina pelo procedimento analítico proposto.

#### 4.9.8. Curva analítica e aplicações

Na FIGURA 4.46 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de QCT nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.15. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de QCT entre  $1,27 \times 10^{-5}$  e  $8,44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $LD = 6,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa}(A) = 4,96 \times 10^{-6} + 0,106 [\text{QCT}], \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9985$ .

O método proposto foi aplicado na determinação de QCT em chás. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a quercetina apresentou um tempo de retenção de 8,45 minutos. Na TABELA 4.16 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{\text{exp}} = 2,17$  e  $t_{\text{tabelado}} = 2,571$ ). Como o  $t_{\text{exp}}$  obtido é menor que o  $t_{\text{tabelado}}$  pode-se concluir que os resultados obtidos da determinação de quercetina pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95% e pode ser usado na determinação de QCT em chás.



**FIGURA 4.46.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de QCT; (a) eletrólito suporte; (b)  $1,27 \times 10^{-5}$ ; (c)  $2,53 \times 10^{-5}$ ; (d)  $3,75 \times 10^{-5}$ ; (e)  $4,96 \times 10^{-5}$ ; (f)  $6,14 \times 10^{-5}$ ; (g)  $7,30 \times 10^{-5}$ ; (h)  $8,44 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; eletrólito suporte: tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> /20% etanol (v/v) (pH 6,9);  $f = 10$  mVs<sup>-1</sup>,  $a = 20$  mV,  $\Delta E_s = 2$  mV). Em detalhe a curva analítica obtida.

**TABELA 4.16.** Determinação de QCT em chás por HPLC e pelo método proposto.

Amostras	mg/g	HPLC	SWV	Er %
Matte	Real	$3,12 \pm 0,03$	$3,12 \pm 0,08$	0,00
	Hikari	$3,19 \pm 0,02$	$3,15 \pm 0,07$	-1,25
Camomila	Real	$2,76 \pm 0,02$	$2,89 \pm 0,05$	+4,71
	Dr. Oetker	$2,15 \pm 0,08$	$2,16 \pm 0,06$	+0,46

$n = 3$ ; nível de confiança de 95%

Er% (Erro relativo %) = método proposto versus HPLC.

## **4.10. ECCM com Ni(OH)<sub>2</sub> para determinação de rutina em formulações farmacêuticas**

### **4.10.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte**

O comportamento voltamétrico do ECCM com Ni(OH)<sub>2</sub> imobilizado em resina poliéster também foi investigado em seis diferentes eletrólitos suportes (cloreto de potássio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, nitrato de sódio, tampão fosfato e hidróxido de sódio). O comportamento do eletrodo na presença de rutina foi muito similar ao comportamento obtido com o mesmo eletrodo na presença de CAT e QCT. Foi verificada a presença de picos voltamétricos em todas as soluções de eletrólitos suportes estudados, com exceção do hidróxido de sódio. A solução de tampão fosfato apresentou melhor definição de pico e maior magnitude de corrente, sendo assim escolhida como eletrólito suporte para todas as determinações de rutina em fármacos.

### **4.10.2. Estudo do efeito do pH**

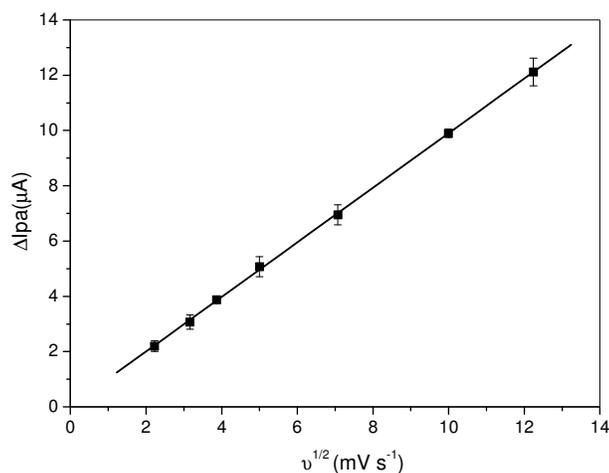
O efeito do pH foi estudado no intervalo de pH de 4 a 11 em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> /10% etanol (v/v) na presença de 4,0 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de rutina.

Assim como para catequina e quercetina a rutina apresentou o mesmo comportamento em tampão fosfato sendo assim a discussão apresentada no item 4.8.3 é válida também para rutina. A melhor definição de pico e máximo de corrente também foi observada em pH igual a 6,9, sendo assim foi selecionada a solução tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 10% etanol (v/v) (pH 6,9) para a otimização de outros parâmetros para esta determinação.

### **4.10.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura**

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica, no intervalo de 5 a 150 mV s<sup>-1</sup>, para uma solução 8,0 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> de rutina em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,8) (FIGURA 4.47). As correntes de pico anódico variaram lineamente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, sendo

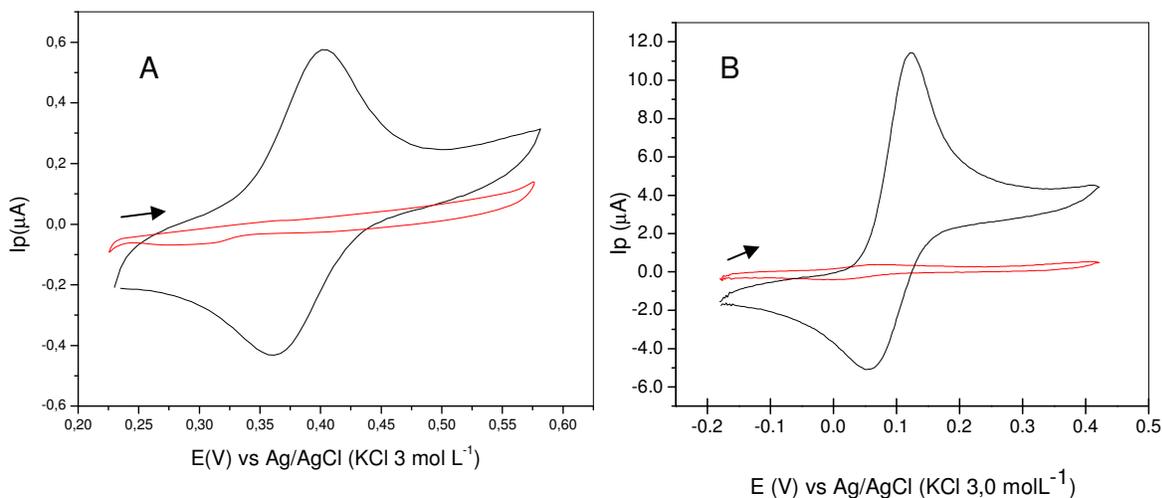
a equação da reta:  $\Delta I_{pa} \text{ (A)} = 2,9 \times 10^{-8} + 9,87 \times 10^{-7} v^{1/2}$ , sugerindo que o processo de oxidação da rutina é controlado por difusão.



**FIGURA 4.47.** Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de Rut.

#### 4.10.4. Comportamento eletroquímico de Rut sobre o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>

Na FIGURA 4.48 são apresentados os perfis voltamétricos da rutina em tampão fosfato utilizando um ECC não modificado e o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> na mesma composição percentual de parafina para vias de comparação.



**FIGURA 4.48.** Voltamograma cíclico para Rut  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ / 10% de etanol (v/v) (pH condicional 6,8) utilizando (A) ECC não modificado e (B) ECCM- Ni(OH)<sub>2</sub>;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

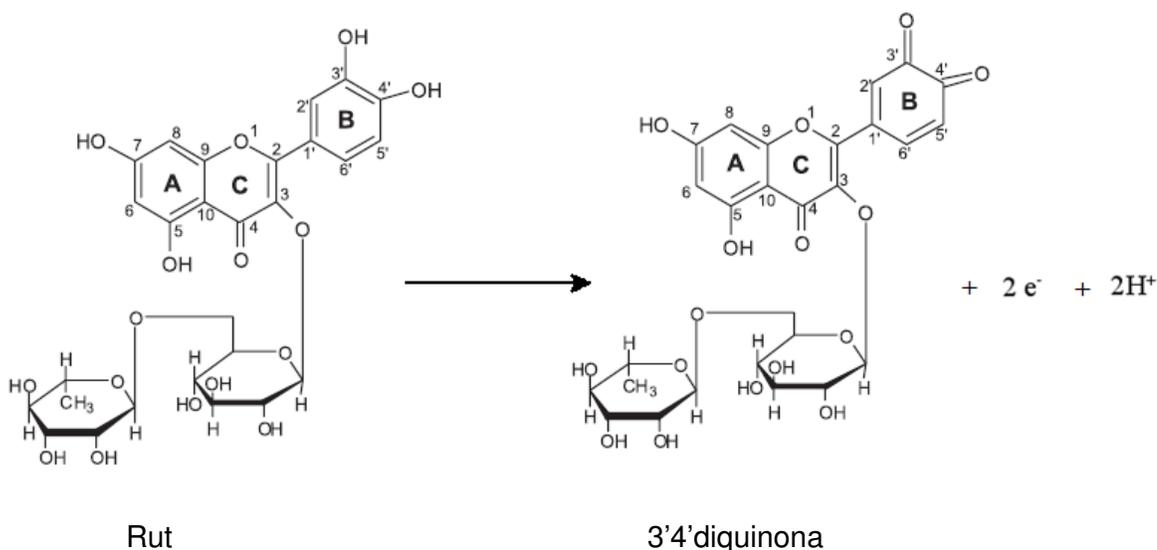
Como pode ser observado na FIGURA 4.48, o perfil voltamétrico da rutina obtida com ECC não modificado apresentou um pico anódico em 402 mV e outro catódico em 360 mV.

O perfil voltamétrico da rutina em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (pH condicional 6,8) determinado com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> apresenta um pico anódico em 120 mV e um pico catódico em 56 mV vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>), a razão  $I_{pa}/I_{pc}$  foi maior que a unidade e  $\Delta E_p$  foi igual a 64 mV evidenciando se tratar de um sistema quasi reversível segundo a teoria da voltametria cíclica.<sup>160, 163</sup>

A presença do modificador Ni(OH)<sub>2</sub> imobilizado em resina poliéster aumentou a eficiência eletrocatalítica do eletrodo como pode ser observado na FIGURA 4.48. Onde ocorre um deslocamento de potencial de trabalho utilizando ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para potenciais menores (menos positivos), o que pode levar a um aumento da seletividade do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para QCT em comparação com o eletrodo não modificado. Além disso, houve um aumento considerável da magnitude de corrente para os dois processos (oxidação e redução).

A variação do potencial anódico com o pH mostrou uma relação linear com inclinação de 29,2 mV pH<sup>-1</sup> o que indica um mecanismo que envolve a transferência de dois elétrons.

Considerando o estudo realizado o qual indicou que no processo de oxidação de rutina envolve dois elétrons e, baseando-se no mecanismo de oxidação propostos por CHICA & BRETT<sup>59</sup>, sugere-se que em tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (pH condicional 6,8), rutina é oxidado a 3'4'diquinona liberando dois elétrons, como mostra a reação a seguir:



#### 4.10.5. Otimização dos parâmetros estudados para o método

A frequência escolhida para todas as determinações de rotina foi igual a de  $25 \text{ s}^{-1}$ , em virtude desta frequência apresentar menor linha base em relação a demais frequências estudadas e melhor definição de pico. A amplitude de 30 mV foi escolhida por apresentar melhor definição de pico assim como maior intensidade de corrente, assim como o incremento de varredura que também foi escolhido por apresentar melhor definição de pico (TABELA 4.17).

**TABELA 4.17.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	KCl, NaCl, $\text{KNO}_3$ , $\text{NaNO}_3$ , tampão fosfato, NaOH	Tampão fosfato
pH do eletrólito	4 – 11	6,9
Solubilidade da amostra eletrólito/ etanol % v/v	99/5% - 75/25%	95/10%
Concentração de tampão fosfato ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0,01 – 1	0,05
Frequência de onda quadrada (f) ( $\text{s}^{-1}$ )	10 – 80	25
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	30
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) (mV)	1 – 5	1

#### 4.10.6. Estudo de Repetibilidade

Os estudos da repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando-se soluções de rotina  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  /10% etanol (v/v) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método. A repetibilidade intra e inter dias foram realizadas conforme descrito anteriormente no

item 4.8.7. O RSD obtido para a repetibilidade intra dias foi de 0,98 % e pra repetibilidade inter dias foi de 2,83 %.

#### **4.10.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação**

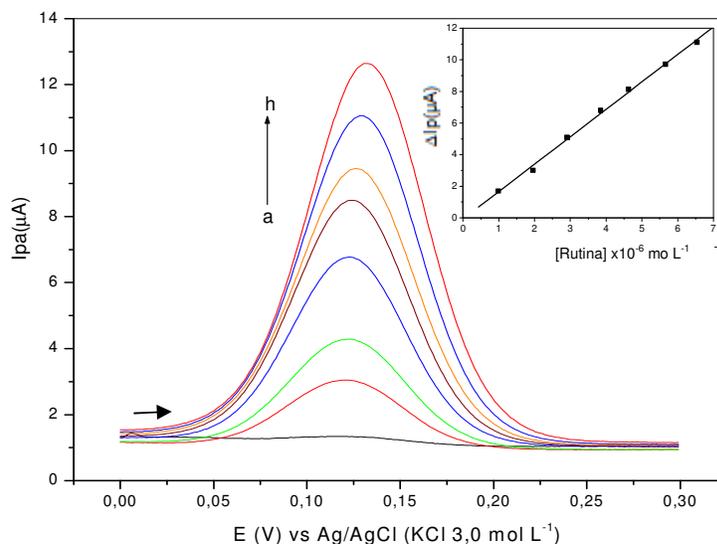
Os mesmos excipientes avaliados para determinação de rutina utilizando o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> também foram avaliados para rutina utilizando o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>. As substâncias avaliadas foram: sacarina sódica, metilparabeno, amido, carbonato de cálcio e estearato de magnésio em solução de tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) (pH condicional 6,8) na mesma concentração (1:1 interferente: analito) e dez vezes maior (10:1 interferente: analito) sendo a concentração de rutina 4,0 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>. Nenhuma substância investigada causou interferência na determinação de rutina em nenhuma proporção de concentração.

Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão. As recuperações variaram entre 97,8 % e 102 %. Esses valores obtidos indicam que não houve interferência da matriz das amostras na determinação de rutina pelo procedimento analítico proposto.

#### **4.10.8. Curva analítica e aplicações**

Na FIGURA 4.49 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de rutina nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.17. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de Rut entre 9,9x10<sup>-7</sup> e 6,5 x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, LD igual a 2,90 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa} (A) = -7,34 \times 10^{-8} + 1,736 [Rut] \text{ mol L}^{-1}$ , r= 0,9985.

O método proposto foi aplicado na determinação de rutina em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a rutina apresentou um tempo de retenção de 4,2 minutos. Na TABELA 4.18 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.



**FIGURA 4.49.** Voltamogramas SW obtidos com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de Rutina; (a) eletrólito suporte; (b)  $9,9 \times 10^{-7}$ ; (c)  $1,96 \times 10^{-6}$ ; (d)  $2,91 \times 10^{-6}$ ; (e)  $3,8 \times 10^{-6}$ ; (f)  $4,6 \times 10^{-6}$ ; (g)  $5,6 \times 10^{-6}$ ; (h)  $6,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; eletrólito suporte: tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> / 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,8);  $f = 25$  mVs<sup>-1</sup>,  $a = 30$  mV,  $\Delta E_s = 1$  mV). Em detalhe a curva analítica obtida.

**TABELA 4.18.** Determinação de rutina em formulações farmacêuticas por HPLC e o método proposto.

Rutina					
Amostras	Valor rotulado	HPLC	SWV	$E_{r1}\%$	$E_{r2}\%$
Venocur*	300	$299 \pm 2$	$302 \pm 1$	+ 0,66	+0,60
Nova Rutina**	20.0	$19,9 \pm 0,2$	$21,0 \pm 0,3$	+ 5,0	+ 5,5

$n = 3$ ; nível de confiança de 95%

\* mg Rutina por comprimido; \*\* mg Rutina por mL

$E_{r1} =$  método proposto vs. valor rotulado;  $E_{r2} =$  método proposto vs. HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{exp} = 2,254$  e  $t_{tabelado} = 2,571$ ). Como o  $t_{exp}$  obtido é menor que o  $t_{tabelado}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de rutina pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

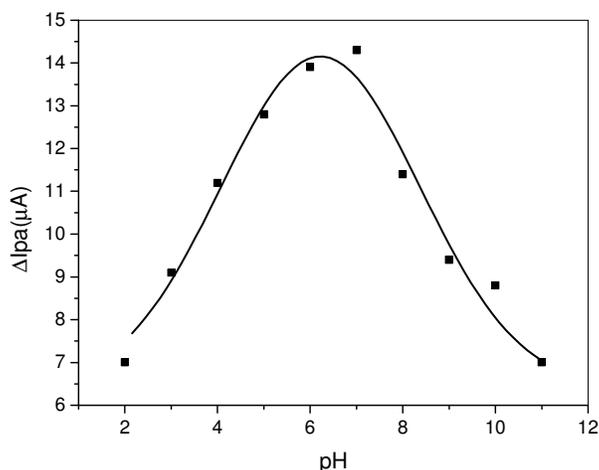
## 4.11. ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para determinação de BHA em maionese

### 4.11.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte

Foram estudados cinco diferentes eletrólitos suportes (tampão fosfato, nitrato de sódio, nitrato de potássio, cloreto de sódio e cloreto de potássio) para ser usados nas determinações de BHA. Em todas as soluções com exceção do tampão fosfato, foi verificada a presença de picos voltamétricos, porém a solução de nitrato de potássio apresentou melhor definição de pico e maior magnitude de corrente sendo assim escolhida para todas as determinações de BHA. O eletrólito suporte utilizado para todas as determinações de BHA foi o nitrato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo 10% de etanol (pH condicional 6,7)

### 4.11.2. Estudo do efeito do pH

O comportamento eletroquímico do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> foi estudado no intervalo de pH de 2 a 11 em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> / 10% etanol (v/v), na presença e na ausência de 8,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de BHA . A FIGURA 4.50 mostra o efeito do pH sobre a corrente de pico anódica do eletrodo modificado. A corrente de pico anódica ( $\Delta I_p/\mu A$ ) foi obtida pela diferença das correntes na presença e na ausência de BHA.

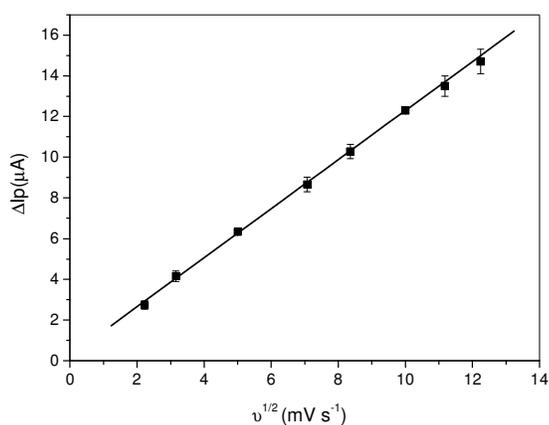


**FIGURA 4.50.** Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>; eletrólito suporte: KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10 % etanol (v/v) na presença de 8,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>

Observa-se um aumento significativo da corrente de pico para valores de pH entre 2 e 7 e um decréscimo nos valores de corrente para pH maiores que 7. A melhor definição de pico e máximo de corrente foi observada em pH 6,7 em virtude dos resultados obtidos escolheu-se trabalhar com uma solução de  $\text{KNO}_3$  em pH 6,7 para a otimização de outros parâmetros para esta determinação.

#### 4.11.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica, no intervalo de 5 a 150  $\text{mV s}^{-1}$ , para uma solução  $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHA em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  / 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,7) (FIGURA 4.51). As correntes de pico anódicas variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, sugerindo que o processo de oxidação de BHA é controlado por difusão.



**FIGURA 4.51.** Resposta voltamétrica do ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$  em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de  $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de BHA em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  / 10% etanol (v/v) (pH condicional 6,7)

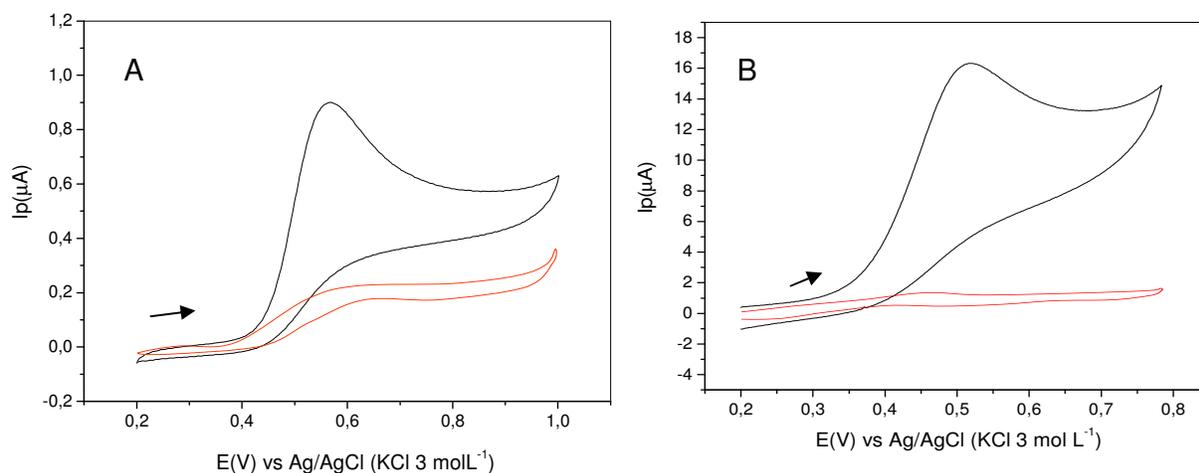
#### 4.11.4. Comportamento eletroquímico de BHA sobre o ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$

Na FIGURA 4.52 são apresentados os perfis voltamétricos de BHA utilizando um ECC não modificado e o ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$  na mesma composição percentual de parafina para vias de comparação.

Como pode ser observado na FIGURA 4.52, o perfil voltamétrico de BHA obtido com ECC não modificado apresentou um pico anódico em 580 mV vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>). O perfil voltamétrico de BHA em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (pH 6,7) determinado com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> mostra um pico anódico em 516 mV vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>), a ausência de um pico catódico no sentido inverso de varredura e o deslocamento para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura evidencia se tratar de um sistema irreversível.<sup>160, 163</sup>

A presença do modificador Ni(OH)<sub>2</sub> imobilizado em resina poliéster aumentou a eficiência eletrocatalítica do eletrodo. O potencial de trabalho utilizando ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> foi deslocado para potenciais menos positivos, podendo assim aumentar a seletividade do eletrodo. A magnitude de corrente também aumentou significativamente para a mesma concentração de BHA empregada nestas determinações voltamétricas.

A variação de potencial anódico com o pH mostrou uma relação linear com inclinação de 29,5 mV pH<sup>-1</sup> o que indica um mecanismo que envolve a transferência de dois elétrons. Utilizando-se os critérios de diagnósticos disponíveis para a técnica de voltametria de onda quadrada<sup>187</sup> para sistemas irreversíveis (equação 2.1) e considerando  $\alpha = 0,5$  foi possível prever o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação de BHA onde o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação de BHA é igual a 2.



**FIGURA 4.52.** Voltamograma cíclico para BHA  $8,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% de etanol (v/v) (pH 6,7) utilizando (A) ECC não modificado e (B) ECCM- Ni(OH)<sub>2</sub>;  $\nu = 50$  mV s<sup>-1</sup>

O mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> na presença de BHA considerando os cálculos realizados para número de elétrons envolvidos na oxidação de BHA obtidos pelas equações 4.3 e 2.2 foi similar ao proposto para quercetina (FIGURA 4.45), onde este é dividido em duas etapas, uma química e outra eletroquímica, caracterizando-se como um mecanismo CE. Inicialmente, BHA é oxidado a TBQ correspondente na superfície do eletrodo e, Ni(OH)<sub>2</sub> é reduzido a Ni<sup>0</sup>, sendo então Ni<sup>0</sup> oxidado eletroquimicamente a Ni(OH)<sub>2</sub> gerando o sinal analítico.

#### 4.11.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto

Na TABELA 4.19 estão apresentados todos os parâmetros estudados e otimizados para determinação de BHA em amostras de alimentos.

**TABELA 4.19.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	NaNO <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> , NaCl, KCl, tampão fosfato	KNO <sub>3</sub>
Solubilidade da amostra eletrólito/ etanol % v/v	95/5% - 70/30%	90/10%
pH do eletrólito	2 – 9	6,7
Concentração de KNO <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	0,01 – 1	0,1
Freqüência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 100	80
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	60
Incremento de varredura (ΔEs) (mV)	1 – 6	5

A freqüência escolhida para todas as determinações de BHA foi igual a 80 s<sup>-1</sup>, em virtude desta apresentar menor linha base em relação a demais. A amplitude de 60 mV foi escolhida por apresentar melhor definição de pico, assim como maior

intensidade de corrente. Um incremento de varredura de potencial igual a 5 mV foi selecionado por apresentar melhor definição de pico.

#### **4.11.6. Estudo da Repetibilidade**

Os estudos de repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de BHA  $5,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% (v/v) empregando-se os mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método. A repetibilidade intra e inter dias foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 4.8.7. O RSD obtido para a repetibilidade intra e inter dias foram: 2,4 % e 3,0 % respectivamente

#### **4.11.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação**

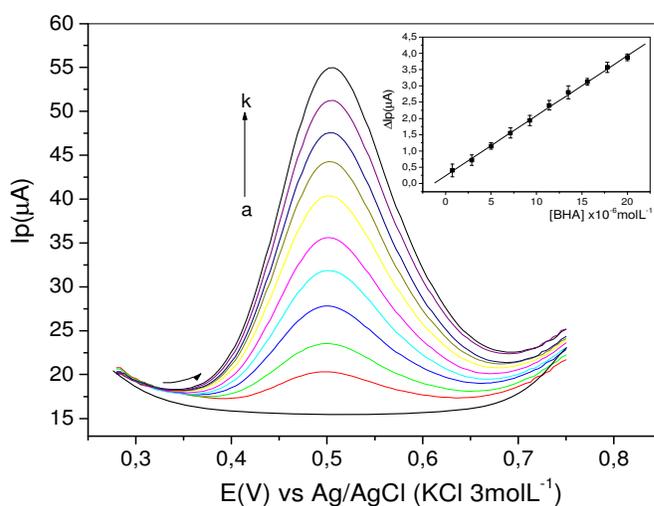
Foram avaliadas algumas substâncias presentes em amostras de maionese que podem interferir na determinação de BHA. As substâncias avaliadas foram: ácido cítrico, EDTA, benzoato de sódio, amido, sorbato de potássio e lactose em solução de KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) (pH condicional 6,7) na mesma concentração (1:1 interferente: analito) e dez vezes maior (10:1 interferente: analito) sendo a concentração de BHA  $5,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Em mesma concentração nenhuma substância investigada apresentou interferência na determinação de BHA em maionese. Em concentração dez vezes maior, somente a lactose apresentou interferência de 4,6 % na determinação de BHA, porém a lactose não está presente em todas as formulações de maionese. Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão. As recuperações variaram entre 96,5 % e 103%. Esses valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de BHA pelo procedimento analítico proposto.

#### **4.11.8. Curva analítica e aplicações**

Na FIGURA 4.53 estão apresentados os voltamogramas de SW obtidos em diferentes concentrações de BHA nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.19. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de BHA entre  $7,5 \times 10^{-7}$  e  $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, com LD igual a  $2,9 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa} (A) = 2,41 \times 10^{-7} + 0,18 [BHA] \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r = 0,9994$ .

O método proposto foi aplicado na determinação de BHA em amostras de maioneses. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a BHA apresentou um tempo de retenção de 6,7 minutos. Na TABELA 4.20 são apresentados os resultados obtidos empregando-se o método proposto e HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{\text{exp}} = 1,948$  e  $t_{\text{tabelado}} = 2,571$ ). Como o  $t_{\text{exp}}$  obtido é menor que o  $t_{\text{tabelado}}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de BHA pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.



**FIGURA 4.53.** Voltamogramas de SW obtidos com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de BHA; (a) eletrólito suporte; (b)  $7,5 \times 10^{-7}$ ; (c)  $2,88 \times 10^{-6}$ ; (d)  $5,01 \times 10^{-6}$ ; (e)  $7,14 \times 10^{-6}$ ; (f)  $9,27 \times 10^{-6}$ ; (g)  $1,14 \times 10^{-5}$ ; (h)  $1,35 \times 10^{-5}$ ; (i)  $1,56 \times 10^{-5}$ ; (j)  $1,78 \times 10^{-5}$ ; (k)  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; eletrólito suporte:  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,7);  $f = 80 \text{ mVs}^{-1}$ ,  $a = 60 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ ). Em detalhe a curva analítica obtida.

**TABELA 4.20.** Determinação de BHA em maionese por HPLC e o método proposto.

Amostras	BHA (mg/100g)		E <sub>r</sub> %
	HPLC	SWV	
Hellmans	2,40 ± 0,05	2,51 ± 0,06	+4,58
Soya	5,96 ± 0,06	6,09 ± 0,05	+2,18
Arisco	1,60 ± 0,04	1,58 ± 0,07	-1,25

$n = 3$ ; nível de confiança de 95%

## 4.12. ECCM com Ni(OH)<sub>2</sub> para determinação de BHT em amostras de maionese e margarina

### 4.12.1. Estudo do efeito do eletrólito suporte

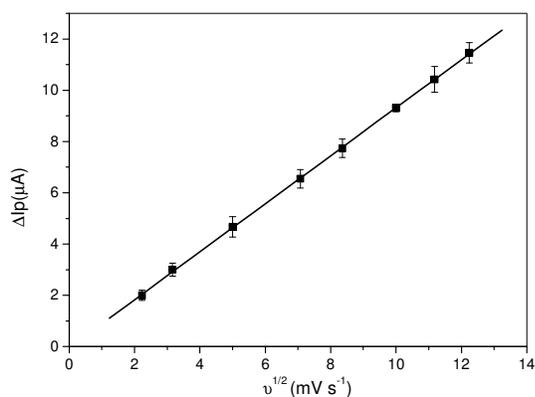
As mesmas soluções de eletrólito suporte estudadas para BHA foram estudados para BHT. O eletrólito suporte utilizado para todas as determinações de BHT foi o nitrato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% de etanol (v/v) (pH 6,7) por apresentar melhor definição de pico e intensidade de corrente.

### 4.12.2. Estudo do efeito do pH

Assim como para BHA, BHT apresentou o mesmo comportamento em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) sendo assim a discussão apresentada no item 4.11.2 é válida também para BHT. A melhor definição de pico e máximo de corrente também foi observada em pH igual a 6,7, sendo assim foi selecionada a solução de KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/10% etanol (v/v) (pH 6,7) para a otimização de todos os parâmetros para esta determinação.

### 4.12.3. Estudo do efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> é apresentado na FIGURA 4.54.

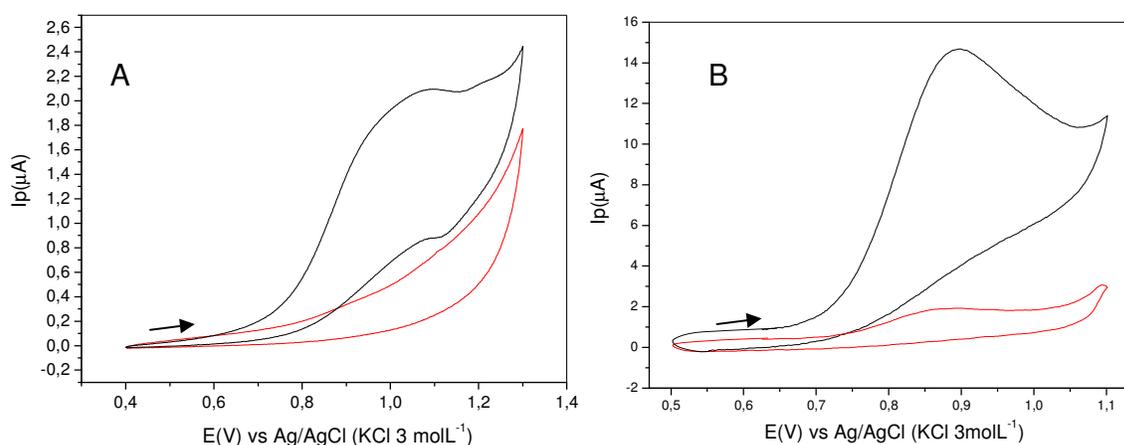


**FIGURA 4.54.** Resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em função da raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de BHT.

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a 150 mV s<sup>-1</sup> para uma solução 2,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> de BHT em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (v/v) (pH 6,7). As correntes de pico anódicas variaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\Delta I_{pa} \text{ (A)} = - 4,55 \times 10^{-8} + 9,36 \times 10^{-7} v^{1/2}$ ), sugerindo que o processo de oxidação de BHT é controlado por difusão.

#### 4.12.4. Comportamento eletroquímico de BHT sobre o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>

Na FIGURA 4.55 são apresentados os perfis voltamétricos de BHT em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (v/v) (pH 6,7) utilizando um ECC não modificado e o ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> na mesma composição percentual de parafina para vias de comparação.



**FIGURA 4.55.** Voltamograma cíclico para BHT 8,0 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% de etanol (v/v) (pH 6,7) utilizando (A) ECC não modificado e (B) ECCM- Ni(OH)<sub>2</sub>;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

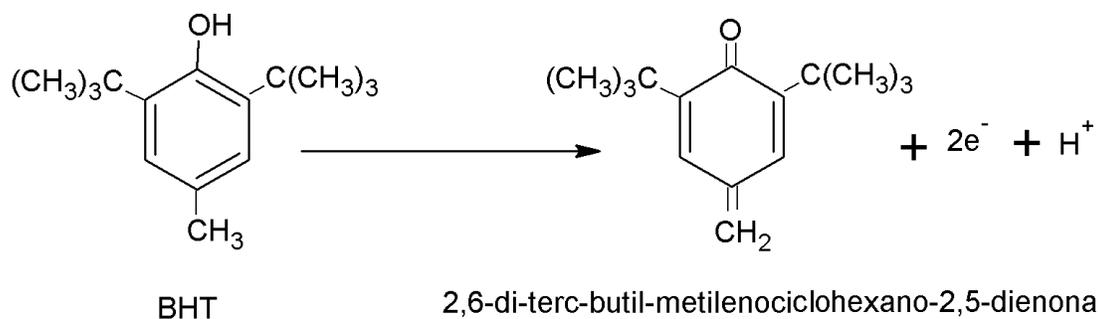
Como pode ser observado na FIGURA 4.55, o perfil voltamétrico de BHT em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (pH 6,7) obtido com ECC não modificado apresentou um pico anódico em 1,08 V vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>) e o perfil voltamétrico de BHT no mesmo eletrólito determinado com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> mostram um pico anódico em 900 mV vs Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>), a ausência de um pico catódico no sentido inverso de varredura e o deslocamento para potenciais mais

positivos com o aumento da velocidade de varredura evidencia-se tratar-se de um sistema irreversível.<sup>160, 163</sup>

Observa-se que o potencial de trabalho utilizando ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> foi deslocado para potenciais menores (menos positivos), o que pode levar a um aumento da seletividade do ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para BHT em comparação com o eletrodo não modificado. A intensidade de corrente também aumentou significativamente na mesma concentração de BHT medida para ambos os eletrodos.

A variação de potencial anódico com o pH mostrou uma relação linear com inclinação de 28,7 mV pH<sup>-1</sup> que indica um mecanismo que envolve a transferência de dois elétrons e um prótons e utilizando a equação 2.1 e considerando  $\alpha = 0,5$ , o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação de BHT também foi igual a 2.

Considerando os estudos realizados sugere-se que em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>/ 10% etanol (pH 6,7), BHT é oxidado a 2,6-di-terc-butil-metilciclohexano-2,5-dienona liberando dois elétrons, como mostra a reação a seguir:



#### 4.12.5. Otimização dos parâmetros para o método proposto

Na TABELA 4.21 são apresentados todos os parâmetros estudados e otimizados para determinação de BHT em amostras de alimentos.

A frequência para determinação de BHT foi escolhida em virtude da menor linha base obtida em relação a demais frequências estudadas e melhor definição de pico. A amplitude e incremento de varredura de potencial também foram escolhidos por apresentar melhor definição de pico e maior intensidade de corrente.

**TABELA 4.21.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	NaNO <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> , NaCl, KCl, tampão fosfato	KNO <sub>3</sub>
Solubilidade da amostra eletrólito/ etanol % v/v	95/5% - 70/30%	90/10%
pH do eletrólito	2 – 9	6,7
Concentração de KNO <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	0,01 – 1	0,1
Freqüência de onda quadrada (f) (s <sup>-1</sup> )	10 – 80	30
Amplitude de onda quadrada (a) (mV)	10 – 100	60
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) (mV)	1 – 6	5

#### 4.12.6. Estudo da Repetibilidade

Os estudos da repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de BHT  $8,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em KNO<sub>3</sub>/etanol 90/10% (V/V) nos mesmos parâmetros de SWV otimizados para o método. A repetibilidade intra e inter dias foram realizadas conforme descrito no item 4.8.7. O RSD obtido para a repetibilidade intra e inter dias foram: 1,4 % e 2,0 % respectivamente

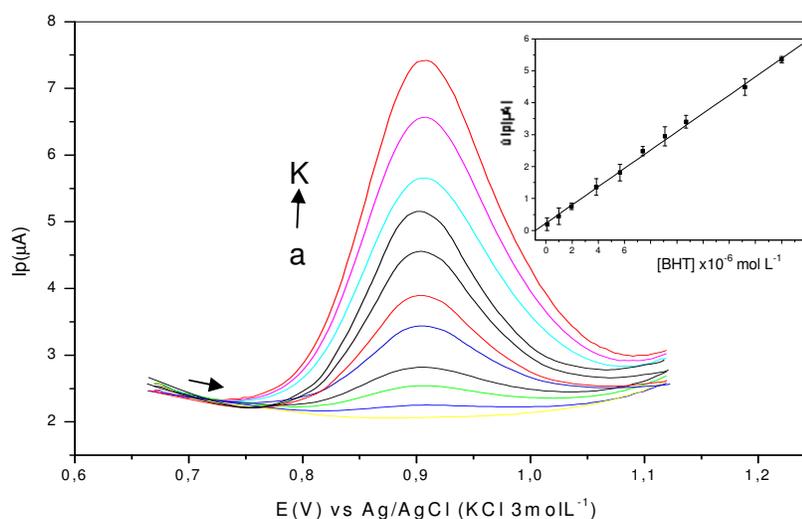
#### 4.12.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação

As mesmas substâncias avaliadas para a determinação de BHA foram avaliadas para BHT na mesma concentração e dez vezes maiores sendo a concentração de BHT  $8,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Nenhuma substância investigada apresentou interferência na determinação de BHT em amostras de maionese e margarina. Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão. As recuperações variaram entre 95,8% e 104%; esses valores obtidos indicam que não houve

interferência significativa da matriz das amostras na determinação de BHT pelo procedimento analítico proposto.

#### 4.12.8. Curva analítica e aplicações

Na FIGURA 4.56 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes concentrações de BHT nas condições otimizadas apresentadas na TABELA 4.21. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de BHT entre  $9,9 \times 10^{-8}$  e  $1,8 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, com limite de detecção determinado conforme a equação 4.4 igual a  $4,3 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. A equação de regressão linear obtida foi:  $\Delta I_{pa}$  (A) =  $2,25 \times 10^{-7} + 0,286$  [BHT] mol L<sup>-1</sup>,  $r = 0,9994$ .



**FIGURA 4.56.** Voltamogramas SW obtidos com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> em diferentes concentrações de BHT; (a) eletrólito suporte; (b)  $9,9 \times 10^{-8}$ ; (c)  $9,9 \times 10^{-7}$ ; (d)  $1,96 \times 10^{-6}$ ; (e)  $3,84 \times 10^{-6}$ ; (f)  $5,66 \times 10^{-6}$ ; (g)  $7,40 \times 10^{-6}$ ; (h)  $9,09 \times 10^{-6}$ ; (i)  $1,07 \times 10^{-5}$ ; (j)  $1,52 \times 10^{-5}$ ; (k)  $1,8 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; eletrólito suporte: KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,7);  $f = 30$  mVs<sup>-1</sup>,  $a = 60$  mV,  $\Delta E_s = 5$  mV). Em detalhe a curva analítica obtida.

O método proposto foi aplicado na determinação de BHT em amostras de maionese e margarinas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a BHT apresentou um tempo de retenção de 8,8 minutos. Na TABELA 4.22 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.

**TABELA 4.22.** Determinação de BHT em maionese e margarina por HPLC e o método proposto.

Amostras	BHT (mg/100g)		
	HPLC	SWV	E <sub>r</sub> %
Vigor	1,20 ± 0,05	1,23 ± 0,10	+ 2,50
Doriana	2,07 ± 0,04	2,12 ± 0,09	+ 2,41
Soya	3,37 ± 0,05	3,41 ± 0,10	+ 1,18
Arisco	1,04 ± 0,06	1,06 ± 0,06	+ 1,92

*n = 3; nível de confiança de 95%*

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado.<sup>186</sup> Como o  $t_{\text{exp}}$  (2,381) obtido é menor que o  $t_{\text{tabelado}}$  (2,571) pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de BHT pelo método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

Na TABELA 4.23 é apresentada a comparação entre antioxidantes naturais CAT e QCT e os antioxidantes sintéticos BHA e BHT quantificados com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>.

Comparando cada antioxidante determinado com os eletrodos modificados propostos, observa-se que para os antioxidantes naturais CAT e QCT o ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> foi o que obteve maior linearidade. O limite de detecção obtido com ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> foi até duas décadas maior para o antioxidante QCT, do que aquele obtido com ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para o mesmo antioxidante. Em relação aos antioxidantes sintéticos, o maior intervalo de linearidade foi obtido usando ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub> para determinar BHT em amostras de maionese e margarina de acordo coma TABELA 4.23.

**TABELA 4.23.** Resultados obtidos para a quantificação de CAT, QCT, BHA e BHT utilizando o ECCM-  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  e ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$

ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$					
	Ep (V)	LD ( $\text{mol L}^{-1}$ )	r	b	L ( $\text{mol L}^{-1}$ )
CAT	0,16	$5,8 \times 10^{-8}$	0,9995	1,28	$9,9 \times 10^{-8} - 1,2 \times 10^{-6}$
QCT	0,16	$8,6 \times 10^{-8}$	0,9985	3,81	$1,9 \times 10^{-7} - 1,3 \times 10^{-6}$
BHA	0,44	$5,9 \times 10^{-8}$	0,9991	3,15	$9,9 \times 10^{-7} - 3,4 \times 10^{-5}$
BHT	0,87	$5,7 \times 10^{-8}$	0,9995	1,00	$3,0 \times 10^{-7} - 3,4 \times 10^{-5}$
ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$					
	Ep (V)	LD ( $\text{mol L}^{-1}$ )	r	b	L ( $\text{mol L}^{-1}$ )
CAT	0,17	$5,5 \times 10^{-8}$	0,9990	1,21	$1,3 \times 10^{-7} - 1,8 \times 10^{-5}$
QCT	0,04	$6,0 \times 10^{-6}$	0,9985	0,106	$1,2 \times 10^{-5} - 8,4 \times 10^{-5}$
BHA	0,51	$2,9 \times 10^{-7}$	0,9996	0,71	$7,5 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$
BHT	0,90	$4,3 \times 10^{-8}$	0,9989	0,28	$9,9 \times 10^{-8} - 1,8 \times 10^{-5}$

r = coeficiente de correlação linear da curva analítica;

b = coeficiente angular da curva analítica;

L = linearidade da curva analítica

Na TABELA 4.24 são apresentados os resultados obtidos para todos os antioxidantes pelo método proposto e os resultados obtidos por alguns autores. Observa-se na TABELA 4.24 que os potenciais de trabalho obtidos para todos os antioxidantes usando o ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$  com exceção de BHT, foram menores em relação aos autores citados, e assim como discutido para o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  o antioxidante rutina foi o que obteve menor potencial de trabalho comparado com os autores citados na TABELA 4.24. Assim, o ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$  mostrou-se relativamente mais seletivo em relação aos resultados encontrados na literatura para os mesmo antioxidante utilizando técnicas voltamétricas como método de determinação.

**TABELA 4.24.** Comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e alguns autores.

ECCNM		ECCM-Ni(OH) <sub>2</sub>		Referências		
Ep (V)		Ep (V)	LD (mol L <sup>-1</sup> )	Ep (V)	LD(mol L <sup>-1</sup> )	
CAT	0,40	0,16	5,5 x10 <sup>-8</sup>	0,23	----	33
				0,20	4,65x10 <sup>-6</sup>	24
QCT	031	0,02	6,0 x10 <sup>-7</sup>	0,31	8,0 x10 <sup>-8</sup>	189
				0,36	2,0 x10 <sup>-8</sup>	40
Rut	0,40	0,22	2,9 x10 <sup>-7</sup>	0,87	1,5 x10 <sup>-7</sup>	188
				0,37	1,8 x10 <sup>-8</sup>	95
BHA	0,58	0,51	2,9 x10 <sup>-7</sup>	0,64	1,0 x10 <sup>-6</sup>	190
				0,65	3,7 x10 <sup>-6</sup>	76
BHT	1,08	0,90	4,3x10 <sup>-8</sup>	0,84	6,8 x10 <sup>-7</sup>	190

#### 4.13. ECCM com resina de troca iônica para determinação de rutina em formulações farmacêuticas

Os parâmetros estudados e otimizados para a quantificação de rutina utilizando o ECCM proposto estão sumarizados na TABELA 4.25. A técnica de voltametria linear foi utilizada para quantificação do analito e a técnica de voltametria cíclica foi utilizada para os demais estudos.

**TABELA 4.25.** Resumo dos parâmetros estudados para o método proposto

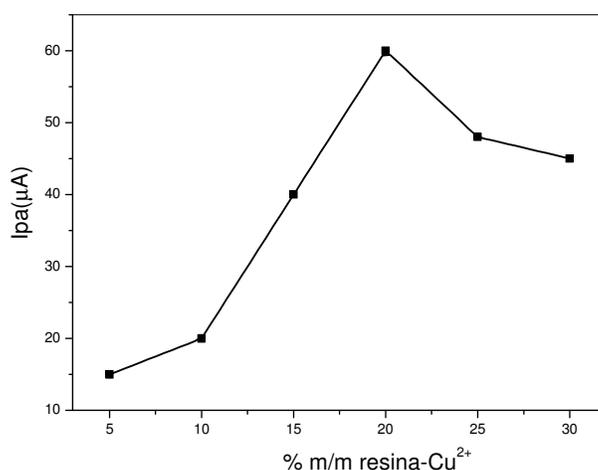
Parâmetros	Valores estudados	Valor selecionado
Eletrólito suporte	Tampão fosfato, KCl, NaCl, KNO <sub>3</sub> , NaNO <sub>3</sub> ,	KNO <sub>3</sub>
pH* do eletrólito	2 - 11	6,0
Solubilidade da amostra (KNO <sub>3</sub> /etanol)	75/25% - 95/5%	90/10%
Concentração de KNO <sub>3</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	0,05 – 0,5	0,1
(CV) Velocidade de varredura (mVs <sup>-1</sup> )	5 - 150	50
(LV) Velocidade de varredura (mVs <sup>-1</sup> )	5 -150	50

##### 4.13.1. Estudo da composição do eletrodo

O efeito da composição do eletrodo foi estudado por voltametria cíclica, fixando primeiramente a percentagem de aglutinante (parafina) em 20% e variaram-se as quantidades de pó de grafite e resina-Cu (II) nas seguintes proporções de pó de grafite/parafina: 75:20; 70:20; 65:20, 60:20, 55:20 e 50:20, (% m/m) e resina-Cu (II): 5, 10, 15, 20, 25 e 30% m/m em relação à massa total do compósito.

A FIGURA 4.57 mostra o efeito da percentagem m/m do modificador na composição do eletrodo. As medidas ciclovoltamétricas foram realizadas em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,0), em velocidade de varredura de potencial de 50 mV s<sup>-1</sup>, na presença e na ausência de 1,09 × 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> de rutina. Os valores de  $\Delta I_p$  correspondem a diferença da corrente obtida na presença e na ausência de rutina.

Como pode ser observado FIGURA 4.57, a concentração de resina catiônica contendo Cu(II) imobilizado no ECCM, possui um grande efeito na resposta voltamétrica do eletrodo modificado. Os picos de corrente aumentaram com o aumento da percentagem do modificador até 20% m/m. Em concentrações superiores a 20% do modificador, foi observado queda da resposta analítica do eletrodo modificado, devido a diminuição da concentração em % do pó de grafite no compósito do eletrodo e conseqüentemente, diminuição da condutividade elétrica do compósito. Sendo assim, selecionou-se a seguinte composição do ECCM: resina-Cu (II) 20 % m/m, pó de grafite 40 % m/m e 20% (m/m) de parafina sólida.

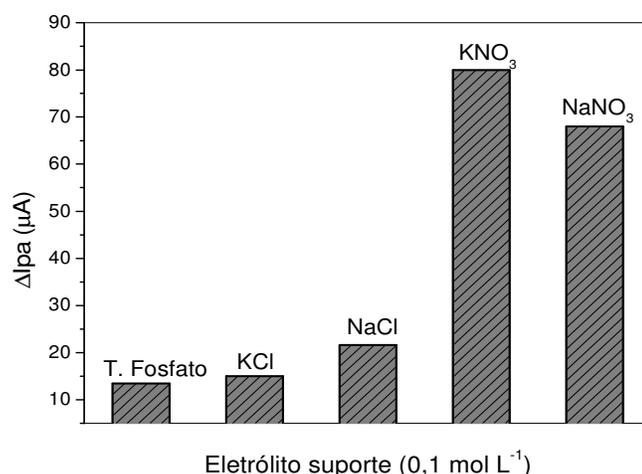


**FIGURA 4.57.** Efeito da composição do compósito do eletrodo sobre resposta voltamétrica do ECCM-resina-Cu (II) em KNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> /10% etanol (v/v) (pH 6,0);  $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ .

#### 4.13.2. Estudo do efeito do eletrólito suporte

O comportamento voltamétrico do ECCM-resina-Cu (II) foi investigado em cinco diferentes eletrólitos suportes, a saber: cloreto de potássio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, nitrato de sódio e tampão fosfato. Em todas as soluções foram verificadas a presença de picos voltamétricos, porém a solução de nitrato de potássio apresentou melhor definição de pico e maior magnitude de corrente (FIGURA 4.58), sendo assim selecionada como eletrólito suporte para todas as determinações de rotina em formulações farmacêuticas. O pico anódico observado com o eletrodo modificado no eletrólito suporte contendo íons potássio aumentou em relação à

solução que contém os íons sódio, demonstrando que o contra íon influencia o comportamento voltamétrico do eletrodo. Este fato pode ser explicado de acordo com o raio iônico hidratado dos íons  $\text{Na}^+(1,8\text{\AA})$  e  $\text{K}^+(1,25\text{\AA})$  quanto menor o raio iônico hidratado maior é a permeabilidade do cátion na molécula de resina-Cu(II), este comportamento concorda com alguns estudos de eletrólitos suporte encontrados na literatura, os quais sugerem o uso de íons potássio no eletrólito suporte.<sup>191, 192</sup> A resposta voltamétrica do ECCM-resina-Cu (II) não foi afetada pela concentração do eletrólito. Assim, a solução do nitrato de potássio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  foi usada para todas as determinações de rotina.



**FIGURA 4.58.** Efeito das soluções de eletrólito suporte estudadas para a determinação de rotina utilizando ECCM com Resina-Cu (II). Variações de correntes obtidas por voltametria cíclica na presença e na ausência de  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de rutina;  $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ .

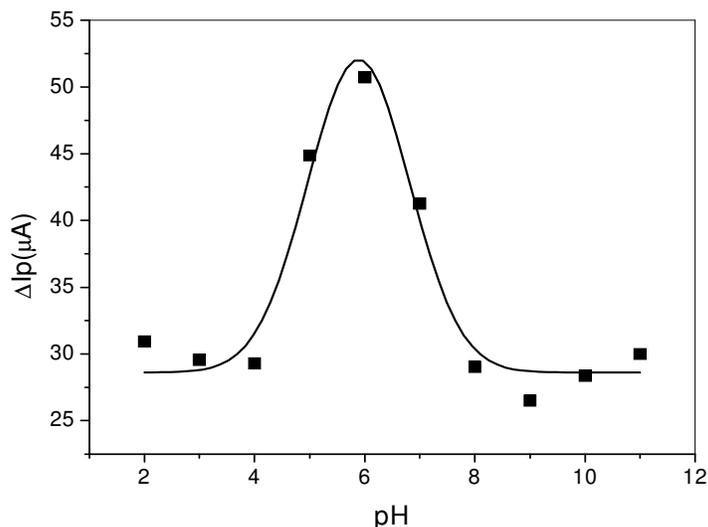
#### 4.13.3. Estudo do efeito do pH

O ECCM com resina-Cu (II) (20% m/m) foi estudado sobre um intervalo de pH entre 2 a 11, em uma solução contendo  $3,84 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de rutina. De acordo com a estrutura da rutina, o pH possui efeito significativo na formação do complexo entre Cu (II) e rutina. ZENG *et al.*<sup>52</sup> Sugere que em pH elevado a reação torna-se mais difícil devido a falta de próton em solução, além disso em pH elevados a rutina polariza negativamente causando repulsão eletrostática entre a rutina e o compósito de carbono, diminuindo a intensidade de corrente.

Conseqüentemente as soluções com pH menores são mais apropriada para a determinação de rutina.

A FIGURA 4.59 mostra o efeito do pH na corrente de pico anódica do eletrodo modificado. A corrente de pico anódica ( $\Delta I_p/\mu A$ ) foi obtida pela diferença das correntes na presença e na ausência de rutina.

Observa-se que no intervalo de pH entre 2,0 e 4,0 a corrente de pico foi praticamente constante, sendo que entre 4,0 e 6,0 houve aumento significativo do sinal analítico, atingindo um sinal máximo em pH igual a 6,0. Em valores de pH maiores que 6,0 a intensidade de corrente de pico diminui, provavelmente devido ao fato que em pH maior que 6,0 os íons hidroxila presente na solução dificulta ou impede a formação do complexo Cu (II)-rutina de acordo com a equação 4.2 (item 4.2.3)

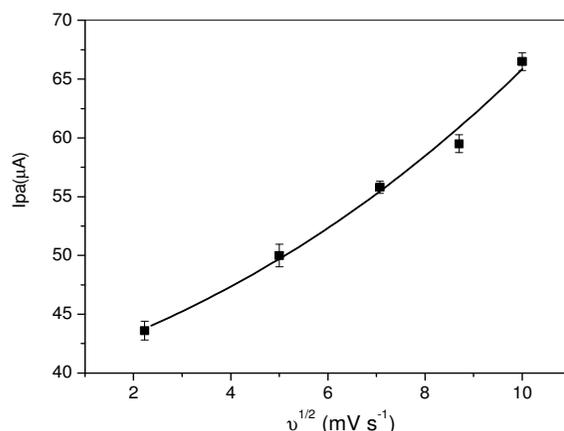


**FIGURA 4.59.** Efeito do pH na resposta voltamétrica do ECCM-resina-Cu (II); eletrólito suporte:  $KNO_3$  0,1 mol  $L^{-1}$  / 10 % etanol (v/v) na presença de  $3,85 \times 10^{-6}$  mol  $L^{-1}$  rutina.

#### 4.13.4. Estudo do efeito da velocidade de varredura

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica do ECCM foi investigado usando voltametria cíclica no intervalo de 5 a 150  $mV s^{-1}$  para uma solução  $3,85 \times 10^{-6}$  mol  $L^{-1}$  de Rut em  $KNO_3$  0,1 mol  $L^{-1}$  / 10% etanol (v/v) (pH 6,0). A FIGURA 4.60 mostra o comportamento do ECCM em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

As correntes de pico anódico não variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura como observado na FIGURA 4.60, sugerindo que a formação do complexo Cu(II)-Rut seja controlado por adsorção das espécies até a superfície do eletrodo.



**FIGURA 4.60.** Resposta voltamétrica do ECCM-resina-Cu (II) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

#### 4.13.5. Comportamento eletroquímico de Rut sobre o ECCM-resina-Cu (II)

A FIGURA 4.61 mostra os ciclo voltamogramas obtidos com ECCM não modificado e ECCM-resina-Cu (II) na presença e na ausência de rutina

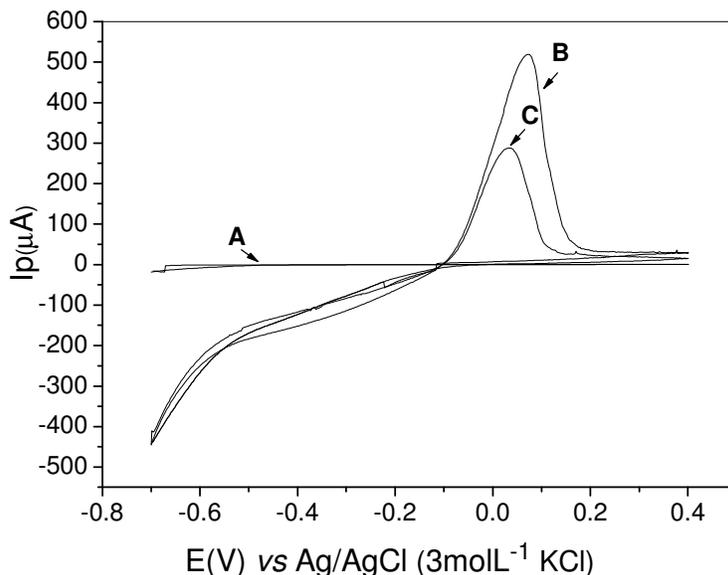
A atividade antioxidante da rutina é realçada pela complexação com metais de transição.<sup>193</sup> As características do complexo rutina-cátion metálico e os outros complexos com flavonóides têm sido descritos utilizando-se métodos como espectrofotometria,<sup>194</sup> cronopotenciometria e voltametria linear.<sup>195</sup> Estes trabalhos descrevem a formação de complexos entre flavonóides, especialmente a rutina com metais como Cu (II), Bi (III) e Ga (III).<sup>194, 195</sup>

BAI e colaboradores<sup>196</sup> estudaram a interação de flavonóides com metais de transição, em especial o cobre (II) por espectrometria de massas com ionização de elétrons. Eles observaram que a rutina e outros flavonóides forma complexo com cobre(II).

As diminuições das correntes foram diretamente proporcionais a formação de complexo Rut-Cu (II) na superfície do ECCM em -0,019V a qual foi investigada por voltametria cíclica. Pode se observar na FIGURA 4.61 B que a intensidade de

corrente diminui na presença de rutina sugerindo que o complexo formado adsorve na superfície do eletrodo.

Ainda de acordo com a FIGURA 4.61 ocorre uma diminuição dos picos de corrente, devido ao fato que a superfície do eletrodo foi bloqueada por uma forte adsorção do complexo formado.



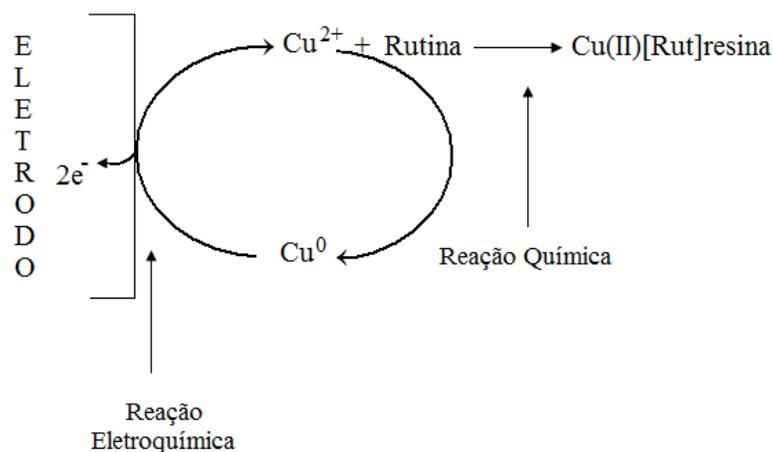
**FIGURA 4.61** - Comportamento voltamétrico da rutina em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  /10 % etanol (v/v) (pH condicional 6,0);  $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$ ; (A) ECC não modificado; (B) ECCM-resina-Cu (II) na ausência; (C) na presença de  $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de rutina.

A intensidade de corrente obtida com o ECCM-resina-Cu (II) em eletrólito suporte na ausência de rutina (branco) pode ser recuperada eletroquimicamente ou por polimento manual da superfície do eletrodo.

Após todas as determinações de rutina, otimizou-se um método de recuperação ou dessorção do complexo Cu (II)-rutina formado na superfície do eletrodo. Para isto, a superfície de contato do eletrodo foi deixada submersa em água deionizada por 20 minutos. Após este tempo, fez se uma varredura no sentido catódico em eletrólito suporte, seguida por uma varredura no sentido anódico. Para este estudo foi usada voltametria cíclica em potencial 400 a  $-700 \text{ mV}$  (sentido catódico) e  $-700$  a  $400\text{mV}$  (sentido anódico). O desvio padrão obtido entre as correntes obtidas com o ECCM-resina-Cu (II) em eletrólito suporte inicialmente (antes da construção da curva analítica) e depois do tratamento catódico foi igual a 1,5%, mostrando que é possível renovar a superfície do eletrodo eletroquimicamente, porém

a vida útil do eletrodo diminui em 48% comparando com a vida útil do eletrodo sem o tratamento catódico.

O mecanismo de resposta voltametria do ECCM-resina-Cu (II) foi proposto como esta representado na FIGURA 4.62. O pico anódico em -0,019 V corresponde à oxidação de  $\text{Cu}^0/\text{Cu}^{2+}$  e a formação do complexo Cu (II) resina [Rutina] que concorda com os artigos citados os quais sugerem a formação de complexos entre a rutina e íons  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>193, 197, 198</sup>



**FIGURA 4.62.** Mecanismo proposto para o funcionamento do ECCM-resina-Cu (II) para a determinação de Rut.

#### 4.13.6. Estudo de Repetibilidade

Os estudos de repetibilidade intra e inter dias foram realizados empregando soluções de rutina  $3,84 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  em  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  /10 % etanol (v/v) nos mesmos parâmetros otimizados para o método. A repetibilidade intra e inter dias foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 4.8.7. O RSD obtido para a repetibilidade intra dias foi de 1,0 % e pra repetibilidade inter dias foi de 3,0 %.

#### 4.13.7. Estudo de interferentes em potencial e teste de recuperação

Foram avaliados alguns excipientes presentes em amostras comerciais que podem interferir na determinação de rutina. As substâncias avaliadas foram: sacarina sódica, metilparabeno, amido, carbonato de cálcio e estearato de magnésio em

solução de  $\text{KNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /10% etanol (v/v) (pH 6,0) na mesma concentração (1:1 interferente: rutina) e dez vezes maior (10:1 interferente: rutina) sendo a concentração de rutina  $3,84 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Nenhuma substância investigada causou interferência na determinação de rutina em nenhuma proporção de concentração.

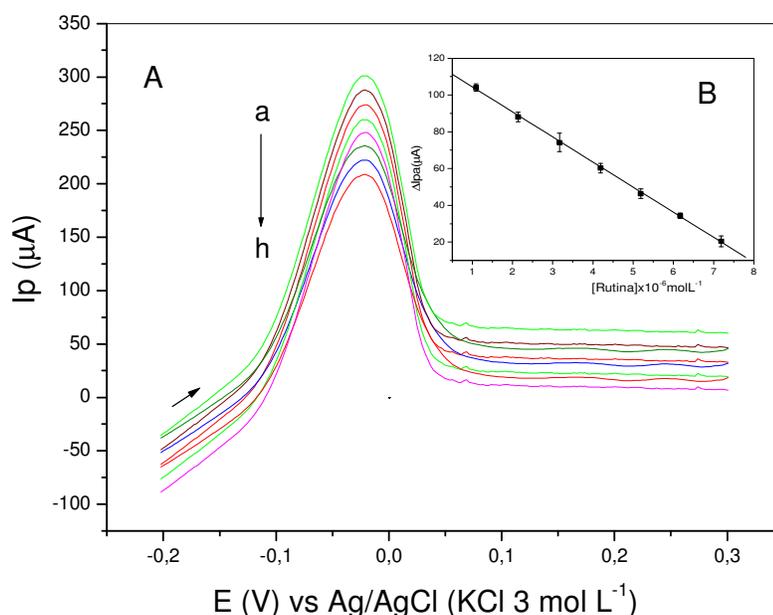
Também foi realizado o estudo de adição e recuperação de padrão usando duas amostras de formulações farmacêuticas com as três concentrações padrão diferentes: 1,30, 2,55 e 3,16  $\text{mg L}^{-1}$  e os resultados obtidos foram comparados com os aqueles adicionados. As recuperações variaram entre 97,8% e 102%, demonstrando a exatidão do método proposto.

É importante notar que os concomitantes contidos nestas amostras não causaram interferências na determinação do rutina, usando o método proposto. Considerando que as substâncias passíveis de interferência foram investigadas e não influenciaram na resposta do ECCM proposto na determinação de rutina, desta forma é possível considerar que o método proposto é eficiente para a determinação de rutina em amostras farmacêuticas.

#### **4.13.8. Curva analítica e aplicações**

Na FIGURA 4.63 são apresentados os voltamogramas lineares obtidos em diferentes concentrações de rutina nas condições otimizadas e apresentadas na TABELA 4.21. Sob os parâmetros otimizados, a corrente de pico anódica obtida com o ECCM-resina-Cu (II) foi linear com a concentração de rutina no intervalo de  $9,90 \times 10^{-7}$  a  $8,07 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , com limite de detecção igual a  $2,65 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e equação da reta igual a  $\Delta I_{pa} \text{ (A)} = 1,17 \times 10^{-4} - 13,60 [\text{Rutina}]$  ( $r = 0.9997$ )

O método proposto foi aplicado na determinação de rutina em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por HPLC nas condições experimentais descritas anteriormente a qual a rutina apresentou um tempo de retenção de 4,2 minutos. Na TABELA 4.26 são apresentados os resultados obtidos para o método proposto e HPLC.



**FIGURA 4.63.** Voltamograma de varredura linear obtido com ECCM-resina-Cu (II) em  $KNO_3\ 0,1\ mol\ L^{-1}/10\ \%$  etanol (v/v) (pH 6,0); (a) branco; (b)  $9,9 \times 10^{-7}$ ; (c)  $2,14 \times 10^{-6}$ ; (d)  $3,90 \times 10^{-6}$ ; (e)  $4,90 \times 10^{-6}$ ; (f)  $6,17 \times 10^{-6}$ ; (g)  $7,13 \times 10^{-6}$ ; (g)  $8,07 \times 10^{-6}\ mol\ L^{-1}$ ;  $\nu = 50\ mVs^{-1}$ ; Em detalhe curva analítica obtida.

**TABELA 4.26.** Determinação de rutina em formulações farmacêuticas por HPLC e o método proposto.

Amostras	Valor rotulado	Rutina			
		HPLC	LV	$E_{r1}\%$	$E_{r2}\%$
Venocur (II)r*	300	$299 \pm 2$	$301 \pm 1$	+ 0,3	+0,6
Nova Rutina**	20,0	$19,9 \pm 0,2$	$20,8 \pm 0,3$	+ 4,0	+ 4,5

$n = 3$ ; nível de confiança de 95%

\* mg Rutina por comprimido; \*\* mg Rutina por mL

$E_{r1}$  = método proposto vs. valor rotulado;  $E_{r2}$  = método proposto vs. HPLC.

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado, <sup>186</sup> ( $t_{exp} = 1,09$  e  $t_{tabelado} = 2,571$ ). Como o  $t_{exp}$  obtido é menor que o  $t_{tabelado}$  pode-se concluir que os resultados obtidos na determinação de rutina pelo

método proposto e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

Na TABELA 4.27 são apresentados os resultados obtidos para a quantificação de rutina utilizando os três eletrodos propostos neste trabalho. De acordo com a TABELA 4.27, observa-se que os limites de detecção e linearidade obtidos com os três eletrodos foram similares, a diferença observada foi em relação aos potenciais de trabalho de cada eletrodo.

**TABELA 4.27.** Resultados obtidos para a quantificação de Rut utilizando os ECCMs propostos.

<b>Rutina</b>					
	<b>Ep (V)</b>	<b>LD</b>	<b>R</b>	<b>b</b>	<b>L (mol L<sup>-1</sup>)</b>
<b>ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	0,16	4,15x10 <sup>-7</sup>	0,9993	5,56	1,37x10 <sup>-7</sup> – 2,5x10 <sup>-6</sup>
<b>ECCM-Ni (OH)<sub>2</sub></b>	0,12	2,90x10 <sup>-7</sup>	0,9985	1,73	9,9x10 <sup>-7</sup> – 6,5x10 <sup>-6</sup>
<b>ECCM-Cu (II)Resina</b>	-0,02	2,65x10 <sup>-7</sup>	0,9997	-13,6	9,9x10 <sup>-7</sup> – 8,07x10 <sup>-6</sup>

LD = limite de detecção calculado conforme a equação 4.4 em mol L<sup>-1</sup>

## **Capítulo 5 – CONCLUSÕES**

---

## CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego de eletrodos compósito de carbono modificados para determinação de antioxidantes catequina, quercetina, rutina, BHA e BHT em diferentes amostras utilizando técnicas voltamétricas.

Os eletrodos modificados propostos (ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>) foram comparados com o ECC não modificado onde verificou-se as propriedades eletrocatalíticas dos modificadores os quais diminuíram os potenciais de trabalho para potenciais menos positivos aumentando assim a seletividade dos eletrodos comparados ao ECC não modificado. Os ECCMs foram aplicados na determinação dos cinco antioxidantes supramencionados com boa precisão e exatidão, mostrando-se promissor na quantificação de antioxidantes em amostras de alimentos e fármacos.

A quantificação de todos os antioxidantes estudados foi realizada utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, esta técnica também foi usada para estudar alguns parâmetros e compará-los com estudos realizados usando a técnica de voltametria cíclica, sendo que os resultados foram concordantes entre si.

Para efeito de comparação, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e os resultados obtidos foram concordantes com os resultados obtidos pelos métodos propostos a nível de confiança de 95%. Ademais, destacam-se algumas vantagens em se utilizar os métodos propostos em relação ao HPLC para determinação de antioxidantes, tais como: baixo custo, menor tempo de análise, menor quantidade de reagentes gastos em todo o procedimento analítico, além da facilidade de construção dos eletrodos e operação do equipamento utilizado em todas as determinações.

Outro procedimento proposto foi a utilização do cobre (II) imobilizado em resina de troca catiônica, sendo esta incorporado no eletrodo compósito de carbono. Este eletrodo foi aplicado na determinação de rutina em formulações farmacêuticas utilizando as técnicas de voltametria cíclica e linear com boa precisão e exatidão.

A composição de cada eletrodo foi estudada sendo que as seguintes composições obtiveram melhor desempenho analítico: ECCM-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: 40% modificador, 40% pó de grafite; ECCM-Ni(OH)<sub>2</sub>: 20% modificador, 60 % pó de grafite e ECCM-resina-Cu: 20% modificador, 60 % pó de grafite, todos contendo 20 % (m/m) de parafina.

A parafina teve um papel importante na fabricação dos eletrodos, pois conferiu a eles uma característica hidrofóbica à superfície dos eletrodos dificultando os processos adsorptivos na superfície dos mesmos. Dentre os cinco antioxidantes determinados, apenas a quercetina apresentou processo controlado por adsorção.

Os modificadores químicos  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  e  $\text{Ni}(\text{OH})_2$  foram imobilizados em resina poliéster. A principal característica atribuída a imobilização dos modificadores foi o aumento na vida útil de cada eletrodo, uma vez que foram construídos para efeito de comparação, eletrodos na mesma composição porém com os modificadores não imobilizados, estes eletrodos apresentaram tempo de vida útil bem menores em comparação aos eletrodos com modificadores imobilizados

Verificou-se que o tampão fosfato foi o eletrólito que proporcionou a melhor resposta em termos de sinal analítico e definição de pico para os antioxidantes naturais catequina, quercetina e rutina, utilizando tanto o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  como ECCM- $\text{Ni}(\text{OH})_2$ . Para os antioxidantes sintéticos BHA e BHT o eletrólito suporte  $\text{KNO}_3$  foi o que proporcionou a melhor resposta voltamétrica para os dois eletrodos, indicando uma possível influência do contra íon nas determinações.

Os resultados obtidos foram comparados com aqueles publicados na literatura que também utilizaram técnicas voltamétricas para determinação dos mesmos antioxidantes, verificou-se que os métodos propostos, nesta tese, obtiveram para todos os sistemas, menores potenciais de trabalho comparados aqueles relatados na literatura e o método proposto utilizando o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  foi o que obteve menores limites de detecção sendo estes limites de até duas décadas menores em relação a CAT e BHA e uma década menor em relação aos demais antioxidantes comparando àqueles apresentados da literatura.

Ainda utilizando o ECCM- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  foi possível realizar a detecção simultânea de BHA e BHT em amostras complexas de alimentos com boa precisão e exatidão.

## **Capítulo 6 – ATIVIDADES FUTURAS**

---

## **CAPÍTULO 6 – ATIVIDADES FUTURAS**

Durante o desenvolvimento desse trabalho, surgiram algumas perspectivas de trabalhos futuros seguindo a mesma linha de pesquisa.

Há a necessidade de estudos adicionais para maiores esclarecimento com relação ao mecanismo de funcionamento dos ECCMs, principalmente aquele contendo o modificador  $\text{Ni(OH)}_2$  devido varias discussões sobre o meio de reação deste eletrodo.

Utilizar estes eletrodos na determinação de outras substâncias em amostras complexas; tais como substâncias antipsicotrópicas (quetiapina e olanzapina) em urina e sangue e lactose em amostras de alimentos.

Adaptar estes eletrodos em sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de analitos de interesse, visando obter maior velocidade analítica.

## **Capítulo 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS C. A. APUD RACANICCI, A. M. C.; MENTEM, J.F.; LAFIGLIOLA M.C., GAIOTTO J.B. & PEDROSO A.A. "Nutricines: Food components in health and nutrition apud Effects of the Addition of BHT and Storage on the Quality of Meat and Bone Meal for Broiler Chickens, ". *Nottingham University Press / Rev. Bras. Cienc. Avic.* **2**: 11, 1999 /2000.
2. ADEGOKE, G.O.; KUMAR, M.V.; KRISHNA, A.G.G.; VARADARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K. & LOKESH, B.R. "Antioxidants and lipid oxidation in foods - A critical appraisal". *J. Food Sci. Technol.* **35**(4): 283, 1998.
3. HALLIWELL, B. "Antioxidants in human health and disease". *Annual Review of Nutrition.* **16**: 33, 1996.
4. MELO E. A. & GUERRA, N.B. "Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos". *Bol. SBCTA.* **36**(1): 1, 2002.
5. SÁNCHEZ-MORENO, S.; LAURRAURI, J.A. & CALIXITO-SAURA, F. "Free radical scavenger capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents". *Food. Res. Int.* **36**(6): 407, 1999.
6. KANATT, S.R.; CHANDER, R. & SHARMA, A. "Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat". *Food Chem.* **100**(2): 451, 2007.
7. SUN, G.; WANG, W. & WUA, J. "Pulse radiolysis study of the formation and the reactivity of baicalin radical anion, and in comparison with rutin, quercetin and acrylate ester radical anions in ethanol". *Radiat. Phys. Chem.* **76**: 951, 2007.
8. MS, *MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução, n° 04 de 24 de novembro de 1988. Aditivos Intencionais - Ministério da Saúde.* 1988, Brasília: Resolução, n° 04 de 24 de novembro de 1988.
9. RAMALHO, V.C. & JORGE, N. "Antioxidants used in oils, fats and fatty foods". *Quim. Nova.* **29**(4): 755, 2006.
10. KUBOW, S. "Lipid oxidation-products in food and atherogenesis". *Nutrition Reviews.* **51**(2): 33, 1993.
11. SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M. & FERREIRA, M.A. "Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante". *Quim. Nova.* **22**(1): 94, 1999.
12. NAWAR, W.W. & FENNEMA, O.R., *Lipids.* 1985: ed. Marcel Dekker - New York. 139.
13. BAILEY, A.E. "Bailey's Industrial Oil and Fat Products vol. 3". *5th ed, John Wiley,* 1996.
14. ZHANGA, Y. & ZHENGGA, J.B. "Sensitive voltammetric determination of rutin at an ionic liquid modified carbon paste electrode". *Talanta.* **77**(1): 325, 2008.
15. ANTUNES, A.J. & CANHOS, V., *Aditivos em Alimentos.* . 1984., Campinas - SP: Editora da UNICAMP.
16. BRENNAN, O.V. & PAGLIARINI, E. "Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines." *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4841, 2001.
17. FENNEMA, O.R., *Química de los alimentos.* . 2nd ed. 1993, Madri: ed. Zaragoza Acribia.
18. SIMÃO, A.M., *Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico.* 1985., São Paulo - SP: Nobel.
19. ZHENG, W. & WANG, S.Y. "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs." *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5165, 2001.

20. TIEPPO, J.; VERCELINO, R.; DIAS, A.S.; VAZ, M.F.S.; SILVEIRA, T.R.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N.P.; HENRIQUES, J.A.P. & PICADA, J.N. "Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome". *Food Chem. Toxicol.* **45**(7): 1140, 2007.
21. RAUHA, J.P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KAHKONEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H. & VUORELA, P. "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds". *Int. J. Food Microbiol.* **56**(1): 3, 2000.
22. EL-HADY, D.A. "Selective and sensitive hydroxypropyl-beta-cyclodextrin based sensor for simple monitoring of (+)-catechin in some commercial drinks and biological fluids". *Anal. Chim. Acta.* **593**(2): 178, 2007.
23. KORISH, A.A. & ARAFAH, M.M. "Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF)". *Arch. Gerontol. Geriatrics.* **46**(1): 25, 2008.
24. EL-HADY, D. & EL-MAAL, N. "Selective square wave voltammetric determination of (+)-catechin in commercial tea samples using beta-cyclodextrin modified carbon paste electrode". *Microchim. Acta.* **161**(1-2): 225, 2008.
25. YILMAZ, Y. "Novel uses of catechins in foods". *Trends Food Sci. Technol.* **17**: 64, 2006
26. TURAN, B.; GULSEN, A.; MAKRIS, D.P. & KEFALAS, P. "Interactions between quercetin and catechin in a model matrix: Effects on the in vitro antioxidant behaviour". *Food Res. Int.* **40**(7): 819, 2007.
27. ZU Y.; LIU, C.; FU, Y. & ZHAO, C. "Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 714, 2006.
28. EVARISTO, I.M. & LEITÃO, M.C. "Identificação e Quantificação por DAD-HPLC, da Fração Fenólica Contida em Folhas de *Quercus suber* L". *Silva Lusitana.* **9**(2): 135 2001.
29. WANG, H.; HELLIWELL, K. & YOU, X. "Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC". *Food Chem.* **68**: 115 2000
30. ITOH, N.; KATSUBE, Y.; YAMAMOTO, K.; NAKAJIMA, N. & YOSHIDA, K. "Laccase-catalyzed conversion of green tea catechins in the presence of gallic acid to epitheafagallin and epitheafagallin 3-O-gallate". *Tetrahedron.* **63**(38): 9488, 2007.
31. GURBUZ, O.; GOCMEN, D.; DAGDELEN, F.; GURSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BUYUKUYSAL, L. & USTA, M. "Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection". *Food Chem.* **100**(2): 518, 2007.
32. FERNANDES, S.C.; OSORIO, R.E.M.; DOS ANJOS, A.; NEVES, A.; MICKE, G.A. & VIEIRA, I.C. "Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor". *J. Braz. Chem. Soc.* **19**(6): 1215, 2008.
33. KORBUT, O.; BUCKOVA, M.; LABUDA, J. & GRUNDLER, P. "Voltammetric detection of antioxidative properties of flavonoids using electrically heated DNA modified carbon paste electrode". *Sensors.* **3**(1): 1, 2003.
34. JANEIRO, P. & BRETT, A.M.O. "Catechin electrochemical oxidation mechanisms". *Anal. Chim. Acta.* **518**: 109, 2004.
35. ZARE, H.R.; NAMAZIAN, M. & NASIRIZADEH, N. "Electrochemical behavior of quercetin: Experimental and theoretical studies". *J. Electroanal. Chem.* **584**(2): 77, 2005.
36. KHALLOUKI, F.; HAUBNER, R.; HULL, W.E.; ERBEN, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. & OWEN, R.W. "Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br". *Food Chem. Toxicol.* **45**(3): 472, 2007.

37. JULLIAN, C.; MOYANO, L.; YANEZ, C. & OLEA-AZAR, C. "Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study". *Spectrochim. Acta, Part A* **67**(1): 230, 2007.
38. JIN, G.P.; HE, J.B.; RUI, Z.B. & MENG, F.S. "Electrochemical behavior and adsorptive stripping voltammetric determination of quercetin at multi-wall carbon nanotubes-modified paraffin-impregnated graphite disk electrode". *Electrochim. Acta.* **51**(21): 4341, 2005.
39. JIN, J.H.; KWON, C.; PARK, W.; KIM, S. & JUNG, S. "Electrochemical characterization of a glassy carbon electrode modified with microbial succinoglycan monomers and multi-wall carbon nanotubes for the detection of quercetin in an aqueous electrolyte". *J Electroanal. Chem.* **623**(2): 142, 2008.
40. LIN, X.Q.; HE, J.B. & ZHA, Z.G. "Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry". *Sens. Actuators B.* **119**(2): 608, 2006.
41. BRETT, A.M.O. & DICULESCU, V.C. "Electrochemical study of quercetin–DNA interactions: Part I. Analysis in incubated solutions". *Bioelectrochemistry.* **64**: 133, 2004.
42. BRETT, A.M.O. & GHICA, M. E. "Electrochemical oxidation of quercetin". *Electroanalysis.* **15**(22): 1745, 2005.
43. BRETT, A.M.O. & DICULESCU, V.C. "Electrochemical study of quercetin–DNA interactions Part II. In situ sensing with DNA biosensors ". *Bioelectrochemistry.* **64**: 143, 2004.
44. FARGHALY, O.A. "Voltammetric determination of quercetin in urine at carbon paste electrode". *Anal. Lett.* **38**(13): 2247, 2005.
45. LIU, B.; ANDERSON, D.; FERRY, D.R.; SEYMOUR, L.W.; TAKATS, P.G. & KERR, D.J. "Determination of quercetin in human plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **666**: 149, 1995.
46. WACH, A.; PYRZYNSKA, K. & BIESAGA, M. "Quercetin content in some food and herbal samples". *Food Chem.* **100**: 699, 2007.
47. CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I. & ZAGNONI, I. "Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts". *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5226, 2003.
48. CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. & MUSCI, M. "Spectrophotometric and coulometric detection in the highperformance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice". *J. Chromatogr., A.* **881**: 449, 2000.
49. NEMATOLLAHI, D. & MALAKZADEH, M. "Electrochemical oxidation of quercetin in the presence of benzenesulfonic acids". *J. Electroanal. Chem.* **547**(2): 191, 2003.
50. ISHII, K.; FURUTA, T. & KASUYA, Y. "High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection". *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **794**: 49, 2003.
51. HE, J.; WANG, Y.; DENG, N. & LIN X. "Study of the adsorption and oxidation of antioxidant rutin by cyclic voltammetry–voltabsorptometry". *Bioelectrochemistry.* **71**: 157, 2007.
52. ZENG, B.Z.; WEI, S.H.; XIAO, F. & ZHAO, F.Q. "Voltammetric behavior and determination of rutin at a single-walled carbon nanotubes modified gold electrode". *Sens. Actuators B.* **115**(1): 240, 2006.
53. XU, J.; ZHANG, H. & CHEN, G. "Carbon nanotube/polystyrene composite electrode for microchip electrophoretic determination of rutin and quercetin in Flos Sophorae Immaturus". *Talanta.* **73**: 932, 2007.

54. CHEN, G.; ZHANG, H. & YE, J. "Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection". *Anal. Chim. Acta.* **423**: 69, 2000.
55. HE, J.; WANG, Y.; DENG, N.; ZHAB, Z. & LIN, X. "Cyclic voltammograms obtained from the optical signals: Study of the successive electro-oxidations of rutin". *Electrochim. Acta.* **52**: 6665, 2007.
56. ERLUND, I., KOSONEN, T., ALFTHAN, G., MÄENPÄÄ, J., PERTTUNEN, K., KENRAALI, J., PARANTAINEN, J. ARO A. "Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56**: 545, 2000.
57. GENE, R.M.; CARTANA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PANELLA, T. & CANIGUERAL, S. "Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of Baccharis trimera: Identification of its Active Constituents". *Planta Med.* **62**: 232, 1996.
58. RAMANATHAN, R.; DAS, W.P. & TAN, C.H. "Inhibitory effects of 2-hydroxy chalcone and other flavonoids on human cancer cell-proliferation". *Int. J. Oncol.* **31**: 115, 1993.
59. GHICA, M.E. & BRETT, A.M.O. "Electrochemical Oxidation of Rutin". *Electroanalysis.* **17**(4): 313, 2005.
60. VOLIKAKIS, G.J. & EFSTATHIOU, C.E. "Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection/adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes". *Talanta.* **51**(4): 775, 2000.
61. OMURA, K. "Antioxidant synergism between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**(12): 1565, 1995.
62. BOTTERWECK, A.A.M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R.A.; KLEINJANS, J. & VAN DEN BRANDT, P.A. "Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study". *Food Chem. Toxicol.* **38**(7): 599, 2000.
63. CRUCES-BLANCO, C.; CARRETERO, A.S.; BOYLE, E.M. & GUTIERREZ, A.F. "The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs". *Talanta.* **50**(5): 1099, 1999.
64. SAAD, B.; SING, Y.Y.; NAWI, M.A.; HASHIM, N.; ALI, A.S.M.; SALEH, M.I.; SULAIMAN, S.F.; TALIB, K.M. & AHMAD, K. "Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC". *Food Chem.* **105**(1): 389, 2007.
65. IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; NIVAUDGUERNET, E. & GUERNET, M. "Effect of pH on the retention behavior of some preservatives-antioxidants in reversed-phase high-performance liquid-chromatography". *Chromatography.* **40**(11-12): 652, 1995.
66. HENDERSON, D.E.; SLICKMAN, A.M. & HENDERSON, S.K. "Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: A comparative study against BHT and melatonin". *J. Agric. Food Chem.* **47**(7): 2563, 1999.
67. CAMPOS, G.C.M. & TOLEDO, M.C.F. "The Determination of BHA, BHT and TBHQ in Fats and Oils by High Performance Liquid Chromatography". *Braz. J. Food Technol.* **3**: 65, 2000.
68. YANG, M.H.; LIN, H.J. & CHOONG, Y.M. "A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats". *Food Res. Int.* **35**(7): 963, 2002.
69. LEE, M.R.; LIN, C.Y.; LI, Z.G. & TSAI, T.F. "Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr., A.* **1120**(1-2): 244, 2006.
70. RUIZ, M.A.; GARCIA-MORENO, E.; BARBAS, C. & PINGARRON, J.M. "Determination of phenolic antioxidants by HPLC with amperometric detection at a nickel phthalocyanine polymer modified electrode". *Electroanalysis.* **11**(7): 470, 1999.

71. RUIZ, M.A.; BLAZQUEZ, M.G. & PINGARRON, J.M. "Electrocatalytic and flow-injection determination of the antioxidant tert-butylhydroxyanisole at a nickel phthalocyanine polymer-modified electrode". *Anal. Chim. Acta.* **305**(1-3): 49, 1995.
72. GARCIA, C.D. & ORTIZ, P.I. "Determination of tert-butylhydroxytoluene by flow injection analysis at polymer modified glassy carbon electrodes". *Electroanalysis.* **10**(12): 832, 1998.
73. RIBER, J.; DE LA FUENTE, C.; VAZQUEZ, M.D.; TASCÓN, M.L. & BATANERO, P.S. "Electrochemical study of antioxidants at a polypyrrole electrode modified by a nickel phthalocyanine complex. Application to their HPLC separation and to their FIA system detections". *Talanta.* **52**(2): 241, 2000.
74. YANEZSEDENO, P.; PINGARRON, J.M. & DIEZ, L.M.P. "Determination of tert-butylhydroxyanisole and tert-butylhydroxytoluene by flow-injection with amperometric detection". *Anal. Chim. Acta.* **252**(1-2): 153, 1991.
75. RAYMUNDO, M.D.; PAULA, M.M.D.; FRANCO, C. & FETT, R. "Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques". *Lwt-Food Sci. Technol.* **40**(7): 1133, 2007.
76. JAYASRI, D. & NARAYANAN, S.S. "Electrocatalytic oxidation and amperometric determination of BHA at graphite-wax composite electrode with silver hexacyanoferrate as electrocatalyst". *Sens. Actuators, B.* **119**(1): 135, 2006.
77. RUIZ, M.A.; YANEZSEDENO, P. & PINGARRON, J.M. " Voltammetric determination of the antioxidant tert-butylhydroxytoluene (bht) at a carbon-paste electrode modified with nickel phthalocyanine". *Electroanalysis.* **6**(5-6): 475, 1994.
78. AGUI, M.L.; REVIEJO, A. J.; YANEZSEDENO, P. & PINGARRON, J. M. " Analytical applications of cylindrical carbon-fiber microelectrodes - simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food". *Anal. Chem.* **67**(13): 2195, 1995.
79. CEBALLOS, C. & FERNANDEZ, H. "Synthetic antioxidants determination in lard and vegetable oils by the use of voltammetric methods on disk ultramicroelectrodes". *Food Res. Int.* **33**(5): 357, 2000.
80. MOSES, P.R.; WIER, L. & MURRAY, R.W. "Chemically modified tin oxide electrode". *Anal. Chem.* **47**(12): 1882, 1975.
81. COX, J.A.; TESS, M.E. & CUMMINGS, T.E. "Electroanalytical methods based on modified electrodes: A review of recent advances". *Rev. Anal. Chem.* **15**(3): 173, 1996.
82. LANE, R.F. & HUBBARD, A.T. "Electrochemistry of chemisorbed molecules. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents". *J. Physical Chem.* **77**(11): 1401, 1973.
83. WATKINS, B.F.; BEHLING, J.R.; KARIV, E. & MILLER, L.L. "Chiral Electrode". *J. Am. Chem. Soc.* **97**(12): 3549, 1975.
84. PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S. & KUBOTA, L.T. "Tendências em Modificações de Eletrodos Amperométricos para Aplicações Analíticas". *Quim. Nova.* **25**(06): 1012, 2002.
85. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. & NIEMAN, T.A. *Principles of Instrumental Analysis.* 5 ed. 1998, Philadelphia: Harcourt Brace & Company.
86. SOUZA, M.D.F.B. "Eletrodos Quimicamente Modificados Aplicados á Eletroanálise: Uma Breve Abordagem ". *Quim. Nova.* **20**(02): 191, 1997.
87. WINK, T.; VANZUILEN, S.J.; BULT, A. & VANBENNEKOM, W.P. "Self-assembled monolayers for biosensors". *Analyst.* **122**(4): R43, 1997.
88. TROJANOWICZ, M. & KRAWCZYK, T.K.V. "Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films". *Microchim. Acta.* **121**(1-4): 167, 1995.
89. DOWNARD, A.J. "Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes". *Electroanalysis.* **12**(14): 1085, 2000.
90. BARD, A. "Chemical modification of electrodes". *J.Chem. Education.* **60**: 302, 1983.

91. LOTZBEYER, T.; SCHUHMANN, W.; KATZ, E.; FALTER, J. & SCHMIDT, H.L. "Direct electron-transfer between the covalently immobilized enzyme microperoxidase MP-11 and a cystamine-modified gold electrode". *J. Electroanal. Chem.* **377**(1-2): 291, 1994.
92. KATZ, E.; SCHLERETH, D.D. & SCHMIDT, H.L. "Electrochemical study of Pyrroloquinoline quinone covalently immobilized as a monolayer onto a Cystamine-modified gold electrode". *J. Electroanal. Chemistry.* **367**(1-2): 59, 1994.
93. CESPEDES, F.; MARTINEZ-FABREGAS, E. & ALEGRET, S. "New materials for electrochemical sensing .1. Rigid conducting composites". *TrAC, Trends Anal. Chem.* **15**(7): 296, 1996.
94. MARTORELL, D.; CESPEDES, F.; MARTINEZ-FABREGAS, E. & ALEGRET, S. "Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite". *Anal. Chim. Acta.* **290**(3): 343, 1994.
95. DOS SANTOS, S.X.; MAZO, L.H. & CAVALHEIRO, E.T.G. "The Use of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in the Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation". *J. Braz. Chem. Soc.* **19**(8): 1600, 2008.
96. BARSAN, M.M.; PINTO, E.M.; FLORESCU, M. & BRETT, C.M.A. "Development and characterization of a new conducting carbon composite electrode". *Anal. Chim. Acta.* **635**(1): 71, 2009.
97. TEIXEIRA, M.F.S.; RAMOS, L.A.; FATIBELLO-FILHO, O. & CAVALHEIRO, E.T.G. "PbO<sub>2</sub>-based graphite-epoxy electrode for potentiometric determination of acids and bases in aqueous and aqueous-ethanolic media". *Fresenius J. Anal. Chem.* **370**(4): 383, 2001.
98. PUNGOR, E. & SZEPESVA, E. "Voltammetric studies with silicone rubber-based graphite electrodes". *Anal. Chim. Acta.* **43**(2): 289, 1968.
99. JIMENEZ, M.M.D.; ELIZALDE, M.P.; GONZALEZ, M. & SILVA, R. "Electrochemical behaviour of nickel-polyester composite electrodes". *Electrochim. Acta.* **45**(25-26): 4187, 2000.
100. MENDES, R.K.; CLARO-NETO, S. & CAVALHEIRO, E.T.G. "Evaluation of a new rigid carbon-castor oil polyurethane composite as an electrode material". *Talanta.* **57**(5): 9140, 2002.
101. MENDES, R.K.; CERVINI, P. & CAVALHEIRO, E.T.G. "The use of a graphite-castor oil polyurethane composite electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers". *Talanta.* **68**(3): 708, 2006.
102. ALEGRET, S. "Rigid carbon - Polymer biocomposites for electrochemical sensing - A review". *Analyst.* **121**(12): 1751, 1996.
103. TALLMAN, D.E. & PETERSEN, S.L. "Composite electrode for electroanalysis - Principles and applications". *Electroanalysis.* **2**(7): 499, 1990.
104. KIRYUSHOV, V.N.; SKVORTSOVA, L.I.; ALEKSANDROVA, T.P. & KARUNINA, O.V. "Effect of the activation of a graphite-epoxy composite electrode and the buffer capacity of a solution on the reversibility of the hydroquinone electrode reaction". *J. Anal. Chem.* **63**(6): 580, 2008.
105. MANEA, F.; RADOVAN, C.; CORB, I.; POP, A.; BURTICA, G.; MALCHEV, P.; PICKEN, S. & SCHOONMAN, J. "Simultaneous determination of 4-chlorophenol and oxalic acid using an expanded graphite-epoxy composite electrode". *Electroanalysis.* **20**(15): 1719, 2008.
106. DOMENECH, A.A. J. "Determination of hydrogen peroxide using glassy carbon and graphite/polyester composite electrodes modified by vanadium-doped zirconias". *Anal. Chim. Acta.* **452**(1): 11, 2002.
107. DOMENECH-CARBO, A.; DOMENECH-CARBO, M.T.; OSETE-CORTINA, L.; GIMENO-ADELANTADO, J.V.; SANCHEZ-RAMOS, S. & BOSCH-REIG, F. "Quantitation of metal

- ions in archaeological glass by abrasive stripping square-wave voltammetry using graphite/polyester composite electrodes". *Electroanalysis*. **15**(18): 1465, 2003.
108. DOMENECH-CARBO, A.; DOMENECH-CARBO, M.T.; SUARI-PERIS, M.C.; GIMENO-ADELANTADO, J.V. & BOSCH-REIG, F. "Electrochemical identification of anthraquinone-based dyes in solid microsamples by square wave voltammetry using graphite/polyester composite electrodes". *Anal. Bioanal. Chem.* **375**(8): 1169, 2003.
  109. LI, C.X.; ZENG, Y.L. & TANG, C.R. "Glucose biosensor based on carbon/PVC-COOH/ferrocene composite with covalently immobilized enzyme". *Chin. Chem. Lett.* **16**(10): 1357, 2005.
  110. KIM, J.Y.; KIM, K.H. & KIM, K.B. "Fabrication and electrochemical properties of carbon nanotube/polypyrrole composite film electrodes with controlled pore size". *J. Power Sources*. **176**(1): 396, 2008.
  111. CATALDI, T.R.I. & CENTONZE, D. "Development of a carbon composite electrode made from polyethylene and graphite powder modified with copper(I) oxide". *Anal. Chim. Acta*. **326**(1-3): 107, 1996.
  112. BEJANKIWAR, R.S.; BASU, A. & CEMENTI, M. "Electrochemical oxidation of polyethylene glycol in electroplating solution using paraffin composite copper hexacyanoferrate modified (PCCHM) anode". *J. Environ. Sci. China*. **16**(5): 851, 2004.
  113. JAYASRI, D. & NARAYANAN, S.S. "Amperometric determination of hydrazine at manganese hexacyanoferrate modified graphite-wax composite electrode". *J. Hazard. Mater.* **144**(1-2): 348, 2007.
  114. TAKEUCHI, R.M.; SANTOS, A.L.; PADILHA, P.M. & STRADIOTTO, N.R. "Copper determination in ethanol fuel by differential pulse anodic stripping voltammetry at a solid paraffin-based carbon paste electrode modified with 2-aminothiazole organofunctionalized silica". *Talanta*. **71**(2): 771, 2007.
  115. FREITAS, K.H.G., MEDEIROS, R. A., FATIBELLO-FILHO, O. "Voltammetric Determination of Rutin Using a Carbon Composite Electrode Modified with Copper(II)-Resin". *Anal. Lett.* **42**(6): 881, 2009.
  116. BURKE, L.D.; COLLINS, J.A. & MURPHY, M.A. "Redox and electrocatalytic activity of copper in base at unusually low, premonolayer potentials". *J. Solid State Electrochem.* **4**(1): 34, 1999.
  117. BURKE, L. D. & MURPHY, M.A. "Multilayer hydrous oxide growth on copper in base and its correlation with previously reported electrocatalytic data for this electrode system". *J. Solid State Electrochem.* **5**(1): 43, 2001.
  118. LORIMER, J.P.; MASON, T.J.; PLATTES, M. & WALTON, D.J. "Passivation phenomena during sonovoltammetric studies on copper in strongly alkaline solutions". *J. Electroanal. Chem.* **568**(1-2): 379, 2004.
  119. STREHLOW, H.H.; MAURICE, V. & MARCUS, P. "Initial and later stages of anodic oxide formation on Cu, chemical aspects, structure and electronic properties". *Electrochim. Acta*. **46**(24-25): 3755, 2001.
  120. WILHELM, S.M.; TANIZAWA, Y.; LIU, C.Y. & HACKERMAN, N. "A photo-electrochemical investigation of semiconducting oxide-films on copper". *Corros. Sci.* **22**(8): 791, 1982.
  121. KANG, M.C. & GEWIRTH, A.A. "Voltammetric and force spectroscopic examination of oxide formation on Cu(111) in basic solution". *J. Phys. Chem. B* **106**(47): 12211, 2002.
  122. MOUCHREK, V.E.; MARQUES, A.L.B.; ZHANG, J.J. & CHIERICE, G.O. "Surface complexation of copper(II) with alizarin red S adsorbed on a graphite electrode and its possible application in electroanalysis". *Electroanalysis*. **11**(15): 1130, 1999.
  123. HUANG, X.J.; POT, J.J. & KOK, W.T. "Electrochemical characteristics of conductive carbon cement as matrix for chemically-modified electrodes". *Anal. Chim. Acta*. **300**(1-3): 5, 1995.

124. DURSUN, Z. & NISLI, G. "Voltammetric behavior of copper(I)oxide modified carbon paste electrode in the presence of cysteine and ascorbic acid". *Talanta*. **63**(4): 873, 2004.
125. MHO, S. & JOHNSON, D.C. "Electrocatalytic response of amino acids at Cu-Mn alloy electrodes". *J. Electroanal. Chem.* **495**(2): 152, 2001.
126. HSI, T.S.; LIN, J.N. & KUO, K.Y. "Simultaneous determination of carbohydrates and amino acids by capillary zone electrophoresis with constant potential amperometric detection at a copper electrode". *J. Chin. Chem. Soc.* **44**(2): 101, 1997.
127. MHO, S. & JOHNSON, D.C. "Electrocatalytic response of carbohydrates at copper-alloy electrodes". *J. Electroanal. Chem.* **500**(1-2): 524, 2001.
128. ABDULLIN, I.F.; BUDNIKOV, G.K.; BAKANINA, Y.N. & KUKUSHKINA, N.N. "Copper and silver electrodes for the potentiometric and voltammetric determination of glucose and other carbohydrates". *J. Anal. Chem.* **53**(10): 935, 1998.
129. D'ERAMO, F.; MARIOLI, J.M.; AREVALO, A.A. & SERENO, L.E. "HPLC analysis of carbohydrates with electrochemical detection at a poly-1-naphthylamine/copper modified electrode". *Electroanalysis*. **11**(7): 481, 1999.
130. YE, J.N. & BALDWIN, R.P. "Determination of carbohydrates, sugar, acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode". *J. Chromatogr., A*. **687**(1): 141, 1994.
131. CASELLA, I.G., DESIMONI, E., SALVI, A. M. "Chemically modified electrode for the detection of carbohydrates". *Anal. Chim. Acta*. **243**(1): 61, 1991.
132. NUNES, L.M.S. & FARIA, R.C. "The Influence of the Electrodeposition Conditions on the Electroanalytical Performance of the Bismuth Film Electrode for Lead Determination". *Electroanalysis*. **20**(20): 2259, 2008.
133. TEIXEIRA, M.F.S.; RAMOS, L.A.; FATIBELLO-FILHO, O. & CAVALHEIRO, E.T.G. "Carbon paste electrode modified with copper(II) phosphate immobilized in a polyester resin for voltammetric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations". *Anal. Bioanal. Chem.* **376**(2): 214, 2003.
134. PEREIRA, A.V. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical formulations with on-line solid-phase reactor containing copper (II) phosphate". *Anal. Chim. Acta*. **366**(1-3): 55, 1998.
135. INVENTORES, A.N.D. [www.patentesonline.com.br](http://www.patentesonline.com.br). 2009 [cited 2009 28 / 05].
136. DECKER, D.L. & CHEN, W. "High-precision measurement of electrical-resistivity of nickel near the ferromagnetic phase-transition at high-pressure". *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* . **46**(13): 8237, 1992.
137. HAJJIZADEH, M.; JABBARI, A.; HELI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; SHAFIEE, A. & KARIMIAN, K. "Electrocatalytic oxidation and determination of deferasirox and deferiprone on a nickel oxyhydroxide-modified electrode". *Anal. Biochem.* **373**(2): 337, 2008.
138. HAJJIZADEH, M.; JABBARI, A.; HELI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; SHAFIEE, A. & KARIMIAN, K. "Electrocatalytic oxidation of some anti-inflammatory drugs on a nickel hydroxide-modified nickel electrode". *Electrochim. Acta*. **53**(4): 1766, 2007.
139. MAJDI, S.; JABBARI, A. & HELI, H. "A study of the electrocatalytic oxidation of aspirin on a nickel hydroxide-modified nickel electrode". *J. Solid State Electrochem.* **11**(5): 601, 2007.
140. MANI, B., NEUFVILLE, J. P. "Dehydration of chemically and electrochemically impregnated (Cl and EI) nickel hydroxide electrodes". *J. Electrochem. Soc.* **135**(4): 800, 1988.

141. HUANG, Q.; WANG, X.; LI, J.; DAI, C.; GAMBOAB, S. & SEBASTIAN, P.J. "Nickel hydroxide/activated carbon composite electrodes for electrochemical capacitors". *J. Power Sources*. **164**: 425, 2007.
142. ZHAO, D.D., BAO, S. J., ZHOU, W. H., LI, H. L. "Preparation of hexagonal nanoporous nickel hydroxide film and its application for electrochemical capacitor". *Electrochem. Commun.* **9**(5): 869, 2007.
143. IBRAHIM, H.S.M. "Black nickel electrodeposition from a modified Watts bath". *J. Appl. Electrochem.* **36**: 295, 2006.
144. SHIBLI, S.M.A.; BEENAKUMARI, K.S. & SUMA, N.D. "Nano nickel oxide/nickel incorporated nickel composite coating for sensing and estimation of acetylcholine". *Biosens. Bioelectron.* **22**(5): 633, 2006.
145. BODE, H., DEHMLT, K., WRITTE, J. APUD DOS SANTOS, M. A. S., *Estudo eletroquímico do níquel em meio alcalino* in *Departamento de química*. 1993, UFSCar: São Carlos. p. 23.
146. HUI, B.S. & HUBER, C.O. "Amperometric detection of amines and amino-acids in flow-injection systems with a nickel-oxide electrode". *Anal. Chim. Acta.* **134**: 211, 1982.
147. CHENG, X.; ZHANG, S.; ZHANG, H.; WANG, Q.; HE, P. & FANG, Y. "Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode". *Food Chem.* . **106**: 830, 2008.
148. YI, Q.; ZHANG, J.; HUANG, W. & LIU, X. "Electrocatalytic oxidation of cyclohexanol on a nickel oxyhydroxide modified nickel electrode in alkaline solutions". *Catal. Commun.* . **8**: 1017, 2007.
149. EL-SHAFEI, A.A. "Electrocatalytic oxidation of methanol at a nickel hydroxide:glassy carbon modified electrode in alkaline medium". *J. Electroanal. Chem.* **471**: 89, 1999.
150. GOBI, K.V.; TOKUDA, K. & OHSAKA, T. "Monomolecular films of a nickel(II) pentaazamacrocyclic complex for the electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide at gold electrodes". *J. Electroanal. Chem.* **444**(2): 145, 1998.
151. LU, S.F.; PAN, J.; HUANG, A.B.; ZHUANG, L. & LU, J.T. "Alkaline polymer electrolyte fuel cells completely free from noble metal catalysts". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(52): 20611, 2008.
152. LUPETTI, K.O.; VIEIRA, I.C.; VIEIRA, H.J. & FATIBELLO-FILHO, O. "Electroregenerable anion-exchange resin with triiodide carbon paste electrode for the voltammetric determination of adrenaline". *Analyst.* **127**(4): 525, 2002.
153. ARRIGAN, D.W.M. " Voltammetric determination of trace metals and organics after accumulation at modified electrodes". *Analyst.* **119**: 1953, 1994.
154. HERNANDEZ, L.; HERNANDEZ, P.; BLANCO, M.H. & SANCHEZ, M. "Determination of copper(II) with a carbon paste electrode modified with an ion-exchange resin". *Analyst.* **113**(1): 41, 1988.
155. HERNANDEZ, L.; MELGUIZO, J.M.; BLANCO, M.H. & HERNANDEZ, P. "Determination of cadmium(II) with a carbon paste electrode modified with an ion-exchange resin". *Analyst.* **114**(3): 397, 1989.
156. LABUDA, J. & BUCKOVA, M. "Selectivity of voltammetric determination at an ion-exchanger modified electrode". *Electrochem. Commun.* **2**(5): 322, 2000.
157. VIANA, M.M.O.; DA SILVA, M.P.; AGRAZ, R.; PROCOPIO, J.R.; SEVILLA, M.T. & HERNANDEZ, L. "Comparison of two kinetic approaches for copper speciation using ion-exchange columns and ion-exchange modified carbon paste electrodes". *Anal. Chim. Acta.* **382**(1-2): 179, 1999.
158. WU, W.S.; UDDIN, M. S. & CHI, H. "Cation-exchange based chemically-modified electrodes". *Bulletin of Electrochemistry.* **11**(8): 402, 1995.

159. CAI, X.; KALCHER, K.; DIEWALD, W.; NEUHOLD, C. & MAGEE, R. J. "Voltammetric determination of trace amounts of mercury with a carbon paste electrode modified with an anion-exchanger". *Fresenius J. Anal. Chem.* **345**(1): 25, 1993.
160. BRETT, A.M.O.B. & CHRISTOPHER M. A., *Electroquímica - Princípios, Métodos e Aplicações*. 1993, New York: Oxford University Press.
161. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. & CROUCH, S.R. *Fundamentos de Química Analítica* 8ed. 2006, São Paulo: Thonson.
162. KISSINGER, P.T. & HEINEMAN, W.R. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. 2 ed. 1996, New York: Marcel Dekker.
163. SCHOLZ, F. *Electroanalytical Methods - Guide to Experiments and Applications*. 2 ed. Institute of Chemistry and Biochemistry of Universitat Greifswald. 2002, New York: Springer.
164. WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 2 ed. 2000, new York: A. John Wiley & Sons Publication.
165. EVANS, D.H.; O'CONNELL, K.M.; PETERSEN, R.A. & KELLY, M.J. "Cyclic voltammetry". *J. Chem. Educ.* **60**(4): 290, 1983.
166. NICHOLSON, R.S. "Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics". *Anal. Chem.* **37** (11): 1351, 1965.
167. MABBOIL, G.A. "An Introduction to Cyclic Voltammetry". *J. Chem. Educ.* **60** (9): 697, 1983.
168. DICK, J.G., *Analytical Chemistry*. International Student Edition ed, ed. LTD, M.-H.K. Vol. Único. 1973. 542.
169. CHRISTIE, J.H.; TURNER, J.A. & OSTERYOUNG, R.A. "Square wave voltammetry at dropping mercury electrode - Theory". *Anal. Chem.* **49**(13): 1899, 1977.
170. TURNER, J.A.; CHRISTIE, J.H.; VUKOVIC, M. & OSTERYOUNG, R.A. "Square wave voltammetry at dropping mercury electrode - Experimental". *Anal. Chem.* **49**(13): 1904, 1977.
171. KRAUSE, M.S. & RAMALEY, L. "Analytical application of square wave voltammetry". *Anal. Chem.* **41**(11): 1365, 1969.
172. RAMALEY, L. & KRAUSE, M. S. "Theory of square wave voltammetry". *Anal. Chem.* **41**(11): 1362, 1969.
173. OSTERYOUNG, J.G. & OSTERYOUNG, R.A. "Square wave voltammetry". *Anal. Chem.* **57**(1): 101A, 1985.
174. OSTERYOUNG, J.G. "Voltammetry for the Future". *Acc. Chem. Res.* **26**: 77, 1993.
175. DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A.R.; TOLEDO, R.A.; PEDROSA, V.A.; OLIVEIRA, R.T.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. & MACHADO, S.A.S. "Square wave voltammetry. Second part: Applications". *Química Nova.* **27**(5): 790, 2004.
176. LOVRIC, M. & KOMORSKYLOVRIC, S. "Square wave voltammetry of an adsorbed reactant". *J. Electroanal. Chem.* **248**(2): 239, 1988.
177. LOVRIC, M. & BRANICA, M. "square-wave voltammetric peak current enhancements by adsorption and reversibility of the redox reaction". *J. Electroanal. Chem.* **226**(1-2): 239, 1987.
178. ODEA, J.J.; OSTERYOUNG, J. & OSTERYOUNG, R. A. "Theory of square wave voltammetry for kinetic systems". *Anal. Chem.* **53**(4): 695, 1981.
179. JORGE-JUNIOR, A.M. & BOTTA-FILHO, W. J. *Microscopia eletrônica de varredura e sua utilização na resolução de problemas industriais* 2003, ABM/UFSCar: São Carlos.
180. HANS-JURGEN, K. & BOTTA-FILHO, W. J. *Microscopia eletrônica de varredura, transmissão e varredura*, 1989, São Paulo:ABM.
181. ATKINS, P.W. *Physical Chemistry*, 1990: New York: Oxford University Press

182. SOMASUNDRUM, M.; KIRTIKARA, K. & TANTICHAROEN, M. "Amperometric determination of hydrogen peroxide by direct and catalytic reduction at a copper electrode". *Anal. Chim. Acta.* **319**(1-2): 59, 1996.
183. DOMENECH, A.; GARCIA-ESPANA, E.; LUIS, S.V.; MARCELINO, V. & MIRAVET, J.F. "Electrochemistry of copper complexes with polyaza[n]paracyclophanes. Influence of ATP as an exogen ligand on the relative stability of the Cu(II) and Cu(I) oxidation states". *Inorg. Chim. Acta.* **299**(2): 238, 2000.
184. VAZQUEZA, M.V.; SANCHEZA, S.R.; CALVOB, E.J. & SCHIFFRINC, D.J. "The electrochemical reduction of oxygen on polycrystalline copper in borax buffer ". *J. Electroanal. Chem.* **374**(1-2): 189, 1994.
185. MOCHIZUKI, M.; YAMAZAKI, S.; KANO, K. & IKEDA, T. "Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins". *Biochim. Biophys. Acta.* **1569**(1-3): 35, 2002.
186. NETO, B.D.B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E., *Como Fazer Experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.* 2 ed. 2003, Campinas: Editora da Unicamp.
187. MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S. & LOVRIC, M., *Square-Wave Voltammetry - Theory and Application.* 2007, Macedonia: ed. Springer.
188. FRANZOI, A.C.; SPINELLI, A. & VIEIRA, L.C. "Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poly(vinylpyrrolidone)". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**(4-5): 973, 2008.
189. ZIELINSKA, D.; NAGELS, L. & PISKULA, M.K. "Determination of quercetin and its glucosides in onion by electrochemical methods". *Anal. Chim. Acta.* **617**(1-2): 22, 2008.
190. NI, Y.; WANG, L. & KOKOT, S. "Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and tert-butylhydroquinone by use of chemometric approaches". *Anal. Chim. Acta.* **412**: 185, 2000.
191. WANG, P.; JING, X.; ZHANG, W. & ZHU, G. "Renewable monogamous hexacyanoferrate-modified graphite organosilicate composite electrode and its electrocatalytic oxidation of L-cysteine". *J. Solid State Electrochem.* **5**: 369-374., 2001.
192. CUI, X.P.; HONG, L. & LIN, X.Q. "Electrochemical preparation, characterization and application of electrodes modified with hybrid hexacyanoferrates of copper and cobalt". *J. Electroanal. Chem.* **526**(1-2): 115, 2002.
193. AFANAS'EVA, I.B.; OSTRAKHOVITCH, E. A.; MIKHAL'CHIK, E. V.; IBRAGIMOVAB, G. A. & KORKINA, L. G. "Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. " *Biochem. Pharmacol.* **61**: 677, 2001.
194. MEL'NIKOVA, N.B.; IOFFE, I.D. & TSAREVA, L.A. "Reaction of bioflavonoids with copper(II) acetate in aqueous solution". *Chem. Nat. Compd.* **38**(1): 33, 2002.
195. ENSAFI, A.A. & HAJIAN, R. "Determination of rutin in pharmaceutical compounds and tea using cathodic adsorptive stripping voltammetry". *Electroanalysis.* **18**(6): 579, 2006.
196. BAI, Y.; SONG, F.; CHEN, M.; XING, J.; LIU, Z. & LIU, S. "Characterization of the rutin-metal complex by electrospray ionization tandemmass spectrometry ". *Anal. Sci.* **20**: 1147, 2004.
197. BROWN, J.E.; KHODR, H.; HIDER, R. C. & RICE-EVANS, C. A. "Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties: part 3". *Biochem. J.* **330**: 1173, 1998.
198. BRIANTE, R.; FEBBRAIO, F. & NUCCI, R. "Antioxidant/prooxidant effects of dietary non-flavonoid phenols on the Cu<sup>2+</sup>-induced oxidation of human low-density lipoprotein (LDL) ". *Chem & Biodiversity.* **1**: 1716, 2004.