

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
ELETROANALÍTICOS EMPREGANDO O ELETRODO DE
DIAMANTE DOPADO COM BORO PARA A
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE EDULCORANTES E
CORANTES EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS**

Patrícia Batista Deroco*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

* bolsista FAPESP

**São Carlos - SP
2014**

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

D437dm Deroco, Patrícia Batista.
Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando o eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação simultânea de edulcorantes e corantes em produtos alimentícios / Patrícia Batista Deroco. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
111 f.

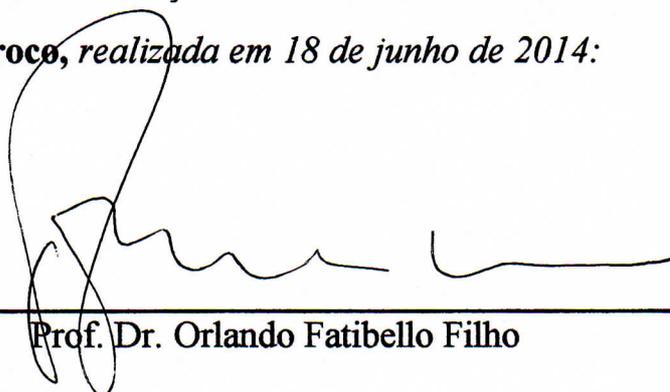
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Métodos eletroanalíticos. 2. Determinação simultânea. 3. Corantes. 4. Edulcorantes. 5. Amperometria. 6. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). I. Título.

CDD: 543.0871 (20^a)

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

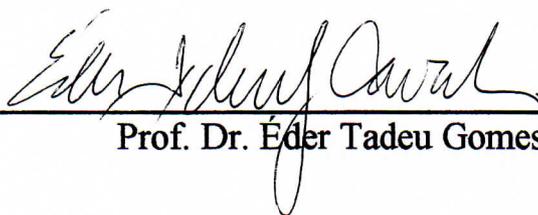
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata **Patrícia Batista Deroco**, realizada em 18 de junho de 2014:*



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter



Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro

Dedico este trabalho,

À minha família, que são exemplos de caráter e dignidade,
meus pais Terezinha e João, minha irmã Priscila,
meus avôs Helena e Antônio e a minha tia Fátima,
que sempre estiveram ao meu lado me apoiando,
incentivando e nunca mediram esforços para me ajudar
e principalmente por terem acreditado em mim.

Amo vocês!!!

“Ciência é estudo. É silêncio, é mais dúvida do que resposta, é a noção de que servir é mais importante do que a de servir-se e claro a compreensão de que o que te faz um cientista é saber que há para se descobrir muito mais do que possa saber. E saber que esta noção não é humildade, é bom senso.”

Paulo Muzy

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde e coragem durante toda esta longa caminhada;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho pela confiança e oportunidade de realizar o mestrado no LABBES, pela orientação, ensinamentos, paciência e incentivo, além da amizade;

Ao Prof. Dr. Romeu Rocha Filho pelas colaborações e discussão dos resultados deste trabalho e todos os ensinamentos transmitidos;

À Dra. Roberta Antigo Medeiros pela grande ajuda na discussão e sugestões que foram essenciais para aprimorarem este trabalho, e também pela paciência e amizade;

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, pela disponibilização do HPLC;

Aos amigos do LABBES/GQA: Roberta, Bruna, Avaré, Cyber, Tiago Almeida, Fred, Jorge, Anderson, Geiser, Marcão, Loriz e Marina pelo apoio, amizade, transmissão de conhecimentos e pelos momentos de descontração;

Aos meus amigos de Votuporanga, em especial: Ayla, Bruno, Carol Bissi, Carol Serantoni, Felipe, Ismael, Karina e Joice pela amizade incondicional e por fazerem minha vida mais divertida sempre me apoiando e me dando forças;

A todos os meus familiares e amigos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao Thiago Guerreiro pela confecção da figura do sistema FIA.

Ao departamento de Química da UFSCar e ao programa de Pós-Graduação pela oportunidade;

A todos os funcionários do DQ, especialmente as secretárias Cristina, Luciani e Ariane pela atenção e colaboração;

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e principalmente FAPESP pela bolsa concedida (processo 2012/08180-5).

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔE – Incremento de varredura

μ – micro (10^{-6})

A – *Ampère*

a – Amplitude de pulso de potencial

AC – Amarelo crepúsculo

AI – Azul indigotina

AK – Acesulfame-K

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS – Aspartame

BDD – Diamante dopado com boro (*Boron-doped diamond*)

BDD PTA – Diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente

BDD PTC – Diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente

cm – centímetro

CMC – Carboximetilcelulose

CV – Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)

CVD – Deposição química a vapor (*Chemical Vapor Deposition*)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (*Differential pulse voltammetry*)

E – Potencial

$E_{det.}$ – Potencial de determinação

E_p – Potencial de pico

f – Frequência de aplicação de pulsos de potencial

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FIA – Análise por injeção em fluxo (*Flow injection analysis*)

FIA-MPA – Análise por injeção em fluxo com detecção por amperometria de múltiplos pulsos

GC – Carbono vítreo (*Glassy carbon*)
HPHT – Altas pressões e altas temperaturas (*High Pression High Temperature*)
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)
I – Corrente
I_p – Corrente de pico
IDA – Ingestão diária aceitável
JECFA – *Joint Expert Committee on Food Additives*
L – Litro
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
m – mili (10^{-3})
MERCOSUL – Mercado comum do Sul
mol – quantidade de matéria
MPA – Amperometria de múltiplos pulsos (*Multiple pulse amperometry*)
n – nano (10^{-9})
pH – Potencial hidrogeniônico
pH_{cond.} – pH condicional
PLS – *Partial Least Squares*
PTA – Pré-tratamento anódico
PTC – Pré-tratamento catódico
RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)
r – coeficiente de correlação
S/N – Razão sinal-ruído (*signal-to-noise*)
SWV – Voltametria de onda quadrada (*Square wave voltammetry*)
t – Tempo de modulação
v – Velocidade de varredura
V – Volt
V40 – Vermelho 40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Edulcorantes artificiais mais utilizados no Brasil e limites permitidos.....	6
TABELA 1.2 – Corantes artificiais permitidos para uso em alimentos no Brasil	11
TABELA 3.1 – Programa de gradiente de eluição para determinação dos corantes AI e V40.....	37
TABELA 4.1 – Valores obtidos para as áreas eletroativas do eletrodo de BDD empregando-se a equação de Randles-Sevcik	42
TABELA 4.2 – Valores do fator de correção em função de cada concentração de AC e a média entre os valores.....	62
TABELA 4.3 – Resultados obtidos no estudo da repetibilidade intra e entre dias para o par de aditivos alimentares determinados simultaneamente por FIA-MPA	66
TABELA 4.4 – Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes	67
TABELA 4.5 – Resultados obtidos na determinação simultânea de AS e AC em produtos alimentícios empregando-se FIA-MPA e o método cromatográfico...	70
TABELA 4.6 – Valores do fator de correção em função de cada concentração de AI e a média entre os valores	77
TABELA 4.7 – Resultados obtidos no estudo da repetibilidade intra e entre dias para o par de corantes alimentícios determinados simultaneamente por FIA-MPA	80
TABELA 4.8 – Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes	82
TABELA 4.9 – Resultados obtidos na determinação simultânea de AI e V40 em balas empregando-se FIA-MPA e o método cromatográfico	84
TABELA 4.10 – Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de AS e AK	87

TABELA 4.11 – Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de AS e AK	87
TABELA 4.12 – Condições analíticas obtidas para a determinação de AS e AK pelas técnicas DPV e SWV	88
TABELA 4.13 – Desvios padrão obtidos no estudo da repetibilidade intra e entre dias.....	92
TABELA 4.14 – Resultados obtidos na determinação simultânea de AS e AK em produtos alimentícios empregando-se HPLC e DPV	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Estrutura química dos edulcorantes aspartame e acesulfame-K..	7
FIGURA 1.2 – Reação para a eletrooxidação do edulcorante AS.....	10
FIGURA 1.3 – Estruturas químicas dos corantes amarelo crepúsculo (AC), vermelho 40 (V40) e azul indigotina (AI).	12
FIGURA 1.4 – Reação para a eletrooxidação do corante V40.....	16
FIGURA 1.5 – Reação para a eletrooxidação do corante AC.	17
FIGURA 1.6 – Reação para a eletrooxidação para o corante AI.....	18
FIGURA 1.7 – Representação da superfície do eletrodo de BDD com diferentes terminações superficiais provocadas pelos pré-tratamentos eletroquímicos catódico e anódico.....	20
FIGURA 3.1 – Fotografia dos eletrodos de BDD utilizados, em (a) eletrodo com área geométrica de $0,25\text{ cm}^2$ montado sobre uma placa de cobre de circuito eletrônico, (b) eletrodo de BDD para medidas em fluxo, (c) adaptador (tarugo) com <i>O-ring</i> de vedação para encaixe do BDD, delimitando a área em $0,33\text{ cm}^2$	30
FIGURA 3.2 – Ilustração da célula eletroquímica para o sistema FIA com detecção amperométrica. Em (a) suporte em acrílico com contato elétrico para acomodação do eletrodo de trabalho, (b) eletrodo de BDD, (c) suporte em acrílico com <i>O-ring</i> para vedação, (d) entrada de solução padrão ou amostra, (e) eletrodo de referência (Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0\text{ mol L}^{-1}$)) miniaturizado e (f) saída das soluções e eletrodo auxiliar em aço inoxidável.	31
FIGURA 3.3 – Diagrama esquemático do sistema FIA utilizado. As representações são: (I) injetor comutador; (A) solução da amostra; (Ca) solução transportadora ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{ } 0,30\text{ mol L}^{-1}$); (Bp) bomba peristáltica; (Det) célula eletroquímica e (Des) descarte.	32
FIGURA 3.4 – Ilustração da montagem do sistema em fluxo. Em (a) bomba peristáltica, (b) injetor comutador manual e (c) detector eletroquímico.	32

- FIGURA 4.1 – Voltamogramas cíclicos empregando-se o eletrodo de BDD PTC, (A) na ausência (—) e na presença (—) de 1,0 mmol L⁻¹ de AS; (B) na ausência (—) e na presença (—) de 3,0 mmol L⁻¹ de AK; (C) na ausência (—) e na presença (—) de 0,40 mmol L⁻¹ de AC; (D) na ausência (—) e na presença (—) de 0,10 mmol L⁻¹ de AI; (E) na ausência (—) e na presença (—) 0,10 mmol L⁻¹ de V40. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 39
- FIGURA 4.2 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial (10; 30; 50; 70; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300; 325; 350; 375; 400; 425; 450; 475 e 500 mV s⁻¹) em solução de hexacianoferrato (III) de potássio 0,10 mol L⁻¹; (A) para o BDD PTA e (B) para o BDD PTC. Os gráficos inseridos correspondem à relação linear da corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. Eletrólito suporte: KCl 0,10 mol L⁻¹. 41
- FIGURA 4.3 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD com diferentes pré-tratamentos em solução de (A) AS 1,0 mmol L⁻¹ e (B) AK 4,0 mmol L⁻¹ após PTA (—) e após PTC (—). Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; ($f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$). 44
- FIGURA 4.4 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD com diferentes pré-tratamentos em solução de (A) AC 0,40 mmol L⁻¹, (B) AI 0,10 mmol L⁻¹ e (C) V40 0,10 mmol L⁻¹ após PTA (—) e após PTC (—). Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; ($f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$). 45
- FIGURA 4.5 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA para edulcorantes e BDD PTC para os corantes com a aplicação de diferentes densidades de corrente (0,05; 0,10; 0,50 e 1,00 A cm⁻²): (A) em solução de AS 1,0 mmol L⁻¹; (B) em solução de AK 4,0 mmol L⁻¹; (C) em solução de AC 0,40 mmol L⁻¹; (D) em solução de AI 0,10 mmol L⁻¹ e (E) em solução de V40 0,10 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; ($f = 30 \text{ Hz}$, $\alpha = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$). 47

- FIGURA 4.6 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em diferentes tempos (30, 60 e 120 s): (A) em solução de AS 1,0 mmol L⁻¹ e (B) em solução de AK 4,0 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; ($f = 30$ Hz, $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV)..... 48
- FIGURA 4.7 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTC em diferentes tempos (120, 180, 240 e 300 s): (A) em solução de AC 0,40 mmol L⁻¹; (B) em solução de AI 0,10 mmol L⁻¹ e (C) em solução de V40 0,10 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; ($f = 30$ Hz, $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV)..... 50
- FIGURA 4.8 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes soluções de eletrólitos suporte contendo (A) AS 1,0 mmol L⁻¹; (B) AK 4,0 mmol L⁻¹; (C) AC 0,40 mmol L⁻¹; (D) AI 0,10 mmol L⁻¹ e (E) V40 0,10 mmol L⁻¹. Eletrólitos suportes: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹, tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 1,9), tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 2,0) e KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ (pH_{cond.} 1,5); ($f = 30$ Hz, $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV)..... 51
- FIGURA 4.9 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD: (A) AS 1,0 mmol L⁻¹; (B) AK 4,0 mmol L⁻¹; (C) AC 0,40 mmol L⁻¹; (D) AI 0,10 mmol L⁻¹ e (E) V40 0,10 mmol L⁻¹ em diferentes concentrações do eletrólito suporte H₂SO₄ 0,010; 0,05; 0,10; 0,30 e 0,50 mol L⁻¹; ($f = 30$ Hz, $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV). 53
- FIGURA 4.10 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD após PTA (—) e após PTC (—) na presença de AS 1,0 mmol L⁻¹ e AC 0,40 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; ($f = 30$ Hz, $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV). 55
- FIGURA 4.11 – Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos utilizando o eletrodo de BDD PTA, para (A) AC 0,10 mmol L⁻¹ e para (B) AS 0,10 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,30 mol L⁻¹; volume de injeção = 350 μL e vazão = 2,4 mL min⁻¹..... 56

- FIGURA 4.12 – Intensidade dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial: 100 a 250 ms, (A) AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ pulso de potencial 1,3 V e (B) AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ pulso de potencial: 1,7 V. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume de injeção = $450 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ 57
- FIGURA 4.13 – Intensidade dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$), vazões: $1,0$ a $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ em soluções de: (A) AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; volume de amostra $400 \text{ }\mu\text{L}$). 59
- FIGURA 4.14 – Magnitude do sinal analítico (corrente) em função do volume da alça de amostragem variando de 50 a $500 \text{ }\mu\text{L}$ para uma solução de: (A) AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; vazão $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ 59
- Figura 4.15 – (A) Sequência de aplicação de pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos ($n = 3$) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em solução de AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e AC + AS nas mesmas concentrações. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $450 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ 61
- FIGURA 4.16 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em diferentes concentrações de uma mistura de AC (—) e AS (—). Concentrações de AS e AC ($n = 3$): (a-j) $0,15$; $0,25$; $0,50$; $0,75$; $1,00$; $2,50$; $5,00$; $7,50$; $10,00$ e $25,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Os sinais obtidos em X, Y e Z correspondem a algumas amostras analisadas. Curva analítica em (B) para AC e (C) para o AS. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $450 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ 64
- FIGURA 4.17 – Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em solução de AC e AS em duas concentrações: $0,50$ e $10 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 10$). Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $450 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ 66

- FIGURA 4.18 – (A) Cromatogramas obtidos para AS $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ (—) e para AC $0,030 \text{ mmol L}^{-1}$ (---). Curvas analíticas obtidas (B) para AC nas concentrações de: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10; 30; 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (C) para AS: 25,0; 50,0; 75,0; 100; 300; 500; 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fase móvel: 40 % de metanol/acetonitrila (70/30 v/v) e 60 % tampão fosfato pH 4,0. Vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ 69
- FIGURA 4.19 – Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos utilizando o eletrodo de BDD PTC, para o (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para o (B) V40 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume de injeção = $450 \mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ 72
- FIGURA 4.20 – Intensidade dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial: 100 a 250 ms, (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pulso de potencial: $0,75 \text{ V}$ e (B) V40 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pulso de potencial: $1,1 \text{ V}$. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume de injeção = $450 \mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ 73
- FIGURA 4.21 – Intensidade dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$), vazões: $1,0$ a $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ em soluções de: (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) V40 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ 74
- FIGURA 4.22 – Intensidade dos sinais de corrente em função do volume da alça de amostragem: 50 a $500 \mu\text{L}$, (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) AS $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ 75
- FIGURA 4.23 – (A) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTC em solução de AI $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, V40 $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AI + V40 nas mesmas concentrações. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $350 \mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ 76
- FIGURA 4.24 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTC em diferentes concentrações de uma mistura de AI (—) e V40 (---). Concentrações de AI: (a-h) $0,070$; $0,10$; $0,30$; $0,50$; $0,60$; $0,70$; $0,90$ e

1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e V40: (a-h) 0,040; 0,10; 0,25; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70 e 0,77 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os sinais obtidos em X, Y e Z correspondem a algumas amostras analisadas. Curvas analíticas obtidas em (B) para AI e (C) para V40. Solução transportadora: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} , volume de injeção = 350 μL e vazão = 4,9 mL min^{-1} 78

FIGURA 4.25 – Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de AI e V40 em duas concentrações diferentes: AI 0,10 e 0,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$; V40 0,070 e 0,70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 10$). Solução transportadora: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} , volume de injeção = 350 μL e vazão = 4,9 mL min^{-1} 80

FIGURA 4.26 – Cromatogramas obtidos para (A): AI 0,10 mmol L^{-1} e (B): V40 0,10 mmol L^{-1} . Os gráficos inseridos são as respectivas curvas analíticas obtidas (A) para AI nas concentrações de: 10,0; 30,0; 60,0; 90,0; 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) para V40 nas mesmas concentrações de: 10,0; 30,0; 60,0; 90,0; 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fase móvel: metanol/acetoneitrila (80/20 v/v) e tampão acetato de amônio pH 7,5 (gradiente de eluição, TABELA 3.1). Vazão 1,5 mL min^{-1} 83

FIGURA 4.27 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo de BDD, (A) para o AS 1,0 mmol L^{-1} e (B) para AK 3,0 mmol L^{-1} em diferentes velocidades de varredura (1-13): 10; 30; 50; 70; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500 mV s^{-1} . Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} 86

FIGURA 4.28 – Dependência de $\log I$ por $\log v$: (A) para AS e (B) para AK. Os gráficos inseridos correspondem à dependência da corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura..... 86

FIGURA 4.29 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em soluções de: (A) AS: (1-8) 4,40 a 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AK 1,0 mmol L^{-1} ; (C) AK: (1-8) 0,30 a 7,6 mmol L^{-1} e AS 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Curvas analíticas para (B) AS e (D) AK. Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} ; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $t = 5 \text{ mV}$ 90

FIGURA 4.30 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em solução contendo diferentes concentrações de AS: (1) 4,4; (2) 7,5; (2) 10,0; (4) 28,0; (5) 53,0; (6) 77,0; (7) 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AK: (1) 0,39; (2) 0,74; (3) 1,2; (4) 2,6; (5) 3,9; (6) 5,1; (7) 7,6 mmol L^{-1} para o AK. (B) Curva analítica obtida para o AS e (C) curva analítica obtida para o AK. Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} ; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, $\alpha = 100 \text{ mV}$ e $t = 5 \text{ mV}$ 91

FIGURA 4.31 – Cromatogramas obtidos para (A): AS 0,80 mmol L^{-1} e (B): AK 0,40 mmol L^{-1} . Os gráficos inseridos são as respectivas curvas analíticas obtidas (A) para AS nas concentrações de: 50,0; 80,0; 100; 400; 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) para AK: 30,0; 50,0; 80,0; 100; 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fase móvel: acetonitrila/tampão fosfato pH 3,5, (15/85 v/v). Vazão: 1,0 mL min^{-1} 94

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICOS EMPREGANDO O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE EDULCORANTES E CORANTES EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS. Neste trabalho, desenvolveu-se métodos eletroanalíticos para a determinação simultânea dos pares: amarelo crepúsculo (AC) e aspartame (AS), azul indigotina (AI) e vermelho 40 (V40)), bem como aspartame (AS) e acesulfame-K (AK) em produtos alimentícios utilizando-se o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD). O par AS e AC foi determinado, sem a necessidade de separação prévia em H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ com o eletrodo de BDD pré-tratado anodicamente e utilizando amperometria de múltiplos pulsos (MPA) em análise por injeção em fluxo. Uma sequência de aplicação dos pulsos em função do tempo, previamente otimizada, foi de $E_{\text{det.1}} = +1,30 \text{ V} / 150 \text{ ms}$ (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas de AC) e $E_{\text{det.2}} = +1,70 \text{ V} / 200 \text{ ms}$ (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de AS e AC). As curvas analíticas obtidas apresentaram linearidades de 0,25 a $25,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção (LD) de $0,04 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos os analitos. Na sequência determinou-se AI e V40 em H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ com o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente empregando FIA-MPA. A sequência de aplicação dos pulsos em função do tempo foi: $E_{\text{det.1}} = +0,75 \text{ V} / 200 \text{ ms}$ (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas do AI) e $E_{\text{det.2}} = +1,10 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ (pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os analitos (AI e V40)). As curvas analíticas obtidas apresentaram linearidades de 0,070 a $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para o AI e de 0,040 a $0,77 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para o V40 e os LDs obtidos para AI e V40 foram 40 e $7,0 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente. As frequências analíticas para cada método foram de 120 e 153 determinações por hora para o par AS e AC e para o par AI e V40, respectivamente. Outro procedimento desenvolvido foi para a determinação dos edulcorantes AS e AK

com o eletrodo de BDD pré-tratado anodicamente e a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) em H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$. As curvas analíticas foram lineares nos intervalos de concentração de $4,4$ a $110 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para o AS e de $0,39$ a $7,6 \text{ mmol L}^{-1}$ para o AK e os LDs obtidos para AS e AK foram $1,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. Finalmente, todos estes métodos desenvolvidos foram empregados na análise de amostras alimentícias comerciais contendo os pares dos analitos (AS e AC ou AI e V40 ou AS e AK). Os resultados obtidos empregando-se os métodos propostos foram concordantes com os resultados obtidos empregando-se métodos comparativos (HPLC) em um nível de confiança de 95%.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROANALYTICAL METHODS EMPLOYING A BORON-DOPED DIAMOND ELECTRODE FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SWEETENERS AND COLORANTS IN FOOD SAMPLES. In this work, three electroanalytical procedures were developed for simultaneous determination of sweeteners (aspartame (AS) and acesulfame-K (AK)) and colorants (sunset yellow (SY), indigo carmine (IC) and allura red (AR)) in food samples using a boron-doped diamond electrode (BDD). AS and SY pair was determined with no need of previous separation in a $0.30 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution with BDD electrode anodically pretreated and using multiple pulses amperometry (MPA) with flow injection analysis system (FIA). The sequence of double-potential waveform with time dependence, previously optimized, was $E_{\text{det.1}} = +1.30 \text{ V} / 150 \text{ ms}$ (pulse potential at which occurs only SY oxidation) and $E_{\text{det.2}} = +1.70 \text{ V} / 200 \text{ ms}$ (pulse potential at which the oxidation of both analytes, AS and SY, occurs). The analytical curves showed linearity from 0.25 a $25.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, with detection limit (LD) of $0.04 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for both analytes. Subsequently, the analytical determination of IC and AR was carried out in a $0.30 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution with BDD electrode cathodically pretreated using FIA-MPA. The dual-potential waveform was the following: $E_{\text{det.1}} = +0.75 \text{ V} / 200 \text{ ms}$ (pulse potential at which occurs only IC oxidation) and $E_{\text{det.2}} = +1.10 \text{ V} / 50 \text{ ms}$ (pulse potential at which the oxidation of both analytes, IC and AR, occurs). The analytical curves were linear from 0.070 to $1.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for IC and 0.040 to $0.77 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for AR, with LDs of 40 nmol L^{-1} and 7.0 nmol L^{-1} , respectively. The analytical frequencies for each method were 120 and 153 determinations per hour for AS and SY pair and for IC and AR pair, respectively. Another procedure was developed for determination of AS and AK sweeteners using a BDD electrode anodically pretreated and differential pulse voltammetry in a 0.30 mol L^{-1}

H₂SO₄ solution. The analytical curves presented linearity from 4.4 to 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for AS and from 0.39 to 7.6 mmol L^{-1} for AK and LDs obtained for AS and AK were 1.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0.28 mmol L^{-1} , respectively. Finally, all these proposed methods were successfully applied in analysis of food samples containing the pairs of (AS and SY or IC and AR or AS and AK). The obtained results were satisfactory and similar to those obtained using comparative HPLC methods at a confidence level of 95%.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Edulcorantes artificiais.....	4
1.1.1 – Aspartame e acesulfame-K	6
1.1.2 – Métodos analíticos para determinação de aspartame e acesulfame-K.....	8
1.1.3 – Reação de oxidação do aspartame e acesulfame-K	9
1.2 – Corantes.....	10
1.2.1 – Amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul indigotina	11
1.2.2 – Métodos analíticos para determinação dos corantes AC, V40 e AI	13
1.2.3 – Reação de eletrooxidação dos corantes AC, V40 e AI.....	15
1.3 – Eletrodo de diamante dopado com boro	18
1.3.1 – Pré-tratamento do eletrodo de BDD.....	20
1.4 – Técnicas analíticas	22
1.4.1 – Voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial.....	22
1.4.2 – Sistemas de análises por injeção em fluxo e amperometria de múltiplos pulsos.....	23
2 – OBJETIVOS	26
3 – EXPERIMENTAL	27
3.1 – Reagentes e soluções.....	27
3.2 – Preparação das amostras	27
3.3 – Instrumentação	28
3.3.1 – Eletrodos.....	29
3.3.2 – Célula eletroquímica convencional.....	30
3.3.3 – Célula eletroquímica com configuração <i>wall jet/camada delgada</i>	30
3.3.4 – Sistema de análises por injeção em fluxo	31
3.4 – Procedimentos Experimentais.....	32
3.4.1 – Pré-tratamentos eletroquímicos do eletrodo de BDD	32

3.4.2 – Estudo da otimização dos parâmetros do sistema de análises por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulso para a determinação simultânea de AS e AC e de AI e V40.....	33
3.4.3 – Medidas voltamétricas e otimização de parâmetros para o desenvolvimento do procedimento analítico para a determinação dos edulcorantes AS e AK.....	34
3.4.4 – Estudo de interferentes em potencial	35
3.4.5 – Métodos comparativos	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 – Estudo do comportamento eletroquímico dos edulcorantes e dos corantes sobre o eletrodo de BDD.....	38
4.2 – Estudo do efeito dos pré-tratamentos eletroquímicos sobre o eletrodo de BDD.....	40
4.2.1 – Determinação da área eletroativa do eletrodo de BDD com os diferentes pré-tratamentos.....	40
4.2.2 – Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o eletrodo de BDD para os edulcorantes e corantes.....	42
4.2.3 – Estudo do efeito da densidade de corrente aplicada no pré-tratamento..	45
4.2.4 – Estudo do tempo da densidade de corrente aplicada no pré-tratamento.	48
4.3 – Procedimentos Eletroanalíticos.....	50
4.3.1 – Estudo do efeito do eletrólito suporte	50
4.3.2 – Determinação simultânea de AS e AC empregando a MPA-FIA e o eletrodo de BDD PTA	54
4.3.2.1 – Estudo dos potenciais a serem aplicados para AC e AS	55
4.3.2.2 – Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potencial	56
4.3.2.3 – Otimização dos parâmetros do sistema FIA	58
4.3.2.4 – Estudo do comportamento amperométrico do AC e AS sobre o eletrodo de BDD com aplicação de uma sequência de pulsos de potencial	60
4.3.2.5 – Estudo de interferentes em potencial	66

4.3.2.6 – Método comparativo – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	68
4.3.2.7 – Aplicação do procedimento proposto empregando MPA-FIA na determinação simultânea de AS e AC em amostras comerciais.....	70
4.3.3 – Determinação simultânea de AI e V40 empregando-se MPA-FIA e o eletrodo de BDD PTC	71
4.3.3.1 – Estudo dos potenciais a serem aplicados para AI e V40	71
4.3.3.2 – Estudo do tempo de aplicação dos pulsos de potencial	72
4.3.3.3 – Otimização do sistema FIA.....	73
4.3.3.4 – Estudo do comportamento amperométrico do AI e V40 sobre o eletrodo BDD com aplicação de uma sequência de pulsos de potencial	75
4.3.3.5 – Estudo de interferentes em potencial	81
4.3.3.6 – Método comparativo – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	82
4.3.3.7 – Aplicação do procedimento proposto empregando-se MPA-FIA na determinação simultânea de AI e V40 em amostras comerciais.....	84
4.3.4 – Determinação simultânea de AS e AK empregando-se as técnicas voltamétricas de pulso (DPV e SWV) e o eletrodo de BDD PTA.....	85
4.3.4.1 – Estudo da velocidade de varredura de potencial.....	85
4.3.4.2 – Comparação entre as técnicas voltamétricas DPV e SWV	87
4.3.4.3 – Determinação simultânea de AS e AK utilizando DPV e o eletrodo de BDD PTA	88
4.3.4.4 – Estudo de possíveis interferentes	92
4.3.4.5 – Método comparativo – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	93
4.3.4.6 – Aplicação do procedimento proposto empregando-se DPV na determinação simultânea de AS e AK em amostras comerciais.....	95
5 – CONCLUSÃO	97
6 – REFERÊNCIAS	99

1 – INTRODUÇÃO

Com a dinâmica da vida moderna, a demanda por praticidade e rapidez na alimentação vem crescendo de forma bastante significativa. Assim, cada vez mais a população vem substituindo o consumo de alimentos “in natura” por alimentos processados. Estes fatos fizeram com que a indústria de alimentos se tornasse um importante setor da atividade econômica, com a inovação e fabricação de vários tipos de alimentos pré-processados ou processados. Durante o processo de fabricação destes alimentos, a indústria passou a adicionar intencionalmente diferentes compostos, classificados como aditivos alimentares, que são capazes de conferir características sensoriais, tais como aroma, textura, cor e sabor, e ainda agregar maior tempo de conservação aos alimentos, tornando-os assim mais atrativos para o consumidor^{1,2}.

A definição de aditivo alimentar atribuída pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), é que: aditivos alimentares são substâncias que são adicionadas intencionalmente aos alimentos sem o objetivo de nutrir, mas sim de conservar e conferir sabor, cor, aroma e textura³.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o órgão responsável pela legislação e fiscalização do uso destes aditivos alimentares pela indústria⁴. Os alimentos processados podem conter dois ou mais tipos de aditivos alimentares. Os aditivos permitidos estão na lista geral harmonizada de aditivos do MERCOSUL⁵ e são divididos em 23 classes funcionais, a saber: corantes, antioxidantes, edulcorantes, conservadores, realçadores de sabor, acidulantes, aromatizantes, estabilizantes de cor, gelificantes, reguladores de acidez, estabilizantes, glaceantes, agentes de massa, umectantes, anti-umectantes, agentes de firmeza, fermentos químicos, antiespumantes, emulsificantes, melhoradores de farinha, sequestrantes, espessantes e espumantes.

Antes de ser autorizado o uso de qualquer aditivo em alimentos, este necessita passar por extensiva avaliação toxicológica, em que devem ser considerados, entre outros aspectos, seus efeitos cumulativos e colaterais e as interações no organismo decorrente de seu uso. Além disso, este uso deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e na menor quantidade possível para alcançar o efeito desejado^{4,6}. Eles podem ser de origem natural ou artificial. Os aditivos naturais são extraídos diretamente de vegetais, enquanto os artificiais são aqueles produzidos sinteticamente em laboratórios. Os mais empregados nos alimentos industrializados são os artificiais por apresentarem um menor custo de produção, além de uma maior pureza⁷.

Duas classes de aditivos alimentares dentre as citadas anteriormente, a dos edulcorantes e a dos corantes foram alvo de estudo nesta dissertação.

Os edulcorantes estão entre as classes de aditivos alimentares mais utilizadas pelas indústrias de alimentos, uma vez que há um empenho no desenvolvimento e inovação de produtos do tipo light, diet ou zero. Estes produtos além de ser uma necessidade para pessoas que têm algum problema de saúde como diabéticos e obesos, também passaram a atender grupos de indivíduos que pensam no bem estar e em um novo estilo de vida, aumentando assim a procura por estes alimentos^{7,8}.

Outra classe amplamente empregada é a dos corantes, já que a cor e aparência tem um papel importantíssimo na aceitação do produto pelo consumidor. Seu uso vem sendo alvo de muitas críticas, uma vez que não são essenciais e sua aplicação justifica-se apenas por hábitos alimentares⁹. Muitos produtos como pudins, gelatinas, geleias, sorvetes, gomas de mascar, refrigerantes, preparados sólidos para refresco entre outros, podem apresentar em sua composição além dos edulcorantes, um ou mais corantes, a fim de produzir cores e tons diferentes.

O aumento no consumo de alimentos contendo edulcorantes e corantes tem gerado uma grande preocupação relacionada com a segurança na ingestão deste tipo de alimento, com isso tornou-se necessário o controle rigoroso de suas aplicações e estudos sobre os possíveis efeitos causados à saúde humana.

Diante disso, os edulcorantes e corantes artificiais têm sido alvo de pesquisas científicas, com o objetivo de investigar os possíveis danos à saúde do consumidor ou de desenvolver procedimentos analíticos confiáveis, eficientes e rápidos para monitorar as quantidades utilizadas pela indústria alimentícia, uma vez que há uma quantidade máxima para uso de cada aditivo estabelecida pela legislação⁴.

Na legislação há também um valor de ingestão diária para cada um destes aditivos, conhecido como Ingestão Diária Aceitável (IDA), que é a quantidade de um determinado composto que pode ser consumido diariamente, com segurança, durante toda a vida³. Portanto, a qualidade dos dados analíticos é um fator importante para o conhecimento dos teores reais existentes nos alimentos, objetivando-se principalmente, a garantia da qualidade do produto. Para isso, na literatura são relatados diferentes procedimentos analíticos para a detecção e quantificação dos edulcorantes e corantes, a fim de assegurar o limite de tolerância e para auxiliar a fiscalização de uso pelas indústrias alimentícias. A grande maioria destes procedimentos empregam técnicas nas quais podem ser necessário o tratamento prévio das amostras, um alto tempo de análise e um consumo excessivo de reagentes. Por isso é essencial o desenvolvimento de novos métodos analíticos simples, rápidos e precisos para a identificação e monitoramento da quantidade destes aditivos em produtos alimentícios.

Neste cenário, os métodos eletroanalíticos são uma interessante alternativa por serem precisos, exatos e sensíveis e ainda apresentam vantagens como: baixo custo operacional, emprego de reagentes de baixa toxicidade e menor tempo de análise^{10,11}.

Para o desenvolvimento de um procedimento eletroanalítico, a escolha do eletrodo de trabalho a ser utilizado é fundamental, devendo-se levar em consideração o comportamento redox do analito a ser analisado e as correntes residuais obtidas no intervalo de potencial avaliado. Além disso, é necessário que o eletrodo apresente uma boa estabilidade mecânica para possíveis aplicações em análises por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), bem como alta resistência a processos de passivação da superfície para evitar a necessidade de limpeza do eletrodo entre cada medida, comprometendo assim a frequência analítica^{12,13}.

Desta forma, o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD, do inglês, *Boron-Doped Diamond*) destaca-se como material eletródico para fins analíticos, apresentando ótimos resultados recentemente¹⁴⁻²⁸. Por possuir propriedades atraentes que atendem aos requisitos descritos anteriormente, surgiu o interesse da utilização deste eletrodo para o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de edulcorantes e corantes em produtos alimentícios.

1.1 – Edulcorantes artificiais

Recentemente, com a conscientização da população em cuidar da saúde e melhorar a qualidade de vida, as pessoas têm se exercitado mais e optado por alimentos mais saudáveis. A busca por alimentos de baixa caloria tem aumentado significativamente²⁹.

Uma das maneiras de reduzir as calorias de um produto é pela substituição parcial ou total da sacarose, que tem alto valor calórico, por edulcorantes não nutritivos, ou seja, de baixa caloria (por exemplo, uma colher de sopa de açúcar equivale a aproximadamente 12 g de sacarose e tem 48 kcal)³⁰.

Este tipo de produto (isento de sacarose) é recomendado também para pessoas que têm a necessidade de uma dieta restrita a ingestão deste tipo de

açúcar, como os diabéticos, pois a sacarose faz com que aumente a taxa de glicose no sangue, e para indivíduos obesos, devido à conversão de sacarose em lipídios⁷.

Os edulcorantes são substâncias que conferem sabor doce aos alimentos, e são utilizados para substituir parcialmente ou totalmente a sacarose. Essas substâncias devem possuir as mesmas propriedades sensoriais da sacarose, ou seja, não deixar sabor residual e ter alta doçura. Ademais, precisam ser de baixo teor calórico, solúveis, não tóxico, nem cancerígeno, e ter um preço acessível. Dificilmente um único edulcorante combina todas essas propriedades, o que implica na utilização de combinações de vários deles em um único produto alimentício^{4,31-33}.

Os edulcorantes artificiais mais utilizados no Brasil estão relacionados na TABELA 1.1 em termos de ingestão máxima recomendada para cada indivíduo e o teor máximo permitido de cada edulcorante para produtos alimentícios comerciais³⁴. Eles são empregados em muitos alimentos como refrigerantes, gelatinas, geleias, sorvetes, preparados sólidos para refresco, adoçantes de mesa, em medicamentos para mascarar características organolépticas dos fármacos e em produtos de higiene bucal para suavizar a incidência de cáries nos usuários. Estes produtos não contêm apenas um único edulcorante em sua formulação, geralmente são utilizadas misturas de dois ou mais, buscando uma combinação sinérgica de edulcorantes que podem reduzir o custo e melhorar o sabor e a estabilidade destes compostos nos produtos³⁵.

TABELA 1.1 – Edulcorantes artificiais mais utilizados no Brasil e limites permitidos

Edulcorantes artificiais	Ingestão máxima/dia* (mg/kg de peso corporal)	Limite máximo** (mg/100g ou mg/100mL)
Ciclâmato de sódio	11	40
Aspartame	40	75
Acesulfame-K	15	35
Sacarina	5	15
Sucralose	15	30

* IDA, quantidade que pode ser consumido diariamente, com segurança, durante toda a vida.

** Quantidade máxima permitida para uso de um aditivo no alimento, expresso em g/100 g ou g/100 mL de alimento pronto para o consumo.

1.1.1 – Aspartame e acesulfame-K

O aspartame (AS) e o acesulfame-K (AK) são edulcorantes artificiais que se apresentam como sólidos cristalinos brancos, inodoros e solúveis em água. São cerca de 200 vezes mais doces do que a sacarose. São comumente combinados nos mais diversos produtos, tais como alimentos, bebidas e formulações farmacêuticas. Esta combinação faz com que melhore o sabor do produto e aumente sua estabilidade^{29,36,37}, sendo, portanto, utilizada em produtos no mundo todo.

AS foi acidentalmente sintetizado por SCHLATTER em 1965 nos Estados Unidos da América, quando este pesquisador tentava desenvolver um sedativo para úlceras e, desde então, é um dos edulcorantes mais amplamente utilizados em todo mundo. Sua estrutura química está representada na FIGURA 1.1. Desde a sua aprovação pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para uso geral em alimentos e bebidas, o AS tem sido utilizado em mais de 6000 produtos disponíveis no mercado³⁸.

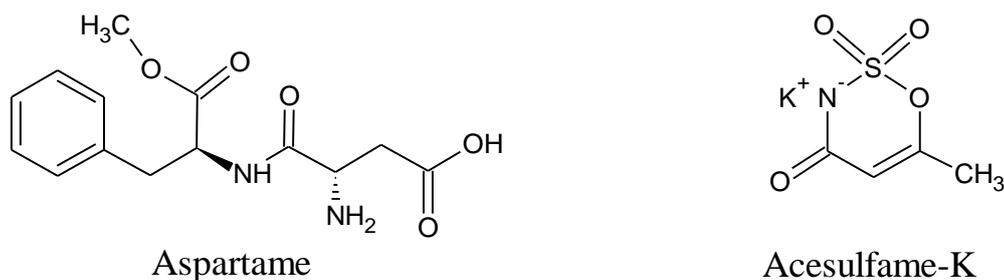


FIGURA 1.1 – Estrutura química dos edulcorantes aspartame e acesulfame-K.

Sua estabilidade é limitada em condições de umidade ou em soluções aquosas quando expostas a processos de aquecimento em altas temperaturas, e em certas condições de pH, podem levar a conversão de AS a produtos que não conferem o sabor doce aos alimentos. Assim, o AS é estável em solução aquosa em temperaturas entre 20-25°C e no intervalo de pH entre 3 a 5³⁹⁻⁴¹.

Quando ingerido, o AS é metabolizado no intestino pelas enzimas *esterase* e *dipeptidase*, produzindo três metabólitos: o ácido *L*-aspártico, *L*-fenilalanina e o metanol. As quantidades destes metabólitos são muito pequenas quando comparadas às obtidas pela dieta normal de um ser humano (consumo de carne, leite, suco de frutas e vegetais), por isso a quantidade de metanol existente no aspartame não é tóxica⁴². Essa metabolização envolve aproximadamente 4 kcal g⁻¹ de energia, porém, esta contribuição energética é negligenciável, uma vez que as quantidades de edulcorante adicionadas aos produtos alimentícios são muito pequenas devido ao seu intenso poder edulcorante. Por ter a fenilalanina como um de seus metabólitos, os produtos contendo AS não são recomendados para indivíduos portadores da doença fenilcetonúria^{43,44}. A fenilcetonúria é uma doença genética rara, na qual o indivíduo nasce sem habilidade de metabolizar o aminoácido fenilalanina que, em altas concentrações no sangue, pode causar hiperatividade, convulsões, cefaléia, depressão e até retardo mental progressivo e irreversível^{45,46}.

O AK (FIGURA 1.1) também foi descoberto acidentalmente pelos químicos alemães CLAUSS e JENSEN, em 1967. Ele não é metabolizado pelo organismo humano sendo excretado pelos rins na forma inalterada^{35,37}. Em geral tem sido muito utilizado para diminuir o sabor amargo do AS⁴⁷.

Este edulcorante tem excelente estabilidade térmica, resistindo a temperaturas de até 225 °C e variações de pH entre 3 e 7. O AK é normalmente combinado com AS ou sucralose para proporcionar um efeito sinérgico. Tais combinações além de fornecer um sabor mais parecido com o do açúcar, também faz com que a quantidade total de edulcorantes utilizada seja menor⁴⁸⁻⁵⁰.

O JECFA (do inglês, *Joint Expert Committee on Food Additives*) estabelece IDA para o AK e AS, de 15 e 40 mg kg⁻¹ de peso corpóreo, respectivamente⁵¹⁻⁵³.

Há evidência de problemas de saúde que podem ser provocados pelo consumo excessivo destes edulcorantes artificiais. Em alguns estudos com ratos e camundongos foi demonstrado o potencial carcinogênico e genotóxico destes edulcorantes, quando administrados em doses de 100 mg kg⁻¹ de AS e de 60 mg kg⁻¹ de AK^{47,54,55}.

Assim, a determinação de edulcorantes em alimentos é necessária para garantir o cumprimento dos requisitos legais, bem como os procedimentos de controle de qualidade na indústria de alimentos.

1.1.2 – Métodos analíticos para determinação de aspartame e acesulfame-K

Vários métodos analíticos para a determinação individual ou simultânea dos edulcorantes artificiais AS e AK têm sido desenvolvidos, tais como cromatográficos acoplados a diferentes detectores⁵⁶⁻⁶², eletroforéticos^{63,64} e espectrofotométricos⁶⁵⁻⁶⁸. No entanto, geralmente estes métodos fazem uso de instrumentos analíticos de maior custo e procedimentos prévios de preparo de

amostras mais laboriosos e demorados quando comparados aos métodos eletroanalíticos.

As técnicas eletroanalíticas são uma alternativa promissora para este tipo de determinação, porque podem proporcionar métodos sensíveis e precisos, bem como, prover simplicidade e rapidez nas análises. Na literatura alguns estudos foram encontrados utilizando as técnicas eletroanalíticas para a determinação de AS ou AK individualmente⁶⁹⁻⁷⁷. Além disso, há apenas um método eletroanalítico para a determinação simultânea de AS e AK⁷⁸.

PIERINI et al.⁷⁸ utilizaram a voltametria de varredura linear com um eletrodo de disco rotatório para a determinação simultânea de AS e AK em adoçantes de mesa. No entanto, a determinação simultânea só foi possível com o auxílio de ferramentas quimiométricas. Para resolver os sinais sobrepostos de AS e AK, empregou-se o método de calibração PLS (do inglês, *Partial Least Squares*) e as curvas analíticas obtidas variaram entre 340 a 680 mmol L⁻¹ para o AS e de 500 a 1000 mmol L⁻¹ para o AK, com a desvantagem de haver uma forte adsorção de AK sobre o eletrodo de trabalho (carbono vítreo).

1.1.3 – Reação de oxidação do aspartame e acesulfame-K

MEDEIROS et al.⁷⁹, estudaram o comportamento do AS sobre o eletrodo de BDD em meio ácido e propuseram uma reação de eletrooxidação para este edulcorante. Neste mecanismo, os autores, baseados em moléculas semelhantes ao AS, sugeriram que o AS pode se oxidar em meio ácido num processo irreversível com o envolvimento de um elétron e um próton e a formação de uma hidroxilamina e um aldeído. A reação está ilustrada na FIGURA 1.2. No entanto, há necessidade estudos adicionais para a confirmação deste mecanismo.

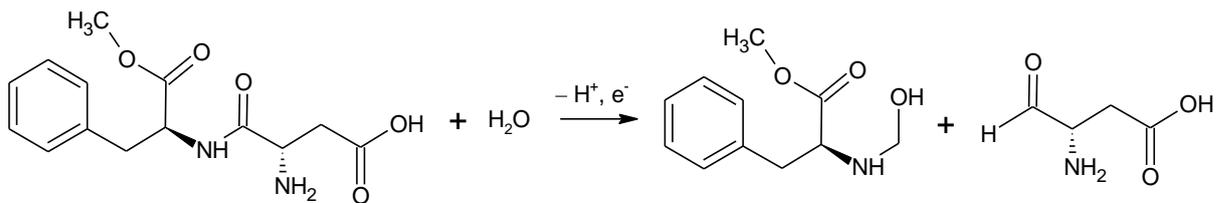


FIGURA 1.2 – Reação para a eletrooxidação do edulcorante AS.

Até a presente data, nenhum estudo sobre a reação de eletrooxidação de AK foi encontrado na literatura.

1.2 – Corantes

O emprego de corantes é um dos avanços da indústria alimentícia que mais tem gerado críticas, uma vez que, sua utilização é justificada na maioria das vezes pela importância da aparência do produto para sua aceitação.

Os corantes alimentícios são definidos como qualquer substância adicionada ao alimento com a finalidade de modificar, restaurar ou intensificar a sua cor. A principal função dos corantes nos alimentos industrializados é o de simular uma cor que seria percebida pelo consumidor como se fosse natural, já que as pessoas associam certas cores a determinados sabores. Do ponto de vista da saúde, os corantes artificiais em geral não são recomendados, justificando seu uso, quase que exclusivamente, do ponto de vista comercial e tecnológico^{9,80-82}.

Os corantes naturais possuem baixa estabilidade, pois são sensíveis à luz, ao calor e à ação das bactérias. Já os corantes sintéticos são mais estáveis, apresentando maior durabilidade, proporcionam cores mais intensas e ainda são economicamente mais viáveis, sendo, portanto os mais utilizados⁸³.

Pela legislação atual mediante as resoluções nº. 382 a 388, de 9 de agosto de 1999 da ANVISA, no Brasil é permitido o uso de apenas 11 corantes artificiais. Na TABELA 1.2 são listados estes corantes e também as cores que os mesmos proporcionam aos alimentos e os limites máximos estabelecidos para a utilização de cada um deles⁸⁴.

TABELA 1.2 – Corantes artificiais permitidos para uso em alimentos no Brasil

Corante	Cor	Limite máximo* (mg/100g ou mg/100mL)
Amaranto	magenta	10
Vermelho de eritrosina	pink	5
Vermelho 40	vermelho alaranjado	15
Ponceau 4R	cereja	10
Amarelo crepúsculo	laranja	10
Tartrazina	amarelo limão	15
Azul indigotina	azul royal	15
Azul brilhante	azul turquesa	15
Vermelho sólido E	vermelho	10
Verde rápido	verde mar	15
Azul de alizarina	azul	15

* Quantidade máxima permitida para uso de um aditivo no alimento, expresso em g/ 100 g ou g/ 100 mL de alimento pronto para o consumo.

1.2.1 – Amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azul indigotina

O amarelo crepúsculo (AC) e o vermelho 40 (V40) são corantes sintéticos pertencentes ao grupo dos azo compostos que são caracterizados por conter uma ou mais ligações do tipo azo ($N = N$) entre os anéis aromáticos, podendo ainda conter grupos sulfônicos para aumentar a solubilidade dos mesmos em solução aquosa. Esta classe de corantes é a mais importante economicamente e a mais utilizada em todo o mundo. O azul indigotina (AI), também é um corante sintético, porém faz parte de uma classe de corantes chamada indigóides, por ser a forma sulfonada do corante indigo. A característica química destes compostos é a ligação $C = C$, sendo AI o único representante desta classe^{80,83,85}. As estruturas químicas destes corantes são apresentadas na FIGURA 1.3.

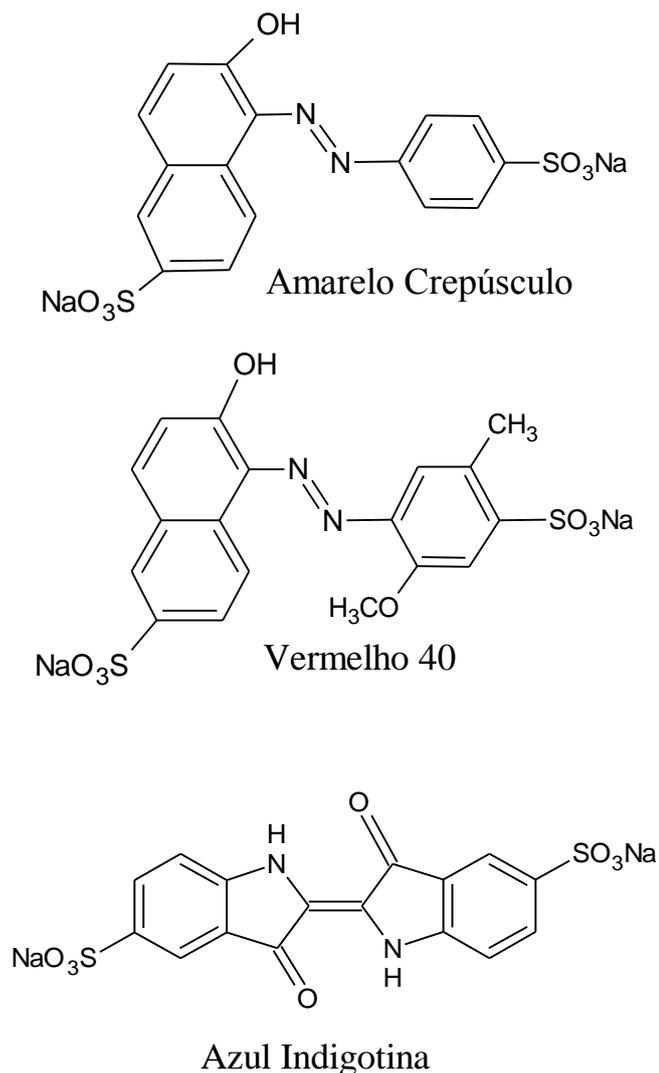


FIGURA 1.3 – Estruturas químicas dos corantes amarelo crepúsculo (AC), vermelho 40 (V40) e azul indigotina (AI).

Estes corantes são amplamente utilizados sozinhos ou em combinação em muitos produtos como gelatinas, iogurtes, sorvetes, refrigerantes, balas, biscoitos, salgadinhos, chicletes e doces em geral.

Em alguns estudos^{1,86,87} é relatado que o consumo de corantes sintéticos pode levar a hiperatividade e reações alérgicas, principalmente em crianças, pois são os indivíduos mais suscetíveis a reações adversas devido à imaturidade fisiológica.

Assim, os produtos alimentícios que contêm corantes sintéticos devem passar por um rigoroso controle de qualidade. Para isso se faz necessário

o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos para quantificação destes corantes em amostras de alimentos.

1.2.2 – Métodos analíticos para determinação dos corantes AC, V40 e AI

Para a quantificação dos corantes AC, V40 e AI em produtos alimentícios, a maioria dos procedimentos analíticos descritos na literatura empregam técnicas cromatográficas⁸⁸⁻⁹⁴ ou espectrofotométricas⁹⁵⁻⁹⁸. Estes métodos podem apresentar certos inconvenientes, tais como a necessidade de pré-tratamento mais laborioso da amostra e alguns casos, o emprego de reagentes ou solventes orgânicos de alta toxicidade. Além disso, os métodos espectrofotométricos apresentam problemas de interferências de um corante sobre o outro, e para resolver o problema de superposição de sinais há a necessidade do uso de ferramentas quimiométricas⁹⁹⁻¹⁰¹ ou o emprego de espectrofotometria derivativa. Os métodos eletroanalíticos geralmente têm algumas vantagens sobre estes métodos como a não necessidade de emprego de reagentes de alta toxicidade (apenas reagente para o preparo da solução do eletrólito suporte, geralmente um sal ou um ácido), curtos tempos de análise e menor custo de instrumentação, quando comparados à cromatografia. Assim, na literatura são descritos vários métodos eletroanalíticos para a determinação individual ou simultânea destes corantes¹⁰²⁻¹⁰⁸.

KAPOR et al.¹⁰² descreveram um método que envolve um eletrodo de gota pendente de mercúrio e voltametria de redissolução catódica, para a determinação simultânea de tartazina e AI em preparados sólidos para refrescos e balas. O limite de detecção deste método foi de $7,4 \text{ nmol L}^{-1}$ e $0,9 \text{ nmol L}^{-1}$ para tartrazina e AI, respectivamente.

DIAZ-GONZALÉZ et al.¹⁰³ investigaram o comportamento redox de AI em dois diferentes eletrodos de carbono impresso comerciais. Em um dos eletrodos foi observado processos de adsorção, portanto, para as medidas

consecutivas foi utilizado apenas o eletrodo no qual não apresentou qualquer fenômeno de adsorção. Foram construídas curvas analíticas para AI utilizando as técnicas de voltametria: cíclica, corrente alternada, onda quadrada e pulso diferencial. Comparando-se as diferentes técnicas voltamétricas, os melhores parâmetros analíticos foram obtidos utilizando a voltametria de corrente alternada, sendo estes: sensibilidade $0,92 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$ e limite de detecção igual a $0,032 \mu\text{mol L}^{-1}$.

SILVA et al.¹⁰⁴ desenvolveram um eletrodo tubular de carbono vítreo modificado com polialilamina para a eletrorredução de corantes azo (tartrazina, AC e V40) por voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square-Wave Voltammetry*) em um sistema em fluxo com multicomutação. O limite de detecção obtido foi de $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a tartrazina, $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o AC e $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o V40.

MEDEIROS et al.¹⁰⁵ usaram a técnica de FIA com detecção por amperometria de múltiplos pulsos para a determinação simultânea dos pares de corantes sintéticos tartrazina e AC, bem como azul brilhante e AC, utilizando um eletrodo de BDD. Obtiveram limites de detecção de $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AC e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para tartrazina no primeiro método e $0,85 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AC e $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para azul brilhante no segundo método.

CHEN et al.¹⁰⁶ construíram um eletrodo de pasta de carbono modificado com microfibras de alumina para a detecção e quantificação de AC em refrigerante. Utilizaram-se voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) e pré-concentração do analito no eletrodo de trabalho em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5. A faixa linear de concentrações obtida foi de $0,50$ a 100 nmol L^{-1} e o limite de detecção calculado igual a $0,16 \text{ nmol L}^{-1}$.

Recentemente, MAJIDI et al.¹⁰⁷ desenvolveram um eletrodo de nanocompósito de carbono-cerâmico modificado com nanotubos de carbono e líquido iônico para a eletrooxidação de AC e tartrazina em amostras

alimentícias. As medidas foram realizadas em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 utilizando a técnica de DPV. As curvas analíticas obtidas foram de 0,40 a $110 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para AC e 3,0 a $70,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para tartrazina, com limites de detecção de $0,10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

GAN et al.¹⁰⁸ desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono modificado com grafeno e TiO_2 , para estudar o comportamento eletroquímico dos corantes ponceau 4R e V40. Utilizando SWV e pré-concentração do analito sobre a superfície do eletrodo, quantificaram estes corantes em amostras de refrigerantes e salsicha. Neste método foram obtidos limites de detecção de $1,35 \text{ nmol L}^{-1}$ e $0,34 \text{ nmol L}^{-1}$ para ponceau 4R e V40, respectivamente.

Para os pares de corantes (AI e V40) ou corante e edulcorante (AC e AS), não foram encontrados trabalhos que relatam a determinação simultânea destes pares por técnicas eletroanalíticas.

Uma vez que estas combinações são muito comuns em amostras comerciais, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que possibilitem a determinação simultânea destas substâncias em análises de rotina de forma simples, rápida e precisa.

1.2.3 – Reação de eletrooxidação dos corantes AC, V40 e AI

A reação para a eletrooxidação de corantes contendo o grupo azo, como o V40 e o AC foram recentemente propostos por GAN et al.^{108,109}. No primeiro trabalho¹⁰⁸, os autores relatam a oxidação de V40 sobre um eletrodo de pasta de carbono modificado com grafeno e TiO_2 em meio de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Segundo eles a reação de eletrooxidação do V40 ocorre no grupo carbonila e envolve a participação de um próton e de um elétron (FIGURA 1.4).

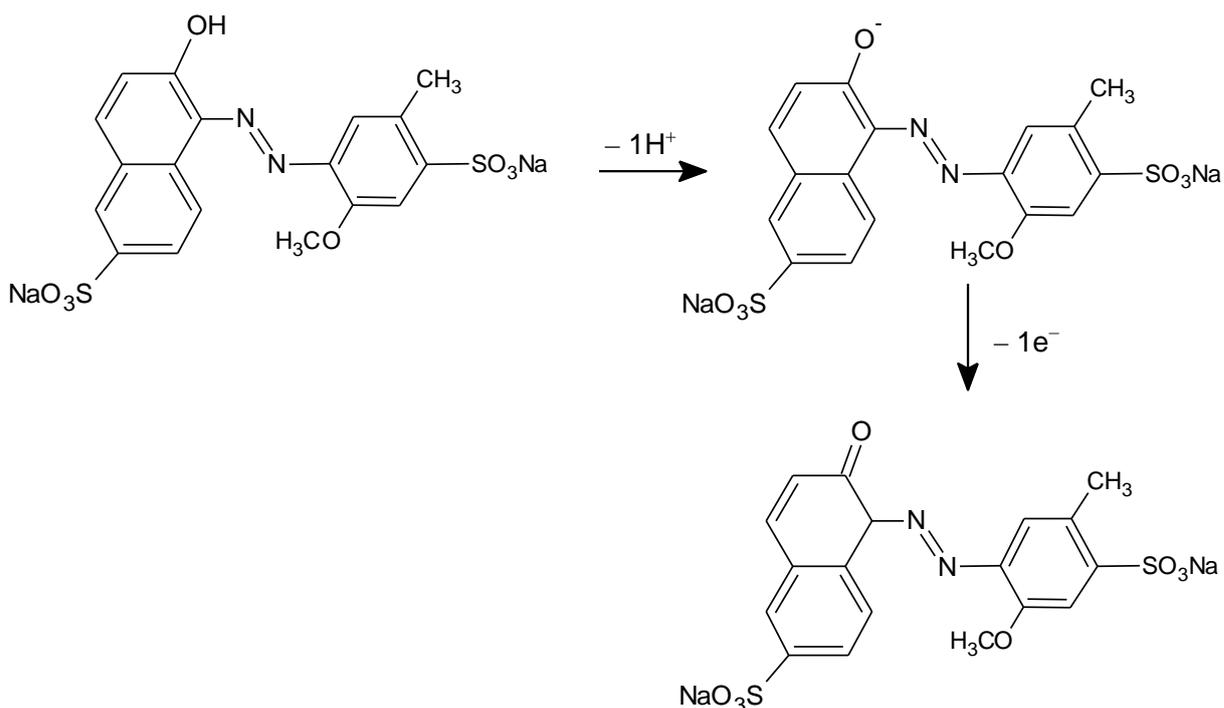


FIGURA 1.4 – Reação para a eletrooxidação do corante V40.

Em seguida, GAN et al.¹⁰⁹ estudaram o comportamento eletroquímico do AC sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de grafeno e nanopartículas de níquel em solução de tampão acetato pH 4,4. E assim, também propuseram uma reação para a eletrooxidação do corante AC, envolvendo um próton e um elétron, como apresentado na FIGURA 1.5. Por tratar-se de corantes contendo grupo azo e possuírem estruturas químicas similares, a reação de eletrooxidação do V40 e AC são semelhantes.

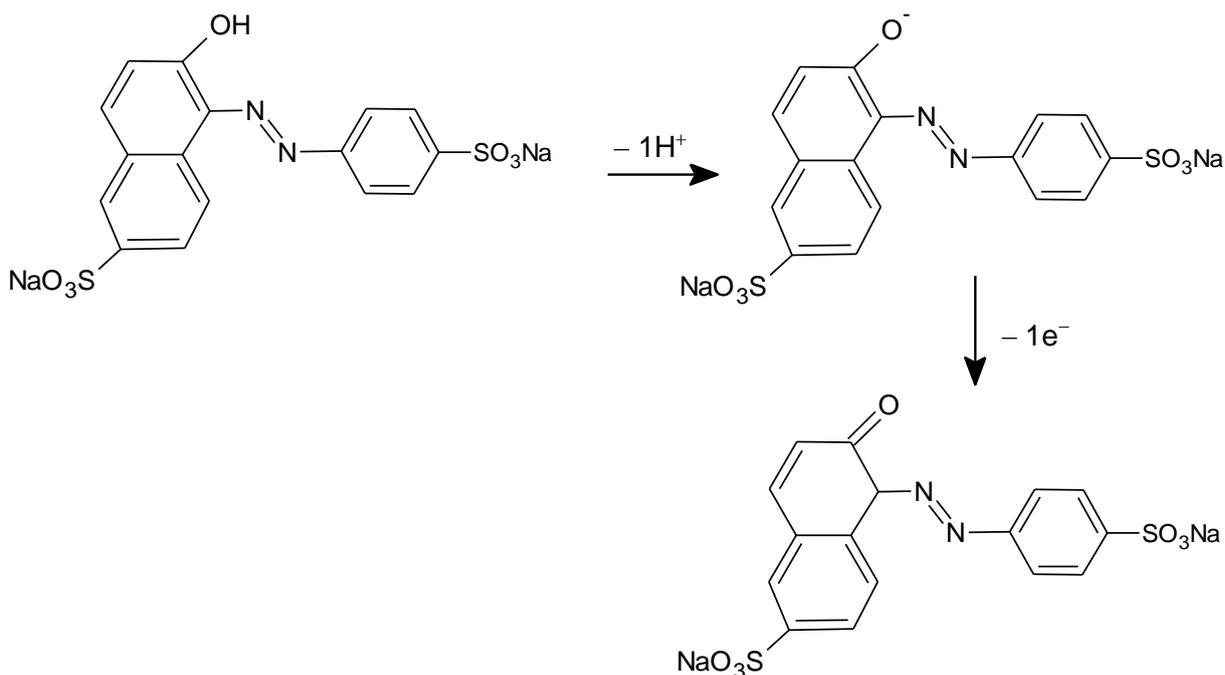


FIGURA 1.5 – Reação para a eletrooxidação do corante AC.

Ambos os mecanismos estão em consonância com o trabalho descrito por YU et al.¹¹⁰ que propôs que corantes do tipo azo com um grupo hidroxila na posição orto em relação ao grupo azo, apresentam oxidação irreversível e um pico anódico bem definido na faixa de pH de 2 a 12.

BEGGIATO et al.¹¹¹ estudaram a oxidação eletroquímica do AI sobre o eletrodo de platina, realizando-se uma eletrólise. Observaram que em meio ácido ou neutro (pH 1 a 7) o processo de oxidação envolve a perda de dois elétrons e dois prótons, produzindo a espécie oxidada dehidroindigo. A reação para esta oxidação é apresentada na FIGURA 1.6.

Como foi descrito na literatura, o corante AI é a forma sulfonada do corante indigo, portanto, estas espécies possuem estruturas moleculares muito semelhantes, sendo a região eletroativa a mesma nestas moléculas¹⁰³. Sendo assim, estudos encontrados na literatura sobre a oxidação eletroquímica do indigo está de acordo com o aqui apresentado para o AI^{112,113}.

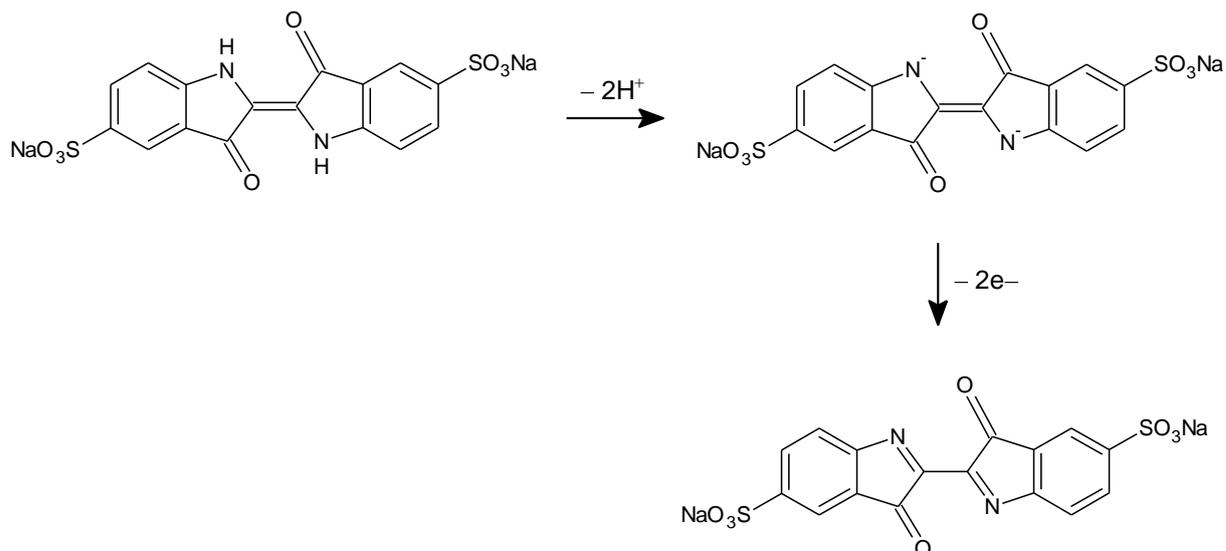


FIGURA 1.6 – Reação para a eletrooxidação para o corante AI.

1.3 – Eletrodo de diamante dopado com boro

Antigamente, o diamante era visto apenas como um cristal precioso e de brilho atraente, sendo utilizado para a fabricação de jóias. Entretanto, com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, as propriedades únicas deste material foram sendo desvendadas. Propriedades como, alta densidade atômica, dureza, capacidade de isolamento elétrico, alta condutividade térmica e inércia química^{114,115}, tornaram o material interessante para uso em diversas áreas, tais como, mecânica, eletrônica, óptica, espacial e médica¹¹⁶.

Sendo assim, devido à sua extrema raridade na natureza, desde o final do século XIX cientistas vinham tentando sintetizar o diamante¹¹⁷. Os dois métodos mais comuns para sua síntese, foram desenvolvidos quase que ao mesmo tempo nos anos 50, e são: o crescimento em altas pressões e altas temperaturas (HPHT, do inglês *High Pressure High Temperature*) e a deposição química a vapor (CVD, do inglês, *Chemical Vapor Deposition*). O primeiro requer um alto custo de produção o que inviabiliza a produção em grandes escalas por trabalhar em temperaturas da ordem de 1670 K e pressões da ordem de 5.000.000 KPa. Por outro lado, na CVD trabalha-se com temperaturas em torno de 1270 K e pressões subatmosféricas entre 1 e 10 KPa. Sendo assim, este

último método é mais empregado na síntese do diamante, por ser aquele que apresenta viabilidade econômica, versatilidade e simplicidade no manuseio e ainda permite o crescimento dos filmes em vários substratos de diferentes tamanhos e formatos. Este método baseia-se na produção de hidrogênio atômico, para gerar radicais metila, que reagem produzindo assim uma fonte de carbonos sp^3 nas proximidades do substrato^{115,118}.

Com os avanços na tecnologia de produzir filmes de diamante a partir do CVD, surgiu o interesse de crescer filmes de diamantes com características semicondutoras, e assim filmes de diamante dopados começaram a serem produzidos. Vários elementos podem ser utilizados como dopantes, boro, fósforo, enxofre, nitrogênio entre outros. Porém, o mais utilizado é o boro, que durante o crescimento do filme de diamante é adicionado na fase gasosa na forma de trimetilboro (na concentração de 10 a 10000 ppm)^{119,120}. Com o desenvolvimento destes filmes de BDD houve um aumento nas possibilidades de aplicação deste material, sendo uma delas na produção de eletrodos para fins analíticos.

O eletrodo de BDD possui propriedades extremamente atrativas como¹²¹⁻¹²⁵:

- ✓ estabilidade a corrosão em meios fortemente agressivos;
- ✓ baixa e estável corrente de fundo;
- ✓ estabilidade de resposta em longo prazo;
- ✓ fraca adsorção;
- ✓ amplo intervalo útil de potencial em meio aquoso e não aquoso.

Devido a essas propriedades, o eletrodo de BDD tem sido muito empregado no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de compostos inorgânicos e principalmente de compostos orgânicos em diversas matrizes^{14,22-26,125-131}.

1.3.1 – Pré-tratamento do eletrodo de BDD

As propriedades eletroquímicas dos eletrodos de BDD são bem sensíveis à sua terminação superficial que pode ser em hidrogênio ou em oxigênio. As superfícies dos eletrodos de BDD recém-preparadas são terminadas em hidrogênio, ou seja, uma superfície hidrofóbica. Entretanto, esta pode se tornar hidrofílica com a modificação da terminação superficial de hidrogênio para oxigênio (grupos oxigenados como: carboxila, carbonila e hidroxila), que pode ser feita mediante a exposição da superfície a um plasma de oxigênio ou a uma solução de ácido forte em ebulição. A mudança da terminação superficial para oxigênio pode ainda ser alcançada por meio de um pré-tratamento eletroquímico anódico em meio ácido. A superfície oxidada anodicamente (por meio de um pré-tratamento anódico, PTA) pode ser facilmente revertida por meio de um pré-tratamento catódico (PTC) e vice-versa¹³². Na FIGURA 1.7 é apresentado um esquema da superfície do eletrodo de BDD após os diferentes pré-tratamentos eletroquímicos (PTC e PTA, respectivamente).

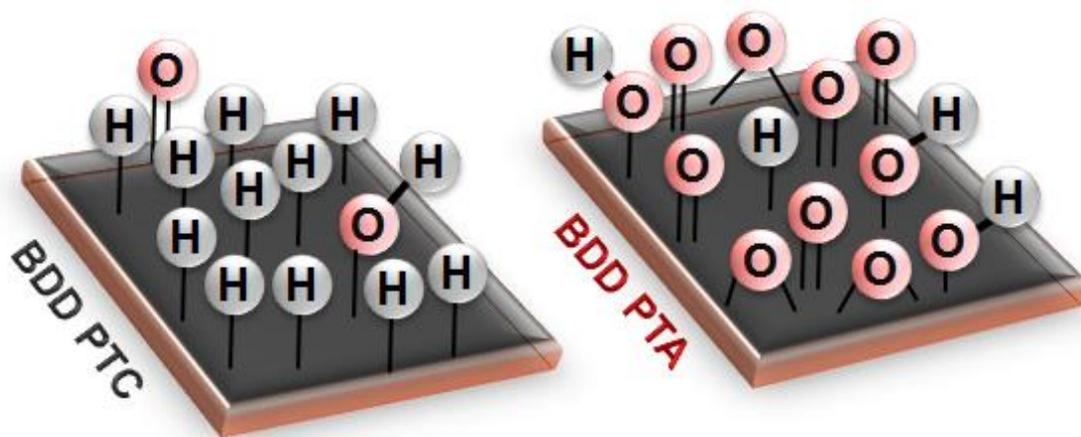


FIGURA 1.7 – Representação da superfície do eletrodo de BDD com diferentes terminações superficiais provocadas pelos pré-tratamentos eletroquímicos catódico e anódico.

YAGI et al.¹³² e GRANGER e SWAIN¹³³ foram os primeiros a descreverem o efeito da terminação superficial do eletrodo de BDD no comportamento eletroquímico deste eletrodo. YAGI et al.¹³² estudaram o comportamento eletroquímico do BDD com terminações em hidrogênio (como preparados) e após a exposição deste filme a um plasma de oxigênio. Observaram que a superfície hidrofóbica do eletrodo como recém-preparado torna-se hidrofílica após o tratamento. Foi realizada uma comparação do comportamento eletroquímico dos eletrodos utilizando diferentes pares redox. Para os pares redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$, a transferência eletrônica se tornou mais lenta com o eletrodo contendo terminações em oxigênio, enquanto que para o $\text{Fe}^{3+/2+}$ a transferência foi acelerada e nenhuma mudança ocorreu para os pares $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ e $\text{Co}(\text{en})_3^{3+/2+}$. Os autores concluíram que, para espécies com cargas negativas, há uma diminuição na velocidade de transferência de carga quando o eletrodo de BDD possui terminações em oxigênio. GRANGER e SWAIN¹³³ também estudaram a influência das diferentes terminações superficiais do BDD na reversibilidade do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Neste estudo, também foi observado que as interações deste par com a superfície do eletrodo é bloqueada quando a superfície possui terminações em oxigênio. A partir destes estudos pioneiros, diversos grupos de pesquisa vem desenvolvendo estudos empregando-se eletrodos de BDD^{28,134-137}.

Já tem sido demonstrado que as terminações em oxigênio na superfície do eletrodo de BDD podem facilitar alguns tipos de reações para diferentes analitos^{138,139}. TERASHIMA et al.¹³⁹ relataram um melhor desempenho na reação de oxidação de disulfetos com o uso do eletrodo de BDD com terminações superficiais em oxigênio. GARBELLINI et al.¹³⁸ também obtiveram maior magnitude do sinal analítico e melhor separação dos picos para nucleotídeos de DNA com o eletrodo de BDD após PTA. Ambos os autores acreditam que os grupos funcionais contendo oxigênio (carbonila e hidroxila) na

superfície do BDD formam um campo polar, que atrai eletrostaticamente as moléculas analisadas.

Assim, o efeito destas diferentes terminações superficiais do eletrodo de BDD sobre as suas respostas eletroquímicas ainda necessita de uma maior investigação. Isso demanda estudos sistemáticos de como diferentes variáveis do pré-tratamento podem afetar a resposta eletroquímica do eletrodo de BDD frente a diferentes reações de transferência de carga, com ou sem controle do transporte de massa, visando contribuir para a compreensão do efeito do pré-tratamento, isto é, para a identificação da propriedade do BDD que é por ele afetada.

1.4 – Técnicas analíticas

1.4.1 – Voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial

As técnicas eletroanalíticas são baseadas em reações de oxidação-redução, as quais são relacionadas com propriedades elétricas mensuráveis tais como, corrente elétrica, diferença de potencial, acúmulo de carga, entre outros. Estas técnicas vêm sendo amplamente empregadas em análises ambientais, farmacêuticas e alimentícias¹². Suas principais vantagens são, baixos limites de detecção, instrumentação de custo relativamente baixo, há possibilidade de se determinar o analito em diferentes estados de oxidação (espeiação do analito) e, na maioria dos casos as determinações eletroanalíticas são rápidas e sensíveis quando comparadas com outras técnicas analíticas¹⁴⁰.

A voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) é uma técnica eficaz e versátil, que pode oferecer informações que caracterizam os processos eletroquímicos de um composto, tais como a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, reversibilidade dos sistemas redox e se o processo é controlado preferencialmente por difusão ou adsorção das espécies na superfície do eletrodo¹⁴¹. Já SWV e DPV são técnicas que envolvem

a aplicação de pulsos de potencial. Atualmente os limites de detecção obtidos por ambas as técnicas voltamétricas podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas, possibilitando assim a análise em matrizes ambientais, biológicas e alimentícias^{140,142}.

1.4.2 – Sistemas de análises por injeção em fluxo e amperometria de múltiplos pulsos (FIA-MPA)

O sistema FIA pode ser definido como um processo analítico de inserção de uma alíquota da solução da amostra ou padrão no percurso analítico, a qual é transportada pelo fluido transportador em direção ao detector.

Os pioneiros a utilizar essa técnica foram RUZICKA e HANSEN¹⁴³ em 1975, e desde então percebeu-se que eram grandes as potencialidades e a praticidade deste processo, uma vez que o sistema é fechado e, portanto, há a minimização dos riscos de contaminação das soluções e do analista. Atualmente tem sido bastante explorada no desenvolvimento de procedimentos analíticos, pois pode proporcionar várias vantagens, como o uso de instrumentação simples, elevada frequência analítica, precisão dos resultados, consumo reduzido de amostras e reagentes e assim menor geração de resíduos (em alguns sistemas FIA o consumo não é baixo) e ainda a facilidade de acoplamento com diversos detectores¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Os detectores eletroquímicos são uma interessante alternativa, quando os analitos são eletroativos, pois utiliza instrumentação de baixo custo, simplicidade no preparo das amostras e possui alta seletividade em alguns casos. Os detectores amperométricos são os mais utilizados, pois apresentam algumas vantagens em comparação com os métodos voltamétricos como maior detectabilidade devido ao alto transporte de massa proporcionado pelo fluxo da solução e pela baixíssima corrente capacitiva instantes depois do início do experimento (aplicação de um único potencial em função do tempo), e ainda menores efeitos de contaminação da superfície do eletrodo uma vez que o tempo

de contato da amostra com o eletrodo é muito menor do que em processos estacionários¹⁴⁷.

Diante disso, a amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês *Multiple Pulse Amperometry*) é uma técnica pulsada promissora para associação com o sistema em fluxo, pois permite a aplicação de diferentes pulsos de potenciais sequencial e continuamente em função do tempo em um eletrodo de trabalho. Essa técnica é disponibilizada pelo software GPES 4.9 comercializado pela empresa Metrohm (Eco Chemie), entre outros. Com este software é possível à aplicação de até 10 pulsos de potenciais com a aquisição de 10 amperogramas distintos. Uma plataforma de pulsos de potenciais pode ser aplicada em um único eletrodo de trabalho para análise simultânea de vários analitos sem a necessidade de etapas de separação previamente a detecção ou tratamentos quimiométricos para separação de sinais.

SURAREUNGCHAI et al.¹⁴⁸ foram os primeiros a descreverem um procedimento para análise simultânea de glicose e frutose com aplicação de quatro pulsos de potenciais usando um eletrodo de ouro recoberto com Nafion. O primeiro pulso de potencial ($-0,5 \text{ V} / 240 \text{ ms}$) foi usado para oxidação e quantificação direta e seletiva de glicose, no segundo pulso de potencial aplicado ($0,2 \text{ V} / 180 \text{ ms}$) ocorreu a oxidação tanto da glicose como da frutose, e a diferença das correntes obtidas nestes dois potenciais foi possível obter o sinal de corrente relacionado apenas a oxidação da frutose, possibilitando assim a sua quantificação. Os demais pulsos de potenciais aplicados ($1,0 \text{ V} / 180 \text{ ms}$ e $-0,8 \text{ V} / 300 \text{ ms}$) foram necessários para limpeza e reativação da superfície do eletrodo de trabalho, respectivamente.

Recentemente em vários trabalhos na literatura têm sido relatado as vantagens de se utilizar a MPA acoplada a um sistema FIA ou BIA (do inglês – *Batch Injection Analysis*) tanto para a limpeza e ativação do eletrodo de trabalho como para a detecção e quantificação simultânea de diferentes compostos com potenciais redox distintos^{105,127,149-153}.

Sendo assim, a junção FIA-MPA é de grande relevância para o desenvolvimento de procedimentos analíticos, uma vez que possibilita a análise individual ou simultânea e direta de compostos de interesse. Além disso, essas técnicas apresentam vantagens como menor tempo de análise, excelente repetibilidade e alta frequência analítica, características estas desejáveis para o emprego em métodos de rotina.

2 – OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea dos edulcorantes AS e AK, dos corantes sintéticos V40 e AI e ainda dos edulcorante e corante AS e AC em produtos alimentícios empregando análise por injeção em fluxo com detecção por amperometria de múltiplos pulsos e/ou as técnicas voltamétricas de pulso, empregando o eletrodo de BDD como eletrodo, de trabalho.

3 – EXPERIMENTAL

3.1 – Reagentes e soluções

Os padrões dos edulcorantes AS e AK (pureza $\geq 99,9$ %) e dos corantes AC (pureza $\geq 90,0$ %), AI (pureza $\geq 85,0$ %) e V40 (pureza $\geq 80,0$ %), foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Soluções estoque destes padrões na concentração de $0,010 \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas diariamente em solução de H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução estoque de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Synth 98% m/m) foi preparada na concentração de $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. As demais soluções de H_2SO_4 em diversas concentrações foram obtidas pela diluição desta solução estoque.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) com pH 1,9 foi preparada pela mistura das soluções de ácido acético (CH_3COOH) $0,040 \text{ mol L}^{-1}$, ácido fosfórico (H_3PO_4) $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido bórico (H_3BO_3) $0,040 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão fosfato com pH 2,0 foi preparada pela adição de $0,61 \text{ mL}$ de ácido fosfórico (H_3PO_4) e $13,62 \text{ g}$ dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) em água suficiente para completar 250 mL .

A solução de nitrato de potássio (KNO_3) foi preparada pela dissolução de $2,530 \text{ g}$ deste sal em água; esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL , sendo então o volume completado com água. Em seguida, ajustou-se o $\text{pH}_{\text{cond.}}$ para $1,5$ com de algumas gotas de HNO_3 concentrado.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, e todas as soluções foram preparadas em água ultra-pura com resistividade maior ou igual a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtida em um sistema *Milli-Q* (Millipore[®], Bedford, MA).

3.2 – Preparação das amostras

As amostras de sólidos para refrescos e gelatinas foram inicialmente homogeneizadas e as massas de interesse pesadas em balança

analítica, e dissolvidas em 10,0 mL de uma solução de H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} . Para completa dissolução da gelatina o ácido sulfúrico foi levemente aquecido. Estas soluções foram filtradas em papel de filtro, e uma alíquota desta solução foi adicionada diretamente na célula eletroquímica contendo 10,0 mL de eletrólito suporte (H_2SO_4 0,30 mol L^{-1}).

Para a amostra de adoçante líquido, uma alíquota de 130 μL foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com a solução do eletrólito suporte (H_2SO_4 0,30 mol L^{-1}) até a marca do balão. Em seguida, 100 μL dessa solução estoque foram transferidos para a célula eletroquímica contendo 10,0 mL da solução do eletrólito suporte.

Para as amostras de refrigerante, uma alíquota de 240 μL da amostra degaseificada foi transferida diretamente para a célula eletroquímica contendo 10,0 mL de eletrólito suporte (H_2SO_4 0,30 mol L^{-1}), e as medidas foram realizadas para cada amostra.

3.3 – Instrumentação

Para as medidas voltamétricas e amperométricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT-12 (Utrecht, Holanda) interfaciado a um computador e gerenciado pelo programa computacional GPES 4.9. A linha base dos voltamogramas de DP e SW e dos amperogramas foram corrigidas pelo método da média móvel (largura do pico: 0,003) e os ruídos foram suavizados (smooth) utilizando-se o algoritmo de Savitzky-Golay disponível no software GPES 4.9.

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D com precisão de $\pm 0,01$ mg e uma balança analítica Mettler, modelo H10 com precisão de $\pm 0,1$ mg.

As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando-se um pHmetro Orion modelo EA 940, conectado a um eletrodo de vidro com um eletrodo de referência interno de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}).

O banho de ultrassom utilizado foi um UNIQUE, modelo Ultraclean 1400 A.

Para o sistema FIA, uma bomba peristáltica Ismatec (IPC- 8) de 8 canais foi utilizada.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-VIS modelo SPD-10A com uma coluna C18 Shim-Pack CLC-ODS (150 × 60 mm, 5 μm) e um injetor manual com alça de amostragem de 20 μL.

3.3.1 – Eletrodos

Os eletrodos de trabalho utilizados foram de BDD que são filmes de diamante com espessura de 1 mm depositados sobre um substrato de silício e com dopagem de boro de 8000 ppm, adquiridos da Adamant Technologies SA, Suíça, e preparados como descrito previamente¹⁵⁴ (FIGURA 3.1). O eletrodo mostrado na FIGURA 3.1 (a) foi montado sobre uma placa de cobre de circuito eletrônico com o auxílio de uma cola condutora de prata sendo a área do eletrodo de 0,25 cm² delimitada com resina epóxi. O eletrodo empregado no sistema FIA é mostrado na FIGURA 3.1 (b). O eletrodo empregado, com dimensões de 12 × 12 mm, foi inicialmente pré-tratado eletroquimicamente empregando-se um adaptador construído em Teflon[®] contendo um contato de ouro como mostrado na FIGURA 3.1 (c). Um anel (*O-ring*) de borracha nitrílica foi usado para vedar a solução e delimitar a área do eletrodo em 0,33 cm². Uma placa de platina foi utilizada como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) foi utilizado como eletrodo de referência.

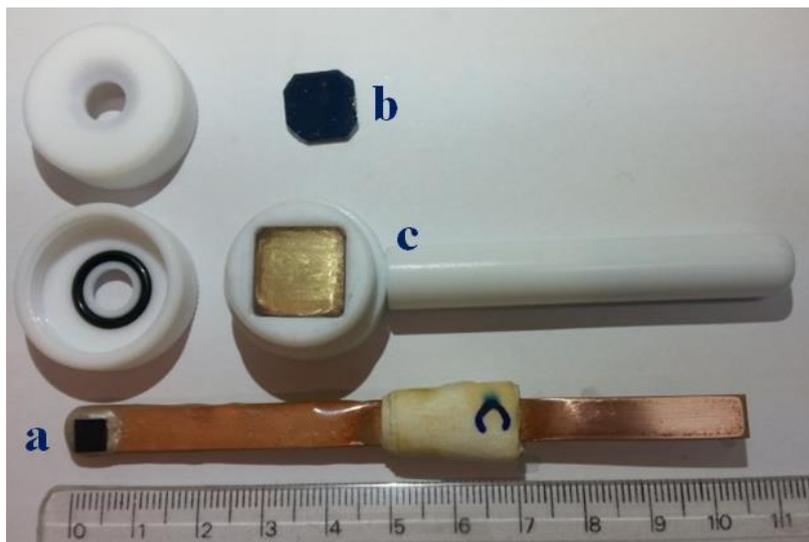


FIGURA 3.1 – Fotografia dos eletrodos de BDD utilizados, em (a) eletrodo com área geométrica de $0,25 \text{ cm}^2$ montado sobre uma placa de cobre de circuito eletrônico, (b) eletrodo de BDD para medidas em fluxo, (c) adaptador (tarugo) com *O-ring* de vedação para encaixe do BDD, delimitando a área em $0,33 \text{ cm}^2$.

3.3.2 – Célula eletroquímica convencional

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula de vidro Pyrex[®] de compartimento único. A célula tem capacidade de 15 mL, e equipada com uma tampa de Teflon[®], contendo orifícios para a desoxigenação da amostra com nitrogênio e posicionamento dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar.

3.3.3 – Célula eletroquímica com configuração *wall jet*/camada delgada

Para o sistema FIA com a detecção amperométrica foi construída uma célula com configuração mista entre a configuração *wall jet* e camada delgada. Esta célula foi projetada de acordo com um modelo proposto por RICHTER et al.¹⁵⁵ com algumas modificações e adaptações feitas em nosso grupo de pesquisa. Na FIGURA 3.2 está ilustrada a montagem e configuração da célula eletroquímica desenvolvida.

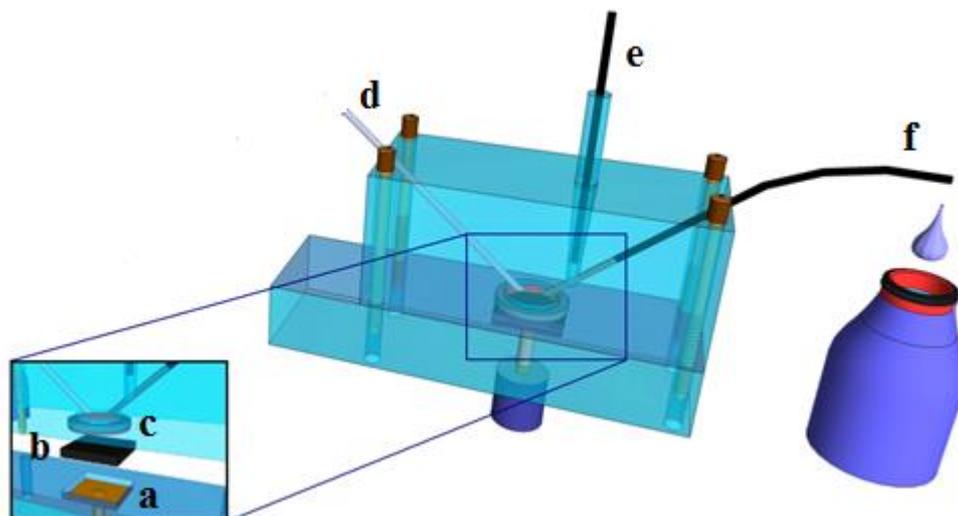


FIGURA 3.2 – Ilustração da célula eletroquímica para o sistema FIA com detecção amperométrica. Em (a) suporte em acrílico com contato elétrico para acomodação do eletrodo de trabalho, (b) eletrodo de BDD, (c) suporte em acrílico com *O-ring* para vedação, (d) entrada de solução padrão ou amostra, (e) eletrodo de referência (Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) miniaturizado e (f) saída das soluções e eletrodo auxiliar em aço inoxidável.

3.3.4 – Sistema de análises por injeção em fluxo

O sistema de análises por injeção em fluxo (FIA) de linha única foi composto basicamente por uma bomba peristáltica para propulsionar as soluções e reagentes, um injetor comutador manual de geometria circular, construído em acrílico com alça de amostragem para inserir volumes conhecidos de soluções de amostra e padrão e célula eletroquímica. Para a alça de amostragem e as linhas de condução foram utilizados tubos de polipropileno de 0,8 mm de diâmetro interno, sendo os tubos de propulsão de Tygon[®]. O esquema do sistema FIA de linha única está apresentado na FIGURA 3.3 e a montagem do sistema pode ser melhor visualizada na FIGURA 3.4.

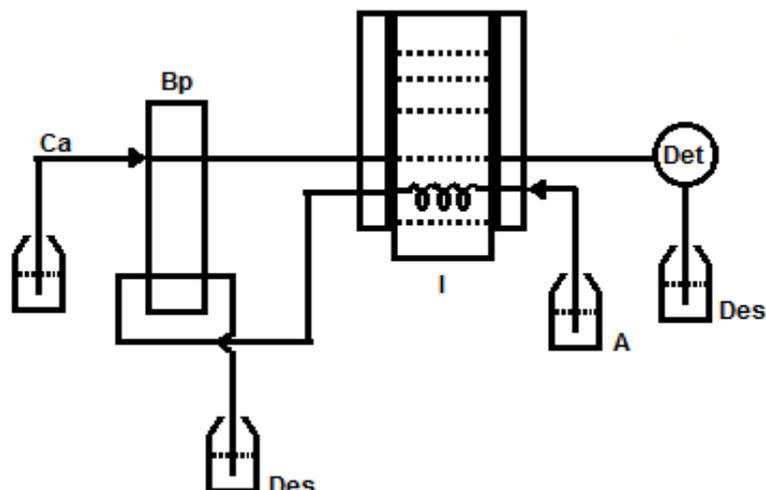


FIGURA 3.3 – Diagrama esquemático do sistema FIA utilizado. As representações são: (I) injetor comutador; (A) solução da amostra; (Ca) solução transportadora (H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$); (Bp) bomba peristáltica; (Det) célula eletroquímica e (Des) descarte.

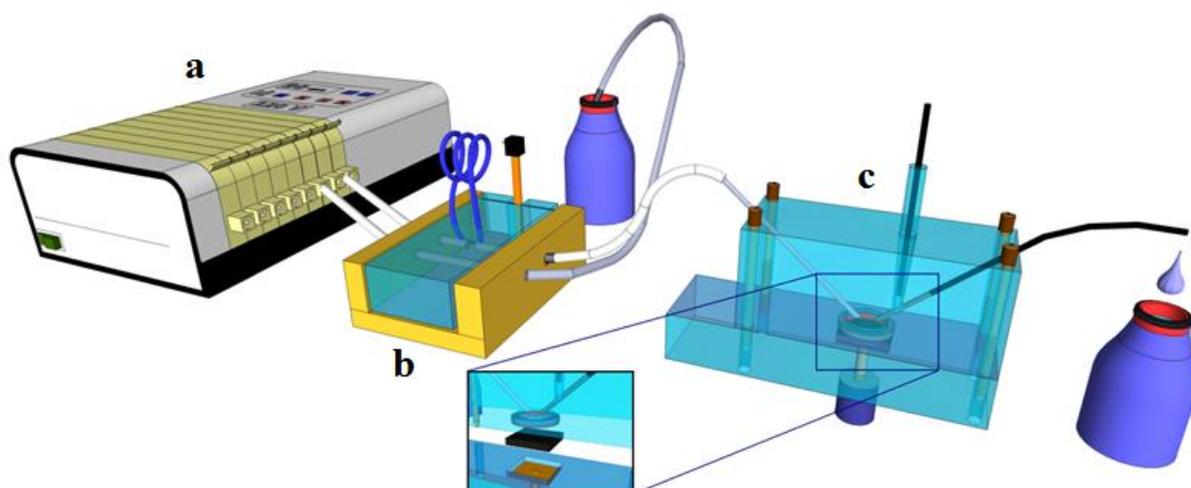


FIGURA 3.4 – Ilustração da montagem do sistema em fluxo. Em (a) bomba peristáltica, (b) injetor comutador manual e (c) detector eletroquímico.

3.4 – Procedimentos Experimentais

3.4.1 – Pré-tratamentos eletroquímicos do eletrodo de BDD

Para o PTA aplicou-se uma corrente de $0,50 \text{ A cm}^{-2}$ por 60 s, e para o PTC aplicou-se uma corrente de $-0,50 \text{ A cm}^{-2}$ por 120 s, ambos em solução de

H_2SO_4 0,50 mol L⁻¹. Em seguida, fez-se um estudo da densidade de corrente aplicada nos pré-tratamentos, sendo as densidades de correntes avaliadas: 0,05; 0,10; 0,50 e 1,00 A cm⁻². Também fez-se um estudo para avaliar o tempo de pré-tratamento realizado no eletrodo de BDD, quando o PTA foi realizada avaliou-se os tempos de 30, 60 e 120 s e quando o PTC foi realizado os tempos foram 120, 180, 240 e 300 s.

O pré-tratamento de interesse (anódico ou catódico) foi realizado uma única vez em todos os dias de trabalho antes de iniciar as medidas, sendo que o pré-tratamento selecionado era sempre precedido do outro pré-tratamento (por exemplo: quando desejava-se o PTA, antes deste era realizado um PTC e vice-versa) para limpeza e condicionamento do eletrodo. O PTC no eletrodo de BDD foi realizado em um tempo de quatro a cinco vezes maior que o PTA, uma vez que é mais difícil reduzir do que oxidar o eletrólito suporte para a geração dos grupos funcionais.

3.4.2 – Otimização dos parâmetros do sistema de análises por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulso para a determinação simultânea de AS e AC e de AI e V40

Para definir os potenciais a serem aplicados para cada analito nas medidas de MPA, utilizou-se FIA com detecção amperometria convencional, variando-se os potenciais em torno do potencial de pico de cada analito. Os voltamogramas hidrodinâmicos para cada analito foram construídos por meio dos sinais de corrente obtidos nos diferentes potenciais aplicados. Um estudo do efeito de diferentes tempos de aplicação de pulso foi realizado variando-se o tempo de 100 a 250 ms.

A fim de encontrar as melhores condições analíticas para o desenvolvimento dos procedimentos, otimizou-se os parâmetros do sistema FIA, como vazão e volume da alça de amostragem. Estes estudos foram realizados de forma univariada, sendo a vazão avaliada na faixa de 1,0 a 6,0 mL min⁻¹ e o

volume de alça de amostragem no intervalo de 50 a 500 μL . Ambos os estudos foram realizados utilizando a técnica de MPA e um sistema FIA, aplicando-se os potenciais desejados sobre o eletrodo de BDD e em solução contendo os analitos de interesse.

Então a possibilidade de determinação simultânea dos analitos de interesse foi avaliada. Este estudo foi realizado aplicando-se uma sequência de dois pulsos de potencial ótimos para cada analito em função do tempo sobre o eletrodo de BDD em soluções contendo apenas um dos analitos ou apenas o outro analito; ou uma mistura de ambos.

Após a otimização de todos os parâmetros relacionados com o sistema FIA-MPA, a fim de construir as curvas analíticas, foram injetadas soluções com diferentes concentrações em ordem crescente e depois decrescente da solução contendo os padrões dos analitos de interesse no sistema FIA. Após cada injeção, os sinais de corrente foram registrados para cada pulso de potencial aplicado, gerando assim, um amperograma em cada pulso de potencial. As soluções das amostras foram injetadas após as injeções da solução padrão para a construção da curva analítica.

O estudo da repetibilidade intra-dias foi realizado pelas medidas voltamétricas consecutivas ($n = 10$) de soluções dos analitos em duas concentrações diferentes.

O estudo de repetibilidade entre-dias foi realizado pelas medidas voltamétricas de duas concentrações diferentes de cada analito em 3 dias diferentes ($n = 3$).

3.4.3 – Medidas voltamétricas e otimização de parâmetros para o desenvolvimento do procedimento analítico para a determinação dos edulcorantes AS e AK

Inicialmente utilizou-se a CV para estudar o perfil voltamétrico do eletrodo de BDD e dos analitos.

Os parâmetros das técnicas de pulso DPV (velocidade de varredura (v), amplitude de potencial (a) e tempo de modulação do pulso (t)) e SWV (frequência de aplicação do pulso (f), amplitude de potencial (a) e incremento de varredura (ΔE)) foram otimizados de forma a obter-se as melhores condições analíticas para os procedimentos desenvolvidos.

Após a otimização dos parâmetros, as curvas analíticas foram construídas pela adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica. Foi então selecionada a melhor técnica (DPV) para a determinação de AS e AK. Estes analitos foram determinados nas amostras utilizando-se esta técnica eletroanalítica e interpolação da corrente obtida para cada analito nas amostras na curva analítica (corrente *vs.* concentração do analito).

O estudo da repetibilidade intra-dias foi realizado pelas medidas voltamétricas consecutivas ($n = 10$) de soluções dos analitos em duas concentrações diferentes.

O estudo de repetibilidade entre-dias foi realizado pelas medidas voltamétricas de duas concentrações diferentes de cada analito em 3 dias diferentes ($n = 3$).

3.4.4 – Estudo de interferentes em potencial

O efeito de interferentes em potencial foi avaliado pela adição de algumas substâncias comumente encontradas nas amostras analisadas em solução padrão dos analitos, nas razões de concentrações de 1:1 e 1:10 (analito:interferente) e os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos usando-se apenas a solução padrão de cada analito.

Para AS e AC os compostos investigados como interferentes em potencial foram: sacarose, ácido cítrico, acesulfame-K e citrato de sódio. Para AI e V40 foram: sacarose, glicose, citrato de sódio, aspartame, acesulfame-K e carboximetilcelulose (CMC) e por fim para AS e AK os seguintes concomitantes foram avaliados: ácido cítrico, sorbitol e benzoato de sódio.

3.4.5 – Métodos comparativos

Os teores dos analitos determinados empregando-se os métodos eletroanalíticos desenvolvidos nesta dissertação foram comparados com os teores obtidos empregando-se um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O procedimento desenvolvido por DOSSI et al.¹⁵⁶, com algumas adaptações foi utilizado como método de comparativo para a determinação de AC e AS. A coluna cromatográfica empregada foi a Shim-Pack CLC-ODS (6,0 mm × 250 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por duas soluções: uma mistura de metanol/acetonitrila (70/30 v/v) (fase móvel A) e tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,01 mol L⁻¹ pH 4,0, ajustado com solução de H₃PO₄ 0,10 mol L⁻¹) (fase móvel B). Aplicou-se nesta determinação uma eluição isocrática sendo 40 % da fase A e 60 % da fase B. A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume das soluções de amostras foi de 20,0 µL. Os comprimentos de onda selecionados no detector UV-Vis fotodiodo foram 210 nm para a AS e 235 nm para AC.

Para os corantes AI e V40, o método comparativo empregado foi aquele proposto por MINIOTI et al.¹⁵⁷ com pequenas adaptações. A coluna cromatográfica empregada foi a Shim-Pack CLC-ODS (6,0 mm × 250 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por duas soluções: uma mistura de metanol/acetonitrila (80/20 v/v) (fase móvel A) e tampão acetato de amônio 0,01 mol L⁻¹ pH 7,5, ajustado com solução de NaOH 10 % (m/v) (fase móvel B). Um gradiente de eluição foi realizado como mostrado na TABELA 3.1. A vazão foi de 1,5 mL min⁻¹ e o volume das soluções das amostras injetado foi de 20,0 µL. Os comprimentos de onda selecionados no detector UV-Vis (modelo SPD-M10-AVP) foram 608 nm para a AI e 507 nm para V40.

TABELA 3.1 – Programa de gradiente de eluição para determinação dos corantes AI e V40

t (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,0	95	5
15,0	48	52
25,0	0	100
27,0	0	100
28,0	95	5
29,0	95	5

Para o caso dos edulcorantes AS e AK foi utilizado como método comparativo o procedimento desenvolvido por SERDAR e KNEZEVIC¹⁵⁸ (com algumas adaptações). A coluna cromatográfica empregada foi a Shim-Pack CLC-ODS (6,0 mm × 250 mm, 5 μm). A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila/tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,0125 mol L⁻¹ pH 3,5, ajustado com solução de H₃PO₄ 0,10 mol L⁻¹) (15/85 v/v) (eluição isocrática) com vazão de 1,0 mL min⁻¹, e volume de injeção de 20 μL. Os comprimentos de onda selecionados no detector UV-Vis (modelo SPD-M10-AVP) foram 193 nm para o AS e 226 nm para o AK.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os estudos do comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD e o efeito dos diferentes pré-tratamentos eletroquímicos realizados em sua superfície para a solução de cada analito de interesse, seguido da apresentação dos resultados obtidos no desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos para a determinação simultânea dos pares de aditivos alimentícios, AS e AC, V40 e AI e por fim AS e AK.

4.1 – Estudo do comportamento eletroquímico dos edulcorantes e dos corantes sobre o eletrodo de BDD

Inicialmente foram realizados experimentos utilizando a técnica de CV para observar o comportamento eletroquímico dos edulcorantes e dos corantes empregando um eletrodo de BDD.

Na FIGURA 4.1 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para os edulcorantes AS e AK e para os corantes AC, V40 e AI. Como pode ser observado, todos os analitos são eletroativos, e apresentam um pico de corrente no sentido positivo de varredura do potencial, indicando a ocorrência de processos de oxidação destes analitos sobre o eletrodo de BDD PTC. Além disso, também foi observado que não há nenhum pico no sentido inverso de varredura (redução) nas condições empregadas, o que caracteriza um processo irreversível para cada um destes aditivos alimentares.

Os potenciais de pico para cada analito, nessa janela de potenciais utilizada neste trabalho, apresentaram valores em torno de 1,80; 2,15; 0,96; 0,70 e 0,90 V para AS, AK, AC, AI e V40, respectivamente.

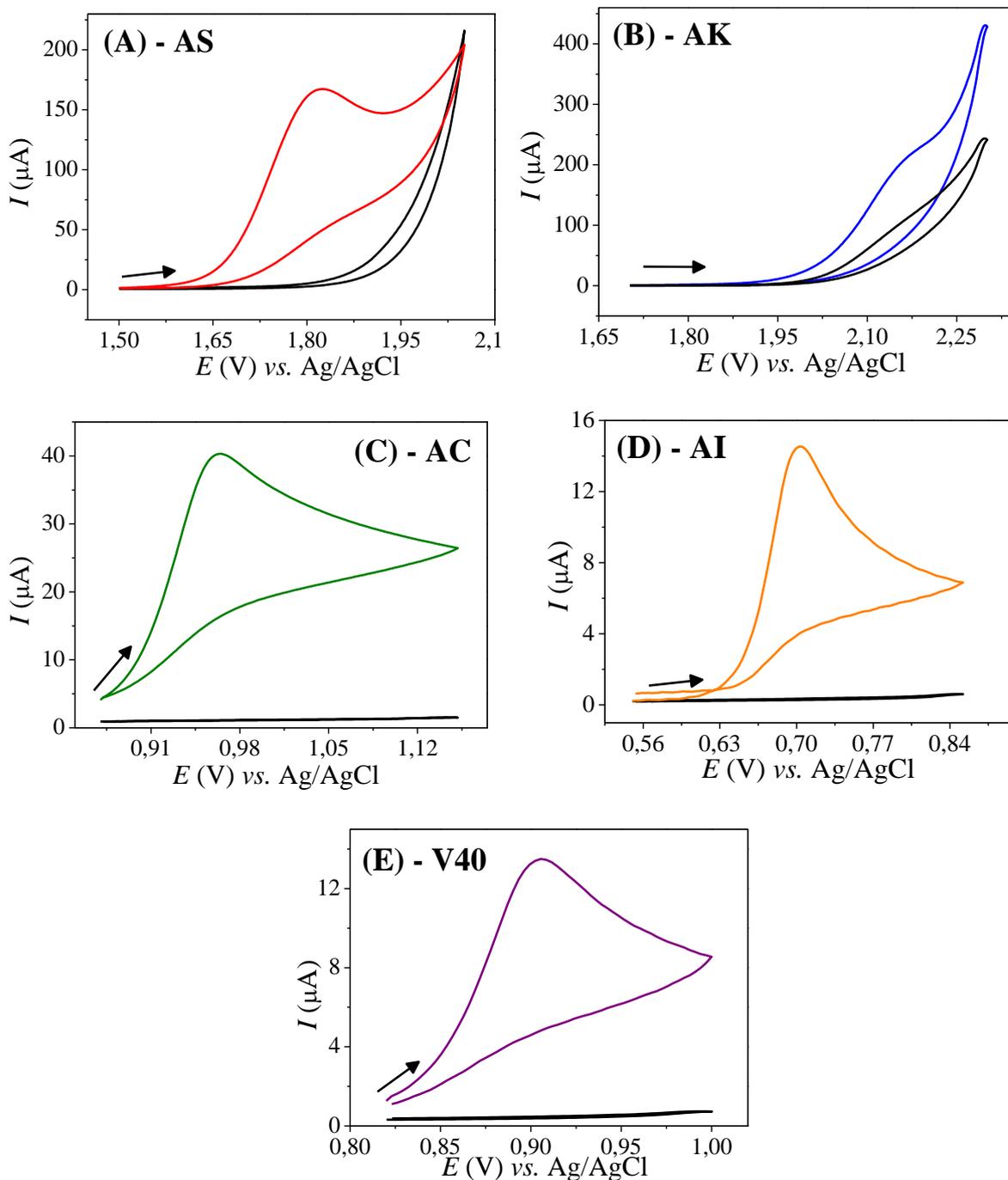


FIGURA 4.1 – Voltamogramas cíclicos empregando-se o eletrodo de BDD PTC, (A) na ausência (—) e na presença (—) de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS; (B) na ausência (—) e na presença (—) de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AK; (C) na ausência (—) e na presença (—) de $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$ de AC; (D) na ausência (—) e na presença (—) de $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de AI; (E) na ausência (—) e na presença (—) $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de V40. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2 – Estudo do efeito dos pré-tratamentos eletroquímicos sobre o eletrodo de BDD

Como já mencionado na Seção 1.3.1, o pré-tratamento eletroquímico feito no eletrodo de BDD pode aumentar significativamente a atividade eletroquímica deste eletrodo para um determinado analito, sendo dependente da terminação superficial do eletrodo (terminação hidrogênio ou oxigênio). Outrossim, o aumento da atividade eletroquímica pode aumentar o desempenho analítico do método eletroquímico como maior detectabilidade (valores menores de LD e LQ), maior sensibilidade (aumento do coeficiente angular da curva analítica), aumento da seletividade (quando há diminuição do potencial de trabalho) entre outros. Assim fez-se um estudo da influência dos diferentes pré-tratamentos (catódico e anódico) do eletrodo de BDD em relação ao comportamento eletroquímico dos edulcorantes e corantes estudados.

4.2.1 – Determinação da área eletroativa do eletrodo de BDD com os diferentes pré-tratamentos

Primeiramente, para verificar a influência dos pré-tratamentos (anódico e catódico) na área eletroativa do eletrodo de BDD, fez-se um estudo empregando-se a CV em diferentes velocidades de varredura de potencial. Para este estudo o eletrodo de BDD foi PTA aplicando-se uma densidade de corrente de $0,50 \text{ A cm}^{-2}$ por 60 s ou PTC aplicando-se $-0,50 \text{ A cm}^{-2}$ por 300 s ambos em solução de H_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Neste estudo, as medidas voltamétricas foram feitas em solução de hexacianoferrato (III) de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, cujo o coeficiente de difusão é conhecido e igual a $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ¹⁵⁹. Na FIGURA 4.2 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos neste estudo. Na FIGURA 4.2 A são apresentados os resultados obtidos com o eletrodo PTA e na FIGURA 4.2 B para o eletrodo PTC. Pode ser visto também nestas figuras os

gráficos de corrente de pico anódica (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$).

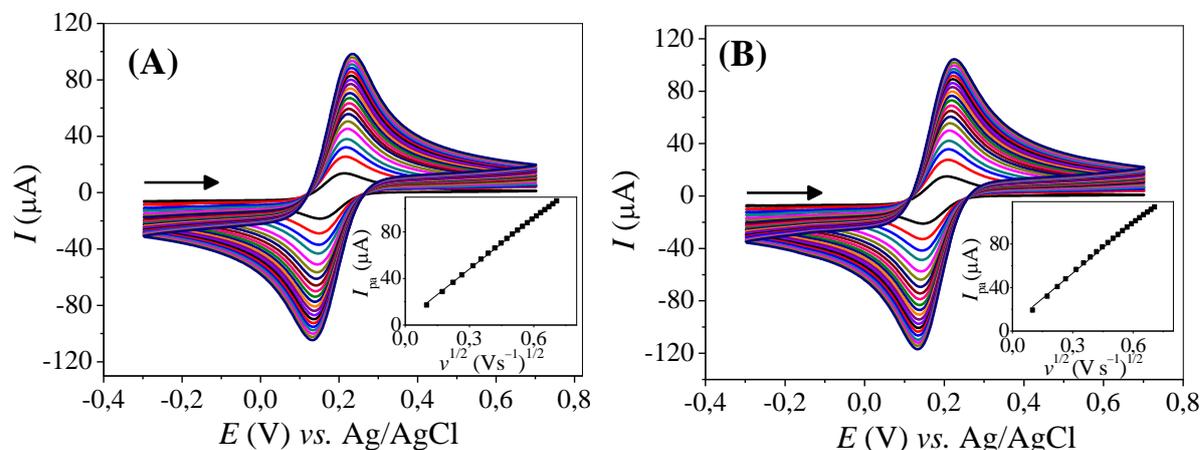


FIGURA 4.2 – Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial (10; 30; 50; 70; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300; 325; 350; 375; 400; 425; 450; 475 e 500 mV s^{-1}) em solução de hexacianoferrato (III) de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; (A) para o BDD PTA e (B) para o BDD PTC. Os gráficos inseridos correspondem à relação linear da corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. Eletrólito suporte: $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Para calcular a área eletroativa para o eletrodo de BDD com diferentes pré-tratamentos, empregou-se a equação de Randles-Sevcik^{160,161}:

$$\pm I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{EQUAÇÃO 4.1}$$

sendo I_p a corrente de pico anódica (+) ou catódica (-) (A), $v^{1/2}$ a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (V s^{-1}), n o número de elétrons envolvidos na reação, A a área eletroativa (cm^2), D o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e C a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}).

O coeficiente angular obtido na regressão linear de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ foi aplicado na EQUAÇÃO 4.1, com os valores de $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ¹⁵⁹, $n = 1$

e $C = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$. Na TABELA 4.1 são mostrados os valores de área geométrica e os valores de área eletroativa determinados para o eletrodo de BDD com cada um dos pré-tratamentos. Nota-se que as áreas eletroativas do eletrodo de BDD com os diferentes pré-tratamentos são menores que a área geométrica e que as áreas eletroativas obtidas nestas duas condições são praticamente iguais, o que indica que, a melhora da atividade eletroquímica do eletrodo de BDD sobre alguns analitos, não está relacionada apenas a área eletroativa, mas provavelmente devido à interação do analito com os diferentes grupos funcionais promovidos pelo pré-tratamento na superfície do eletrodo de BDD.

TABELA 4.1 – Valores obtidos para as áreas eletroativas do eletrodo de BDD empregando-se a equação de Randles-Sevcik

Área geométrica BDD (cm ²)	Área eletroativa BDD PTA (cm ²)	Área eletroativa BDD PTC (cm ²)
0,25	0,20	0,21

4.2.2 – Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o eletrodo de BDD para os edulcorantes e corantes

Inicialmente, o efeito do PTA e PTC foram avaliados empregando-se a CV e soluções dos analitos de interesse. Devido às variações significativas da linha base (dados não mostrados), especialmente para aqueles analitos que são eletroativos (AS e AK) em potenciais elevados, a seleção do melhor tratamento do eletrodo foi prejudicada. Assim, optou-se em utilizar a SWV nestas avaliações.

Para o estudo do efeito do pré-tratamento eletroquímico sobre o eletrodo, realizou-se um PTA (0,50 A cm⁻² por 60 s) ou PTC (-0,50 A cm⁻² por 120 s) em solução de H₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹. Na FIGURA 4.3 são apresentados os

voltamogramas de onda quadrada obtidos com o eletrodo de BDD PTA ou BDD PTC para os edulcorantes AS (FIGURA 4.3 A) e AK (FIGURA 4.3 B) em H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Pode-se notar que para o AS houve uma melhora na resposta eletroquímica com o eletrodo de BDD PTA em termos de maior intensidade de corrente obtida e diminuição do potencial de oxidação. O contrário foi obtido com o eletrodo de BDD PTC. Já para o AK, com o eletrodo de BDD PTA houve um pequeno aumento no potencial de oxidação, ocorrendo o contrário com o eletrodo de BDD PTC. Como o interesse neste trabalho foi a análise simultânea destas substâncias (analitos), escolheu-se o PTA para ser realizado no BDD para detecção destes analitos, por ter apresentado uma maior atividade eletroquímica para a ocorrência da reação de oxidação, principalmente do AS. Este comportamento foi contrário ao esperado, uma vez que em todos os trabalhos realizados no grupo^{22,23,126,127}, com diferentes analitos e com o eletrodo de BDD, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o eletrodo pré-tratado catodicamente. Assim, é necessário maiores estudos para entender a interação que ocorre entre os analitos e os grupos funcionais na superfície do BDD. Alguns artigos são encontrados na literatura com discussões sobre o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD e o efeito dos diferentes pré-tratamentos^{28,134,136}. Porém, ainda não há uma explicação satisfatória para as interações da superfície do eletrodo pré-tratado e as características do analito. O efeito destes pré-tratamentos eletroquímicos sobre a superfície do eletrodo de BDD e a relação com as respostas voltamétricas obtidas para os diferentes analitos também é tema de pesquisa em nosso grupo.

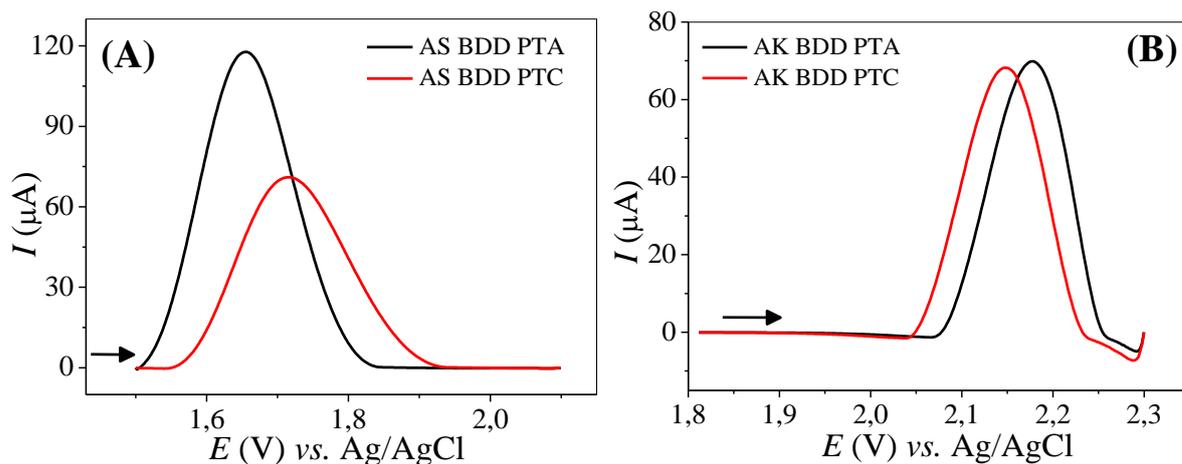


FIGURA 4.3 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD com diferentes pré-tratamentos em solução de (A) AS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) AK $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ após PTA (—) e após PTC (—). Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; ($f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

Já para os corantes AC (FIGURA 4.4 A), AI (FIGURA 4.4 B) e V40 (FIGURA 4.4 C), foi observado que o eletrodo de eletrodo de BDD PTC apresentou melhor resposta eletroquímica para a reação de oxidação, isto é, diminuição do potencial de oxidação (potencial de trabalho) e um aumento na intensidade do sinal de corrente (aumento do sinal analítico). Desta forma, o eletrodo de BDD PTC foi selecionado para a determinação dos corantes AC, AI e V40 em alimentos.

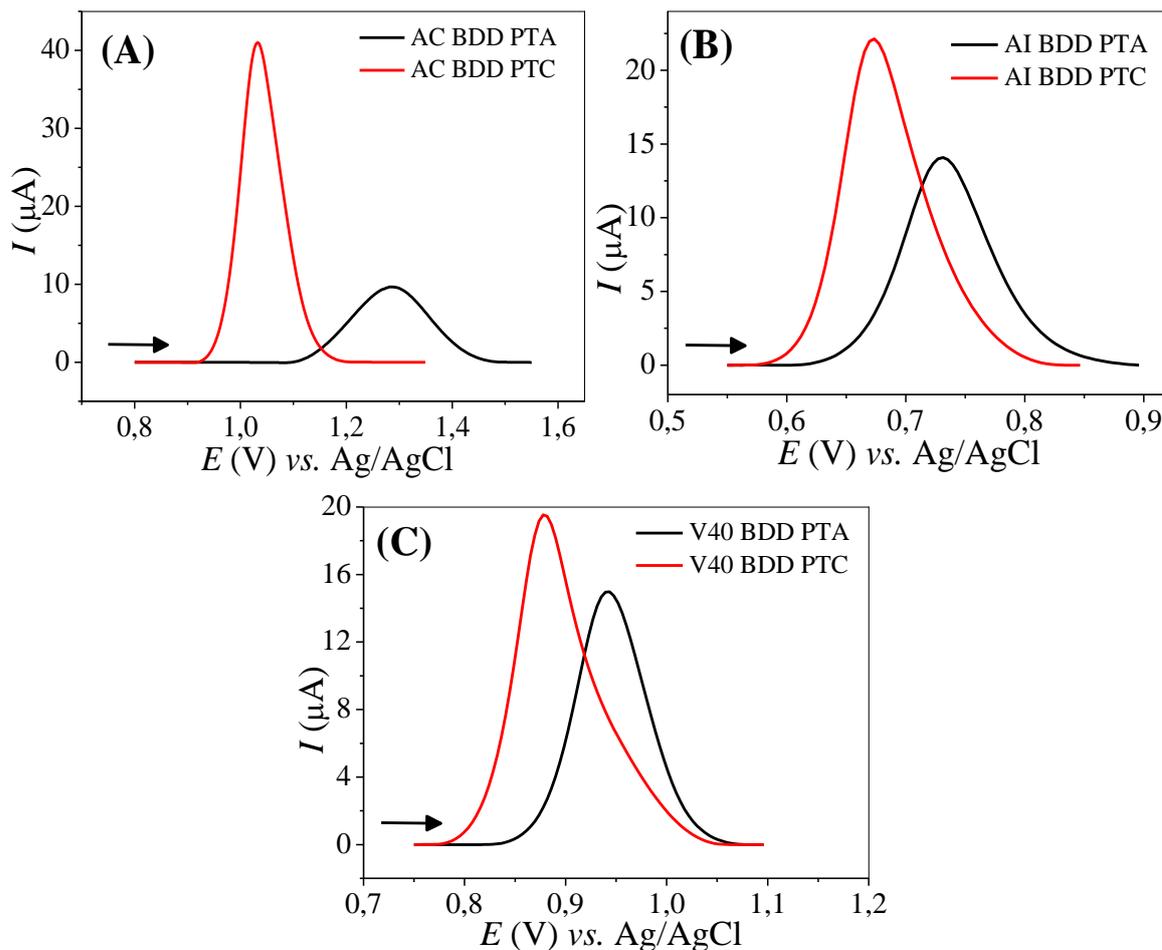


FIGURA 4.4 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD com diferentes pré-tratamentos em solução de (A) AC $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$, (B) AI $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (C) V40 $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ após PTA (—) e após PTC (—). Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; ($f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

4.2.3 – Estudo do efeito da densidade de corrente aplicada no pré-tratamento

O efeito da densidade de corrente aplicada no PTA sobre a resposta eletroquímica dos edulcorantes (AS e AK) e PTC sobre a resposta analítica dos corantes (AC, AI e V40) foi também investigada.

Na FIGURA 4.5 são mostrados os voltamogramas de onda quadrada obtidos para os edulcorantes (AS e AK) empregando-se o eletrodo de BDD PTA e para os corantes (AC, AI e V40) utilizando-se o BDD PTC com a

aplicação de diferentes densidades de corrente (0,05; 0,10; 0,50 e 1,00 A cm⁻²). Como pode ser observado, para AS e AC (FIGURA 4.5 A e C, respectivamente) ocorreu apenas deslocamento no potencial de oxidação para as diferentes densidades de corrente aplicada. Para o AK e V40 (FIGURA 4.5 B e E, respectivamente) não houve diferença significativa, tanto na intensidade de corrente, quanto no potencial de pico. No caso do AI (FIGURA 4.5 D), este analito foi o único que apresentou uma diferença significativa na intensidade de sinal de corrente, sendo que a magnitude do sinal analítico aumentou com o aumento da densidade de corrente aplicada até 0,10 A cm⁻², diminuindo em valores de densidade de corrente maiores.

Como as variações para a reação de oxidação destes analitos não foram tão significativas com as diferentes densidades de corrente aplicadas e também sabendo-se que, quanto menor a corrente aplicada, menor será o desgaste do eletrodo ao longo do tempo, optou-se por utilizar uma baixa densidade de corrente na realização do pré-tratamento.

No entanto, não foi possível utilizar a densidade de corrente de 0,05 A cm⁻² devido a baixa repetibilidade dos resultados ao longo de um dia de trabalho.

Assim, optou-se por utilizar a densidade de corrente de 0,10 A cm⁻² durante o pré-tratamento eletroquímico do eletrodo de BDD, podendo assim se obter resultados satisfatórios para a determinação destes aditivos alimentares e também prolongando o tempo de vida útil do eletrodo de BDD.

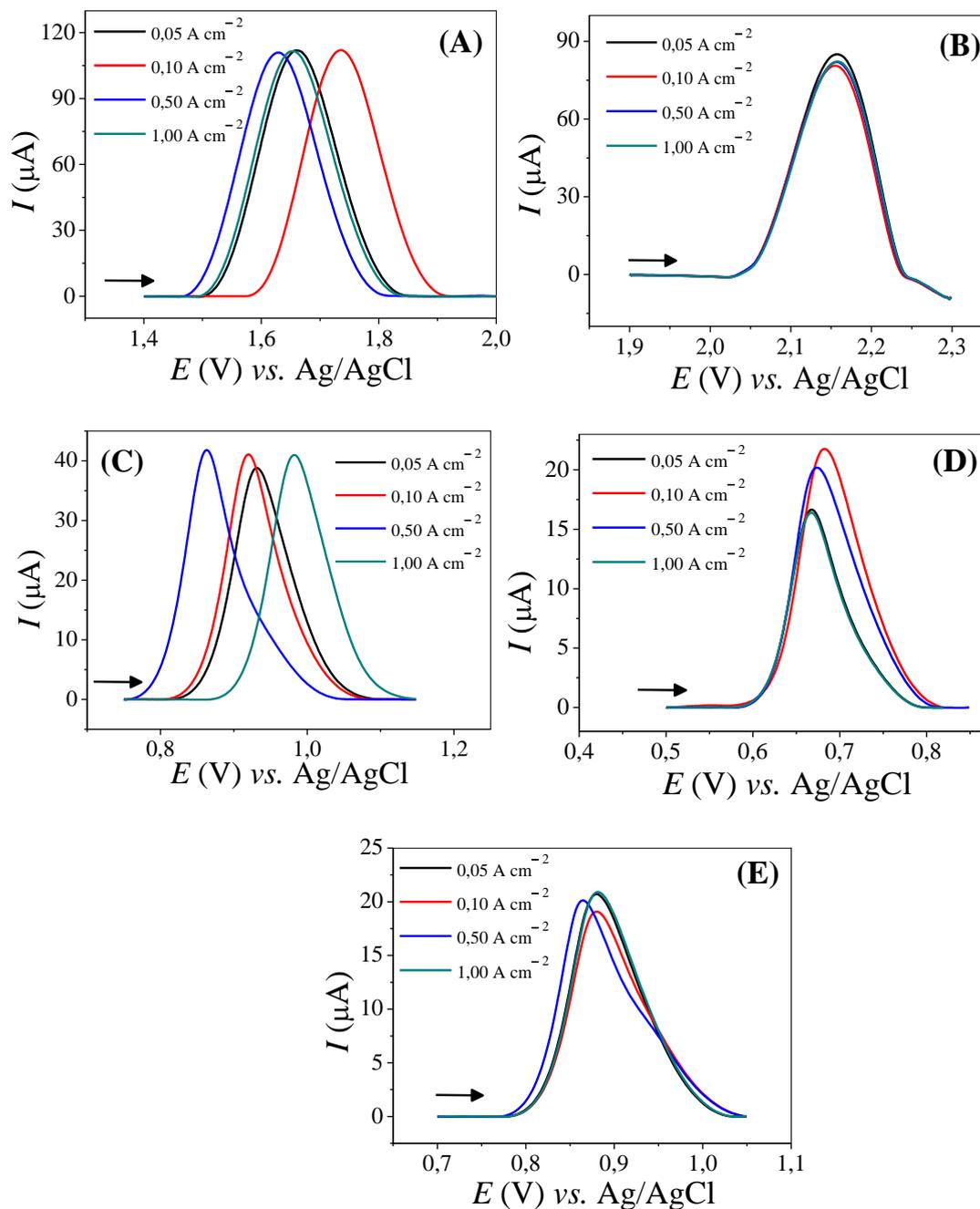


FIGURA 4.5 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA para edulcorantes e BDD PTC para os corantes com a aplicação de diferentes densidades de corrente ($0,05$; $0,10$; $0,50$ e $1,00 \text{ A cm}^{-2}$): (A) em solução de AS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) em solução de AK $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (C) em solução de AC $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$; (D) em solução de AI $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (E) em solução de V40 $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; ($f = 30 \text{ Hz}$, $\alpha = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

4.2.4 – Estudo do tempo da densidade de corrente aplicada no pré-tratamento

Também foi realizado um estudo do tempo de densidade de carga/corrente aplicada no PTA para as soluções dos edulcorantes (AS e AK) e no PTC para as soluções dos corantes (AC, AI e V40).

Foram realizados PTA no eletrodo de BDD aplicando-se densidade de corrente de $0,10 \text{ A cm}^{-2}$ por diferentes tempos: 30, 60 e 120 s, e a partir dos resultados obtidos para as soluções dos edulcorantes (AS e AK) (FIGURA 4.6), pode-se observar que para os menores tempos de pré-tratamento foram obtidas as maiores intensidades de corrente para a oxidação de AK, sendo que para AS não houve nenhuma diferença significativa. No entanto, o eletrodo de BDD PTA obtido com um menor tempo de pré-tratamento apresentou uma instabilidade das respostas (baixa repetibilidade) em um período de 8 h de trabalho. Sendo assim, para os estudos posteriores, optou-se por realizar o PTA aplicando $0,10 \text{ A cm}^{-2}$ durante 60 s, o que corresponde a uma carga aplicada de 6 C cm^{-2} .

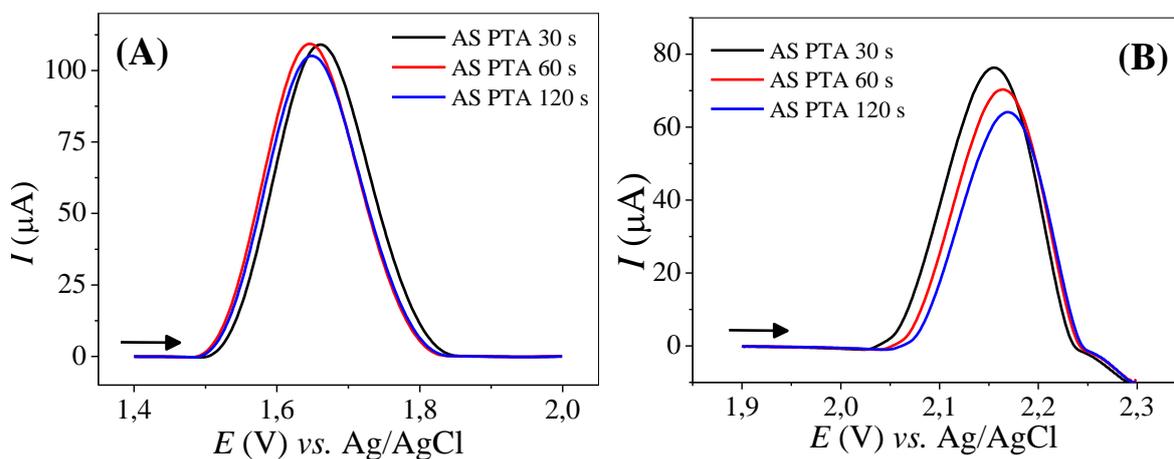


FIGURA 4.6 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em diferentes tempos (30, 60 e 120 s): (A) em solução de AS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) em solução de AK $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; ($f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

O mesmo estudo do tempo de aplicação de corrente foi realizado para o eletrodo de BDD PTC aplicando-se uma densidade de corrente de $-0,10 \text{ A cm}^{-2}$ no BDD nos tempos de 120, 180, 240 e 300 s. Na FIGURA 4.7 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o eletrodo de BDD PTC em diferentes tempos de aplicação de carga em soluções dos corantes (AC, AI e V40).

Nota-se que para todos os tempos de pré-tratamento a resposta voltamétrica para estes corantes foi praticamente a mesma e, por isso, optou-se por trabalhar com o PTC no tempo de 120 s, onde foi possível obter bons resultados, e corresponde a uma carga aplicada de -12 C cm^{-2} .

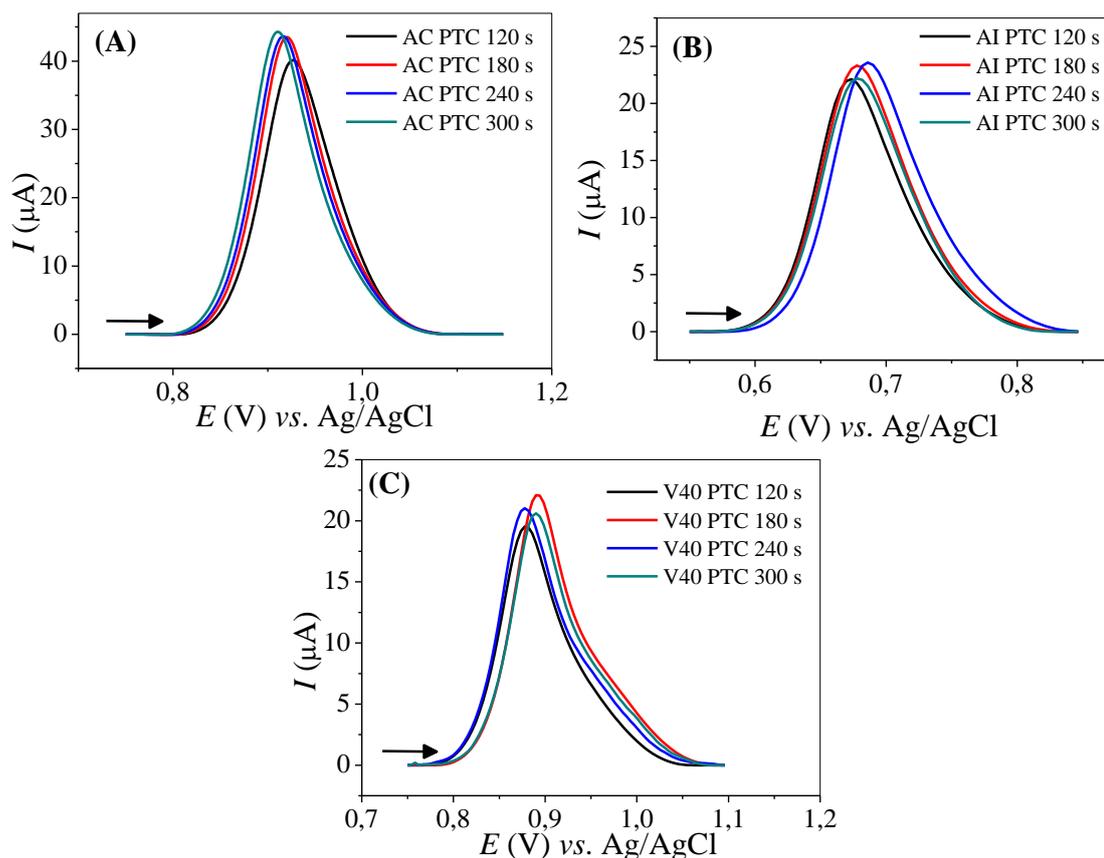


FIGURA 4.7 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTC em diferentes tempos (120, 180, 240 e 300 s): (A) em solução de AC $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) em solução de AI $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (C) em solução de V40 $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; ($f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

4.3 – Procedimentos Eletroanalíticos

4.3.1 – Estudo do efeito do eletrólito suporte

Experimentos iniciais para todos os analitos de interesse (AS, AK, AC, AI e V40) foram realizados em diferentes eletrólitos suportes, como H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,9), tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) e KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH_{cond.} 1,5). Os voltamogramas de onda quadrada obtidos em soluções contendo AS, AK, AC, AI e V40 nos diferentes eletrólitos suportes são apresentados na FIGURA 4.8.

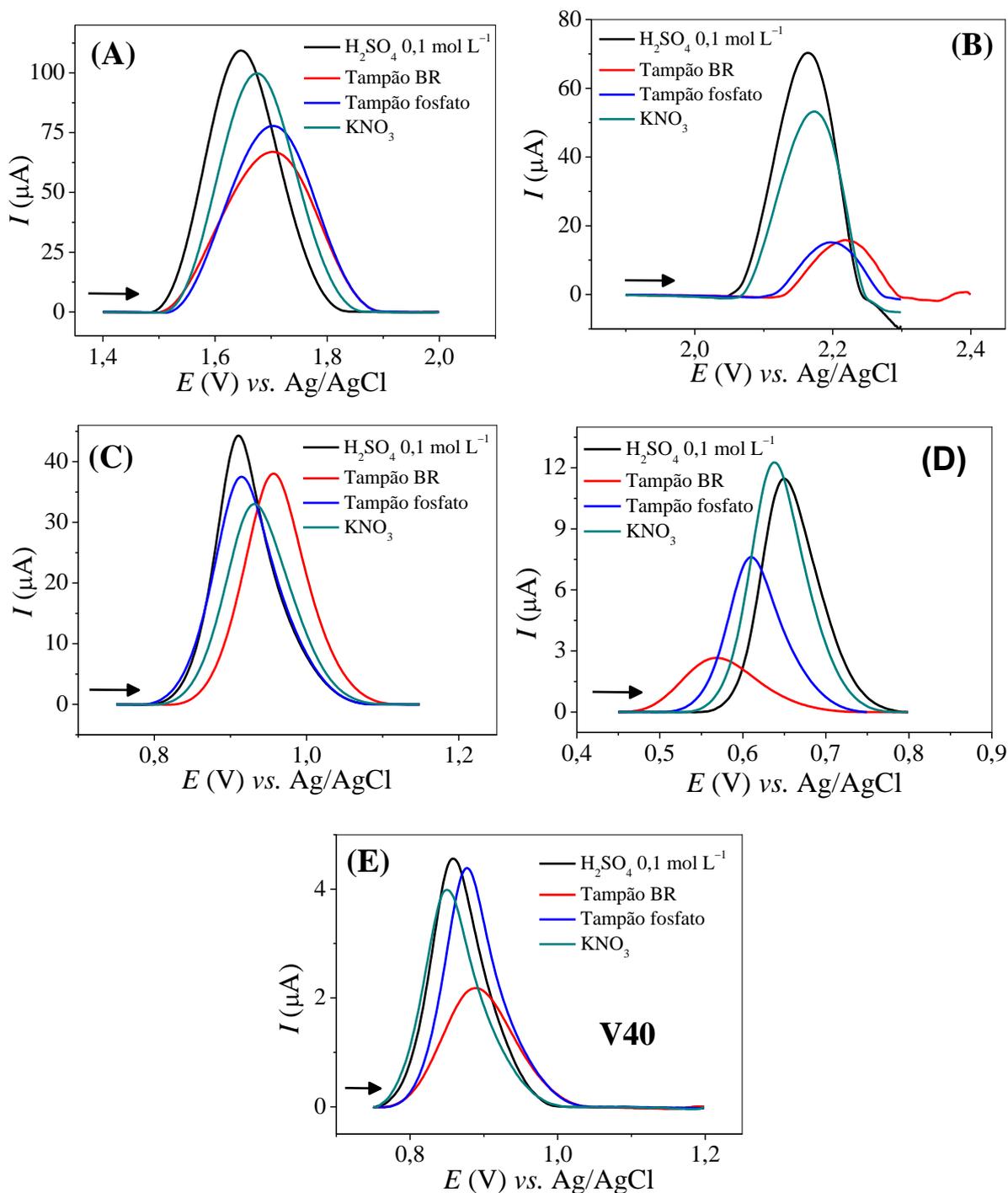


FIGURA 4.8 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes soluções de eletrólitos suporte contendo (A) AS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) AK $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (C) AC $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$; (D) AI $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (E) V40 $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólitos suportes: H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 1,9), tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) e KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH_{cond.} 1,5); ($f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$).

Considerando as respostas obtidas, o eletrólito suporte selecionado para as próximas medidas eletroanalíticas foi a solução de H_2SO_4 , por proporcionar um melhor perfil voltamétrico, maior magnitude do sinal analítico (corrente de pico) e potencial de oxidação mais próximo de zero para a maioria dos analitos (menor potencial de trabalho).

Posteriormente, estudou-se a influência da concentração do H_2SO_4 de 0,010 a 0,50 mol L^{-1} sobre o sinal analítico para estes aditivos alimentares utilizando-se o eletrodo de BDD. Na FIGURA 4.9 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos neste estudo.

Observou-se que a resposta voltamétrica muda com as diferentes concentrações do eletrólito suporte. A magnitude de pico aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração da solução de H_2SO_4 até uma concentração de 0,30 mol L^{-1} , mantendo-se praticamente constante em concentrações superiores, com exceção do AI que teve a magnitude de corrente aumentada em maior concentração. Porém, como o objetivo deste trabalho foi a determinação simultânea de pares destes analitos, optou-se por trabalhar com a solução de H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} por proporcionar a melhor resposta analítica para a maioria dos analitos.

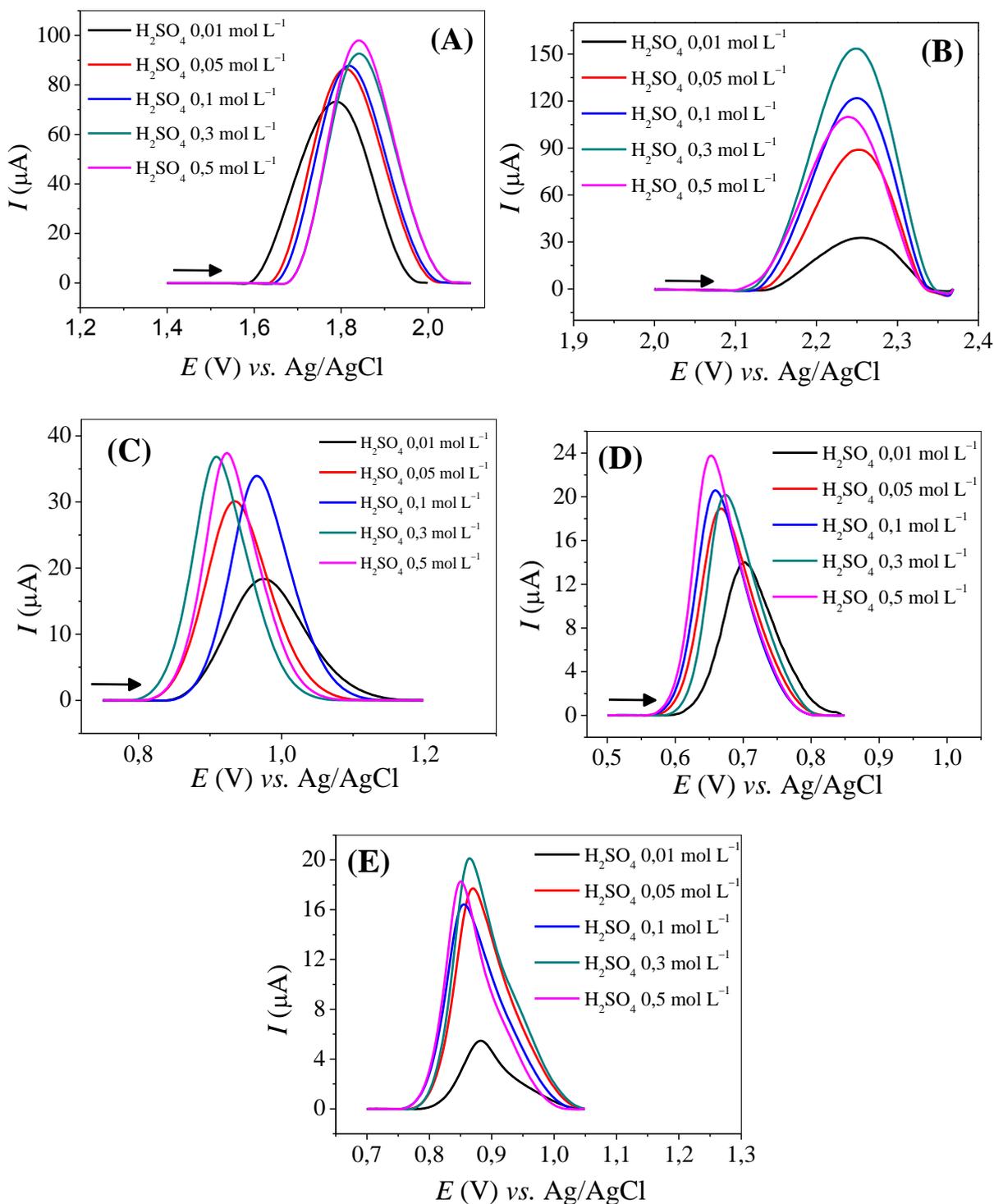


FIGURA 4.9 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD: (A) AS 1,0 mmol L⁻¹; (B) AK 4,0 mmol L⁻¹; (C) AC 0,40 mmol L⁻¹; (D) AI 0,10 mmol L⁻¹ e (E) V40 0,10 mmol L⁻¹ em diferentes concentrações do eletrólito suporte H_2SO_4 0,010; 0,05; 0,10; 0,30 e 0,50 mol L⁻¹; ($f = 30$ Hz, $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV).

4.3.2 – Determinação simultânea de AS e AC empregando a MPA-FIA e o eletrodo de BDD PTA

Este método foi desenvolvido para a determinação simultânea de dois aditivos alimentares, a saber: AS e AC, utilizando-se um sistema FIA-MPA e um eletrodo de BDD PTA.

Inicialmente, para o desenvolvimento do método proposto, foi necessária a escolha do pré-tratamento eletroquímico a ser realizado no eletrodo de BDD já que para o AS a melhor resposta analítica foi obtida quando o eletrodo de BDD foi PTA e para o AC a melhor resposta analítica foi com o eletrodo de BDD PTC. Analisando-se os voltamogramas apresentados na FIGURA 4.10, pode-se notar que com o PTA do eletrodo de BDD um menor potencial de trabalho foi obtido para o AS ($E = 1,61 \text{ V}$) em comparação com o PTC do eletrodo de BDD ($E = 1,73$), enquanto que para o AC, o potencial foi ligeiramente maior ($E = 0,98 \text{ V}$) que aquele obtido ($E = 0,91 \text{ V}$) para este analito quando se empregou eletrodo de BDD com o PTC. Considerando-se que as correntes de fundo são menores para a determinação de AC do que para a determinação de AS (ver FIGURA 4.1 C e A, respectivamente) e conseqüentemente o LD e LQ para este analito (AC) devem ser menores do que para o AS, assim selecionou-se o PTA a fim de favorecer a oxidação do AS com o objetivo de obter-se bons LD e LQ para este analito, além do deslocamento do pico de oxidação para potenciais menores. Ademais, cabe enfatizar que a concentração de cada um destes analitos é relativamente alta nos produtos analisados, não limitando assim o tipo de pré-tratamento aplicado. Neste caso, os diferentes pré-tratamentos feitos afetam os LDs e/ou LQs obtidos com eletrodo de BDD, porém como pode ser observado na Seção 4.3.2.4, foi possível obter excelente LD para estes analitos com o eletrodo de BDD PTA. O PTA foi realizado aplicando-se uma densidade de corrente de $0,10 \text{ A cm}^{-2}$ por 60 s (procedimento detalhado na Seção 3.4.1).

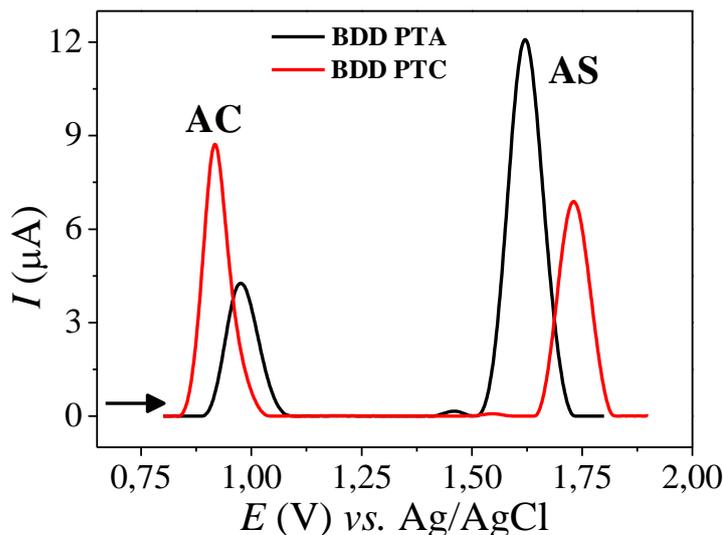


FIGURA 4.10 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD após PTA (—) e após PTC (—) na presença de AS 1,0 mmol L⁻¹ e AC 0,40 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹; ($f = 30$ Hz, $a = 40$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV).

4.3.2.1 – Estudo dos potenciais a serem aplicados para AC e AS

O objetivo principal deste trabalho foi a detecção dos analitos utilizando um sistema FIA. Considerando-se que o método em fluxo possui alta frequência analítica, que o sistema é fechado, minimizando assim os riscos de contaminação do operador, desenvolveu-se preferencialmente este método em fluxo. Sendo disso, os estudos que serão apresentados foram desenvolvidos em condições hidrodinâmicas.

Utilizando-se a técnica amperométrica convencional, definiu-se os potenciais a serem aplicados para cada analito, por meio da construção dos voltamogramas hidrodinâmicos, isto é, um gráfico das correntes obtidas nos diferentes potenciais aplicados (I vs. E) empregando-se o eletrodo de BDD PTA e solução contendo cada analito (AC 0,10 mmol L⁻¹ e AS 0,10 mmol L⁻¹), FIGURA 4.11. Como pode ser observado na FIGURA 4.11 (A), a oxidação do AC inicia-se em torno de 1,00 V atingindo o maior sinal de corrente em 1,30 V.

Após este potencial, o sinal de corrente permaneceu praticamente constante. Já na FIGURA 4.11 (B), empregando-se uma solução de AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, nota-se um aumento do sinal analítico a partir de $1,50 \text{ V}$, sendo o maior sinal analítico obtido no potencial de $1,70 \text{ V}$, permanecendo praticamente constante em potenciais mais elevados. Desta forma, selecionou-se para os estudos posteriores os potenciais de $1,30 \text{ V}$ e $1,70 \text{ V}$ para AC e AS, respectivamente.

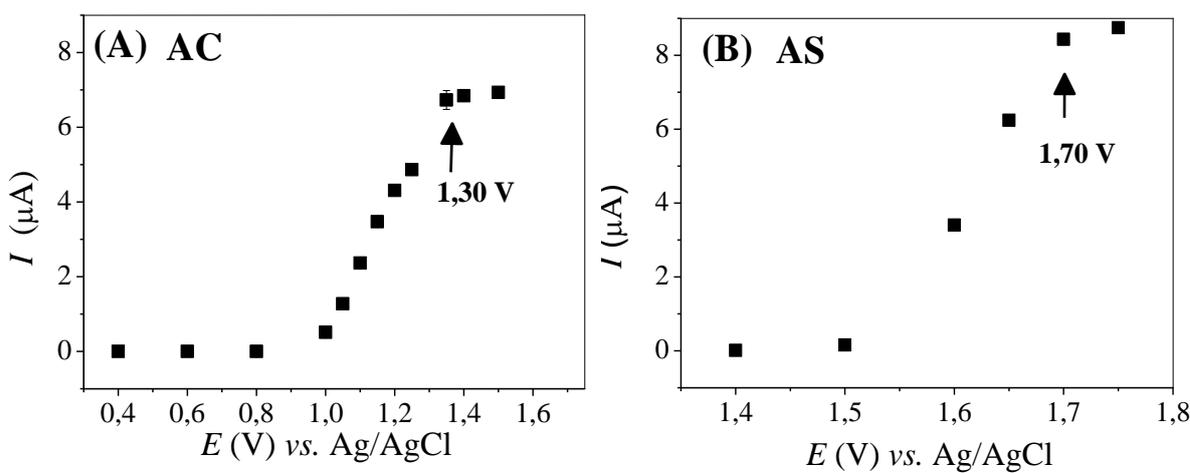


FIGURA 4.11 – Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos utilizando o eletrodo de BDD PTA, para (A) AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e para (B) AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume de injeção = $350 \mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3.2.2 – Estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial

Realizou-se um estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial para o AC ($1,30 \text{ V}$) e para o AS ($1,70 \text{ V}$). Estes dois pulsos de potencial foram aplicados variando-se o tempo de aplicação entre 100 e 250 ms sobre o eletrodo de BDD PTA para cada solução de AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Os gráficos da intensidade de corrente em função do tempo de aplicação do pulso de potencial são apresentados na FIGURA 4.12. Observa-se que para o AS ($1,70 \text{ V}$), a magnitude do sinal analítico diminuiu

significativamente com o aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial. Para AC (1,30 V), a magnitude do sinal analítico aumentou até o tempo de 150 ms e, em tempos superiores, ocorreu uma diminuição do sinal analítico. Por haver uma limitação na técnica de MPA, em que o tempo de análise é proporcional ao tempo de aplicação dos pulsos de potencial, optou-se por utilizar o tempo de aplicação de pulso de 200 ms para o AS (1,70 V), mesmo havendo uma perda de intensidade de sinal, o que não prejudicou o método em fluxo, uma vez que as amostras continham altas concentrações deste analito. Esta estratégia foi necessária para se ter um tempo de análise maior, possibilitando assim obter os sinais transientes para a construção da curva analítica e também das amostras em um mesmo amperograma. No caso do AC ($E = 1,30$ V), selecionou-se um tempo de aplicação de pulso de potencial de 150 ms, por apresentar um maior sinal analítico.

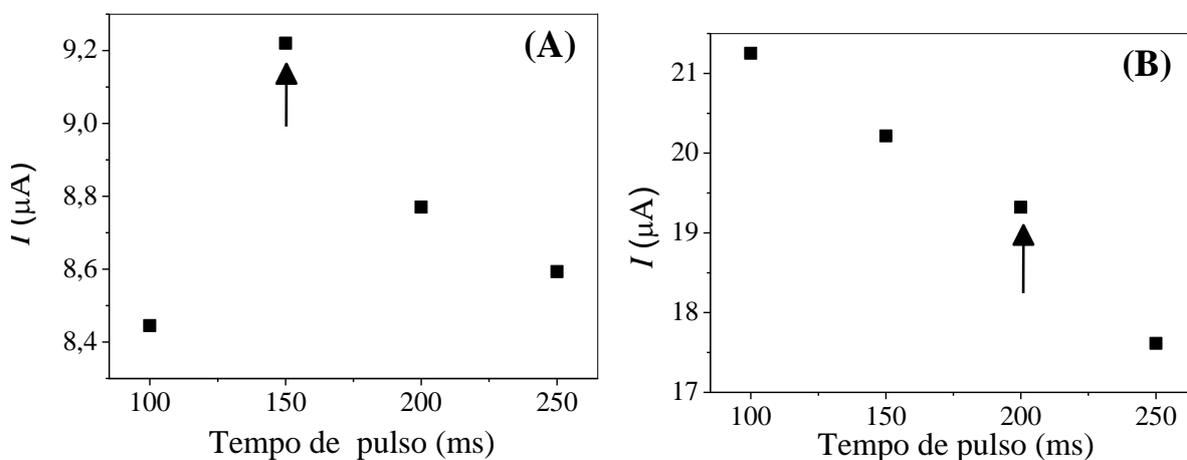


FIGURA 4.12 – Intensidade dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial: 100 a 250 ms, (A) AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ pulso de potencial 1,30 V e (B) AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ pulso de potencial: 1,70 V. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume de injeção = $450 \mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3.2.3 – Otimização dos parâmetros do sistema FIA

A vazão da solução transportadora (H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$) e o volume de amostra injetado são os parâmetros do sistema FIA que controlam o tempo de contato da zona da amostra com o eletrodo, por isso são importantes parâmetros que devem ser otimizados para se obter as melhores condições analíticas.

Sendo assim, avaliou-se o efeito da vazão da solução transportadora no intervalo de $1,0$ a $6,0 \text{ mL min}^{-1}$, aplicando-se os potenciais de $1,30$ e $1,70 \text{ V}$ no eletrodo de BDD PTA para uma solução de AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Nota-se na FIGURA 4.13 que, para ambos os analitos, o comportamento foi o mesmo, ou seja, houve um aumento de sinal analítico em toda intervalo de vazão investigado. No entanto, em vazões maiores do que $4,9 \text{ mL min}^{-1}$, observou-se uma alta pressão hidrodinâmica no sistema, o que prejudicou as medidas analíticas. Sendo isso, esta vazão foi selecionada por proporcionar maior sinal analítico e alta frequência analítica (120 determinações por hora).

Ademais, avaliou-se o efeito do volume de amostra injetado, no intervalo de 50 a $500 \text{ }\mu\text{L}$ para uma solução de AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Na FIGURA 4.14, pode ser observado um aumento do sinal analítico com o aumento do volume de amostra até um volume de $450 \text{ }\mu\text{L}$ para ambos os analitos. Após este volume injetado, o sinal analítico permaneceu praticamente constante. Este comportamento pode ser atribuído ao efeito da dispersão da amostra, gerando assim um gradiente de concentração.

Quanto menor o volume de amostra injetado, maior será o efeito da dispersão e menor será o sinal analítico. Neste trabalho não ocorre reação destes analitos durante o percurso analítico, deste modo a variação no sinal analítico com a variação do volume de amostra injetada está relacionada somente com as características hidrodinâmicas do sistema FIA-MPA. Desta maneira, um volume de $450 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra foi o selecionado para os estudos posteriores.

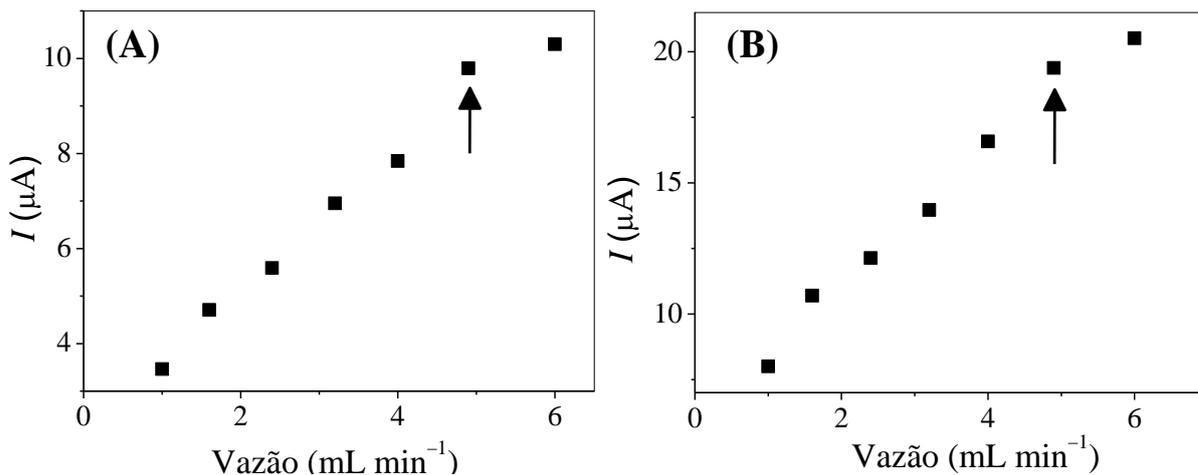


FIGURA 4.13 – Intensidade dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$), vazões: $1,0$ a $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ em soluções de: (A) AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; volume de amostra $400 \mu\text{L}$).

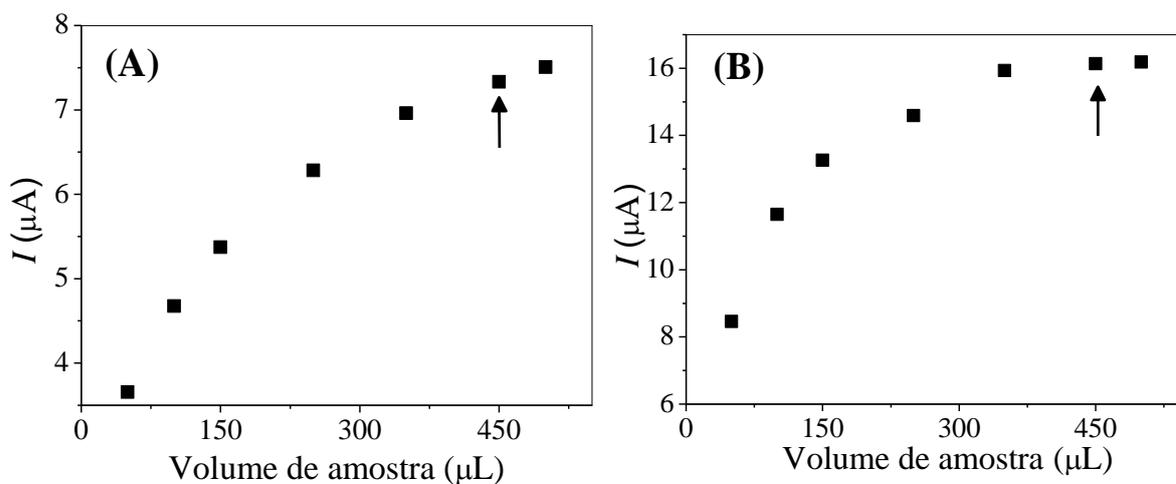


FIGURA 4.14 – Magnitude do sinal analítico (corrente) em função do volume da alça de amostragem variando de 50 a $500 \mu\text{L}$ para uma solução de: (A) AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; vazão $2,0 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3.2.4 – Estudo do comportamento amperométrico do AC e AS sobre o eletrodo de BDD com aplicação de uma sequência de pulsos de potencial

Para possibilitar a determinação simultânea de AC e AS sem interferência de um analito sobre o outro utilizando MPA, estudou-se a aplicação de uma sequência de dois pulsos de potencial no eletrodo de BDD em função do tempo sobre para uma solução de AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$, uma solução de AS $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$; ou solução contendo os dois analitos (AC e AS) nas mesmas concentrações. Na Figura 4.15 são apresentados os amperogramas obtidos neste estudo usando a técnica MPA acoplada ao sistema FIA com a aplicação de uma sequência de dois pulsos de potencial em função do tempo, a saber:

1. $E_{\text{det.1}} = +1,30 \text{ V} / 150 \text{ ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas de AC;
2. $E_{\text{det.2}} = +1,70 \text{ V} / 200 \text{ ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os analitos (AS e AC).

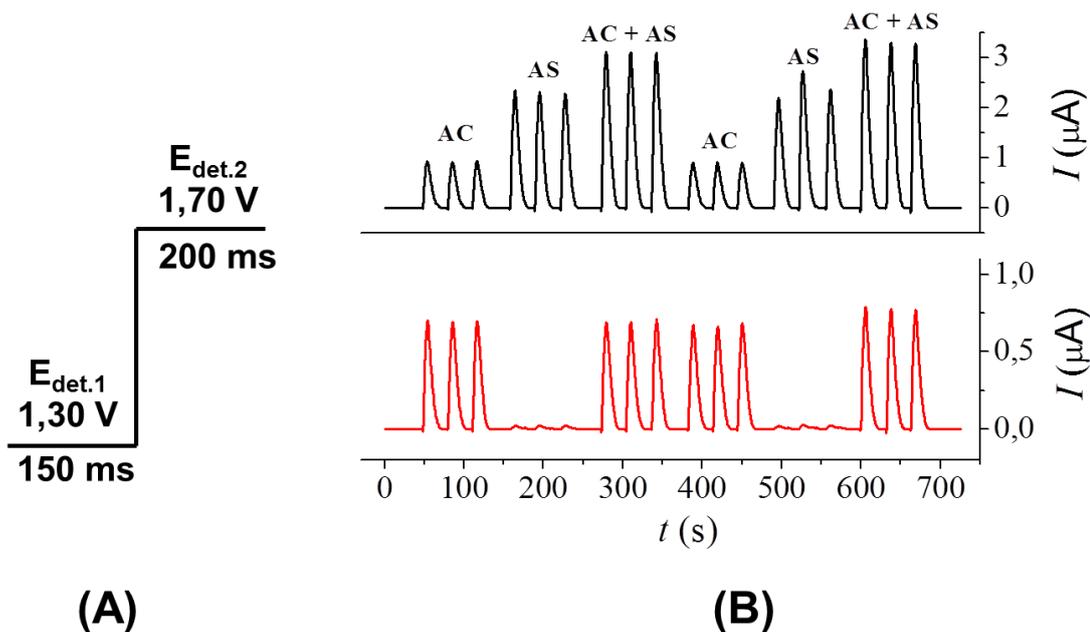


Figura 4.15 – (A) Sequência de aplicação de pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos ($n = 3$) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em solução de AC $0,10\text{ mmol L}^{-1}$, AS $0,10\text{ mmol L}^{-1}$ e AC + AS nas mesmas concentrações. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30\text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $450\text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $4,9\text{ mL min}^{-1}$.

Observa-se que o AC é oxidado em ambos os pulsos de potencial ($1,30\text{ V}$ e $1,70\text{ V}$). Porém, o AS é oxidado apenas em $1,70\text{ V}$. Sendo assim, pode-se concluir que o sinal de corrente obtido em $1,30\text{ V}$ está relacionado apenas com a oxidação do AC, e o sinal de corrente obtido em $1,70\text{ V}$, está relacionado com a oxidação de ambas as espécies. Deste modo, a quantificação de AC pode ser feita de forma direta ($I_{AC} = I_{E_{det.1}}$), enquanto que para a AS, a subtração das correntes ($I_{AS} = I_{E_{det.2}} - I_{E_{det.1}}$) permite-se obter os valores de corrente correspondentes apenas a concentração de AS. Porém, na Figura 4.15, pode ser observado que a oxidação de AC não gera a mesma magnitude de corrente em ambos os pulsos de potencial, o que impede uma simples subtração de sinal para se obter a corrente relacionada apenas com a oxidação do AS.

Conseqüentemente, uma solução adotada neste trabalho foi a construção de uma curva analítica aplicando ambos os pulsos de potencial sobre

o BDD em uma solução contendo apenas AC para verificar a diferença nos sinais de corrente obtidas para cada pulso. Assim, um fator de correção^{25,127} pode ser estimado:

$$\text{Fator} = \frac{I_{AC\ 1,70\ V}}{I_{AC\ 1,30\ V}} \quad \text{EQUAÇÃO 4.2}$$

Utilizando-se a EQUAÇÃO 4.2 o valor foi calculado mediante a média de cada ponto da curva analítica e obteve-se o valor de $1,45 \pm 0,08$. Na TABELA 4.2 são apresentados os valores do fator de correção em função de cada concentração de AC e a média obtida.

TABELA 4.2 – Valores do fator de correção em função de cada concentração de AC e a média entre os valores

Concentração de AC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fator de correção	Média do Fator de correção
0,10	3,64	
0,25	3,33	$3,08 \pm 0,72$
0,50	2,27	
0,75	1,67	
1,00	1,50	
2,50	1,45	
5,00	1,39	
7,50	1,39	
10,0	1,42	$1,45 \pm 0,08$
25,0	1,39	
50,0	1,41	
75,0	1,44	
100,0	1,44	

Sendo assim, considerou-se o valor do fator de correção para as concentrações mais altas, devido ao menor desvio e considerando que as amostras analisadas contém alto teor dos analitos alvos.

Para obter-se a mesma intensidade de corrente para o AC em $E_{\text{det.1}}$ e $E_{\text{det.2}}$ multiplicou-se $E_{\text{det.1}}$ por um fator de correção de $1,45 \pm 0,08$ para subtrair do sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.2}}$ e obter a intensidade de corrente proporcional a concentração de AS : $I_{\text{AS}} = I_{\text{Edet.2}} - (I_{\text{Edet.1}} \times 1,45)$.

Após a otimização de todos os parâmetros da técnica FIA-MPA, obteve-se as curvas analíticas injetando-se soluções padrão de uma mistura de AC e AS em ordem crescente e depois decrescente de concentrações ($0,15$ a $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e injeções de soluções de algumas amostras de produtos alimentícios contendo estes analitos. Na FIGURA 4.16 são apresentados os amperogramas corrigidos obtidos para o AS ($1,70 \text{ V}$) e para AC ($1,30 \text{ V}$) e as respectivas curvas analíticas.

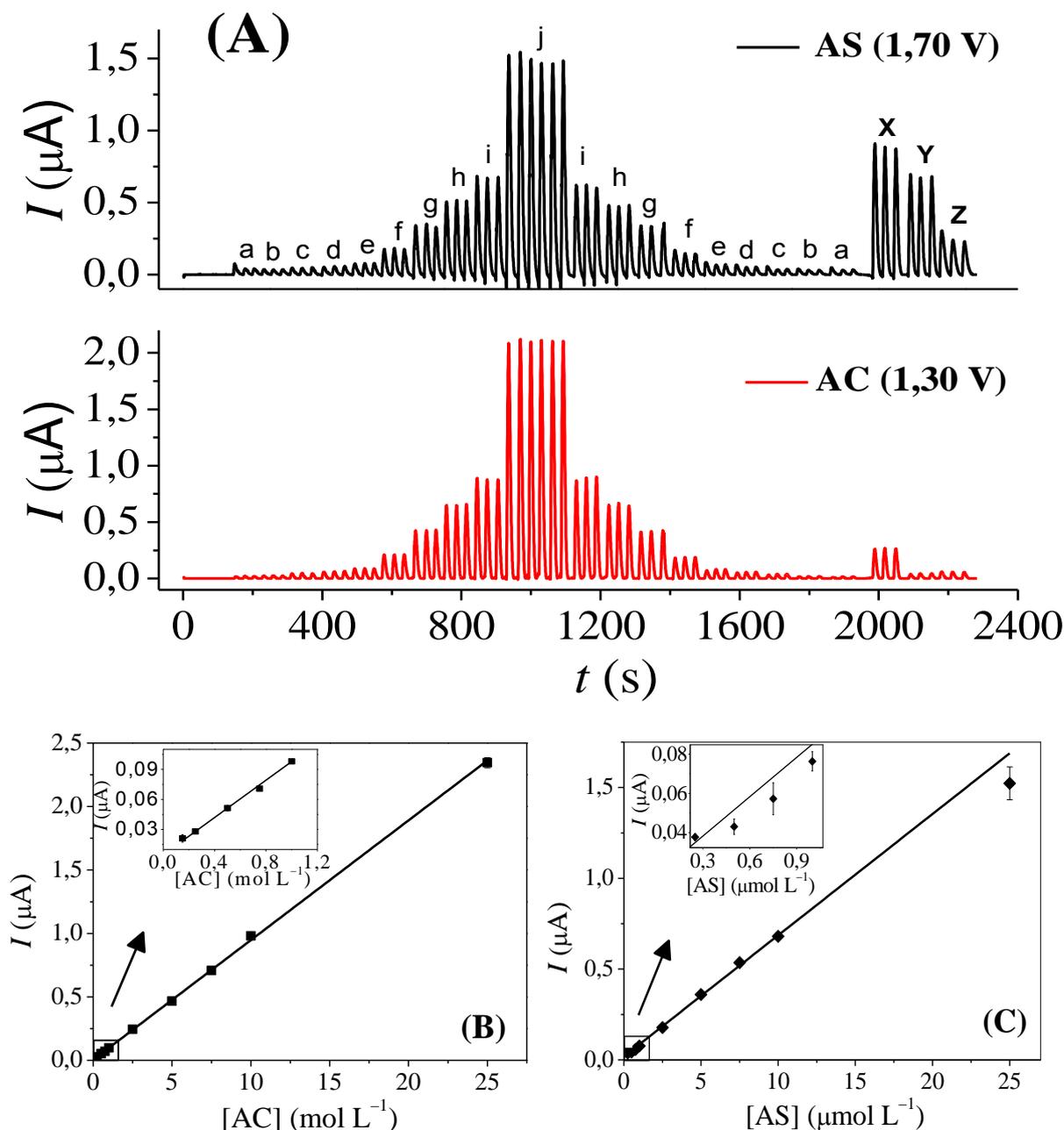


FIGURA 4.16 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em diferentes concentrações de uma mistura de AC (—) e AS (—). Concentrações de AS e AC ($n = 3$): (a-j) 0,15; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,00 e 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os sinais obtidos em X, Y e Z correspondem a algumas amostras analisadas. Curva analítica em (B) para AC e (C) para o AS. Solução transportadora: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} , volume de injeção = 450 μL e vazão = 4,9 mL min^{-1} .

As curvas apresentaram uma ampla faixa linear de resposta, para o AS, a primeira concentração injetada ficou fora da linearidade, obtendo-se uma linearidade na faixa de 0,25 a 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e as equações de regressão linear correspondentes foram:

$$I_{\text{pa}}/\mu\text{A} = 0,00394 + 9,44 \times 10^4 [\text{AC} (\text{mol L}^{-1})]; r = 0,999$$

$$I_{\text{pa}}/\mu\text{A} = 0,01824 + 6,68 \times 10^4 [\text{AS} (\text{mol L}^{-1})]; r = 0,995$$

O cálculo do limite de detecção foi realizado utilizando-se o método da razão sinal-ruído^{162,163}, ou seja, 3 vezes o sinal ruído (3S/N). Para a determinação desta relação sinal-ruído, uma comparação entre a medida do sinal analítico de uma solução de referência em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse e um branco (eletrólito suporte) é realizada. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. Para o AC e AS o resultado obtido foi 0,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para ambos os analitos.

A repetibilidade intra-dia foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ($n = 10$), para soluções contendo simultaneamente AS e AC em duas diferentes concentrações (0,50 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Na FIGURA 4.17 são apresentados os amperogramas obtidos neste estudo. Para o estudo da repetibilidade entre-dias foram feitas medidas em três diferentes dias ($n = 3$) com diferentes soluções contendo simultaneamente AC e AC em duas concentrações (0,50 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os desvios padrões relativos (RSD - do inglês, *Relative Standard Deviation*) para ambos os estudos são apresentados na TABELA 4.3. Os resultados de repetibilidade intra-dia e entre-dias obtidos foram satisfatórios com RSD menores que 7,8 % para intra-dias e menores do que 9,3 % para entre-dias para todas as concentrações dos analitos estudadas.

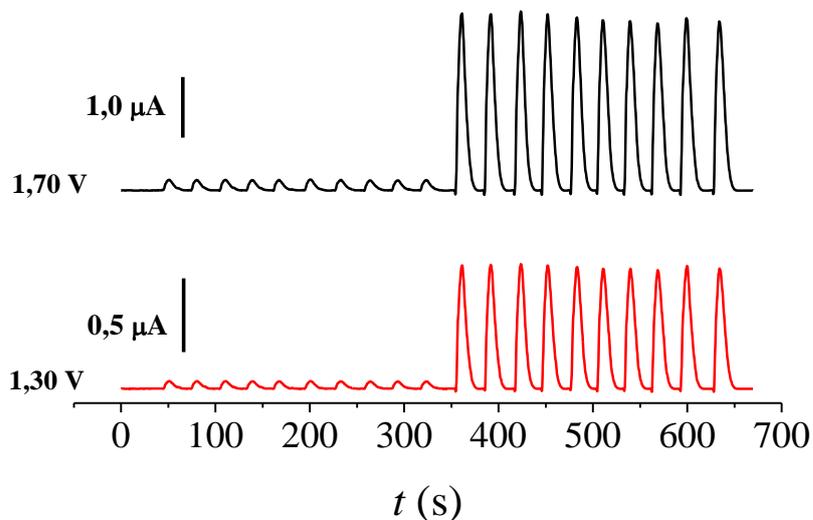


FIGURA 4.17 – Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em solução de AC e AS em duas concentrações: 0,50 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 10$). Solução transportadora: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} , volume de injeção = 450 μL e vazão = 4,9 mL min^{-1} .

TABELA 4.3 – Resultados obtidos no estudo da repetibilidade intra e entre dias para o par de aditivos alimentares determinados simultaneamente por FIA-MPA

Aditivo alimentar		RSD ^a (%)	
		Intra-dia	Entre-dias
AS ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,50	5,7	4,4
	10	2,0	0,4
AC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,50	2,3	9,2
	10	1,4	5,3

^a $n = 10$; ^b $n = 3$

4.3.2.5 – Estudo de interferentes em potencial

Para avaliar a seletividade do método proposto, o efeito de interferentes em potencial foi investigado por meio da adição de algumas substâncias comumente presentes nas amostras alimentícias analisadas em uma

solução padrão dos analitos AC e AS (ambos na concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os interferentes em potencial estudados foram: sacarose, ácido cítrico, acesulfame-K e citrato de sódio. Realizou-se também um estudo com a mistura de todos estes interferentes. Na TABELA 4.4 são mostrados os RSDs obtidos para cada analito em comparação com os interferentes em potencial.

TABELA 4.4 – Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes

Razão A:I	RSD (%)	
	AS: Sacarose	AC: Sacarose
1:1	1,7	1,8
1:10	-2,0	-1,9
	AS: Ácido cítrico	AC: Ácido cítrico
1:1	-4,4	-1,9
1:10	-2,2	-3,8
	AS: Acesulfame-K	AC: Acesulfame-K
1:1	-0,6	0,1
1:10	-0,6	-1,0
	AS: Citrato de sódio	AC: Citrato de sódio
1:1	-1,7	-1,0
1:10	1,7	0,9
	AS: Todos	AC: Todos
1:1	4,4	1,6

A= analito e I= interferente em potencial

Nota-se a partir destes resultados que não houve interferência significativa das substâncias comumente encontradas nas amostras analisadas, uma vez que variações menores do que $\pm 4,5 \%$ foram observadas no sinal analítico com a adição dos interferentes.

4.3.2.6 – Método comparativo – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O método eletroanalítico proposto empregando-se FIA-MPA e o eletrodo de BDD PTA, foi comparado com o método HPLC¹⁵⁶. Utilizando-se as condições cromatográficas como descritas na Seção 3.4.5, os analitos AC e AS apresentaram um tempo de retenção de 2,1 e 3,7 minutos, respectivamente. Na FIGURA 4.18 são apresentados os cromatogramas obtidos para o AC e o AS, e as respectivas curvas analíticas obtidas para cada um dos aditivos alimentares nas faixas de concentrações de 1,0 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AC e 25,0 a 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AS.

As equações de regressão obtidas para as curvas analíticas foram:

$$A \text{ (u.a.)} = 2,16 \times 10^4 + 3,49 \times 10^{10} [\text{AC (mol L}^{-1}\text{)}]$$

$$A \text{ (u.a.)} = 2,84 \times 10^4 + 8,85 \times 10^9 [\text{AS (mol L}^{-1}\text{)}]$$

Este método (HPLC) foi empregado para as mesmas amostras de alimentos, a fim de comparar os teores de AS e AC obtidos utilizando-se este método de analítico e o método amperométrico proposto nesta dissertação.

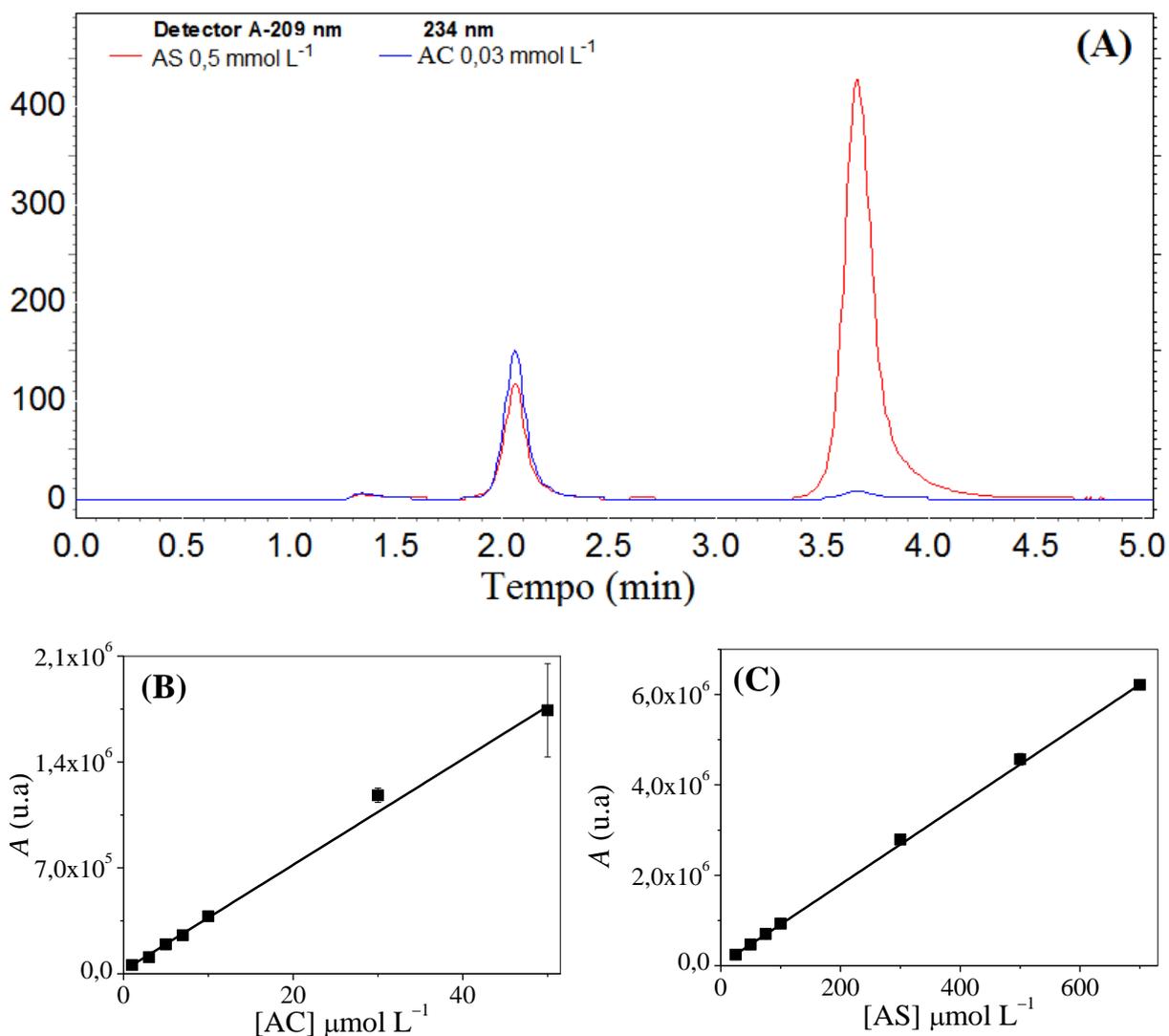


FIGURA 4.18 – (A) Cromatogramas obtidos para AS 0,50 mmol L⁻¹ (—) e para AC 0,030 mmol L⁻¹ (—). Curvas analíticas obtidas (B) para AC nas concentrações de: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10; 30; 50 μmol L⁻¹ e (C) para AS: 25,0; 50,0; 75,0; 100; 300; 500; 700 μmol L⁻¹. Fase móvel: 40 % de metanol/acetonitrila (70/30 v/v) e 60 % tampão fosfato pH 4,0. Vazão 1,0 mL min⁻¹.

4.3.2.7 – Aplicação do procedimento proposto empregando MPA-FIA na determinação simultânea de AS e AC em amostras comerciais

Por fim, o procedimento desenvolvido utilizando-se o eletrodo de BDD PTA e a técnica MPA acoplada ao sistema FIA foi empregado na determinação simultânea de AS e AC em amostras comerciais de gelatina e sólido preparado para suco. Para a determinação simultânea destes analitos utilizou-se o método por interpolação na curva analítica. Na TABELA 4.5 são apresentados os resultados obtidos para os teores de AS e AC determinados empregando-se o método amperométrico (FIA-MPA) e o cromatográfico (HPLC) para todas as amostras.

TABELA 4.5 – Resultados obtidos na determinação simultânea de AS e AC em produtos alimentícios empregando-se FIA-MPA e o método cromatográfico

AMOSTRAS	AS		AC		AS	AC
	HPLC ^a	MPA ^a	HPLC ^a	MPA ^a	ERRO (%) ^b	ERRO (%) ^b
Sólidos para suco (mg 100 g⁻¹)						
1	401±5	377±7	29±1	26±2	-6	-10
2	394±11	392±12	53±1	59±3	-0,5	11
Gelatinas (mg 100 g⁻¹)						
1	84±1	80±6	n.d. ^c	n.d. ^c	-5	-
2	216±20	215±1	4,3±0,3	4,3±0,1	-0,5	0,0

^a n = 3; ^b Erro (%) = (100 × (valor MPA – valor HPLC)/valor HPLC); ^c n.d. = não detectado

Para avaliar o nível de concordância dos resultados obtidos empregando-se os dois procedimentos, aplicou-se o teste *t*-pareado. Para o AC (n = 3) o $t_{\text{experimental}} = 0,34$ e para o AS (n = 4) $t_{\text{experimental}} = 1,12$, ambos os valores

foram menores que o $t_{\text{crítico}} = 4,30$ e $3,18$ para AC e AS, respectivamente. Estes resultados indicam que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos empregando-se o método proposto e o método de comparativo, a um nível de confiança de 95 %, estando os erros dentro de um intervalo aceitável.

4.3.3 – Determinação simultânea de AI e V40 empregando-se FIA-MPA e o eletrodo de BDD PTC

Nesta parte do trabalho será apresentado o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de dois corantes alimentícios, AI e V40 utilizando-se um sistema FIA-MPA e um eletrodo de BDD PTC.

Como discutido anteriormente (Seção 4.3.1), utilizou-se H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. Outrossim, conforme resultados apresentados na Seção 3.3.2, a atividade eletroquímica destes corantes (AI e V40) é melhorada quando utiliza-se o eletrodo de BDD PTC. Sendo assim, em todos os dias de trabalho, antes de realizar as medidas voltamétricas, o eletrodo de BDD foi previamente tratado catodicamente (PTC) aplicando-se uma corrente de $-0,10 \text{ A cm}^{-2}$ durante 120 s.

4.3.3.1 – Estudo dos potenciais a serem aplicados para AI e V40

Inicialmente, estudou-se o comportamento destes corantes em condições hidrodinâmicas. Foram construídos os voltamogramas hidrodinâmicos para cada corante utilizando-se a amperometria convencional, aplicando-se pulsos de potencial em torno do potencial de pico de cada analito, que como apresentado anteriormente estiveram em torno de $0,70$ e $0,90 \text{ V}$ para AI e V40, respectivamente. Na FIGURA 4.19 são mostrados os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para cada um dos corantes.

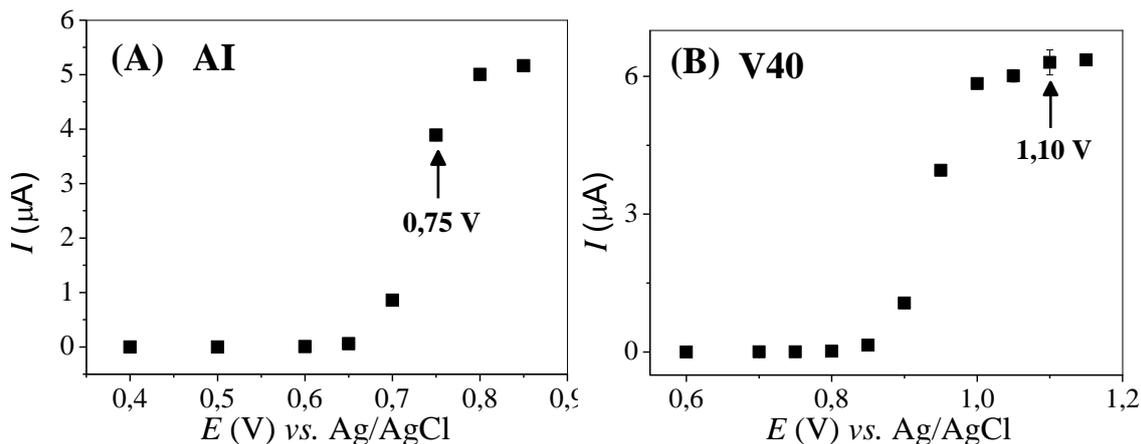


FIGURA 4.19 – Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos utilizando o eletrodo de BDD PTC, para o (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para o (B) V40 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume de injeção = $450 \mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$.

Analisando os resultados obtidos, nota-se que o sinal de corrente para AI começa a aumentar em torno de $0,70 \text{ V}$ e atinge um máximo de sinal de corrente no potencial de $0,80 \text{ V}$, enquanto que a oxidação de V40 inicia-se a partir de $0,90 \text{ V}$ e atinge o máximo de sinal analítico em $1,10 \text{ V}$. Apesar do sinal de corrente continuar aumentando nos potenciais acima de $0,75 \text{ V}$ para o AI, este potencial foi selecionado para o desenvolvimento do trabalho, uma vez que, em potenciais superiores começou a ocorrer a oxidação do V40, o que impossibilitaria a determinação simultânea dos dois analitos. Para a determinação de V40, selecionou-se o potencial de $1,10 \text{ V}$, onde obteve-se um elevado sinal de corrente.

4.3.3.2 – Estudo do efeito tempo de aplicação dos pulsos de potencial

Para cada pulso de potencial selecionado ($0,75$ e $1,10 \text{ V}$), estudou-se o tempo em que cada um deveria ser aplicado para obter-se as melhores condições analíticas. Estes dois pulsos de potencial foram aplicados variando-se o tempo de aplicação de 50 a 250 ms sobre o eletrodo de BDD PTC para uma

solução contendo ambos os corantes (AI e V40) na concentração de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Como pode ser observado na FIGURA 4.20 (A), para o AI o maior sinal analítico foi obtido no tempo de aplicação do pulso de potencial de 200 ms e, em (B) para o V40, o sinal de corrente diminuiu consideravelmente com o aumento do tempo de aplicação do pulso. Sendo assim, selecionou-se os tempos de aplicação de pulso de 200 ms para AI e 50 ms para V40.

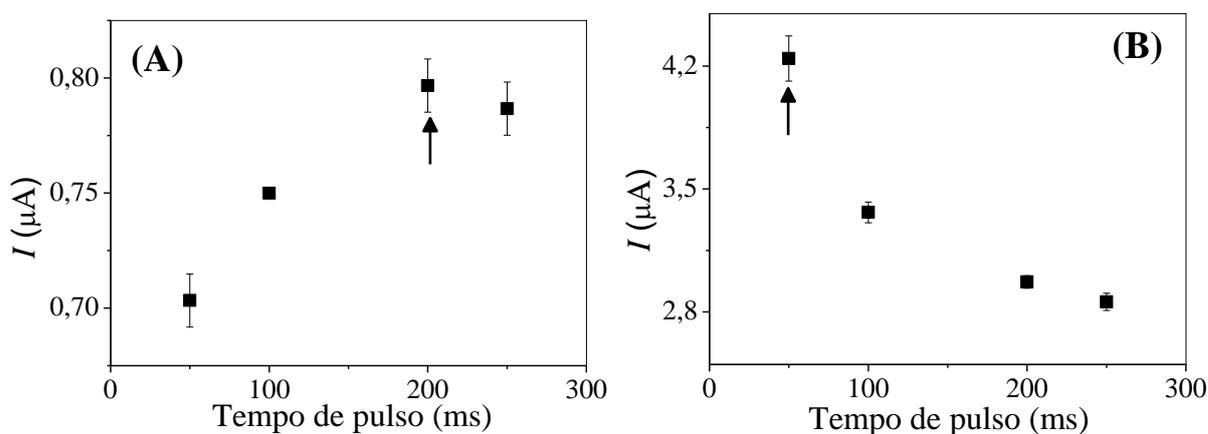


FIGURA 4.20 – Intensidade dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação de pulsos de potencial: 100 a 250 ms, (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pulso de potencial: 0,75 V e (B) V40 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pulso de potencial: 1,10 V. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume de injeção = $450 \mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3.3.3 – Otimização do sistema FIA

No estudo da influência da vazão da solução transportadora (H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$), a faixa de $1,0$ a $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ foi estudada, aplicando-se os potenciais de 0,75 e 1,10 V no eletrodo de BDD PTC para uma solução de AI e V40 ambos na concentração de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Na FIGURA 4.21 são apresentados os resultados obtidos neste estudo. Observa-se que para os dois corantes o comportamento foi o mesmo, ou seja, houve um aumento de sinal analítico em toda a faixa estudada, porém em vazões maiores do que $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ observou-se uma alta pressão hidrodinâmica no sistema, o que

prejudicou as medidas analíticas. Assim, a vazão de $4,9 \text{ mL min}^{-1}$ foi utilizada nos experimentos subsequentes.

Como já discutido, este comportamento era esperado uma vez que como não ocorre reação durante o percurso analítico, a influência da vazão no sinal analítico esta relacionada com as características hidrodinâmicas do sistema FIA-MPA que no caso foi o mesmo utilizado anteriormente.

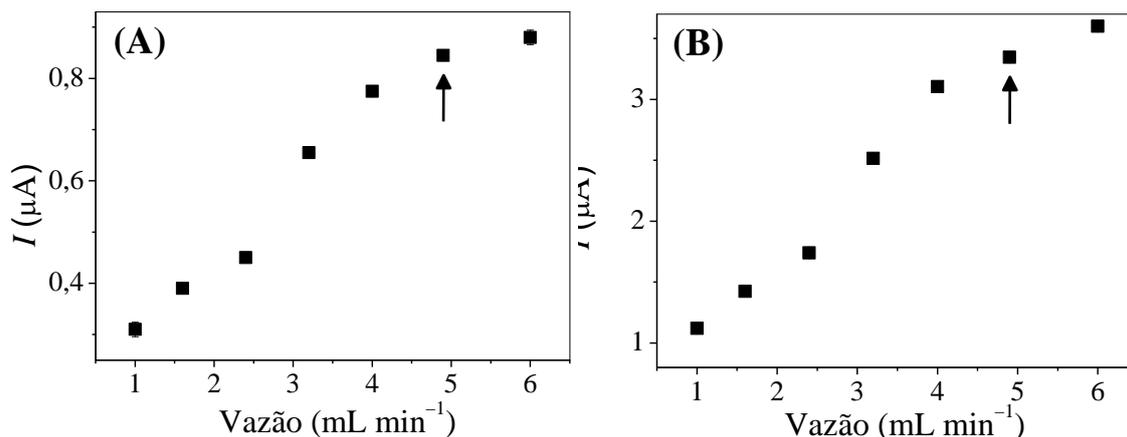


FIGURA 4.21 – Intensidade dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$), vazões: $1,0$ a $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ em soluções de: (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) V40 $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O efeito do volume de amostra foi investigado na faixa de 50 a $450 \mu\text{L}$ para uma solução $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AI e V40 simultaneamente. Nota-se na FIGURA 4.22 que o sinal de corrente aumenta conforme eleva-se o volume de amostra injetado. No entanto, optou-se por trabalhar com o volume de $350 \mu\text{L}$, por gerar menor concentração de resíduos, sem perda significativa do sinal analítico. Outrossim, nestas condições experimentais, a frequência analítica foi igual a 153 determinações por hora.

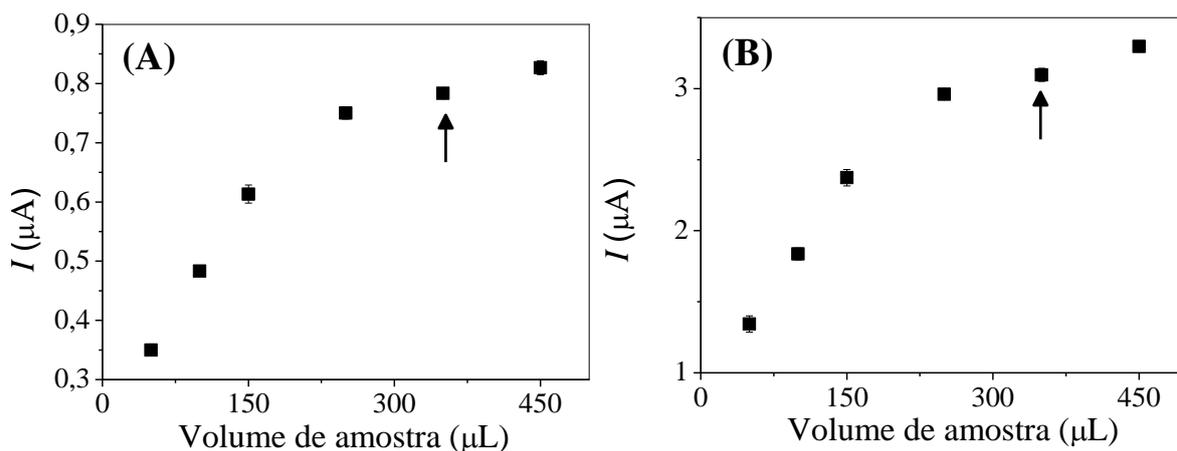


FIGURA 4.22 – Intensidade dos sinais de corrente em função do volume da alça de amostragem: 50 a 500 μL , (A) AI $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) AS $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.3.4 – Estudo do comportamento amperométrico do AI e V40 sobre o eletrodo BDD com aplicação de uma sequência de pulsos de potencial

Após otimizar todos os parâmetros envolvidos no sistema FIA-MPA, avaliou-se o método em fluxo com a aplicação no eletrodo de BDD de uma sequência de dois pulsos de potencial em função do tempo. Os quais foram:

1. $E_{\text{det.1}} = +0,75 \text{ V} / 200 \text{ ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas de AI;
2. $E_{\text{det.2}} = +1,10 \text{ V} / 50 \text{ ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os analitos (AI e V40).

Na FIGURA 4.23 são mostrados os amperogramas obtidos quando injetou-se soluções ($n = 3$) contendo apenas AI $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou V40 $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou uma mistura de AI e v40 nas mesmas concentrações.

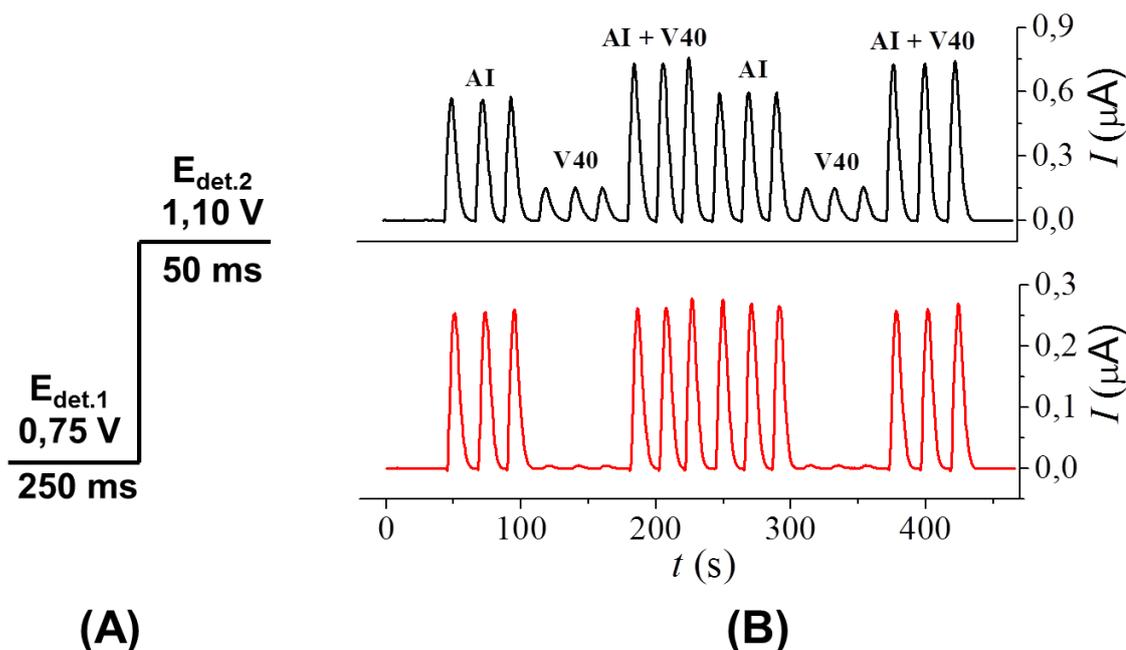


FIGURA 4.23 – (A) Sequência de aplicação dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTC em solução de AI $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, V40 $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AI + V40 nas mesmas concentrações. Solução transportadora: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $350 \mu\text{L}$ e vazão = $4,9 \text{ mL min}^{-1}$.

Observa-se que no pulso de potencial de 0,75 V apenas AI é oxidado. Já no pulso de potencial 1,10 V tanto AI quanto V40 são oxidados. Assim, a quantificação de AI pode ser feita de forma direta ($I_{AI} = I_{E_{det.1}}$), enquanto para o V40 é necessária a subtração das correntes ($I_{AI} = I_{E_{det.2}} - I_{E_{det.1}}$) para se obter os valores de corrente correspondente apenas a concentração de V40. Porém, como pode ser observado na FIGURA 4.23, a oxidação de AI não gera a mesma intensidade de corrente em ambos os pulsos de potencial, o que impede uma simples subtração de sinal para obter a corrente relacionada apenas com a oxidação do V40. Conseqüentemente, foi necessário calcular um fator de correção, assim como discutido no procedimento anterior (Seção 4.3.2.4). Assim, contruiu-se uma curva analítica aplicando-se ambos os pulsos de potencial (0,75 e 1,10 V) sobre o BDD PTC em uma solução contendo apenas AI para verificar a diferença nos sinais de corrente obtidas em cada pulso de

potencial. Aplicando-se a EQUAÇÃO 4.2, o valor calculado foi de $2,58 \pm 0,25$. Na TABELA 4.6 são apresentados os valores do fator de correção em função de cada concentração de AI e a média entre os valores.

TABELA 4.6 – Valores do fator de correção em função de cada concentração de AI e a média entre os valores

Concentração de AI ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fator de correção ^a	Média do fator de correção
0,07	2,90	
0,30	2,80	
0,50	2,80	
0,70	2,60	
0,90	2,60	$2,58 \pm 0,25$
2,00	2,40	
4,00	2,20	
6,00	2,30	

^a n = 3

Para obter-se a mesma intensidade de corrente para o AI em $E_{\text{det.1}}$ e $E_{\text{det.2}}$ multiplicou-se $E_{\text{det.1}}$ pelo fator de correção de $2,58 \pm 0,25$ para subtrair do sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.2}}$ e obter a intensidade de corrente proporcional a concentração de V40, $I_{\text{AI}} = I_{\text{Edet.2}} - (I_{\text{Edet.1}} \times 2,58)$.

Em seguida, foram feitos experimentos com a injeção de soluções contendo os padrões de uma mistura de AI e V40 em ordem crescente e depois decrescente de concentrações: 0,070 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AI, e 0,040 a 0,77 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para V40 e injeções de soluções de três amostras de balas. Na FIGURA 4.24 são apresentados em (A) os amperogramas corrigidos obtidos para soluções padrão de AI (0,75 V) e AC (1,10 V) e a injeção de três amostras, em (B) e (C) e as respectivas curvas analíticas.

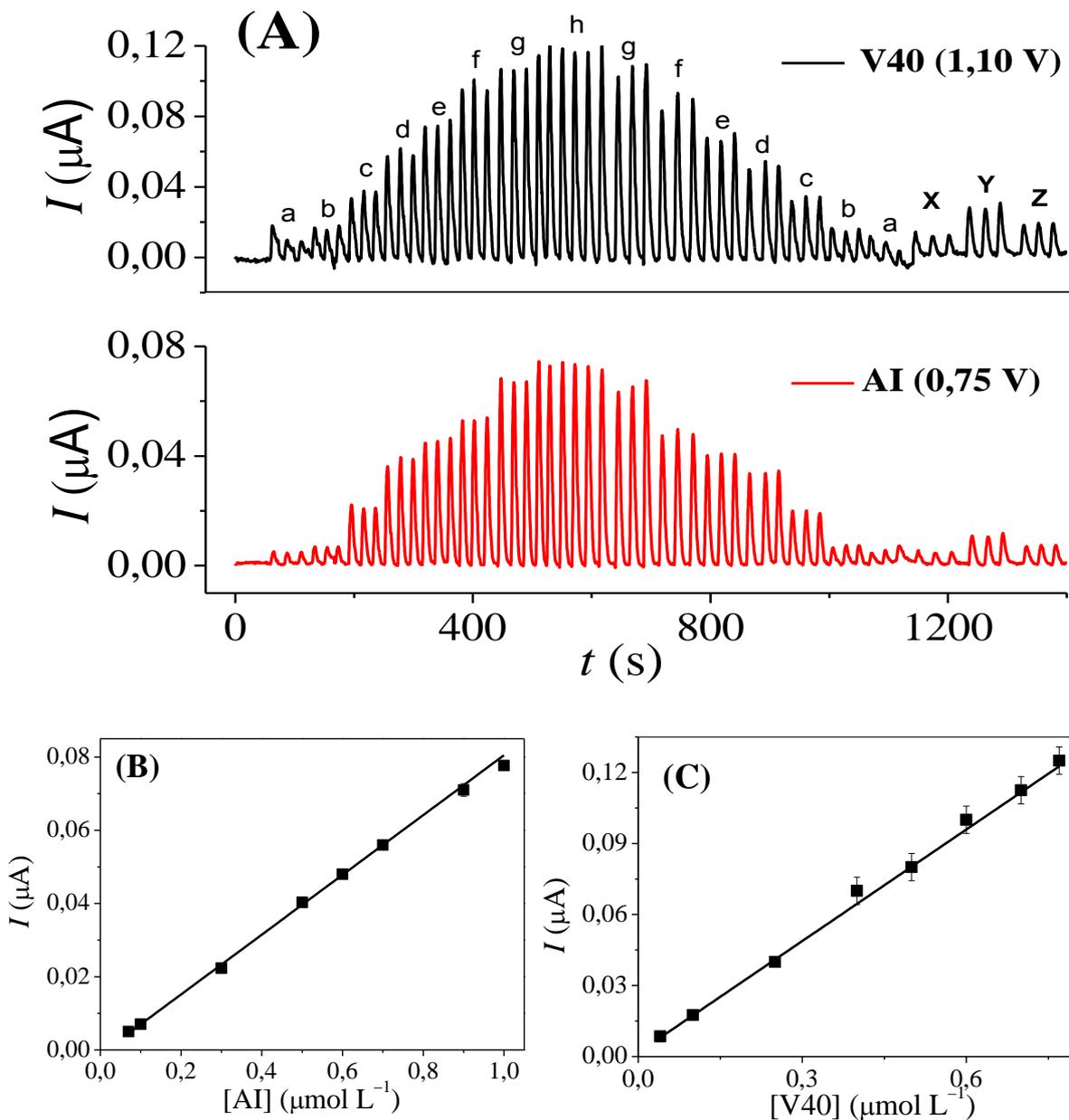


FIGURA 4.24 – (A) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTC em diferentes concentrações de uma mistura de AI (—) e V40 (—). Concentrações de AI: (a-h) 0,070; 0,10; 0,30; 0,50; 0,60; 0,70; 0,90 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e V40: (a-h) 0,040; 0,10; 0,25; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70 e 0,77 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e os sinais obtidos em X, Y e Z correspondem a algumas amostras analisadas. Curvas analíticas obtidas em (B) para AI e (C) para V40. Solução transportadora: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} , volume de injeção = 350 μL e vazão = 4,9 mL min^{-1} .

Como pode ser observado na FIGURA 4.24 (B) e (C), as curvas analíticas apresentaram uma faixa linear e as equações de regressão correspondentes foram:

$$I_{pa}/\mu A = -0,00292 + 2,04 \times 10^5 [AI/(\text{mol L}^{-1})]; r = 0,999$$

$$I_{pa}/\mu A = 0,00169 + 1,57 \times 10^5 [V40/(\text{mol L}^{-1})]; r = 0,998$$

Os limites de detecção (3 S/N) (calculados como descrito na Seção 4.3.2.4) obtidos foram 40 e 7,0 nmol L⁻¹ para AI e V40, respectivamente.

Também foram realizados os estudos de repetibilidade intra e entre-dias. Para a repetibilidade intra-dia foram feitas sucessivas injeções no mesmo dia (n = 10) de soluções simultâneas de AI e V40 em duas concentrações: AI 0,10 e 0,90 μmol L⁻¹; V40 0,070 e 0,70 μmol L⁻¹ (ver FIGURA 4.25). Para o estudo da repetibilidade entre-dias, foram feitas medidas em três diferentes dias (n = 3), nas mesmas concentrações. Os RSDs obtidos são mostrados na TABELA 4.7. Os resultados de repetibilidade intra-dia e entre-dias obtidos foram satisfatórios com RSDs menores que 8,6 % e 3,1 %, respectivamente para todas as concentrações estudadas.

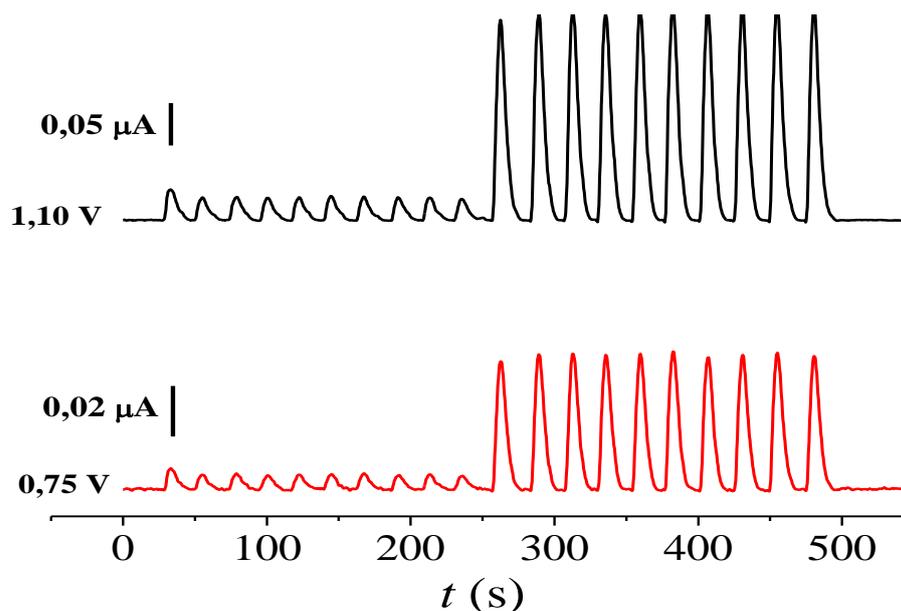


FIGURA 4.25 – Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de AI e V40 em duas concentrações diferentes: AI 0,10 e 0,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$; V40 0,070 e 0,70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 10$). Solução transportadora: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} , volume de injeção = 350 μL e vazão = 4,9 mL min^{-1} .

TABELA 4.7 – Resultados obtidos no estudo da repetibilidade intra e entre dias para o par de corantes alimentícios determinados simultaneamente por FIA-MPA

Aditivos alimentícios		Intra-dia RSD ^a (%)	Entre-dias RSD ^b (%)
AI ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,10	8,5	2,4
	0,90	2,3	3,0
V40 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,070	4,0	2,7
	0,70	2,5	1,1

^a $n = 10$; ^b $n = 3$

4.3.3.5 – Estudo de interferentes em potencial

Também realizou-se o estudo de análise de eventuais interferentes, para investigar a seletividade do método proposto. Interferentes em potencial como sacarose, glicose, citrato de sódio, aspartame, acesulfame-K e carboximetilcelulose (CMC) são comumente encontrados nas amostras de balas analisadas, e por isso estas substâncias foram adicionadas individualmente e, em outro estudo, em conjunto (mistura de todos os interferentes em potencial), em uma solução padrão dos corantes AI e V40 na concentração de $0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos. Na TABELA 4.8 são apresentados os RSDs obtidos para cada analito, equivalentes a comparação do sinal analítico na presença e na ausência dos interferentes em potencial. Analisando os resultados obtidos, observa-se que ocorreram variações menores do que $\pm 6,8 \%$ no sinal analítico com a adição destas substâncias, indicando que não há interferência significativa da matriz das amostras na determinação de AI e V40 empregando-se o método proposto.

TABELA 4.8 – Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes

Razão A:I	RSD (%)	
	AI: Sacarose	V40: Sacarose
1:1	5,9	-0,8
1:10	2,0	-2,5
	AI: Glicose	V40: Glicose
1:1	-2,0	-0,8
1:10	-1,0	-1,2
	AI: Citrato de sódio	V40: Citrato de sódio
1:1	-6,2	-5,7
1:10	-6,8	-4,4
	AI: Aspartame	V40: Aspartame
1:1	-2,1	-1,9
1:10	0,0	0,2
	AI: Acesulfame-K	V40: Acesulfame-K
1:1	-1,1	-4,6
1:10	4,1	-1,2
	AI: CMC	V40: CMC
1:1	0,0	-1,3
1:10	-6,3	-4,5
	AI: todos	V40: todos
1:1	0,0	1,9

A= analito e I= interferente em potencial

4.3.3.6 – Método comparativo – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para avaliar o desempenho do método proposto empregando-se FIA-MPA e o eletrodo de BDD PTC utilizou-se como método comparativo o HPLC¹⁵⁷, utilizando-se as condições cromatográficas como descritas na seção 3.4.5. Nestas condições, as moléculas de AI e V40 apresentaram um tempo de retenção de 18,9 e 11,1 min, respectivamente. Na FIGURA 4.26 são apresentados os cromatogramas obtidos para AI e V40 e os respectivos comprimentos de onda e curvas analíticas. As curvas analíticas foram

construídas na faixa de concentração de 10,0 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para ambos os corantes.

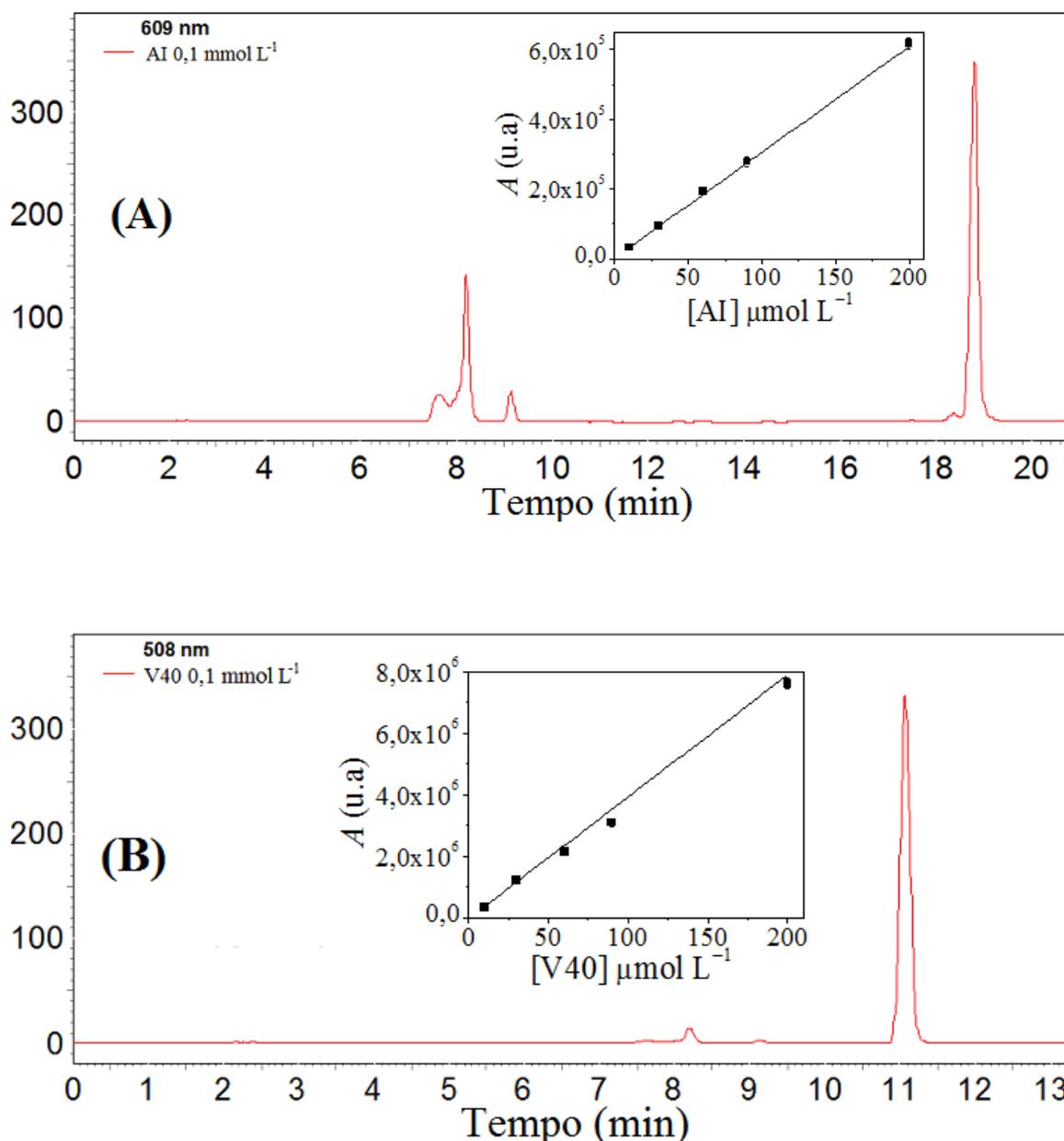


FIGURA 4.26 – Cromatogramas obtidos para (A): AI 0,10 mmol L⁻¹ e (B): V40 0,10 mmol L⁻¹. Os gráficos inseridos são as respectivas curvas analíticas obtidas (A) para AI nas concentrações de: 10,0; 30,0; 60,0; 90,0; 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) para V40 nas mesmas concentrações de: 10,0; 30,0; 60,0; 90,0; 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fase móvel: metanol/acetonitrila (80/20 v/v) e tampão acetato de amônio pH 7,5 (gradiente de eluição, TABELA 3.1). Vazão 1,5 mL min⁻¹.

As equações de regressão obtidas para as curvas analíticas foram:

$$A \text{ (u.a.)} = 1,85 \times 10^3 + 3,03 \times 10^9 [\text{AI (mol L}^{-1}\text{)}]$$

$$A \text{ (u.a.)} = -4,14 \times 10^4 + 3,97 \times 10^{10} [\text{V40 (mol L}^{-1}\text{)}]$$

Este método (HPLC) foi empregado para nas mesmas amostras de alimentos, a fim de comparar os teores de AI e V40 obtidos utilizando-se este método de analítico e método amperométrico proposto.

4.3.3.7 – Aplicação do procedimento proposto empregando-se FIA-MPA na determinação simultânea de AI e V40 em amostras comerciais

Algumas amostras de balas contendo os corantes AI e V40 foram analisadas a fim de avaliar o método proposto. Para a determinação simultânea destes analitos utilizou-se o método por interpolação na curva analítica. Na TABELA 4.9 são mostrados os resultados obtidos para os teores de AI e V40 determinados em balas empregando-se o método amperométrico (FIA-MPA) e o cromatográfico (HPLC).

TABELA 4.9 – Resultados obtidos na determinação simultânea de AI e V40 em balas empregando-se FIA-MPA e o método cromatográfico

Amostras	AI		V40		AI	V40
	HPLC ^a	MPA ^a	HPLC ^a	MPA ^a	ERRO (%) ^b	ERRO (%) ^b
Balas (mg/ 100 g)						
1	10±1	10±1	23±1	23±1	0,0	0,0
2	5,8±0,2	5,9±0,3	10±1	11±1	1,7	-9,1
3	11±1	9,7±0,9	2,8±0,1	3,0±0,1	-12	7,1

^a n = 3; ^b Erro (%) = (100 × (valor MPA – valor HPLC)/valor HPLC)

Para avaliar o nível de concordância dos resultados obtidos empregando-se os dois procedimentos, aplicou-se o teste *t*-pareado. Para o AI ($n = 3$) o $t_{\text{experimental}} = 0,72$ e para o V40 ($n = 3$) $t_{\text{experimental}} = 0,89$, ambos os valores são menores que o $t_{\text{crítico}} = 4,30$. Sendo assim, estes resultados indicam que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos empregando-se o método proposto e o método comparativo, a um nível de confiança de 95%, estando os erros dentro de um intervalo aceitável.

4.3.4 – Determinação simultânea de AS e AK empregando-se as técnicas voltamétricas de pulso (DPV e SWV) e o eletrodo de BDD PTA

Inicialmente empregou-se a técnica FIA-MPA para a determinação de AS e AK em alimentos. Devido ao alto potencial de trabalho para a detecção de AK (2,15 V) e de algumas substâncias concomitantes presentes nestas amostras, os resultados obtidos não foram de qualidade analítica. Sendo assim, optou-se por trabalhar com as técnicas SWV e DPV.

4.3.4.1 – Estudo da velocidade de varredura de potencial

Uma maneira de identificar se o transporte de massa das espécies para a superfície do eletrodo é controlado por difusão ou adsorção, é por meio do coeficiente angular da regressão linear do logaritmo do sinal de corrente ($\log I$) pelo logaritmo da velocidade de varredura ($\log v$)¹⁴¹. Então, fez-se um experimento empregando-se CV e o eletrodo de BDD PTA em diferentes velocidades de varredura para as soluções de AS 1,0 mmol L⁻¹ ou AK 3,0 mmol L⁻¹. Na FIGURA 4.27 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos neste experimento. A dependência de $\log I$ por $\log v$, é apresentada na FIGURA 4.28; os gráficos inseridos correspondem à dependência da corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura. Nota-se que com o aumento da velocidade de varredura houve um deslocamento

do potencial de oxidação para potenciais mais positivos, comportamento característico de processos irreversíveis.

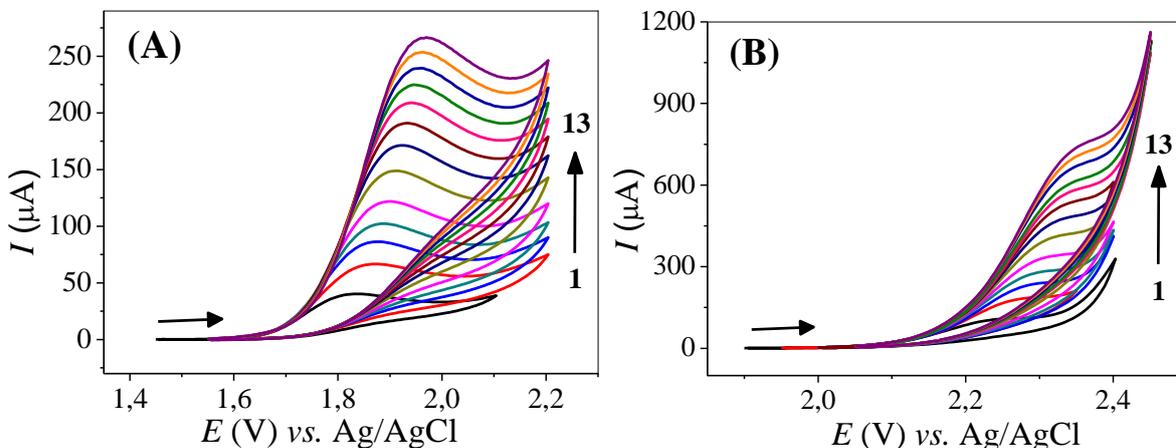


FIGURA 4.27 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo de BDD, (A) para o AS $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) para AK $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura (1-13): 10; 30; 50; 70; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500 mVs^{-1} . Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,30 \text{ mol L}^{-1}$.

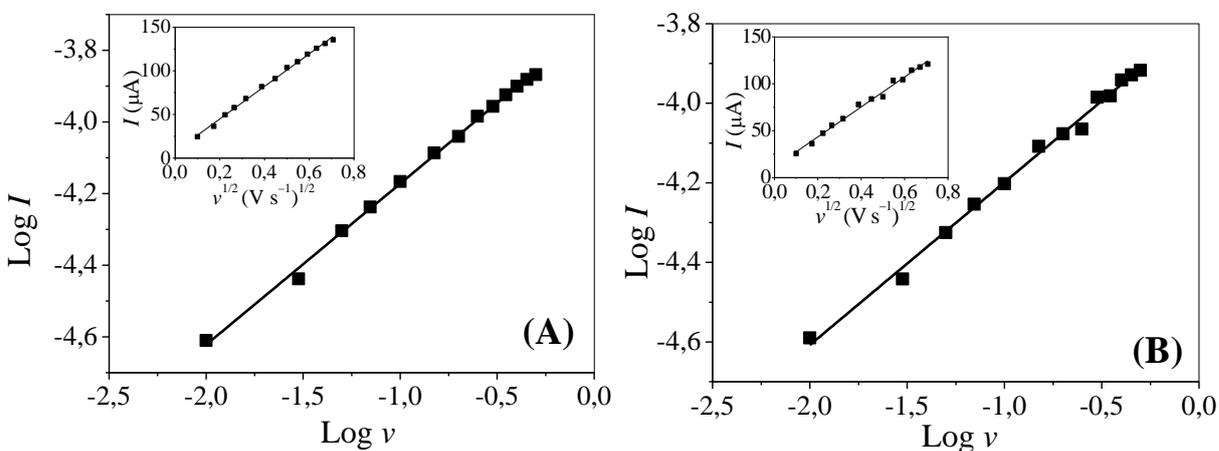


FIGURA 4.28 – Dependência de $\log I$ por $\log v$: (A) para AS e (B) para AK. Os gráficos inseridos correspondem à dependência da corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura.

Os coeficientes angulares obtidos nas regressões lineares para os gráficos da FIGURA 4.28 foram 0,45 e 0,41 para AS e AK, respectivamente.

Estes valores estão próximos do valor teórico (0,5) para sistemas controlados por difusão das espécies. A difusão das espécies pode ser confirmada pela relação linear da corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade varredura ($r = 0,998$ para AS e $r = 0,994$ para AK)^{141,160}.

4.3.4.2 – Comparação entre as técnicas voltamétricas DPV e SWV

Para o desenvolvimento do método voltamétrico utilizando-se o eletrodo de BDD PTA para a determinação simultânea de AS e AK foram estudadas as técnicas de voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV). Foram otimizados os parâmetros relacionados com cada uma das técnicas de pulso, SWV e DPV, que podem influenciar na resposta voltamétrica. Na TABELA 4.10 e TABELA 4.11 são apresentados os intervalos de valores estudados para cada um dos parâmetros, em cada técnica eletroquímica, bem como os valores selecionados para experimentos seguintes.

TABELA 4.10 – Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de AS e AK

Parâmetros SWV	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência f (Hz)	10 a 70	50
Amplitude a (mV)	10 a 100	50
Incremento ΔE_s (mV)	1 a 5	4

TABELA 4.11 – Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de AS e AK

Parâmetros DPV	Faixa estudada	Valor selecionado
Velocidade v (mV s ⁻¹)	1 a 30	25
Amplitude a (mV)	10 a 100	100
Tempo de modulação t (ms)	5 a 30	5

Após a otimização dos parâmetros das técnicas SWV e DPV, as curvas analíticas foram construídas simultaneamente para ambos edulcorantes, empregando-se estas duas técnicas analíticas. Na TABELA 4.12 encontram-se as condições analíticas obtidas para a determinação simultânea de AS e AK utilizando-se as diferentes técnicas.

TABELA 4.12 – Condições analíticas obtidas para a determinação de AS e AK pelas técnicas DPV e SWV

Parâmetro	AS		AK	
	DPV	SWV	DPV	SWV
Faixa linear (mmol L ⁻¹)	0,04 a	0,05 a	0,38 a	0,52 a
	0,11	0,11	7,6	7,6
Coefficiente angular (µA mol ⁻¹ L)	$3,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$
Coefficiente de correlação (r)	0,998	0,999	0,995	0,993
Limite de detecção (mmol L ⁻¹)	0,0016	0,0019	0,28	0,35

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se notar que não houve uma diferença significativa nos resultados obtidos empregando-se ambas as técnicas. No entanto, empregando-se a técnica DPV foi possível obter voltamogramas com uma melhor definição de pico, sendo então esta técnica selecionada para desenvolver o procedimento eletroanalítico para determinação simultânea dos edulcorantes AS e AK.

4.3.4.3 – Determinação simultânea de AS e AK utilizando DPV e o eletrodo de BDD PTA

Primeiramente, investigou-se a resposta eletroquímica de AS e AK, um na presença do outro em diferentes concentrações a fim de avaliar a possibilidade de realizar a determinação simultânea destes sem interferência de um sobre o outro. Na FIGURA 4.29 (A) são apresentados os voltamogramas de

pulso diferencial, na qual foram feitas adições sucessivas de AS em diferentes concentrações (4,4 a 110,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) mantendo a concentração de AK constante em 1,0 mmol L^{-1} . Observa-se que a intensidade de corrente para o AS aumentou com o aumento da concentração, indicando que o AK não interfere na quantificação do AS, uma vez que a corrente de pico do AK se manteve praticamente constante mesmo com as adições sucessivas de AS, com um desvio padrão relativo de 7,8 %. A FIGURA 4.29 (B) corresponde à curva analítica obtida ($I_{\text{pa}}/\mu\text{A} = 0,3598 + 4,09 \times 10^5 [\text{AS}/(\text{mol L}^{-1})]$, $r = 0,998$).

Na FIGURA 4.29 (C) são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos quando fez-se adições sucessivas de AK em diferentes concentrações (0,30 a 7,6 mmol L^{-1}) mantendo-se a concentração de AS constante em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nota-se que a intensidade de corrente também aumentou para o AK à medida que sua concentração foi aumentada. Assim, o AS não interferiu na quantificação do AK, sendo que a corrente de pico do AS também se manteve praticamente constante com um desvio padrão relativo de 3,7 %. A curva analítica obtida para o AK na presença de AS está apresentada na FIGURA 4.29 (D), e a equação de regressão correspondente foi: ($I_{\text{pa}}/\mu\text{A} = -20,17 + 5,19 \times 10^4 [\text{AK}/(\text{mol L}^{-1})]$, $r = 0,994$).

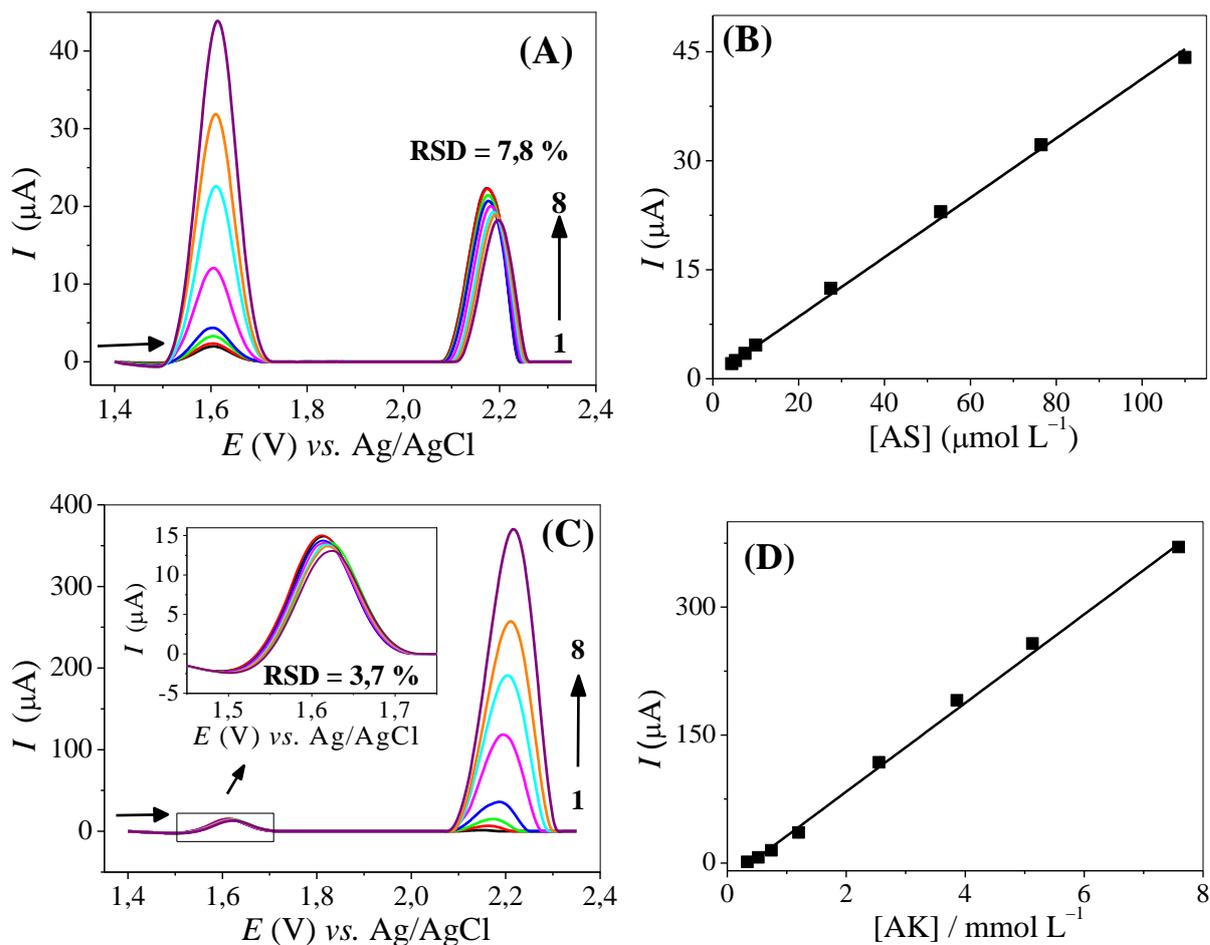


FIGURA 4.29 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em soluções de: (A) AS: (1-8) 4,40 a 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AK 1,0 mmol L^{-1} ; (C) AK: (1-8) 0,30 a 7,6 mmol L^{-1} e AS 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Curvas analíticas para (B) AS e (D) AK. Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} ; $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 100 \text{ mV}$ e $t = 5 \text{ mV}$.

Em seguida, a fim de construir a curva analítica para a determinação simultânea destes edulcorantes, foram obtidos os voltamogramas de pulso diferencial variando-se a concentração AS e AK simultaneamente (4,40 a 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AS e 0,40 a 7,6 mmol L^{-1} para o AK). Na FIGURA 4.30 (A) são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos, e em (B) e (C), as respectivas curvas analíticas.

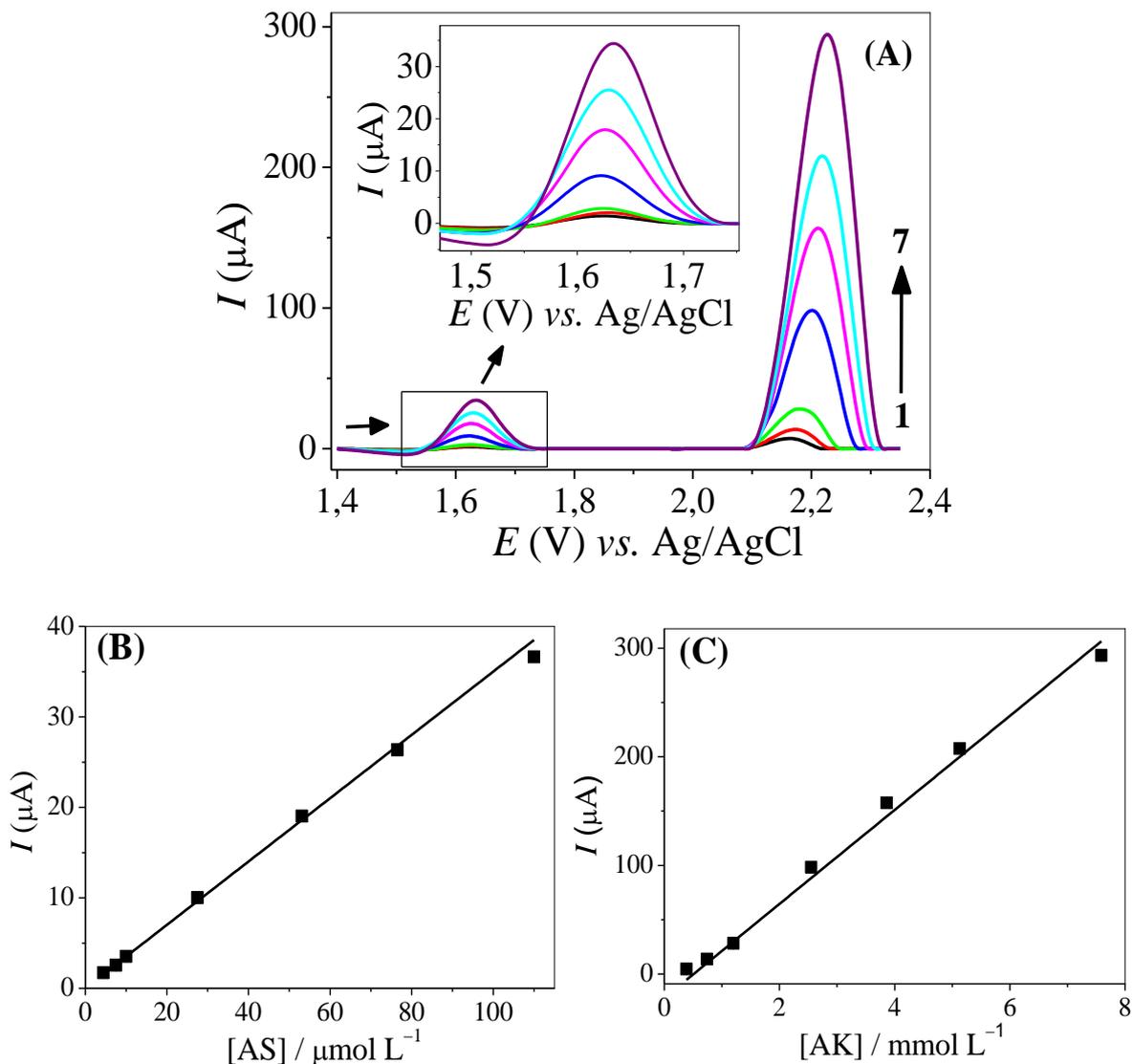


FIGURA 4.30 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD PTA em solução contendo diferentes concentrações de AS: (1) 4,4; (2) 7,5; (2) 10,0; (4) 28,0; (5) 53,0; (6) 77,0; (7) 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AK: (1) 0,39; (2) 0,74; (3) 1,2; (4) 2,6; (5) 3,9; (6) 5,1; (7) 7,6 mmol L^{-1} para o AK. (B) Curva analítica obtida para o AS e (C) curva analítica obtida para o AK. Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,30 mol L^{-1} ; $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, $\alpha = 100 \text{ mV}$ e $t = 5 \text{ mV}$.

As curvas analíticas obtidas apresentaram boa linearidade nas concentrações estudadas com coeficientes de correlação de 0,998 e 0,995 para AS e AK, respectivamente. As equações correspondentes foram:

$$I_{pa}/\mu A = 0,0186 + 3,49 \times 10^5 [AS/(\text{mol L}^{-1})]$$

$$I_{pa}/\mu A = -21,99 + 4,33 \times 10^4 [AK/(\text{mol L}^{-1})]$$

O limite de detecção (3 S/N) (calculados como descrito na Seção 4.3.2.4) obtido foi de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o AS e $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$ para AK.

A repetibilidade intra-dia foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ($n = 10$), para soluções de uma mistura de AS e AK em duas concentrações. Para o estudo da repetibilidade entre-dias foram feitas medidas em três diferentes dias ($n = 3$) para soluções em duas diferentes concentrações de uma mistura de AS e AK. Os RSDs obtidos estão apresentados na TABELA 4.13. Os resultados de repetibilidade intra e entre-dias obtidos foram satisfatórios com RSDs menores que 10% para todas as concentrações estudadas.

TABELA 4.13 – Desvios padrão obtidos no estudo da repetibilidade intra e entre dias

Edulcorante	Intra-dia RSD ^a (%)	Entre-dias RSD ^b (%)
AS (mol L⁻¹)		
$5,0 \times 10^{-6}$	2,9	4,9
$4,8 \times 10^{-5}$	0,90	3,6
AK (mol L⁻¹)		
$4,9 \times 10^{-4}$	5,6	9,6
$3,5 \times 10^{-3}$	0,40	3,4

4.3.4.4 – Estudo de possíveis interferentes

Para investigar a seletividade do método proposto, o comportamento voltamétrico dos edulcorantes na presença de diversas substâncias geralmente encontradas nas amostras analisadas (refrigerantes, pó

para refresco e adoçante) foi avaliado. O método utilizado está detalhado na seção 3.4.4.

Os concomitantes ácido cítrico, sorbitol e benzoato de sódio, presentes nas amostras foram testados como possíveis interferentes (resultados não apresentados). Nenhuma das substâncias analisadas causou qualquer interferência na determinação simultânea de AS e AK com exceção do benzoato de sódio (BS), que causou interferência negativa na determinação apenas do AK em concentração igual ou superior aquela de AK. Essa interferência deve-se ao fato do BS apresentar um pico de oxidação próximo ao do AK, porém como nas amostras analisadas a concentração de BS está bem abaixo da concentração de AK (máximo permitido 50 mg / 100 mg ou 100 mL)¹⁶⁴, foi possível obter uma determinação satisfatória.

4.3.4.5 – Método comparativo – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foi adotado como método comparativo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)¹⁵⁸ a fim de se avaliar o método voltamétrico proposto utilizando-se DPV e o eletrodo de BDD PTA.

Nas condições empregadas (descritas na seção 3.4.5), as moléculas de AS e AK apresentaram um tempo de retenção de 19,0 e 5,4 minutos, respectivamente. Na FIGURA 4.31 são apresentados os cromatogramas para AS e AK em seus respectivos comprimentos de onda e as curvas analíticas obtidas para ambos. As curvas analíticas foram construídas na faixa de concentração de 50,0 a 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para AS e de 30,0 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o AK.

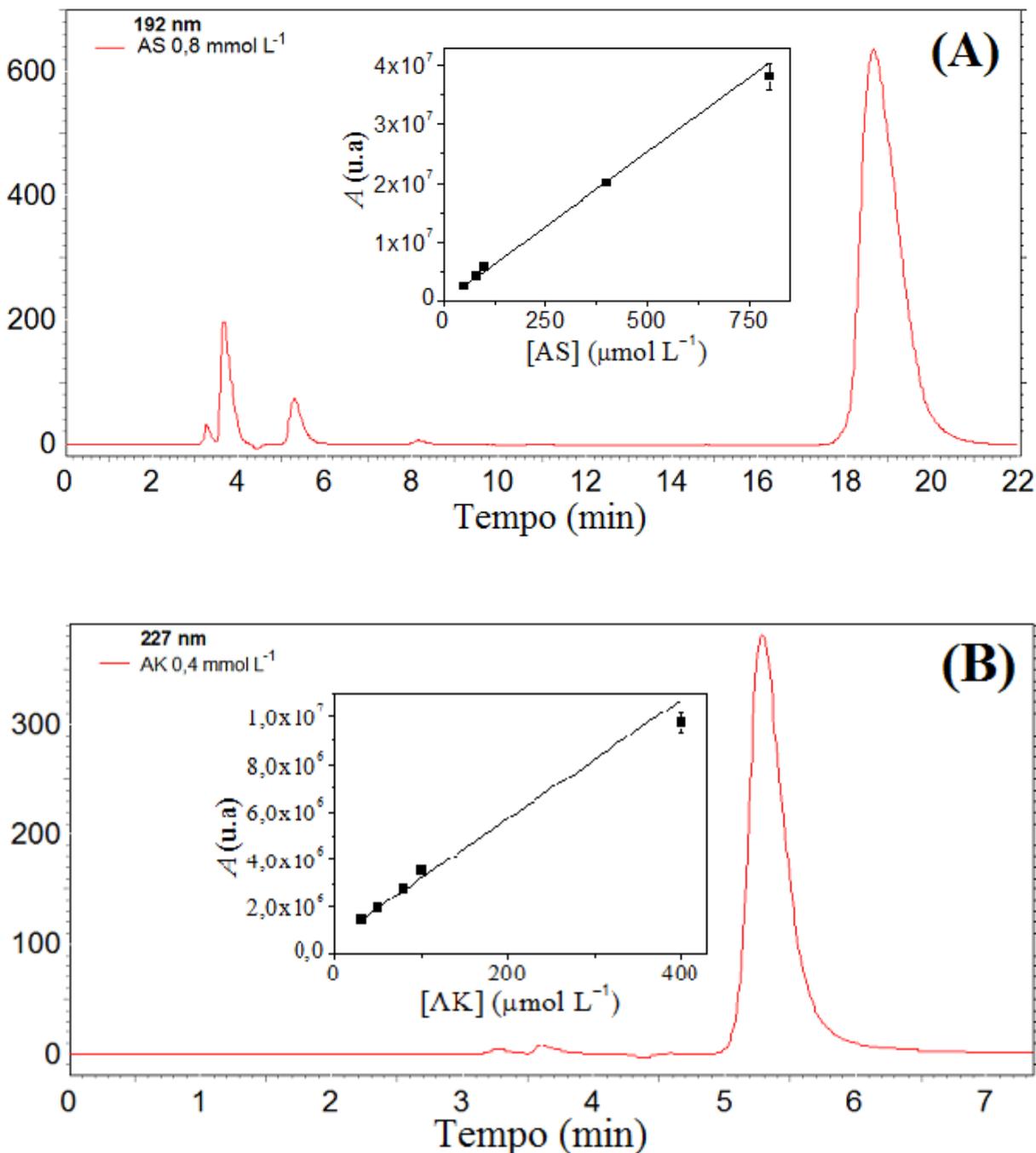


FIGURA 4.31 – Cromatogramas obtidos para (A): AS 0,80 mmol L⁻¹ e (B): AK 0,40 mmol L⁻¹. Os gráficos inseridos são as respectivas curvas analíticas obtidas (A) para AS nas concentrações de: 50,0; 80,0; 100; 400; 800 μmol L⁻¹ e (B) para AK: 30,0; 50,0; 80,0; 100; 400 μmol L⁻¹. Fase móvel: acetonitrila/tampão fosfato pH 3,5, (15/85 v/v). Vazão: 1,0 mL min⁻¹.

As equações de regressão obtidas para as curvas analíticas foram:

$$A \text{ (u.a.)} = 7,13 \times 10^5 + 2,50 \times 10^{10} [\text{AS}/(\text{mol L}^{-1})]$$

$$A \text{ (u.a.)} = 1,11 \times 10^5 + 4,90 \times 10^{10} [\text{AK}/(\text{mol L}^{-1})]$$

Este método foi aplicado nas mesmas amostras analisadas pelo método voltamétrico proposto, a fim de comparar e avaliar os resultados obtidos pelo método proposto.

4.3.4.6 – Aplicação do procedimento proposto empregando-se DPV na determinação simultânea de AS e AK em amostras comerciais

Finalmente, para avaliar o procedimento proposto utilizando-se DPV e o eletrodo de BDD PTA, algumas amostras de alimentos industrializados (refrigerantes, refrescos e adoçante) contendo estes edulcorantes (AS e AK) foram analisadas. Na TABELA 4.14 são apresentados os resultados obtidos para os teores de AS e AK determinados em produtos alimentícios empregando-se o método proposto e o cromatográfico (HPLC). Para a determinação simultânea destes edulcorantes utilizou-se o método por interpolação da curva analítica.

TABELA 4.14 – Resultados obtidos na determinação simultânea de AS e AK em produtos alimentícios empregando-se HPLC e DPV

Amostras	AS			AK		
	HPLC ^a	DPV ^a	Erro 1 (%) ^b	ADD ^c	REC ^{a,d}	REC (%)
Refrigerantes (mg 100 g⁻¹)						
1	31±2	32±2	3,2	5,4	5,7±0,1	106
2	33±1	35±1	6,1	5,4	5,8±0,1	107
3	19±1	22±2	15	5,4	4,6±0,2	85,2
Refresco (mg 100 g⁻¹)						
4	42±2	44±4	4,8	5,4	5,2±0,0	96,3
Adoçante (g 100 mL⁻¹)						
5	7,7±0,6	7,0±0,3	-9,1	5,4	5,0±0,3	92,6

^a n = 3; ^b Erro (%) = $(100 \times (\text{valor DPV} - \text{valor HPLC})/\text{valor HPLC})$; ^c Adição;

^d Recuperação.

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos empregando-se os dois procedimentos, aplicou-se o teste *t*-pareado. Para o AS (n = 5) o $t_{\text{experimental}} = 0,86$, é menor que o $t_{\text{crítico}} = 2,78$. Estes resultados indicam que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos empregando-se o método proposto e o método de comparativo, a um nível de confiança de 95%, estando os erros dentro de um intervalo aceitável. Para o AK obteve-se boas recuperações variando de 85,2 a 107%, e estes valores indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de AK, mostrando ser possível a determinação destes edulcorantes quando as concentrações de AK estiverem numa proporção maior do que a encontrada nas amostras analisadas.

5 – CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados é possível destacar algumas considerações a respeito do eletrodo de BDD e sua aplicação no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a detecção de edulcorantes e corantes.

Os pré-tratamentos eletroquímicos, anódico ou catódico, no eletrodo de BDD proporcionaram uma melhora na atividade eletroquímica para os analitos utilizados dependendo da terminação promovida na superfície do eletrodo (hidrogênio ou oxigênio). Estes tratamentos eletroquímicos do eletrodo de BDD permitiram implementar as melhores condições analíticas do método desenvolvido, como o limite de detecção e a diminuição dos potenciais de trabalho.

Com o cálculo das áreas eletroativas para o BDD com os pré-tratamentos conclui-se que as áreas eletroativas foram menores que a área geométrica, isso provavelmente porque estes eletrodos possuem uma superfície predominantemente semicondutora. Cabe destacar ainda que as áreas eletroativas obtidas nestas duas condições (pré-tratamentos diferentes) são praticamente iguais, o que indica que, a melhora da atividade eletroquímica do BDD sobre alguns analitos, não está relacionada apenas a área eletroativa, mas é devido principalmente com a interação do analito com os diferentes grupos funcionais promovidos pelo pré-tratamento na superfície do BDD.

O método analítico desenvolvido empregando MPA acoplado ao sistema FIA e o eletrodo de BDD PTA para a determinação simultânea de AS e AC se mostrou bastante simples, rápido e eficiente, apresentando resultados concordantes com aqueles obtidos utilizando o método comparativo (HPLC), além do que este método apresentou vantagem, como por exemplo, alta frequência analítica (120 determinações h^{-1}). Ademais, o método em fluxo apresentou excelentes limites de detecção e cabe ressaltar que este é o primeiro

método eletroanalítico proposto para a determinação simultânea destes aditivos alimentares (AS e AC).

A técnica FIA-MPA e o eletrodo de BDD PTC também foram empregados com sucesso na determinação simultânea dos pares de corante AI e V40 em amostras alimentícias (Ex.: balas), que continham estes corantes sendo os resultados obtidos concordantes com aqueles obtidos empregando-se o método cromatográfico (método comparativo). Outrossim, o método apresentou algumas vantagens como simples diluição como etapas de pré-tratamento das amostras, alta frequência analítica (153 determinações h^{-1}). Assim, este método pode ser considerado de grande interesse analítico, uma vez que não há métodos eletroanalíticos propostos na literatura para a determinação simultânea deste par de corantes.

O eletrodo de BDD PTA mostrou-se bastante adequado para a determinação simultânea dos edulcorantes AS e AK pelo método empregando DPV em produtos alimentícios contendo a combinação destes edulcorantes em proporções adequadas. Apenas um artigo⁷⁸ descrevendo a determinação simultânea destes analitos foi encontrado na literatura. No entanto, a determinação simultânea só foi possível com o auxílio de ferramentas quimiométricas e ainda o método tem também como desvantagem a forte adsorção de AK sobre o eletrodo de trabalho (carbono vítreo).

Todos os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho de mestrado apresentaram condições analíticas bastantes satisfatórias para a detecção e quantificação simultânea dos edulcorantes e corantes. Além do que possuem as vantagens de não haver a necessidade de uma separação prévia e apenas uma simples diluição como preparação das amostras. Assim todos estes métodos são simples, rápidos, precisos e não necessitam de reagentes de alta toxicidade e ainda utilizam instrumentação de custo relativamente baixo.

6 – REFERÊNCIAS

1. TEIXEIRA POLONIO, M.L. & PERES, F. "Food additive intake and health effects: public health challenges in Brazil". *Cad. Saúde Pública*, **25** (8): 1653, 2009.
2. AUN, M.V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J.C.; KALIL, J.; AGONDI, R.C. & MOTTA, A.A. "Aditivos alimentares, reações adversas a aditivos, medicamentos, mecanismo de ação.". *Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.*, **34** (5): 177, 2011.
3. ADDITIVES, Comnined compendium of food additive specifications. Roma, FAO/JECFA, 2006.
4. ANVISA, Portaria SVS/MS n. 540. *www.anvisa.gov.br*, 1997.
5. MERCOSUL, Resolução - GMC n. 11. *www.mercosur.int*, 2006.
6. FDA, Determining the Regulatory Status of a Food Ingredient. *www.fda.gov*, 2013.
7. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C.; GOUVEIA, S.T.; CALAFATI, S.A. & SANTOS, G.A.J.M. "Artificial Sweeteners". *Quim. Nova*, **19**: 248, 1996.
8. TORLONI, M.R.; NAKAMURA, M.U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V.H.S.; MANO, C.; FUSARO, A.S. & MATTAR, R. "O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil". *Rev. bras. ginecol. obstet.*, **29** (5): 267, 2007.
9. PRADO, M.A. & GODOY, H.T. "Corantes artificiais em alimentos". *Alimentos e Nutrição*, **14** (2): 237, 2003.
10. 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". *Quim. Nova*, **27** (5): 790, 2004.
11. DE SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S. & AVACA, L.A. "Square wave voltammetry. Part 1: Theoretical aspects". *Quim. Nova*, **26** (1): 81, 2003.
12. GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. & MACHADO, S.A.S. "Electroanalytical techniques for the determination of pesticides in foods.". *Quim. Nova*, **29** (1): 105, 2006.
13. BAREK, J.; FISCHER, J.; NAVRATIL, T.; PECKOVA, K.; YOSYPCHUK, B. & ZIMA, J. "Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds". *Electroanalysis*, **19** (19-20): 2003, 2007.
14. DEROCO, P.B.; VICENTINI, F.C.; OLIVEIRA, G.G.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *J. Electroanal. Chem.*, **719**: 19, 2014.
15. DOGAN-TOPAL, B.; KUL, D.; OZKAN, S.A. & USLU, B. "Anodic behaviour of fulvestrant and its voltammetric determination in pharmaceuticals

- and human serum on highly boron-doped diamond electrode using differential pulse adsorptive stripping voltammetry". *J. Appl. Electrochem.*, **41** (11): 1253, 2011.
16. LEVENT, A. "Electrochemical determination of melatonin hormone using a boron-doped diamond electrode". *Diam. Relat. Mater.*, **21**: 114, 2012.
17. MUSILOVA, J.; BAREK, J. & PECKOVA, K. "Determination of Nitrophenols in Drinking and River Water by Differential Pulse Voltammetry at Boron-Doped Diamond Film Electrode". *Electroanalysis*, **23** (5): 1236, 2011.
18. SVORC, L. & KALCHER, K. "Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: Simultaneous determination of guanine and adenine in biological samples using boron-doped diamond electrode". *Sensor.Actuat. B-Chem.*, **194**: 332, 2014.
19. YARDIM, Y. & EREZ, M.E. "Electrochemical Behavior and Electroanalytical Determination of Indole-3-Acetic Acid Phytohormone on a Boron-Doped Diamond Electrode". *Electroanalysis*, **23** (3): 667, 2011.
20. YOSYPCHUK, O.; BAREK, J. & VYSKOCIL, V. "Determination of 1-hydroxypyrene in human urine by HPLC with electrochemical detection at a boron-doped diamond film electrode". *Anal. Bioanal. Chem.*, **404** (3): 693, 2012.
21. ZAVAZALOVA, J.; DEJMKOVA, H.; BAREK, J. & PECKOVA, K. "Voltammetric and Amperometric Determination of Mixtures of Aminobiphenyls and Aminonaphthalenes Using Boron Doped Diamond Electrode". *Electroanalysis*, **25** (1): 253, 2013.
22. ARDILA, J.A.; SARTORI, E.R.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of bezafibrate in pharmaceutical formulations using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **103**: 201, 2013.
23. MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **97**: 291, 2012.
24. GIMENES, D.T.; DE FREITAS, J.M.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Flow-Injection amperometric method for determination of diclofenac in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Electroanalysis*, **23** (11): 2521, 2011.
25. PEREIRA, P.F.; MARRA, M.C.; LIMA, A.B.; DOS SANTOS, W.T.P.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode". *Diam. Relat. Mater.*, **39**: 41, 2013.
26. EINAGA, Y. "Diamond electrodes for electrochemical analysis". *J. Appl. Electrochem.*, **40** (10): 1807, 2010.

27. PECKOVA, K.; MUSILOVA, J. & BAREK, J. "Boron-doped diamond film electrodes-new tool for voltammetric determination of organic substances". *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **39** (3): 148, 2009.
28. SALAZAR-BANDA, G.R.; ANDRADE, L.S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments". *Electrochim. Acta*, **51** (22): 4612, 2006.
29. PINHEIRO, M.V.S.; OLIVEIRA, M.N.; PENNA, A.L.B. & TAMIME, A.Y. "The effect of different sweeteners in low-calorie yogurts - a review". *Int. J. Dairy Technol.*, **58** (4): 193, 2005.
30. GOMES, C.R.; VISSOTTO, F.Z.; FADINI, A.L.; DE FARIA, E.V. & LUIZ, A.M. "Influence of different bulk agents in the rheological and sensory characteristics of diet and light chocolate". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **27** (3): 614, 2007.
31. CARVALHO, P.R. "Aditivos dos alimentos". *Revista Logos*, **12**: 57, 2005.
32. ALMEIDA, J.Z.; CARVALHO, K.M. & SAMPAIO, H.A.C. "Adoçantes artificiais: interrelações positivas e negativas com as doenças crônicas não transmissíveis". *Rev. Bras. Nutr. Clín.*, **20** (2): 77, 2005.
33. VIEIRA, C.A.; CORBO, M.A.P.; BORGES, T.M.; MEIRELLES, M.; MESTRINER, A.C.; SOARES, A.M. & GIGLIO, J.R. "Adoçantes dietéticos na alimentação de ratos: uma abordagem histológica e bioquímica". *Ciênc. Biol. Saúde*, **29** (1) 2008.
34. ANVISA, Resolução - RDC n. 18. www.anvisa.gov.br, 2008.
35. KROGER, M.; MEISTER, K. & KAVA, R. "Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues". *Compr. Rev. Food Sci. F.*, **5** (3): 35, 2006.
36. VETSCH, W. "Aspartame - Technical considerations and predicted use". *Food Chem.*, **16** (3-4): 245, 1985.
37. NABORS, L.O.B., *Alternative sweeteners*, New York, Marcel Dekker, 2001.
38. BUTCHKO, H.H. & STARGEL, W.W. "Aspartame: Scientific evaluation in the postmarketing period". *Regul. Toxicol. Pharm.*, **34** (3): 221, 2001.
39. ARORA, S.; SHENDURSE, A.M.; SHARMA, V.; WADHWA, B.K. & SINGH, A.K. "Assessment of stability of binary sweetener blend (aspartame x acesulfame-K) during storage in whey lemon beverage". *J. Food Sci. Tech. Mys.*, **50** (4): 770, 2013.
40. MAGNUSON, B.A.; BURDOCK, G.A.; DOULL, J.; KROES, R.M.; MARSH, G.M.; PARIZA, M.W.; SPENCER, P.S.; WADDELL, W.J.; WALKER, R. & WILLIAMS, G.M. "Aspartame: A safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies". *Cr. Rev. Toxicol.*, **37** (8): 629, 2007.
41. HOMLER, B.E. "Properties and stability of aspartame". *Food Technol.*, **38** (7): 50, 1984.

42. National Academy of Sciences, Sweeteners: Issues and Uncertainties, Washington, DC. The National Academies Press, 1975.
43. SHANKAR, P.; AHUJA, S. & SRIRAM, K. "Non-nutritive sweeteners: review and update". *Nutrition*, **29** (11-12): 1293, 2013.
44. BUTCHKO, H.H.; STARGEL, W.W.; COMER, C.P.; MAYHEW, D.A.; BENNINGER, C.; BLACKBURN, G.L.; DE SONNEVILLE, L.M.J.; GEHA, R.S.; HERTELENDY, Z.; KOESTNER, A.; LEON, A.S.; LIEPA, G.U.; MCMARTIN, K.E.; MENDENHALL, C.L.; MUNRO, I.C.; NOVOTNY, E.J.; RENWICK, A.G.; SCHIFFMAN, S.S.; SCHOMER, D.L.; SHAYWITZ, B.A.; SPIERS, P.A.; TEPHLY, T.R.; THOMAS, J.A. & TREFZ, F.K. "Aspartame: review of safety". *Regul. Toxicol. Pharm.*, **35** (2): S1, 2002.
45. ANVISA, Esclarecimento sobre fenilcetonúria - Informe técnico n. 49. www.anvisa.gov.br, 2012.
46. DA SILVA, L.C.S.; CARVALHO, T.S.; DA SILVA, F.B.; PIRES, R.F.; GIUGLIANI, R. & PEREIRA, M.L.S. "Aspartame loading test in PKU heterozygous individuals bearing severe and moderate mutations". *Clin. Genet.*, **58** (1): 86, 2000.
47. WHITEHOUSE, C.R.; BOULLATA, J. & MCCAULEY, L.A. "The potential toxicity of artificial sweeteners". *Am J Clin Nutr*, **56** (6): 251, 2008.
48. DUFFY, V.B. & SIGMAN-GRANT, M. "Position of the American dietetic association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners". *J. Am. Diet. Assoc.*, **104** (2): 255, 2004.
49. COUNCIL, C.C., *Sweet facts about acesulfame potassium*. www.acesulfamek.org/faq.html, 2010:
50. SINCHAIPANIT, P.; KERR, W.L. & CHAMCHAN, R. "Effect of sweeteners and hydrocolloids on quality attributes of reduced-calorie carrot juice". *J. Sci. Food Agr.*, **93** (13): 3304, 2013.
51. FAO/WHO, J., Technical Report Series 653: Aspartame; Evaluation of certain food additives. Geneva, World Health Organization, 1980.
52. FAO/WHO, J., Toxicological evaluation of certain food additives. Geneva World Health Organization, 1983.
53. FAO/WHO, J., Toxicological evaluation of certain food additives. Geneva World Health Organization, 1991.
54. SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; TIBALDI, E.; ESPOSTI, D.D. & LAURIOLA, M. "Life-Span exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats". *Environ. Health Perspect.*, **115** (9): 1293, 2007.
55. MUKHERJEE, A. & CHAKRABARTI, J. "In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K - a non-nutritive sweetener". *Food Chem. Toxicol.*, **35** (12): 1177, 1997.
56. BERSET, J.D. & OCHSENBEIN, N. "Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)". *Chemosphere*, **88** (5): 563, 2012.

57. CHEN, X.-H.; ZHAO, Y.-G.; SHEN, H.-Y. & JIN, M.-C. "Application of dispersive solid-phase extraction and ultra-fast liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry in food additive residue analysis of red wine". *J. Chromatogr. A*, **1263**: 34, 2012.
58. LIM, H.-S.; PARK, S.-K.; KWAK, I.-S.; KIM, H.-I.; SUNG, J.-H.; JANG, S.-J.; BYUN, M.-Y. & KIM, S.-H. "HPLC-MS/MS analysis of 9 artificial sweeteners in imported foods". *Food Sci. Biotechnol.*, **22** (1): 233, 2013.
59. SIK, B. "Development and validation of a green high performance liquid chromatographic method for the determination of some artificial sweeteners and caffeine in soft drinks". *Food Anal. Method.*, **5** (6): 1443, 2012.
60. YANG, D.J. & CHEN, B. "Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS". *J. Agr. Food Chem.*, **57** (8): 3022, 2009.
61. ZHAO, Y.-G.; CAI, M.-Q.; CHEN, X.-H.; PAN, S.-D.; YAO, S.-S. & JIN, M.-C. "Analysis of nine food additives in wine by dispersive solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography". *Food Res. Int.*, **52** (1): 350, 2013.
62. ZYGLER, A.; WASIK, A.; KOT-WASIK, A. & NAMIESNIK, J. "Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection". *Anal. Bioanal. Chem.*, **400** (7): 2159, 2011.
63. BERGAMO, A.B.; FRACASSI DA SILVA, J.A. & DE JESUS, D.P. "Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection". *Food Chem.*, **124** (4): 1714, 2011.
64. STOJKOVIC, M.; THANH DUC, M. & HAUSER, P.C. "Determination of artificial sweeteners by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection optimized by hydrodynamic pumping". *Anal. Chim. Acta*, **787**: 254, 2013.
65. CHENG, C. & WU, S.-C. "Simultaneous analysis of aspartame and its hydrolysis products of Coca-Cola Zero by on-line postcolumn derivation fluorescence detection and ultraviolet detection coupled two-dimensional high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, **1218** (20): 2976, 2011.
66. CROITORU, M.D.; FUELOEP, I.; AJTAY, M.K.; BALOGH, C. & DOGARU, M.T. "Direct HPLC-UV Determination of cyclamate, saccharine and aspartame from soft drinks". *Acta Aliment.*, **40** (4): 459, 2011.
67. FERNANDES, V.N.O.; FERNANDES, L.B.; VASCONCELLOS, J.P.; JAGER, A.V.; TONIN, F.G. & OLIVEIRA, M.A.L. "Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection". *Anal. Method.*, **5** (6): 1524, 2013.
68. HE, Y.-C.; FANG, S. & XU, X.-J. "Simultaneous determination of acesulfame-k, aspartame and stevioside in sweetener blends by ultraviolet

- spectroscopy with variable selection by sipls algorithm". *Maced. J. Chem. Chem. En.*, **31** (1): 17, 2012.
69. ANIK, U.; ODACI, D.; TIMUR, S.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S.; BESUN, N. & TELEFONCU, A. "A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection". *Anal. Chim. Acta*, **570** (2): 165, 2006.
70. COMPAGNONE, D.; OSULLIVAN, D. & GUILBAULT, G.G. "Amperometric bienzymic sensor for aspartame". *Analyst*, **122** (5): 487, 1997.
71. FATIBELLO-FILHO, O.; SULEIMAN, A.A.; GUILBAULT, G.G. & LUBRANO, G.J. "Bienzymatic electrode for the determination of aspartame in dietary products". *Anal. Chem.*, **60** (21): 2397, 1988.
72. HERZOG, G.; KAM, V.; BERDUQUE, A. & ARRIGAN, D.W.M. "Detection of food additives by voltammetry at the liquid-liquid interface". *J. Agr. Food Chem.*, **56** (12): 4304, 2008.
73. MEDEIROS, R.A.; CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetry determination of aspartame in dietary products using a boron-doped diamond electrode". *Anal. Lett.*, **40** (16-18): 3195, 2007.
74. MEDEIROS, R.A.; CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **76** (3): 685, 2008.
75. NIKOLELIS, D.P. & PANTOULIAS, S. "A minisensor for the rapid screening of acesulfame-K, cyclamate, and saccharin based on surface-stabilized bilayer lipid membranes". *Electroanalysis*, **12** (10): 786, 2000.
76. ODACI, D.; TIMUR, S. & TELEFONCU, A. "Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination". *Food Chem.*, **84** (3): 493, 2004.
77. XIAO, D. & CHOI, M.M.F. "Aspartame optical biosensor with bienzyme-immobilized eggshell membrane and oxygen-sensitive optode membrane". *Anal. Chem.*, **74** (4): 863, 2002.
78. PIERINI, G.D.; LLAMAS, N.E.; FRAGOSO, W.D.; LEMOS, S.G.; DI NEZIO, M.S. & CENTURION, M.E. "Simultaneous determination of acesulfame-K and aspartame using linear sweep voltammetry and multivariate calibration". *Microchem. J.*, **106**: 347, 2013.
79. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetry determination of aspartame in dietary products using a boron-doped diamond electrode". *Anal. Lett.*, **40** (16-18): 3195, 2007.
80. CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C. & SANDI, D. "Corantes alimentícios". *Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.*, **20** (2) 2002.
81. ANVISA, Resolução - CNNPA n. 44. www.anvisa.gov.br, 1997.

82. BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P.M.; SALMINEN, S. & THORNGATE, J., Synthetic food colorants, in *Food Additives*. New York, Marcel Dekker, 2002, p. 477.
83. BRASIL, F.I., Dossiê corantes - Revista n.9, Insumos, 2009. www.revista-fi.com.
84. ANVISA, Resoluções - nº 382 a 388. www.anvisa.gov.br, 1999.
85. Os corantes alimentícios, in *Aditivos e ingredientes*. 2009. p. 28.
86. BORIS, M. & MANDEL, F.S. "Foods and additives are common causes of the attention-deficit hyperactive disorder in children". *Ann. Allergy*, **72** (5): 462, 1994.
87. FUGLSANG, G.; MADSEN, C.; HALKEN, S.; JORGENSEN, M.; OSTERGAARD, P.A. & OSTERBALLE, O. "Adverse reactions to food-additives in children with atopic symptoms". *Allergy*, **49** (1): 31, 1994.
88. BONAN, S.; FEDRIZZI, G.; MENOTTA, S. & ELISABETTA, C. "Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector". *Dyes Pigments*, **99** (1): 36, 2013.
89. HAJIMAHMOODI, M.; AFSHARIMANESH, M.; MOGHADDAM, G.; SADEGHI, N.; OVEISI, M.R.; JANNAT, B.; PIRHADI, E.; MAZDEH, F.Z. & KANAN, H. "Determination of eight synthetic dyes in foodstuffs by green liquid chromatography". *Food Addit. Contam. A*, **30** (5): 780, 2013.
90. KHANAVI, M.; HAJIMAHMOODI, M.; RANJBAR, A.M.; OVEISI, M.R.; ARDEKANI, M.R.S. & MOGADDAM, G. "Development of a Green Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Food Colorants". *Food Anal. Method.*, **5** (3): 408, 2012.
91. LI, W.-J.; ZHOU, X.; TONG, S.-S. & JIA, Q. "Poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N'-methylene bisacrylamide) monolithic column embedded with gamma-alumina nanoparticles microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of synthetic food dyes in soft drink samples". *Talanta*, **105**: 386, 2013.
92. MA, K.; JIANG, X.-X.; ZHAO, M. & CAI, Y.-Q. "Simultaneous Determination of 20 Food Additives in Drinks by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Photo-diode Array Detector". *Chinese J. Anal. Chem.*, **40** (11): 1661, 2012.
93. WU, H.; GUO, J.-B.; DU, L.-M.; TIAN, H.; HAO, C.-X.; WANG, Z.-F. & WANG, J.-Y. "A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography". *Food Chem.*, **141** (1): 182, 2013.
94. ZOU, T.; HE, P.; YASEN, A. & LI, Z. "Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors". *Food Chem.*, **138** (2-3): 1742, 2013.

95. EL-SHEIKH, A.H. & AL-DEGS, Y.S. "Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices". *Dyes Pigments*, **97** (2): 330, 2013.
96. LI, R.; CHEN, G.-Q.; ZHU, C. & KONG, F.-B. "Quantitative analysis of two food colors using excitation-emission matrix spectra coupled with parallel factor algorithm". *Spectrosc. Spect. Anal.*, **34** (1): 111, 2014.
97. TAVAKOLI, M.; SHEMIRANI, F. & HAJIMAHMOODI, M. "Magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction of three food colorants from real samples". *Food Anal. Method.*, **7** (1): 100, 2014.
98. TURAK, F. & OZGUR, M.U. "Simultaneous determination of allura red and ponceau 4R in drinks with the use of four derivative spectrophotometric methods and comparison with high-performance liquid chromatography". *J. Aoac Int.*, **96** (6): 1377, 2013.
99. ISSA, A.A.; AL-DEGS, Y.S.; AL-GHOUTI, M.A. & OLIMAT, A.A.M. "Studying competitive sorption behavior of methylene blue and malachite green using multivariate calibration". *Chem. Eng. J.*, **240**: 554, 2014.
100. KHATAEE, A.R.; FATHINIA, M.; NASERI, A.; HASANZADEH, A.; VAFAEI, F.; EMAMI, A.; HANIFEHPOUR, Y. & JOO, S.W. "Modeling and optimization of simultaneous photocatalysis of three dyes on ceramic-coated TiO₂ nanoparticles using chemometrics methods: phytotoxicological assessment during degradation process". *Res. Chem. Intermediat.*, **40** (3): 1283, 2014.
101. NI, Y.; WANG, Y. & KOKOT, S. "Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics". *Talanta*, **78** (2): 432, 2009.
102. KAPOR, M.A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P.A. & ZANONI, M.V.B. "Electroanalysis of food dyes: determination of indigo-carmin and tartrazine". *Eclét. Quím.*, **26**: 53, 2001.
103. DIAZ-GONZALEZ, M.; FERNANDEZ-SANCHEZ, C. & COSTA-GARCIA, A. "Comparative voltammetric behavior of indigo carmine at screen-printed carbon electrodes". *Electroanalysis*, **14** (10): 665, 2002.
104. SILVA, M.L.S.; GARCIA, M.B.Q.; LIMA, J.L.F.C. & BARRADO, E. "Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system". *Talanta*, **72** (1): 282, 2007.
105. MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **99**: 883, 2012.
106. CHEN, X.; WU, K.; SUN, Y. & SONG, X. "Highly sensitive electrochemical sensor for sunset yellow based on the enhancement effect of alumina microfibers". *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **185**: 582, 2013.
107. MAJIDI, M.R.; BAJ, R.F.B. & NASERI, A. "Carbon nanotube-ionic liquid (CNT-IL) nanocomposite modified sol-gel derived carbon-ceramic electrode for

- simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine in food samples". *Food Anal. Method.*, **6** (5): 1388, 2013.
108. GAN, T.; SUN, J.; ZHU, H.; ZHU, J. & LIU, D. "Synthesis and characterization of graphene and ordered mesoporous TiO₂ as electrocatalyst for the determination of azo colorants". *J. Solid State Electr.*, **17** (8): 2193, 2013.
109. GAN, T.; SUN, J.; WU, Q.; JING, Q. & YU, S. "Graphene decorated with nickel nanoparticles as a sensitive substrate for simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine in food samples". *Electroanalysis*, **25** (6): 1505, 2013.
110. YUA, J.; JIAA, J. & MAB, Z. "Comparison of electrochemical behavior of hydroxyl-substituted and nonhydroxyl-substituted azo dyes at a glassy carbon electrode". *J. Chin. Chem. Soc.*, **51** (6): 1319, 2004.
111. BEGGIATO, G.; CASALBOREMICELI, G.; GERI, A. & PIETROPAOLO, D. "Indigo carmine - an electrochemical study". *Ann. Chim.*, **83** (7-8): 355, 1993.
112. FERNANDEZ-SANCHEZ, C. & COSTA-GARCIA, A. "Voltammetric studies of indigo adsorbed on pre-treated carbon paste electrodes". *Electrochem. Commun.*, **2** (11): 776, 2000.
113. BOND, A.M.; MARKEN, F.; HILL, E.; COMPTON, R.G. & HÜGEL, H. "The electrochemical reduction of indigo dissolved in organic solvents and as a solid mechanically attached to a basal plane pyrolytic graphite electrode immersed in aqueous electrolyte solution". *J. Chem. Soc. Perk. T. 2*, **2**: 1735, 1997.
114. PLESKOV, Y.V. "Electrochemistry of diamond: A review". *Russ. J. Electrochem.*, **38** (12): 1275, 2002.
115. DE BARROS, R.D.M.; RIBEIRO, M.C.; AN-SUMODJO, P.T.; JULIAO, M.S.D.; SERRANO, S.H.P. & FERREIRA, N.G. "Boron-doped CVD diamond films. Part 1. History, production and characterization". *Quim.Nova*, **28** (2): 317, 2005.
116. BARANAUSKAS, V. "O futuro brilhante dos diamantes sintéticos". *Ciênc. Hoje*, **27** (161): 40, 2000.
117. FERRO, S. "Synthesis of diamond". *J. Mater. Chem.*, **12** (10): 2843, 2002.
118. JAMES E. BUTLER; RICHARD L. WOODIN; AND, L.M.B. & FALLON, P. "Thin Film Diamond Growth Mechanisms". *Philos. T. Roy. Soc. A*, **342** (1164): 209, 1993.
119. ALFARO, M.A.Q.; FERRO, S.; MARTINEZ-HUITLE, C.A. & VONG, Y.M. "Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment". *J. Brazil. Chem. Soc.*, **17** (2): 227, 2006.
120. PLESKOV, Y.V. "Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis". *J. Anal. Chem.*, **55** (11): 1045, 2000.
121. COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. & MARKEN, F. "Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes". *Electroanalysis*, **15** (17): 1349, 2003.

122. HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, R.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y. & SWAIN, G.M. "Conductive diamond thin-films in electrochemistry". *Diam. Relat. Mater.*, **12** (10-11): 1940, 2003.
123. LEE, J. & PARK, S.M. "Direct electrochemical assay of glucose using boron-doped diamond electrodes". *Anal. Chim. Acta*, **545** (1): 27, 2005.
124. SIANGPROH, W.; WANGFUENGGANAGUL, N. & CHAILAPAKUL, O. "Electrochemical oxidation of tiopronin at diamond film electrodes and its determination by amperometric flow injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, **499** (1-2): 183, 2003.
125. PECKOVÁ, K.; MUSILOVÁ, J. & BAREK, J. "Boron-doped diamond film electrodes—new tool for voltammetric determination of organic substances". *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **39**: 148, 2009.
126. LOURENCAO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous differential pulse voltammetric determination of ascorbic acid and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Electroanalysis*, **22** (15): 1717, 2010.
127. MEDEIROS, R.A.; LOURENCAO, B.C.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simple flow injection analysis system for simultaneous determination of phenolic antioxidants with multiple pulse amperometric detection at a boron-doped diamond electrode". *Anal. Chem.*, **82** (20): 8658, 2010.
128. DORNELLAS, R.M.; NOGUEIRA, D.B. & AUCELIO, R.Q. "The boron-doped diamond electrode voltammetric method for ultra-trace determination of the fungicide pyraclostrobin and evaluation of its photodegradation and thermal degradation". *Anal. Method.*, **6** (3): 944, 2014.
129. GIMENES, D.T.; PEREIRA, P.F.; CUNHA, R.R.; BEZERRA DA SILVA, R.A.; ABARZA MUNOZ, R.A. & RICHTER, E.M. "A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection". *Electroanalysis*, **24** (9): 1805, 2012.
130. HONORIO, G.G.; AZEVEDO, G.C.; COSTA MATOS, M.A.; LEAL DE OLIVEIRA, M.A. & MATOS, R.C. "Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry". *Food Control*, **36** (1): 42, 2014.
131. SARTORI, E.R.; TRENCH, A.B.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determination of propylthiouracil in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *J. Brazil. Chem. Soc.*, **24** (9): 1504, 2013.
132. YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes". *J. Electroanal. Chem.*, **473** (1-2) 1999.
133. GRANGER, M.C. & SWAIN, G.M. "The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes". *J. Electrochem. Soc.*, **146** (12): 4551, 1999.

134. GIRARD, H.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; HERLERN, M. & ETCHEBERRY, A. "Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes". *Diam. Relat. Mater.*, **16** (2): 316, 2007.
135. SIMON, N.; GIRARD, H.; BALLUTAUD, D.; GHODBANE, S.; DENEUVILLE, A.; HERLEM, M. & ETCHEBERRY, A. "Effect of H and O termination on the charge transfer of moderately boron doped diamond electrodes". *Diam. Relat. Mater.*, **14** (3-7): 1179, 2005.
136. SUFFREDINI, H.B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment". *Electrochim. Acta*, **49** (22-23): 4021, 2004.
137. HUTTON, L.A.; IACOBINI, J.G.; BITZIOU, E.; CHANNON, R.B.; NEWTON, M.E. & MACPHERSON, J.V. "Examination of the factors affecting the electrochemical performance of oxygen-terminated polycrystalline boron-doped diamond electrodes". *Anal. Chem.*, **85** (15): 7230, 2013.
138. GARBELLINI, G.S.; ULIANA, C.V. & YAMANAKA, H. "Detection of DNA nucleotides on pretreated boron-doped diamond electrodes". *J. Brazil. Chem. Soc.*, **22** (7): 1241, 2011.
139. TERASHIMA, C.; RAO, T.N.; SARADA, B.V.; KUBOTA, Y. & FUJISHIMA, A. "Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretreated boron-doped diamond electrodes". *Anal. Chem.*, **75** (7): 1564, 2003.
140. SKOOG, D.A.H., F. J. & NIEMAN, T. A., *Princípios de Análise Instrumental*. 5 ed. 2002.
141. GOSSER, D.K., *Cyclic Voltammetry: Simulation and analysis of reaction mechanisms*, New York, VCH, 1993, 165 p.
142. BRETT, A.M.O. & BRETT, C.M.A., *Electrochemistry: principles, methods and applications*, New York, INC, 1993.
143. RUZICKA, J. & HANSEN, E.H. "Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis". *Anal. Chim. Acta*, **78** (1): 145, 1975.
144. REIS, B.F.; KRONKA, E.A.M. & GINÉ, M.F. "Análise química por injeção em fluxo contínuo". *Quim. Nova*, **12**: 82, 1989.
145. REIS, B.F. "Chemical analysis by flow injection: Twenty years of development". *Quim. Nova*, **19** (1): 51, 1996.
146. KARLBERG, B. & PACEY, G.E., *Flow injection analysis a practical guide*, New York, Elsevier, 1989.
147. SANTOS, W.T.P.; GIMENES, D.T.; RICHTER, E.M. & ANGNES, L. "Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications". *Quim. Nova*, **34** (10): 1753, 2011.
148. SURAREUNGCHAI, W.; DEEPUNYA, W. & TASAKORN, P. "Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose". *Anal. Chim. Acta*, **448**: 215, 2001.
149. MIRANDA, J.A.T.; CUNHA, R.R.; GIMENES, D.T.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Simultaneous determination of ascorbic acid and

- acetylsalicylic acid using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection". *Quim. Nova*, **35** (7): 1459, 2012.
150. SANTOS, W.T.P.; DE ALMEIDA, E.G.N.; FERREIRA, H.E.A.; GIMENES, D.T. & RICHTER, E.M. "Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection". *Electroanalysis*, **20** (17): 1878, 2008.
151. GIMENES, D.T.; SANTOS, W.T.P.; TORMIN, T.P.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Flow-injection amperometric method for indirect determination of dopamine in the presence of a large excess of ascorbic acid". *Electroanalysis*, **20** (1): 74, 2010.
152. LIMA, A.B.; CHAVES, S.C.; SILVA, L.M.; PEREIRA, P.F.; RICHTER, E.M. & SANTOS, W.T.P. "Determination of nimesulide by flow injection analysis with multiple-pulse amperometric detection". *Quim. Nova*, **36** (9): 1296, 2013.
153. SILVA, W.C.; PEREIRA, P.F.; MARRA, M.C.; GIMENES, D.T.; CUNHA, R.R.; SILVA, R.A.B.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "A Simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection". *Electroanalysis*, **23** (12): 2764, 2011.
154. GANDINI, D.; MICHAUD, P.A.; DUO, I.; MAHE, E.; HAENNI, W.; PERRET, A. & COMNINELLIS, C. "Electrochemical behavior of synthetic boron-doped diamond thin film anodes". *New Diam. Front. Carbon Technol.*, **9** (5): 303, 1999.
155. RICHTER, E.M.; JESUS, D.P.D.; NEVES, C.A.; LAGO, C.L.D. & ANGNES, L. "Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de CDs graváveis". *Quim. Nova*, **26** (6): 839, 2003.
156. DOSSI, N.; TONIOLO, R.; SUSMEL, S.; PIZZARIELLO, A. & BONTEMPELLI, G. "Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks". *Chromatographia*, **63** (11-12): 557, 2006.
157. MINIOTI, K.S.; SAKELLARIOU, C.F. & THOMAIDIS, N.S. "Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector". *Anal. Chim. Acta*, **583** (1): 103, 2007.
158. SERDAR, M. & KNEZEVIC, Z. "Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography". *Arh. Hig. Rada Toksiko.*, **62** (2): 169, 2011.
159. KONOPKA, S.J. & MCDUFFIE, B. "Diffusion coefficients of ferricyanide and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry". *Anal. Chem.*, **42** (14): 1741, 1970.
160. BARD, *Electrochemical methods fundamentals and applications*, New York, 2 ed, John Wiley & Sons Inc, 2001.
161. LAVIRON, E. "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems ". *J. Electroanal. Chem.*, **101** (1): 19, 1979.

162. ICH, Validation of analytical procedures: text and methodology, Guideline, 2005.

163. RIBEIRO, F.A.D.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.D. & SCHNEIDER, R.P. "Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados".

Quim. Nova, **31**: 164, 2008.

164. ANVISA, Resolução - RDC n. 05. *www.anvisa.gov.br*, 2007.