

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

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ASPARTAME E
CICLAMATO DE SÓDIO EM PRODUTOS DIETÉTICOS
EMPREGANDO UM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO
COM BORO**

Roberta Antigo Medeiros*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA
(área: QUÍMICA ANALÍTICA)

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

*** Bolsista CAPES**

**SÃO CARLOS
2007**

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

M488dv

Medeiros, Roberta Antigo.

Determinação voltamétrica de aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro / Roberta Antigo Medeiros. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
109 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Química analítica. 2. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). 3. Aspartame. 4. Ciclamato de sódio. 5. Voltametria de onda quadrada. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Waldir e Helena, símbolo de amor, esperança e incentivo para superar a saudade e as dificuldades.

A minha irmã Luciana, pelo exemplo de força de vontade, superação e alegria.

Ao Roberto pelo carinho, paciência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força, saúde, por estar sempre comigo e me ajudar a superar os momentos difíceis.

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

Ao Prof. Dr. Romeu Cardozo Rocha Filho e a Adriana Evaristo de Carvalho que nos cedeu o filme de diamante dopado com boro e também nos ajudou no desenvolvimento do trabalho.

Ao Giancarlos R. Salazar-Banda pela construção do eletrodo de diamante dopado com boro.

À Tatiane R. Albarici pela ajuda nas medidas cromatográficas.

Aos órgãos de financiamento: CAPES, CNPq e FAPESP.

Ao pessoal do LBBES e do LABIE, pelo companheirismo, apoio e espírito de grupo.

Aos amigos Raquel, Estela e Luciano pelo convívio sempre alegre e agradável.

A todos os meus familiares e amigos que mesmo estando distantes sempre me deram carinho e apoio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ASPARTAME	4
1.1.1. MÉTODOS DE ANÁLISE DO ASPARTAME	6
1.1.2. DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ASPARTAME	8
1.2. CICLAMATO DE SÓDIO	9
1.2.1. MÉTODOS DE ANÁLISE PARA O CICLAMATO DE SÓDIO	11
1.3.2. DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DO CICLAMATO DE SÓDIO	12
1.3. ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (BDD)	13
1.4. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	19
1.4.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA	20
1.4.2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA (SWV)	21
1.4.2.1. DESENVOLVIMENTO TEÓRICO	25
1.6 OBJETIVOS	28
2. PARTE EXPERIMENTAL	30
2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	30
2.2. AMOSTRAS ANALISADAS	31
2.2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME	31
2.2.1.1. ADOÇANTES DIETÉTICOS EM PÓ (ZERO CAL [®] , FINN [®] E GOLD [®])	31
2.2.1.2. PREPARADOS SÓLIDOS PARA REFRESCOS (SBELT [®] , MID [®] E FIT [®])	31
2.2.1.3. REFRIGERANTES COLA (COCA-COLA [®] E PEPSI-COLA [®])	32
2.2.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CICLAMATO DE SÓDIO	32
2.2.2.1. ADOÇANTES DIETÉTICOS LÍQUIDOS (ZERO CAL [®] E FINN [®])	32
2.2.2.2. PREPARADO SÓLIDO PARA REFRESCO (MAGRO [®])	32
2.2.2.3. REFRIGERANTES DE GUARANÁ (ANTARCTICA [®] E KUAT [®])	32
2.3. INSTRUMENTAÇÃO	33
2.3.1. ELETRODOS	33
2.3.1.1. ELETRODO DE TRABALHO	33
2.3.1.2. ELETRODO DE REFERÊNCIA	34

2.3.1.3. ELETRODO AUXILIAR (CONTRA ELETRODO).....	34
2.3.2. CÉLULA ELETROQUÍMICA	35
2.4. METODOLOGIA	35
2.4.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA E DE ONDA QUADRADA	35
2.4.2. ESTUDO DE INTERFERENTES EM POTENCIAL	36
2.4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	36
<u>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>39</u>
3.1. JANELA ELETROQUÍMICA DE POTENCIAL	39
3.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO ASPARTAME SOBRE O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO.....	40
3.2.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	40
3.2.1.1. ESTUDO DO EFEITO DO MEIO.....	41
3.2.2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	44
3.2.2.1. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO CATÓDICO.....	45
3.2.2.2. EFEITO DA FREQUÊNCIA DE APLICAÇÃO DOS PULSOS DE POTENCIAIS (f)	46
3.2.2.3. EFEITO DA AMPLITUDE DO PULSO DE POTENCIAL (a).....	48
3.2.2.4. EFEITO DO INCREMENTO DE VARREDURA (ΔE_s)	50
3.2.2.5. ESTUDO DE REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE.....	51
3.2.3. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	53
3.2.4. ESTUDO DE INTERFERENTES EM POTENCIAL E TESTE DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO.....	54
3.2.5. DETERMINAÇÃO DE ASPARTAME EM AMOSTRAS COMERCIAIS E VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	58
3.2.6. NÚMEROS DE ELÉTRONS ENVOLVIDOS E MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO ASPARTAME.....	61
3.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO CICLAMATO DE SÓDIO SOBRE O ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO	65
3.3.1. VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	65
3.3.1.1. ESTUDO DO EFEITO DO MEIO	66
3.3.2. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	68
3.3.2.1. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO CATÓDICO.....	68

3.3.2.2. EFEITO DA FREQUÊNCIA DE APLICAÇÃO DOS PULSOS DE POTENCIAIS	69
3.3.2.3. EFEITO DA AMPLITUDE DE PULSO DE POTENCIAL	71
3.3.2.4. ESTUDO DE REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE.....	72
3.3.3. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	74
3.3.4. ESTUDO DE INTERFERENTES EM POTENCIAL E TESTE DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO.....	75
3.3.5. DETERMINAÇÃO DE CICLAMATO DE SÓDIO EM AMOSTRAS COMERCIAIS E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	78
3.3.6. NÚMERO DE ELÉTRONS ENVOLVIDOS E MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO CICLAMATO DE SÓDIO	81
3.4. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ASPARTAME E CICLAMATO DE SÓDIO...	84
3.4.1. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	84
3.4.2. ESTUDO DE REPETIBILIDADE	88
3.4.3. ESTUDO DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO.....	88
3.4.4. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ASPARTAME E CICLAMATO DE SÓDIO EM AMOSTRAS COMERCIAIS E VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	90
<u>4. CONCLUSÕES.....</u>	<u>95</u>
<u>5. ATIVIDADES FUTURAS</u>	<u>99</u>
<u>6. REFERÊNCIAS</u>	<u>101</u>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Propriedades diversas de diferentes materiais de interesse tecnológico.....	13
Tabela 3.1. Estudo de adição e recuperação de aspartame em amostras de produtos dietéticos	57
Tabela 3.2. Resultados obtidos na determinação de aspartame em produtos dietéticos analisados por HPLC e por SWV	61
Tabela 3.3. Estudo de adição e recuperação de ciclamato de sódio em amostras de produtos dietéticos.....	77
Tabela 3.4. Resultados obtidos na determinação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos analisados por HPLC e por SWV	81
Tabela 3.5. Parâmetros da SWV selecionados para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio	84
Tabela 3.6. Estudo de adição e recuperação de aspartame em produtos dietéticos na determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio.....	89
Tabela 3.7. Estudo de adição e recuperação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos na determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio.....	89
Tabela 3.8. Resultados obtidos na determinação de aspartame em produtos dietéticos empregando-se HPLC e SWV	92
Tabela 3.9. Resultados obtidos na determinação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando-se HPLC e SWV	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura do aspartame	4
Figura 1.2 - Síntese do aspartame.....	5
Figura 1.3 - Estrutura do ácido ciclâmico e seus sais de sódio e cálcio.....	9
Figura 1.4 - Síntese do ciclamato de sódio.....	10
Figura 1.5 - Esquema geral de deposição de filmes de diamante, a partir de uma fase gasosa, pelo método CVD.....	15
Figura 1.6 - Intervalo de potencial aproximado para platina, mercúrio, carbono e diamante dopado com boro.	18
Figura 1.7 - (A) Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica.	21
(B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível.	21
Figura 1.8 - Representação esquemática da voltametria de onda quadrada, onde: 1) potencial na forma de onda; 2) escada de potencial; 3) forma de aplicação do potencial na SWV; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total. ...	23
Figura 1.9 - Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada.	24
Figura 1.10 - Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B).....	24
Figura 2.1 – Foto do eletrodo de diamante dopado com boro.....	34
Figura 2.2 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica.	35
Figura 3.1 - Voltamograma cíclico para o eletrodo de diamante dopado com boro em ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹	39
Figura 3.2 - Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo BDD, na ausência (a) e na presença de aspartame 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ (b).	41
Figura 3.3 - Voltamogramas cíclicos para a oxidação do aspartame em diferentes eletrólitos suporte: (A) tampão fosfato (pH = 6,0); (B) tampão BR (pH = 5,0); (C) ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹	42
Figura 3.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o aspartame em diferentes concentrações do eletrólito suporte ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄). ([Aspartame] = 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , v = 50 mV s ⁻¹).....	43
Figura 3.5 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o aspartame 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , na presença de oxigênio (a); e na ausência de oxigênio (b).	43
Figura 3.6 - Voltamogramas de onda quadrada do aspartame (1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , em ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ , f = 10 s ⁻¹ , a = 40 mV, ΔE _s = 2 mV).	44

Figura 3.7 - Voltamogramas de onda quadrada do aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o eletrodo BDD sem pré-tratamento catódico (a) e com o pré-tratamento catódico (b). ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).....	46
Figura 3.8 - Influência da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial no aspecto geral dos voltamogramas do aspartame ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	47
Figura 3.9 - Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos para o aspartame (dados extraídos da Figura 3.20).	48
Figura 3.10 - Influência da variação da amplitude da onda quadrada no aspecto geral dos voltamogramas do aspartame ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 10 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	49
Figura 3.11 - Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude da onda quadrada para o aspartame (dados extraídos da Figura 3.10).....	50
Figura 3.12 - Influência da variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico ($[\text{Aspartame}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$).	51
Figura 3.13 - Voltamogramas de onda quadrada para o aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ obtidos em quintuplicata ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). .	52
Figura 3.14 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos em dias diferentes para soluções de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).....	52
Figura 3.15 - Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de aspartame ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	53
Figura 3.16 - Curva analítica obtida para o aspartame em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	54
Figura 3.17 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o aspartame na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência de tartrazina (a) e na presença de tartrazina na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (b).	55
Figura 3.18 - SW voltamogramas obtidos para a determinação de aspartame em produtos dietéticos (adoçante de mesa: Zero cal [®]). (1) amostra Zero cal [®] ; (2) amostra Zero cal [®] + $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (3) amostra Zero cal [®] + $1,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (4) amostra Zero cal [®] + $2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e (5) amostra Zero cal [®] + $3,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de aspartame.	58
Figura 3.19 – Cromatograma típico para o aspartame na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	59
Figura 3.20 - Curva analítica obtida para o aspartame empregando HPLC.....	60
Figura 3.21 - Variação do potencial com o pH para o aspartame.	62

Figura 3.22 - Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.	63
Figura 3.23 - Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo BDD, na ausência (a) e na presença de ciclamato de sódio $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (b).	65
Figura 3.24 - Voltamogramas cíclicos para a oxidação do aspartame em diferentes eletrólitos suporte: (A) tampão BR (pH = 5,0); (b) ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	66
Figura 3.25 - Voltamogramas cíclicos para o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações do eletrólito suporte, H_2SO_4	67
Figura 3.26 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de oxigênio (a); e na ausência de oxigênio (b).	67
Figura 3.27 - Voltamogramas de onda quadrada do ciclamato de sódio ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	68
Figura 3.28 - Voltamogramas de onda quadrada do ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o eletrodo BDD sem pré-tratamento catódico (a) e com o pré-tratamento catódico (b). ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	69
Figura 3.29 - Influência da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial no aspecto geral dos voltamogramas do ciclamato de sódio ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	70
Figura 3.30 - Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos para o ciclamato de sódio (dados extraídos da Figura 3.43).	71
Figura 3.31 - (A) Influência da variação da amplitude do pulso de potencial nos voltamogramas do ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). (B) Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude do pulso de potencial onda quadrada para o aspartame (dados extraídos da Figura 3.44).	72
Figura 3.32 - Voltamogramas de onda quadrada para o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	73
Figura 3.33 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos em dias diferentes para soluções de ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	73
Figura 3.34 - Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de ciclamato de sódio ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).	74
Figura 3.35 - Curva analítica obtida para o ciclamato de sódio.	75

- Figura 3.36** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ciclamato de sódio na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência de acesulfame-K (a) e na presença de acesulfame-K na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (b)..... 76
- Figura 3.37** - SWV voltamogramas obtidos para a determinação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos (refrigerante de guaraná Antarctica[®]). (1) amostra Antarctica[®]; (2) amostra Antarctica[®] + $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (3) amostra Antarctica[®] + $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (4) amostra Antarctica[®] + $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (5) amostra Antarctica[®] + $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (6) amostra Antarctica[®] + $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de ciclamato de sódio..... 78
- Figura 3.38** - Cromatograma típico para o ciclamato de sódio na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 79
- Figura 3.39** - Curva analítica obtida para o ciclamato de sódio empregando HPLC..... 80
- Figura 3.40** - Variação do potencial com o pH para o ciclamato de sódio..... 82
- Figura 3.41** - Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial..... 83
- Figura 3.42** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o aspartame em diferentes concentrações ($5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo constante o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$)..... 85
- Figura 3.43** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ciclamato de sódio em diferentes concentrações ($5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo constante o aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$)..... 86
- Figura 3.44** - Voltamogramas de onda quadrada para o aspartame e para o ciclamato de sódio em diferentes concentrações em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Concentrações: Aspartame – $5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Ciclamato de sódio – $5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$)..... 87
- Figura 3.45** - (A) Curva analítica obtida para o aspartame..... 87
(B) Curva analítica obtida para o ciclamato de sódio..... 87
- Figura 3.46** - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$)..... 88
- Figura 3.47** - SW voltamogramas obtidos para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos (refrigerante de guaraná Kuat[®]). (1) amostra Kuat[®]; (2) amostra Kuat[®] + $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (3) amostra Kuat[®] + $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (4) amostra Kuat[®] + $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de aspartame..... 90

Figura 3.48 - SW voltamogramas obtidos para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos (refrigerante de guaraná Kuat[®]). (1) amostra Kuat[®]; (2) amostra Kuat[®] + $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; (3) amostra Kuat[®] + $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; (4) amostra Kuat[®] + $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; (5) amostra Kuat[®] + $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de solução padrão de ciclamato de sódio. 91

RESUMO

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ASPARTAME E CICLAMATO DE SÓDIO EM PRODUTOS DIETÉTICOS EMPREGANDO UM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO. Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação dos edulcorantes aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) e a voltametria de onda quadrada (SWV). No primeiro procedimento desenvolvido determinou-se aspartame em produtos dietéticos empregando-se um eletrodo de BDD e a técnica voltamétrica por onda quadrada após otimização das condições experimentais. A recuperação de aspartame em 8 amostras variou de 95,9 % a 104,4 % dos valores adicionados. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de aspartame de $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $2,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo de 5 determinações sucessivas de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi de 0,17 % (repetibilidade) e de 5 determinações em dias e soluções diferentes de aspartame foi de 2,8 % (reprodutibilidade). A quantificação de aspartame nos produtos dietéticos utilizando o eletrodo de BDD apresentou resultados concordantes com os resultados obtidos empregando-se o método cromatográfico a um nível de confiança de 95 %. Na seqüência, foi estudada a determinação de ciclamato de sódio por oxidação desta substância sobre o eletrodo de BDD, empregando-se a técnica SWV. A curva analítica para o ciclamato de sódio foi linear no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ e $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo de 5 medidas sucessivas de ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi de 1,1 % (repetibilidade) e de 5 determinações em dias e soluções de ciclamato de sódio diferentes foi de 2,4 % (reprodutibilidade). Os valores do estudo de recuperação em 5 amostras comerciais variaram entre 98,6 % e 106 % e os resultados obtidos na

determinação do ciclamato de sódio nessas amostras estão em concordância com os resultados obtidos empregando-se o método de referência (HPLC). Finalmente, foi desenvolvido um procedimento para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio, uma vez que estes edulcorantes apresentaram potenciais de pico de oxidação bem distintos, 1,6 V e 1,9 V respectivamente. As curvas analíticas foram lineares no intervalo de concentração de aspartame entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $3,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e de $5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o ciclamato de sódio. A determinação simultânea destes edulcorantes em produtos dietéticos também apresentou resultados satisfatórios e concordantes com os resultados obtidos pelo método cromatográfico.

ABSTRACT

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF ASPARTAME AND SODIUM CYCLAMATE IN DIETARY PRODUCTS EMPLOYING BORON DOPED DIAMOND ELECTRODE. The development of electroanalytical procedures for aspartame and sodium cyclamate determination in dietary products using a boron doped diamond (BDD) electrode and the square wave voltammetry (SWV) is reported in this work. The first procedure development is reported in related to the determination of aspartame in dietary products employing BDD electrode and the SWV technique after optimization of the experimental conditions. The recovery of aspartame from 8 samples ranged from 95.9 % to 104.4 % of the added amount. The analytical curve was linear in the aspartame concentration range from $9.9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ to $5.2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ with a detection limit of $2.3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The relative standard deviation for 5 successive determinations of $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ aspartame was 0.17 % and the relative standard deviation for 5 determinations of aspartame in different days was 2.8 %. The concentration of aspartame determined in several dietary products using the BDD electrode and those concentrations determined using a HPLC method are in close agreement (calculated *t*-values did not exceed the critical values at the 95 % confidence level) and within an acceptable range of error. In the sequence, the analytical determination of sodium cyclamate was studied by oxidation of this substance on BDD electrode employed the SWV. The analytical curve for sodium cyclamate was linear in the concentration range from 5.0×10^{-5} to $4.1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ with a detection limit of $4.8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The relative standard deviation for five successive measurements was 1.1 % and the relative standard deviation for determinations of $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sodium cyclamate in five different days was 2,4 %. The recoveries values from five samples ranged from 98.6 % to 106,0 % and the results found using the proposed method agreed at the 95% confidence level with those from a HPLC

method. Finally, a procedure for simultaneous determination of aspartame and sodium cyclamate was developed, once the oxidation peak potentials of the aspartame and sodium cyclamate are 1.6 V and 1.9 V, respectively. The analytical curves were linear in the aspartame concentration range from 5.0×10^{-6} to 4.0×10^{-5} mol L⁻¹, with detection limit of 3.5×10^{-7} mol L⁻¹ and from 5.0×10^{-5} to 4.0×10^{-4} mol L⁻¹, with detection limit of 4.5×10^{-6} mol L⁻¹ for sodium cyclamate. The simultaneous determination of these sweeteners in various dietary products was implemented with success.

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação com a saúde e qualidade de vida, as pessoas têm mudado alguns de seus hábitos, se exercitam mais, comem alimentos mais saudáveis e têm diminuído o consumo de alimentos ricos em açúcar, sal e gordura, aumentando assim, a demanda do consumo de alimentos com propriedades funcionais. A indústria alimentícia é responsável por esta demanda, e como consequência, tem havido uma rápida e crescente inovação nestes produtos disponíveis para o consumo em todo mundo^{1,2}.

Estes produtos têm sido definidos pelos termos diet e light. Pela regulamentação brasileira definida pelas portarias 27/98 e 29/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária, o termo light pode ser utilizado na rotulagem de alimentos em duas situações, a primeira considera apenas o conteúdo absoluto de nutrientes (sódio, açúcares, colesterol, gorduras ou valor energético), cujos teores considerados baixos são definidos como atributos que devem obedecer à legislação específica de cada alimento. Já a segunda situação compara os alimentos com teores reduzidos desses nutrientes a alimentos similares de um mesmo fabricante ou ao valor médio de três produtos similares de uma região. Essa comparação deve atender a uma diferença mínima de 25% do nutriente ou da caloria do produto. Os produtos diet, segundo a portaria 29/98, são alimentos destinados a dietas com restrição de nutrientes e/ou podem ser empregados para o controle de peso. No caso das dietas com restrições, são raros os exemplos nos quais a ausência de um componente (carboidratos, gorduras, proteínas ou sódio) não seja obrigatória. Existem outras expressões que podem substituir o termo diet nos produtos como: não contém, livre, zero, sem adição de, isento de, free, no, without³.

A eliminação ou redução de sacarose (açúcar) nos produtos alimentares, diet ou light, exige que o açúcar seja substituído por um aditivo alimentar⁴ que possua características semelhantes, principalmente a doçura. É aí que entram os edulcorantes artificiais, também chamados de adoçantes. Estes

edulcorantes devem ser uma cópia exata das propriedades sensoriais da sacarose, ou seja, não ter gosto residual, promover as propriedades funcionais da sacarose sendo quimicamente estável, com baixo teor calórico, poder adoçante igual ou superior ao da sacarose, ser solúvel, não ser tóxico, nem carcinogênico e ser economicamente acessível. Infelizmente, nenhum dos edulcorantes artificiais comercialmente disponíveis combina todas essas características, mas estas limitações podem ser parcialmente superadas pelo uso de uma combinação de edulcorantes⁵⁻⁷.

A popularização dos edulcorantes artificiais começou na década de 60, nos Estados Unidos, quando no Brasil ainda eram considerados fármacos, consumidos somente por pessoas que eram portadoras de diabetes ou outras doenças com limitação na ingestão de açúcar. Esta situação começou mudar a partir de 1980 com a reformulação e a classificação dos edulcorantes, permitindo que todos tivessem acesso a estes produtos⁸. Os edulcorantes podem ser classificados em nutritivos e não nutritivos. Os edulcorantes nutritivos fornecem energia e textura aos alimentos e geralmente contém o mesmo valor calórico que o açúcar. Já os edulcorantes não nutritivos fornecem somente doçura acentuada aos alimentos, não desempenha nenhuma outra função tecnológica ao produto final e não geram calorias significativas^{1,2}. Os edulcorantes artificiais são classificados como não nutritivos, devem ser: incolores, inodoros, estáveis e solúveis em solução aquosa, atóxicos, economicamente acessíveis, possuir ausência de sabor e não metabolizar ou produzir metabólitos que prejudiquem o organismo. Seu uso abrange não somente produtos dietéticos (e.g. pudins, gelatinas, geléias, sorvetes, gomas de mascar, refrigerantes, preparados sólidos para refrescos, adoçantes de mesa e outros), como também é usado em medicamentos para encobrir ou mascarar propriedades organolépticas dos fármacos, e em produtos de higiene bucal para diminuir a incidência de caries nos usuários^{1,9,10}.

Dentre os edulcorantes artificiais mais comuns estão o ciclamato de sódio, sacarina, aspartame e o acesulfame-K, os quais são permitidos em 90 países¹¹, inclusive no Brasil¹. Em alguns países como nos Estados Unidos, o consumo de alguns destes edulcorantes não é permitido, devido a estudos que mostram que eles podem causar danos a saúde do consumidor, mas, até os dias de hoje nada foi confirmado.

Existe uma preocupação muito grande relacionada á segurança na ingestão destes edulcorantes, investigações sobre seus efeitos na espécie humana são cada vez mais importantes, uma vez que a procura por produtos contendo tais edulcorantes cresce a cada dia, eles possuem um valor de ingestão diária aceitável (IDA-quantidade de um determinado composto que pode ser consumido diariamente, com segurança, durante toda a vida)¹² que foi estabelecido pelo Comitê Científico Europeu de Alimentos. Sendo assim, há na literatura diversos procedimentos analíticos para determinação destes adoçantes, para o controle do limite de tolerância e para evitar seu uso em excesso. No entanto, muitos destes métodos, consomem muito tempo ou requerem equipamentos de alto custo. Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos para estudar, determinar e monitorar a quantidade destes adoçantes em produtos alimentares.

Neste sentido, o eletrodo de diamante dopado com boro apresenta várias características, como por exemplo, uma larga janela eletroquímica de potencial de trabalho que resulta em elevada reprodutibilidade e baixas correntes residuais, e ainda, alta estabilidade, que o torna um material promissor para aplicações analíticas, e neste caso, para determinação de edulcorantes artificiais, sendo que, na literatura ainda não há métodos analíticos para determinação de adoçantes que empreguem técnicas voltamétricas e o BDD como eletrodo de trabalho.

1.1. Aspartame

Descoberto acidentalmente em 1965 nos Estados Unidos por J. M. Schlatter, quando tentava desenvolver um sedativo para úlceras, o aspartame (Figura 1.1) é um dipeptídeo formado a partir do ácido aspártico, fenilalanina e metanol. É um pó branco, cristalino, inodoro, possui 4 cal/g, com uma doçura 200 vezes maior que a do açúcar^{1,2,13,14}, possui algumas vantagens como, sabor semelhante à sacarose e sem sabor residual amargo; redução calórica pela sua intensa doçura; reforça o sabor e o aroma, sinergismo com outros adoçantes artificiais, é seguro para diabéticos; isento de sódio, podendo ser consumido por hipertensos; não cariogênico e não tóxico^{5,10,13}.

Introduzido sob o nome comercial de Nutrasweet[®] é atualmente um dos adoçantes mais comercializados no mundo e, no Brasil, vem sendo muito empregado em diversos produtos dietéticos, como refrigerantes, iogurtes, refrescos em pó, gelatinas, pudins, chás e sorvetes^{15,16}.

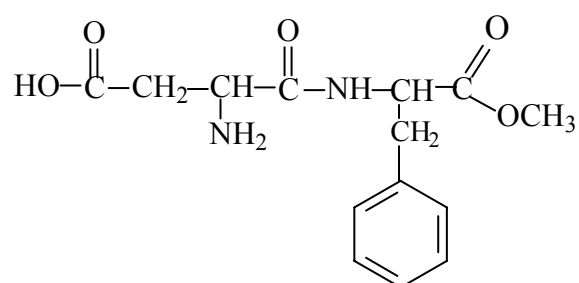


Figura 1.1 - Estrutura do aspartame.

A síntese química deste edulcorante consiste na reação de acoplamento do ácido L-aspártico com éster metílico da L-fenilalanina, formando uma mistura de α e β isômeros com predominância do composto α , como mostra a Figura 1.2.

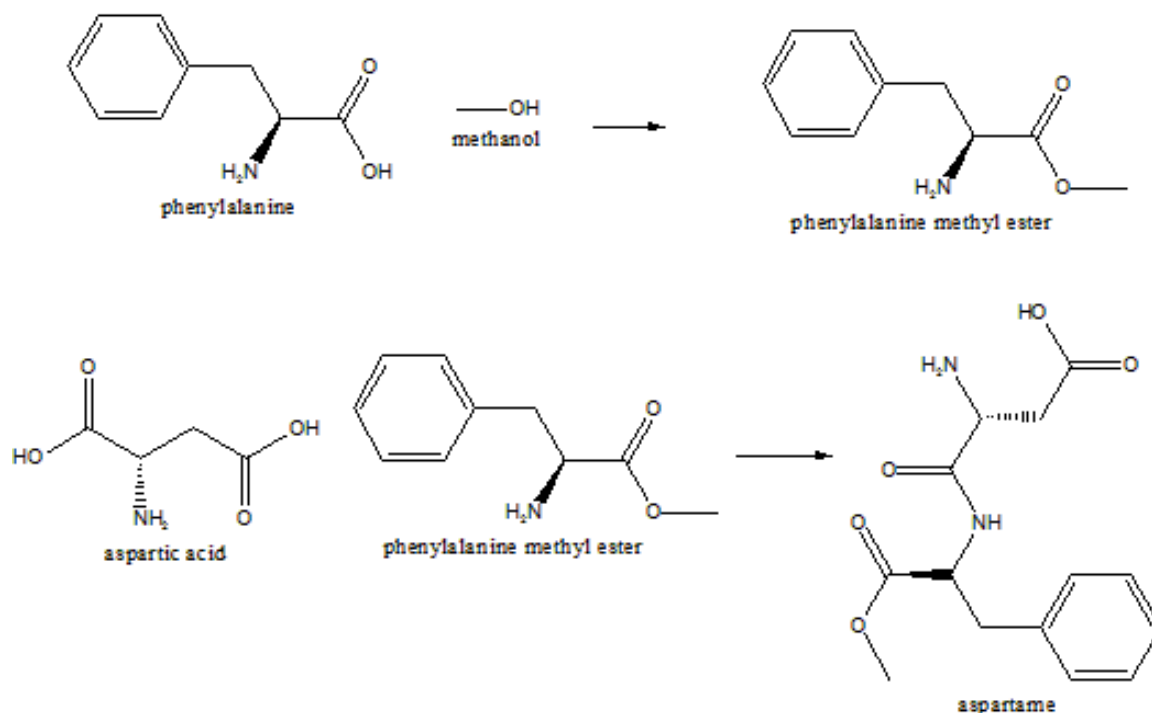


Figura 1.2 - Síntese do aspartame.

Este edulcorante é o único entre os de alto grau de doçura que é metabolizado, sendo digerido como qualquer dipeptídeo. Sendo assim, a ingestão dos produtos metabolizados do aspartame, não deveria causar problemas à saúde, uma vez que na alimentação normal as quantidades dos componentes, L-fenilalanina, ácido L-aspártico, são muito superiores¹⁷. No entanto, o consumo de aspartame, por conter fenilalanina, deve ser rigorosamente controlado em pacientes fenilcetonúricos. A fenilcetonúria é uma rara doença genética, detectada no nascimento, que inibe a capacidade de metabolizar a fenilalanina proveniente de qualquer fonte. Doses elevadas de fenilalanina ocasionam mudança de comportamento, como depressão, insônia, cefaléia e alteração na visão^{18,14}.

O processo de aprovação do aspartame iniciou nos Estados Unidos em 1973 e foi liberado em 1974. A segurança no consumo do aspartame e seus constituintes metabólicos por humanos foram verificados através de intensos estudos toxicológicos em animais, utilizando-se doses maiores que aquelas possivelmente consumidas por pessoas. Os estudos farmacológicos em animais

não revelaram efeitos do aspartame sobre o sistema nervoso central, aparelho digestivo, endócrino e reprodutor, nem sobre a resposta inflamatória as doses que superam em muito as concentrações alcançadas no consumo humano. Através dos resultados obtidos pelos estudos, foi constatado que no caso do aspartame a quantidade máxima que pode ser ingerida diariamente sem qualquer efeito adverso é de 40 mg/kg de peso corpóreo do consumidor^{5,17}.

O aspartame possui boa estabilidade quando seco e em condições adequadas de armazenagem, pode permanecer mais de cinco anos sem apresentar alterações significativas. Porém, na presença de umidade ou em solução, a ligação éster presente na molécula de aspartame é instável e sob certas condições de temperatura e pH pode ocorrer à conversão do aspartame em aspartilfenilalanina e/ou sua forma ciclicadictopiperazina (DKP) e pequenas quantidades de β -aspartame e, estes produtos formados não conferem o sabor doce aos produtos^{5,13,14}. Em solução aquosa é estável no intervalo de pH entre 3 e 5, tendo a melhor estabilidade em temperatura de 20-25 °C e pH igual a 4,3.

Devido à limitada estabilidade do aspartame, produtos a serem fritos, cozidos, etc., onde o produto é exposto a altas temperaturas de processamento por um longo período de tempo, não podem conter o edulcorante aspartame. Mas, ele ainda pode ser utilizado em vários processos alimentícios, e já ficou demonstrado que, mesmo a altas temperaturas, em curtos períodos de tempo a perda da doçura do aspartame foi insignificante¹⁹.

1.1.1. Métodos de Análise do Aspartame

O aspartame tem sido determinado em diversos produtos dietéticos por várias técnicas, as mais utilizadas são: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)^{16,20-25}, cromatografia gasosa^{26,27}, eletroforese capilar^{28,29} espectrofotometria na região do UV e visível^{15,30-32} e ainda métodos amperométricos³³⁻³⁷ e potenciométricos^{38,39}. Algumas destas técnicas necessitam de um tempo de análise muito grande ou não possuem seletividade necessária

para sua determinação em amostras comerciais, isto, acaba dificultando a quantificação do aspartame.

A espectrofotometria, por exemplo, necessita melhorar sua seletividade por aplicação de procedimentos preliminares de extração para a determinação do aspartame. É o caso do método da ninidrina, que teve sua seletividade melhorada utilizando extrações prévias em carbonato de propileno³¹ ou mistura de isopropanol-metanol¹⁵. Estas aplicações de etapas prévias atentam contra o desempenho analítico do procedimento, principalmente no que diz respeito ao tempo de análise.

A eletroforese capilar é outra técnica usada para a determinação de aspartame, Joseph e Matyska²⁹ em 1997 desenvolveram um procedimento que permite determinar o aspartame em produtos alimentícios em um tempo menor que o tempo gasto nos métodos empregando HPLC. Walker et al.²⁸ também em 1997 desenvolveram um procedimento empregando a eletroforese capilar que permite a determinação simultânea de aspartame, ácido benzóico e cafeína em dois minutos.

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais utilizada para a determinação deste edulcorante devido à sua seletividade e por possibilitar a determinação simultânea do aspartame com outros edulcorantes artificiais, tais como acesulfame-K, ciclamato de sódio e sacarina, e também com outros compostos. Demiralay et al.²² desenvolveram um procedimento para a separação e quantificação simultânea de acesulfame-K, aspartame, sacarina, vanilina, ácido benzóico e ácido sórbico. Gibbis et al.¹⁶ também propuseram um procedimento de quantificação do aspartame e de seus metabólitos utilizando HPLC e uma coluna de fase reversa com detecção espectrofotométrica na região do UV. No entanto, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de alto custo, alto tempo de análise e trabalhosa para alguns tipos de amostras.

1.1.2. Determinação Eletroquímica do Aspartame

Algumas técnicas eletroquímicas também foram utilizadas para a análise de aspartame. Malaki e Koupparis³⁰ desenvolveram um método potenciométrico por meio da titulação do aspartame com dinitrofluoro benzeno e detecção do ponto de equivalência com eletrodo íon-seletivo a fluoreto. Campanella et al.³⁹ propuseram um biossensor potenciométrico para a análise de aspartame que consiste na imobilização da enzima L-aspartase por meio de poliazetidina em um eletrodo sensível a amônia gasosa. Este biossensor apresentou um tempo de vida de aproximadamente 20 dias. No método desenvolvido por Odaci et al.³⁵ as enzimas carboxil esterase e álcool oxidase foram imobilizadas em uma membrana gelatinosa e subsequentemente combinada com um eletrodo para oxigênio. As condições ideais para a operação do eletrodo foram pH = 8 e temperatura de 37 °C. Compagnone et al.³⁶ desenvolveram um eletrodo enzimático amperométrico por imobilização covalente da enzima álcool oxidase e α -Chimotripsin, como transdutor foi utilizado um eletrodo sensível a peróxido de hidrogênio. Foram obtidos bons resultados com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Porém, diferentes estratégias tiveram que ser utilizadas para eliminar interferências. Villarta et al.³³ também desenvolveram um eletrodo enzimático amperométrico para a determinação de aspartame, baseado na co-imobilização das enzimas aspartato aminotransferase e glutamato oxidase. O eletrodo apresentou resposta linear no intervalo de concentração de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Kirgoz et al.³⁷ propuseram um biossensor amperométrico, no qual uma membrana gelatinosa contendo carboxil esterase e álcool oxidase, foi integrada a superfície de um eletrodo composto de grafite epóxi. O biossensor desenvolvido apresentou seletividade e linearidade em um intervalo de concentração de 2,5 a $400 \mu \text{ mol L}^{-1}$. Fatibello-Filho et al.⁴⁰ desenvolveram um eletrodo bi-enzimático para aspartame utilizando L-aspartase e carboxipeptidase A imobilizadas diretamente na membrana de um eletrodo de amônia. A resposta

foi linear na faixa de concentração de $4,2 \times 10^{-4}$ a $8,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Um grande problema destes métodos é a baixa estabilidade das enzimas o que leva a um pequeno tempo de vida do eletrodo.

1.2. Ciclamato de Sódio

Descoberto em 1937 por Michael Sveda, um estudante de química da Universidade de Ilinois (EUA), que casualmente descobriu seu sabor adocicado, o ciclamato de sódio é um adoçante artificial 30 vezes mais doce que a sacarose e com zero de calorias⁴¹. É um pó branco, cristalino, inodoro, solúvel em água, álcool e propilenoglicol, é mais estável que o aspartame e a sacarina, o que possibilita sua utilização em altas e baixas temperaturas^{2,10}. O nome ciclamato é empregado tanto ao ácido ciclâmico, como aos seus sais de sódio e cálcio⁴². A Figura 3 apresenta as estruturas dos ciclamatos.

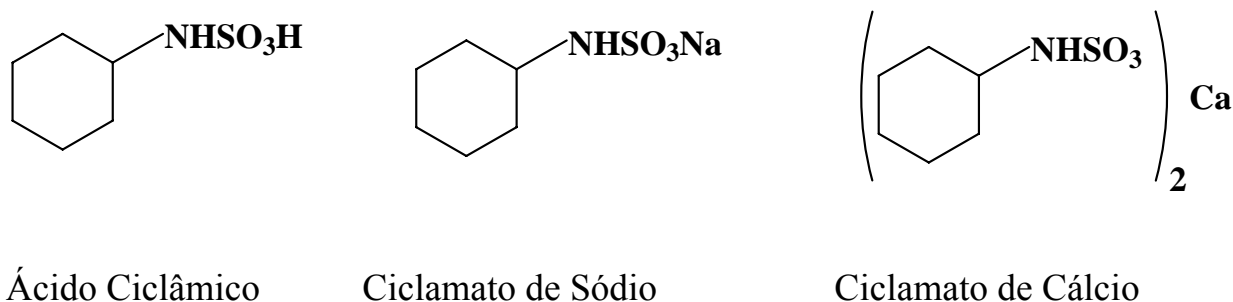


Figura 1.3 - Estrutura do ácido ciclâmico e seus sais de sódio e cálcio.

A síntese do ácido ciclâmico é realizada em duas etapas distintas (Figura 1.4). Na primeira etapa há a formação do ciclohexilssulfamato de bário pela adição de sais de amina a solução de hidróxido de bário. Logo após a adição, o excesso de ciclohexilamina é evaporado a pressão reduzida. A segunda etapa consiste na formação do ácido ciclohexilssulfâmico através da adição de ácido sulfúrico a solução contendo ciclohexilssulfamato de bário. Esta adição é feita a frio para que o ácido livre possa ser hidrolisado. O sulfato de bário

formado é removido por etapas sucessivas de filtração e lavagem, fornecendo os cristais de ácido ciclâmico¹.

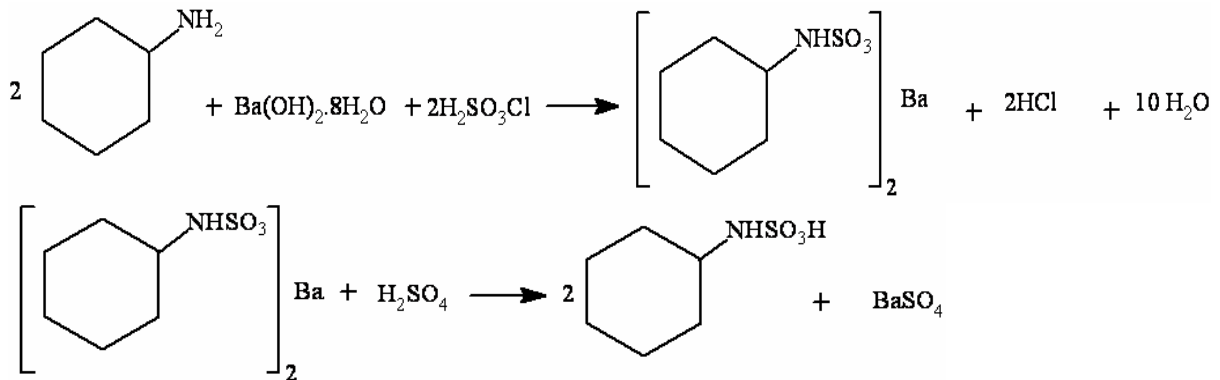


Figura 1.4 - Síntese do ácido ciclâmico.

O ciclamato de sódio é comumente empregado junto com a sacarina, uma vez que o ciclamato pode mascarar o sabor residual amargo deixado pela sacarina. A utilização dessa mistura aumentou o consumo dos adoçantes artificiais nos Estados Unidos na década de 60, quando foram produzidas mais de 7.718 toneladas de ciclamato¹⁰. Porém, no fim da década de 60, por meio de experimentos com ratos constatou-se que o ciclamato de sódio não era eliminado de forma invariável, mas poderia ser metabolizado como ciclohexilamina. Estes experimentos ainda resultaram no aparecimento de calcificação do miocárdio, câncer de bexiga, ruptura de cromossomos e deformação de embriões, devido à presença da ciclohexilamina. A partir destes estudos o uso do ciclamato de sódio foi proibido nos EUA^{1,2,10}. Mesmo assim, em 1977 o JECFA/OMS (Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives) aprovou o uso do ciclamato de sódio como adoçante em alimentos e bebidas, e atualmente este edulcorante é utilizado como adoçante de baixa caloria em mais de 40 países, inclusive no Brasil, Alemanha, África do Sul e Suíça⁴¹. Estudos complementares sobre a toxicidade em longo prazo do ciclamato de sódio e da sacarina foram realizados em diversos animais, os

resultados mostraram que nenhuma dessas substâncias apresentou efeitos teratogênico ou afetaram a reprodução⁴³.

Tanto em seres humanos quanto em várias espécies de animais, o ciclamato de sódio não é absorvido completamente no intestino. Quando absorvido é rapidamente excretado na urina sem considerável acúmulo no sangue ou tecidos. O ciclamato de sódio não absorvido é normalmente eliminado nas fezes, mas uma quantidade variável pode ser convertida para a ciclohexilamina por microorganismos. Esta conversão é diferenciada nos seres humanos, sendo que 76% dos usuários regulares convertem menos de 0,1% da dose ingerida de ciclamato de sódio, cerca de 8 a 10% convertem 1% ou mais, e 4% convertem 20% ou mais⁴¹.

Os resultados de todos os estudos realizados visando verificar a toxicidade do ciclamato de sódio ou da mistura ciclamato/sacarina, apresentaram poucos efeitos fisiopatológicos mesmo quando ingeridas doses elevadas do edulcorante. Após avaliação dos estudos toxicológicos disponíveis, considera-se seguro o uso do ciclamato em alimentos e bebidas, tendo lhe conferido a ingestão diária máxima aceitável de 11,0 mg/kg do peso corporal do consumidor^{1,11}.

1.2.1. Métodos de Análise para o Ciclamato de Sódio

Devido a sua ampla utilização e pelas controvérsias com relação ao seu processo metabólico e toxicidade, o ciclamato de sódio necessita de métodos quantitativos eficientes para a determinação de seu teor em produtos comerciais.

Os métodos gravimétricos⁴⁴ para a determinação do ciclamato são os mais antigos, oferecem precisão, no entanto, são muito demorados, consumindo em média 36 horas de análise.

A espectrofotometria no ultravioleta também pode ser utilizada para a determinação do ciclamato de sódio. Hoo e Hu⁴⁵ determinaram ciclamato em bebidas e alimentos sólidos através da reação deste adoçante com hipoclorito

ocorrendo à conversão do ciclamato em N,N-diclorociclohexilamina e este composto foi monitorado no comprimento de onda de 314 nm. Ainda existem alguns procedimentos espectrofotométricos por injeção em fluxo^{46,47}. Rocha et al.⁴⁶ desenvolveram um sistema de análise por injeção em fluxo em que o ciclamato de sódio reage com a ninidrina em meio ácido e a determinação espectrofotométrica do excesso de ninidrina é feita por iodometria.

A cromatografia líquida de alta eficiência⁴⁸⁻⁵² também é amplamente utilizada na quantificação do ciclamato, sendo que essa determinação pode se feita direta ou indiretamente. Na determinação indireta utilizam-se processos derivativos que possam gerar compostos que absorvam na região do ultravioleta.

1.3.2. Determinação Eletroquímica do Ciclamato de Sódio

Alguns métodos eletroquímicos também foram empregados na determinação do ciclamato de sódio. Richardson e Luton⁵³ determinaram ciclamato em suco de frutas e em xaropes expectorantes, em meio fortemente ácido utilizando-se nitrito de sódio como titulante, sendo o ponto final destas titulações detectado amperometricamente. Um procedimento simples, preciso e exato para a determinação de ciclamato em produtos dietéticos como pudim, gelatina, adoçantes de mesa, coca-cola e guaraná foi proposto por Fatibello et al.⁵⁴, o ciclamato foi titulado com uma solução de nitrito de sódio em solução de ácido fosfórico 1,0 mol L⁻¹ e o ponto final da titulação foi determinado biamperometricamente, o limite de detecção obtido foi de 1,3 x 10⁻³ mol L⁻¹. Um minissensor baseado na imobilização de membranas lipídicas (s-BLMs) sobre um eletrodo de prata foi desenvolvido por Nikolelis e Pantoulis⁵⁵ para a determinação de acesulfame-K, ciclamato de sódio e sacarina. A curva analítica foi linear num intervalo de concentração para o ciclamato de sódio de 10 a 160 μmol L⁻¹, com limite de detecção de 10 μmol L⁻¹.

1.3. Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD)

O diamante é um material exótico e de difícil acessibilidade. É um polimorfo de carbono puro, cristaliza no sistema cúbico, geralmente em cristais com forma octaédrica (8 faces) ou hexaquisoctaédrica (48 faces), frequentemente com superfícies curvas, arredondadas, incolores ou coradas. Os diamantes de cor escura são pouco conhecidos e o seu valor como gema é menor devido ao seu aspecto pouco atrativo.

O diamante possui um conjunto impar de propriedades, em comparação a outros materiais utilizados pela indústria em geral⁵⁶. Algumas destas propriedades, comparadas as de outros materiais, estão relacionadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Propriedades diversas de diferentes materiais de interesse tecnológico

	GaAs	Silício	Diamante
Densidade (g cm^{-3}) (23 °C)	5,32	2,33	3,52
Força de flexão (psi) (23 °C)	8.000	18.500	427.000
Ponto de fusão (°C)	1238	1.420	4.000
Condutividade térmica ($\text{W cm}^{-1} \text{K}^{-1}$)	0,53	1,45	20
Temperatura máxima de operação (°C)	470	225	1.900
Band gap (eV)	1,43	1,12	5,45
Resistividade (Ωcm)	10^8	10^3	10^{16}
Dureza (kg mm^{-2})	600	1.000	10.000

Tabela extraída da ref. 57.

O empenho na proposição e estudo dos métodos para a síntese de filmes de diamante deu-se devido ao interesse no uso deste material nas mais variadas áreas, graças a estas propriedades. Os dois métodos básicos empregados para a síntese do diamante são a deposição química a partir da fase vapor (Chemical Vapor Deposition–CVD) e o crescimento a alta-pressão/alta temperatura (High-Pressure/High-Temperature-HPHT), estes dois métodos foram desenvolvidos na década de 50, o que mais se assemelha ao processo de

formação do diamante natural é o segundo (HPHT), desenvolvido pela General Electric em 1955. Já o método CVD foi desenvolvido por Willian Eversole em 1952⁵⁷⁻⁵⁹. Inicialmente, os processos de deposição se restringiam ao crescimento unicamente de grãos sobre o grão pré-existente de diamante ou a partir de material a base de carbono que não o diamante. Estes filmes só passaram a ser produzidos sobre outros substratos com o desenvolvimento e entendimento das técnicas de crescimento^{57,60}.

Devido à viabilidade econômica, a versatilidade e ao manuseio simplificado, atualmente, o método CVD é o mais utilizado para a síntese dos filmes de diamante em série^{58,61}. O método CVD baseia-se na deposição de um filme de diamante sobre diferentes tipos de substratos, inclusive o próprio diamante, sob condições termodinamicamente metaestáveis, a partir da ativação de uma fase gasosa introduzida em um reator. Os substratos mais utilizados são: silício, tungstênio, molibdênio, titânio, grafite e carbono vítreo, e os reatores são: reatores com ativação por filamento quente de tungstênio, plasma de microondas, plasma de radiofrequência, chama de óxido acetileno, dentre outros. A mistura gasosa mais utilizada na síntese do diamante é aquela de metano diluída em hidrogênio, mas é possível utilizar outras substâncias orgânicas como fonte de carbono, como o metanol, acetona e o etanol. Pequenas frações de oxigênio, ou ainda compostos halogenados, também podem ser usados com o objetivo de aumentar a taxa de crescimento e aumentar a qualidade final dos filmes crescidos⁵⁷⁻⁶³.

A Figura 1.5 mostra de maneira geral como ocorre a ativação dos gases para a formação do filme. Os gases são injetados no reator, na etapa representada pela região 1. Em seguida, passam pela região de ativação, região 2, onde são formados, inicialmente, hidrogênio atômico e, logo em seguida, o radical metila, o qual é considerado o principal precursor do crescimento do diamante. Outros radicais também são formados, mas tem participação secundária no processo. O hidrogênio atômico e o radical metila são, então, as

principais espécies reativas envolvidas no crescimento do diamante. Por difusão, passando a região 3, o hidrogênio atômico e o radical metila chegam ao substrato, o qual é colocado a uma distância previamente definida da região de ativação. Desta forma, terá início o processo de nucleação, com posterior coalescência e crescimento dos grãos do filme de diamante policristalino, sobre o substrato empregado. Os grãos de diamante começam a crescer a partir de uma camada intermediária de carbeto, originada pela reação entre o substrato e o radical metila, ou a partir de outros grãos de diamantes previamente depositados sobre o substrato, antes do crescimento, pelo método de semeadura⁵⁷.

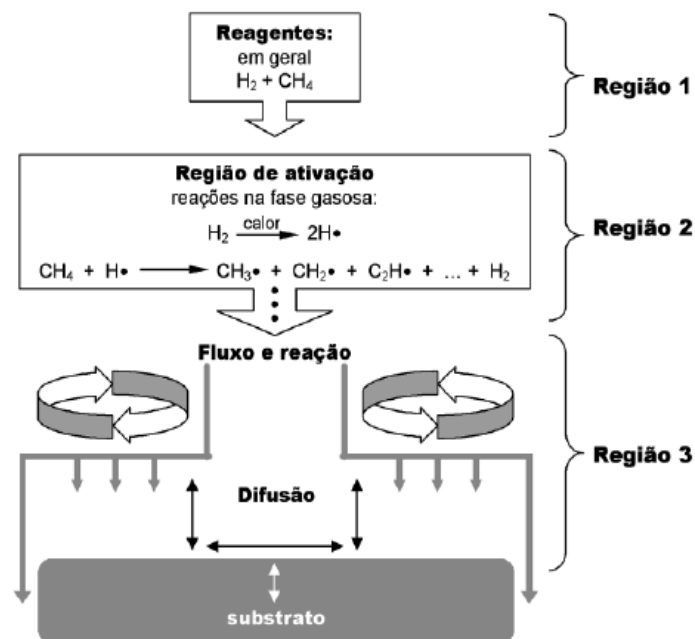


Figura 1.5 - Esquema geral de deposição de filmes de diamante, a partir de uma fase gasosa, pelo método CVD⁵⁷.

A partir do momento em que se estabeleceu a tecnologia para produzir filmes finos de diamante sintéticos a partir de reagentes gasosos, pela técnica CVD, surge o interesse de crescer filmes de diamante com características semicondutoras, e sabendo de antemão que o diamante natural tipo IIb é um semicondutor tipo p que contém boro. Em 1973 surgiram os primeiros relatos sobre o crescimento de filmes de diamante dopado com boro a baixas pressões, a

partir da mistura B_2H_6/CH_4 , usando grãos de diamante natural como substrato. Apesar do grande passo dado para a obtenção de diamantes dopados, as taxas de crescimento foram ainda muito baixas em comparação com o que se consegue atualmente⁵⁷.

Com o estabelecimento do método de dopagem de filmes de diamantes CVD ampliam-se as possibilidades de aplicação destes filmes semicondutores, em diferentes áreas da ciência. Uma das aplicações que mais despertou interesse a partir dos anos 90, foi à fabricação de eletrodos para uso em aplicações eletroquímicas⁵⁸. Para o crescimento de filmes de diamantes dopados com boro, vários substratos podem ser utilizados, mas devem levar em conta a semelhança entre o parâmetro de rede e/ou o coeficiente de dilatação térmica dos dois materiais, para facilitar o crescimento de um filme aderente e de qualidade. Com relação ao dopante, diferentes compostos podem ser injetados no reator simultaneamente com hidrogênio e metano. Os dopantes mais empregados são o boro e seus derivados, cada qual com suas características próprias, tais como B_2H_6 , que não contém carbono ou oxigênio na molécula, o que evita a inclusão de elementos extras no reator, é facilmente encontrado e possibilita o controle de concentração de boro, mas é altamente tóxico, explosivo e reativo. O $B(OCH_3)_3$ e o B_2O_3 não são tóxicos, mas deve ser diluído em acetona ou metanol para ser usado, o que implica em fonte adicional de carbono e oxigênio^{58,64}. A concentração do boro nos filmes de diamante pode variar de 10 a 25.000 ppm⁶⁵.

Após o crescimento dos filmes de diamantes dopados com boro, um dos parâmetros mais importantes na montagem do eletrodo é o estabelecimento do contato elétrico, normalmente ôhmico (contato entre um metal e um semicondutor), o qual deve apresentar resistência mínima. Alguns dos contatos mais usados são os de índio/gálio, gálio, subcamada de titânio, pasta de prata, ouro ou Au/Ta⁶¹. Igualmente importante é o isolamento de todas as partes do eletrodo que não devem entrar em contato com a solução de medida. O filme

deve ter sua borda totalmente vedada, em geral com borracha de silicone, ou deve ser embutida em um material inerte adequado, para que somente a superfície do diamante dopado fique exposta à solução, de modo que ela não se infiltre por eventuais orifícios e alcance o material usado como suporte. Uma das dificuldades enfrentadas nesta etapa é conseguir um isolante perfeito do filme pelo maior período possível, pois muitas vezes a solução utilizada pode promover o descolamento do material usado para a vedação⁵⁷.

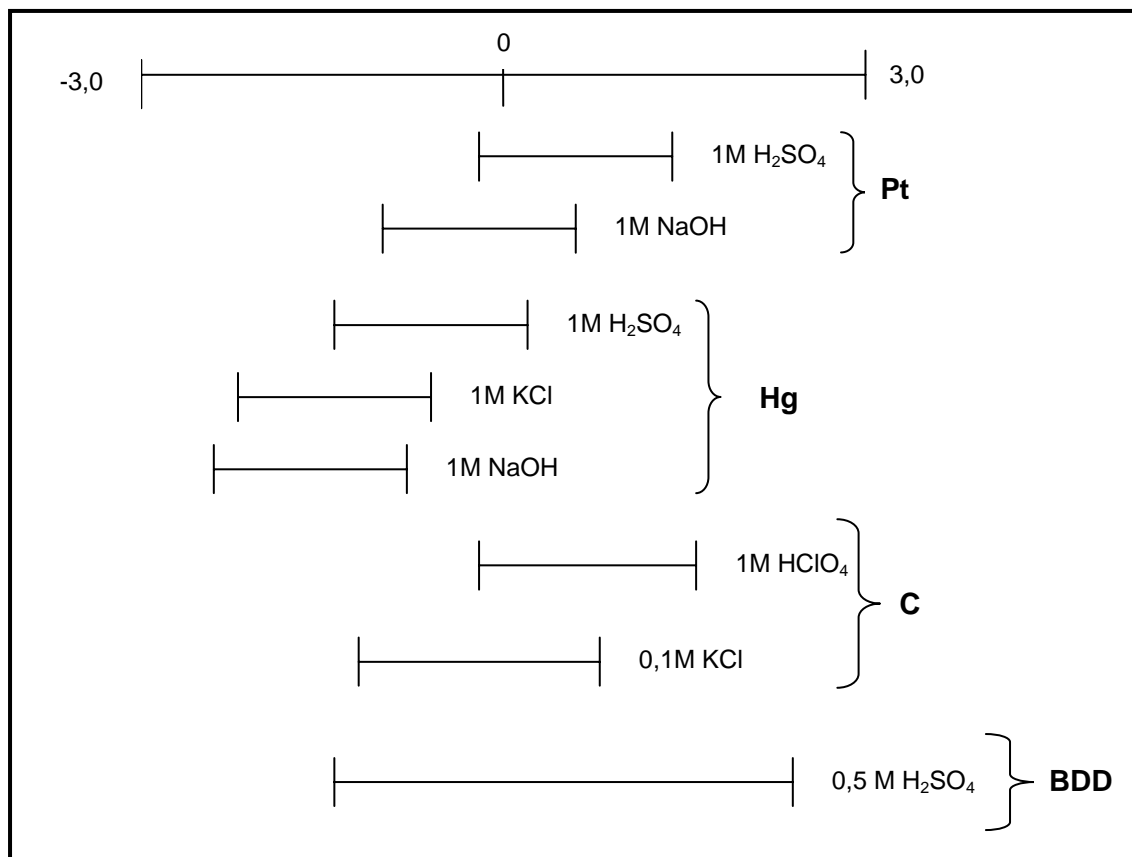
No Brasil, eletrodos de diamante dopado com boro já estão sendo preparados utilizando-se a técnica CVD, inclusive sobre diferentes substratos^{66,67}, e estão sendo cada vez mais utilizados para diversas aplicações eletroquímicas.

Os eletrodos de diamantes dopados com boro possuem um número importante de propriedades eletroquímicas distinguíveis de outros eletrodos comumente usados, tais como carbono vítreo, platina e pasta de carbono^{58,60,61,68}.

Estas propriedades são:

- estabilidade química a corrosão em meios muito agressivos
- baixa e estável corrente de fundo
- extraordinária estabilidade morfológica e microestrutural a altas temperaturas (por exemplo, 180°C)
- boa resposta a alguns analitos em soluções aquosas e não-aquosas com pré-tratamento convencional
- fraca adsorção de moléculas polares, o que melhora a resistência do eletrodo à desativação ou envenenamento
- estabilidade de resposta em longo prazo
- transparência óptica nas regiões de UV/Vis e IV
- e finalmente, o eletrodo de diamante dopado com boro possui uma larga janela de potencial em meio aquoso e não aquoso. Neste eletrodo o desprendimento de hidrogênio começa em $-1,5$ V e o desprendimento de oxigênio em $+2,5$ V (*vs.* Ag/AgCl). Como mostra a Figura 1.6, a janela de

potencial do eletrodo de diamante dopado com boro é muito maior que a dos outros eletrodos citados⁶⁸.



Adaptado da Ref. 78.

Figura 1.6 - Intervalo de potencial aproximado para os eletrodos de platina, mercúrio, carbono vítreo e diamante dopado com boro.

Em função dessas propriedades únicas, o eletrodo de diamante dopado com boro está sendo cada vez mais utilizado no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, em diversas matrizes⁶⁴. Zang e Oyama⁶⁹, por exemplo, utilizaram o eletrodo de BDD para a determinação de mioglobina e hemoglobina por meio da voltametria cíclica e obteve um limite de detecção da ordem de $2,9 \times 10^{-6}$ e $6,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. Zhao et al.⁷⁰ desenvolveram um método para a determinação simultânea de triptofan e tirosina sobre um eletrodo de diamante dopado com boro e o limite de detecção obtido foi $1,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. O eletrodo de BDD também tem sido muito utilizado na determinação de pesticidas como 4-nitrofenol⁷¹ e 4-clorofenol⁷², apresentando

resposta linear num intervalo de concentração de $6,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o 4-nitrofenol, e de $7,2 \times 10^{-6}$ a $3,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para o 4-clorofenol.

Adicionalmente, existem vários outros trabalhos na literatura que mostram a viabilidade e aplicabilidade da utilização do eletrodo de BDD para a determinação de diversos compostos orgânicos, como por exemplo, captopril⁷³, dopamina⁷⁴, ácido úrico⁷⁵, poliaminas⁷⁶, histamina e serotonina⁷⁷, entre outros.

1.4. Técnicas Eletroanalíticas

A química eletroanalítica compreende um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de uma solução do analito quando ele está tomando parte de uma célula eletroquímica. Envolve medidas de parâmetros elétricos tais como corrente, potencial e carga, tem ampla faixa de aplicação, incluindo monitoramento ambiental, o controle de qualidade industrial e as análises biomédicas⁷⁸.

As técnicas eletroquímicas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas. Os métodos eletroanalíticos ainda têm algumas vantagens gerais sobre outros tipos de métodos, uma dessas vantagens é que as medidas são normalmente específicas para um estado de oxidação particular de um elemento. Uma outra vantagem é que a sua instrumentação é relativamente barata quando comparada a outros equipamentos, por exemplo, para espectroscopia. Essas vantagens levaram a um aumento substancial da popularidade da eletroanálise⁷⁹.

1.4.1. Voltametria Cíclica

Historicamente, os métodos voltamétricos se desenvolveram a partir da polarografia, técnica desenvolvida em 1922 pelo químico tcheco Jaroslav Heyrovsky, a quem coube por esse feito o Prêmio Nobel em Química em 1959⁷⁹.

No início, os métodos voltamétricos não foram empregados como ferramentas analíticas de rotina devido a algumas dificuldades. Mas, na década de 60 e início de 70, foram feitos muitos avanços em todas as áreas da voltametria, resultando em uma melhora significativa de sensibilidade e possibilitando a inclusão das técnicas voltamétricas no repertório de métodos analíticos.

A voltametria cíclica se popularizou rapidamente em diversas áreas, sua facilidade de aplicação e versatilidade são seus principais atributos. Frequentemente, a voltametria cíclica é o primeiro experimento a ser realizado quando se deseja estudar o comportamento eletroquímico de um composto ou a superfície do eletrodo⁸⁰. Na voltametria cíclica, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia continuamente com o tempo na forma de onda triangular (Figura 1.7), partindo de um valor inicial E_i , até um valor limite pré-determinado, E_v . Ao alcançar E_v , a direção da varredura é invertida e um caminho inverso é percorrido até chegar a E_f , que pode ser o valor do potencial inicial E_i , ou outro valor de potencial pré-estabelecido.

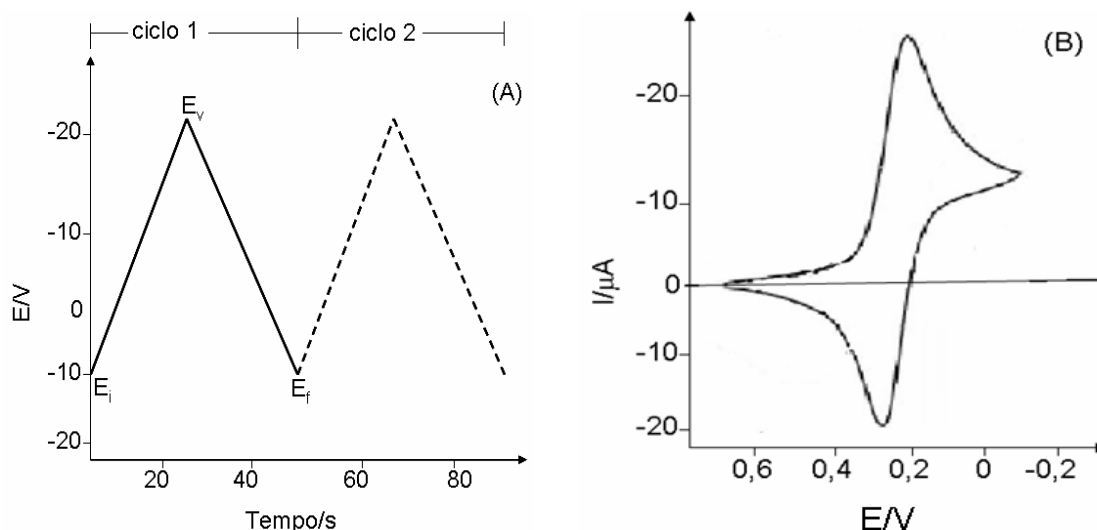


Figura 1.7 - (A) Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica. (B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível⁷⁹.

A direção da varredura pode ser positiva ou negativa, e em princípio, a velocidade com que o potencial é varrido pode assumir qualquer valor. Também é possível realizar múltiplas ciclagens durante o experimento, muitas vezes, há uma diferença entre o voltamograma obtido na primeira ciclagem e nas ciclagens posteriores, por onde é possível obter informações sobre o mecanismo da reação em estudo⁷⁸.

1.4.2. Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

O desenvolvimento da voltametria de onda quadrada (SWV), do inglês “*Square Wave Voltammetry*” se deu a partir da década de 50, quando Barker aplicou pulsos de potencial em um eletrodo gotejante de mercúrio, e chegou a polarografia de onda quadrada^{81,82}. Porém a técnica desenvolvida por Barker, possuía uma sensibilidade limitada pela reversibilidade do sistema e, principalmente, pelos ruídos originários de várias fontes que o capilar de mercúrio juntamente com a coluna captavam e assim, influenciavam intensamente nas respostas de corrente. Para resolver este problema, ele optou por modificar a frequência de aplicação da onda quadrada, assim como utilizar uma variação mais rápida na rampa de potencial, de maneira a obter uma

resposta de corrente-potencial otimizada, ampliando o limite de detecção da metodologia. Mas, os ruídos externos que eram intensificados pela utilização do capilar ainda influenciavam de maneira considerável nas análises^{81, 83}.

Baseados nestes primeiros estudos realizados por Barker, em 1969, Ramaley e Krause^{83,84} substituíram o eletrodo gotejante de mercúrio por eletrodos estacionários eliminando os ruídos provenientes do capilar de mercúrio, e também substituíram a rampa linear de potencial por uma rampa de potencial na forma de escada. Assim, surgiu a voltametria de onda quadrada que utiliza uma variação de potencial na forma de onda, aliada a uma rampa de potencial na forma de escada, gerando um pico simétrico que poderia ser utilizado com sucesso nas determinações analíticas⁸¹. Contudo, nesta forma de aplicação de potencial, a medida de corrente era realizada próxima ao centro do pulso, e as varreduras de potenciais eram limitadas para pequenos valores de amplitude, e conseqüentemente, baixas velocidades de varreduras, o que provocava uma perda de sensibilidade analítica.

Para tentar corrigir essas limitações, em 1977, Christie, Turner e Osteryoung^{85,86}, desenvolveram um estudo no qual a medida de corrente era realizada ao final do pulso de potencial, o que possibilitou que as varreduras de corrente em função dos pulsos de potenciais aplicados fossem feitas em velocidades superiores a 100 mV s^{-1} , este é o modelo mais atual de SWV.

As formas de onda para esta técnica, apresentadas na Figura 1.8, consiste de uma onda simétrica (amplitude de pulso de potencial, a) sobreposta a uma “escada de potenciais” (incremento de varredura de potencial, ΔE_s), sendo que um período completo de onda quadrada ocorre para cada período (τ) da escada de potenciais. A largura do pulso, ou $\tau/2$, é denominada t_p e a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais, $1/\tau$, é designada por f ^{81,83,84}.

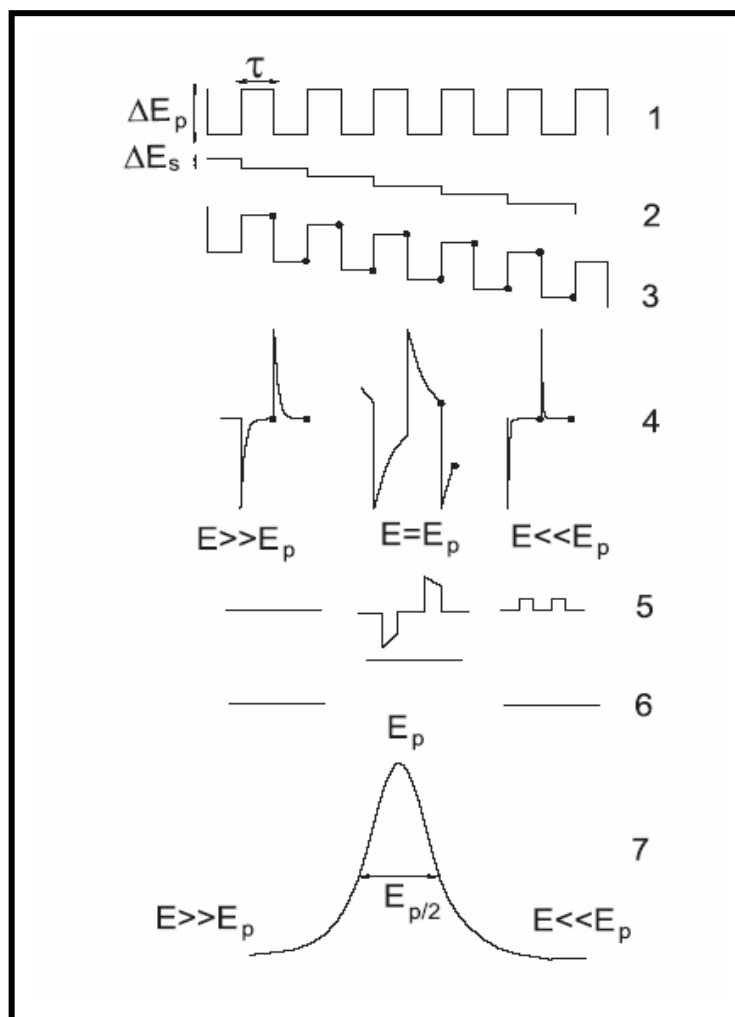


Figura 1.8 - Representação esquemática da voltametria de onda quadrada, onde: 1) potencial na forma de onda; 2) escada de potencial; 3) forma de aplicação do potencial na SWV; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total⁸¹.

As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos (no sentido da varredura) e reversos (no sentido oposta da varredura), e o sinal é dado como uma intensidade da corrente resultante ($\Delta I = I_d - I_r$) que é um sinal obtido diferencialmente, e apresenta excelente sensibilidade e minimização das correntes capacitivas⁸². A Figura 1.9 apresenta a forma de aplicação de potencial típica da voltametria de onda quadrada. Adicionalmente, na Figura 1.10, estão representados os voltamogramas teóricos que podem ser obtidos em um sistema reversível (A) e um sistema totalmente irreversível (B).

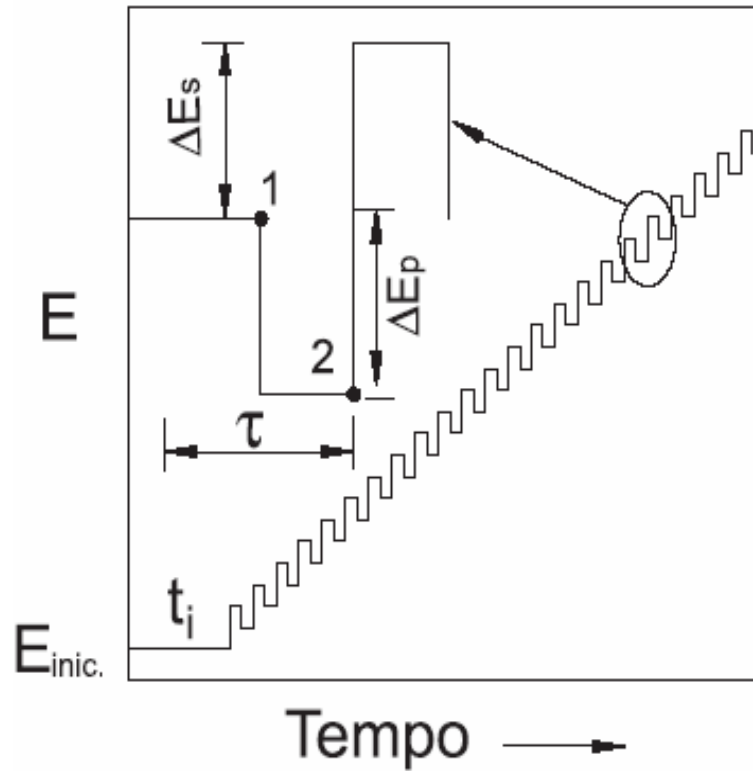


Figura 1.9 - Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada⁸¹.

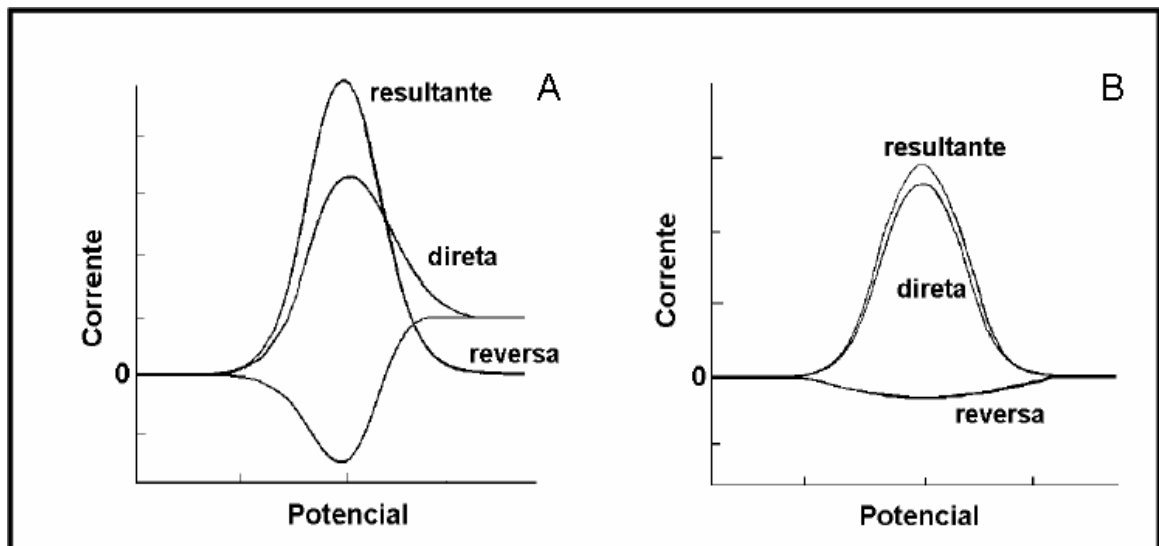


Figura 1.10 - Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B)⁸¹.

A voltametria de onda quadrada apresenta algumas vantagens com relação a outras técnicas voltamétricas. Uma dessas vantagens é a diminuição da interferência proveniente da corrente capacitiva, uma vez que, na SWV, assim

como em outras técnicas de pulso, como a corrente capacitiva é proporcional a $e^{-t/RC}$, onde t é o tempo, R a resistência da solução e C a capacitância da dupla camada, e a corrente faradaica é aproximadamente proporcional a $t^{-1/2}$, a variação de corrente diminui mais rapidamente que a corrente faradaica. Assim, as medidas de corrente são realizadas após a corrente capacitiva ter se tornado negligenciável, melhorando a resolução dos dados experimentais⁸².

Outra vantagem importante está relacionada com a velocidade de varredura (produto da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) pelo incremento de varredura de potencial (ΔE_s)). Como é possível trabalhar em altas velocidades de varredura de potencial e como a corrente de pico é função da velocidade de varredura, a sensibilidade desta técnica pode aumentar significativamente, alcançando limites de detecção de 10^{-12} mol L⁻¹, dependendo do sistema⁷⁸. Pela voltametria de onda quadrada ainda é possível obter informações mecanísticas mais precisas que as obtidas por voltametria cíclica, sendo que a SWV não possui as mesmas limitações da voltametria cíclica, onde sistemas irreversíveis apresentam sérios problemas em relação à queda de sensibilidade e de resolução⁸⁷.

1.4.2.1. Desenvolvimento Teórico

Basicamente, todo o desenvolvimento teórico foi desenvolvido por dois grupos de trabalho; o grupo de Janet Osteryoung em New York, e o grupo de Milivoj Lovric na Iugoslávia. Os aspectos básicos já estão bem definidos e apresentados em diversas publicações facilitando a utilização da técnica e a análise de resultados obtidos.

Os critérios de diagnósticos de processos redox na SWV foram desenvolvidos e testados de acordo com inúmeros cálculos teóricos, por meio de simulação de reações reversíveis, quase-reversíveis e irreversíveis e considerando as reações com adsorção de reagente e/ou produto. Estes critérios que serão apresentados resumidamente podem fornecer informações com

relação a número de elétrons envolvidos no processo redox e informações sobre a cinética de tais processos⁸¹.

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

$$I_r = I_d - I_i \quad (1)$$

Como pode se observado pela equação 1, as correntes inversas são negativas e acabam contribuindo para uma melhora intensa na resposta voltamétrica⁸⁸.

2) Em reações totalmente irreversíveis a corrente de pico (I_p) apresenta uma relação linear com a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f). Porém, em reações reversíveis a corrente de pico é linear com a raiz quadrada da frequência^{81,82,89}, como mostram as equações 2 e 3:

$$I_p = k f \text{ (reações irreversíveis)} \quad (2)$$

$$I_p = k f^{1/2} \text{ (reações reversíveis)} \quad (3)$$

Para reações quase-reversíveis a relação entre I_p e f não é linear.

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

$$\Delta E_p / \Delta \log f = -2,3RT / \alpha nF \text{ (ou } \Delta E_p / \Delta \log f = -59 / \alpha n \text{ mV)} \quad (4)$$

Para sistemas reversíveis, sem adsorção do produto a relação também é linear, mas com uma inclinação de^{89,90}:

$$\Delta E_p / \Delta \log f = -2,3RT / 2nF \text{ (ou } \Delta E_p / \Delta \log f = -29 / n \text{ mV)} \quad (5)$$

4) A amplitude dos pulsos de potencial também pode influenciar nos valores de corrente de pico. Para reações redox totalmente irreversíveis, a sensibilidade analítica aumenta com o aumento da amplitude, e para reações reversíveis com adsorção de reagentes e/ou produto, a corrente de pico aumenta proporcionalmente somente para valores de amplitudes menores que 60 mV⁸⁹.

A utilização destas equações desenvolvidas por Lovric e Osteryoung é suficiente para fornecer informações sobre a reversibilidade do sistema, e sobre o número de elétrons envolvidos no processo redox.

Dentre todas as técnicas eletroanalíticas a SWV é uma das mais sensíveis podendo alcançar limites de detecção comparáveis aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

1.6 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho está relacionado com o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de edulcorantes em produtos dietéticos, já que na literatura não há relatos de trabalhos que empreguem as técnicas eletroquímicas voltamétricas e nem o eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação destes adoçantes. De forma mais detalhada este objetivo pode ser dividido em:

- Pesquisar as potencialidades e limitações do eletrodo de diamante dopado com boro nas determinações dos adoçantes artificiais: aspartame e ciclamato de sódio.
- Escolha da técnica voltamétrica mais adequada para a análise destes edulcorantes.
- Desenvolvimento de um procedimento analítico para a análise do aspartame e do ciclamato de sódio em produtos dietéticos utilizando a técnica voltamétrica mais adequada. Análise da influência de interferentes presentes nas amostras na sensibilidade e seletividade da técnica.
- Desenvolvimento de um procedimento analítico para a análise simultânea dos edulcorantes: aspartame e ciclamato de sódio também em produtos dietéticos.

Capítulo 2 – PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA), e todas as soluções foram preparadas em água deionizada.

As soluções estoque de aspartame na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas previamente ao uso para evitar o processo de hidrólise. Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se $0,0294 \text{ g}$ de aspartame (Sigma) em 10 mL de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Soluções contendo entre $1,0 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por diluição da solução estoque em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de ciclamato de sódio na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se $0,0201 \text{ g}$ de ciclamato de sódio (Sigma) em 10 mL de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, e as demais soluções foram preparadas a partir desta em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Foram preparadas várias soluções de ácido sulfúrico (Synth 98% m/m) em diferentes concentrações, diluindo-se volumes apropriados desse ácido em água deionizada.

Foram utilizadas micropipetas volumétricas de 50 e $1000 \mu\text{L}$ e de 5 mL , todas com ponteiras descartáveis de polietileno. Todo material utilizado (balões volumétricos, béqueres, etc.), passou por um procedimento de limpeza adotado com o intuito de assegurar a ausência de quaisquer resíduos que pudessem interferir nas medidas. Para isto, foi utilizada uma solução de HNO_3 10% v/v e posterior lavagem com água deionizada.

2.2. Amostras Analisadas

As amostras de adoçantes dietéticos em pó (Zero cal[®], Finn[®] e Gold[®]), adoçantes dietéticos líquidos (Zero cal[®], Finn[®]), preparados sólidos para refrescos diet (Sbelt[®], MID[®], FIT[®], Magro[®]), refrigerantes cola diet (Coca-cola[®] e Pepsi-cola[®]) e refrigerantes de guaraná diet (Antarctica[®] e Kuat[®]) utilizadas para a determinação do aspartame e/ou ciclamato de sódio foram obtidas nos supermercados locais.

2.2.1. Preparação das Amostras para a Determinação de Aspartame

2.2.1.1. Adoçantes Dietéticos em Pó (Zero cal[®], Finn[®] e Gold[®])

Massas de 0,115 g exatamente pesadas em balança analítica foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e dissolvidas em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, respectivamente. Em seguida, alíquotas de 260 µL foram transferidas para a célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte (H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹) e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos para cada amostra.

2.2.1.2. Preparados Sólidos para Refrescos (Sbelt[®], MID[®] e FIT[®])

Uma massa exatamente pesada de 0,0780 g (Sbelt[®]), 0,306 g (MID[®]) e 0,0680 g (FIT[®]) foi transferida para balões de 10 mL, e os volumes completados com ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ após dissolução das mesmas obtendo-se uma concentração teórica de aspartame 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. Alíquotas de 200 µL das amostras foram transferidas separadamente, para célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte (H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹) e as medidas voltamétricas foram realizadas.

2.2.1.3. Refrigerantes Cola (Coca-cola[®] e Pepsi-cola[®])

As duas amostras de refrigerante cola foram degaseificadas por 5 minutos em banho ultra-som. Em seguida, um volume de 300 μL das amostras foi transferido diretamente para a célula eletroquímica contendo 10 mL de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , obtendo-se concentrações teóricas de aspartame de $2,5 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} para a Coca-cola[®] e $2,4 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} para a Pepsi-cola[®] e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos para cada amostra.

2.2.2. Preparação das Amostras para a Determinação de Ciclamato de Sódio

2.2.2.1. Adoçantes Dietéticos Líquidos (Zero cal[®] e Finn[®])

Alíquotas de 10 μL dos adoçantes dietéticos líquidos foram diretamente transferidas para a célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte (H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}), respectivamente. Em seguida, os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos.

2.2.2.2. Preparado Sólido para Refresco (Magro[®])

Uma massa exatamente pesada de 0,0670 g foi transferida para balões volumétricos de 10 mL e dissolvidas com ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1} , desta solução foi retirada uma alíquota de 400 μL que foi diretamente transferida para a célula eletroquímica contendo 10 mL de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos.

2.2.2.3. Refrigerantes de Guaraná (Antarctica[®] e Kuat[®])

As duas amostras de refrigerante de guaraná foram degaseificadas por 5 minutos em banho ultra-som. Em seguida, um volume de 1 mL

(Antarctica[®]) e 2 mL (Kuat[®]) foi transferido separadamente para a célula eletroquímica contendo 10 mL de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, e os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos.

2.3. Instrumentação

Para a determinação dos edulcorantes aspartame e ciclamato, foram feitos estudos utilizando-se a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada. Para tanto, foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie) interfaciado a um microcomputador e gerenciado por um programa computacional GPES 4.0.

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se 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.

2.3.1. Eletrodos

2.3.1.1. Eletrodo de Trabalho

O eletrodo de trabalho (Figura 2.1) utilizado para o estudo eletroanalítico de aspartame e ciclamato de sódio foi o eletrodo de diamante dopado com boro com área de 0,72 cm², fabricado pelo *Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique SA* (CSEM), em Neuchatêl, Suíça, com um teor de boro de 8000 ppm. O eletrodo de BDD utilizado foi sintetizado sobre um substrato de silício pela técnica de HF CVD (Hot Filament Chemical Vapor Deposition), cuja fase gasosa consistia de metano (CH₄), com excesso de hidrogênio (H₂) e o gás de dopagem utilizado foi o trimetilboro.

Para a realização dos experimentos o eletrodo de BDD foi inicialmente submetido a um tratamento catódico. Neste pré-tratamento

empregou-se a cronopotenciometria no qual foi aplicada ao eletrodo uma corrente de $-0,72\text{ A}$ por 60 s .

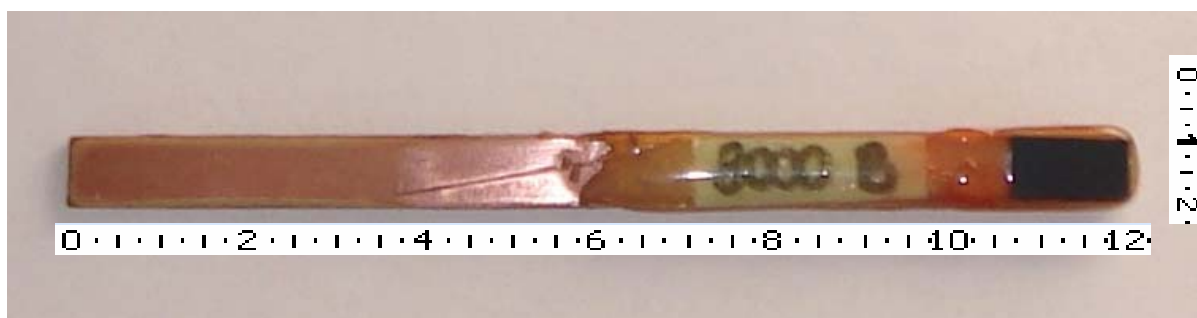


Figura 2.1 – Foto do eletrodo de diamante dopado com boro.

2.3.1.2. Eletrodo de Referência

O eletrodo de referência utilizado em todas as medidas voltamétricas foi o eletrodo Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0\text{ mol L}^{-1}$). Para a sua obtenção, um fio de prata foi recoberto com $\text{AgCl}_{(s)}$ por anodização. Após lavagem com água o fio de prata recoberto foi introduzido em um tudo de vidro com 3 mm de diâmetro interno contendo solução de $\text{KCl } 3,0\text{ mol L}^{-1}$, em seguida o capilar foi fechado e deixado em repouso por algumas horas. A extremidade desse eletrodo era sempre mantida em solução de $\text{KCl } 3,0\text{ mol L}^{-1}$ para evitar a evaporação da solução interna.

2.3.1.3. Eletrodo Auxiliar (contra eletrodo)

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

2.3.2. Célula Eletroquímica

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula de vidro de compartimento único, como representada na Figura 2.2. A célula tem capacidade de 15 mL, é equipada com uma tampa de Teflon[®], contendo orifícios para a desoxigenação da amostra com nitrogênio e posicionamento dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar.

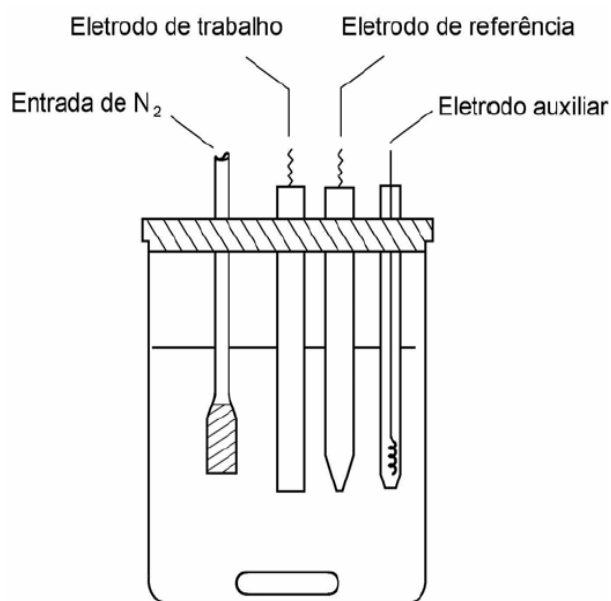


Figura 2.2 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica.

2.4. Metodologia

2.4.1. Voltametria Cíclica e de Onda Quadrada

Inicialmente utilizou-se a voltametria cíclica para estudar o perfil voltamétrico do eletrodo BDD e dos analitos, aspartame e ciclamato de sódio, e também para a determinação do melhor eletrólito suporte e sua concentração. A voltametria de onda quadrada foi utilizada para propor um procedimento eletroanalítico para a determinação do aspartame e do ciclamato de sódio em amostra de produtos dietéticos sobre o eletrodo de BDD.

Para a realização das medidas adicionou-se a célula eletroquímica 10 mL do eletrólito suporte (H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e então a solução foi desoxigenada durante 5 minutos com nitrogênio. Após a otimização do sistema as curvas analíticas foram obtidas pela adição de alíquotas da solução padrão na célula eletroquímica. Após cada adição, os voltamogramas de onda quadrada eram obtidos. As amostras foram analisadas pelo método da adição de padrão.

2.4.2. Estudo de Interferentes

As medidas para determinação de possíveis interferentes foram efetuadas nas mesmas condições experimentais estabelecidas para o aspartame e para o ciclamato de sódio. Inicialmente, os interferentes: acesulfame-K, sacarina, ácido cítrico, ácido ascórbico, sacarose, lactose, benzoato de sódio e os corantes, amarelo crepúsculo, tartrazina e azul brilhante foram analisadas separadamente para observar quais seriam eletroativos sobre o eletrodo DDB e se haveria sobreposição de picos entre os analitos, aspartame ou ciclamato e os concomitantes estudados. Posteriormente, somente as substâncias que apresentaram eletroatividade sobre o eletrodo foram analisadas sobre uma concentração constante de aspartame ou ciclamato de sódio, sendo feitas adições sucessivas de diferentes concentrações destes interferentes a célula eletroquímica.

2.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Um método empregando a cromatografia líquida de alta eficiência²² foi utilizado visando à comparação com os resultados obtidos por SWV.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-VIS modelo SPD-M10AVP e coluna C_{18} Shim-Pack CLC-ODS (60x150 mm, 5 μm), a fase móvel utilizada foi acetonitrila/tampão fosfato pH = 4, na proporção 14/86 v/v, com vazão de 0,8

mL por minuto, o volume da injeção foi de 30 μ L, a temperatura foi de 25 °C e o comprimento de onda monitorado foi de 192 nm para o aspartame e 200 nm para o ciclamato.

Para as medidas cromatográficas não foi necessário realizar qualquer tratamento prévio nas amostras, elas foram apenas dissolvidas ou solubilizadas em uma solução com a mesma composição da fase móvel.

Capítulo 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados com o aspartame e o ciclamato de sódio sob o eletrodo de BDD, utilizando as técnicas de voltametria cíclica e de onda quadrada. Os resultados são acompanhados de uma breve discussão e, quando necessário, de observações experimentais.

3.1. Janela Eletroquímica de Potencial

A Figura 3.1 mostra um voltamograma cíclico para o eletrodo BDD obtido em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se que este eletrodo apresenta uma janela eletroquímica de potencial de aproximadamente $4,0 \text{ V}$, compreendida entre $-1,5$ e $+2,5 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Isto se deve ao fato deste eletrodo possuir altos sobrepotenciais para as reações de desprendimento de hidrogênio e de oxigênio.

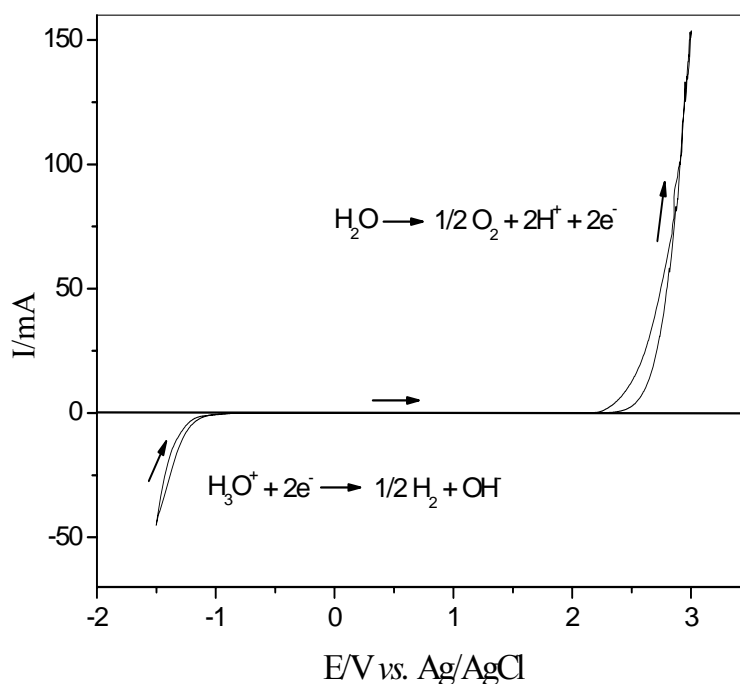


Figura 3.1 - Voltamograma cíclico para o eletrodo de diamante dopado com boro em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2. Avaliação da Resposta Eletroquímica do Aspartame sobre o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica e de onda quadrada com o eletrodo de BDD, para a determinação do aspartame. As condições experimentais foram otimizadas visando-se desenvolver um procedimento para a determinação do aspartame em produtos dietéticos.

3.2.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente utilizada para os estudos de eletroatividade de compostos orgânicos. Sendo assim, foram realizados experimentos preliminares de voltametria cíclica para observar a presença de processos de oxidação ou de redução do aspartame sobre a superfície do eletrodo de BDD. Os resultados experimentais obtidos com experimentos de voltametria cíclica (Figura 3.2) mostraram que o aspartame apresenta resposta eletroativa no sentido positivo de varredura, ou seja, ocorre um processo de oxidação do analito sobre o eletrodo BDD. Ademais, como pode ser observado nesta figura, não há um pico no processo inverso (redução) o que indica um processo irreversível.

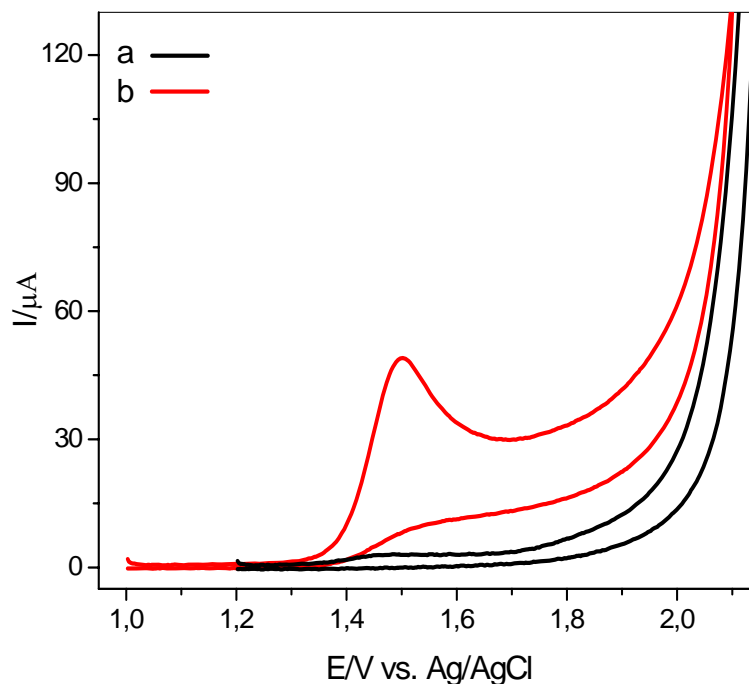


Figura 3.2 - Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo BDD, na ausência (a) e na presença de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (b), em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.1.1. Estudo do Efeito do Meio

Experimentos iniciais com o aspartame foram realizados em diferentes eletrólitos suportes tais como: tampão fosfato ($\text{pH} = 6$), tampão de Britton-Robinson (BR) ($\text{pH} = 5$) e ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos para o aspartame nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na Figura 3.3. O eletrólito suporte que proporcionou uma melhor resposta para o processo de oxidação do aspartame foi o ácido sulfúrico, com um perfil voltamétrico melhor definido, intensidade de corrente de pico ligeiramente maior e ainda, apresentou um potencial de pico menor.

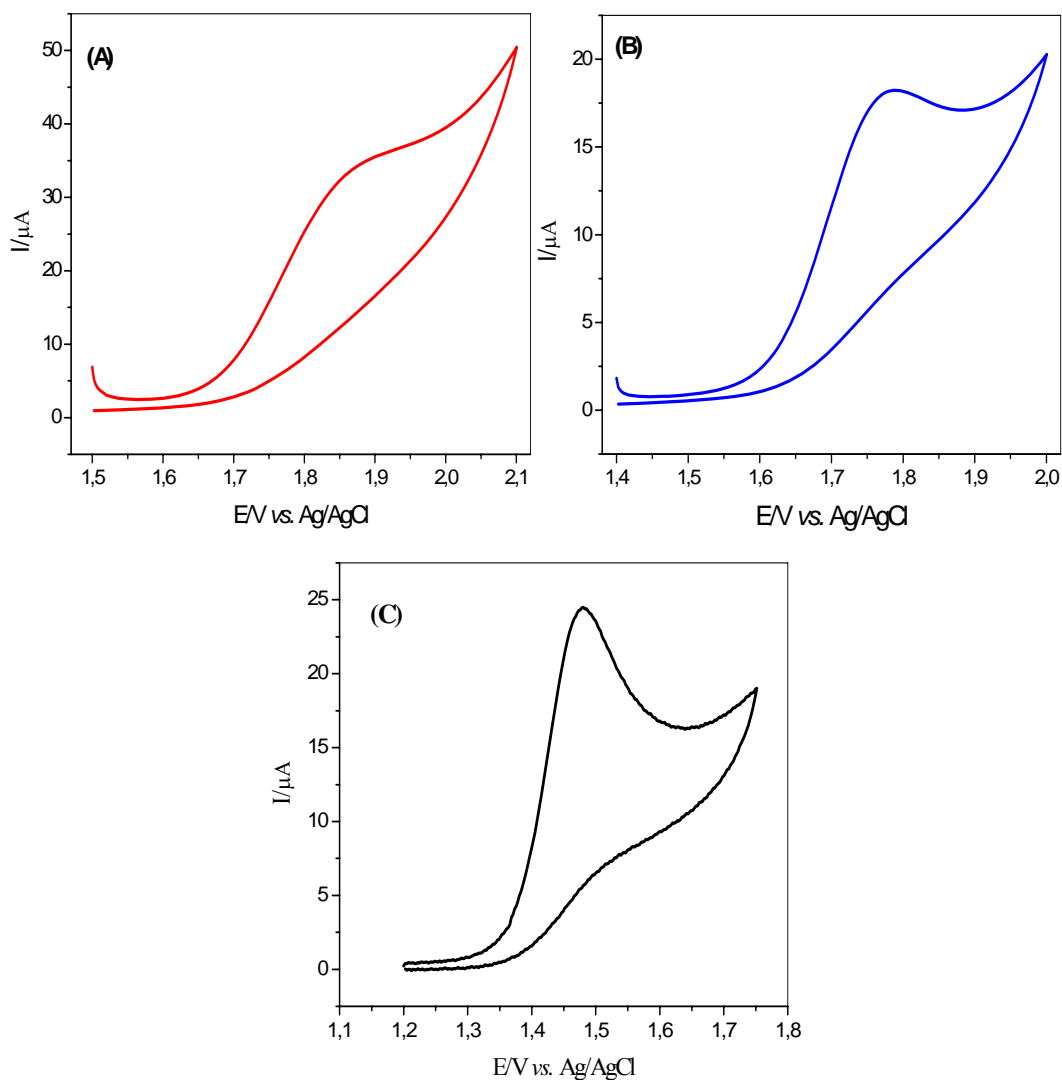


Figura 3.3 - Voltamogramas cíclicos para a oxidação do aspartame em diferentes eletrólitos suporte: (A) tampão fosfato (pH = 6,0); (B) tampão BR (pH = 5,0); (C) ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1} .

Os voltamogramas da Figura 3.4 são resultados da variação da concentração do eletrólito suporte, observa-se que o potencial de pico é pouco influenciado pela variação da concentração do eletrólito, ao contrário da intensidade de corrente de pico que apresenta valores diferentes para cada concentração do eletrólito, neste caso, a concentração do eletrólito suporte selecionada foi de 0,5 mol L^{-1} , no qual observa-se um máximo de corrente.

Antes da realização das medidas eletroquímicas todas as soluções foram desoxigenadas durante 5 minutos com nitrogênio gasoso. Como pode ser

observado na Figura 3.5 a ausência de oxigênio promove uma melhora com relação a intensidade de corrente de pico.

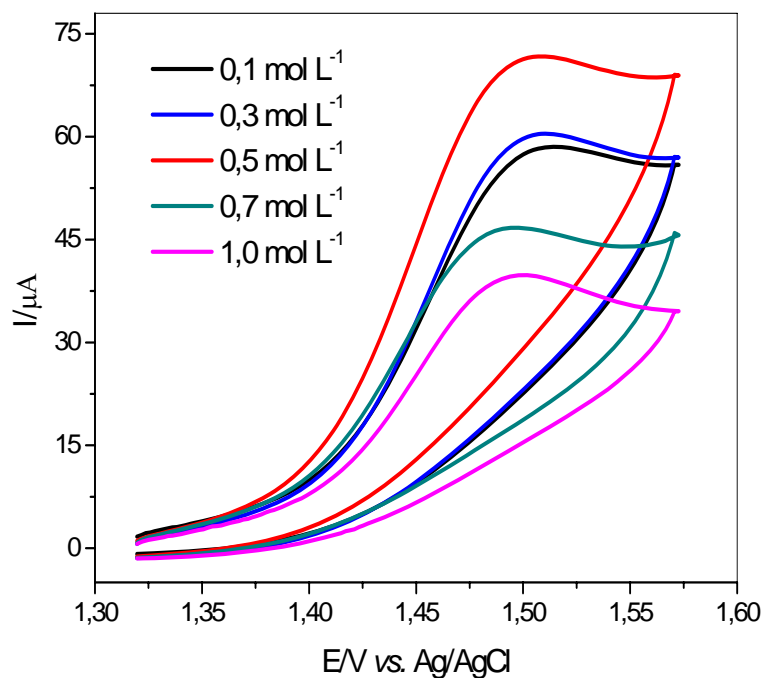


Figura 3.4 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o aspartame em diferentes concentrações do eletrólito suporte ácido sulfúrico (H₂SO₄). ([Aspartame] = 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, v = 50 mV s⁻¹).

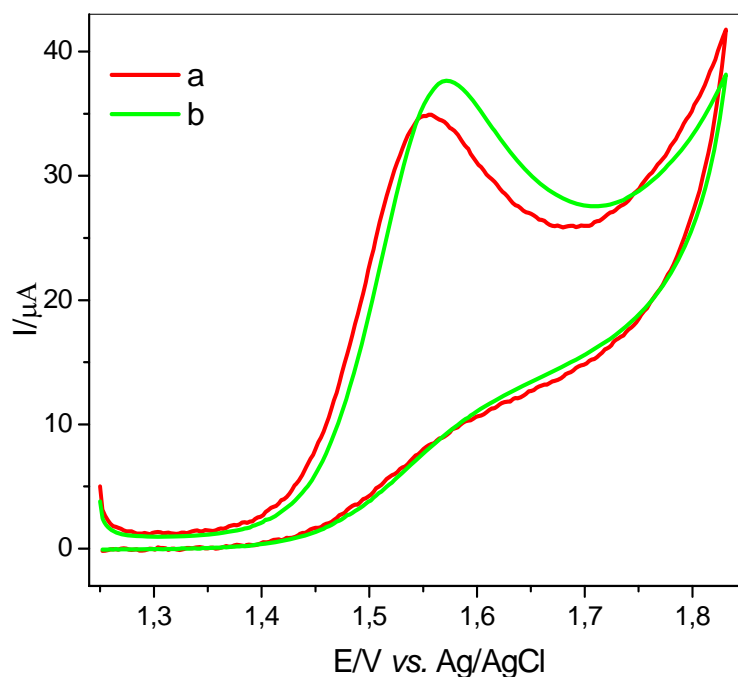


Figura 3.5 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o aspartame 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, na presença de oxigênio (a); e na ausência de oxigênio (b).

3.2.2. Voltametria de Onda Quadrada

Os voltamogramas de onda quadrada apresentaram um comportamento semelhante aqueles obtido por voltametria cíclica, apresentando somente um pico de oxidação para o aspartame em torno de 1,6 V vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Nas respostas obtidas com a SWV, a corrente medida é uma resultante entre as correntes de varredura no sentido direto e no sentido reverso de aplicação dos pulsos de potencial. A separação e demonstração destas correntes podem ser utilizadas para se observar a presença de picos em ambos os sentidos e, assim, realizar uma avaliação prévia do tipo de reação redox que ocorre no sistema.

A Figura 3.6 apresenta a separação das componentes de corrente para o aspartame sobre o eletrodo BDD. Observa-se que a corrente resultante é bastante semelhante à corrente direta e ainda, a corrente reversa não apresenta pico. Este comportamento é característico de sistemas totalmente irreversíveis⁸¹.

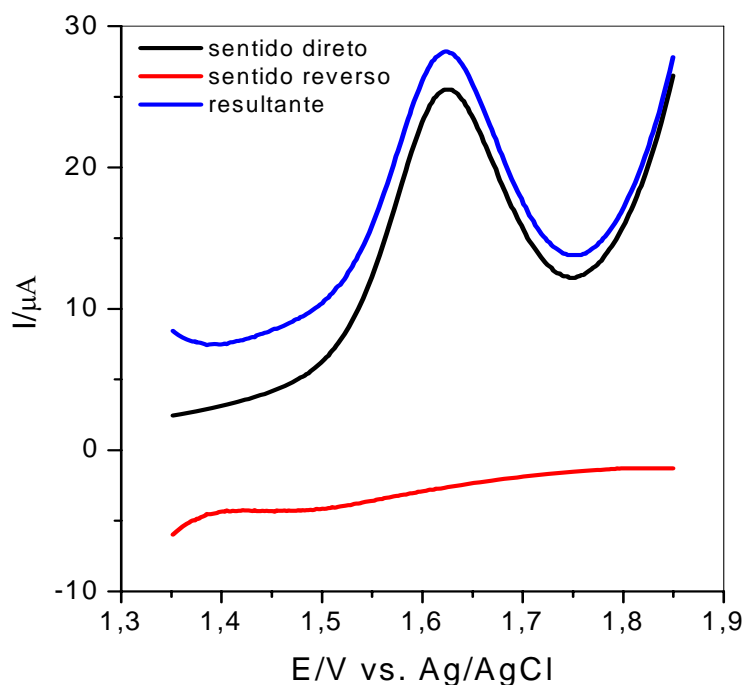


Figura 3.6 - Voltamogramas de onda quadrada do aspartame ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, $f = 10$ s⁻¹, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV).

3.2.2.1. Efeito do Pré-Tratamento Catódico

Um trabalho desenvolvido por Suffredini et al.⁹¹ chamaram a atenção para o efeito de pré-tratamentos eletroquímicos sobre a resposta eletroquímica do eletrodo de diamante dopado com boro. Neste trabalho, Suffredini et al. relatam que ao realizar uma polarização catódica sobre o eletrodo de BDD obteve-se uma melhora significativa com relação à resposta eletroquímica do eletrodo e conseqüentemente com relação ao limite de detecção para clorofenóis. Diante disso, optou-se por realizar este pré-tratamento catódico sobre o eletrodo de BDD com o objetivo de melhorar a resposta eletroquímica do eletrodo para o aspartame. Neste pré-tratamento é aplicada ao eletrodo uma corrente de $-0,72$ A por 60 s.

A Figura 3.7 mostra os voltamogramas obtidos para o aspartame sobre o eletrodo sem o pré-tratamento catódico e após o pré-tratamento. Observa-se que, assim como para os clorofenóis, o pré-tratamento catódico sobre o eletrodo de BDD causa uma melhora significativa no perfil voltamétrico para o aspartame, e também um aumento na corrente de pico anódica.

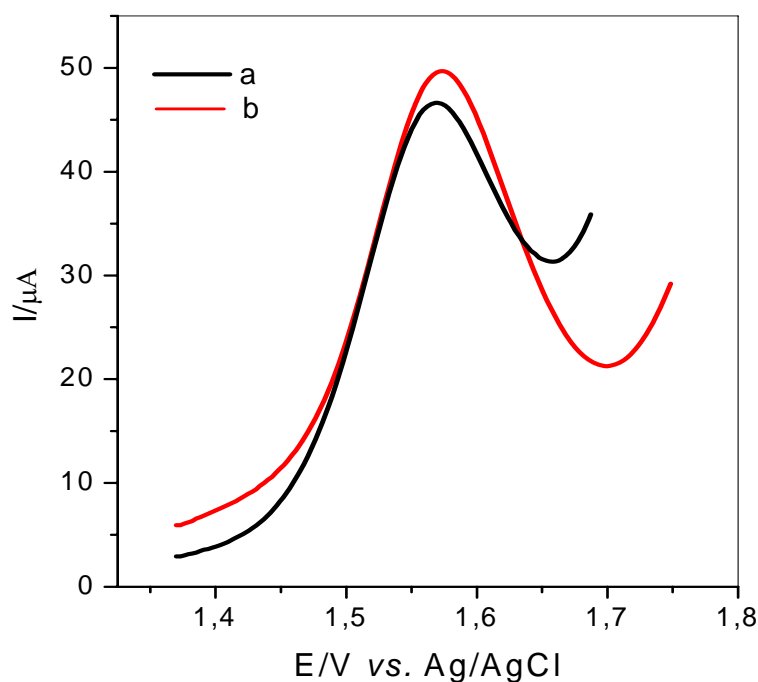


Figura 3.7 - Voltamogramas de onda quadrada do aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o eletrodo BDD sem pré-tratamento catódico (a) e com o pré-tratamento catódico (b); ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Este pré-tratamento catódico era realizado diariamente antes da realização dos experimentos, pois a exposição do eletrodo ao ar atmosférico causa oxidação da superfície do eletrodo diminuindo o efeito do pré-tratamento⁹².

3.2.2.2. Efeito da Frequência de Aplicação dos Pulsos de Potenciais (f)

Para o desenvolvimento de um procedimento analítico empregando a voltametria de onda quadrada é de grande importância à otimização de parâmetros como a frequência de aplicação de pulsos de potencial (f), amplitude de pulso de potencial (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s), pois podem melhorar de forma significativa a resposta voltamétrica. Desta forma, estes parâmetros foram avaliados.

A frequência de aplicação dos pulsos de potencial é uma das mais importantes variáveis na voltametria de onda quadrada, pois é ela que determina

a intensidade dos sinais e conseqüentemente a sensibilidade do método, e ainda fornece informações sobre o processo mecanístico do sistema.

A Figura 3.8 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o aspartame em função da variação da freqüência. Observa-se que à medida que se aumenta a freqüência de aplicação de pulsos de potenciais ocorre também um aumento na intensidade da corrente de pico e um deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos, mas há também, um deslocamento da linha base para valores maiores de correntes. Portanto, a freqüência escolhida foi a de 10 s^{-1} , para evitar altos valores de corrente para a linha base.

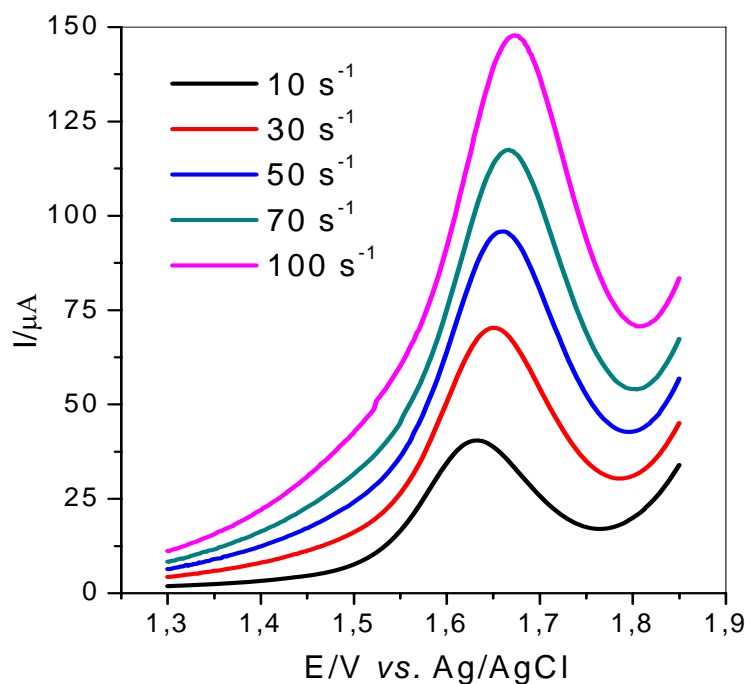


Figura 3.8 - Influência da variação da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial no aspecto geral dos voltamogramas do aspartame ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Segundo a teoria da voltametria de onda quadrada^{81,82}, para sistemas difusionais totalmente irreversíveis com processo controlado por adsorção das espécies, a intensidade de corrente varia linearmente com a freqüência de aplicação dos pulsos de potencial. A Figura 3.9 mostra o comportamento da

corrente de pico em função da variação da frequência, pela linearidade obtida, confirma-se que o processo de oxidação do aspartame sobre o eletrodo de BDD é irreversível e controlado por adsorção.

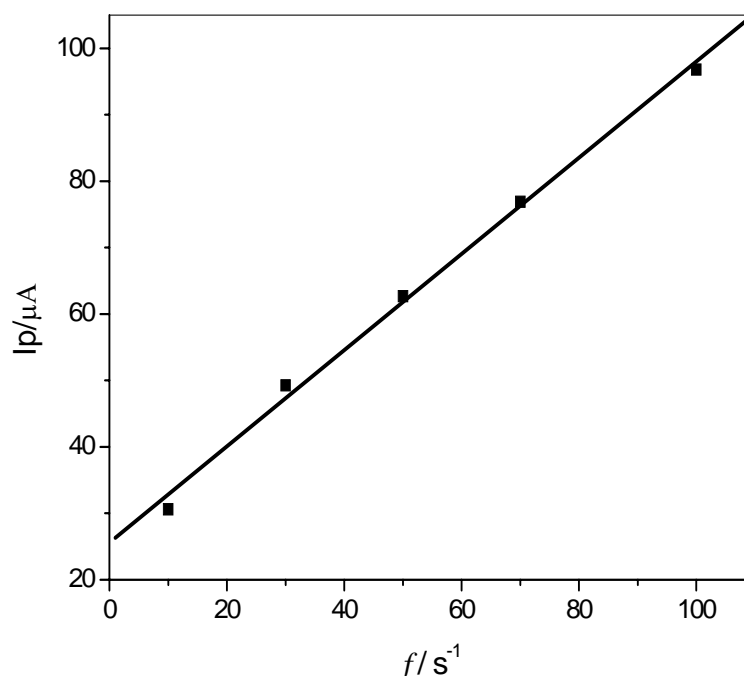


Figura 3.9 - Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos para o aspartame (dados extraídos da Figura 3.8).

3.2.2.3. Efeito da Amplitude do Pulso de Potencial (*a*)

Um outro parâmetro estudado foi a influência da variação da amplitude de pulso de potencial na corrente de pico para a oxidação do aspartame. A variação da amplitude de pulso de potencial pode servir para uma avaliação do tipo do processo redox envolvido, já que para sistemas totalmente irreversíveis o aumento da amplitude pode deslocar os valores de potenciais de pico, provocar mudanças significativas nas larguras de meia-altura dos voltamogramas, e, além disto, o aumento da amplitude também pode provocar aumento da corrente de pico. Os voltamogramas obtidos para o aspartame nos diferentes valores de amplitude estão apresentados na Figura 3.10.

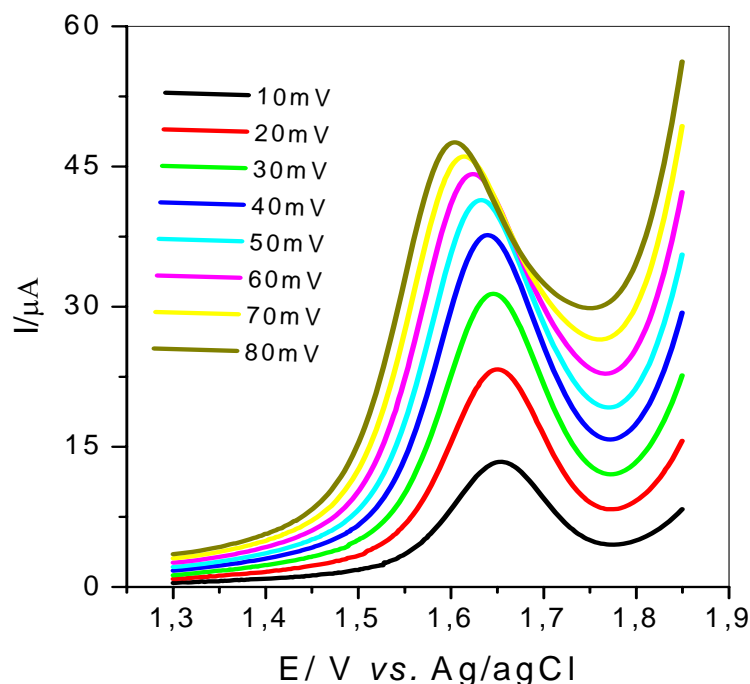


Figura 3.10 - Influência da variação da amplitude de pulso de potencial no aspecto geral dos voltamogramas do aspartame ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 10 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\text{H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Observa-se que para valores de amplitudes menores que 40 mV, o aumento da intensidade de corrente é linear, valores estes apresentados na Figura 3.11. Adicionalmente, amplitudes maiores parecem não atuar de modo significativo na sensibilidade para propósitos analíticos, Sendo assim, a amplitude selecionada para o desenvolvimento deste trabalho foi de 40 mV.

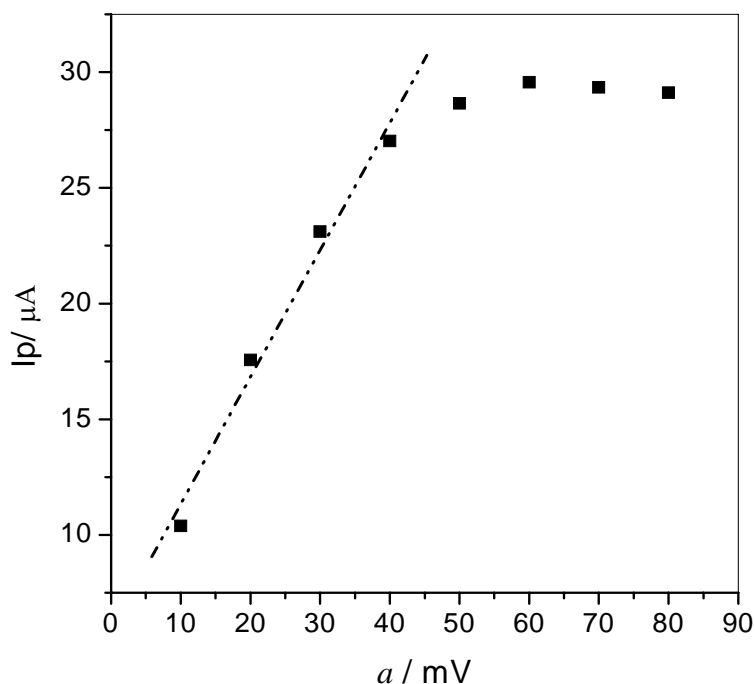


Figura 3.11 - Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude de pulso de potencial para o aspartame (dados extraídos da Figura 3.10).

3.2.2.4. Efeito do Incremento de Varredura (ΔE_s)

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

Na Figura 3.12 é apresentada a dependência da intensidade de corrente de pico em função da variação do incremento de varredura para o aspartame. Pode-se observar que a corrente de pico varia linearmente com o incremento de varredura até 2 mV, desta forma optou-se em trabalhar com este valor de incremento de varredura (2 mV).

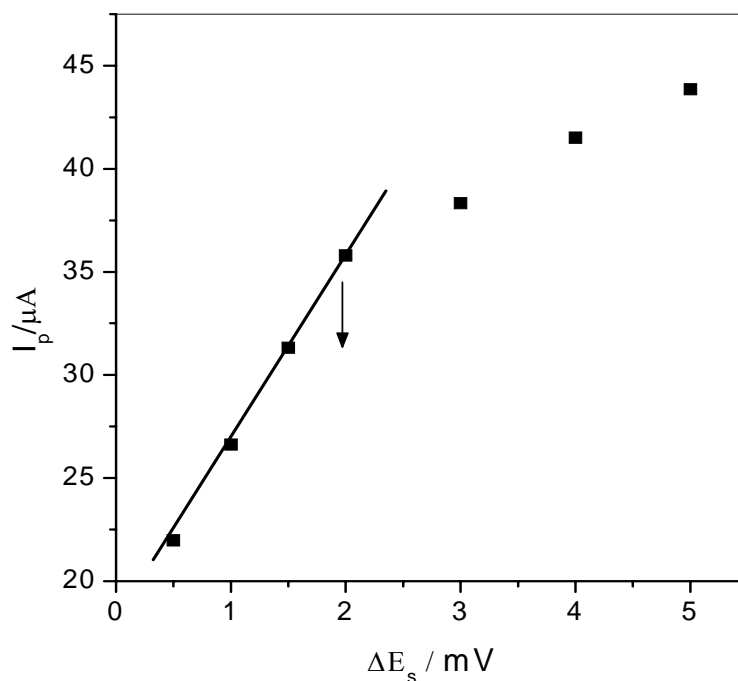


Figura 3.12 - Influência da variação do incremento de varredura sobre as correntes de pico ($[\text{Aspartame}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ em $\text{H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

3.2.2.5. Estudo de Repetibilidade e Reprodutibilidade

A repetibilidade e a reprodutibilidade do eletrodo de BDD foram estudadas empregando soluções padrão de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O estudo de repetibilidade foi feito em quintuplicata ($n=5$) para a solução de aspartame (Figura 3.13). Já no estudo de reprodutibilidade 5 medidas de corrente foram obtidas em dias diferentes com diferentes soluções de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e estão mostrados na Figura 3.14.

O desvio padrão relativo (RSD) obtido para o estudo de repetibilidade foi de 0,17 % e para a reprodutibilidade foi de 2,8 %.

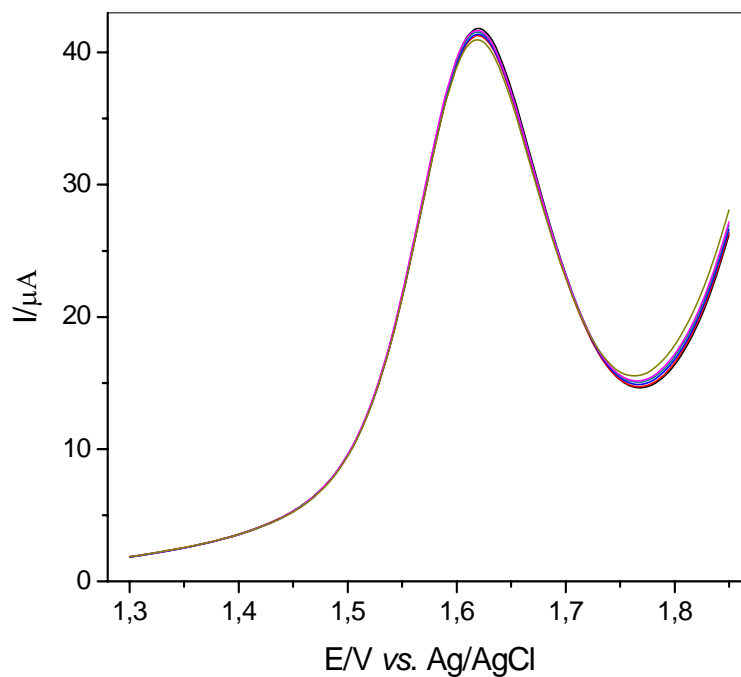


Figura 3.13 - Voltamogramas de onda quadrada para o aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ obtidos em quintuplicata ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2\text{mV}$).

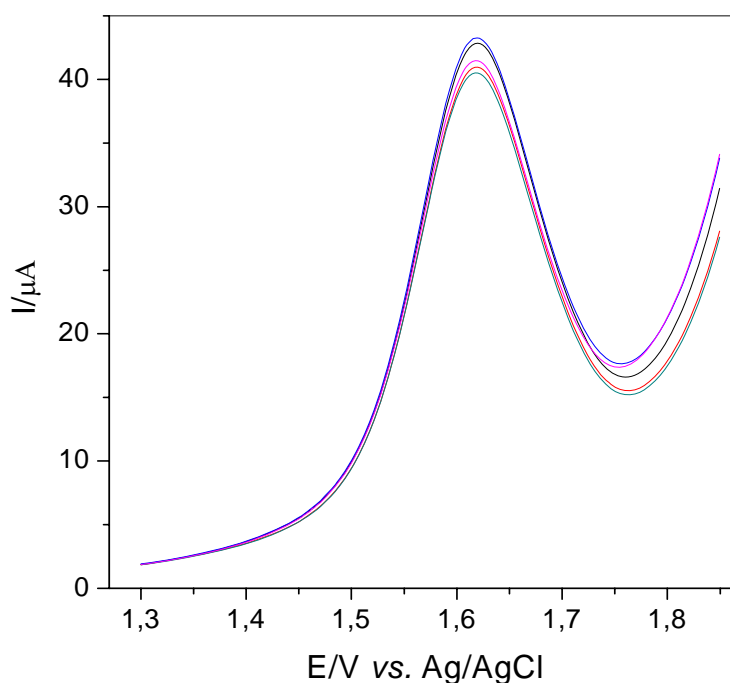


Figura 3.14 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos em dias diferentes para soluções de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

3.2.3. Construção da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros que envolvem a voltametria de onda quadrada, a curva analítica foi construída. Alíquotas de 50 μL da solução padrão de aspartame na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas em 10 mL de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 3.15 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando-se a concentração de aspartame de $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A curva analítica pode ser observada na Figura 3.16, e a equação da reta obtida foi:

$$(I_{pa} / \mu\text{A}) = 0,301 + 2,18 \times 10^5 [\text{Aspartame}] \text{ mol L}^{-1} \quad (6)$$

com um coeficiente de correlação de 0,9998.

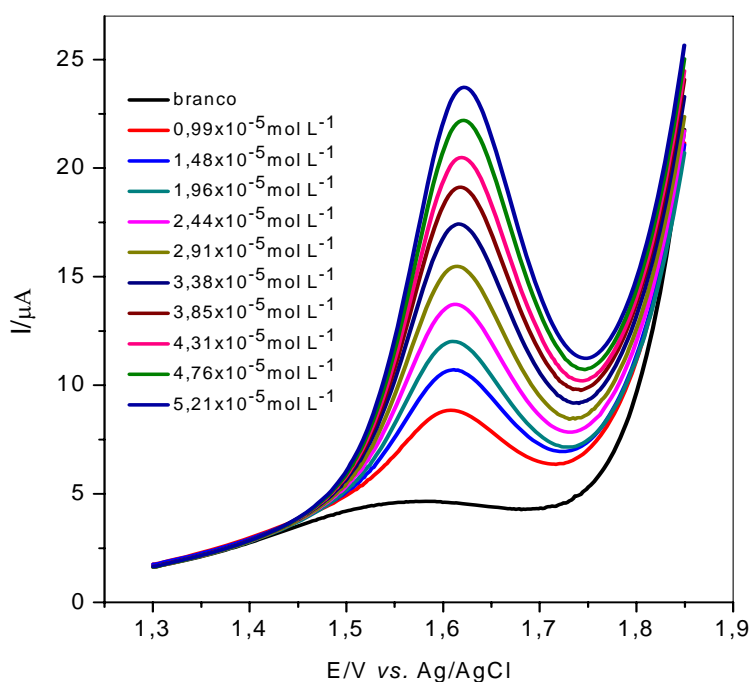


Figura 3.15 - Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de aspartame ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

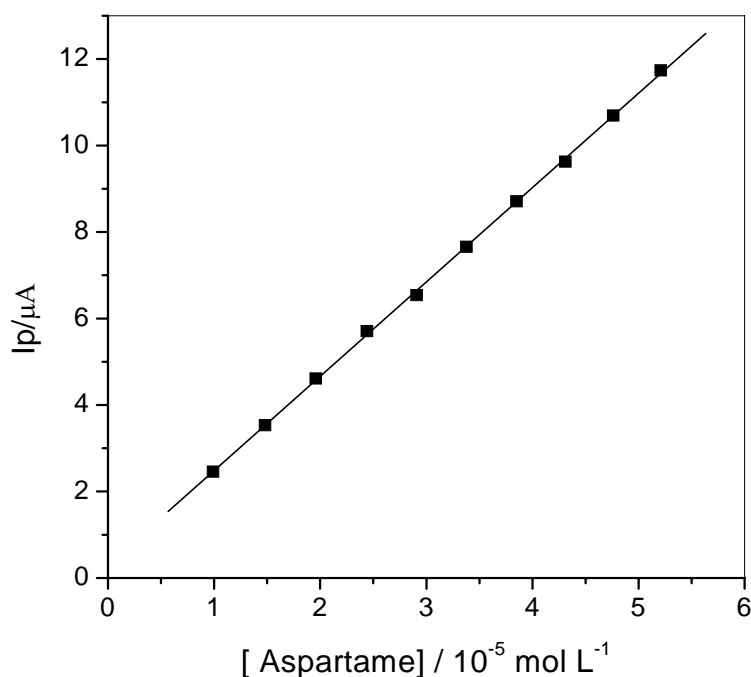


Figura 3.16 - Curva analítica obtida para o aspartame em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹.

Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão da média aritmética de 10 voltamogramas do branco, obtidos das correntes medidas no mesmo potencial de pico de oxidação do aspartame, e a relação:

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad (7)$$

onde S_B é o desvio padrão da média aritmética de 10 brancos e b o valor do coeficiente angular da curva analítica. O limite de detecção obtido para o intervalo de concentração estudado foi de $2,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

3.2.4. Estudo de Interferentes em Potencial e Teste de Adição e Recuperação

Para investigar a seletividade do eletrodo de BDD, diversas substâncias geralmente adicionadas em produtos dietéticos como: acesulfame-K,

ciclamato, sacarina, ácido cítrico, ácido ascórbico, sacarose, lactose, benzoato de sódio e os corantes, amarelo crepúsculo, tartrazina e azul brilhante, foram analisadas. Os testes foram feitos pela adição destes concomitantes à solução de aspartame na concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de aspartame. Algumas das substâncias analisadas como benzoato de sódio, sacarina e sacarose não apresentaram eletroatividade frente ao eletrodo de BDD. Dentre as que apresentaram eletroatividade somente a tartrazina apresentou um pico de oxidação próximo ao potencial de pico do aspartame. Com pode ser observado pela Figura 3.17, o voltamograma obtido para o aspartame na presença de tartrazina em concentrações 1/1 apresentou uma queda de corrente de aproximadamente 5% com relação ao voltamograma obtido somente para o aspartame.

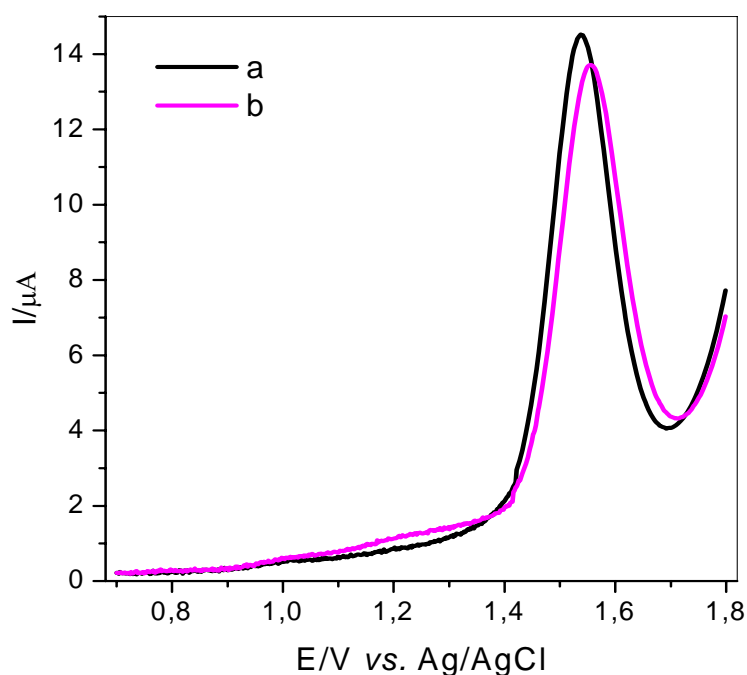


Figura 3.17 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o aspartame na concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência de tartrazina (a) e na presença de tartrazina na concentração de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (b).

Porém, a tartrazina é um corante alimentício que não está presente em todos os produtos dietéticos e, normalmente sua concentração nos produtos que a contém é muito menor que a concentração de aspartame tornando possível a determinação de aspartame na presença de tartrazina com boa exatidão.

As outras substâncias mesmo apresentando eletroatividade frente ao eletrodo de BDD não provocaram qualquer interferência na resposta do eletrodo de BDD para o aspartame, sendo que os potenciais de pico dessas substâncias são distantes do potencial de oxidação do aspartame e não ocorreu bloqueio do eletrodo de BDD.

O estudo de adição e recuperação das substâncias ativas em amostras de interesse também pode fornecer informações da influência de possíveis interferentes existentes na matriz desses produtos sobre o procedimento proposto. Para esse estudo foram feitos experimentos em triplicata para algumas amostras de produtos dietéticos: adoçantes de mesa (Zero Cal[®], Finn[®] e Gold[®]); preparados sólidos para refrescos (Sbelt[®], FIT[®] e MID[®]) e refrigerantes cola (Coca-cola[®] e Pepsi-cola[®]); por meio da adição de alíquotas de solução padrão de aspartame as soluções dessas amostras. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.1.

As recuperações variaram entre 95,9 % e 104,4 %, e estes valores obtidos indicam que não houve interferência da matriz das amostras na determinação de aspartame pelo procedimento analítico desenvolvido.

Tabela 3.1. Estudo de adição e recuperação de aspartame em amostras de produtos dietéticos

Amostras	Aspartame /10 ⁻⁵ mol L ⁻¹		Recuperação/%
	Adicionado	Recuperado	
Zero Cal [®]	1,91	1,92	100,6
	2,84	2,93	103,1
	3,75	3,80	101,4
Finn [®]	1,91	1,89	99,2
	2,84	2,86	100,8
	3,75	3,86	103,2
Gold [®]	1,91	1,88	98,4
	2,84	2,88	101,4
	3,75	3,71	98,9
Sbelt [®]	1,80	1,74	96,8
	2,79	2,75	98,6
	3,69	3,67	99,4
FIT [®]	1,80	1,79	99,4
	2,79	2,76	99,1
	3,69	3,76	101,8
MID [®]	1,80	1,81	100,5
	2,79	2,75	101,4
	3,69	3,54	95,9
Coca-cola [®]	1,80	1,88	104,4
	2,79	2,85	102,1
	3,69	3,71	100,5
Pepsi-cola [®]	1,80	1,85	102,8
	2,79	2,90	103,9
	3,69	3,84	104,0

(n=3)

3.2.5. Determinação de Aspartame em Amostras Comerciais e Validação do Procedimento Analítico por Comparação com Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Com o objetivo de avaliar o desempenho do procedimento analítico, determinou-se o aspartame em produtos dietéticos encontrados no comércio local. O método utilizado para a determinação de aspartame foi o método de adição de padrão. A Figura 3.18 mostra os voltamogramas obtidos pelo método de adição de padrão para uma amostra de produto dietético.

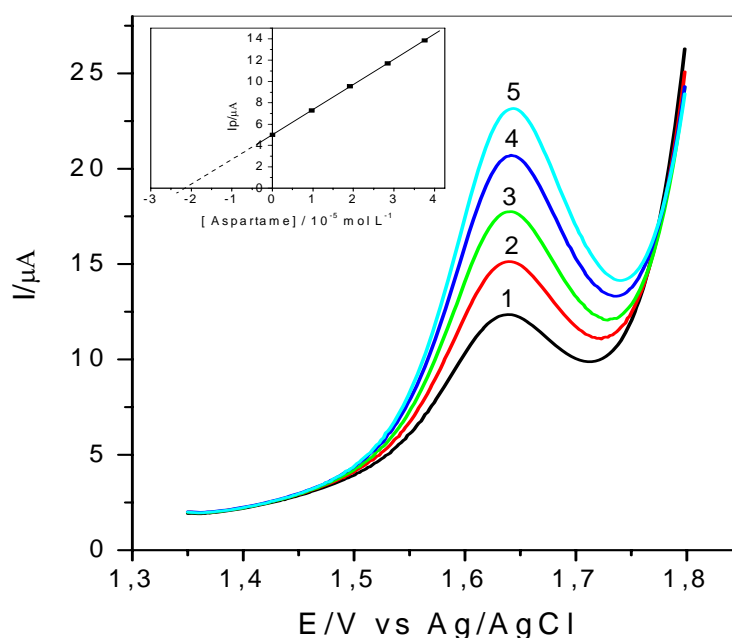


Figura 3.18 – SWV obtidos para a determinação de aspartame em produtos dietéticos (adoçante de mesa: Zero cal[®]). (1) amostra Zero cal[®]; (2) amostra Zero cal[®] + $1,0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$; (3) amostra Zero cal[®] + $1,9 \times 10^{-5} mol L^{-1}$; (4) amostra Zero cal[®] + $2,8 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ e (5) amostra Zero cal[®] + $3,7 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ de solução padrão de aspartame.

O procedimento desenvolvido se mostrou simples, rápido e eficiente podendo ser utilizado para a determinação de aspartame em produtos dietéticos. A Tabela 3.2 mostra os resultados obtidos para todas as amostras de produtos dietéticos que foram analisadas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para fazer uma comparação dos resultados obtidos com a voltametria de onda quadrada e o eletrodo de BDD para a determinação de aspartame em produtos dietéticos. Nas condições experimentais empregadas, já apresentadas na parte experimental, a molécula do aspartame apresentou um tempo de retenção de 19,6 minutos. Um cromatograma típico do aspartame é apresentado na Figura 3.19.

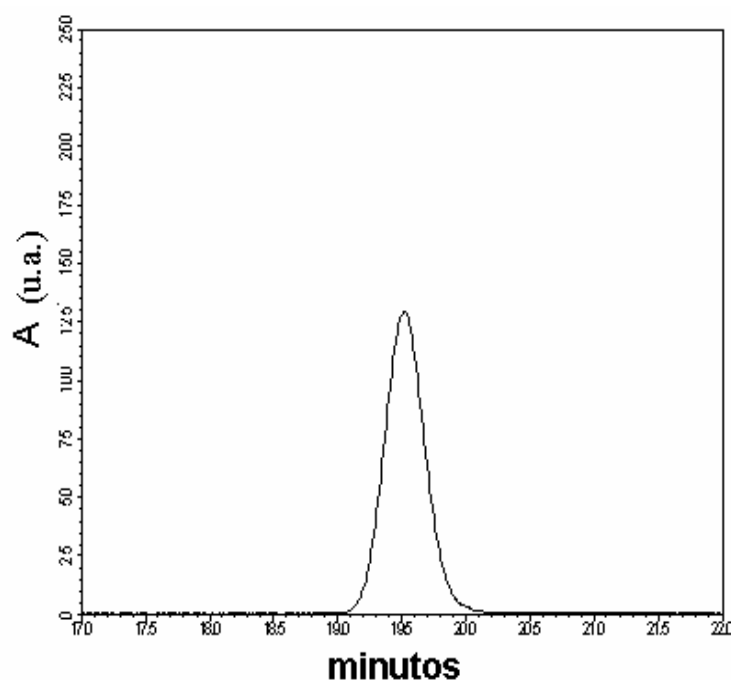


Figura 3.19 – Cromatograma típico para o aspartame na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 3.20 mostra a curva analítica obtida por HPLC para o aspartame no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e abaixo segue a equação da curva analítica obtida.

$$A(u.a.) = 40,2 + 49,4 \times 10^5 [\text{Aspartame}] \text{ mol L}^{-1} \quad (8)$$

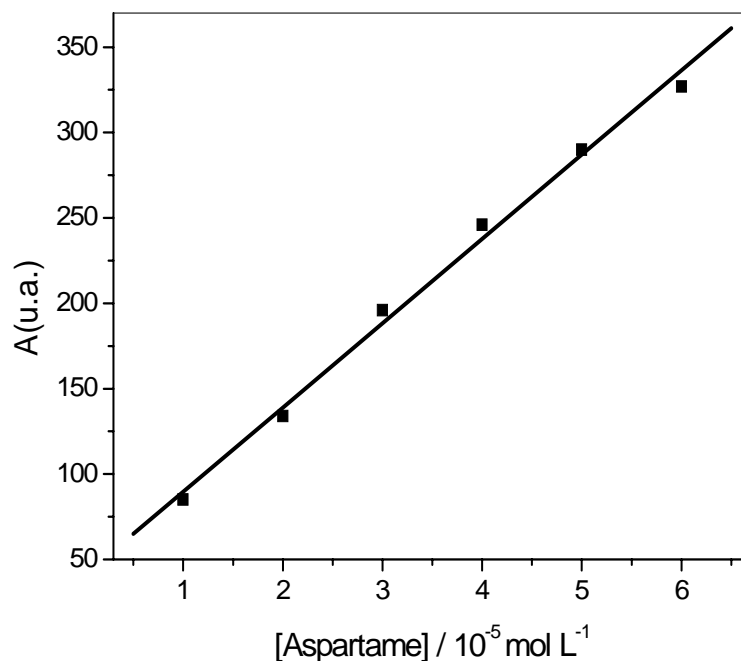


Figura 3.20 – Curva analítica obtida para o aspartame empregando HPLC.

Na Tabela 3.2 encontram-se os resultados obtidos para a determinação do aspartame em produtos dietéticos por HPLC e por SWV. Observa-se que os resultados obtidos pelo método proposto empregando SWV estão em concordância com os resultados obtidos pelo método de referência empregado, HPLC. Os resultados obtidos pelos dois métodos também foram comparados aplicando-se o teste t pareado ⁹³, ($t_{\text{exp}} = 2,41$; $t_{\text{crítico}} = 2,57$). Como o t_{exp} (2,41) obtido é menor que o $t_{\text{crítico}}$ (2,57) conclui-se que os resultados obtidos na determinação de aspartame por SWV e por HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95% e estão dentro de um erro relativo aceitável.

Tabela 3.2. Resultados obtidos na determinação de aspartame em produtos dietéticos analisados por HPLC e por SWV

Amostras	Aspartame (mg/100mL)					
	Valor Rotulado	Valor		Erro	Erro	
		HPLC	SWV	Relativo (1) %	Relativo (2) %	
Adoçantes de mesa	Zero cal [®]	—	0,63±0,02	0,64±0,02	—	1,6
	Finn [®]	—	0,62±0,03	0,60±0,01	—	-3,3
	Gold [®]	—	0,56±0,04	0,55±0,03	—	-1,8
Preparados sólidos para refrescos	Sbelt [®]	30,0	31,0±0,2	29,2±0,4	-2,7	-5,8
	Mid [®]	28,8	28,6±0,3	28,4±0,4	-1,4	-0,7
	FIT [®]	34,1	34,2±0,2	34,7±0,5	1,7	1,4
Refrigerante cola	Coca-cola [®]	24,0	24,1±0,2	24,5±0,4	2,0	1,6
	Pepsi-cola [®]	34,9	35,1±0,5	36,0±0,4	3,0	2,5

(n=3) Erro relativo (1) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor rotulado}) / \text{valor rotulado}$

Erro relativo (2) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor HPLC}) / \text{valor HPLC}$

3.2.6. Números de Elétrons Envolvidos e Mecanismo de Oxidação do Aspartame

Na literatura, ainda não há um mecanismo proposto de oxidação do aspartame. Diante disso, iniciaram-se alguns estudos para tentar sugerir um possível mecanismo de oxidação deste edulcorante.

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

$$E = E_0 - \frac{0,059}{n} \log [H^+] \quad (9)$$

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

A Figura 3.21 mostra a relação E_p vs. pH, para uma solução de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ num intervalo de pH de 0,3 a 1,3. O potencial de pico diminui linearmente com o aumento do pH, com uma tangente igual a $(dE/dpH) = - 51 \text{ mV/pH}$, correspondente de acordo com a equação (9) a uma transferência de um próton e um elétron por molécula de aspartame oxidada.

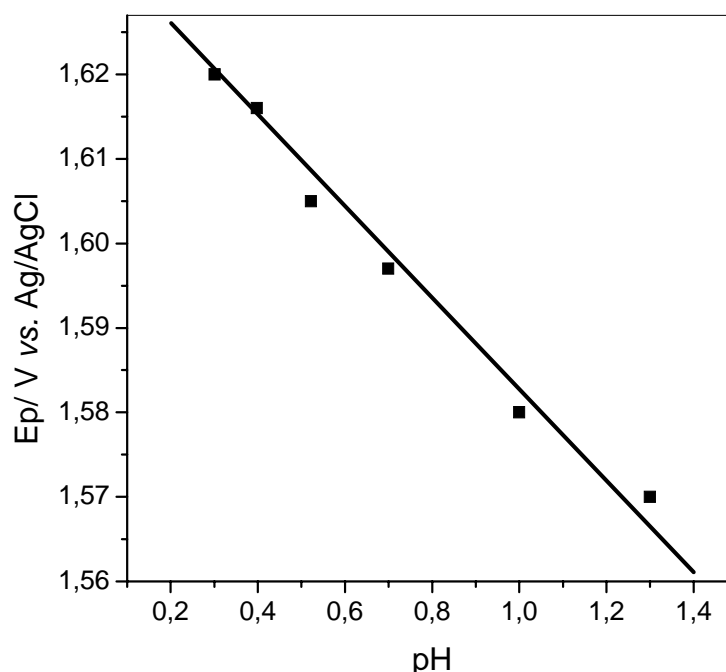


Figura 3.21 - Variação do potencial de pico com o pH para o aspartame.

Utilizando-se os critérios de diagnósticos disponíveis para a técnica de voltametria de onda quadrada^{81,89}, também foi possível prever o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do aspartame. De acordo com estes critérios, a dependência dos potenciais de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial para reações totalmente irreversíveis com reagentes e/ou produtos adsorvidos é linear e apresenta uma inclinação de:

$$\Delta E_p / \Delta \log f = - 2,3 RT / \alpha n F \quad (10)$$

onde: α é o coeficiente de transferência de carga e n o número de elétrons envolvidos na reação.

A Figura 3.22 apresenta o comportamento do potencial de pico em função do logaritmo da frequência para o aspartame. Como pode ser observado há um comportamento linear com uma inclinação da curva de 0,088. Empregando-se a equação (10) tem-se que αn é igual a 0,67. Considerando-se o coeficiente de transferência de carga igual a 0,5, que é o valor comumente utilizado para moléculas orgânicas, o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação do aspartame é igual a 1.

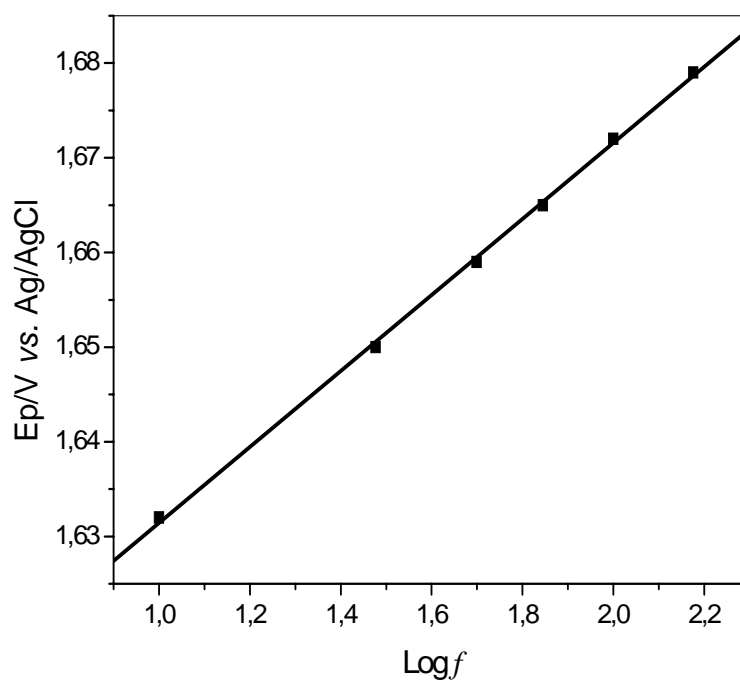
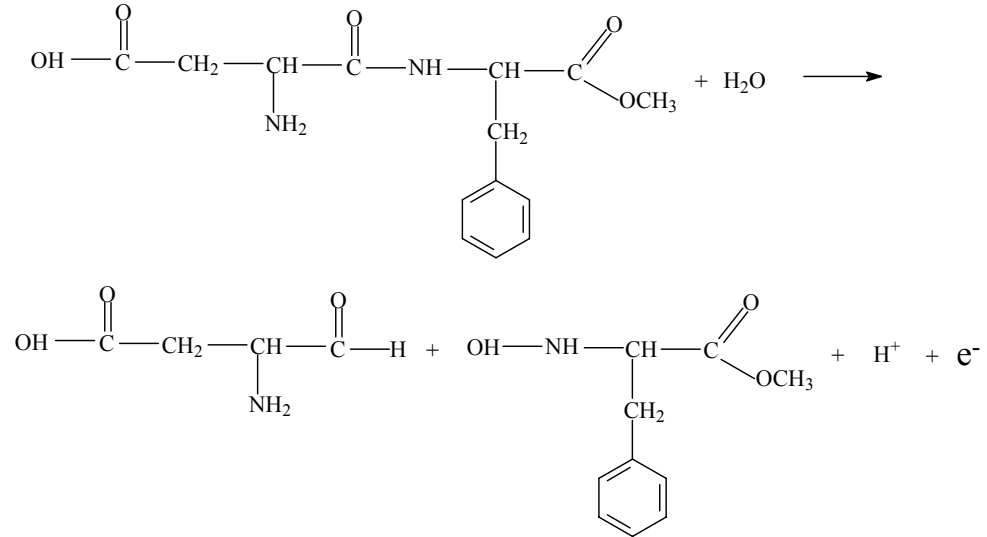


Figura 3.22 - Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

Os estudos realizados indicam que no processo de oxidação do aspartame está envolvido apenas um elétron e, baseando-se em mecanismos de oxidação propostos na literatura para outras moléculas semelhantes à molécula do aspartame, sugere-se que em meio ácido o aspartame pode se oxidar

formando uma hidroxilamina e aldeído liberando um elétron e um próton, como mostra a reação a seguir:



No entanto, ainda serão necessários outros estudos para a confirmação deste mecanismo de oxidação para o edulcorante aspartame.

3.3. Avaliação da Resposta Eletroquímica do Ciclamato de Sódio Sobre o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

Inicialmente foram realizados experimentos utilizando-se a voltametria cíclica para a avaliação preliminar do comportamento do ciclamato de sódio sobre o eletrodo de BDD. Posteriormente, utilizou-se a SWV para o desenvolvimento de um procedimento analítico para a determinação de ciclamato de sódio em amostras de produtos alimentícios.

3.3.1. Voltametria Cíclica

A Figura 3.23 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de BDD na ausência e na presença de ciclamato de sódio na concentração de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado o voltamograma obtido para o ciclamato de sódio apresentou somente um pico de oxidação em torno de $1,9 \text{ V vs. Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$, com características de um processo irreversível, ou seja, não apresenta pico de redução no sentido inverso.

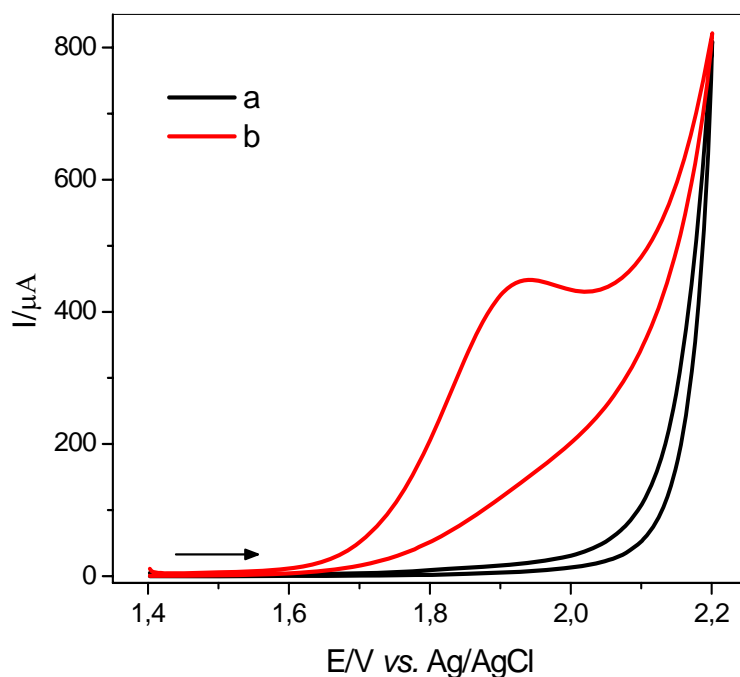


Figura 3.23 - Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo BDD, na ausência (a) e na presença de ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (b) em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.1.1. Estudo do Efeito do Meio

Os eletrólitos suporte selecionados para este estudo foram: tampão Britton-Robinson (BR) ($\text{pH} = 5$) e ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Pelos voltamogramas obtidos, mostrados na Figura 3.24, o eletrólito suporte escolhido para o desenvolvimento do trabalho com ciclamato de sódio também foi o ácido sulfúrico por apresentar maior intensidade de corrente e melhor definição de pico.

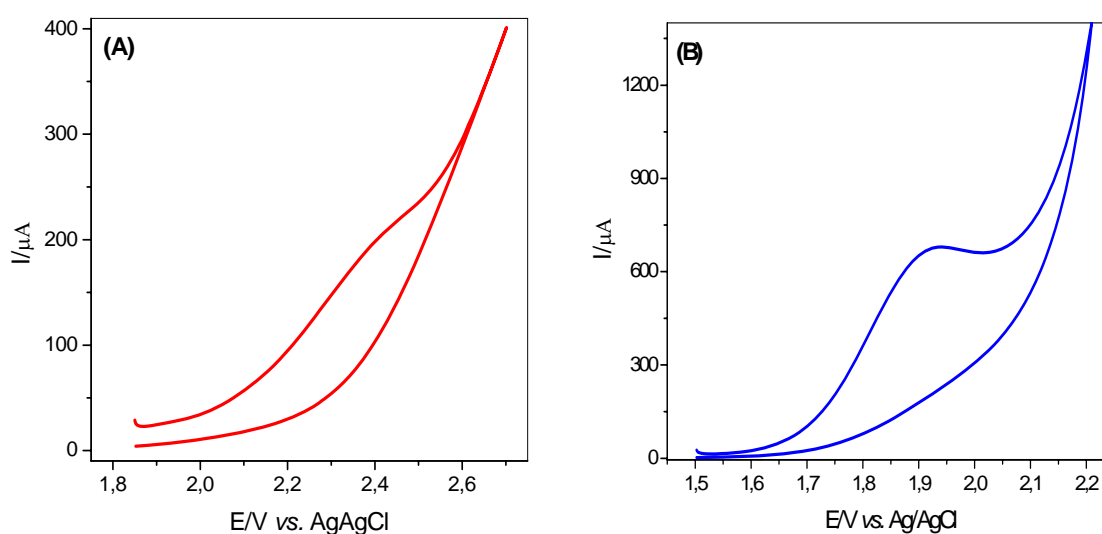


Figura 3.24 - Voltamogramas cíclicos para a oxidação do ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte: (A) tampão BR ($\text{pH} = 5,0$); (B) ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Posteriormente, foi realizado o estudo da influência da variação da concentração do ácido sulfúrico na resposta voltamétrica para o ciclamato de sódio. Os voltamogramas obtidos para o ciclamato em diferentes valores de concentração do ácido sulfúrico encontram-se na Figura 3.25. Pode-se observar que a corrente de pico não sofre grande influência pela variação da concentração do ácido sulfúrico. Portanto, optou-se por continuar trabalhando com a concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico. As soluções de ciclamato de sódio também foram desoxigenadas durante 5 minutos com nitrogênio gasoso,

pois a ausência de oxigênio também promoveu uma melhora com relação à intensidade de corrente de pico, como pode ser observado na Figura 3.26.

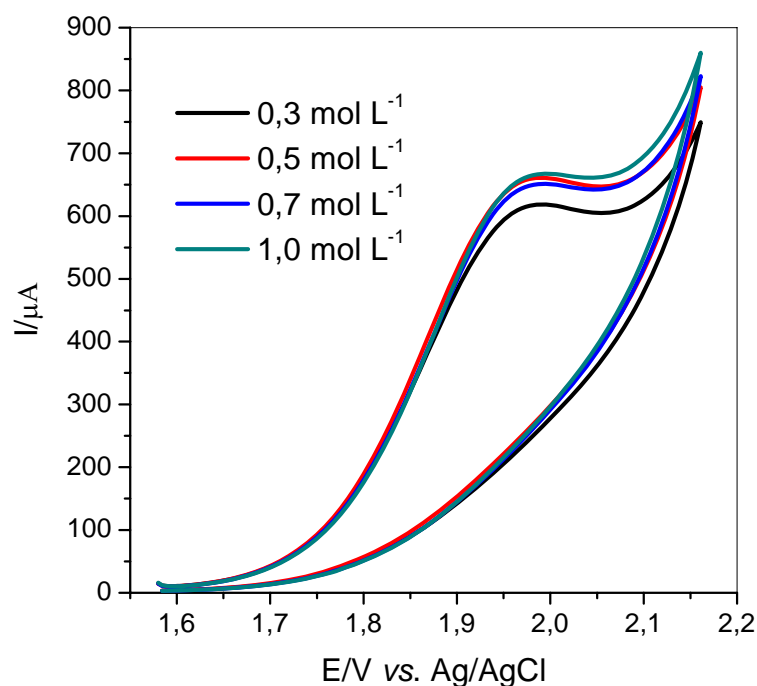


Figura 3.25 - Voltamogramas cíclicos para o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações do eletrólito suporte, H_2SO_4 .

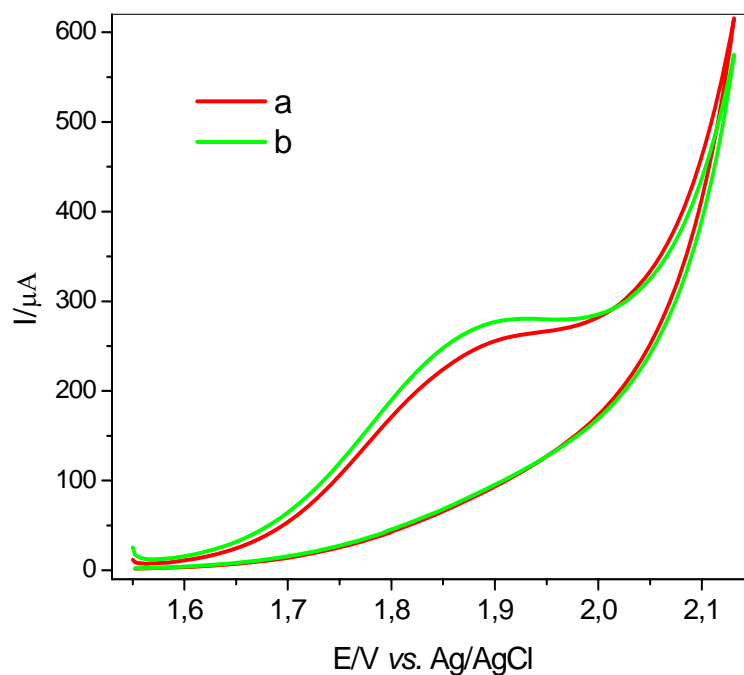


Figura 3.26 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de oxigênio (a); e na ausência de oxigênio (b).

3.3.2. Voltametria de Onda Quadrada

Assim como o observado por voltametria cíclica, o ciclamato de sódio em ácido sulfúrico apresentou somente um pico de oxidação em torno de 1,9 V. Na Figura 3.27 está apresentado um voltamograma de onda quadrada para o ciclamato de sódio com as componentes de corrente. Observa-se um comportamento típico de uma reação irreversível. Pode-se notar que não há participação da corrente reversa e que as correntes direta e resultante são praticamente as mesmas.

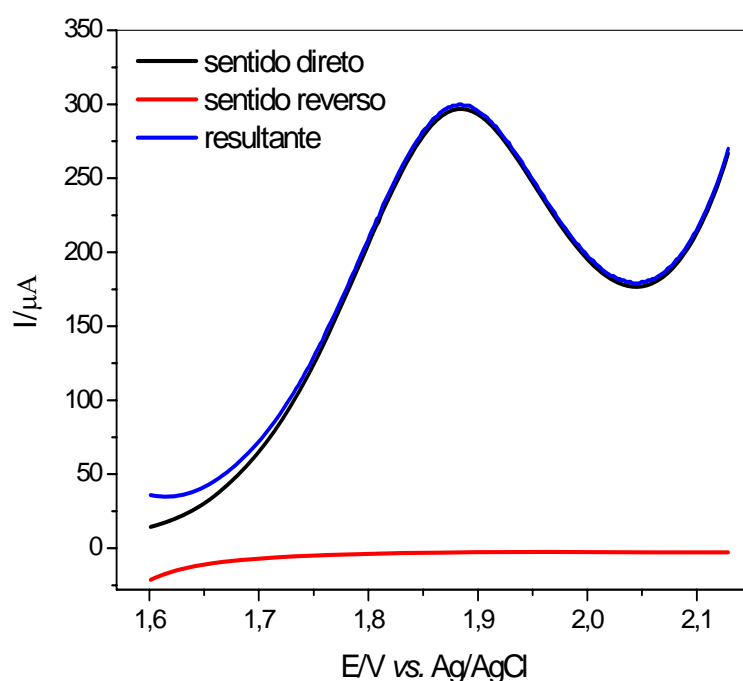


Figura 3.27 - Voltamogramas de onda quadrada do ciclamato de sódio ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

3.3.2.1. Efeito do Pré-Tratamento Catódico

A Figura 3.28 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ciclamato de sódio sobre o eletrodo de BDD sem o pré-tratamento catódico e após o pré-tratamento catódico. Observa-se que o voltamograma obtido para o ciclamato com o eletrodo pré-tratado catodicamente apresentou

maior corrente de pico e também melhor definição de pico, e por isso optou-se por trabalhar com a realização do pré-tratamento catódico antes da execução dos experimentos.

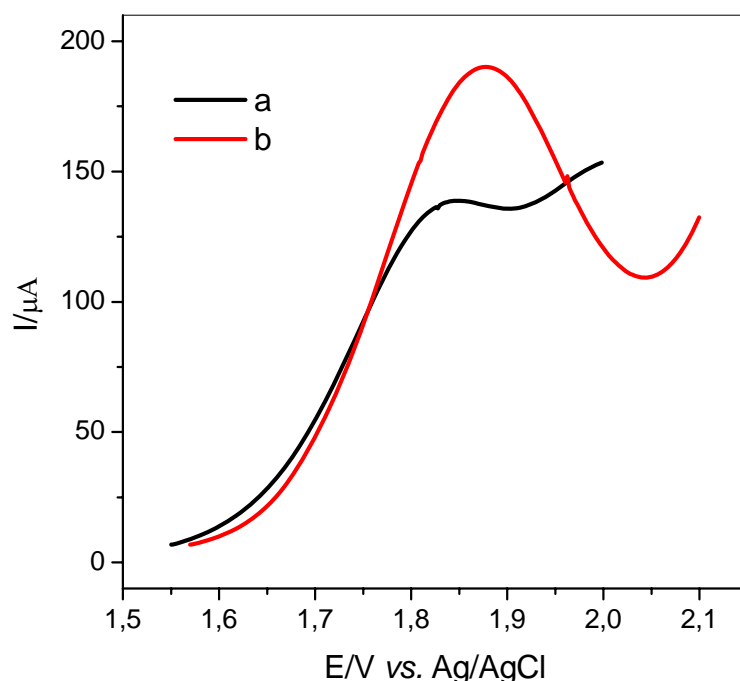


Figura 3.28 - Voltamogramas de onda quadrada do ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sobre o eletrodo BDD sem pré-tratamento catódico (a) e com o pré-tratamento catódico (b). ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

3.3.2.2. Efeito da Frequência de Aplicação dos Pulsos de Potenciais

A Figura 3.29 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ciclamato de sódio em função da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial. Observa-se que com o aumento no valor da frequência ocorre um aumento na intensidade de corrente de pico e também um deslocamento da linha base para valores maiores de corrente, comportamento semelhante ao apresentado pelo aspartame, sendo assim, a frequência de aplicação dos pulsos selecionada para este trabalho foi de 10 s^{-1} .

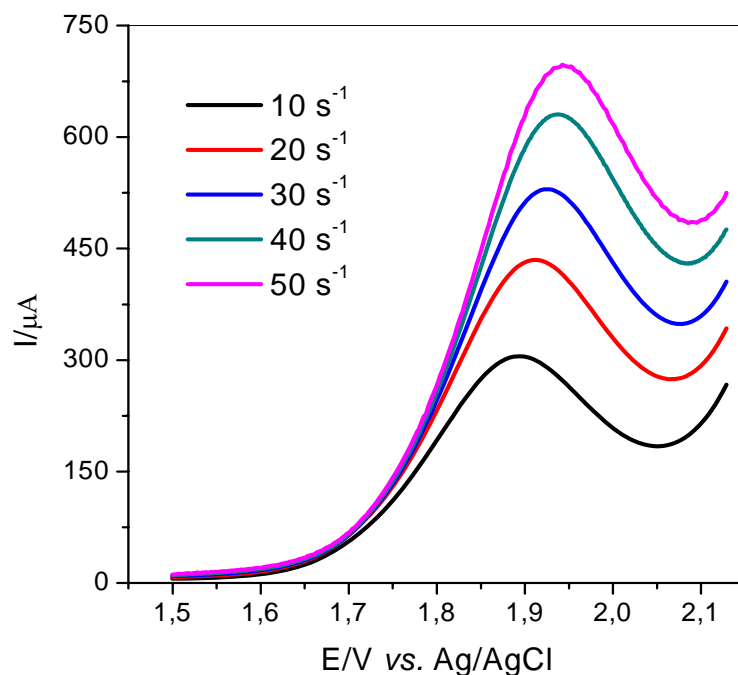


Figura 3.29 - Influência da variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial nos voltamogramas do ciclamato de sódio ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

Segundo a teoria desenvolvida para SWV^{81,82}, em sistemas totalmente irreversíveis com processo controlado por adsorção das espécies, a intensidade de corrente varia linearmente com a frequência de aplicação dos pulsos. Este comportamento é observado na Figura 3.30, sendo que a corrente de pico varia linearmente com a frequência confirmando que o processo de oxidação do ciclamato de sódio sobre o eletrodo de BDD é irreversível.

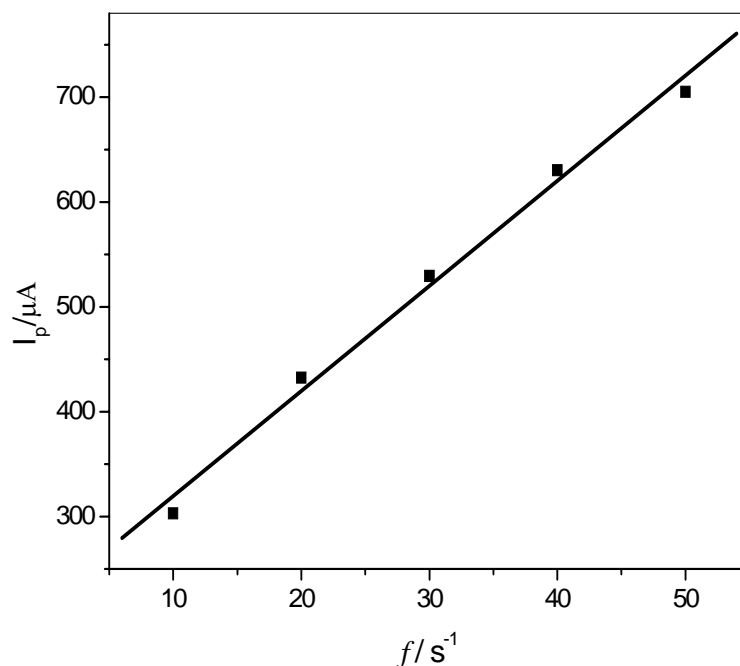


Figura 3.30 - Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos para o ciclamato de sódio (dados extraídos da Figura 3.29).

3.3.2.3. Efeito da Amplitude de Pulso de Potencial

Na Figura 3.31(A) estão apresentados os voltamogramas obtidos para o ciclamato de sódio em função da variação da amplitude de pulso de potencial. Observa-se que para valores menores que 40 mV, o aumento da intensidade de corrente é linear (Figura 3.31(B)). Adicionalmente, para amplitudes maiores os valores obtidos afastam-se da linearidade. Por isso a princípio optou-se por trabalhar com a amplitude de 40 mV. Porém, a curva analítica obtida para o ciclamato de sódio empregando este valor de amplitude não foi satisfatória, pois a reta obtida passava muito distante da origem. Este problema foi solucionado empregando-se menores valores de amplitude de pulso de potencial e neste caso o valor selecionado foi de 20 mV.

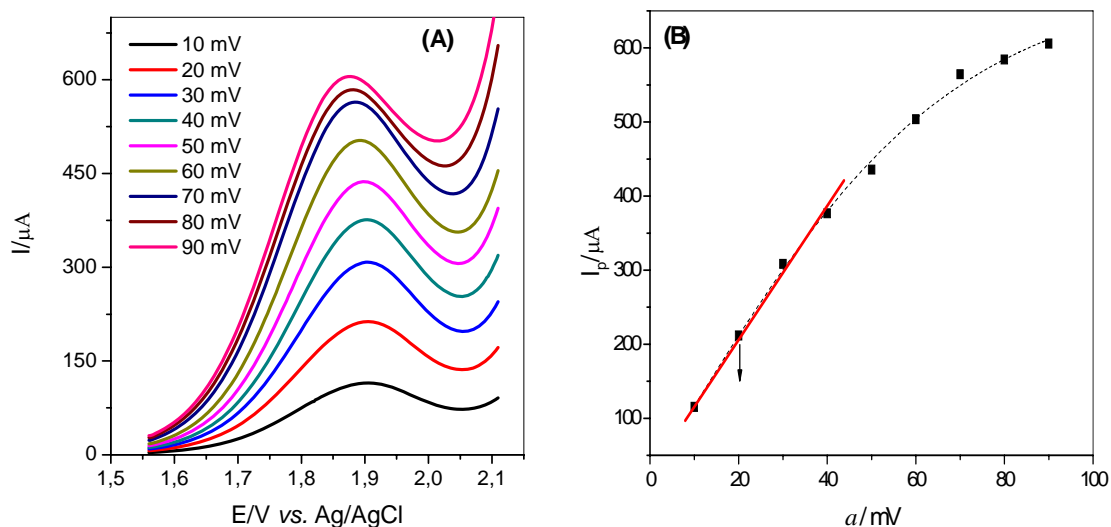


Figura 3.31 - (A) Influência da variação da amplitude do pulso de potencial nos voltamogramas do ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). (B) Dependência da corrente de pico com a variação de amplitude do pulso de potencial onda quadrada para o aspartame.

Um outro parâmetro otimizado para o desenvolvimento do procedimento analítico para a determinação do ciclamato de sódio foi o incremento de varredura (ΔE_s), que apresentou comportamento muito semelhante ao obtido para o aspartame (Figura 3.11). Sendo assim, o incremento de varredura de potencial empregado neste trabalho também foi de 2 mV.

3.3.2.4. Estudo de Repetibilidade e Reprodutibilidade

No estudo da repetibilidade do eletrodo de BDD para o ciclamato de sódio foram feitas 5 medidas sucessivas de uma solução de ciclamato de sódio na concentração de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, os voltamogramas estão apresentados na Figura 3.32, o desvio padrão relativo (RSD) obtido foi de 1,2 %. Já no estudo de reprodutibilidade, cujos voltamogramas estão na Figura 3.33, foram feitas medidas em 5 dias diferentes em soluções diferentes de ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para a reprodutibilidade o desvio padrão relativo obtido foi de 2,4 %.

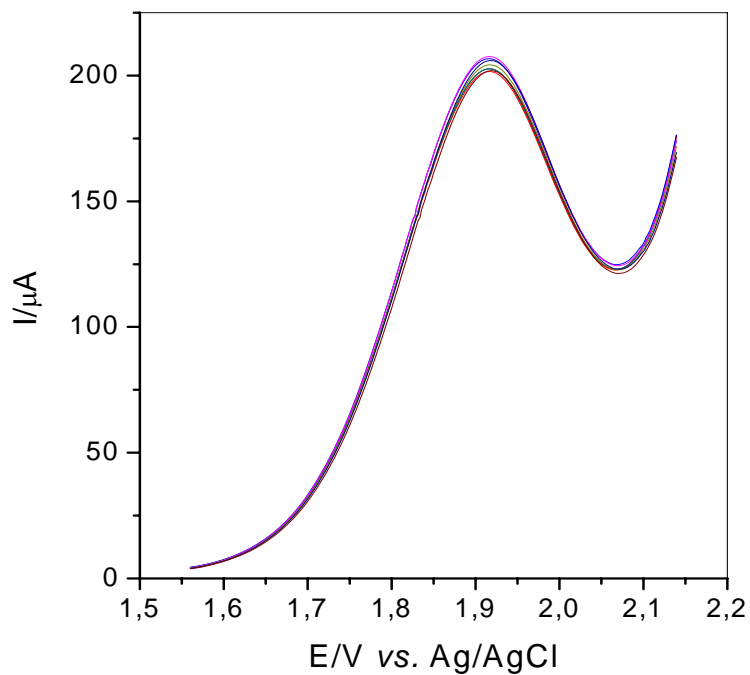


Figura 3.32 - Voltamogramas de onda quadrada para o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

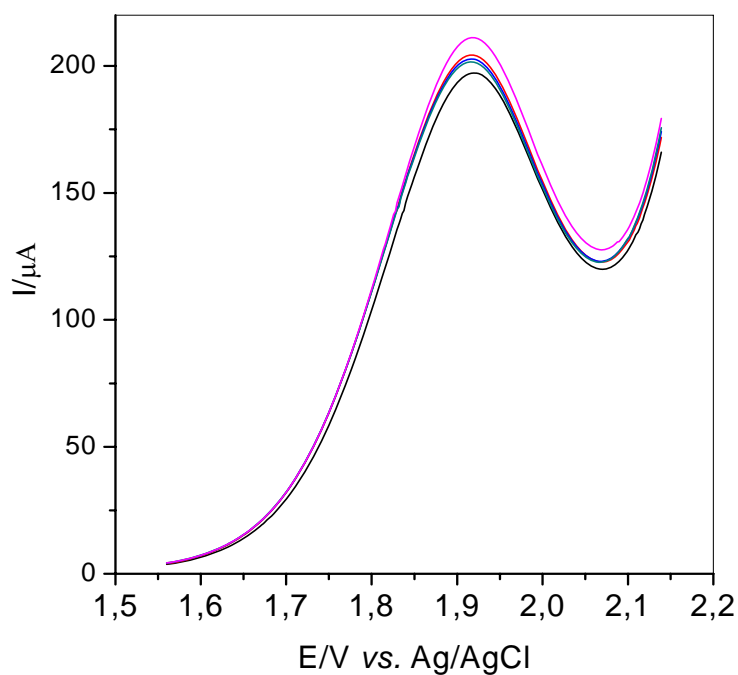


Figura 3.33 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos em dias diferentes para soluções de ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($n = 5$) ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

3.3.3. Construção da Curva Analítica

A curva analítica foi construída pela adição de alíquotas de 40 μL da solução padrão de ciclamato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em 10 mL de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na célula eletroquímica. A Figura 3.34 apresenta os voltamogramas obtidos para as diferentes concentrações de ciclamato de sódio que variaram de $5,0 \times 10^{-5}$ a $4,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A curva analítica obtida pode ser observada na Figura 3.35, o coeficiente de correlação obtido foi de 0,9992 e a equação da reta obtida foi:

$$(I_{pa} / \mu\text{A}) = 0,999 + 6,69 \times 10^4 [\text{Ciclamato de Sódio}] \text{ mol L}^{-1} \quad (11)$$

O limite de detecção foi calculado empregando-se a equação (7) e o valor obtido foi de $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

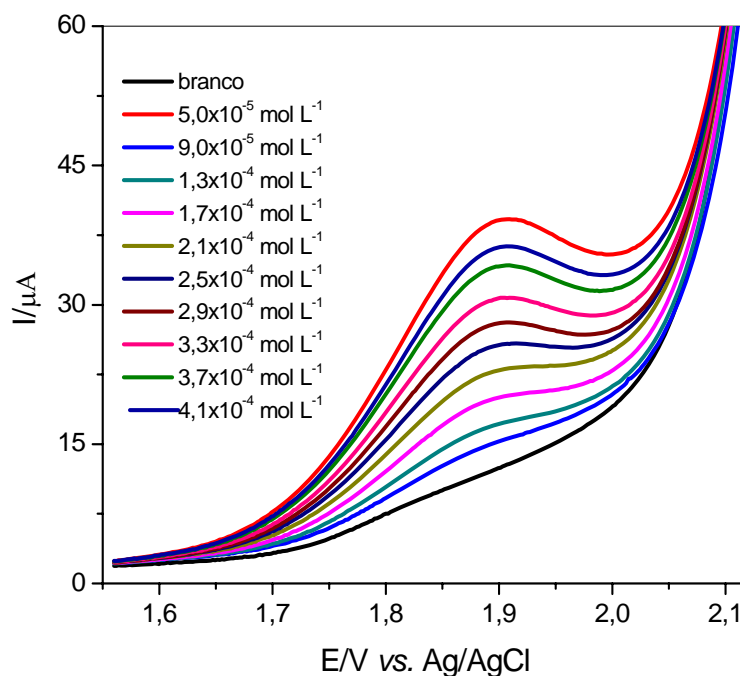


Figura 3.34 - Voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de ciclamato de sódio ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

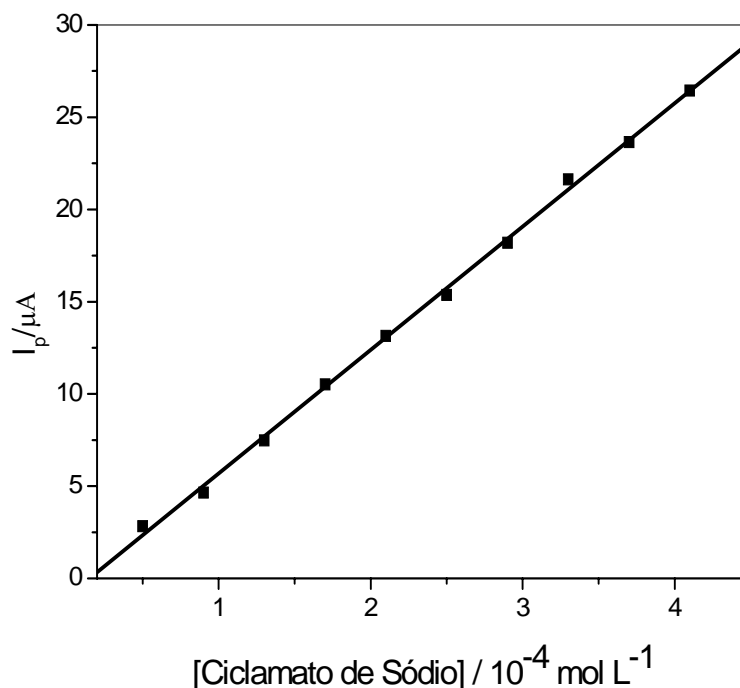


Figura 3.35 - Curva analítica obtida para o ciclamato de sódio.

3.3.4. Estudo de Interferentes em Potencial e Teste de Adição e Recuperação

As substâncias: acesulfame-K, sacarina, ácido cítrico, ácido ascórbico, sacarose, lactose, benzoato de sódio e os corantes amarelo crepúsculo, tartrazina e azul brilhante, também foram analisadas com possíveis interferentes na determinação do ciclamato de sódio. Os testes foram feitos pela adição destes concomitantes a solução de ciclamato de sódio na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados foram comparados com os resultados obtidos para as medidas feitas somente com a solução de ciclamato de sódio. Entre as substâncias que apresentaram eletroatividade frente ao eletrodo de BDD, apenas o acesulfame-K que também é um edulcorante, apresentou potencial de pico (2,0 V vs. Ag/AgCl) próximo ao potencial de pico do ciclamato de sódio (1,9 V vs. Ag/AgCl). Porém, a combinação destes edulcorantes não é muito empregada pelas indústrias alimentícias, e quando estes edulcorantes estão combinados em um produto dietético a proporção normalmente é muito diferente e o ciclamato

de sódio normalmente aparece em concentrações maiores. Pelos estudos realizados, em concentrações proporcionais, ciclamato de sódio/acesulfame-K (1/1), a interferência é de aproximadamente 5%. A Figura 3.36, mostra os voltamogramas obtidos para o ciclamato de sódio na ausência e na presença de acesulfame-K na concentração de 1/1. Sendo assim, o ciclamato de sódio pode ser quantificado em produtos dietéticos mesmo na presença do acesulfame-K desde que este esteja em concentrações menores que a do ciclamato de sódio, o que normalmente é encontrado nas composições dos produtos dietéticos.

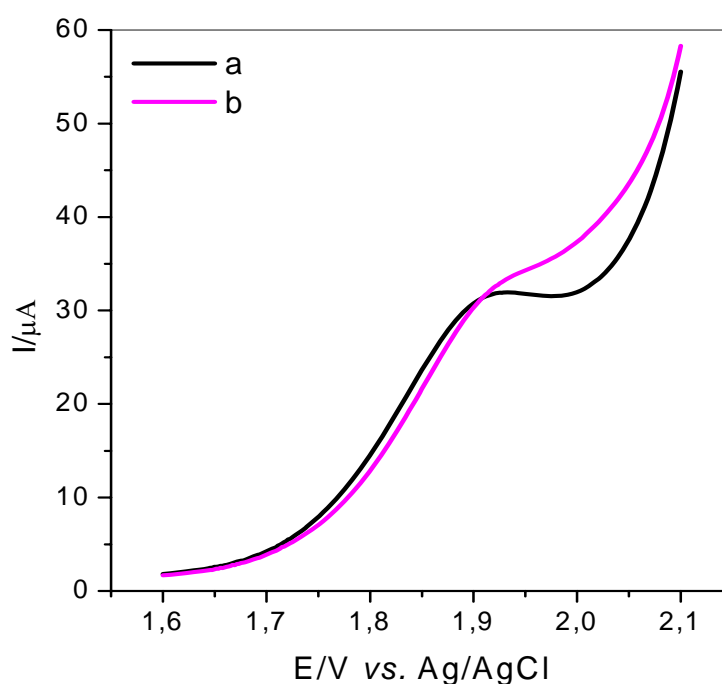


Figura 3.36 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ciclamato de sódio na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência (a) e na presença de acesulfame-K na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (b).

O estudo de adição e recuperação das substâncias em amostras de interesse foi realizado. Foram feitos experimentos em triplicatas por meio da adição de alíquotas de solução padrão de ciclamato de sódio às soluções das amostras dos produtos dietéticos: adoçantes de mesa (Zero Cal[®], Finn[®]); preparados sólidos para refrescos (Magro[®]) e refrigerantes de guaraná (Antarctica[®] e Kuat[®]).

A Tabela 3.3 apresenta os resultados de recuperação obtidos. Observa-se que as recuperações variaram entre 98,6% e 106,0%, indicando assim que a matriz de cada amostra não interfere na determinação de ciclamato de sódio pelo procedimento analítico desenvolvido.

Tabela 3.3. Estudo de adição e recuperação de ciclamato de sódio em amostras de produtos dietéticos

Amostras	Ciclamato de sódio /10 ⁻⁴ mol L ⁻¹		Recuperação/%
	Adicionado	Recuperado	
Zero Cal [®]	1,50	1,48	98,6
	2,00	1,98	99,0
	2,50	2,54	101,6
Finn [®]	1,50	1,57	104,7
	2,00	2,10	105,0
	2,50	2,60	104,0
Magro [®]	1,50	1,48	98,7
	2,00	2,12	106,0
	2,50	2,57	102,8
Guaraná	1,50	1,55	103,3
	2,00	2,11	105,0
Antarctica [®]	2,50	2,52	100,8
	1,50	1,54	102,0
Guaraná Kuat [®]	2,00	2,08	104,0
	2,50	2,63	105,2

(n=3)

3.3.5. Determinação de Ciclamato de Sódio em Amostras Comerciais e Validação do Procedimento Analítico por Comparação com Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para avaliar o desempenho do procedimento analítico desenvolvido, determinou-se o ciclamato de sódio em produtos dietéticos encontrados no comércio local. O método utilizado para a determinação de ciclamato de sódio foi o método de adição de padrão. A Figura 3.37 mostra os voltamogramas obtidos pelo método de adição de padrão para uma amostra de produto dietético.

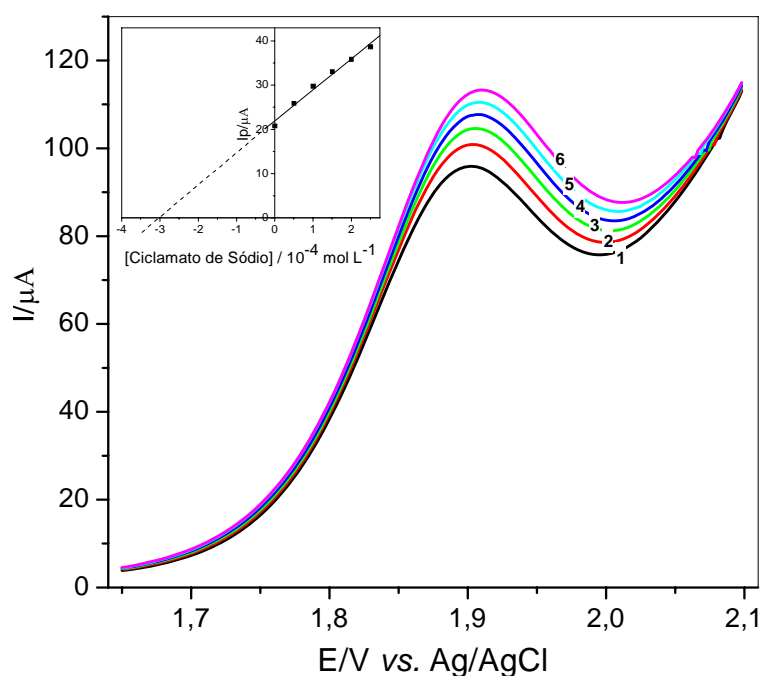


Figura 3.37 - SWV voltamogramas obtidos para a determinação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos (refrigerante de guaraná Antarctica[®]). (1) amostra Antarctica[®]; (2) amostra Antarctica[®] + $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (3) amostra Antarctica[®] + $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (4) amostra Antarctica[®] + $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (5) amostra Antarctica[®] + $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (6) amostra Antarctica[®] + $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de ciclamato de sódio.

A Tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos para todas as amostras de produtos dietéticos que foram analisadas.

Para avaliar o desempenho do procedimento eletroanalítico desenvolvido empregando a SWV e o eletrodo de BDD, foi adotado como método de referência para fins comparativos a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As condições cromatográficas foram empregadas de acordo com o que está descrito na parte experimental, nestas condições a molécula de ciclamato de sódio apresentou um tempo de retenção de 6 minutos. A Figura 3.38 mostra um cromatograma obtido para o ciclamato de sódio.

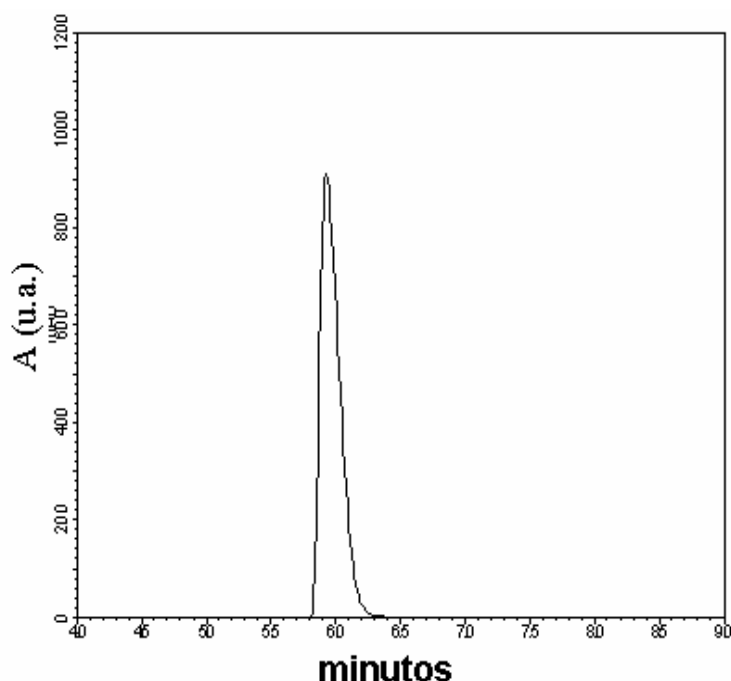


Figura 3.38 - Cromatograma típico para o ciclamato de sódio na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

A curva analítica obtida para o ciclamato de sódio no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ empregando HPLC está apresentado na Figura 3.39 e equação da curva analítica obtida foi:

$$A(u.a) = 131,7 + 236,4 \times 10^4 [\text{Aspartame}] \text{ mol L}^{-1}$$

com um coeficiente de correlação de 0,997.

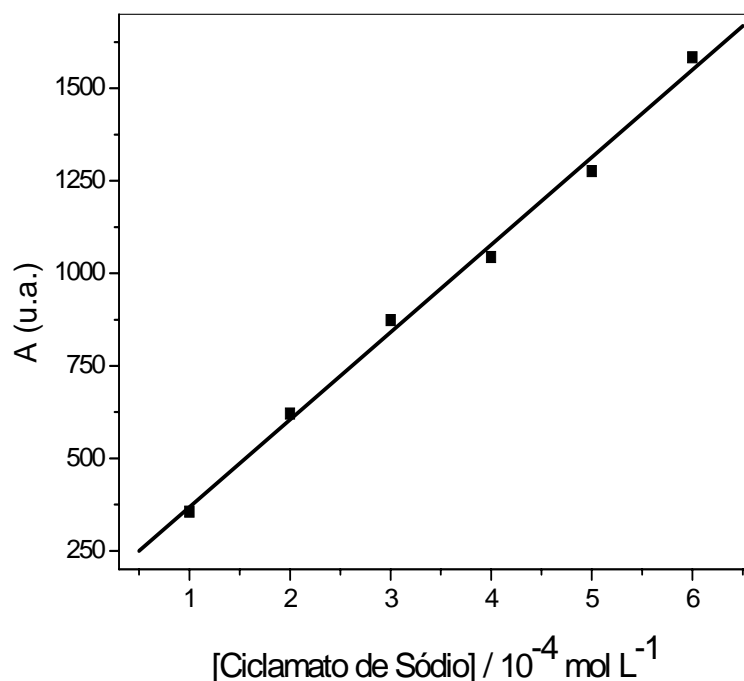


Figura 3.39 - Curva analítica obtida para o ciclamato de sódio empregando HPLC.

A Tabela 3.4 traz os resultados obtidos para a determinação do ciclamato de sódio em produtos dietéticos por HPLC e por SWV. Como pode ser observado os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de referência estão em concordância, indicando que o método proposto pode ser utilizado para a determinação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos. Os resultados obtidos pelos dois métodos (SWV e HPLC) também foram comparados aplicando-se o teste t pareado⁹³, ($t_{\text{exp}} = 1,93$; $t_{\text{crítico}} = 2,78$). Como o t_{exp} (1,93) obtido é menor que o $t_{\text{crítico}}$ (2,78) conclui-se que os resultados obtidos na determinação de ciclamato de sódio por SWV e HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95% e estão dentro de um erro relativo aceitável.

Tabela 3.4. Resultados obtidos na determinação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos analisados por HPLC e por SWV

Amostras	Ciclamato de sódio (mg/100mL)					
	Valor Rotulado	HPLC	SWV	Erro	Erro	
				Relativo (1) %	Relativo (2) %	
Adoçantes de mesa	Zero cal [®]	—	7.511±10	8.007±15	—	6,6
	Finn [®]	8.300	8.410±22	8.370±23	0,8	-0,5
Preparados sólidos para refrescos	Magro [®]	120	122±2	122±4	1,7	0
	Antarctica [®]	70	68±1	72±1	2,8	5,8
Refrigerante de guaraná	Kuat [®]	31,0	31,5±0,5	29,3±0,4	-5,5	-6,9

(n=3) Erro relativo (1) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor rotulado})/\text{valor rotulado}$
 Erro relativo (2) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor HPLC})/\text{valor HPLC}$

3.3.6. Número de Elétrons Envolvidos e Mecanismo de Oxidação do Ciclamato de Sódio

Neste trabalho foram realizados alguns estudos na tentativa de entender o processo de oxidação do ciclamato de sódio, assim como o número de elétrons envolvidos, e também tentar sugerir um possível mecanismo de oxidação para esta substância já que na literatura ainda não há nenhum mecanismo proposto de oxidação do ciclamato de sódio.

O efeito do pH sobre os potenciais de pico é um procedimento que pode fornecer informações sobre o número de elétrons envolvidos na reação redox. A Figura 3.40 mostra a relação entre E_p vs. pH, para uma solução de

ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ num intervalo de pH de 0,2 a 1,0. O potencial de pico diminuiu linearmente com o aumento do pH com uma tangente igual a $(dE/dpH) = - 57 \text{ mV/pH}$, correspondente de acordo com a equação (9), a uma transferência de um próton e um elétron por molécula de ciclamato de sódio oxidada.

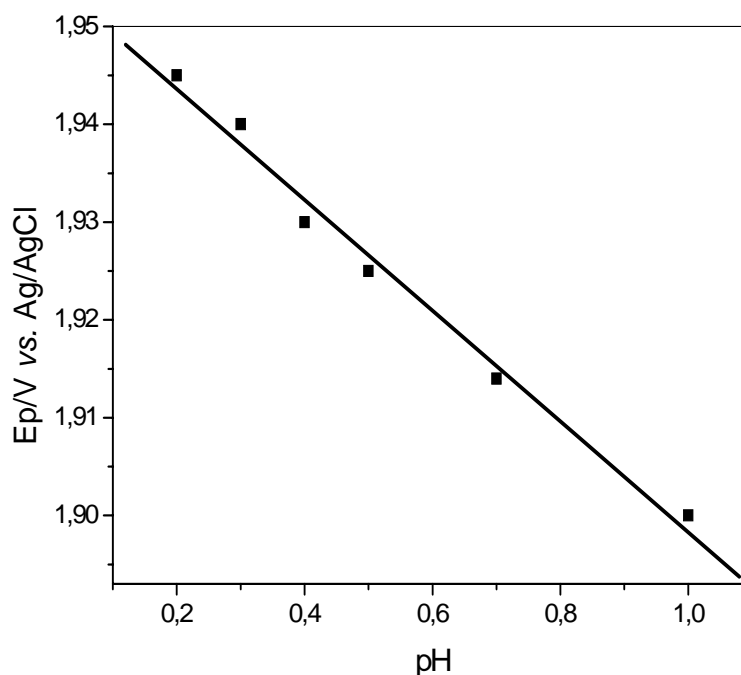


Figura 3.40 - Variação do potencial com o pH para o ciclamato de sódio.

Empregando-se a teoria desenvolvida para a SWV⁸¹ também foi possível prever o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do ciclamato de sódio. A Figura 3.41 apresenta o comportamento do potencial de pico em função do logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial para o ciclamato de sódio. Como pode ser observado, há um comportamento linear com uma inclinação da curva obtida de 0,096. Aplicando a equação (10), tem-se que αn é igual a 0,61. Considerando-se o coeficiente de transferência de carga igual a 0,5, que é o valor comumente utilizado para moléculas orgânicas, o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação do ciclamato de sódio é igual a 1.

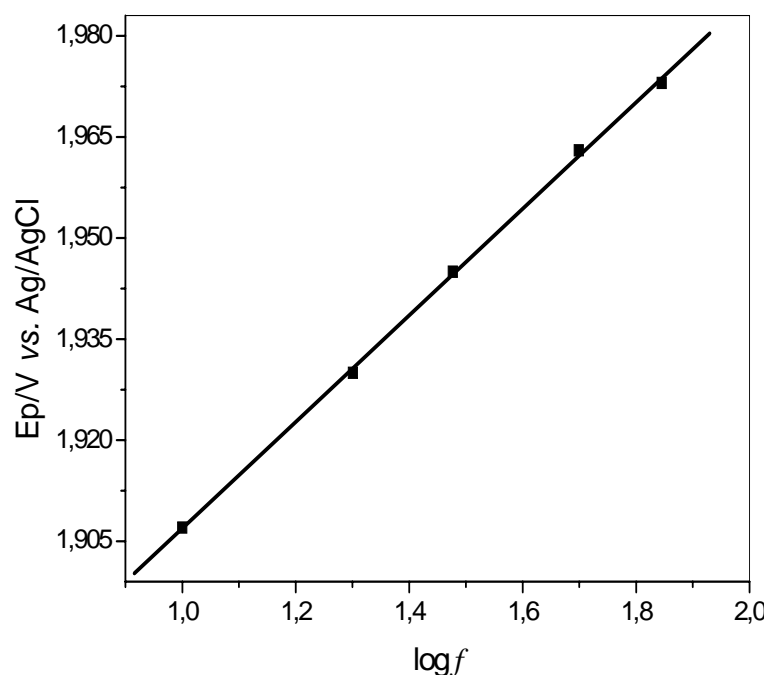
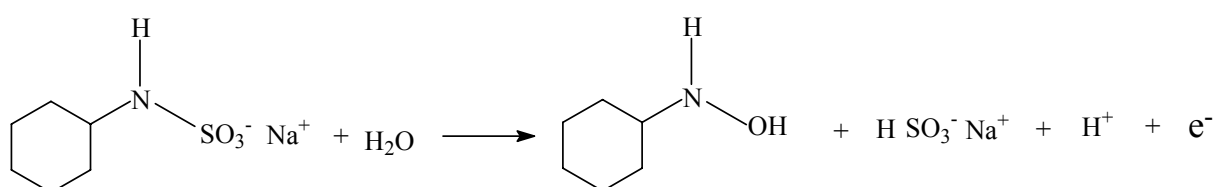


Figura 3.41 - Dependência do potencial de pico com o logaritmo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

Esses estudos indicam que, assim como para o aspartame, no processo de oxidação do ciclamato de sódio está envolvido apenas um elétron e, baseando-se em mecanismos de oxidação propostos na literatura para outras moléculas semelhantes à molécula do ciclamato de sódio, sugere-se que o ciclamato de sódio em meio ácido pode se oxidar formando uma hidroxilamina e liberando um elétron e um próton, como apresentado na equação (reação) abaixo. Porém, novos estudos devem ser realizados para confirmar este mecanismo de oxidação para o ciclamato de sódio.



3.4. Determinação Simultânea de Aspartame e Ciclamato de Sódio

O interesse em desenvolver um procedimento eletroanalítico para a determinação simultânea de edulcorantes, surge devido a fatores como: a utilização de combinações de edulcorantes pela indústria alimentícia, em que são empregados dois ou mais edulcorantes em um mesmo produto; e também, o método mais comumente utilizado para a determinação de edulcorantes, a cromatografia líquida de alta eficiência, possibilita a determinação simultânea de edulcorantes. Sendo assim, é interessante desenvolver um procedimento mais rápido e simples do que o HPLC, mas que também possibilite a determinação simultânea destes edulcorantes.

3.4.1. Voltametria de Onda Quadrada

A determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio foi investigada por voltametria de onda quadrada, uma vez que os potenciais de pico de oxidação do aspartame (1,6 V) e do ciclamato de sódio (1,9 V) são bem distintos. Após otimizar as melhores condições de trabalho para a determinação de aspartame e ciclamato de sódio separadamente, realizou-se as medidas voltamétricas de onda quadrada para determinação simultânea destes edulcorantes nas mesmas condições de trabalho, que estão apresentadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros da SWV selecionados para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio

Parâmetros	Valor selecionado
Frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) / s^{-1}	10
Amplitude de pulso de potencial (a) / mV	20
Incremento de varredura de potencial (ΔE_s) / mV	2,0

Na Figura 3.42 estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos no intervalo de potencial de 1,3 a 2,1 V, nos quais foram feitas adições sucessivas de aspartame em diferentes concentrações ($5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) mantendo a concentração de ciclamato de sódio constante em $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Observa-se que mesmo em concentração de até 100 vezes maior o ciclamato de sódio não interfere na quantificação do aspartame, cuja curva analítica obtida está inserida na Figura 3.42.

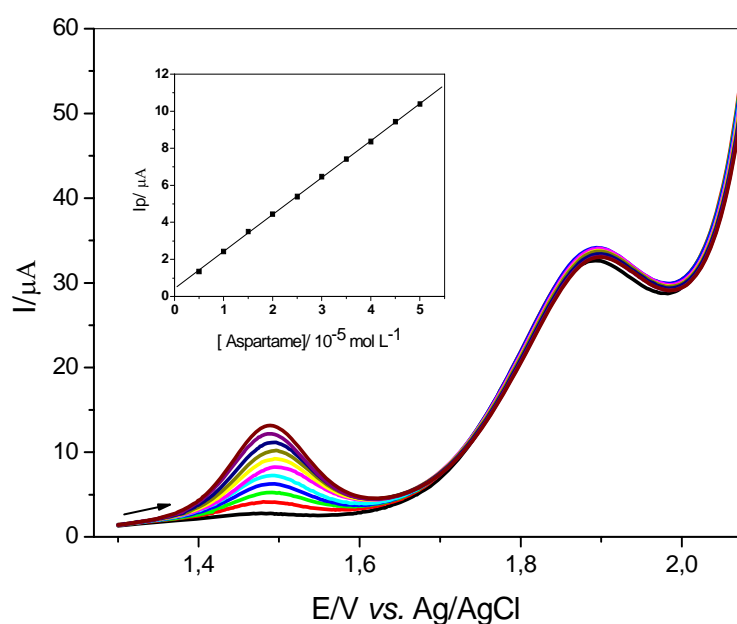


Figura 3.42 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o aspartame em diferentes concentrações ($5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), mantendo constante o ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Por outro lado, a Figura 3.43 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos neste mesmo intervalo de potencial, em que foram feitas adições sucessivas de ciclamato de sódio num intervalo de concentração entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, mantendo a concentração de aspartame constante em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Com pode ser observado o aspartame também não interfere na quantificação do ciclamato de sódio. A curva analítica obtida para o ciclamato de sódio está inserida na Figura 3.43.

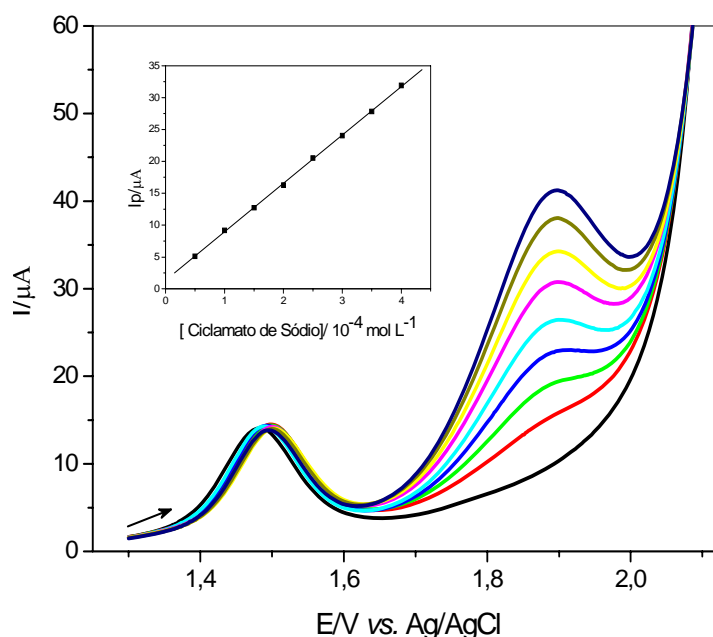


Figura 3.43 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o ciclamato de sódio em diferentes concentrações ($5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), mantendo constante o aspartame $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($f = 10$ s⁻¹, $a = 20$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV, H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹).

E por fim, realizaram-se medidas voltamétricas de onda quadrada no intervalo de potencial de 1,3 a 2,1 V, adicionando-se alíquotas sucessivas de 50 μL de solução padrão de aspartame $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, e 50 μL de solução padrão de ciclamato de sódio 0,01 mol L⁻¹, simultaneamente na célula eletroquímica contendo 10 mL de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹. A Figura 3.44 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando-se a concentração de aspartame de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a concentração de ciclamato de sódio de $5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As curvas analíticas construídas para o aspartame e para o ciclamato de sódio estão apresentadas na Figura 3.45 e, as equações da reta obtidas foram:

$$(I_{pa} / \mu A) = 1,36 + 2,65 \times 10^5 [\text{Aspartame}] \text{ mol L}^{-1}$$

$$(I_{pa} / \mu A) = 2,42 + 7,14 \times 10^4 [\text{Ciclamate de Sódio}] \text{ mol L}^{-1}$$

com coeficientes de correlação de 0,9991 e 0,9992, respectivamente.

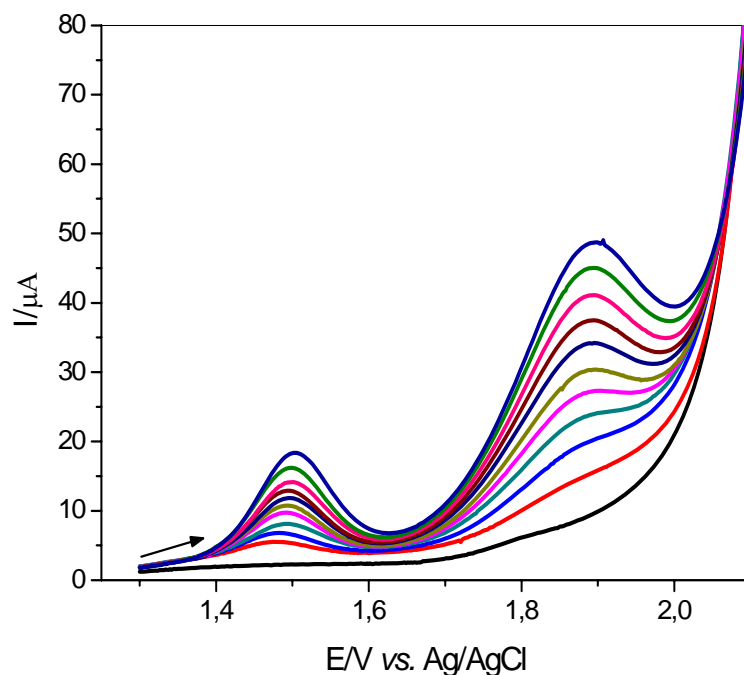


Figura 3.44 - Voltamogramas de onda quadrada para o aspartame e para o ciclamato de sódio em diferentes concentrações em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Concentrações: Aspartame – $5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, Ciclamato de sódio – $5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

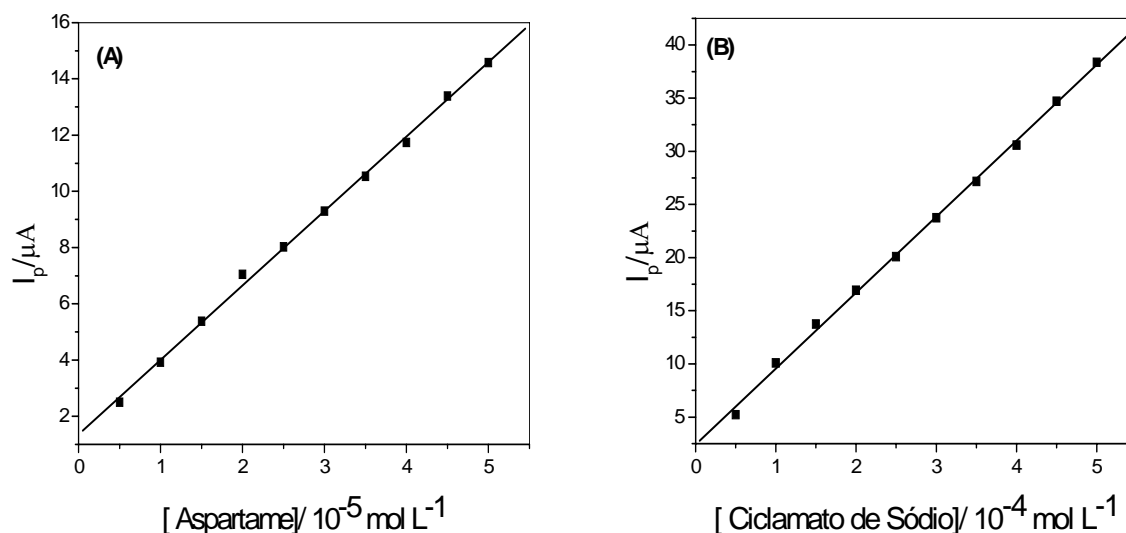


Figura 3.45 - (A) Curva analítica obtida para o aspartame.
(B) Curva analítica obtida para o ciclamato de sódio.

Os limites de detecção foram calculados pela equação (7), e os resultados obtidos foram $\text{LD} = 3,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o aspartame e $\text{LD} = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o ciclamato de sódio.

3.4.2. Estudo de Repetibilidade

A repetibilidade do eletrodo de BDD para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio foi estudada empregando soluções de aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Foram realizadas cinco medidas sucessivas dessas soluções e os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 3.46. O desvio padrão relativo obtido para o aspartame foi de 1,3 % e para o ciclamato de sódio foi de 1,1 %; estes valores indicam que o eletrodo de BDD apresentou boa repetibilidade.

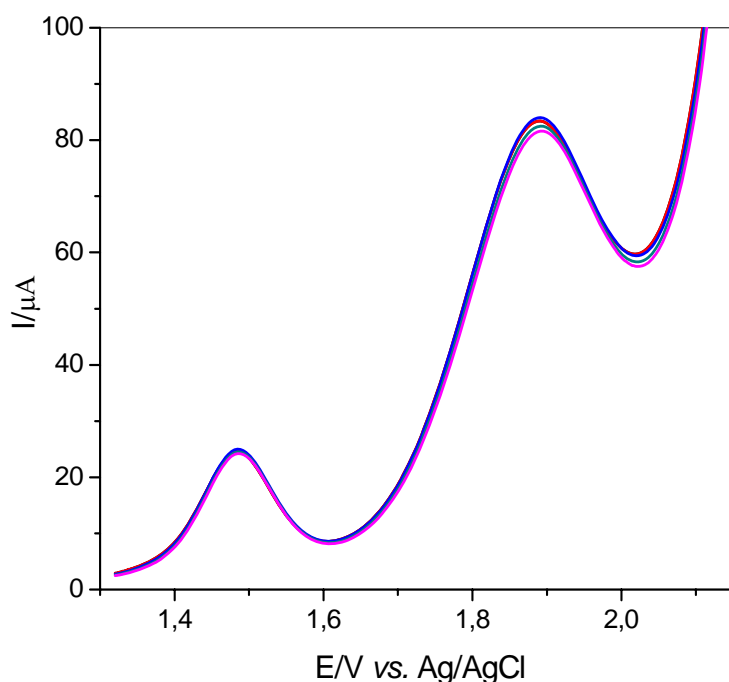


Figura 3.46 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o aspartame $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 10 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\text{H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

3.4.3. Estudo de Adição e Recuperação

As Tabelas 3.6 e 3.7 apresentam os resultados obtidos no estudo de adição e recuperação de aspartame e ciclamato de sódio, estes experimentos

foram realizados em triplicata para as amostras de preparado sólido para refresco (Magro[®]) e refrigerante de guaraná (Kuat[®]). Foram obtidas recuperações variando entre 100,0 e 106,0 % para o aspartame e entre 98,0 e 105,5 % para o ciclamato de sódio, indicando assim que não houve efeito de matriz nessas determinações voltamétricas.

Tabela 3.6. Estudo de adição e recuperação de aspartame em produtos dietéticos na determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio

Amostras	Aspartame /10 ⁻⁵ mol L ⁻¹		Recuperação/%
	Adicionado	Recuperado	
Suco Magro [®]	1,00	1,00	100,0
	2,00	2,05	102,5
	3,00	3,10	103,3
Guaraná Kuat [®]	1,00	1,03	103,0
	2,00	2,05	102,5
	3,00	3,18	106,0

(n=3)

Tabela 3.7. Estudo de adição e recuperação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos na determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio

Amostras	Ciclamato de sódio /10 ⁻⁴ mol L ⁻¹		Recuperação/%
	Adicionado	Recuperado	
Suco Magro [®]	1,00	1,05	105,0
	2,00	2,01	100,5
	3,00	3,07	102,3
Guaraná Kuat [®]	1,00	0,98	98,0
	2,00	2,11	105,5
	3,00	2,98	99,3

(n=3)

3.4.4. Determinação Simultânea de Aspartame e Ciclamato de Sódio em Amostras Comerciais e Validação do Procedimento Analítico por Comparação com Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos encontrados no comércio local foi empregado o método de adições múltiplas de padrão. As Figuras 3.47 e 3.48 mostram os voltamogramas obtidos para a determinação de aspartame e ciclamato de sódio na amostra de refrigerante de guaraná Kuat[®].

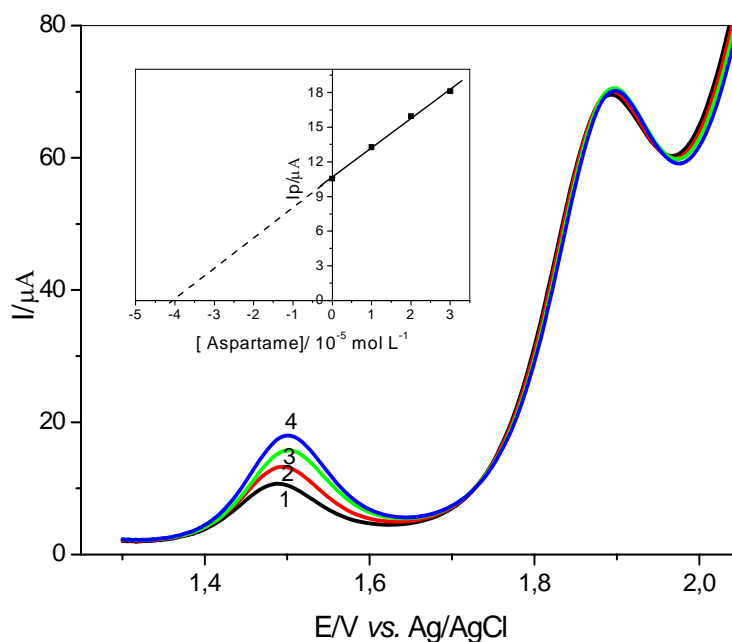


Figura 3.47 – SWV obtidos para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos (refrigerante de guaraná Kuat[®]). (1) amostra Kuat[®]; (2) amostra Kuat[®] + $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (3) amostra Kuat[®] + $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (4) amostra Kuat[®] + $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de aspartame.

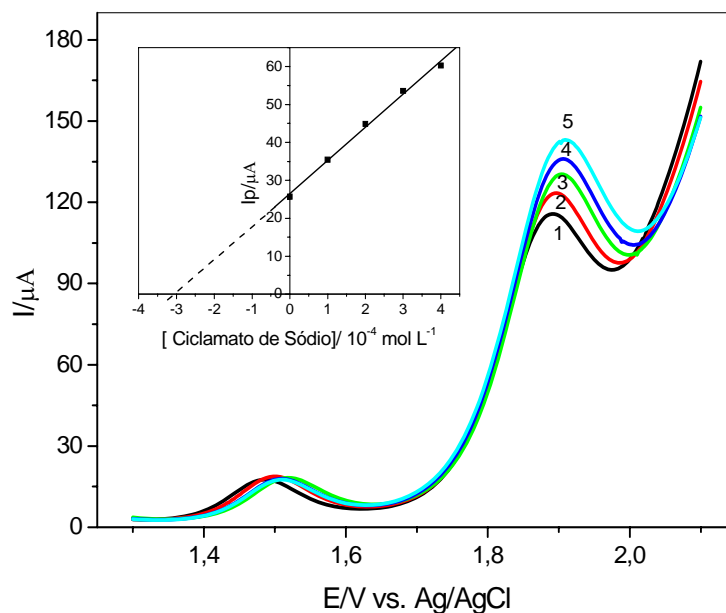


Figura 3.48 - SWV obtidos para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos (refrigerante de guaraná Kuat[®]). (1) amostra Kuat[®]; (2) amostra Kuat[®] + $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (3) amostra Kuat[®] + $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (4) amostra Kuat[®] + $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (5) amostra Kuat[®] + $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de solução padrão de ciclamato de sódio.

O procedimento desenvolvido se mostrou simples, rápido e eficiente podendo ser utilizado para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos contendo a combinação destes edulcorantes. As Tabelas 3.8 e 3.9 apresentam os resultados obtidos dos teores de aspartame e ciclamato de sódio determinados pelo procedimento voltamétrico e cromatográfico em todas as amostras de produtos dietéticos que foram analisadas.

Tabela 3.8. Resultados obtidos na determinação de aspartame em produtos dietéticos empregando-se HPLC e SWV

Amostras	Aspartame (mg/100mL)					
	Valor Rotulado	HPLC	SWV	Erro	Erro	
				Relativo (1) %	Relativo (2) %	
Preparado sólido para refresco	Magro [®]	6,8	6,6±0,2	6,5±0,3	-4,4	-1,5
Refrigerante de guaraná	Kuat [®]	12,0	11,8±0,2	12,4±0,4	3,3	5,1

(n=3) Erro relativo (1) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor rotulado})/\text{valor rotulado}$
 Erro relativo (2) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor HPLC})/\text{valor HPLC}$

Tabela 3.9. Resultados obtidos na determinação de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando-se HPLC e SWV

Amostras	Ciclamato de sódio (mg/100mL)					
	Valor Rotulado	HPLC	SWV	Erro	Erro	
				Relativo (1) %	Relativo (2) %	
Preparado sólido para refresco	Magro [®]	120	122±5	123±3	2,5	0,82
Refrigerante de Guaraná	Kuat [®]	31,0	31,5±0,3	30,6±0,2	-1,3	-2,8

(n=3) Erro relativo (1) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor rotulado})/\text{valor rotulado}$
 Erro relativo (2) % = $100 \times (\text{valor voltamétrico} - \text{valor HPLC})/\text{valor HPLC}$

O que pode ser observado é que resultados obtidos por SWV estão em concordância com os resultados obtidos por HPLC. Aplicou-se o teste *t - pareado* para os resultados obtidos empregando-se o procedimento proposto e o procedimento de referência. Para o aspartame o $t_{\text{exp}} = 2,51$ e para o ciclamato

de sódio o $t_{\text{exp}} = 2,54$, ambos os valores são menores que o $t_{\text{crítico}} = 2,57$, portanto, os resultados da determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio obtidos pelo procedimento proposto empregando SWV e pelo procedimento de referência empregando HPLC não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95 % e estão dentro de um erro relativo aceitável.

Capítulo 4 - CONCLUSÃO

4. CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho de mestrado evidenciaram a viabilidade do emprego do eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação de aspartame e ciclamato de sódio em diferentes amostras utilizando a voltametria de onda quadrada.

O eletrodo de diamante dopado com boro apresentou melhor resposta voltamétrica depois de passar por um pré-tratamento catódico, no qual se aplica ao eletrodo uma corrente de -0,72 A por 60 s.

Os melhores resultados analíticos para o aspartame, foram obtidos em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, com frequência de aplicação dos pulsos de 10 s⁻¹, amplitude de pulso de potencial de 40 mV e incremento de varredura de potencial de 2 mV. Nestas condições, o aspartame apresentou somente um pico de oxidação em 1,6 V vs. Ag/AgCl, com características de um processo irreversível e controlado por adsorção das espécies à superfície eletródica. A curva analítica foi linear no intervalo de concentração de aspartame de 9,9 x 10⁻⁶ a 5,2 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ ((I_{pa} / μA) = 0,301 + 2,18 × 10⁵ [Aspartame] mol L⁻¹, r = 0,9998) com um limite de detecção de 2,3 x 10⁻⁷ mol L⁻¹. O desvio padrão relativo de 5 determinações sucessivas de aspartame 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ foi de 0,17 % e o desvio padrão relativo de 5 determinações de aspartame 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em dias diferentes e em soluções de aspartame diferentes foi de 2,8 %. Os resultados obtidos para a determinação de aspartame em produtos dietéticos utilizando-se o procedimento proposto estão em boa concordância com os resultados obtidos empregando-se o método de referência, a um nível de confiança de 95 %. Este procedimento apresentou boa sensibilidade e dispensou qualquer tratamento prévio das amostras.

No procedimento para a determinação do ciclamato de sódio foram utilizadas as seguintes condições: o eletrólito suporte foi o ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, frequência de aplicação dos pulsos de potencial de 10 s⁻¹, amplitude de pulso de potencial de 20 mV e incremento de varredura de 2 mV. O ciclamato

de sódio apresentou um único pico no sentido anódico em 1,9 V, com características de um processo irreversível. A curva analítica foi obtida num intervalo de concentração entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $4,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $4,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ((I_{pa} / μA) = 0,999 + $6,69 \times 10^4$ [Ciclamato de Sódio] mol L⁻¹, r = 0,9992). No estudo de adição e recuperação, foram obtidas recuperações entre 96,8 % e 106,0 % , indicando que não houve interferência das matrizes das amostras na determinação do ciclamato de sódio. Para o estudo de repetibilidade onde foram feitas 5 determinações sucessivas de ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, o desvio padrão relativo obtido de 1,2 % e para o estudo de reprodutibilidade o desvio padrão relativo foi de 2,4 %. Os resultados obtidos para a determinação de ciclamato de sódio em amostras de produtos dietéticos utilizando-se o procedimento proposto estão em concordância com os resultados obtidos pelo método de referência a um nível de confiança de 95 %. O procedimento desenvolvido para a determinação de ciclamato de sódio também apresentou boa sensibilidade e não foi necessário qualquer pré-tratamento das amostras analisadas.

O eletrodo de BDD também apresentou excelente resposta voltamétrica na determinação simultânea dos edulcorantes, aspartame e ciclamato de sódio, por voltametria de onda quadrada. Empregando as melhores condições já estudadas para os edulcorantes separadamente, desenvolveu-se um procedimento analítico para a determinação simultânea de aspartame e ciclamato de sódio já que seus potenciais de pico são bem distintos, 1,6 V e 1,9 V, respectivamente. As curvas analíticas foram lineares no intervalo de concentração de aspartame de $5,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e de ciclamato de sódio de $5,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com limites de detecção de $3,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $4,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente. O desvio padrão relativo obtido para 5 determinações sucessivas e simultâneas de aspartame $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e ciclamato de sódio $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi de 1,1 %. O procedimento desenvolvido também foi utilizado para determinações simultâneas em amostras

comerciais de produtos dietéticos, e os resultados obtidos também estão em concordância com os resultados obtidos pelo procedimento de referência, a um nível de confiança de 95 %.

Diante dos resultados expostos, acredita-se no sucesso da utilização do eletrodo de BDD aliado a SWV para a determinação dos edulcorantes, aspartame e ciclamato de sódio em produtos dietéticos. Levando ainda em consideração que o procedimento proposto apresenta algumas vantagens sobre o método padrão (HPLC) como, por exemplo, baixo custo, menor tempo de análise e dispensa de qualquer tratamento prévio das amostras.

Capítulo 5 – ATIVIDADES FUTURAS

5. ATIVIDADES FUTURAS

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

Estudar as potencialidades e limitações do eletrodo de diamante dopado com boro nas determinações eletroanalíticas de outros adoçantes artificiais e naturais, como acesulfame-K, steviosídeo, sucralose, frutose e lactose.

Desenvolver procedimentos eletroanalíticos para a determinação destes adoçantes em produtos alimentícios empregando a técnica voltamétrica mais adequadas para cada analito.

Adaptação do eletrodo de BDD em sistemas de análise por injeção em fluxo para determinação destes analitos de interesse, visando obter maior velocidade analítica.

Capítulo 6 - REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; GOUVEIA, S. T.; CALAFATTI, S. A.; SANTOS, G. A. J. M. Adoçantes artificiais. *Química Nova*; Vol.19; 248-257; 1996.
2. PINHEIRO, M. V.; OLIVEIRA, M. N.; PENNA, A. L. B.; TAMINE, A. Y. The effect of different sweeteners in low-calorie yogurts – a review. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 4, 193-199, 2005.
3. OLIVA, R. Considerações sobre o uso do edulcorante aspartame em alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>. Acesso em: 07/03/2007.
4. CHAPMAN, D. G. Food additives. *Canada Journal Publication of Health*. Vol. 61, 391-395, 1991.
5. VETSCH, W. Aspartame: technical considerations and predicted use. *Food Chemistry*, Vol. 16, 245-258, 1985.
6. HANGER, L. Y.; LOTZ, A.; LEPENIOTIS, S. Descriptive profiles of selected high intensity sweeteners (HIS), HIS blends, and sucrose. *Journal of Food Science*, Vol. 61, 456-458, 1996.
7. MATYSIAK, N. L.; NOBLE, A. C. Comparison of temporal perception of fruitiness in model systems sweetened with aspartame, an aspartame + acesulfame K blend, or sucrose. *Journal of Food Science*, Vol. 56, 823-826, 1991.
8. Adoçantes. Mocinhos ou bandidos? Disponível em: http://acd.ufrj.br/consumo/leituras/id_bebaleite020322.htm. Acesso em: 3/10/2005.
9. BAR, A. Toothfriendly: achievements after 10 years and further prospects, in: sugarless -towards the year 2000. *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 1-15, 1994.
10. O'BRIEN, L.; GELARDI, R. C. Alternative sweeteners. *Chemtech*, may, 274-278, 1981.
11. YAN, Z.; YINGYING, G.; MINGLI, Y.; FRITS, J. S. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages

-
- by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*; Vol. 1085: 143-146; 2005.
12. GARNIER-SAGNE, I.; LEBLANC, J. C.; VERGER, P. H. Calculation of the intake of three intense sweeteners in young insulin-dependent diabetic. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 39, 745-749, 2001.
13. HOMLER, B. E. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, Vol. 38, 50-55, 1984.
14. CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos para fins especiais: Dietéticos. São Paulo: Varela, 1996.
15. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação espectrofotométrica de aspartame em produtos dietéticos usando ninidrina como reagente. *Química Nova*, Vol. 18, 250-254, 1995.
16. GIBBS, B. F.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its metabolites in foods, *Journal of Chromatography A*; Vol. 725, 372-377, 1996.
17. BUTCHKO, H. H. et al. Aspartame: review of safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 35, S1-S93, 2002.
18. ODACI, D.; TIMUR, S.; TELEFONEU, A. Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination. *Food Chemistry*, Vol. 84, 493-496, 2004.
19. BASTIN, S. Nonnutritive sweeteners. State food and nutrition specialist. Disponível em: <<http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/fcs3/fcs3105/fcs3105.pdf>> Acesso: 18 jul.2006.
20. DI PIETRA, A. M.; CAVRINI, V.; BONAZZI, D.; BENFENATI, L. HPLC Analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations, *Chromatographia*, Vol. 30, 215-219, 1990.
21. DELANEY, M. F.; PASKO, K. M.; GSELI, D. S.; KOROLOGOS, P. C. Determination of aspartame, caffeine, saccharin and benzoic acid in beverages by high performance liquid chromatography. *Journal of Chemical Education*, Vol. 62, 618-620, 1985.
22. DEMIRALAY, E. Ç.; OZKAN, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. Isocratic of some food Additives by reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, Vol. 63, 91-96, 2006.

-
23. DEMIRALAY, E. Ç.; OZKAN, G. Optimization strategy for isocratic separation of *a*-aspartame and its breakdown products by reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, Vol. 60, 579-582, 2004.
 24. TYLER, T. A. Liquid-chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame, and sodium benzoate in cola beverages. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Vol.67, 745-747, 1984.
 25. VERZELLA, G.; BAGNASCO, G.; MANGIA, A. Ion-pair high-performance liquid-chromatographic analysis of aspartame and related products. *Journal chromatography*, Vol. 349, 83-89, 1985.
 26. GALLETTI, G. C.; CHIAVARI, G.; BOCCHINI, P. Thermal decomposition products of aspartame as determined by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, Vol. 32, 137-151, 1995.
 27. FURDA, I.; MALIZIA, M. G.; VERNIERI, P. J. Decomposition products of L-aspartyl-L-phenylalanine methyl-ester and their identification by gas-liquid-chromatography. *Journal Food Chimica Acta*, Vol. 23, 340-343, 1975.
 28. WALKER, J. C.; ZAUGG, S. E.; WALKER, E. B. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *Journal chromatography A*, Vol. 781, 481-485, 1997.
 29. PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 781, 423-428, 1997.
 30. FATIBELLO-FILHO, O.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; PEREIRA, A. P. Solid-phase reactor with copper (II) phosphate for flow-injection spectrophotometric determination of aspartame in tabletop sweeteners sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. *Analytical Chimica Acta*, Vol. 384, 167-174, 1999.
 31. VESELY, Z.; DÁVIDKOVÁ, E.; PRUDEL, M. Determination of alpha-L-aspartyl-L-phenylalanine methylester hydrochloride in soft drinks. *Die nahrung*, Vol. 24, 525-528, 1980.
 32. PRASAD, U.V.; DIVAKAR, T. E.; SASTRY, C. S. P. New methods for the determination of aspartame. *Food Chemistry*, Vol. 28, 269-278, 1988.

-
33. VILLARTA, R. L.; SULEIMAN, A. A.; GUILBAULT, G. G. Amperometric enzyme electrode for the determination of aspartame in diet food. *Microchemical Journal*, Vol. 48, 60-64, 1993.
 34. CHOU, S. F. Amperometric biosensor for the determination of the artificial sweetener aspartame with an immobilized bienzyme system. *Biosensor Bioelectronics*, Vol. 11, 71-73, 1996.
 35. ODACI, D.; TIMUR, S.; TELEFONEU, A. Carboxyl esterase-alcohol oxidase based biosensor for the aspartame determination. *Food Chemistry*, Vol. 84, 493-496, 2004.
 36. COMPAGNONE, D.; O'SULLIVAN, D.; GUILBAULT, G. G. Amperometric bienzymic sensor for aspartame. *The Analyst*, Vol. 122, 487-490, 1997.
 37. KIRGOZ, U. A.; 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. *Analytical Chimica Acta*, Vol. 570, 165-169, 2006.
 38. MALAKI, E. A.; KOUPPARIS, M. A. Determination of amino acid based on monitoring their reaction with dinitrofluorobenzene using a fluoride-selective electrode. *Analyst*, Vol. 112, 757, 1987.
 39. CAMPANELLA, L.; ATURKI, Z.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETTI, M. Aspartate analysis in formulations using a new enzyme sensor. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, Vol. 13, 439-447, 1995.
 40. FATIBELLO-FILHO, O.; SULEIMAN, A. A.; GUILBAULT, G. G.; LUBRANO, G. J. Bienzymatic electrodes for the determination of aspartame in dietary products. *Analytical Chemistry*, Vol. 60, 2397-2399, 1988.
 41. AHMED, F. E.; THOMAS, D. B. Assessment of the carcinogenicity of the nonnutritive sweetener cyclamate. *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 22, 81-118, 1992.
 42. ZENÉN, E.; CANDEBAT, V.; ROCHÉ, M. O. G. Acción, uso, análisis y toxicidad de los edulcorantes sintéticos de empleo actual y potencial en Cuba. *Alimentaria*, Julio/Agosto, 47-52, 1985.

-
43. KROES, R.; PETERS, P. W. J.; BERKVEN, J. M.; VERSCHUUREN, H. G.; DE VRIES, T. H.; VAN ESCH, G.J. Long-term toxicity and reproduction study (including a teratogenicity study) with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine. *Toxicology*, Vol. 8, 285-300, 1977.
 44. CASTRO, S. A. C. Determinação biométrica de ciclamato em produtos dietéticos. São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 1994. Dissertação de mestrado, 85p.
 45. HOO, D.; HU, C. Quantitative conversion of cyclamate to N,N-dichlorocyclohexylamine, and ultraviolet spectrophotometric assay of cyclamate in food. *Analytical Chemistry*, Vol. 44, 2111 – 2113, 1972.
 46. ROCHA, F. R. P.; RODENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; GUARDIA, M. A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 547, 204–208, 2005.
 47. CABERO, C.; SAURINA, J.; HERNANDEZ-CASSOU, S. Flow-injection spectrophotometric determination of cyclamate in sweetener products with sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 381, 307-313, 1999.
 48. LAWRENCE, J. Use of post-column ion-pair extraction with absorbance detection for the liquid chromatographic determination of cyclamate and other artificial sweeteners in diet beverages. *Analyst*, Vol. 112, 879-881, 1987.
 49. HUANG, Z.; MA, J.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; YAO, S. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 555, 233-237, 2006.
 50. CHOI, M. M. F.; HSU, M. Y.; WONG, S. L. Determination of cyclamate in low-calorie foods by high-performance liquid chromatography with indirect visible photometry. *Analyst*, Vol. 125, 217-220, 2000.
 51. PRANDO, J.; PRADO, M. A. Determinação de edulcorantes artificiais em alimentos por CLAE. XIV Congresso Interno de Iniciação Científica Unicamp, Campinas, 2006.
 52. CASALS, I.; REIXACH, M.; AMAT, J.; FUENTES, M.; SERRA-MAJEM, L. Quantification of cyclamate and cyclohexylamine in urine samples using

-
- high-performance liquid chromatography with trinitrobenzenesulfonic acid pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, Vol. 750, 397-402, (1996).
53. RICHARDSON, M. L.; LUTON, P. E. The determination of cyclamate in soft drinks by titration with sodium nitrite. *Analyst*, Vol. 91, 522, 1966.
54. FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D.; CALAFATTI, S. A. Biamperometric titration and flow injection determination of cyclamate in low-calorie products. *Analyst*. Vol. 120, 2407, 1995.
55. 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*, Vol. 12, 786-790, 2000.
56. FERRO, S. Synthesis of diamond. *Journal of Materials Chemistry*. Vol. 12, 2843-2855, 2002.
57. BARROS, R. C. M.; RIBEIRO, M. C.; AN-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de Diamante CVD Dopado com Boro. Parte I. Histórico, Produção e Caracterização, *Química Nova*, Vol. 28, 317-325, 2005.
58. ALFARO, M. A. Q.; FERRO, S.; HUITLE, C. A. M.; VONG, M. Y. Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment. *Journal of Brazilian Chemical Society*, Vol. 17, 227-236, 2000.
59. ANGUS, J. C. Synthetic diamond: emerging CVD science and technology, Spear, K. E., Dismukes J. P., eds. John Wiley & Sons: New York, cap.2, 1994.
60. PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Application of diamond electrodes to electrochemical processes. *Electrochimica Acta*, Vol. 51, 191-199, 2005.
61. PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of diamond: a review. *Russian Journal of Electrochemistry*; Vol. 38, 1411-1429; 2002.
62. MENDES DE BARROS, R. C.; CORAT, E. J.; TRAVA-AIROLDO, V. J.; FERREIRA, N. G.; LEITE, N. F.; ILHA, K. Mass spectrometry and diamond growth from CCl₄/H₂ gas mixtures. *Diamond and Related Materials*, Vol. 6, 490-493, (1997).

-
63. FERREIRA, N. G.; CORAT, E. J.; TRAVA-AIROLDO, V. J.; LEITE, N. F.; DEL BOSCO, E. Evidence of enhanced atomic hydrogen production with halogens in diamond MWPACVD. *Diamond and Related Materials*, Vol. 7, 81-87, 1998.
64. PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 55, 1045-1050, 2000.
65. PEDROSA, V. A. Estudos das potencialidades do eletrodo de diamante nas determinações eletroanalíticas de pesticidas e compostos correlatos. São Carlos, programa de Pós-Graduação em Química – USP, 2005 Tese de doutorado, 131p.
66. FERREIRA, N. G.; SILVA, L. L. G.; CORAT, E. J.; TRAVA-AIROLDI, V. J., ILHA, K. Electrochemical characterization on semiconductors p-type CVD diamond electrodes. *Brazilian Journal of Physics*. Vol. 29, 760-763, 1999.
67. FERREIRA, N. G., SILVA, L. L. G.; CORAT, E. J. Electrochemical activity of Boron-Doped Diamond electrodes grown on carbon fiber cloths. *Diamond and Related Materials*. Vol 11, 657-661, 2002.
68. HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOTTER, J.; CVAKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diamond and Related Materials*. Vol. 12, 1940-1949; 2003.
69. ZHANG, J. D.; OYAMA, M. Electroanalysis of mioglobina and hemoglobina with a boron doped diamond electrode. *Microchemical Journal*, Vol. 78, 217-222, 2004.
70. ZHAO, G.; QI, Y.; TIAN, Y. Simultaneous and direct determination of tryptophan and tyrosine at boron doped diamond electrode. *Electroanalysis*. Vol. 18, 830-834, 2006.
71. PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Eletroanalytical determination of 4-nitrofenol by square wave voltammetry on diamond electrodes. *Journal of Brazilian Chemical Society*, Vol. 14, 530-535, 2003.
72. PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. *Química Nova*, Vol. 26, 844-849, 2003.

-
73. SIANGPROH, W.; NGAMUKOT, P.; CHAILAPAKUL, O. Electrochemical determination of captopril at boron-doped thin film electrode applied to flow injection system. *Sensors and Actuators B*. Vol. 91, 60-66, 2003.
74. FUJISHIMA, A.; RAO, T. N.; POPA, E.; SARADA, B. V.; YAGI, I.; TRYK, D. A. Electroanalysis of dopamina and NADH at conductive diamond electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 473, 179-185, 1999.
75. POPA, E.; KUBOTA, Y.; TRYK, D. A.; FUJISYMA, A. Selective voltammetric and detection of uric acid with oxidized film electrodes. *Analytical Chemistry*. Vol. 72, 1724-1727, 2000.
76. KOPPANG, M. D.; WITEK, M.; BLAU, J.; SWAIN, G. M. Electrochemical oxidation of polyamines at diamond thin-film electrodes. *Analytical Chemistry*. Vol. 71, 1188-1195, 1999.
77. SARADA, B. V.; RAO, T. N.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. *Analytical Chemistry*. Vol. 72, 1632-1638, 2000.
78. BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Electroquímica: princípios, métodos e aplicações. *Oxford University Press Inc.*, New York, 1993, p.241.
79. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & NIEMAN, T. A. "Princípios de Análise Instrumental". 5ª edição. *Editora Bookman*, 2002, cap. 25.
80. MABBOTT, G. A. An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, Vol. 60, 697-706, 1983.
81. SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, Vol. 26, 81-89, 2003.
82. OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*. Vol 57, 101A. – 110A, 1985.
83. RAMALEY, L.; KRAUSE, Jr. M. S. Analytical application of square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*. Vol. 41, 1365-1369, 1969.
84. RAMALEY, L.; KRAUSE Jr. M. S. Theory of Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*. Vol. 41, 1362-1365, 1969.

-
85. CHRISTIE, J. H.; TURNER, J. A.; OSTERYOUNG, R. A. Square Wave Voltammetry at the Dropping Mercury Electrode: Theory *Analytical Chemistry*. Vol. 49, 1899-1903, 1977.
86. CHRISTIE, J. H.; TURNER, J. A.; OSTERYOUNG, R. A. Square wave voltammetry at the dropping mercury Electrode: Experimental. *Analytical Chemistry*. Vol. 49, 1904-1908, 1977.
87. SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. *Química Nova*, Vol. 27, 790-797, 2004.
88. LOVRIC, M.; BRANICA, M. Square-wave voltammetry peak current enhancements by adsorption and reversibility of the redox reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 226, 239-245, 1987.
89. LOVRIC, M.; KOMORSKY-LOVRIC, S. Square wave voltammetry of an adsorbed reactant. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 248, 239-253, 1988.
90. O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, R. A.; OSTERYOUNG, J. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. *Analytical Chemistry*, Vol. 53, 695-701, 1981.
91. 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. *Electrochimica Acta*, Vol.49, 4021- 4026, 2004.
92. 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. *Electrochimica Acta*, Vol.51, 4612- 4619, 2006.
93. ANDERSON, R. L. Practical statistics for analytical chemists. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1987.