

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

**Desenvolvimento de Procedimentos Eletroanalíticos para a
Determinação de Antioxidantes e Corantes em Produtos
Alimentícios Empregando um Eletrodo de Diamante
Dopado com Boro**

*Roberta Antigo Medeiros**

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

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

*** Bolsista CNPq**

**SÃO CARLOS
2011**

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

M488dp

Medeiros, Roberta Antigo.

Desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação de antioxidantes e corantes em produtos alimentícios empregando um eletrodo de diamante dopado com boro / Roberta Antigo Medeiros. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

155 f.

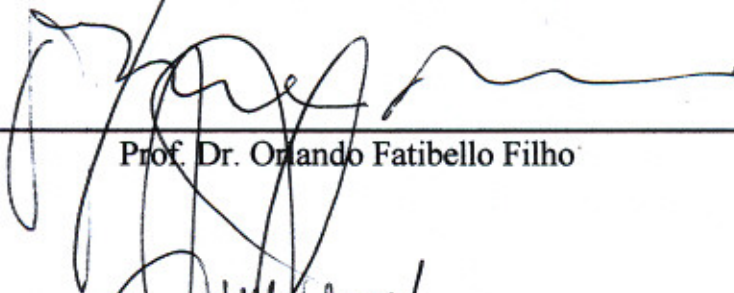
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química analítica. 2. Alimentos - aditivos. 3. Determinação simultânea. 4. Antioxidantes. 5. Corantes. 6. Métodos eletroanalíticos. I. Título.

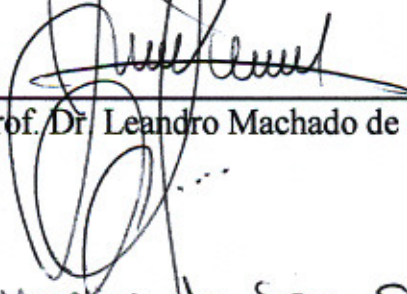
CDD: 543 (20^a)

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

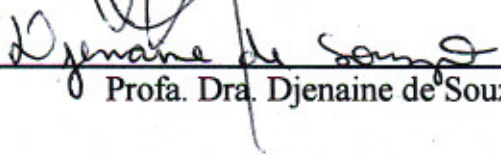
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Roberta Antigo Medeiros**, realizada em 29 de abril de 2011:*



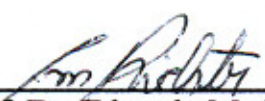
Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



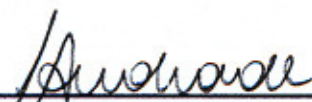
Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho



Profa. Dra. Djenaine de Souza



Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter



Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais, Waldir e Helena, símbolo de amor e
esperança, e irrestrito apoio em todo e qualquer momento.*

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

*Ao meu esposo Roberto, pelo amor, amizade, paciência,
apoio e por me fazer feliz.*

Amo Vocês!!!

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. E também pela amizade.

Ao Prof. Dr. Romeu Cardozo Rocha Filho, pelas discussões e incentivo durante todo decorrer do trabalho. E também pela amizade.

À doutoranda Bruna Cláudia Lourenção, pela ajuda e discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, por permitir que utilizássemos o HPLC.

Ao Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade, pela colaboração na construção da célula eletroquímica para o sistema FIA.

À Prof. Dra. Djenaine de Souza, pelas discussões relacionadas à SWV e pelo empréstimo do eletrodo de GC.

Ao pessoal do LABBES e do LABIE, pelo apoio e boas risadas.

Aos amigos Bruna, Diego, Geiser, Bruno, Débora, Avaré e Cyber, pelo convívio sempre alegre e agradável.

Aos compadres Estela e Luciano, pelos almoços de domingo, amizade e companheirismo.

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

Ao Departamento de Química da UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação, em especial às secretárias Cristina, Luciani e Ariane.

Aos professores do programa de pós-graduação, que contribuíram para minha formação e realização deste trabalho.

Aos órgãos de financiamento: CAPES, CNPq e FAPESP.

Obrigada!!!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita”.
(Mahatma Gandhi)

“Somos moldados por nossos pensamentos, tornamo-nos aquilo que pensamos. Quando a mente é pura, a alegria nos segue como uma sombra que nunca some”.
(Buda)

“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por isso, aprendemos sempre.”
(Paulo Freire)

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ΔE_s – incremento de varredura

A – ampér (corrente)

a – amplitude de pulso de potencial

AB – azul brilhante

AC – amarelo crepúsculo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDD – boron doped diamond (diamante dopado com boro)

BHA – butilhidroxianisol

BHT – butilhidroxitolueno

CG – cromatografia gasosa

CV – cyclic voltammetry (voltametria cíclica)

CVD – chemical vapor deposition (deposição química a vapor)

DG – galato de dodecila

DPV – differential pulse voltammetry (voltametria de pulso diferencial)

E – potencial

E_p – potencial de pico

f – frequência de aplicação de pulsos de potencial

FIA – flow injection analysis (análise por injeção em fluxo)

GC – Glassy carbon (carbono vítreo)

HPHT - high-pressure/ high-temperature (alta pressões e altas temperaturas)

HPLC – High Performance/Pressure Liquide Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

IDA – ingestão diária aceitável

I_p – corrente de pico

JECFA – Joint Expert Committee on Food Adittives

LD – limite de detecção

MPA – multiple pulse amperometry (amperometria de múltiplos pulsos)

OG – octil galato

PG – propil galato

DG – dodecil galato

PTA – pré-tratamento anódico

PTC – pré-tratamento catódico

SWV – square wave voltammetry (voltametria de onda quadrada)

t – tempo de modulação

Tampão BR – tampão de Britton-Robinson

TBHQ – terc-butil hidroquinona

TT – tartrazina

v – velocidade de varredura

V – volt

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1.1 - Antioxidantes sintéticos que podem ser utilizados pelas indústrias alimentícias brasileiras ¹⁷ | 7 |
| Tabela 1.2 - Corantes artificiais permitidos pela ANVISA para uso em alimentos..... | 15 |
| Tabela 3.1 - Valores obtidos para as áreas eletroativas dos eletrodos de BDD empregando-se a equação de Randles-Sevcik | 56 |
| Tabela 3.2 - Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de BHA e BHT | 71 |
| Tabela 3.3 - Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de BHA e BHT | 71 |
| Tabela 3.4 - Condições analíticas obtidas para a determinação de BHA e BHT pelas técnicas DPV e SWV | 72 |
| Tabela 3.5 - Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias | 79 |
| Tabela 3.6 - Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes | 80 |
| Tabela 3.7 - Estudos de adição e recuperação de BHA em amostras de maionese..... | 81 |
| Tabela 3.8 - Estudos de adição e recuperação de BHT em amostras de maionese e margarina | 81 |
| Tabela 3.9 - Resultados obtidos na determinação simultânea de BHA e BHT em produtos alimentícios empregando-se HPLC e SWV | 84 |
| Tabela 3.10 - Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias | 91 |
| Tabela 3.11 - Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes | 92 |
| Tabela 3.12 - Resultados obtidos na determinação simultânea de BHA e BHT em produtos alimentícios empregando-se HPLC e MPA-FIA | 93 |
| Tabela 3.13 - Comparação dos limites de detecção obtidos nesta tese com outros procedimentos eletroanalíticos e/ou materiais de eletrodo para a determinação de BHA e BHT | 95 |
| Tabela 3.14 - Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de TT, AC e AB | 100 |
| Tabela 3.15 - Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de TT, AC e AB..... | 101 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 3.16 - Condições analíticas obtidas para a determinação de AC, TT e AB pelas técnicas DPV e SWV | 101 |
| Tabela 3.17 - Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intra e entre-dias para os pares de corantes determinados simultaneamente..... | 111 |
| Tabela 3.18 - Desvios padrão relativos obtidos para o estudo de interferentes | 112 |
| Tabela 3.19 - Estudos de adição e recuperação de TT e AC nas amostras analisadas..... | 113 |
| Tabela 3.20 - Estudos de adição e recuperação de AB e AC nas amostras analisadas | 114 |
| Tabela 3.21 - Resultados obtidos na determinação de TT e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e DPV | 117 |
| Tabela 3.22 - Resultados obtidos na determinação de AB e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e DPV | 117 |
| Tabela 3.23 - Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias para os pares de corantes determinados simultaneamente por MPA-FIA | 129 |
| Tabela 3.24 - Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes | 131 |
| Tabela 3.25 - Resultados obtidos na determinação simultânea de TT e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e DPV | 132 |
| Tabela 3.26 - Resultados obtidos na determinação simultânea de AB e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e MPA-FIA | 133 |
| Tabela 3.27 - Comparação dos limites de detecção obtidos na tese com os limites de detecção obtidos em outros procedimentos e/ou materiais de eletrodo para a determinação de TT e AC | 135 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 - Estruturas químicas dos antioxidantes BHA e BHT. | 9 |
| Figura 1.2 - Estruturas químicas dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e azul brilhante. | 17 |
| Figura 1.3 - Mecanismo sugerido para o crescimento de diamante a partir de metano e hidrogênio pelo processo CVD ⁸⁹ | 22 |
| Figura 1.4 - Esquema ilustrativo das diferentes terminações superficiais dos eletrodos de BDD. | 25 |
| Figura 2.1 - Fotografia do eletrodo de BDD com área de 0,72 cm ² , utilizado nas medidas voltamétricas. | 36 |
| Figura 2.2 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica..... | 38 |
| Figura 2.3 - Adaptador para o eletrodo de BDD. | 39 |
| Figura 2.4 - Fotografia mostrando as peças necessárias para a confecção e montagem da célula eletroquímica para análises em fluxo. | 40 |
| Figura 2.5 - Fotografias mostrando a montagem da célula eletroquímica para análises em fluxo | 41 |
| Figura 2.6 - Sistema FIA de linha única. | 42 |
| Figura 3.1 - Voltamograma cíclico empregando-se o eletrodo de diamante dopado com boro em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ | 54 |
| Figura 3.2 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial (10 - 500 mV s ⁻¹) para um eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²) em solução de hexacianoferrato 3,0 mmol L ⁻¹ . (B) Relação linear obtida de I_p vs. $v^{1/2}$ | 56 |
| Figura 3.3 - (A) Voltamogramas cíclicos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm ²), na ausência (linha preta) e na presença de BHA 0,10 mmol L ⁻¹ (linha vermelha). (B) Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD, na ausência (linha preta) e na presença de BHT 0,20 mmol L ⁻¹ (linha azul). Eletrólito suporte: KNO ₃ 0,01mol L ⁻¹ (30% v/v de etanol, pH _{cond.} = 1,5), $v = 50$ mVs ⁻¹ | 58 |
| Figura 3.4 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²), na ausência (linha preta) e na presença de TT 0,10 mmol L ⁻¹ (linha laranja). (B) voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD, na ausência (linha preta) e na presença de AC 0,10 mmol L ⁻¹ (linha rosa). (C) voltamogramas cíclicos | |

empregando o eletrodo de BDD, na ausência (linha preta) e na presença de AB 0,10 mmol L⁻¹ (linha azul). Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$ 59

Figura 3.5 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) com diferentes pré-tratamentos em solução de BHA 0,10 mmol L⁻¹ (A) e BHT 0,20 mmol L⁻¹ (B): após PTA (linha preta) e após PTC linha vermelha (para o BHA) e azul (para o BHT). Eletrólito suporte: KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ (30% v/v de etanol, pH_{cond.} = 1,5), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$ 61

Figura 3.6 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) pré-tratado catodicamente em diferentes tempos (120, 180 e 240 s): (A) em solução de BHA 0,10 mmol L⁻¹ e (B) em solução de BHT 0,10 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ (30% v/v de etanol, pH_{cond.} = 1,5), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$ 62

Figura 3.7 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm²) com diferentes pré-tratamentos, em solução de TT 0,10 mmol L⁻¹ (A), AC 0,10 mmol L⁻¹ (B) e AB 0,10 mmol L⁻¹ (C): após PTA (linha preta) e após PTC (linha vermelha, para o TT, rosa, para o AC, e azul, para o AB). Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$. No gráfico inserido na figura (C) são apresentados voltamogramas de onda quadrada obtidos para o eletrodo de BDD em solução de AB 0,10 mmol L⁻¹ após os diferentes pré-tratamentos. 63

Figura 3.8 - Voltamogramas cíclicos e de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm²) pré-tratado catodicamente em diferentes tempos (180, 240 e 300 s): (A) em solução de TT 0,10 mmol L⁻¹, (B) em solução de AC 0,10 mmol L⁻¹ e (C) em uma solução de AB 0,10 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$ 64

Figura 3.9 - Voltamogramas cíclicos obtido empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) em soluções de BHA 0,10 mmol L⁻¹ (A) e BHT 0,10 mmol L⁻¹ (B) em diferentes eletrólitos suporte: H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹, KNO₃ 0,1 mol L⁻¹, tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH_{cond.} = 3,9), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH_{cond.} = 6,0) e tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH_{cond.} = 2,3), todos os eletrólitos foram preparados com água e etanol (30% v/v), ($\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$). 66

Figura 3.10 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) em solução de BHA 0,10 mmol L⁻¹ (A) e BHT 0,15 mmol L⁻¹ (B) em diferentes concentrações do eletrólito suporte KNO₃: 0,5; 0,1; 0,05 e 0,01 mol L⁻¹, ($\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$). 67

| | |
|---|----|
| Figura 3.11 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm ²) em solução de BHA 0,10 mmol L ⁻¹ (A) e BHT 0,10 mmol L ⁻¹ (B) em diferentes concentrações hidrogeniônicas (pH _{cond.} : 1,5; 2,0; 4,0 6,0; 8,0 e 10,0) do eletrólito suporte KNO ₃ 0,01mol L ⁻¹ (30% v/v de etanol), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$ | 68 |
| Figura 3.12 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm ²) em solução de BHA 0,10 mmol L ⁻¹ (A) e BHT 0,15 mmol L ⁻¹ (B) em diferentes velocidades de varredura: (A): 1-12: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 e 150 mVs ⁻¹ ; (B): 1-10: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mVs ⁻¹ . Eletrólito suporte: KNO ₃ 0,01mol L ⁻¹ (30% v/v de etanol; pH _{cond.} = 1,5). | 69 |
| Figura 3.13 - Dependência da corrente de pico pela velocidade de varredura: (A) para o BHA e (B) para o BHT. Os gráficos inseridos correspondem à dependência de log <i>I</i> vs. log ν para o BHA (A) e para o BHT (B). | 69 |
| Figura 3.14 - Voltamogramas de onda quadrada (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm ²) em solução de BHA 0,10 mmol L ⁻¹ (A) e BHT 0,10 mmol L ⁻¹ (B), em diferentes frequências de aplicação de pulso de potencial (1-9): 10 - 200 Hz. Os gráficos inseridos nas Figuras (A) e (B) correspondem a dependência de E _p pelo logaritmo de <i>f</i> . Eletrólito suporte: KNO ₃ 0,01 mol L ⁻¹ (30% v/v de etanol; pH _{cond.} = 1,5). | 73 |
| Figura 3.15 - Mecanismos de oxidação do BHA e do BHT. | 74 |
| Figura 3.16 - Voltamogramas de onda quadrada (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm ²) pré-tratado catodicamente (linha vermelha) e para eletrodo de GC (área geométrica = 0,20 cm ²) (linha preta) em solução de BHA 1,0 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ + BHT 1,5 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . Eletrólito suporte: KNO ₃ 0,01mol L ⁻¹ (30% v/v de etanol; pH _{cond.} = 1,5); $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ | 76 |
| Figura 3.17 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm ²) em soluções de: (A) BHA e BHT ((constante); (B) BHT e BHA (constante). Eletrólito suporte: KNO ₃ 0,01mol L ⁻¹ (30% v/v de etanol; pH _{cond.} = 1,5); $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ | 77 |
| Figura 3.18 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm ²) em diferentes concentrações de BHA e BHT. (B) curva analítica obtida para o BHA e (C) curva analítica obtida para o BHT. Eletrólito suporte: KNO ₃ 0,01mol L ⁻¹ (30% v/v de etanol; pH _{cond.} = 1,5); $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ | 78 |

Figura 3.19 - Cromatogramas obtidos para o BHA $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e para o BHT $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) simultaneamente. Os gráficos inseridos são as respectivas curvas analíticas obtidas em unidades de área para os antioxidantes. Fase móvel: acetonitrila/metanol (50/50, v/v) (eluição isocrática), vazão: $1,0 \text{ mL /min}$, volume de injeção: $20,0 \text{ }\mu\text{L}$ e os comprimentos de onda: 290 nm para o BHA e 278 nm para o BHT..... 82

Figura 3.20 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o BHA $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e BHT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B), empregando-se o eletrodo de BDD. Eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = $350,0 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$. .. 85

Figura 3.21 - Magnitude da média ($n = 3$) dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), vazões: $0,65$ a $2,75 \text{ mL min}^{-1}$ (A) e em função do volume da alça de amostragem: 50 a $600 \text{ }\mu\text{L}$ (B). Concentrações de BHA e BHT: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ 86

Figura 3.22- (A) Sequência de aplicações dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de BHA $50,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, BHT $50,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ e BHA + BHT nas mesmas concentrações. Solução transportadora e eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = $350,0 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ 88

Figura 3.23 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes concentrações de uma mistura de BHA e BHT. Os gráficos (ao lado) são as curvas analíticas obtidas para o BHA e para o BHT. Solução transportadora e eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = $350,0 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$. Os sinais obtidos em A, B, C e D correspondem a quatro amostras de maionese analisadas. 89

Figura 3.24 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de BHA (850 mV) e BHT (1150 mV) em três concentrações diferentes (10 injeções para cada concentração). Concentrações: BHA - $0,070$; $0,50$ e $3,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$; BHT - $0,70$; $6,0$ e $70 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Solução transportadora e eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = $350,0 \text{ }\mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ 90

Figura 3.25 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) em solução de TT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) em diferentes eletrólitos suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 1,1$), e tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,8$), ($v = 50 \text{ mVs}^{-1}$)..... 96

| | |
|---|-----|
| Figura 3.26 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²) em solução de TT 0,10 mmol L ⁻¹ (A) e AC 0,15 mmol L ⁻¹ (B) em diferentes concentrações do eletrólito suporte H ₂ SO ₄ | 97 |
| Figura 3.27 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²) em solução de TT 0,10 mmol L ⁻¹ (A), AC 0,10 mmol L ⁻¹ (B) e AB 0,10 mmol L ⁻¹ (C) em diferentes velocidades de varredura. | 98 |
| Figura 3.28 - Dependência da corrente de pico pela velocidade de varredura: (A) para o TT, (B) para o AC e (C) para o AB..... | 99 |
| Figura 3.29 - Voltamogramas de onda quadrada (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²) em solução de TT 0,10 mmol L ⁻¹ (A), AC 0,10 mmol L ⁻¹ (B) e AB 0,05 mmol L ⁻¹ , em diferentes frequências de aplicação de pulso de potencial (10 - 200 Hz). Os gráficos inseridos em (A), (B) e (C) são a dependência de E _p pelo logaritmo de <i>f</i> . Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , <i>a</i> = 40 mV e ΔE _s = 3 mV. | 103 |
| Figura 3.30 - Mecanismos de redução da TT e do AC. | 104 |
| Figura 3.31 - Proposta de um mecanismo de redução para o AB. | 105 |
| Figura 3.32 - Voltamogramas de pulso diferencial (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD(área geométrica = 0,30 cm ²) pré-tratado catodicamente (linha vermelha) e o eletrodo de GC (área geométrica = 0,20 cm ²) (linha preta) em solução de TT 2,9 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ + AC 1,5 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (A) e, em solução de AB 2,9 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ + AC 1,0 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; <i>v</i> = 20 mV s ⁻¹ , <i>a</i> = 60 mV e <i>t</i> = 5 ms. | 106 |
| Figura 3.33 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²) em soluções de: (A) TT e AC (constante); (B) AC e TT (constante); (C) AB e AC (constante); (D) AC e AB (constante). Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; <i>v</i> = 20 mV s ⁻¹ , <i>a</i> = 60 mV e <i>t</i> = 5 ms..... | 108 |
| Figura 3.34 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²) em diferentes concentrações de TT e AC. (B) curva analítica obtida para a TT e (C) curva analítica obtida para o AC. Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; <i>v</i> = 20 mV s ⁻¹ , <i>a</i> = 60 mV e <i>t</i> = 5 ms..... | 109 |
| Figura 3.35 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm ²) em diferentes concentrações de AB e AC. (B) curva | |

| | |
|---|-----|
| analítica obtida para a TT e (C) curva analítica obtida para o AC. Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $t = 5 \text{ ms}$ | 110 |
| Figura 3.36 - Cromatogramas obtidos para o TT 0,1 mmol L ⁻¹ (linha vermelha - 430 nm); para o AC 0,1 mmol L ⁻¹ (linha azul - 484 nm) e para o AB 0,1 mmol L ⁻¹ (linha rosa - 609 nm). Fase móvel: acetato de amônio 1% (m/v) (0,13 mol L ⁻¹) (pH 7,5) (Fase Móvel A) e mistura metanol:acetonitrila 80:20 (v/v) (Fase Móvel B) (eluição gradiente), vazão = 1,0 mL /min e o volume das injeções: 20,0 µL, comprimentos de onda: 430 nm para a TT, 484 nm para AC e 610 nm para AB. | 115 |
| Figura 3.37 - Curvas analíticas obtidas para os corantes em unidades de área..... | 115 |
| Figura 3.38 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para a TT 0,1 mmol L ⁻¹ (A), para o AC 0,1 mmol L ⁻¹ (B) e para o AB 0,05 mmol L ⁻¹ (C), utilizando o eletrodo de BDD. Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , volume de injeção = 250,0 µL e vazão = 3,1 mL min ⁻¹ | 119 |
| Figura 3.39 - Magnitude da média (n = 3) dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹), vazões: 0,45 a 3,55 mL min ⁻¹ , (A) TT 1,0 mmol L ⁻¹ ; (B) AC 0,1 mmol L ⁻¹ e (C) AB 0,05 mmol L ⁻¹ | 120 |
| Figura 3.40 - Magnitude da média (n = 3) dos sinais de corrente em função do volume da alça de amostragem: 50 a 500 µL, (A) TT 1,0 mmol L ⁻¹ ; (B) AC 0,1 mmol L ⁻¹ e (C) AB 0,05 mmol L ⁻¹ | 120 |
| Figura 3.41 - Magnitude da média (n = 3) dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais: 100 a 500 ms, (A) TT 1,0 mmol L ⁻¹ , pulso de potencial = -0,45 V; (B) AC 0,1 mmol L ⁻¹ , pulso de potencial = -0,15 V e (C) AB 0,05 mmol L ⁻¹ , pulso de potencial = -0,45 V. | 122 |
| Figura 3.42 - (A) Sequência de aplicações dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de TT 50,0 µmol L ⁻¹ , AC 50,0 µmol L ⁻¹ e TT + AC nas mesmas concentrações. Solução transportadora e eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , volume de injeção = 350,0 µL e vazão = 2,4 mL min ⁻¹ | 124 |
| Figura 3.43 - (A) Sequência de aplicações dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de AB 50,0 µmol L ⁻¹ , AC 10,0 µmol L ⁻¹ e AB + AC nas mesmas concentrações. Solução transportadora e eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , volume de injeção = 350,0 µL e vazão = 2,4 mL min ⁻¹ | 125 |

Figura 3.44 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes concentrações de uma mistura de TT e AC. Os gráficos (ao lado) são as curvas analíticas obtidas para o AC e para a TT. Solução transportadora e eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, volume de injeção = 350,0 µL e vazão = 2,4 mL min⁻¹. Os sinais obtidos em A, B e C correspondem a três amostras analisadas. 127

Figura 3.45 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se a o eletrodo de BDD em diferentes concentrações de uma mistura de AB e AC. Os gráficos (ao lado) são as curvas analíticas obtidas para o AC e para o AB. Solução transportadora e eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, volume de injeção = 350,0 µL e vazão = 2,4 mL min⁻¹. Os sinais obtidos em A, B e C correspondem a três amostras analisadas. 129

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ELETROANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES E CORANTES EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS EMPREGANDO UM ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO - Nesta tese investigou-se: a) a resposta eletroquímica de um eletrodo de diamante dopado com boro, após diferentes pré-tratamentos eletroquímicos, para dois antioxidantes (butilhidroxianisol - BHA e butilhidroxitolueno - BHT) e para três corantes (tartrazina - TT, amarelo crepúsculo - AC e azul brilhante - AB); b) o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação simultânea destes antioxidantes e corantes, empregando as técnicas voltamétricas de pulso (SWV e DPV) e a técnica amperométrica de múltiplos pulsos acoplada a um sistema FIA (MPA-FIA). Em geral, tanto para os antioxidantes quanto para os corantes, menores potenciais redox e maiores intensidades de correntes de pico foram obtidos após o eletrodo de BDD passar por um pré-tratamento catódico em sua superfície. Melhores condições analíticas para a determinação de ambos os antioxidantes em eletrólito suporte de KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$) foram obtidas usando SWV, que foi selecionada para a análise simultânea do BHA e BHT, quando apresentaram uma separação de 300 mV entre seus potenciais de pico de oxidação. As correspondentes curvas analíticas apresentaram boa linearidade na faixa de concentração de $5,99 \times 10^{-7}$ a $1,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com limites de detecção iguais a $1,45 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, para BHA, e $2,47 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, para BHT. A determinação simultânea desses antioxidantes também foi realizada utilizando a MPA-FIA, aplicando-se a seguinte sequência de pulsos de potencial: $E_{\text{det.1}} = 850 \text{ mV} / 200 \text{ ms}$ e $E_{\text{det.2}} = 1150 \text{ mV} / 200 \text{ ms}$ vs. Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Em $E_{\text{det.1}}$ ocorre a oxidação apenas do BHA e em $E_{\text{det.2}}$ ocorre a oxidação de BHA e BHT; portanto, $I_{\text{BHA}} = I_{E_{\text{det.1}}}$ e $I_{\text{BHT}} = I_{E_{\text{det.2}}} - I_{E_{\text{det.1}}}$. As

respectivas curvas analíticas apresentaram boas linearidades nas faixas de concentrações estudadas ($4,80 \times 10^{-8}$ - $3,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para BHA, e $6,80 \times 10^{-7}$ - $6,80 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, para BHT), com limites de detecção de $3,00 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, para BHA, e $4,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, para BHT. Para a determinação voltamétrica simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC foi utilizada a DPV; em eletrólito suporte de H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹, as separações entre os potenciais de redução foram de 150 mV, para TT e AC, e 189 mV, para AB e AC. As correspondentes curvas analíticas foram obtidas nas faixas de concentração de $9,99 \times 10^{-8}$ - $5,66 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para TT, $2,00 \times 10^{-8}$ - $4,76 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para AC, $5,96 \times 10^{-7}$ - $9,90 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para AB e $9,99 \times 10^{-8}$ - $4,76 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para AC. Os limites de detecção obtidos foram $6,27 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,31 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o par de corantes TT e AC, respectivamente, e $1,43 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $2,56 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o par AB e AC, respectivamente. Também foi desenvolvido um procedimento para a determinação simultânea desses pares de corantes utilizando-se MPA-FIA. A sequência de aplicação dos pulsos de potencial foi a seguinte: E_{det.1} = -150 mV / 400 ms, quando ocorre a redução apenas de AC, e E_{det.2} = -450 mV / 100 ms, quando ocorre a redução de ambos os corantes (TT e AC ou AB e AC). Os limites de detecção obtidos foram $2,55 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $8,10 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, para o par de corantes TT e AC, respectivamente, e $3,52 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $8,54 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, para o par de corantes AB e AC, respectivamente. Finalmente, foi realizada a determinação simultânea desses antioxidantes e corantes em amostras de produtos alimentícios; os resultados obtidos foram satisfatórios e concordantes com os resultados obtidos empregando-se os métodos cromatográficos, adotados como métodos comparativos.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROANALYTICAL PROCEDURES FOR THE DETERMINATION OF ANTIOXIDANTS AND COLORANTS IN FOOD SAMPLES USING A BORON-DOPED DIAMOND ELECTRODE - The following topics were investigated in this thesis: a) the electrochemical response of a boron-doped diamond electrode, after different electrochemical pretreatments, for two antioxidants (butylated hydroxyanisole – BHA and butylated hydroxytoluene – BHT) and three food colorants (tartrazine – TT, sunset yellow – SY, and brilliant blue – BB); b) the development of electroanalytical methods for the simultaneous determination of these antioxidants and colorants, using pulse voltammetric techniques (SWV and DPV) and the multiple pulse amperometric technique coupled to a FIA system (MPA-FIA). In general, for the antioxidants as well as the food colorants, lower redox potentials and higher intensities of peak current were obtained after the BDD electrode underwent cathodic pretreatment on its surface. Better analytical conditions for the determination of both antioxidants in 0.01 mol L⁻¹ KNO₃ (30% v/v ethanol; pH_{cond.} = 1.5) were obtained using SWV, which was selected for the simultaneous determination of BHA and BHT, when a 300 mV separation between their oxidation peak potentials was attained. The corresponding analytical curves were linear in the concentration range 5.99×10^{-7} to 1.01×10^{-5} mol L⁻¹, with detection limits of 1.45×10^{-7} mol L⁻¹, for BHA, and 2.47×10^{-7} mol L⁻¹, for BHT. The simultaneous determination of these antioxidants was also carried out using MPA-FIA, applying a dual-potential waveform: $E_{\text{det.1}} = 850 \text{ mV} / 200 \text{ ms}$ and $E_{\text{det.2}} = 1150 \text{ mV} / 200 \text{ ms}$ vs. Ag/AgCl (3.0 mol L⁻¹ KCl). Only BHA is oxidized at $E_{\text{det.1}}$, while both BHA and BHT are oxidized at $E_{\text{det.2}}$; thus, $I_{\text{BHA}} = I_{E_{\text{det.1}}}$ and $I_{\text{BHT}} = I_{E_{\text{det.2}}} - I_{E_{\text{det.1}}}$. The respective analytical curves presented a good linearity in the investigated

concentration ranges (4.80×10^{-8} - 3.00×10^{-6} mol L⁻¹, for BHA, and 6.80×10^{-7} - 6.80×10^{-5} mol L⁻¹, for BHT), with detection limits of 3.00×10^{-8} mol L⁻¹, for BHA, and 4.00×10^{-7} mol L⁻¹, for BHT. DPV was used for the simultaneous voltammetric determination of the colorant pairs TT and SY or BB and SY; in the 0.10 mol L⁻¹ H₂SO₄ supporting electrolyte, the separation between the reduction peak potentials was 150 mV, for TT and SY, and 189 mV, for BB and SY. The corresponding analytical curves were obtained in the concentration ranges 9.99×10^{-8} - 5.66×10^{-6} mol L⁻¹, for TT, and 2.00×10^{-8} - 4.76×10^{-6} mol L⁻¹, for SY, 5.96×10^{-7} - 9.90×10^{-6} mol L⁻¹, for BB, and 9.99×10^{-8} - 4.76×10^{-6} mol L⁻¹, for SY. The obtained detection limits were 6.27×10^{-8} mol L⁻¹ and 1.31×10^{-8} mol L⁻¹ for the pair TT and SY, respectively, and 1.43×10^{-7} mol L⁻¹ and 2.56×10^{-8} mol L⁻¹, for the pair BB and SY, respectively. An MPA-FIA procedure for the simultaneous determination of these pairs of colorants was also developed. The dual-potential waveform was the following: $E_{\text{det.1}} = -150$ mV / 400 ms, when only SY is reduced, and $E_{\text{det.2}} = -450$ mV / 100 ms vs. Ag/AgCl (3.0 mol L⁻¹ KCl), when both TT and SY or BB and SY are reduced. Detection limits of 2.55×10^{-6} mol L⁻¹ and 8.10×10^{-7} mol L⁻¹ were obtained for colorant pair TT and SY, respectively, and 3.52×10^{-6} mol L⁻¹ and 8.54×10^{-7} mol L⁻¹, for the pair BB and SY, respectively. Finally, the proposed methods were successfully applied in the simultaneous determination of those antioxidants and colorants in food products; the obtained results were satisfactory and similar to those obtained using high-performance liquid chromatography methods adopted as comparative methods.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 2 |
| 1.2 ANTIOXIDANTES..... | 6 |
| 1.2.1 Antioxidantes BHA e BHT | 8 |
| 1.2.2 Métodos analíticos para a determinação de BHA e BHT | 9 |
| 1.3 CORANTES..... | 14 |
| 1.3.1 Corantes tartrazina (TT), amarelo crepúsculo (AC) e azul brilhante (AB)..... | 16 |
| 1.3.2 Métodos analíticos para a determinação dos corantes TT, AC e AB..... | 18 |
| 1.4 ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO (BDD) | 20 |
| 1.5 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS | 27 |
| 1.5.1 Voltametria cíclica (CV), Voltametria de onda quadrada (SWV) e Voltametria de pulso diferencial (DPV) | 28 |
| 1.5.2 Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA) | 28 |
| 1.6 OBJETIVOS | 33 |
| 2. PARTE EXPERIMENTAL..... | 35 |
| 2.1 INSTRUMENTAÇÃO | 35 |
| 2.1.1 Eletrodos..... | 36 |
| 2.1.1.1 Eletrodo de trabalho | 36 |
| 2.1.1.2 Eletrodo de referência | 37 |
| 2.1.1.3 Eletrodo auxiliar..... | 37 |
| 2.1.2 Célula eletroquímica | 38 |
| 2.1.2.1 Célula eletroquímica com configuração wall Jet/camada delgada..... | 39 |
| 2.1.3 Sistema FIA..... | 42 |
| 2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES | 43 |
| 2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS | 44 |
| 2.3.1 Amostras de maioneses e margarinas..... | 44 |
| 2.3.2 Amostras de preparados sólidos para refrescos, gelatinas e hidrotônicos..... | 45 |
| 2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 46 |
| 2.4.1 Estudo do efeito do pré-tratamento sobre o eletrodo de BDD | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.2 Estudo da área eletroativa do eletrodo de BDD | 47 |
| 2.4.3 Estudo do comportamento voltamétrico dos antioxidantes e corantes sobre os eletrodos de BDD e desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos | 47 |
| 2.4.4 Estudo do comportamento amperométrico dos antioxidantes e corantes sobre os eletrodos de BDD e da otimização dos parâmetros da detecção por MPA-FIA para desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos | 48 |
| 2.4.5 Estudo do limite de detecção e recuperação dos analitos..... | 50 |
| 2.4.6 Estudo de interferentes | 50 |
| 2.4.7 Método comparativo para a determinação dos antioxidantes e corantes | 51 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 3.1 JANELA ELETROQUÍMICA DE POTENCIAL DO ELETRODO DE BDD | 53 |
| 3.2 ESTUDOS DA ÁREA ELETROATIVA DO ELETRODO DE BDD..... | 54 |
| 3.3 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO ELETRODO DE BDD..... | 57 |
| 3.3.1 Estudo do comportamento eletroquímico dos antioxidantes BHA e BHT sobre o eletrodo de BDD..... | 57 |
| 3.3.2 Estudo do comportamento eletroquímico dos corantes TT, AC e AB sobre o eletrodo de BDD..... | 58 |
| 3.3.3 Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD | 60 |
| 3.3.3.1 Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o eletrodo de BDD para os antioxidantes BHA e BHT | 60 |
| 3.3.3.2 Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o eletrodo de BDD para os corantes TT, AC e AB | 62 |
| 3.4 PROCEDIMENTOS ELETROANALÍTICOS..... | 65 |
| 3.4.1 Determinação de BHA e BHT empregando as técnicas voltamétricas de pulso (SWV e DPV) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente..... | 65 |
| 3.4.1.1 Voltametria de pulso diferencial (DPV) vs. Voltametria de onda quadrada (SWV) ... | 70 |
| 3.4.1.2 Mecanismo de oxidação dos antioxidantes BHA e BHT | 72 |
| 3.4.1.3 Determinação simultânea de BHA e BHT por SWV empregando o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente | 75 |
| 3.4.1.3.1 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação | 79 |
| 3.4.1.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência - método comparativo | 82 |

| | |
|---|-----|
| 3.4.1.3.3 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando SWV na determinação simultânea de BHA e BHT em amostras comerciais | 83 |
| 3.4.2 Determinação simultânea de BHA e BHT empregando a amperometria de múltiplos pulsos acoplada a um sistema de análise por injeção em fluxo (MPA-FIA) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente..... | 84 |
| 3.4.2.1 Otimização dos parâmetros do sistema FIA..... | 85 |
| 3.4.2.2 Comportamento amperométrico do eletrodo de BDD para BHA e BHT frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial | 87 |
| 3.4.2.3 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação | 91 |
| 3.4.2.4 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando MPA-FIA na determinação simultânea de BHA e BHT em amostras comerciais | 92 |
| 3.4.3 Procedimentos eletroanalíticos desenvolvidos nesta tese vs. procedimentos eletroanalíticos propostos na literatura para a determinação dos antioxidantes BHA e BHT . | 94 |
| 3.4.4 Determinação dos corantes TT, AC e AB empregando as técnicas voltamétricas de pulso (SWV e DPV) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente | 96 |
| 3.4.4.1 Voltametria de pulso diferencial (DPV) vs. Voltametria de onda quadrada (SWV) . | 100 |
| 3.4.4.2 Mecanismo de redução dos corantes TT, AB e AB | 102 |
| 3.4.4.3 Determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC por DPV empregando o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente | 105 |
| 3.4.4.3.1 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação | 111 |
| 3.4.4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - método comparativo..... | 114 |
| 3.4.4.3.3 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando DPV na determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC em amostras comerciais..... | 116 |
| 3.4.5 Determinação simultânea dos pares de corante TT e AC ou AB e AC empregando a amperometria de múltiplos pulsos acoplada a um sistema de análise por injeção em fluxo (MPA-FIA) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente | 118 |
| 3.4.5.1 Otimização dos parâmetros do sistema FIA..... | 119 |
| 3.4.5.2 Estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial em MPA-FIA | 121 |
| 3.4.5.3 Comportamento amperométrico do eletrodo de BDD para os pares de corantes TT e AC ou AB e AC frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial | 122 |
| 3.4.5.4 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação | 130 |
| 3.4.5.5 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando MPA-FIA na determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC em amostras comerciais..... | 132 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.6 Procedimentos eletroanalíticos desenvolvidos nesta tese vs. Procedimentos eletroanalíticos propostos na literatura para a determinação dos corantes TT, AC e AB..... | 134 |
| 4. CONCLUSÕES | 137 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 141 |

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Os produtos alimentícios industrializados vêm sendo cada vez mais comercializados e estão ocupando espaço no mercado de alimentos. Estes alimentos são fáceis de preparar, consumir e são encontrados nos supermercados em grandes variedades. Além disso, o tempo de prateleira desses alimentos industrializados é bem maior do que os produtos “*in natura*”, tornando fácil o seu armazenamento. Esses alimentos industrializados vieram pra ficar e estão se tornando uma solução para a vida agitada das grandes cidades^{1,2}.

Portanto, as indústrias alimentícias vêm se aprimorando e cobrindo um vasto número de operações, envolvendo o processamento de produtos alimentícios. Para auxiliar neste processamento industrial e ainda para manter a maioria dos produtos em boas condições, aumentando seu prazo de validade, ou ainda para torná-los mais saborosos e atrativos, a eles são acrescentados os chamados aditivos alimentares^{1,3,4}.

Os aditivos alimentares têm como uma de suas funções aumentar a vida de prateleira dos alimentos industrializados, mas, também, possibilitam o desenvolvimento de inúmeros produtos alimentícios com cores, sabores e texturas inexistentes anteriormente⁵.

O Fundo das Nações Unidas para Agricultura define os aditivos alimentares como “substâncias que são adicionadas intencionalmente aos alimentos sem o objetivo de nutrir, mas sim de conservar e conferir sabor, aroma, cor e textura”⁶. No Brasil, o órgão responsável pela legislação e fiscalização do uso dos aditivos alimentares pela indústria é a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que define os aditivos alimentares de forma bastante semelhante: “aditivo alimentar é todo e qualquer ingrediente

adicionado intencionalmente aos alimentos sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento”⁷.

A segurança no uso destes aditivos é de suma importância. O que significa que, antes de ser autorizado ele deve ser submetido a uma avaliação toxicológica, na qual se leva em consideração principalmente: efeito acumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso. O uso dos aditivos alimentares deve ser mantido em observação e reavaliado quando necessário caso se modifique as condições de uso. Além disso, seu uso também deve ser limitado a alguns tipos de alimentos, em condições específicas e a menor nível possível para alcançar o efeito desejado⁶⁻⁸.

O uso dos aditivos alimentares pela indústria de alimentos justifica-se por razões relacionadas ao processo de fabricação e por proporcionar ao alimento industrializado características o mais parecido possível com a do alimento “in natura”. Porém, o uso desses aditivos não é justificado quando essas vantagens e qualidades puderem ser obtidas por etapas de fabricação mais adequadas ou por maiores precauções de ordem higiênica ou operacional⁵.

Os aditivos alimentares são divididos e classificados em espessantes, estabilizantes, edulcorantes, corantes, conservadores, aromatizantes e flavorizantes, umectantes e anti-umectantes, espumíferos e anti-espumíferos, clarificantes, antioxidantes, agente de massa, geleificante, regulador de acidez, acidulantes, melhorador de farinha, realçador de sabor, fermento químico, glaceante, agente de firmeza, sequestrante e estabilizador de cor⁷.

Dentre as classes de aditivos citadas anteriormente, duas foram estudadas nesta tese, a dos corantes e a dos antioxidantes. Estas classes estão entre as três mais estudadas e amplamente controladas em todo o mundo⁴. Elas

têm chamado a atenção de pesquisadores e sanitaristas, causando uma grande preocupação relacionada à segurança em sua ingestão, pois, segundo alguns estudos já realizados, alguns dos corantes e antioxidantes poderiam vir a causar danos à saúde do consumidor, principalmente se consumidos de forma inadequada.

Na legislação existe um valor de ingestão diária para a maioria destes aditivos, a IDA (ingestão diária aceitável) - quantidade de um determinado composto que pode ser consumido diariamente, com segurança, durante toda a vida⁷. Desta forma, investigações sobre os efeitos de antioxidantes e corantes na espécie humana são cada vez mais importantes, uma vez que as indústrias, cada vez mais estão empregando estes tipos de aditivos no processamento e fabricação dos alimentos. Existe também uma preocupação com relação às quantidades destes aditivos que estão sendo adicionadas aos alimentos, lembrando que também há uma quantidade máxima estabelecida pela legislação^{6,7}.

Sendo assim, há na literatura diversos procedimentos analíticos para a quantificação, tanto de corantes como de antioxidantes, para o controle de qualidade nas indústrias, para o controle do limite de tolerância e para auxiliar a fiscalização do uso em excesso desses aditivos pelas indústrias alimentícias. No entanto, muitos destes métodos, requerem equipamentos de alto custo, utilizam grandes quantidades de reagentes ou consomem muito tempo de análise. Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos mais rápidos, com a utilização de equipamento de menor custo, para estudar, determinar e monitorar a quantidade desses aditivos nos alimentos.

O emprego de técnicas eletroanalíticas para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos vem crescendo significativamente, uma vez que elas são precisas, exatas, sensíveis, de baixo custo e requerem curtos tempos de análise⁷.

O crescimento da utilização das técnicas eletroanalíticas é devido, principalmente, ao desenvolvimento da instrumentação eletroanalítica, como, por exemplo, as técnicas que envolvem a aplicação de pulsos de potenciais. Técnicas como a voltametria de onda quadrada (SWV), a voltametria de pulso diferencial (DPV) e a amperometria de múltiplos pulsos (MPA) possibilitam a aquisição de dados com sensibilidade comparável àquelas obtidas com o emprego de técnicas cromatográficas de separação e detecção, o que permite análises em água, solo, alimentos e, até mesmo, compostos de interesse biológico⁹.

Ao se utilizar as técnicas eletroanalíticas deve-se levar em consideração algumas informações relacionadas ao eletrodo de trabalho: a janela de potencial de trabalho, a condutividade elétrica, a reprodutibilidade da superfície, as propriedades mecânicas, o custo de fabricação, a disponibilidade e a toxicidade¹⁰. Segundo Galli *et. al.*¹¹, “a escolha do material do eletrodo de trabalho é de grande importância devido ao fato de que as respostas obtidas são relacionadas às reações redox que ocorrem em sua superfície ou na interface eletrodo-solução. Desta forma, o analito de interesse pode interagir com a superfície eletródica, resultando na transferência de elétrons”.

Diferentes eletrodos de carbono têm sido utilizados tanto na eletroquímica quanto na eletroanalítica, devido principalmente, as suas características, como: ampla janela de potencial de trabalho, são razoavelmente inertes quimicamente e, ainda, mostram facilidade de modificação. Existem vários tipos de materiais carbônicos utilizados como eletrodos; o carbono vítreo, carbono pirolítico, pasta de carbono, grafite, etc. Porém, nos últimos anos novos tipos de materiais de carbono têm sido utilizados como eletrodo de trabalho, chamando a atenção devido aos excelentes resultados que têm apresentado. Um destes materiais é o diamante dopado com boro (BDD), o qual possui um número importante de propriedades eletroquímicas distinguíveis das de outros

eletrodos comumente usados, tais como carbono vítreo, platina e pasta de carbono^{12, 13}. Os primeiros relatos sobre a utilização do BDD em eletroquímica se deram no final da década de 80 e, desde então, uma das aplicações que mais tem despertado interesse é o uso de eletrodos de BDD em aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas¹⁴.

Tendo em vista as características dos eletrodos de diamante dopado com boro e os relatos de sua boa interação com compostos orgânicos, surge o interesse de se desenvolver procedimentos eletroanalíticos para a detecção e quantificação de alguns dos corantes e antioxidantes mais utilizados na indústria de alimentos. Maiores detalhes sobre o eletrodo de BDD serão descritos em seções posteriores.

1.2 Antioxidantes

A diminuição da vida de prateleira dos alimentos industrializados é causada principalmente pelos processos de oxidação das substâncias orgânicas. Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos das reações de oxidação e de controle dessas reações é de grande importância econômica para a indústria alimentícia¹⁵.

As principais reações de oxidação em alimentos (escurecimento enzimático e oxidação de lipídios) provocam uma mudança sensorial e, conseqüentemente, desenvolvem sabor desagradável, denominado de ranço. Essas modificações na qualidade do produto alimentício estão diretamente relacionadas ao prazo de validade de diversos produtos alimentícios processados¹⁵.

Os antioxidantes têm a função de evitar ou reduzir a oxidação destes compostos, impedindo o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. Eles foram uma das primeiras classes de aditivos para os quais foram

elaboradas propostas de normas de uso, baseadas em dados nacionais do emprego dessas substâncias. Para poderem ser utilizadas pela indústria de alimentos, essas substâncias tiveram que passar por investigações que comprovaram que seu uso seria seguro, dentro de um limite de ingestão diária. Além disso, o uso de todos os antioxidantes está sujeito as legislações específicas de cada país ou por normas internacionais, necessitando de análises para garantir que estejam sendo usados dentro dos limites seguros¹⁶.

No Brasil, a legislação que regulamenta a utilização de antioxidantes em alimentos como: creme vegetal, margarinas, óleos e gorduras é a Resolução nº 04/88 - CNS/MS23, de 24 de novembro de 1988¹⁷ da ANVISA, em vigor até a presente data. Na Tabela 1 encontram-se os antioxidantes sintéticos que podem ser utilizados pelas indústrias e os alimentos nos quais eles podem ser adicionados com os respectivos códigos de rotulagem e limites máximos de adição, de acordo com a mesma resolução¹⁸.

Tabela 1.1 - Antioxidantes sintéticos que podem ser utilizados pelas indústrias alimentícias brasileiras¹⁷

| Antioxidantes | Código de Rotulagem | Alimentos em que podem ser adicionados | Limite máximo (g/100 g)* |
|-------------------|---------------------|--|--------------------------|
| BHA ^a | 320 | Creme vegetal | 0,02 |
| | | Margarinas | 0,02 |
| | | Óleos e gorduras | 0,02 |
| | | Maioneses | 0,02 |
| BHT ^a | 321 | Creme vegetal | 0,02 |
| | | Margarinas | 0,02 |
| | | Óleos e gorduras | 0,01 |
| | | Maioneses | 0,01 |
| TBHQ ^a | 319 | Óleos e gorduras | 0,02 |
| PG ^a | 310 | Creme Vegetal | 0,01 |
| OG ^a | 311 | Margarinas | 0,01 |
| DG ^a | 312 | Óleos e gorduras | 0,01 |

* Será tolerado a mistura na dose de 0,02g/100g no total, isto é; a soma dos dois não pode ultrapassar seu valor individual.

^a BHA - butilhidroxianisol; BHT - butilhidroxitolueno; TBHQ - terc-butil-hidroquinona; PG - propil galato; OG - octil galato; DG - dodecil galato.

O JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), comitê conjunto FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares e contaminantes, bem como normas publicadas pelo Codex Alimentarius, também estabelecem um limite de ingestão para os aditivos. Este valor é representado pela IDA (Ingestão Diária Aceitável) expresso em mg do antioxidante por kg de massa corpórea (mc). IDAs de 0 a 0,55, 0 a 0,35 mg/kg e 0 a 1,4 mg/kg mc foram estabelecidas para o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e propil galato (PG), respectivamente. O octil galato (OG) e o dodecil galato (DG) não tiveram suas IDAs estabelecidas por falta de informações toxicológicas, e para o *tert*-butil hidroquinona (TBHQ) atribui-se uma IDA temporária de 0 a 0,75 mg/kg mc, até que se finalizem os estudos¹⁹.

1.2.1 Antioxidantes BHA e BHT

Butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT) são os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos. Segundo Ramalho *et al.*²⁰, “a estrutura fenólica destes compostos (Figura 1.1) permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação”.

Esses antioxidantes apresentam baixa estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas são particularmente efetivos no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta⁴. Porém, estudos toxicológicos realizados em experimentos com animais têm demonstrado a possibilidade desses antioxidantes apresentarem efeito cancerígeno. Em outros estudos, o BHA também mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um

mecanismo desconhecido; em humanos, a relevância dessa observação ainda não está clara¹⁹.

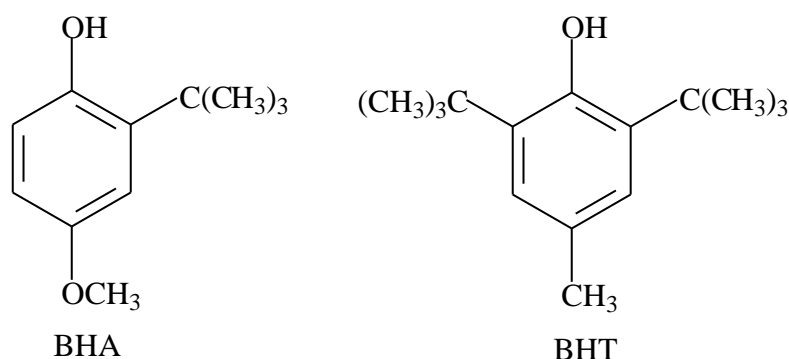


Figura 1.1 - Estruturas químicas dos antioxidantes BHA e BHT.

Devido a esses problemas, que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de encontrar produtos naturais, que possuam as mesmas propriedades para substituir os sintéticos, ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos²⁰. Por outro lado, esses antioxidantes têm sido monitorados com intenso rigor para evitar a sua utilização em excesso e indevida nos alimentos. Através de procedimentos analíticos é possível determinar a concentração dos antioxidantes presentes em diferentes alimentos e estimar a ingestão potencial destes aditivos pela população, de forma a garantir o emprego seguro destes aditivos.

1.2.2 Métodos analíticos para a determinação de BHA e BHT

Os métodos utilizados para detecção e quantificação de antioxidantes sintéticos em alimentos foram revisados por diversos autores²¹⁻²⁴. Tais métodos incluem principalmente colorimetria, espectrofotometria, cromatografia (papel, gel, camada delgada, gás, gás-líquido e líquida de alta eficiência) e, com menor frequência, voltametria, polarografia e densitometria²³.

Devido a algumas limitações, os métodos colorimétricos e espectrofotométricos, utilizados no passado, têm sido substituídos por outras técnicas, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)²⁴, sendo esta última a mais estudada e utilizada para determinação de BHT e BHA²⁵⁻³⁰.

Vários procedimentos eletroquímicos empregando técnicas voltamétricas³¹⁻⁴⁵ e amperométricas⁴⁶⁻⁵¹ também foram desenvolvidos para a determinação destes antioxidantes, separadamente e simultaneamente.

Wang e Freiha³¹ descrevem um método que envolve a pré-concentração de BHA em um eletrodo de pasta de carbono antes da realização das medidas voltamétricas, o limite de detecção obtido foi de $2,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Anguí *et al.*³³ usaram microeletrodos de fibra de carbono cilíndricas para a determinação simultânea de BHA e BHT empregando a voltametria de onda quadrada e perclorato de tetrabutylamônio (meio não aquoso) como eletrólito suporte. Os limites de detecção obtidos foram $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para BHA, e $3,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, para o BHT. Posteriormente, Anguí *et al.*³⁵ utilizaram um microeletrodo de fibra modificado com poli(3-metiofeno) para estudar o comportamento eletroquímico de BHA, BHT, TBHQ e PG. Esses pesquisadores observaram que houve efeito eletrocatalítico com o microeletrodo modificado quando comparado com o eletrodo de carbono vítreo (GC) convencional. Porém, só foi possível obter boa reprodutibilidade com a limpeza do microeletrodo entre as medidas.

Diaz *et al.*³⁶ estudaram o comportamento voltamétrico do PG, BHA e BHT sobre um eletrodo de GC, estático e em rotação, em meio de acetonitrila-água. Para a determinação simultânea destes antioxidantes em amostras de sopa, foram empregados métodos quimiométricos para separação dos picos de oxidação.

De La Fuente *et al.*³⁷ usaram um eletrodo de platina modificado com polipirrol e o complexo ftalocianina de níquel tetrassulfonado (mediador de elétrons) e as técnicas voltamétricas cíclica (CV) e de pulso diferencial (DPV) para a determinação de BHA e TBHQ separadamente em diferentes amostras de alimentos. Os limites de detecção obtidos foram de 2,1 ppm para ambos os antioxidantes quando empregada a técnica CV e 18,7 ppm (BHA) e 1,23 ppm (TBHQ) quando empregada a DPV.

Ceballos e Fernandez³⁹ usaram a voltametria de onda quadrada (SWV) com ultramicroeletrodos de discos de carbono para determinar BHA e BHT simultaneamente em óleos vegetais. As determinações foram realizadas diretamente no eletrólito suporte, ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹, após procedimento de extração em acetonitrila. As faixas lineares foram obtidas nas concentrações de 60,4 a 422,8 ppm para o BHA e de 62,2 a 435,4 ppm para o BHT.

Ni *et al.*⁴⁰ estudaram o comportamento voltamétrico dos antioxidantes BHA, BHT, PG e TBHQ sobre um eletrodo de GC em solução de ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹ contendo 1,0% v/v de metanol como eletrólito suporte. Para a determinação simultânea dos antioxidantes foram utilizadas ferramentas quimiométricas, como o método LS (*least-square*), PLS (*partial least-square*) e análise por regressão de componente principal. As faixas lineares das curvas analíticas foram obtidas nas concentrações de 2,8 a 83,0 μmol L⁻¹, para BHA, e 2,8 a 36,0 μmol L⁻¹, para BHT, com limites de detecção de 1,0 μmol L⁻¹ e 0,68 μmol L⁻¹, respectivamente. Este procedimento foi aplicado na determinação desses antioxidantes em uma mistura sintética e também em amostras de alimentos.

Michalkiewicz *et al.*⁴¹ investigaram a oxidação eletroquímica dos antioxidantes TBHQ, BHA e BHT, por voltametria sobre microeletrodos de platina. As melhores condições encontradas para a determinação voltamétrica desses corantes foram em NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹ e CH₃COONa 0,1 mol L⁻¹

empregando-se DPV ou SWV . Uma boa linearidade foi obtida entre as concentrações de $3,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Raymundo *et al.*⁴³ estudaram a influência do eletrodo de trabalho, do eletrólito suporte, do pH do eletrólito suporte e da técnica voltamétrica empregada, na determinação simultânea de BHA, BHT e TBHQ. Os melhores resultados foram obtidos com o eletrodo GC em eletrólito suporte tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH = 2,0) ou HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH = 2,0) ambos contendo 20 mL L⁻¹ de metanol e empregando a técnica voltamétrica de onda quadrada.

O complexo aquapentacianoferrato de níquel foi utilizado por Kumar e Narayanan⁴⁴ como mediador de elétrons no desenvolvimento de um sensor para a determinação de BHA. Este complexo foi imobilizado sobre um eletrodo de grafite. A faixa linear obtida foi de $6,24 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $2,19 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $2,49 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e um coeficiente de correlação de 0,9979.

Recentemente, Freitas e Fatibello-Filho⁴⁵ desenvolveram um procedimento para a análise simultânea de BHA e BHT empregando um eletrodo compósito de carbono modificado com fosfato de cobre (II) imobilizado em resina de poliéster (MCCE-Cu₃(PO₄)₂). Foi obtida uma separação de 430 mV entre os potenciais de oxidação destes antioxidantes, o que possibilitou a análise simultânea dos mesmos. Os limites de detecção obtidos foram $7,2 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o BHA e $9,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para o BHT.

Um dos procedimentos amperométricos descritos na literatura foi desenvolvido por Yáñez-Sedeño *et al.*⁴⁶, no qual foi utilizado um eletrodo de GC em um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) para a determinação de BHA e BHT separadamente. A solução carregadora (e eletrólito suporte) foi o ácido perclórico contendo 5% v/v de metanol. Os limites de detecção foram de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o BHA e $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o BHT.

Ruiz *et al.*⁴⁸ usaram um eletrodo de GC modificado com ftalocianina de níquel para a detecção amperométrica de BHA, BHT, PG e TBHQ após separação prévia por HPLC. O potencial aplicado foi de 0,7 V e o tempo de análise dos quatro antioxidantes foi de 17 minutos. Os limites de detecção foram de 0,11, 0,60 e 0,15 µg/mL para o BHA, BHT e PG, respectivamente.

Um eletrodo compósito de grafite e cloreto de polivinila (PVC) foi utilizado por Luque *et al.*⁴⁹ para determinação amperométrica de BHA, PG e OG, individualmente. Foi utilizada uma célula com configuração *wall-jet* e KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ com 10% ou 20% v/v de metanol como solução carregadora. As faixas lineares das curvas analíticas foram obtidas entre as concentrações: 0,10 - 30,0; 0,10 - 13,0 e 0,1 - 35,0 mg L⁻¹, para PG, OG e BHA, respectivamente.

Riber *et al.*⁵⁰ usaram um eletrodo de polipirrol modificado com o complexo ftalocianina de níquel tetrassulfonada como detector eletroquímico amperométrico em um sistema de análise por injeção em fluxo após pré-separação dos antioxidantes por HPLC. Os antioxidantes analisados foram TBHQ, BHA e PG, cujos limites de detecção foram 0,26, 0,38 e 0,38 µmol L⁻¹, respectivamente.

Jayasri e Narayanan⁵¹ utilizaram um eletrodo compósito de grafite, quimicamente modificado com AgHCF, para a determinação amperométrica de BHA em amostras de salgadinhos de batata. As respostas amperométricas foram lineares num intervalo de concentração $7,4 \times 10^{-6}$ a $8,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, o limite de detecção obtido foi de $3,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Apesar dos bons resultados obtidos empregando-se os respectivos métodos supracitados, muitos deles utilizaram solventes orgânicos de alta toxicidade como acetonitrila e metanol. Quando realizada a determinação simultâneas a maioria dos métodos empregou a separação prévia por HPLC ou

com auxílio de métodos quimiométricos e ainda, alguns dos autores relatam problemas de falta de reprodutibilidade.

1.3 Corantes

Os corantes são substâncias que são adicionadas aos alimentos industrializados com o objetivo de lhes transmitir novas cores ou intensificar as que eles já possuem, melhorando o seu aspecto. A função dos corantes é apenas a de "colorir" os alimentos industrializados, fazendo com que fiquem mais parecidos com os alimentos naturais. O uso de corantes pela indústria de alimentos é extremamente comum, já que a cor e a aparência têm um papel importantíssimo na aceitação dos produtos pelo consumidor⁵².

De acordo com a ANVISA⁵³, “existem razões de ordem técnica para se colorir os alimentos, como por exemplo, restaurar a cor dos produtos cuja coloração natural foi afetada ou destruída durante o processamento; ou uniformizar a cor dos alimentos produzidos a partir de matérias-primas de origem diversa; e ainda, conferir cor a alimentos incolores”.

A resolução n. 44 da ANVISA, também estabeleceu as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas⁵³. Pela legislação atual, no Brasil é permitido o uso de apenas 11 (onze) corantes artificiais. Na Tabela 1.2 encontram-se os corantes artificiais que podem ser utilizados pelas indústrias brasileiras, os respectivos códigos de rotulagem e limites máximos de adição, de acordo com a mesma resolução.

Porém, estudos toxicológicos têm demonstrado que alguns desses corantes podem apresentar risco à saúde humana, principalmente se consumido em excesso. Estudos realizados nos Estados Unidos e na Europa desde a década

de 70 demonstraram casos de reações alérgicas, asma e dores de cabeça, chegando-se até ao câncer em animais de laboratório. Alguns corantes já foram banidos em diversos países, inclusive no Brasil, devido aos estudos do Codex Alimentarius, órgão ligado à Organização Mundial da Saúde (OMS)⁵⁰.

Tabela 1.2 - Corantes artificiais permitidos pela ANVISA para uso em alimentos

| Corantes | Código de Rotulagem | Cor | Limite máximo (g/100g-/100mL) |
|------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| Amaranto | E123 | Magenta | 0,010 |
| Vermelho de eritrosina | E127 | Pink | 0,005 |
| Vermelho 40 | E129 | Vermelho alaranjado | 0,015 |
| Ponceau 4R | E124 | Cereja | 0,010 |
| Amarelo crepúsculo | E110 | Laranja | 0,010 |
| Tartrazina | E102 | Amarelo limão | 0,015 |
| Azul indigotina | E132 | Azul royal | 0,015 |
| Azul brilhante | E133 | Azul turquesa | 0,015 |
| Vermelho sólido E | E122 | Vermelho | 0,010 |
| Verde rápido | E143 | Verde mar | 0,015 |
| Azul de alizarina | E131 | Azul | 0,015 |

Sendo assim, o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação das concentrações destes corantes presentes em diferentes alimentos é necessária, tanto para assegurar os requerimentos legais (limites permitidos), como para o controle de qualidade nas indústrias de alimentos. Além disso, o conhecimento da concentração destes corantes em alimentos também pode ser utilizado para estimar a ingestão potencial destes aditivos pela população.

Dentre os corantes artificiais permitidos pela ANVISA (Tabela 1.2), três foram selecionados para serem estudados neste trabalho de doutorado: tartrazina, amarelo crepúsculo e azul brilhante. Estes são corantes bastante

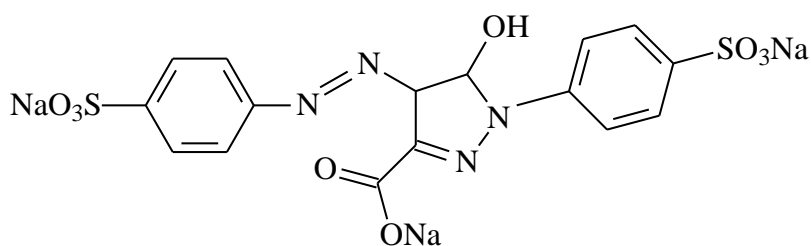
empregados na indústria alimentícia, adicionados aos alimentos individualmente e também misturados.

1.3.1 Corantes tartrazina (TT), amarelo crepúsculo (AC) e azul brilhante (AB)

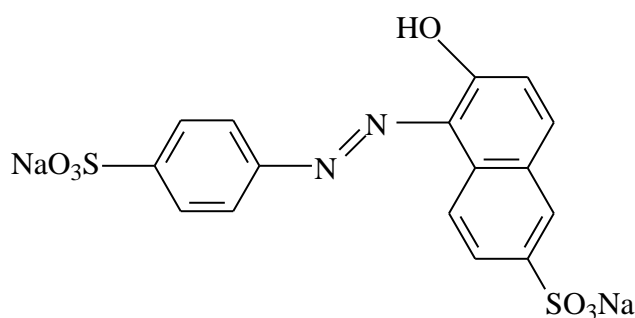
A TT e o AC são pigmentos sintéticos pertencentes ao grupo dos corantes azo, que apresentam um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo (N=N). Esses anéis podem conter um, dois ou três grupos sulfônicos. Já o AB integra o grupo de corantes trifenilmetanos, que apresenta estrutura básica de três radicais arila, em geral grupos fenólicos, ligados a um átomo de carbono central, e apresentam ainda grupos sulfônicos que lhes conferem alta solubilidade em água⁵⁴. As estruturas químicas destes corantes estão mostradas na Figura 1.2.

A TT proporciona a cor amarelo-limão quando utilizada sozinha em alimentos, mas também é muito utilizada em combinações com outros corantes, como o AC e o AB para produzir vários tons de amarelo e verde. O uso mais frequente desses corantes se dá em cereais, confeitos, cerejas em calda, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, revestimentos, gelatinas, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos, como também em cosméticos e medicamentos⁵⁵.

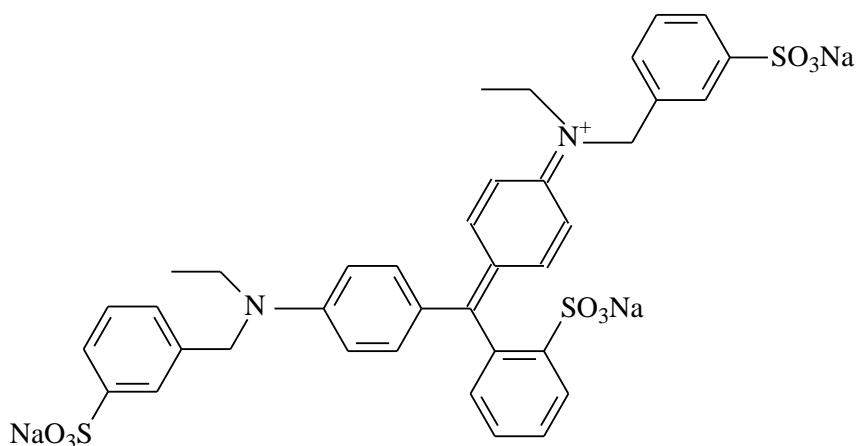
No Brasil, a ANVISA, estabeleceu um limite máximo de 0,015; 0,010 e 0,015 mg/100g do alimento para a TT, AC e AB, respectivamente⁵⁰.



Tartrazina



Amarelo Crepúsculo



Azul Brillhante

Figura 1.2 - Estruturas químicas dos corantes tartrazina, amarelo crepúsculo e azul brilhante.

Devido a estudos já realizados, a ANVISA também estabeleceu normas para a aplicação, principalmente da tartrazina, tanto em alimentos como em medicamentos. De acordo com estas normas, estes produtos devem possuir mensagem alertando sobre possíveis reações alérgicas em pessoas sensíveis à tartrazina, como asma, bronquite e urticária⁵⁵. Entretanto, os estudos sobre os

efeitos alérgicos da tartrazina ainda não são conclusivos, e por isso optou-se por não individualizá-la dos demais ingredientes nos rótulos de alimentos (como ocorre com o glúten e a fenilalanina), mas apenas registrá-lo junto com os demais ingredientes^{1, 53, 55}.

1.3.2 Métodos analíticos para a determinação dos corantes TT, AC e AB

A quantificação individual ou simultânea dos corantes TT, AC e AB têm sido usualmente realizada por métodos cromatográficos⁵⁶⁻⁶⁵ ou espectrofotométricos⁶⁶⁻⁷¹. No entanto, os métodos espectrofotométricos apresentam problemas na determinação simultânea desses corantes, isto devido à interferência de um corante sobre o outro na resposta espectrofotométrica obtida.

Alguns métodos eletroanalíticos também já foram desenvolvidos para a determinação individual ou simultânea desses corantes⁷²⁻⁸¹. Maslowska e Janiak⁷² usaram um eletrodo de gota pendente de mercúrio e a DPV para a determinação de TT. O eletrólito suporte foi o tampão BR (pH 4,10). A linearidade foi obtida na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Neste trabalho também foi realizado um estudo detalhado do efeito do pH e sua relação com o mecanismo de redução do corante.

Ni *et al.*⁷³ também utilizaram um eletrodo de gota pendente de mercúrio e voltametria adsortiva para a determinação dos corantes sintéticos amaranço, amarelo crepúsculo, tartrazina e Ponceau 4R. No entanto, a determinação simultânea direta desses corantes não foi possível devido à sobreposição dos picos de redução dos corantes. Sendo assim, os resultados obtidos foram interpretados utilizando métodos quimiométricos.

Nevado *et al.*^{75, 76} usaram um eletrodo de gota pendente de mercúrio e voltametria de redissolução adsortiva para a determinação de TT⁷⁵ e AC⁷⁶. As

melhores condições analíticas para a determinação destes corantes foram obtidas com 30 s de tempo de acumulação em um potencial de -0,20 V para a tartrazina e 0,15 s de tempo de acumulação em um potencial de -0,40 V para o amarelo crepúsculo. Uma faixa linear foi obtida nas concentrações de 10,0 a 272,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a TT e 5,0 a 90,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o AC.

Kapor *et al.*⁷⁷ desenvolveram um método para a determinação simultânea de tartazina e indigo carmim em preparados sólidos para refrescos e balas, empregando um eletrodo de gota pendente de mercúrio e voltametria de redissolução catódica. O limite de detecção alcançou valores de $7,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $9,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para tartrazina e índigo carmim, respectivamente.

Lopez-de-Alba *et al.*⁷⁸ usaram a polarografia de pulso diferencial juntamente com calibração multivariada para realizar a determinação simultânea de tartrazina, amarelo crepúsculo e vermelho 40 em produtos alimentícios. Os limites de detecção obtidos foram 0,011, 0,020 e 0,013 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Silva *et al.*⁷⁹ construíram um eletrodo tubular de carbono vítreo modificado com polialilamina para a eletrorredução de corantes azo (tartrazina, amarelo crepúsculo e vermelho 40) por SWV e um sistema em fluxo com multicomutação. O limite de detecção obtido foi de $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para a tartrazina, $3,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o amarelo crepúsculo e $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o vermelho 40.

Song *et al.*⁸⁰ estudaram a redução eletroquímica da TT sobre um eletrodo de grafite pirolítico modificado com nanotubos de carbono. Para validar o método proposto o corante TT foi determinado em amostras de preparados sólidos para refrescos. O limite de detecção obtido foi de 0,5 mg L^{-1} ($9,36 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Song *et al.*⁸¹ também estudaram a redução eletroquímica do AC empregando-se um eletrodo de carbono vítreo modificado com

nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Foram obtidas duas faixas lineares nas concentrações de 1,2 - 125,0 mg L⁻¹ e 125,0 - 265,0 mg L⁻¹, e o limite de detecção foi de 0,5 mg L⁻¹ ($1,10 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). O método desenvolvido se mostrou satisfatório e também foi aplicado na determinação de AC em amostras de preparados sólidos para refrescos.

Muitos dos métodos supracitados empregaram eletrodos de mercúrio, eletrodo que vem sendo substituído por outros eletrodos sólidos, devido à sua toxicidade, ou ainda, utilizaram métodos quimiométricos para a quantificação simultânea desses corantes, características que inviabilizam ou dificultam a aplicabilidade destes métodos em análises de rotina.

1.4 Eletrodo de diamante dopado com boro (BDD)

O diamante é conhecido desde o ano 3.000 a.C. como um cristal misterioso, indestrutível e de brilho atraente, que esteve sempre associado à sorte, riqueza, ostentação, entre outras. Por volta de 1772, o químico Antoine Lavoisier foi o primeiro a desvendar sua composição, tendo concluído acertadamente que o diamante era composto apenas de carbono⁸².

O diamante é um material bastante atraente para as mais variadas áreas tecnológicas, devido às propriedades únicas que possui, como, alta densidade atômica, dureza, capacidade de isolamento elétrico, força de flexão, alta condutividade térmica e inércia química^{83, 84}. Sendo assim, já no final do século 19 surgem os primeiros relatos das tentativas de se realizar o “sonho” de produzir diamante sintético, porém, até o início da década de 1950 nenhum sucesso havia sido alcançado⁸⁵.

No entanto, durante a década de 1950, pesquisadores da empresa *General Electric* conseguiram sintetizar o diamante por meio de um método a altas pressões e altas temperaturas (sigla em inglês - HPHT). Apesar do grande

avanço tecnológico, o método HPHT utilizado para a síntese do diamante necessitava de instrumentação de alto custo, o que inviabilizou a produção de diamante em grande escala. Por outro lado, na mesma década, um pesquisador da *Union Carbide* conseguiu sintetizar filmes de diamante por deposição química a vapor (sigla em inglês - CVD) usando um fluxo de metano sobre uma grade de diamante aquecida, este método apresenta custo bem inferior ao do HPHT^{84, 86}.

As pesquisas sobre a síntese do diamante avançaram durante as décadas de 70, 80 e 90, e foi principalmente nesta última década que o custo da produção foi significativamente reduzido devido às melhorias na nucleação e taxas de crescimento; além disso, aprendeu-se muito sobre o mecanismo de síntese do diamante⁸⁷. Atualmente, a síntese de filmes finos de diamante pode ser realizada por vários protocolos de deposição estabelecidos na literatura, sendo que o mais usual é o CVD por filamento quente ou microondas^{84, 86}.

O método CVD, baseia-se em produzir hidrogênio atômico e ativar uma fonte carbonácea gasosa produzindo um precursor de carbono sp^3 nas proximidades de um substrato. Os substratos mais empregados para a síntese de filmes de diamante são: silício, molibdênio, tungstênio e quartzo. A escolha do substrato deve levar em conta duas características: (i) tolerância a altas temperaturas de deposição (700 a 900 °C), e (ii) similaridade de coeficiente de expansão térmica com o do diamante ($1,1 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$)^{12, 88}. Os reagentes mais utilizados na síntese do diamante por CVD são metano altamente diluído em hidrogênio, mas, também podem ser empregadas outras substâncias orgânicas como fonte de carbono, tais como metanol, acetona e etanol⁸¹.

O mecanismo para descrever o crescimento do diamante a partir de metano e hidrogênio sobre uma superfície contendo diamante semeado foi descrito em 1993 por Butler *et al.*⁸⁹, e é apresentado da seguinte forma (Figura 1.3): (i) remoção de um hidrogênio do CH_4 por um hidrogênio atômico para

produzir o radical $\text{CH}_3\cdot$, que é o precursor primário de crescimento; (ii) remoção de hidrogênios terminais da superfície do diamante semeado pelo hidrogênio atômico, gerando sítios ativos; (iii) ocupação dos sítios ativos (adsorção) pelos precursores primários; (iv) remoção de um hidrogênio dos grupos metila adsorvidos para produzir sítios ativos para futuras adições de precursores primários; (v) subseqüentes remoções de hidrogênios dos grupos metila acontecem e os grupos radiculares formados ou se ligam entre si, ou se ligam diretamente a sítios formados na superfície. Nesta etapa, formam-se os carbonos sp^3 que dão origem ao diamante^{84, 87}.

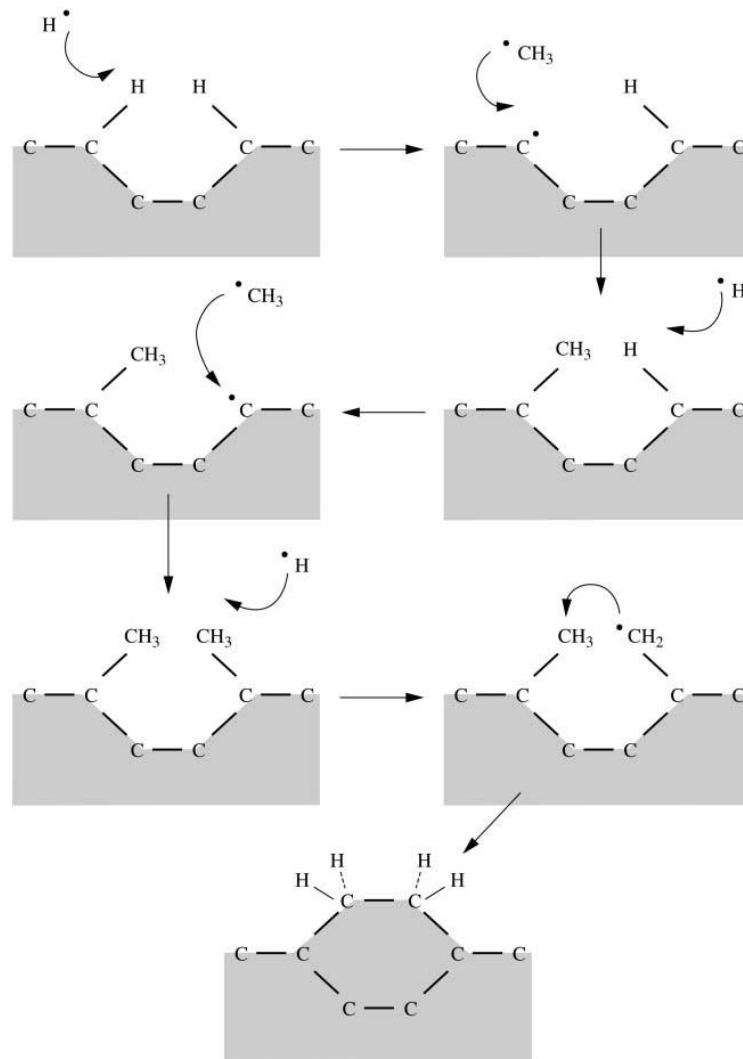


Figura 1.3 - Mecanismo sugerido para o crescimento de diamante a partir de metano e hidrogênio pelo processo CVD⁸⁹.

A partir do momento em que se estabeleceu a tecnologia para produzir filmes finos de diamantes sintéticos, através de reagentes gasosos, pela técnica CVD, surgiu o interesse de se crescer filmes de diamante com características semicondutoras. Assim, em 1973 surgem 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 substrato⁸⁴.

Quando um filme de diamante é apropriadamente dopado, ele adquire boa condutividade e pode se tornar um material promissor para ser empregado como eletrodo⁸⁶. Existem diferentes tipos de dopantes: boro, fósforo, enxofre, nitrogênio, entre outros. Entre esses dopantes, o mais utilizado é o boro, cuja dopagem dos filmes de diamante deve ser com uma concentração de $1,0 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ ou mais. Geralmente o composto utilizado para essa dopagem, que ocorre durante o crescimento do filme, é o trimetilboro, adicionado à fase gasosa em uma concentração na faixa de 10 - 10000 ppm^{90, 91}.

De acordo com De Barros *et al.*⁸⁴ após o crescimento dos filmes de diamante dopado com boro, um dos parâmetros mais importantes na montagem de eletrodos de BDD 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/Ta⁸³. Igualmente importante é o isolamento de todas as partes do eletrodo que não devem entrar em contato com a solução de medida. Assim, o filme deve ter sua borda totalmente vedada, em geral com borracha de silicone, ou deve ser embutido 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 suporte⁹². 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 vedação.

Na eletroquímica, um eletrodo de BDD foi utilizado pela primeira vez por Y. V. Pleskov e colaboradores em 1987⁸⁰. Desde então, como já mencionado, uma das aplicações que mais tem despertado interesse, é a fabricação de eletrodos de BDD para uso eletroquímico^{14, 90}. No Brasil, eletrodos de BDD já estão sendo preparados há alguns anos, utilizando-se a técnica CVD, inclusive sobre diferentes substratos^{93, 94}, e têm sido cada vez mais utilizados para diversas aplicações eletroquímicas.

Os eletrodos de BDD possuem um número importante de propriedades eletroquímicas distinguíveis das de outros eletrodos de carbono ligados por sp^2 comumente usados, tais como carbono vítreo, grafite e pasta de carbono. Estas propriedades são^{12, 83, 95}:

- estabilidade 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;
- larga janela de potencial em meio aquoso e não aquoso, (por exemplo, em meio aquoso, a reação de desprendimento de hidrogênio pode começar somente em potenciais por volta de -1,5 V e a de desprendimento de oxigênio por volta de 2,5 V *vs.* Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Em função dessas propriedades, os eletrodos de BDD têm sido muito estudados nos últimos anos,

tanto do ponto de vista de propriedades eletroquímicas fundamentais^{83, 96-98} como em aplicações ambientais^{95, 99-101} e eletroanalíticas^{10,14, 102-106}.

As superfícies dos filmes de BDD recém preparadas são terminadas em hidrogênio. Entretanto, como apontado por Yagi *et al.*¹⁰⁷ esta terminação pode ser facilmente mudada para oxigênio, por exposição da superfície a um plasma de oxigênio ou a uma solução de ácido forte em ebulição; para isso também se passou a usar polarizações anódicas. Assim, pode-se ter eletrodos de BDD com terminações superficiais tanto de hidrogênio como de oxigênio (Figura 1.4). Os primeiros relatos da influência da terminação superficial no comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD foram em 1999 em trabalhos desenvolvidos por Yagi *et al.*¹⁰⁷ e Granger e Swain⁹⁶, desde então surgiram diversos artigos abordando este tema.

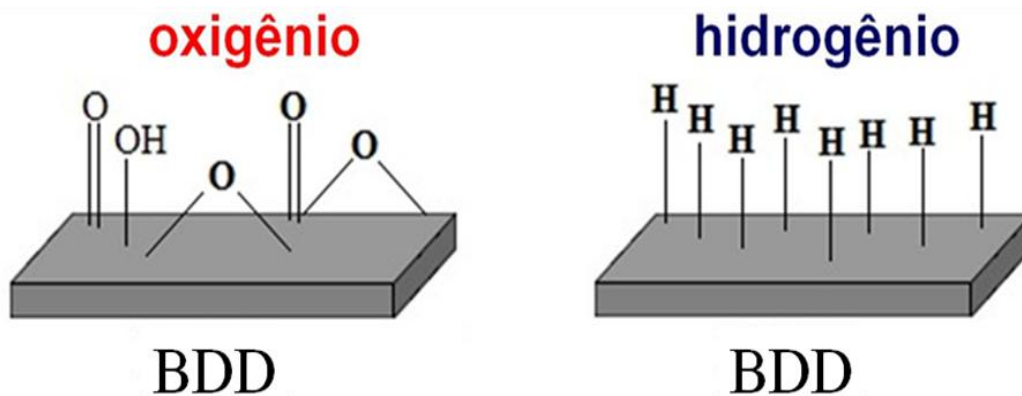


Figura 1.4 - Esquema ilustrativo das diferentes terminações superficiais dos eletrodos de BDD.

No trabalho desenvolvido por Yagi *et al.*¹⁰⁷, foram comparados os comportamentos eletroquímicos de um eletrodo de BDD como preparado (terminação em hidrogênio) e após um tratamento em plasma de oxigênio. Foi observado que a superfície hidrofóbica do eletrodo como preparado se torna hidrofílica após o tratamento, e ainda que o comportamento voltamétrico de pares redox conhecidos foram significativamente diferentes após o tratamento.

A transferência de elétrons dos pares redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e $\text{IrCl}_6^{2-/3-}$ se tornou mais lenta para o eletrodo pré-tratado com plasma de oxigênio, enquanto que, para o par redox $\text{Fe}^{3+/2+}$ a transferência era acelerada e para os pares $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ e $\text{Co}(\text{en})_3^{3+/2+}$ não houve mudança. Segundo os autores, isso indica que há uma diminuição na velocidade de transferência de carga para espécies com cargas negativas quando se utiliza o eletrodo de BDD pré-tratado com plasma de oxigênio.

Granger e Swain⁹⁶ estudaram a influência das terminações superficiais do eletrodo de BDD (obtidas por polarização anódica e por tratamento com plasma de hidrogênio) na reversibilidade de alguns analitos redox, dentre eles o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Eles também observaram que a reação ocorre mediante reações específicas na superfície do eletrodo com terminação em hidrogênio e que essas interações superficiais são bloqueadas quando a superfície do eletrodo contém terminações em oxigênio.

Ferro e De Battisti¹⁰⁸ estudaram o comportamento eletroquímico dos pares redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e $\text{Fe}^{3+/2+}$, em meio aquoso, sobre os eletrodos de BDD como preparado e após polarização anódica (potencial de 3,0 V por 20 min, em solução de HClO_4 1,0 mol L^{-1}). Novamente, os autores relatam uma diferença na resposta eletroquímica do par $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ sobre o eletrodo de BDD como preparado e após polarização anódica. Para o par $\text{Fe}^{3+/2+}$ o efeito foi relativamente pequeno.

Suffredini *et al.*¹⁰⁹ relataram que ao realizar uma polarização catódica (-3,0 V por 30 min em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L^{-1}) de um eletrodo de BDD obteve-se uma melhora significativa com relação à sua resposta eletroquímica e, conseqüentemente, com relação ao limite de detecção para clorofenóis, indicando que as terminações superficiais do eletrodo de BDD têm grande influência sobre seu desempenho analítico. Adicionalmente, Suffredini *et al.*¹⁰⁹ também realizaram medidas voltamétricas com $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ou

ferroceno e observaram que ambos os sistemas apresentaram picos quase-reversíveis, após polarização anódica do eletrodo de BDD (3,0 V, por 30 min em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹) e picos reversíveis após a polarização catódica acima mencionada.

Contudo, observou-se que a resposta eletroquímica do eletrodo de BDD é extremamente dependente do tipo de pré-tratamento realizado em sua superfície, sendo que para alguns analitos o pré-tratamento catódico aumenta significativamente sua atividade eletroquímica, melhorando as condições analíticas dos procedimentos desenvolvidos. Ademais, medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica dos eletrodos pré-tratados anódica e catodicamente confirmaram as diferenças experimentais observadas e salientadas anteriormente. Além disso, segundo Suffredini *et al.*¹⁰⁹, os resultados obtidos sugerem que ocorre uma transformação interna do filme de BDD ou, mais provavelmente, a presença de uma camada ativa responsável pelo comportamento observado⁸⁶.

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, eletrodos de BDD pré-tratados catodicamente apresentaram bom desempenho na determinação de fármacos¹¹⁰⁻¹¹⁴ e edulcorantes^{13, 115, 116}.

Pouquíssimos materiais mostram tanta versatilidade para fins eletroquímicos e eletroanalíticos quanto o diamante dopado com boro. Ele pode ser utilizado em eletroanálise com aumento de estabilidade, precisão e pode proporcionar baixos limites de detecção, além de permitir a determinação de uma ampla variedade de compostos orgânicos que sejam eletroativos¹¹.

1.5 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas envolvem medidas de parâmetros elétricos tais como corrente, potencial e carga, tem ampla faixa de aplicação, incluindo

monitoramento ambiental, controle de qualidade industrial e análises biomédicas¹¹⁷.

As técnicas eletroanalíticas podem fornecer baixos limites de detecção e muitas informações relacionadas ao sistema eletroquímico. Os procedimentos eletroanalíticos ainda podem proporcionar algumas vantagens sobre outros tipos de procedimentos, empregando outras técnicas. Uma dessas vantagens é que as medidas geralmente são específicas para o estado de oxidação característico do analito. Ademais, sua instrumentação é relativamente de baixo custo. Essas vantagens levaram a um aumento substancial da popularidade da eletroanálise⁹.

1.5.1 Voltametria cíclica (CV), Voltametria de onda quadrada (SWV) e Voltametria de pulso diferencial (DPV)

CV geralmente é a primeira técnica utilizada quando se deseja estudar o comportamento eletroquímico de um composto ou a superfície de um eletrodo¹¹⁸. SWV e DPV são técnicas com aplicações de pulsos de potencial que possibilitam à aquisição de dados com limites de detecção comparáveis aqueles obtidos com o emprego de técnicas cromatográficas de separação e detecção, o que permite análises em água, solo, alimentos e, até mesmo, compostos de interesse biológico⁹. A teoria dessas técnicas já está bem estabelecida na literatura, na qual é possível encontrar inúmeros trabalhos abordando-as e descrevendo-as¹¹⁷⁻¹²².

1.5.2 Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA)

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) e detecção amperométrica de um único analito tem sido comumente abordados na literatura. No entanto, uma limitação da detecção amperométrica convencional é

a impossibilidade da determinação simultânea de substâncias eletroativas com potenciais distintos, já que somente um valor de potencial constante pode ser aplicado ao eletrodo. Nestes casos, o mais comum é a utilização de uma técnica de separação (HPLC) antes da detecção dos analitos, ou ainda, o uso de dois ou mais sensores com a aplicação de diferentes potenciais constantes em cada eletrodo. Outra estratégia seria utilizar uma rede de microeletrodos associada a tratamentos quimiométricos para a determinação simultânea¹²³⁻¹²⁵.

Em contrapartida, a MPA é uma técnica pulsada que permite a aplicação de diferentes pulsos de potenciais sequencial e continuamente em função do tempo em um eletrodo de trabalho, diferentemente da técnica amperométrica convencional, na qual apenas um potencial constante pode ser aplicado ao eletrodo de trabalho. É possível a aplicação de até 10 pulsos de potenciais distintos com a aquisição de 10 amperogramas distintos (um para cada pulso de potencial aplicado).

Disponibilizada em potenciostatos da *Eco Chemie - Metrohm*, a MPA vem sendo amplamente aplicada em inúmeros trabalhos da literatura com intuito principal de realizar a limpeza e ativação dos eletrodos de trabalho durante a análise. Porém, alguns poucos estudos também já relataram as vantagens de se utilizar a MPA acoplada a um sistema FIA na detecção simultânea de diferentes compostos com potenciais redox distintos¹²⁶.

Em MPA, uma plataforma de potenciais apropriados pode ser aplicada em um único eletrodo de trabalho. Assim, é possível detectar cada analito na mistura em seu potencial específico de forma direta ou indireta, com a vantagem de não necessitar de tratamento prévio de amostra ou até mesmo tratamentos quimiométricos dos resultados obtidos¹²⁷.

Surareungchai *et al.*¹²⁸ desenvolveram um procedimento para a análise simultânea de glicose e frutose por MPA acoplada a um sistema FIA, através da aplicação de quatro pulsos de potenciais (E_{det1} , E_{det2} , E_{oxd} e E_{red}) sobre

o eletrodo de ouro modificado com Nafion em meio de NaOH 0,10 mol L⁻¹. A sequência de aplicação dos pulsos de potenciais foi a seguinte: $E_{\text{det1}} = -0,5\text{V}/240 \text{ ms}$, $E_{\text{det2}} = 0,2\text{V}/180 \text{ ms}$, $E_{\text{oxd}} = 1,0\text{V}/180 \text{ ms}$ e $E_{\text{red}} = -0,8\text{V}/300 \text{ ms}$. E_{det1} causa a oxidação da glicose, E_{det2} causa a oxidação da glicose e da frutose, simultaneamente. E_{oxd} foi o pulso de potencial aplicado para a limpeza da superfície do eletrodo e E_{red} foi o pulso de potencial usado para a reativação da superfície do eletrodo. Através do amperograma obtido em E_{det1} foi possível realizar a quantificação direta e seletiva da glicose. Porém, para a quantificação da frutose fez-se uma subtração das correntes dos amperogramas obtidos em E_{det2} e E_{det1} , para assim, obter o amperograma com as correntes correspondentes apenas à concentração de frutose e realizar sua quantificação. Os limites de detecção obtidos foram 1,2 e 0,13 mmol L⁻¹ para glicose e frutose, respectivamente.

Mais recentemente, Santos *et al.*¹²⁷ descreveram o desenvolvimento de um procedimento simples e rápido para a determinação simultânea de paracetamol (PC) e ácido ascórbico (AA) em formulações farmacêuticas usando FIA e detecção com MPA. Foi utilizado um sistema com três eletrodos (disco de ouro como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl_{sat}) como eletrodo de referência e um fio de platina como eletrodo auxiliar) em uma célula com configuração *wall-jet*.

Os compostos foram detectados pela aplicação de uma sequência de quatro pulsos de potencial em função do tempo:

- (1) 0,40 V/100ms: neste pulso de potencial apenas o AA é oxidado e quantificado sem a interferência do PC;
- (2) 0,65 V/100ms: neste pulso de potencial ocorre a oxidação de ambas as espécies (AA e PC), mas somente o produto eletroquimicamente gerado a partir do PC é eletroativo na região catódica;

- (3) 0,00 V/100ms: o produto gerado em (2) na oxidação do PC é reduzido, e assim o PC é quantificado indiretamente sem a interferência do AA;
- (4) -0,05 V/600ms: pulso de potencial usado para regeneração da superfície do eletrodo de ouro.

A faixa de concentração linear foi de 5,0 a 24,0 mg L⁻¹ para o AA e 50,0 a 240,0 mg L⁻¹ para o PC.

Gimenes *et al.*¹²⁹ também descrevem a aplicação de uma sequência de três pulsos de potenciais (0,80 V/700 ms; 0,35 V/30 ms e 0,00 V/500 ms) sobre um eletrodo de GC em uma célula *wall-jet* para a rápida e indireta quantificação de dopamina (DA) na presença de um excesso de AA. Em 0,80 V/700 ms, ocorre a oxidação tanto da DA quanto do AA, já em 0,35 V/30 ms ocorre a redução apenas do produto da oxidação da DA gerado ao aplicar o pulso de potencial de 0,80 V e, em 0,00 V/500 ms faz-se a regeneração da superfície do eletrodo de trabalho (GC). O limite de detecção para a dopamina foi de 50 nmol L⁻¹.

Sendo assim, observa-se que a detecção MPA acoplada a um sistema FIA é extremamente interessante para o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a análise individual ou simultânea de compostos eletroativos, direta ou indiretamente. Ademais, essa técnica apresenta algumas características vantajosas como baixo custo, boa reprodutibilidade, boa sensibilidade, seletividade, menor tempo de análise e menor consumo de reagentes.

Alguns aspectos experimentais da MPA acoplada em um sistema FIA devem ser considerados, tais como: os parâmetros do sistema de análise por injeção em fluxo (vazão da solução transportadora e volume da alça de amostragem) e o tempo de duração do pulso de potencial aplicado na MPA.

Basicamente, os parâmetros do sistema de análise por injeção fluxo são otimizados da forma convencional e já estabelecida na literatura^{130, 131}.

O tempo de duração do pulso de potencial aplicado na MPA é um aspecto bastante importante e pode influenciar significativamente nas componentes de correntes geradas durante a aplicação dos pulsos de potencial. Essas componentes de corrente são: corrente capacitiva (I_C) (originada do carregamento da dupla camada elétrica quando um pulso de potencial é aplicado) e a corrente faradaica (I_F) (originada quando ocorre o processo redox na superfície do eletrodo).

De acordo com Dos Santos *et al.*¹²⁶, “considerando-se a dependência da I_F e da I_C com o tempo de aplicação do pulso de potencial, tem-se que, quanto maior o tempo, menor será a contribuição da I_C ($I_C \propto t^{-1/3}$) para a corrente total. Porém, o sinal amperométrico correspondente ao processo redox do analito, I_F ($I_F \propto t^{1/2}$), não é afetado pela corrente I_C mesmo com tempos de aplicação dos pulsos menores, uma vez que a corrente amperométrica é monitorada antes, durante e após a passagem da zona de amostra no sistema em fluxo”. Sendo assim, a contribuição da corrente capacitiva na corrente residual (linha base) permanece constante durante o registro de todo o amperograma (sinais transientes). Entretanto, o aumento da I_C implicará em um aumento da corrente residual (linha base), levando a um aumento no limite de detecção do analito.

1.6 Objetivos

Este trabalho de doutorado teve como objetivo principal o desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos, para a determinação simultânea dos antioxidantes: BHA e BHT ou dos corantes: TT, AC e AB, empregando as técnicas voltamétricas de pulso e amperométrica de múltiplos pulsos acoplada a um sistema FIA, e o eletrodo de BDD como eletrodo de trabalho.

Outros objetivos foram estudar o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD após diferentes pré-tratamentos eletroquímicos e os mecanismos de reação de cada analito.

Capítulo 2 - PARTE EXPERIMENTAL

2. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão descritos os equipamentos, eletrodos, células eletroquímicas, reagentes, soluções e os procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento deste trabalho de doutorado.

2.1 Instrumentação

Para as medidas voltamétricas e amperométricas foi utilizado um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT-30 (Ecochemie) interfaciado a um computador e gerenciado por um programa computacional GPES 4.0.

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

As medidas de pH das soluções foram feitas utilizando-se um pHmetro Orion modelo EA 940.

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

Uma centrífuga modelo T21, da marca Sorvall foi utilizada no preparo das amostras de maionese e margarina.

As medidas cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AT Shimadzu com detector de UV-VIS modelo SPD-M10AVP com uma coluna C₁₈ Shim-Pack CLC-ODS (60 × 150 mm, 5 μm) e um injetor manual com alça de amostragem de 20 μL.

2.1.1 Eletrodos

2.1.1.1 Eletrodo de trabalho

Os eletrodos de trabalho utilizados para os estudos eletroanalíticos foram de diamante dopado com boro (Figura 2.1) com áreas de $0,72 \text{ cm}^2$, nas determinações voltamétricas dos antioxidantes (BHA e BHT); $0,30 \text{ cm}^2$, nas determinações voltamétricas dos corantes (TT, AC e AB) e $0,33 \text{ cm}^2$, nas medidas amperométricas (MPA) realizadas com sistema FIA. Os eletrodos de BDD foram fabricados pelo *Centre Suisse de Electronique et de Microtechnique SA* (CSEM), em Neuchatêl, Suíça, com um teor de boro de 8000 ppm^{132} . O eletrodo de BDD utilizado foi sintetizado sobre um substrato de silício dopado pela técnica de HF CVD (*Hot Filament Chemical Vapor Deposition*), cuja fase gasosa consistia de metano (CH_4), com excesso de hidrogênio (H_2) e o gás de dopagem utilizado foi o trimetilboro¹³³. Antes de qualquer medida eletroquímica, um processo de limpeza do eletrodo de BDD foi realizado. Neste procedimento o eletrodo de BDD foi imerso em isopropanol e deixado em banho ultrassônico por 10 min.

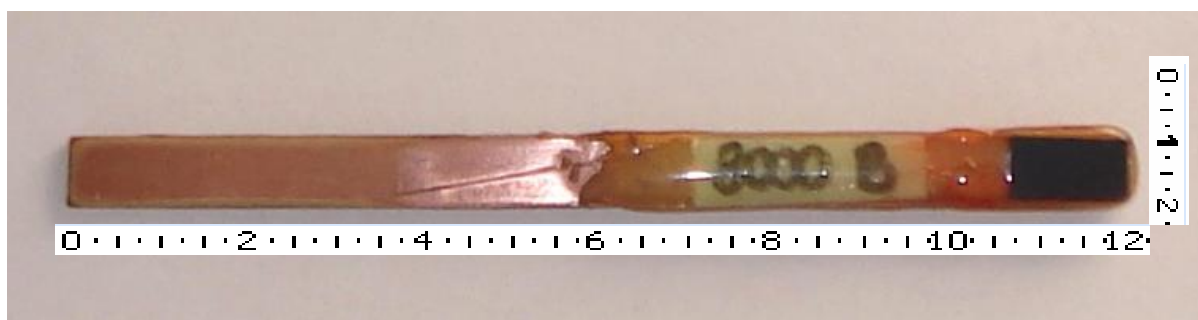


Figura 2.1 - Fotografia do eletrodo de BDD com área de $0,72 \text{ cm}^2$, utilizado nas medidas voltamétricas.

Um eletrodo de GC de área $0,20 \text{ cm}^2$ também foi utilizado como eletrodo de trabalho para comparar o comportamento eletroquímico de cada analito sobre esses dois diferentes tipos de eletrodos de carbono (BDD *vs.* GC). Antes de ser utilizado, o eletrodo de GC foi pré-tratado com um polimento seqüencial com alumina ($1,0 \text{ }\mu\text{m}$ e $0,05 \text{ }\mu\text{m}$)/água sobre pano de feltro, depois, foi deixado em banho de ultrassom por 5 minutos e lavado com água.

2.1.1.2 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 alguns dias. A extremidade desse eletrodo era sempre mantida em solução de $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para as medidas amperométricas foi utilizado o eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) miniaturizado¹³⁴.

2.1.1.3 Eletrodo auxiliar

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. Nas medidas amperométricas foi utilizado um tubo de aço inox acoplado na saída da célula eletroquímica com configuração *wall-jet*.

2.1.2 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.

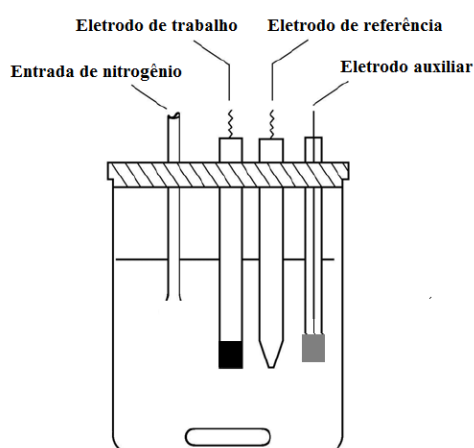


Figura 2.2 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica.

Outra célula eletroquímica com volume de 50 mL foi utilizada apenas para a realização dos pré-tratamentos anódicos e catódicos no eletrodo de BDD que era inserido na célula eletroquímica com configuração mista (*wall Jet/camada delgada*), para as medidas amperométricas em fluxo. O eletrodo de BDD era inserido em um adaptador especial (tarugo) de tal forma que estivesse firmemente preso por meio de um *O-ring* de borracha. Resultando em uma área geométrica ($0,33 \text{ cm}^2$) similar a área exposta na célula eletroquímica com configuração *wall Jet/camada delgada*. O contato elétrico era estabelecido por uma placa de cobre pelo lado do substrato recoberto por uma fina camada de ouro. Na Figura 2.3 são mostradas as fotografias do adaptador para o eletrodo BDD. Essa configuração especial foi necessária porque o eletrodo de BDD não

poderia ser fixado em uma placa de cobre como o eletrodo mostrado na Figura 2.1, pois, posteriormente seria inserido na célula *wall Jet/camada delgada* para as análises amperométricas em fluxo.

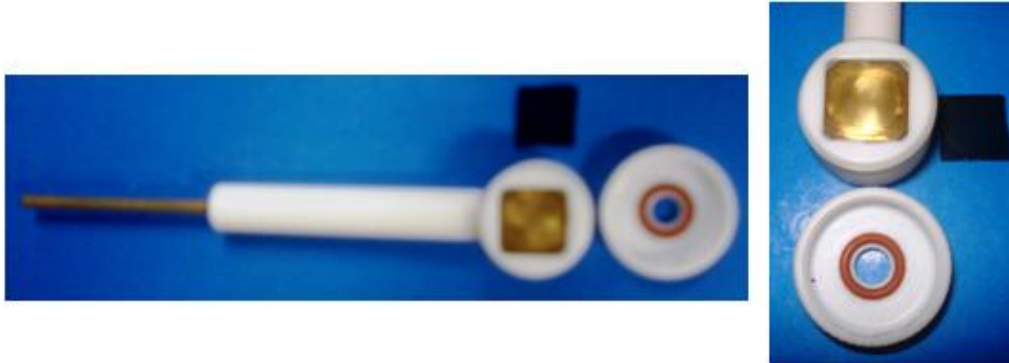


Figura 2.3 - Adaptador para o eletrodo de BDD.

2.1.2.1 Célula eletroquímica com configuração *wall Jet/camada delgada*

Para as medidas amperométricas com MPA acoplada a um sistema em fluxo foi construída uma célula com configuração mista entre a configuração *wall Jet* e *camada delgada*. Esta célula foi projetada de acordo com um modelo proposto pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Lúcio Angnes (USP-SP)¹³⁵ com algumas modificações e adaptações feitas pelo Prof. Leonardo Santos Andrade (UFG). As Figuras 2.4 e 2.5 mostram as fotografias das partes necessárias para a confecção e para montagem do detector eletroquímico, respectivamente.

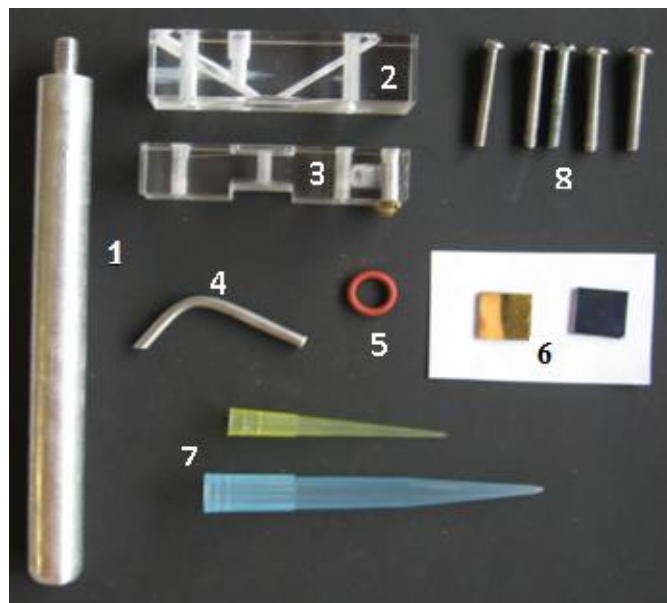


Figura 2.4 - Fotografia mostrando as partes necessárias para a confecção e montagem da célula eletroquímica para análises em fluxo: (1) Haste em Al; (2) e (3) suportes em acrílico para acomodação de: (4) tubo em aço inoxidável, (5) *O-ring*, (6) eletrodo de BDD (frente e verso-Au) e (7) ponteiras usadas para confecção do eletrodo de referência miniaturizado e para seu suporte. Fotografias do Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade.

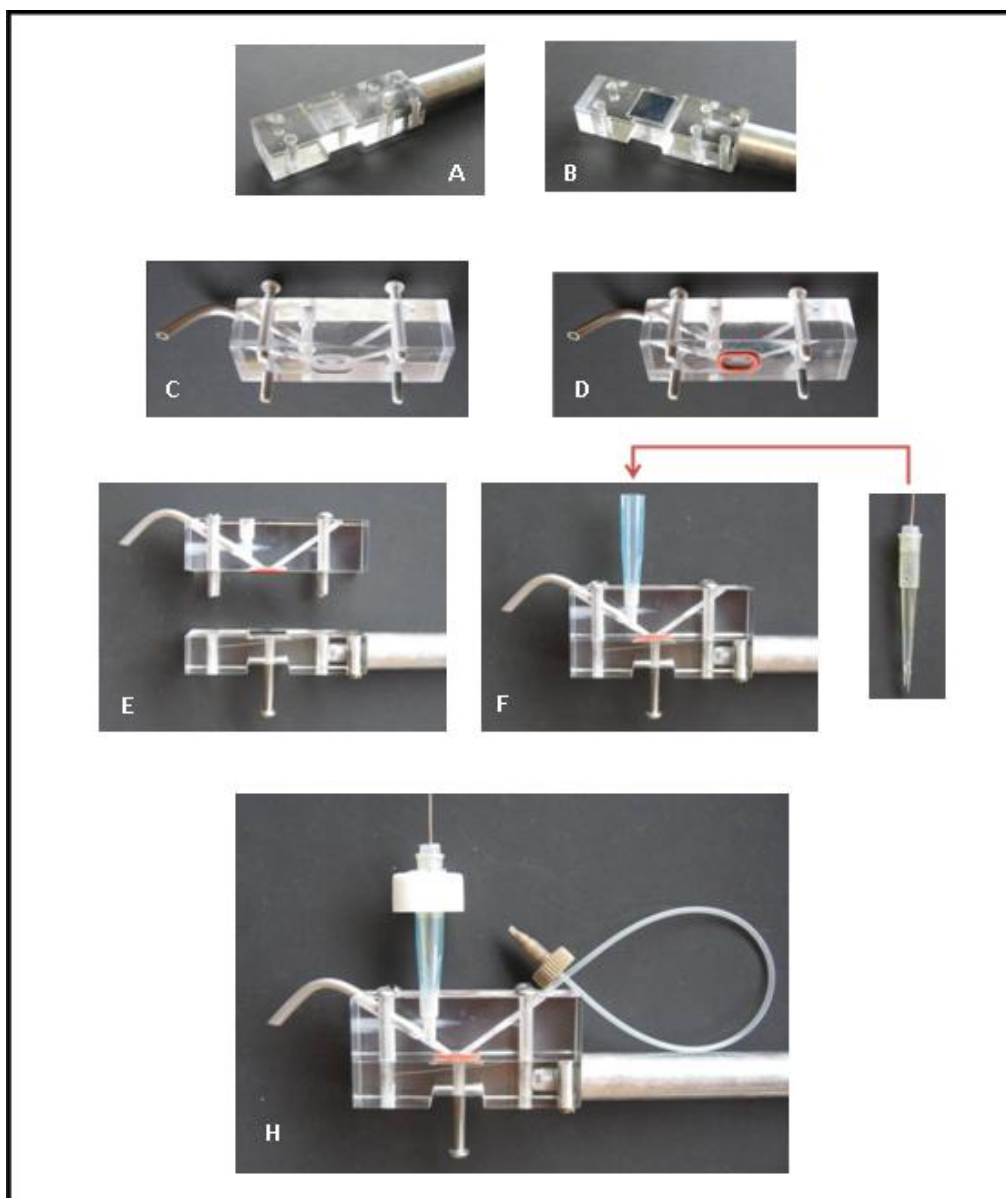


Figura 2.5 - Fotografias mostrando a montagem da célula eletroquímica para análises em fluxo: (A) Haste em alumínio fixada ao suporte em acrílico, (B) suporte em acrílico com o eletrodo de BDD acomodado, (C) e (D) Visão tridimensional do suporte em acrílico para acomodação do tubo em aço inoxidável, do *O-ring* e das ponteiros usadas para confecção do eletrodo de referência miniaturizado e para seu suporte, (E) e (F) Justaposição das peças com auxílio de parafusos e contato elétrico feito com outro parafuso rosqueado pela parte inferior do detector, (G) eletrodo de referência de Ag/AgCl miniaturizado e (H) detector eletroquímico completamente montado, contendo os eletrodos de trabalho, de referência e contra-eletrodo (tubo de aço inox). Fotografias do Prof. Dr. Leonardo Santos Andrade.

2.1.3 Sistema FIA

O sistema FIA foi constituído de uma linha única e composto basicamente por um sistema propulsor, um injetor, um detector eletroquímico e tubos de polietileno 0,8 mm de diâmetro interno. O esquema do sistema FIA de linha única está apresentado na Figura 2.6.

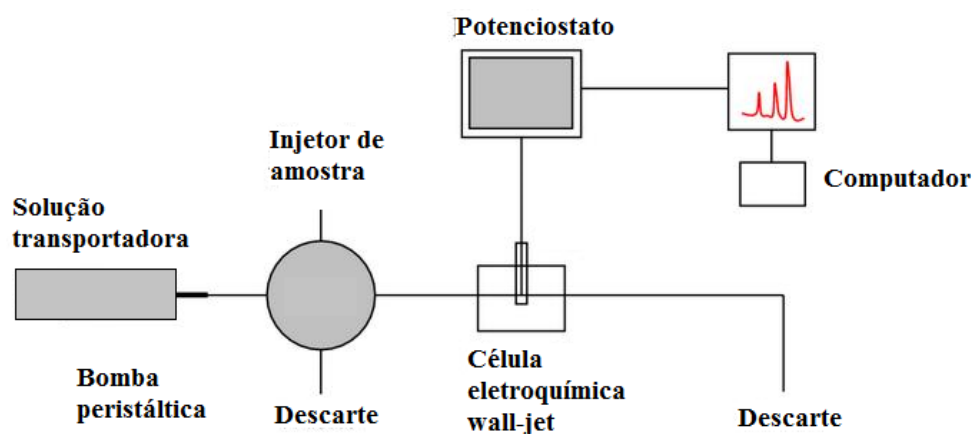


Figura 2.6 - Sistema FIA de linha única.

O sistema propulsor foi uma bomba peristáltica Ismatec. As amostras e soluções de referência foram introduzidas no sistema em fluxo utilizando um injetor comutador manual construído em acrílico. Foram utilizados tubos e conexões de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm, para confecção das bobinas reacionais, alças de amostragem e linhas de condução das soluções. Os tubos de propulsão foram de Tygon[®]. O detector eletroquímico foi a célula eletroquímica com configuração *wall-jet/camada delgada* e o eletrodo de trabalho foi o BDD.

2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico, e todas as soluções foram preparadas em água destilada, deionizada e purificada em um sistema *Milli-Q* (Millipore[®], Bedford, MA) com resistividade maior do que 18,2 MΩ cm.

As soluções de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Synth 98% m/m) foram preparadas em diferentes concentrações, diluindo-se volumes apropriados desse ácido em água, sendo padronizada com solução de NaOH, padronizada previamente.

A solução de KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ foi preparada por dissolução de 0,505 g em água contendo 30% v/v de etanol, em balão de 500,0 mL.

A solução de cloreto de potássio 0,1 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 0,745 g de cloreto de potássio em 100 mL de água.

A solução de hexacianoferrato de potássio $1,1 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ foi preparada previamente ao uso, dissolvendo-se 0,905 g de hexacianoferrato de potássio em 25 mL da solução de cloreto de potássio.

As soluções estoque de BHA (Sigma) e BHT (Sigma) foram preparadas na concentração de 1,0 mmol L⁻¹ por dissolução de 0,00451 g e 0,00551 g, respectivamente, em solução de KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ contendo 30% de etanol v/v, em balão volumétrico de 25 mL. A adição de 30% v/v de etanol à solução de KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ foi necessária para a completa dissolução dos antioxidantes.

As soluções estoque dos corantes TT (Sigma), AB (Sigma) e AC (Sigma) foram preparadas na concentração de 1,0 mmol L⁻¹ por dissolução de 0,00534 g, 0,00452 g e 0,00854 g, respectivamente, em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹, em balão volumétrico de 10 mL.

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 HNO₃ 10% v/v e posterior lavagem com água deionizada.

2.3 Preparo das amostras

As amostras de maioneses, margarinas, preparados sólidos para refrescos, gelatinas e hidrotônicos utilizadas para a determinação dos antioxidantes ou corantes foram obtidas nos supermercados locais.

2.3.1 Amostras de maioneses e margarinas

Para o preparo das amostras de maionese e margarina foi utilizado um procedimento similar aos propostos por Luque *et al.*⁴⁹ e Raymundo *et al.*⁴³. Uma massa de 1,0 g de maionese ou margarina foi dissolvida em 2,0 mL de etanol em tubo de centrífuga. Após agitação por 5 min e banho de ultrassom por mais 10 min, a amostra foi então centrifugada em 5000 rpm por 10 min. Esses procedimento de extração foi repetido duas vezes, o extrato foi coletado e diluído para 5,0 mL com o eletrólito suporte. Em seguida, alíquotas de 500,0 µL foram transferidas para a célula eletroquímica contendo 9,5 mL de eletrólito suporte (KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ com 30% de etanol v/v) e as medidas foram realizadas para cada amostra. Para as medidas amperométricas (MPA) acoplada ao sistema em fluxo, alíquotas de 500,0 µL da solução de amostra foram transferidas para a um balão de 10,0 mL e o volume completado com eletrólito suporte (KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ com 30% de etanol v/v) previamente a injeção de cada amostra no sistema em fluxo.

Para as medidas com HPLC, após o procedimento de extração, o extrato foi diluído para 5,0 mL com a fase móvel. Em seguida, alíquotas de 500,0 µL foram diluídas novamente para 10,0 mL com a fase móvel e as injeções de 20,0 µL na coluna cromatográfica foram realizadas para separação dos analitos da amostra e posterior detecção.

2.3.2 Amostras de preparados sólidos para refrescos, gelatinas e hidrotônicos

As amostras sólidas foram inicialmente homogeneizadas. Massas de 1,0 g de preparados sólidos para refrescos e gelatinas foram pesadas e dissolvidas em 10,0 mL de uma solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Para completa dissolução da gelatina o ácido sulfúrico foi levemente aquecido. Posteriormente, as soluções das amostras foram para um banho de ultrassom por 10 min para completa extração dos corantes. Essas soluções foram filtradas em papel de filtro.

Depois, uma alíquota de 500,0 µL foi transferida para a célula eletroquímica contendo 9,5 mL de eletrólito suporte (H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹), e as medidas foram realizadas. Para as medidas amperométricas (MPA) acoplada ao FIA ou para as medidas empregando HPLC, alíquotas de 500,0 µL da solução de amostra foram transferidas para a um balão de 10,0 mL e o volume completado com o eletrólito suporte (H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹) /ou a fase móvel previamente a injeção de cada amostra no sistema em fluxo /ou na coluna cromatográfica.

Para as amostras de hidrotônicos, uma alíquota de 1,0 mL da amostra foi transferida diretamente para a célula eletroquímica contendo 9,0 mL de eletrólito suporte (H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹), e as medidas foram realizadas para cada amostra. Para as medidas amperométricas (MPA) acoplada ao FIA ou

HPLC, alíquotas de 1,0 mL da amostra foram transferidas para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com eletrólito suporte ou a fase móvel, previamente a injeção de cada amostra no sistema em fluxo /ou na coluna cromatográfica.

2.4 Procedimento experimental

2.4.1 Estudo do efeito do pré-tratamento sobre o eletrodo de BDD

Sabe-se que a polarização do eletrodo BDD provoca uma modificação em suas terminações superficiais. Por isso, fez-se um estudo com polarizações anódicas e catódicas para comparação e seleção do melhor pré-tratamento do eletrodo de BDD para cada analito.

Para os antioxidantes, BHA e BHT, o pré-tratamento anódico (PTA) foi realizado aplicando-se uma corrente de $1,0 \text{ A cm}^{-2}$ por 20 s, e o pré-tratamento catódico (PTC) de $-1,0 \text{ A cm}^{-2}$ por 120 s. Em seguida, fez-se um estudo do tempo de pré-tratamento catódico (120 s, 180 s e 240 s), que foi o pré-tratamento selecionado para a determinação desses antioxidantes. Após o PTC eram realizados 50 ciclovotamogramas sucessivos em uma velocidade de varredura de potencial de 200 mVs^{-1} em solução do eletrólito suporte para estabilização da resposta.

Para os corantes, TT, AC e AB, o PTA consistiu da aplicação de uma corrente de $0,5 \text{ A cm}^{-2}$ por 60 s, e o PTC de $-0,5 \text{ A cm}^{-2}$ por 180 s. Em seguida, fez-se um estudo do tempo de pré-tratamento catódico (180 s, 240 s e 300 s), que foi o tratamento selecionado para a determinação desses corantes. Após o PTC eram realizados 50 ciclovotamogramas sucessivos em uma velocidade de varredura de potencial de 200 mVs^{-1} em solução do eletrólito suporte para estabilização da resposta.

Em cada dia de trabalho, inicialmente, era realizado um PTA no eletrodo de BDD (para limpeza do eletrodo) em um tempo de quatro a cinco vezes menor que o PTC que era realizado posteriormente. O PTC foi o pré-tratamento que apresentou os melhores resultados para todos os analitos. Para as medidas amperométricas realizaram-se os mesmos pré-tratamentos no eletrodo de trabalho (BDD).

2.4.2 Estudo da área eletroativa do eletrodo de BDD

Empregando a técnica de voltametria cíclica foram determinadas as áreas eletroativas de cada um desses eletrodos. Este estudo foi realizado empregando-se a equação de Randles-Sevcik. Foi realizado um experimento empregando a voltametria cíclica em uma solução de hexacianoferrato de potássio, espécie eletroativa que possui um perfil eletroquímico reversível e cujo coeficiente de difusão em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ é conhecido. Assim, variando-se as velocidades de varredura obteve-se um gráfico de corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura cujo coeficiente angular foi aplicado na equação de Randles-Sevcik e os valores das áreas eletroativas foram obtidas.

2.4.3 Estudo do comportamento voltamétrico dos antioxidantes e corantes sobre os eletrodos de BDD e desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos

Inicialmente utilizou-se a CV para estudar o perfil voltamétrico do eletrodo de BDD e dos analitos, para a determinação do melhor eletrólito suporte e sua concentração e para selecionar o melhor pré-tratamento eletroquímico. A SWV e a DPV foram utilizadas para propor um procedimento

eletroanalítico para a determinação individual e simultânea dos corantes e dos antioxidantes, sobre o eletrodo de BDD. Antes do desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos, os parâmetros físicos das técnicas SWV (frequência de aplicação do pulso (f), amplitude de potencial (a) e incremento de varredura (ΔE)) e DPV (velocidade (v), amplitude de potencial (a) e tempo de modulação do pulso (t)) foram minuciosamente otimizados para assim encontrar as melhores condições analíticas nos procedimentos desenvolvidos.

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 eram obtidos. As amostras foram analisadas pelo método da adição de padrão.

O estudo de repetibilidade intra-dias foi realizado através de medidas voltamétricas consecutivas ($n=10$) de três concentrações diferentes de cada analito.

O estudo de repetibilidade entre-dias foi realizado através de medidas voltamétricas ($n=3$) de três concentrações diferente em 5 dias diferentes.

2.4.4 Estudo do comportamento amperométrico dos antioxidantes e corantes sobre os eletrodos de BDD e da otimização dos parâmetros da detecção por MPA-FIA para desenvolvimento dos procedimentos eletroanalíticos

Inicialmente, utilizou-se a técnica amperométrica convencional para definir os potenciais a serem aplicados para cada analito, através da construção do voltamograma hidrodinâmico: um gráfico das correntes obtidas nos diferentes potenciais aplicados (I vs. E). Posteriormente, a MPA acoplada a um sistema FIA foi utilizada para avaliar a possibilidade da determinação

simultânea tanto dos corantes quanto dos antioxidantes. Neste estudo aplicou-se ao eletrodo de BDD os pulsos de potenciais ótimos para oxidação e redução de cada analito, encontrados através do voltamograma hidrodinâmico, e fez-se medidas com soluções contendo os analitos individualmente e misturados.

Também foram realizados os estudos para a otimização dos parâmetros do sistema FIA, a vazão e a alça de amostragem, com o intuito de encontrar as melhores condições que proporcionassem alta frequência analítica sem interferir na eficiência da análise simultânea tanto dos corantes quanto dos antioxidantes. Os estudos da variação da vazão e alça de amostragem foram feitos de forma univariada.

Estudos do tempo de aplicação de cada pulso de potencial sobre o eletrodo de trabalho para cada analito foram realizados. Os tempos foram variados de 100 a 500 ms.

Após a otimização do sistema em fluxo, as curvas analíticas foram obtidas pelas injeções de diferentes concentrações da solução padrão no sistema FIA. Após cada injeção, os sinais de corrente eram registrados para cada pulso de potencial aplicado, gerando assim, um amperograma em cada pulso de potencial. As soluções das amostras foram injetadas após as injeções da solução padrão para a construção da curva analítica, sendo que, depois das injeções das amostras a solução padrão nas diferentes concentrações para a construção da curva analítica foi injetada novamente, mas no sentido inverso.

O estudo de repetibilidade intra-dias foi realizado através de uma série de injeções (n=10) de três concentrações diferentes de cada analito.

O estudo de repetibilidade entre-dias foi realizado através de uma série de injeções (n=3) de três concentrações diferente em 5 dias diferentes.

2.4.5 Estudo do limite de detecção e recuperação dos analitos

O limite de detecção (LD) foi calculado pelo método da relação sinal-ruído. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de uma solução de referência em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse e um branco (matriz isenta do composto de interesse, neste caso foi utilizado o eletrólito suporte). Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1. Neste trabalho a relação foi de 3 vezes o sinal ruído para o cálculo do LD¹³⁶.

O estudo de recuperação dos analitos (antioxidantes e corantes) foi realizado pela adição de duas concentrações diferentes de uma solução padrão a uma solução de amostra. Descontou-se então dos resultados finais de cada amostra, o valor originalmente presente na amostra, de modo a obter o valor recuperado frente ao padrão adicionado.

2.4.6 Estudo de interferentes

As medidas para determinação de possíveis interferentes foram efetuadas nas mesmas condições experimentais estabelecidas tanto para os antioxidantes (BHA e BHT) quanto para os corantes (TT, AC e AB). Cada um dos possíveis interferentes foi adicionado à solução padrão inicial nas razões de concentrações de 10:1, 1:1 e 1:10 (analito:interferente) e, os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos usando-se apenas a solução padrão de cada analito.

Os compostos analisados como possíveis interferentes na determinação dos antioxidantes BHA e BHT foram: amido, EDTA, ácido ascórbico e ácido cítrico.

Os compostos analisados como possíveis interferentes na determinação dos corantes TT, AC e AB foram: ácido ascórbico, citrato de sódio, ácido cítrico, ciclamato de sódio, sacarina, aspartame e sacarose.

2.4.7 Método comparativo para a determinação dos antioxidantes e corantes

Para ambos os grupos de analitos (antioxidantes e corantes) o método comparativo utilizado empregou a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O procedimento descrito por Perrin e Meyer²⁷ (com algumas adaptações) foi utilizado como método comparativo para a determinação dos antioxidantes BHA e BHT. A coluna cromatográfica empregada foi a Shim-Pack CLC-ODS (6,0 mm × 250 mm, 5 µm). A fase móvel foi acetonitrila/metanol (50/50, v/v) (eluição isocrática). A vazão foi de 1,0 mL /min e o volume das injeções na coluna através de um injetor manual foi de 20,0 µL. Os comprimentos de onda selecionados no detector UV-vis fotodiodo foram 290 nm para o BHA e 278 nm para o BHT.

Para os corantes o procedimento cromatográfico utilizado foi descrito por Miniotti *et al.*⁵⁸. A coluna cromatográfica empregada foi a Shim-Pack CLC-ODS (6,0 mm × 250 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por duas soluções: acetato de amônio 1% (m/v) (0,13 mol L⁻¹), com pH de 7,5 que foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio 10% (m/v) (Fase Móvel A) e a mistura metanol:acetonitrila 80:20 (v/v) (Fase Móvel B) (eluição gradiente). A vazão foi de 1,0 mL /min e o volume das injeções na coluna através de um injetor manual foi de 20,0 µL. Os comprimentos de onda selecionados no detector UV-vis fotodiodo foram 430 nm para a TT, 484 nm para AC e 610 nm para AB.

Capítulo 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nos estudos de área eletroativa do eletrodo de BDD, do comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD em solução de BHA, BHT, TT, AC e AB e do efeito dos diferentes pré-tratamentos eletroquímicos sobre este eletrodo para cada analito. Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos nos procedimentos eletroanalíticos empregando-se as técnicas voltamétricas de pulso (SWV e DPV) e a amperometria de múltiplos pulsos (MPA) acoplada a um sistema FIA para a determinação desses antioxidantes e corantes.

3.1 Janela eletroquímica de potencial do eletrodo de BDD

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 $+2,5 \text{ V vs. Ag/AgCl (KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1})$. Isto se deve ao fato deste eletrodo possuir altos sobrepotenciais para as reações de despreendimento de hidrogênio e de oxigênio.

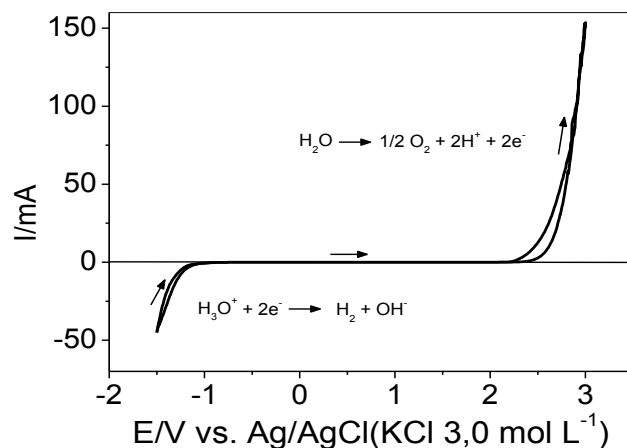


Figura 3.1 - Voltamograma cíclico empregando-se o eletrodo de BDD em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2 Estudos da área eletroativa do eletrodo de BDD

Uma das formas de calcular o valor da área eletroativa de um eletrodo é por meio da equação de Randles-Sevcik:

$$I_p/v^{1/2} = \pm(2,69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}C \quad (3.1)$$

onde A é área ativa do eletrodo (cm^2), D o coeficiente de difusão (cm^2/s), n o número de elétrons envolvidos na reação, $v^{1/2}$ a raiz quadrada da velocidade de varredura (V/s), I_p a corrente de pico (A) e C a concentração (mol/ cm^3).

Porém, essa equação só pode ser aplicada em casos no qual a difusão das espécies para o eletrodo ocorre de forma unidimensional e não tridimensional¹³⁷. Sendo assim, essa equação pode ser aplicada para os cálculos da área eletroativa de eletrodos rígidos com estruturas não porosas, como é o caso dos filmes de BDD.

Empregando-se a voltametria cíclica foram realizados experimentos em diferentes velocidades de varredura, utilizando um eletrodo de BDD em

solução de hexacianoferrato, espécie eletroativa com perfil voltamétrico reversível, cujo coeficiente de difusão é conhecido.

O coeficiente angular obtido do gráfico de I_p vs. $v^{1/2}$ foi aplicado na equação 3.1 junto com os valores de $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $n = 1$ e $C = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$, para se obter o valor da área eletroativa do eletrodo de BDD.

Neste trabalho de doutorado foram utilizados três eletrodos de BDD com áreas geométricas diferentes; sendo assim, foram calculados os valores das áreas eletroativas para esses três eletrodos em duas condições experimentais: (1) eletrodo de BDD limpo apenas com banho de ultrassom em isopropanol por 10 min e lavagem com água Milli-Q; (2) eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente aplicando-se $-0,5 \text{ A cm}^{-2}$ por 180 s. Na Figura 3.2(A) são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varreduras de potencial para um dos eletrodos de BDD pré-tratado catodicamente. Na Figura 3.2(B) é mostrada a relação linear obtida de I_p vs. $v^{1/2}$ e na Tabela 3.1 são apresentadas as áreas geométricas e as áreas eletroativas determinadas para cada um dos eletrodos de BDD nas duas condições experimentais apresentadas anteriormente, utilizando-se a equação 3.1.

Como pode ser observado na Tabela 3.1, as áreas eletroativas dos eletrodos de BDD são menores que as áreas geométricas nas duas condições experimentais estudadas. Notou-se também, que as áreas eletroativas desses eletrodos aumentaram ao se realizar o pré-tratamento catódico, isso comparando com as áreas eletroativas dos eletrodos limpos apenas em isopropanol e água.

Uma explicação para esses valores pode estar relacionada com o que é abordado em um trabalho de Swain e colaboradores¹³⁸. Neste estudo, empregando microscopia de força atômica com ponta condutora e microscopia eletroquímica, esses autores concluíram que o eletrodo de BDD possui uma superfície predominantemente isolante com pequenas áreas condutoras e

menores do que 2,0 μm de diâmetro distribuídas randomicamente e de maneira não uniforme sobre a sua superfície. Eles também observaram que as áreas ativas dos eletrodos de BDD aumentam com o aumento da dopagem com boro e que as áreas condutoras correspondem aos locais na superfície onde o dopante (boro) pode estabelecer contato elétrico com o substrato de silício por meio do filme.

Desta forma, os resultados obtidos para as áreas eletroativas dos eletrodos de BDD estão concordantes com estudos da literatura, indicando que as áreas eletroativas desses eletrodos são menores que as áreas geométricas, já que nem toda área do eletrodo é condutora.

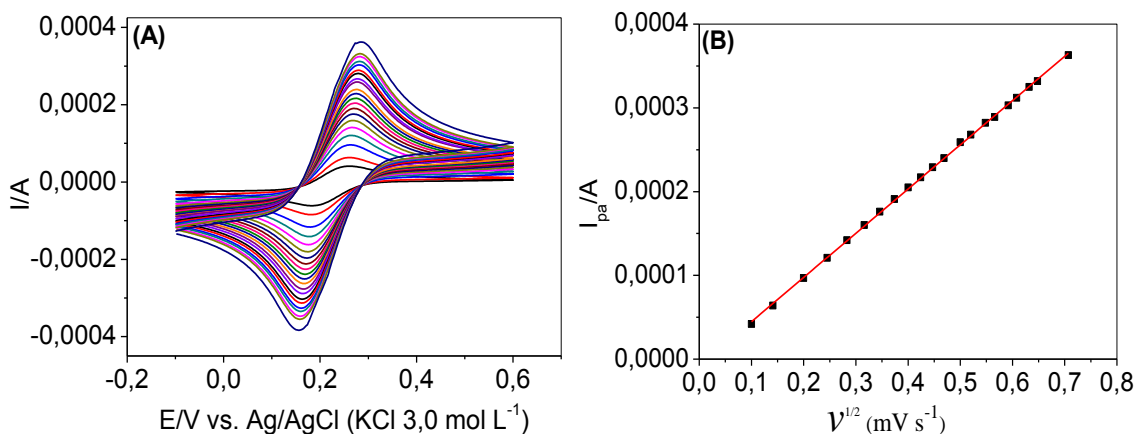


Figura 3.2 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial (10 - 500 mV s^{-1}) para um eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm^2) em solução de hexacianoferrato 3,0 mmol L^{-1} . (B) Relação linear obtida de I_p vs. $v^{1/2}$.

Tabela 3.1 - Valores obtidos para as áreas eletroativas dos eletrodos de BDD empregando-se a equação de Randles-Sevcik

| Eletrodos | Área geométrica (cm^2) | Área eletroativa 1 ^A (cm^2) | Área eletroativa 2 ^B (cm^2) |
|-----------|-----------------------------------|---|---|
| 1 | 0,72 | 0,40 | 0,52 |
| 2 | 0,30 | 0,18 | 0,24 |
| 3 | 0,33 | 0,24 | 0,32 |

^A área eletroativa após limpeza em isopropanol e água; ^B área eletroativa após pré-tratamento catódico

Outros resultados interessantes foram os valores obtidos para as áreas eletroativas dos eletrodos de BDD após pré-tratamento catódico. Os valores obtidos aumentaram cerca de 30% com relação às áreas eletroativas dos eletrodos apenas com limpeza em isopropanol e água. Uma explicação para este comportamento pode estar relacionada ao efeito do pré-tratamento sob a superfície do diamante dopado com boro. Trabalhos desenvolvidos por Suffredini *et al*¹⁰⁹, Becker e Juttner¹³⁹ e Salazar-Banda *et al.*¹³² relatam que os eletrodos sem o pré-tratamento catódico ou pré-tratados anodicamente, ou seja, com terminações em grupos funcionais de oxigênio (descrito na introdução), apresentam uma camada passiva descontínua sobre sua superfície. Essa camada diminui a velocidade transferência de elétrons, resultando na perda da reversibilidade do par redox. Portanto, essa camada passiva sobre a superfície do eletrodo pode bloquear alguns sites ativos presentes na superfície do eletrodo, levando assim a diminuição da área eletroativa dos eletrodos empregados neste trabalho.

3.3 Comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD

3.3.1 Estudo do comportamento eletroquímico dos antioxidantes BHA e BHT sobre o eletrodo de BDD

Foram realizados experimentos preliminares de voltametria cíclica com o eletrodo de BDD em solução de BHA ou BHT a fim de se observar a presença de processos de oxidação ou de redução desses analitos. Os resultados experimentais obtidos (Figura 3.3) mostraram que ambos os antioxidantes apresentam respostas eletroativas no sentido positivo de varredura, ou seja, ocorrem processos de oxidação desses analitos sobre o eletrodo de BDD. Ademais, como pode ser observado na Figura 3.3, não há nenhum pico no

sentido inverso (redução) o que caracteriza um processo irreversível, nessas condições experimentais.

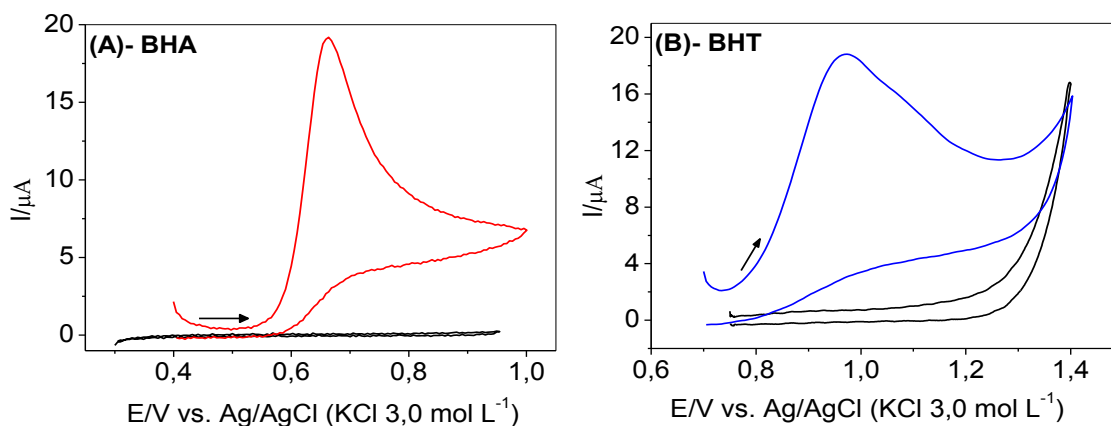


Figura 3.3 - (A) Voltamogramas cíclicos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,72 \text{ cm}^2$), na ausência (linha preta) e na presença de BHA $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha vermelha). (B) Voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD, na ausência (linha preta) e na presença de BHT $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha azul). Eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol, $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

O BHA apresentou um pico de oxidação em torno de $0,66 \text{ V}$ e o BHT em aproximadamente $0,97 \text{ V}$. Estes resultados estão concordantes com aqueles relatados na literatura^{35, 36} empregando-se eletrodos de carbono, como o eletrodo de carbono vítreo e grafite.

3.3.2 Estudo do comportamento eletroquímico dos corantes TT, AC e AB sobre o eletrodo de BDD

Os experimentos de voltametria cíclica com o eletrodo de BDD em solução de TT, AC ou AB também foram realizados com o objetivo de se observar a presença de processos de oxidação ou de redução destes corantes. Na Figura 3.4 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de BDD para cada um dos analitos. Observou-se que todos os corantes

apresentaram um pico no sentido negativo de varredura de potencial o que indica um processo de redução. Ademais, não foram observados picos no sentido inverso, o que caracteriza uma reação irreversível para todos os corantes, nessas condições experimentais.

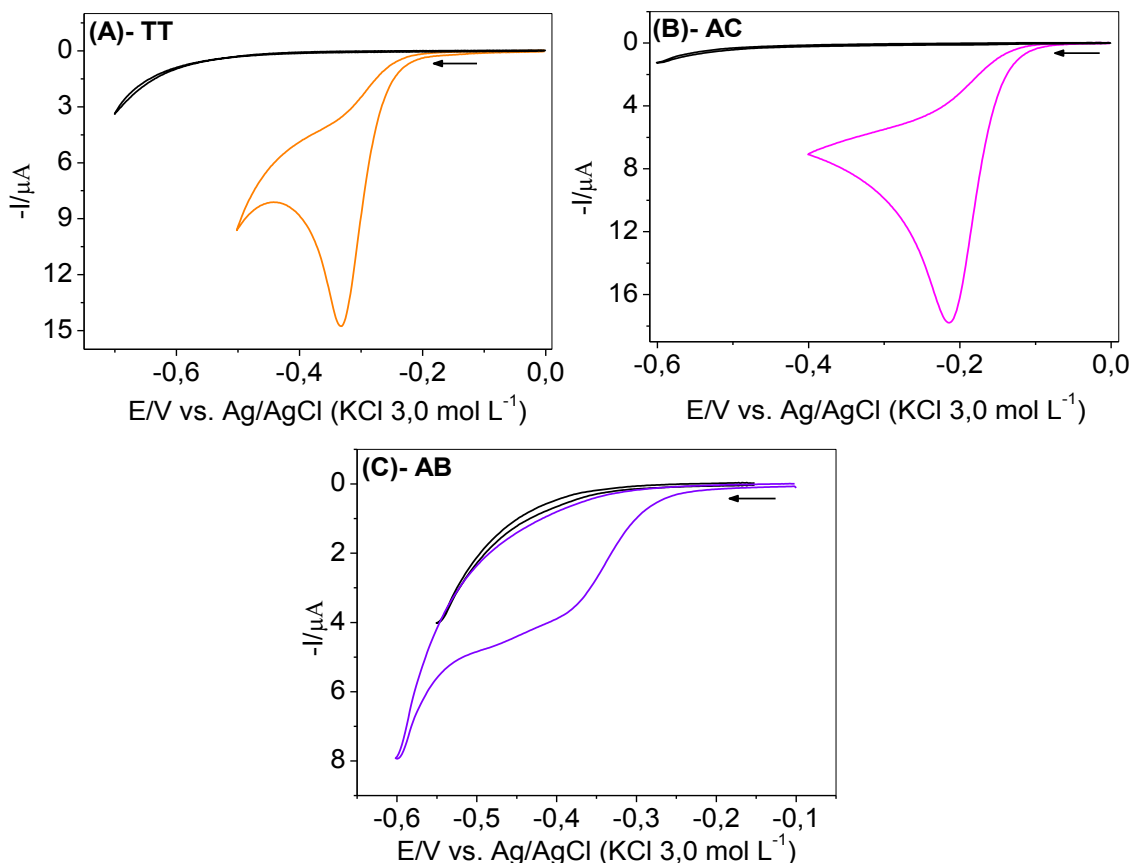


Figura 3.4 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$), na ausência (linha preta) e na presença de TT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha laranja). (B) voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD, na ausência (linha preta) e na presença de AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha rosa). (C) voltamogramas cíclicos empregando o eletrodo de BDD, na ausência (linha preta) e na presença de AB $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha azul). Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Os picos de redução apresentaram valores de potencial em torno de $-0,33$, $-0,21$ e $-0,39 \text{ V}$ para TT, AC e AB, respectivamente. Os potenciais de pico obtidos utilizando o eletrodo de BDD foram menos negativos do que os

potenciais de redução apresentados por outros eletrodos de trabalho descritos na literatura^{73, 78}. Potenciais mais próximos de zero podem diminuir a interferência de outras substâncias.

3.3.3 Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o comportamento eletroquímico do eletrodo de BDD

Como já abordado na introdução, o comportamento eletroquímico do eletrodo BDD é extremamente dependente da terminação superficial do eletrodo (em oxigênio ou hidrogênio), e que essa terminação pode ser mudada através de polarizações eletroquímicas. Alguns trabalhos também relatam que os eletrodos pré-tratados catodicamente apresentaram uma resposta eletroquímica significativamente melhor do que a resposta obtida com os eletrodos pré-tratados anodicamente, e que essa melhora na resposta pode interferir positivamente nas condições analíticas de um procedimento, como por exemplo, melhorar os limites de detecção. Diante disso, optou-se por realizar esses estudos com os diferentes pré-tratamentos (catódico e anódico) para se obter a melhor resposta eletroquímica do eletrodo de BDD para cada um dos antioxidantes e corantes estudados.

3.3.3.1 Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o eletrodo de BDD para os antioxidantes BHA e BHT

Na Figura 3.5 são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de BDD, pré-tratado anodicamente (PTA: $1,0 \text{ A cm}^{-2}$ por 20 s) ou catodicamente (PTC: $-1,0 \text{ A cm}^{-2}$ por 120 s), para o BHA e o BHT. Observou-se que para ambos antioxidantes houve uma melhora na resposta eletroquímica com o eletrodo pré-tratado catodicamente, tanto com relação à

diminuição do potencial de oxidação quanto com relação ao aumento da intensidade de corrente de pico, principalmente para o BHA.

Com o eletrodo pré-tratado catodicamente, o potencial de oxidação do BHA diminuiu cerca de 60 mV enquanto que a intensidade de corrente aumentou cerca de 31%. Para o BHT o potencial de oxidação diminuiu cerca de 150 mV e a intensidade de corrente do pico aumentou aproximadamente 10%. Os resultados obtidos nesse estudo, concordantes com a literatura¹⁰⁶, indicam que os eletrodos de BDD pré-tratados catodicamente deverão apresentar melhor desempenho analítico na determinação desses antioxidantes em alimentos.

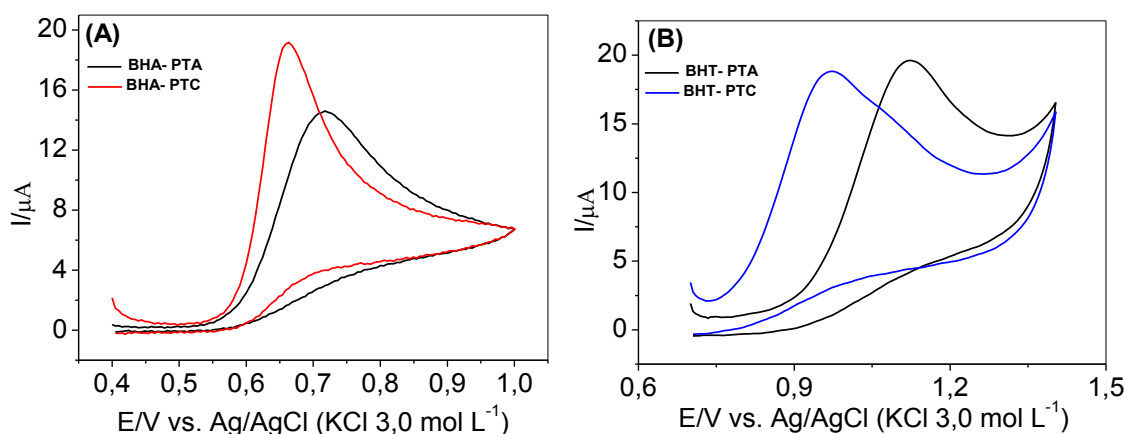


Figura 3.5 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) com diferentes pré-tratamentos em solução de BHA 0,10 mmol L⁻¹ (A) e BHT 0,20 mmol L⁻¹ (B): após PTA (linha preta) e após PTC linha vermelha (para o BHA) e azul (para o BHT). Eletrólito suporte: KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ (30% v/v de etanol, pH_{cond.} = 1,5), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Também foi realizado um estudo do efeito do tempo (carga aplicada) do PTC sobre a resposta eletroquímica obtida com o eletrodo de BDD para os antioxidantes BHA e BHT. Na Figura 3.6 são apresentados os voltamogramas cíclicos em soluções de BHA e BHT, obtidos para o eletrodo de BDD, pré-tratado catodicamente em diferentes tempos. Observou-se que para os tempos de PTC estudados não houve uma mudança significativa na resposta

voltamétrica do eletrodo de BDD. Sendo assim, nos estudos posteriores optou-se por realizar o PTC simplesmente por um tempo de 120 s, o que corresponde a uma carga aplicada de -120 C cm^{-2} .

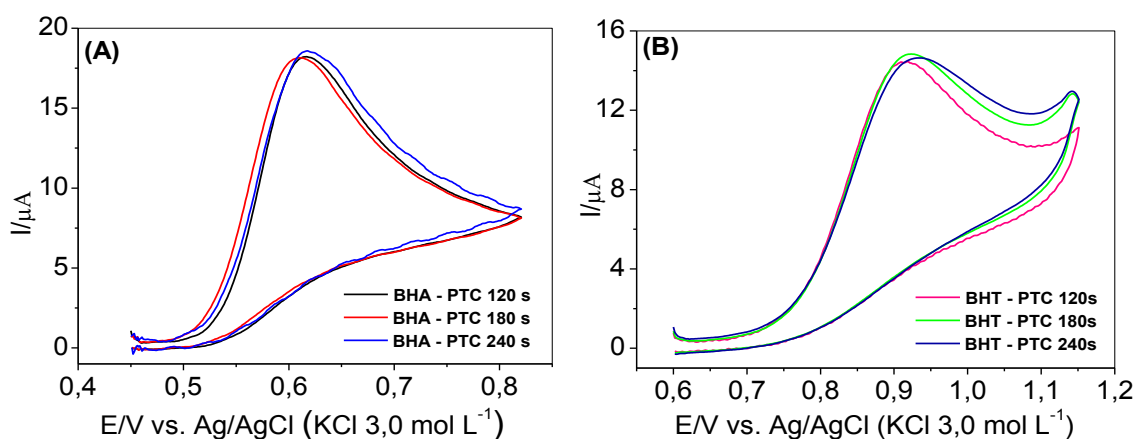


Figura 3.6 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,72 \text{ cm}^2$) pré-tratado catodicamente em diferentes tempos (120, 180 e 240 s): (A) em solução de BHA $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e (B) em solução de BHT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol, $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

3.3.3.2 Estudo do efeito dos pré-tratamentos anódico e catódico sobre o eletrodo de BDD para os corantes TT, AC e AB

Os mesmos experimentos realizados com os antioxidantes foram feitos também com os corantes. Na Figura 3.7 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos em solução dos corantes TT, AC e AB empregando-se o eletrodo de BDD, pré-tratado anodicamente (PTA: $0,5 \text{ A cm}^{-2}$ por 60 s) e catodicamente (PTC: $-0,5 \text{ A cm}^{-2}$ por 180 s).

Analisando-se esta figura, fica claro que o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente apresentou melhores respostas voltamétricas também para os corantes. O potencial de redução aumentou cerca de 50 mV para a TT, porém diminuiu cerca de 22 mV para o AC e 52 mV para o AB. No entanto, na SWV

não foi observada diminuição do potencial de redução para esse último corante. Outrossim, nas respostas voltamétricas obtidas para todos os corantes foi observada um aumento significativo na intensidade de corrente de pico. Esse aumento foi cerca de 60% para o TT, de 44% para o AC e de 24% para o AB. Esses resultados indicam que o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente deverá apresentar melhor desempenho analítico na determinação desses corantes em produtos alimentícios.

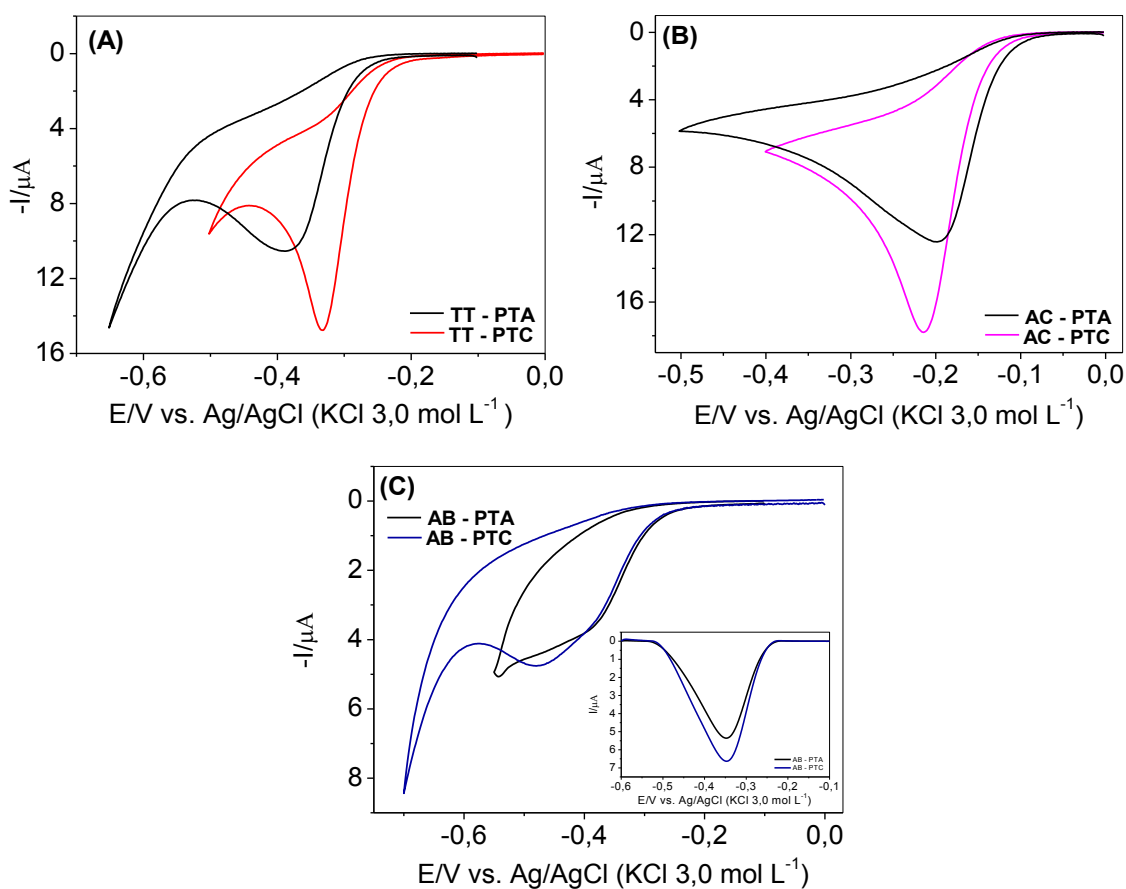


Figura 3.7 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) com diferentes pré-tratamentos, em solução de TT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A), AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) e AB $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (C): após PTA (linha preta) e após PTC (linha vermelha, para o TT, rosa, para o AC, e azul, para o AB). Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$. No gráfico inserido na Figura (C) são apresentados voltamogramas de onda quadrada obtidos para o eletrodo de BDD em solução de AB $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ após os diferentes pré-tratamentos.

Na Figura 3.8 são mostrados os voltamogramas obtidos empregando-se o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente nos diferentes tempos para a TT, o AC e o AB.

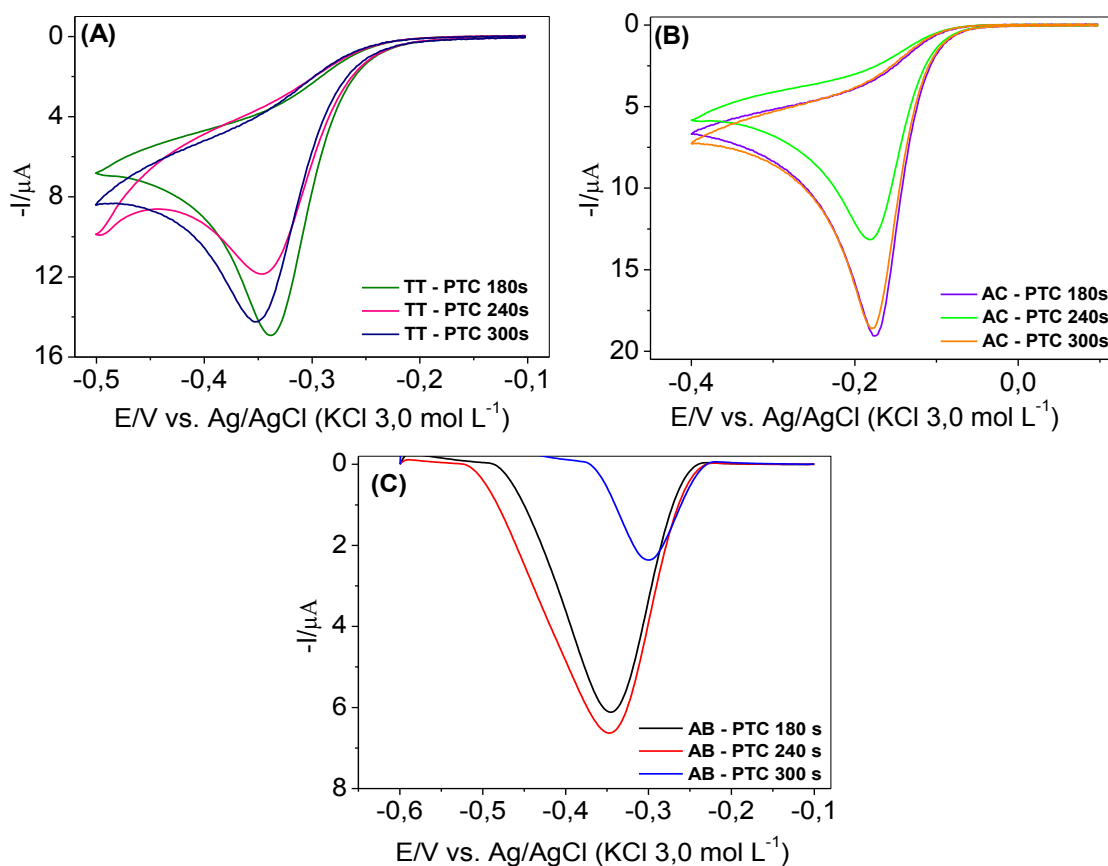


Figura 3.8 - Voltamogramas cíclicos e de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm²) pré-tratado catodicamente em diferentes tempos (180, 240 e 300 s): (A) em solução de TT 0,10 mmol L⁻¹, (B) em solução de AC 0,10 mmol L⁻¹ e (C) em uma solução de AB 0,10 mmol L⁻¹. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Os resultados obtidos mostram que para a TT e o AC nos tempos de 180 s e 300 s a resposta voltamétrica foi praticamente a mesma, enquanto que no tempo de PTC de 240 s houve uma diminuição significativa na intensidade de corrente de pico. Já para o AB, os resultados não puderam ser avaliados por CV devido à dificuldade de visualização das diferenças nas respostas voltamétricas; por isso, adotou-se a técnica SWV. Este corante teve um comportamento um

pouco diferente, para os tempos de 180 s e 240 s não houve mudança significativa na resposta enquanto que no tempo de 300 s há uma diminuição considerável na intensidade de corrente de pico. Sendo assim, optou-se por trabalhar com PTC no tempo de 180 s, o que corresponde a uma carga aplicada de -90 C cm^{-2} .

Salazar-Banda *et al.*¹⁴⁰, usando voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, realizaram uma investigação, via a resposta para a espécie $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, da carga mínima necessária no PTC do eletrodo de BDD para obtenção de bons resultados eletroquímicos. Concluíram que uma carga de somente -9 C cm^{-2} era suficiente, pois a resposta voltamétrica para a espécie $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ já era reversível. Portanto, a carga aplicada no PTC do eletrodo de BDD previamente aos estudos realizados nesta tese sempre foi pelo menos 10 vezes maior que aquela indicada por Salazar-Banda *et al.* como a carga mínima necessária para se obter resultados eletroquímicos de alta qualidade.

3.4 Procedimentos Eletroanalíticos

3.4.1 Determinação de BHA e BHT empregando as técnicas voltamétricas de pulso (SWV e DPV) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente

Os estudos iniciais como o efeito do eletrólito suporte, sua concentração e pH, continuaram sendo realizados por voltametria cíclica. Os eletrólitos suporte utilizados foram H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond.}} = 3,9$), tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond.}} = 6,0$) e tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond.}} = 2,3$). As soluções desses eletrólitos foram preparadas com água e etanol (30% v/v), lembrando-se que para chegar nesse percentual foi realizado um estudo da solubilidade dos antioxidantes no meio hidroetanólico, uma vez que esses antioxidantes não são

completamente solúveis em meio aquoso. Os voltamogramas obtidos para o eletrodo de BDD em solução de BHA e BHT nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na Figura 3.9 (A) e (B).

O eletrólito suporte que proporcionou uma boa resposta para o eletrodo de BDD no processo de oxidação tanto do BHA quanto do BHT foi o KNO_3 . Observou-se que os voltamogramas obtidos com o KNO_3 apresentaram boas intensidades de corrente de pico e perfil voltamétrico melhor definido, principalmente para o BHA, quando comparados com os demais eletrólitos.

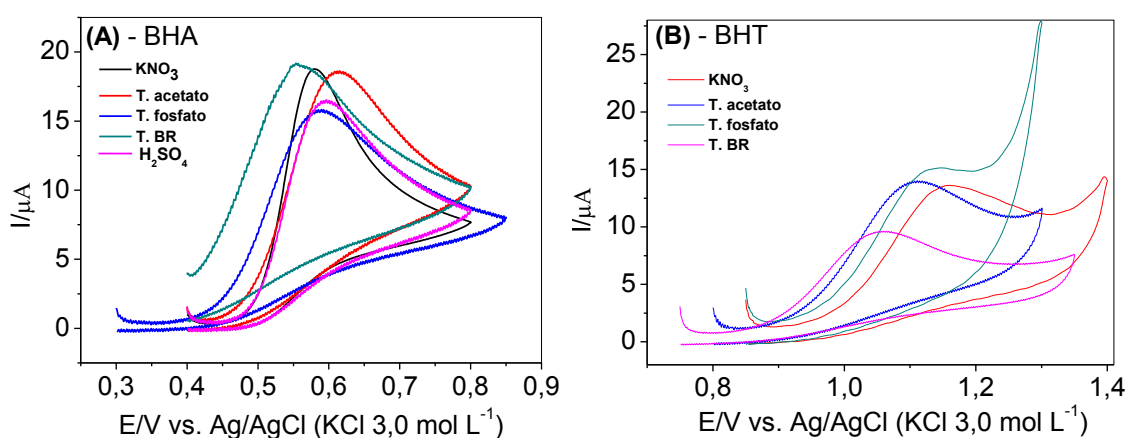


Figura 3.9 - Voltamogramas cíclicos obtido empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) em soluções de BHA 0,10 mmol L⁻¹ (A) e BHT 0,10 mmol L⁻¹ (B) em diferentes eletrólitos suporte: H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹, KNO₃ 0,1 mol L⁻¹, tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH_{cond.} = 3,9), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH_{cond.} = 6,0) e tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH_{cond.} = 2,3), todos os eletrólitos foram preparados com água e etanol (30% v/v), ($v = 50 \text{ mVs}^{-1}$).

Posteriormente foi realizado um estudo variando-se a concentração de KNO_3 . Na Figura 3.10 são apresentados os voltamogramas obtidos para o eletrodo de BDD em solução de BHA e BHT no eletrólito suporte KNO_3 em diferentes concentrações (0,5; 0,1; 0,05 e 0,01 mol L⁻¹).

Observou-se que tanto a intensidade de corrente de pico quanto o potencial de oxidação dos antioxidantes são pouco influenciados pela

concentração do KNO_3 . Diante desses resultados optou-se por trabalhar com uma concentração de KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

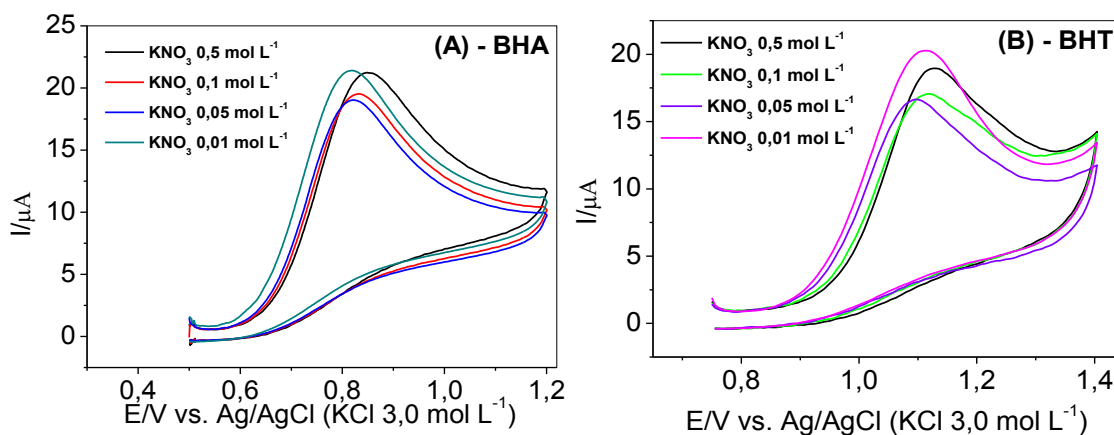


Figura 3.10 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,72 \text{ cm}^2$) em solução de BHA $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e BHT $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) em diferentes concentrações do eletrólito suporte KNO_3 : $0,5$; $0,1$; $0,05$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mVs}^{-1}$).

Ademais, investigou-se o efeito da concentração hidrogeniônica do meio na resposta voltamétrica obtida para o eletrodo de BDD em soluções de BHA e BHT. Os valores de pH foram ajustados com uma solução de ácido nítrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou uma solução de hidróxido de potássio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, lembrando que estes pHs são considerados condicionais devido a percentagem etanol utilizado no preparo do KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos nestes estudos são mostrados na Figura 3.11. Ao analisar os voltamogramas observou-se que a intensidade de corrente de pico diminui significativamente com o aumento do pH_{cond} para ambos os antioxidantes, sendo assim, o pH_{cond} do eletrólito suporte KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ selecionado foi de 1,5 para os experimentos seguintes.

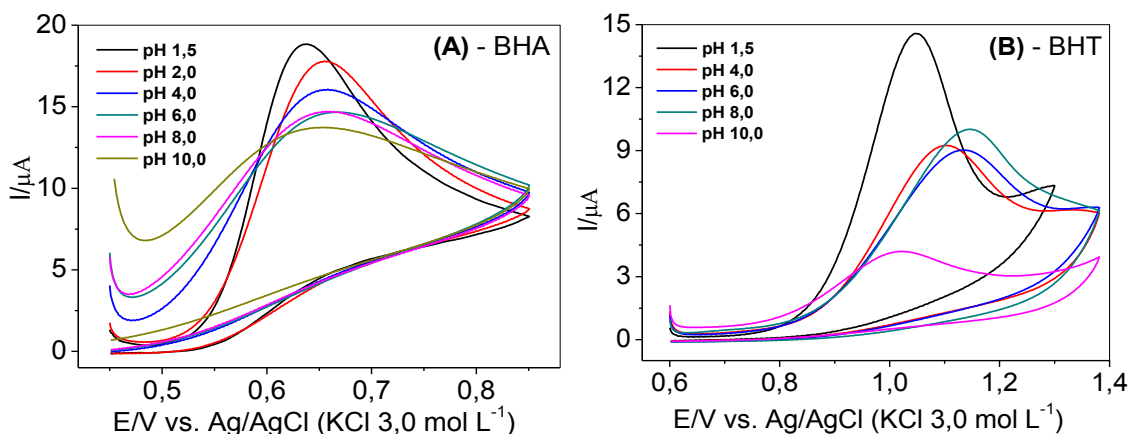


Figura 3.11 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,72 \text{ cm}^2$) em solução de BHA $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e BHT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) em diferentes concentrações hidrogeniônicas (pH_{cond} : 1,5; 2,0; 4,0 6,0; 8,0 e 10,0) do eletrólito suporte KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Após selecionar o melhor eletrólito suporte, sua concentração e pH, realizou-se um estudo, ainda com voltametria cíclica, para obter informações adicionais sobre o processo eletroquímico entre o eletrodo de BDD e os antioxidantes.

De acordo com a literatura^{141, 142}, um dos parâmetros utilizados para identificar se o transporte de massa da reação é controlado por difusão ou adsorção das espécies na superfície eletródica é por meio da dependência existente entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade varredura. Na Figura 3.12 são mostrados os voltamogramas obtidos para o eletrodo de BDD em solução de BHA (A) e BHT (B), em diferentes velocidades de varredura e a dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura é apresentada na Figura 3.13. Ao analisar os voltamogramas observou-se que o potencial de oxidação de ambos antioxidantes desloca-se para valores de potenciais mais positivos com o aumento da velocidade varredura, sendo esse comportamento característico de processos irreversíveis.

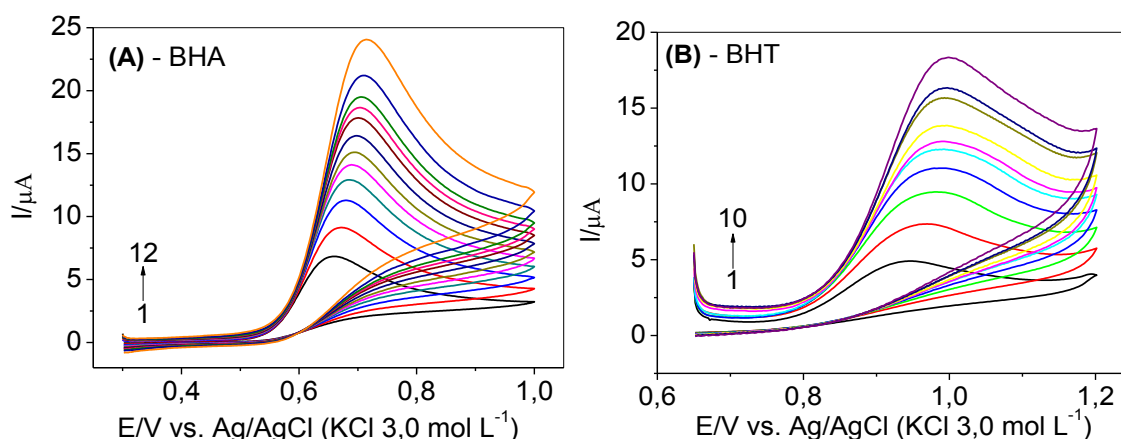


Figura 3.12 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) em solução de BHA 0,10 mmol L⁻¹ (A) e BHT 0,15 mmol L⁻¹ (B) em diferentes velocidades de varredura: (A): 1-12: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 e 150 mVs⁻¹; (B): 1-10: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mVs⁻¹. Eletrólito suporte: KNO₃ 0,01mol L⁻¹ (30% v/v de etanol; pH_{cond.} = 1,5).

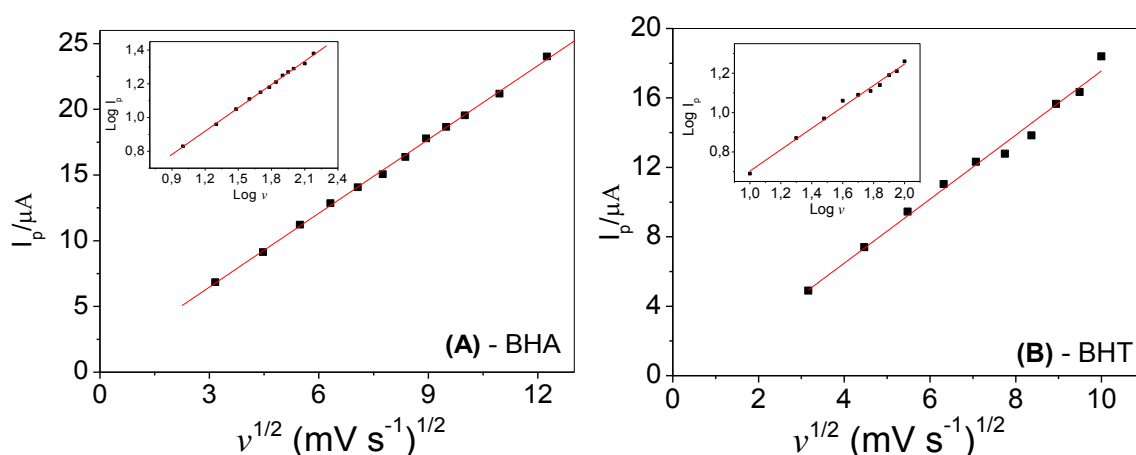


Figura 3.13 - Dependência da corrente de pico pela velocidade de varredura: (A) para o BHA e (B) para o BHT. Os gráficos inseridos correspondem à dependência de $\log I$ vs. $\log v$ para o BHA (A) e para o BHT (B).

Como pode ser observado na Figura 3.13, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura tanto para o BHA ($r = 0,9988$) quanto para o BHT ($r = 0,9868$). Este comportamento é um indicativo de que o transporte de massa de ambos os antioxidantes é controlado preferencialmente por difusão das espécies à superfície eletródica. Observou-se

também que o coeficiente linear obtido é diferente de zero (BHA: $I_p = 0,854 + 1,87 v^{1/2}$; BHT: $I_p = -0,894 + 1,85 v^{1/2}$), provavelmente devido a um fraco processo de adsorção que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho.

Os gráficos inseridos na Figura 3.13 (A) e (B) são a dependência do logaritmo da corrente de pico pelo logaritmo da velocidade de varredura. Como pode ser observado o comportamento de cada um deles foi linear com um coeficiente angular de 0,461 para BHA e 0,544 para o BHT. Esses valores estão próximos do previsto na literatura (valor de 0,50) para sistemas controlados pela difusão das espécies.

3.4.1.1 Voltametria de pulso diferencial (DPV) vs. Voltametria de onda quadrada (SWV)

Os voltamogramas de pulso diferencial apresentaram comportamento parecido com os obtidos por voltametria cíclica, com a presença de apenas um pico de oxidação em torno de 0,60 V para o BHA e 0,95 V para o BHT. Na voltametria de onda quadrada os potenciais de oxidação foram aproximadamente 0,62 e 0,97 V para o BHA e BHT, respectivamente.

Posteriormente, foi realizada a otimização dos parâmetros das duas técnicas de pulso, DPV e SWV, que podem influenciar na resposta voltamétrica. Para a DPV os parâmetros estudados foram: velocidade de varredura (v), amplitude (a) e tempo de modulação (t), e para a SWV: frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE). Nas Tabelas 3.2 e 3.3 são mostradas as faixas de valores estudadas para cada parâmetro, em cada técnica, e os valores destes parâmetros que foram selecionados para os experimentos seguintes.

Tabela 3.2 - Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de BHA e BHT

| Parâmetros DPV | Faixa estudada | Valor selecionado |
|---------------------------|-------------------|----------------------|
| BHA | | |
| v (mV s ⁻¹) | 5 - 70 | 40 |
| a (mV) | 10 - 100 | 60 |
| t (ms) | 5 - 30 | 10 |
| BHT | | |
| v (mV s ⁻¹) | 5 - 70 | 60 |
| a (mV) | 10 - 100 | 60 |
| t (ms) | 5 - 30 | 10 |

Tabela 3.3 - Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de BHA e BHT

| Parâmetros SWV | Faixa estudada | Valor selecionado |
|-------------------|-------------------|----------------------|
| BHA | | |
| f (Hz) | 10 - 200 | 100 |
| a (mV) | 10 - 100 | 50 |
| ΔE (mV) | 1 - 6 | 4 |
| BHT | | |
| f (Hz) | 10 - 200 | 100 |
| a (mV) | 10 - 100 | 50 |
| ΔE (mV) | 1 - 7 | 4 |

Após a otimização dos parâmetros experimentais e dos parâmetros das técnicas da voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, a curva analítica foi construída para os dois antioxidantes, separadamente, pelas duas técnicas. Na Tabela 3.4 estão as condições analíticas obtidas para a determinação de BHA e BHT empregando-se as diferentes técnicas. Pelos resultados obtidos, pode ser concluído que a técnica SWV apresentou as melhores condições analíticas para a determinação de ambos os antioxidantes. Condições analíticas como, o coeficiente angular (sensibilidade) e limite de

detecção foram consideravelmente melhores aplicando-se a técnica SWV, principalmente para o BHA.

Tabela 3.4 - Condições analíticas obtidas para a determinação de BHA e BHT pelas técnicas DPV e SWV

| | BHA | | BHT | |
|--|--|--|--|--|
| | DPV | SWV | DPV | SWV |
| Faixa linear (mol L ⁻¹) | 1,00 × 10 ⁻⁶ - 9,00 × 10 ⁻⁵ | 2,00 × 10 ⁻⁷ - 1,00 × 10 ⁻⁵ | 3,00 × 10 ⁻⁷ - 8,00 × 10 ⁻⁶ | 3,00 × 10 ⁻⁷ - 5,70 × 10 ⁻⁵ |
| Coefficiente angular (μA mol L ⁻¹) | 3,03 × 10 ⁴ | 3,16 × 10 ⁵ | 1,46 × 10 ⁵ | 1,91 × 10 ⁵ |
| Coefficiente linear (μA) | 0,0713 | - 0,0399 | 0,267 | -0,233 |
| Coefficiente de correlação (r) | 0,995 | 0,999 | 0,997 | 0,999 |
| Limite de detecção (mol L ⁻¹) | 7,00 × 10 ⁻⁷ | 1,00 × 10 ⁻⁷ | 2,40 × 10 ⁻⁷ | 1,40 × 10 ⁻⁷ |

Diante desses resultados, a SWV foi a técnica voltamétrica utilizada para desenvolver o procedimento eletroanalítico para a determinação simultânea dos teores de BHA e BHT nos alimentos.

3.4.1.2 Mecanismo de oxidação dos antioxidantes BHA e BHT

Na literatura já existem algumas propostas de mecanismos de oxidação para o BHA envolvendo 2 elétrons e 2 prótons^{37, 42}. Porém, para o BHT ainda não há nenhuma proposta detalhada. A teoria envolvendo a SWV possibilita o estudo dos processos que ocorrem na superfície do eletrodo, como por exemplo, prever o número de elétrons envolvidos na reação.

O número de elétrons para os processos irreversíveis pode ser obtido empregando-se a seguinte equação (eq. 3.2)^{119, 121}:

$$\delta E_p / \delta \log f = -2.3RT / \alpha nF \quad (3.2)$$

na qual, α é o coeficiente de transferência de carga, n o número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação e $\delta E_p/\delta \log f$ é o coeficiente angular obtido da dependência do potencial redox pelo logaritmo das freqüências de aplicação dos pulsos de potenciais.

Na Figura 3.14 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o eletrodo de BDD em solução de BHA e BHT nas diferentes freqüências de aplicação dos pulsos de potencial. Os gráficos inseridos apresentam a dependência de E_p com $\log f$.

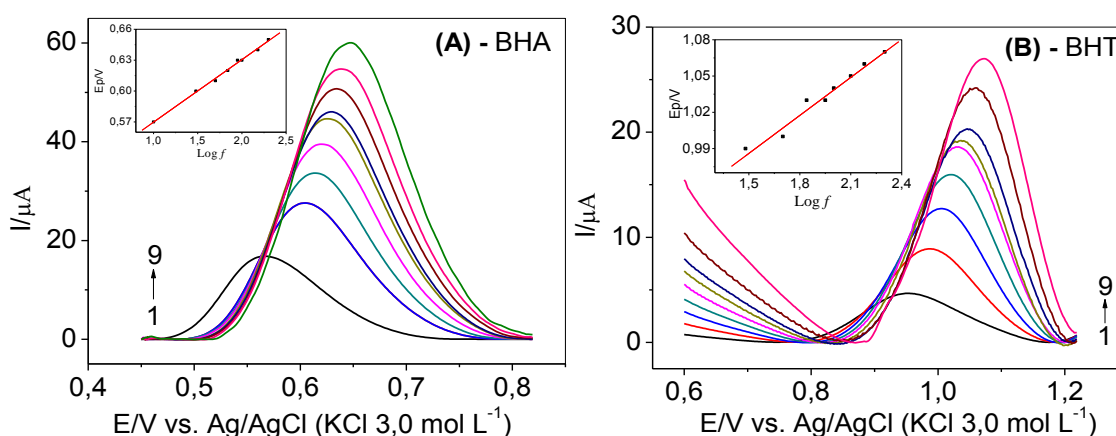


Figura 3.14 - Voltamogramas de onda quadrada (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,72 \text{ cm}^2$) em solução de BHA $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e BHT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B), em diferentes freqüências de aplicação de pulso de potencial (1-9): 10 - 200 Hz. Os gráficos inseridos nas Figuras (A) e (B) correspondem a dependência de E_p pelo logaritmo de f . Eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$).

Os coeficientes angulares obtidos nos gráficos da Figura 3.14 foram: 0,0608 para o BHA e 0,105 para o BHT. Aplicando-se a equação 3.1 calculou-se os valores de αn para o BHA e BHT, que foram iguais a 0,970 e 0,562, respectivamente. Como esses antioxidantes são moléculas orgânicas, o valor de α segundo a literatura¹⁴¹ pode ser considerado como sendo 0,5. Desta forma, foi possível prever o número de elétrons envolvidos no processo de

oxidação do BHA e do BHT, empregando-se os critérios de diagnósticos da técnica de SWV. O número de elétrons obtidos para o BHA foi de 2 elétrons, concordante com a literatura, já para o BHT, o número de elétrons foi igual a 1.

Diante desses resultados, e dos mecanismos propostos na literatura, acredita-se que o mecanismo eletroquímico de oxidação do BHA e do BHT ocorre com a perda de 2 elétrons/2 prótons e 1 elétron/1 próton, respectivamente. Na Figura 3.15 estão os possíveis mecanismos de oxidação do BHA e do BHT.

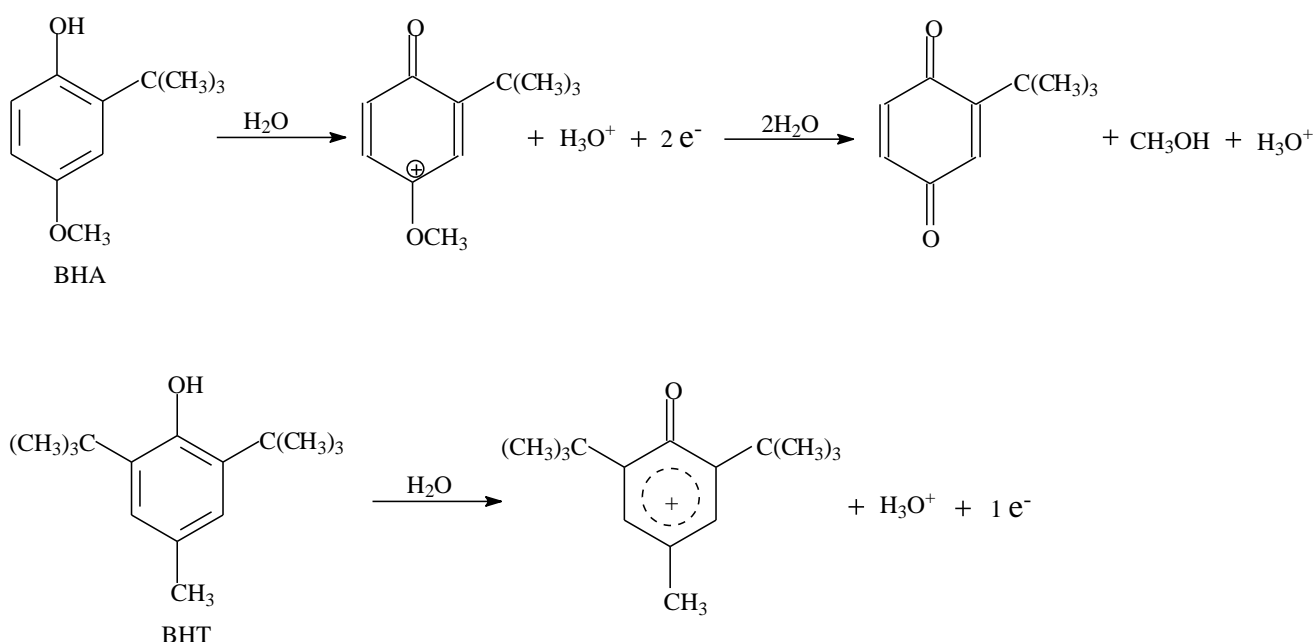


Figura 3.15 - Mecanismos de oxidação do BHA e do BHT.

Outro estudo realizado empregando-se a teoria da SWV foi estimar a concentração de espécie adsorvida na superfície do eletrodo de BDD. Segundo essa teoria, o cálculo da concentração de espécies adsorvidas pode ser estimado pela seguinte equação¹⁴³:

$$I_p = (5 \pm 1) \times 10^2 qan^2 Ffa \Delta E_s \Gamma \quad (3.3)$$

sendo, q a área geométrica do eletrodo, n o número de elétrons, α é o coeficiente de transferência, F a constante de Faraday, ΔE_s é o incremento de varredura, f a frequência de aplicação dos pulsos e Γ é a concentração da espécie adsorvida na superfície do eletrodo.

Para realizar esses cálculos utilizaram-se os voltamogramas (resultados não mostrados) obtidos para o eletrodo de BDD em solução de BHA e BHT em diferentes valores de amplitude, mantendo f e ΔE_s constantes. Através do coeficiente angular obtido do gráfico da dependência de I_p com a variação da amplitude e com o auxílio da equação 3.3 obteve-se os valores da concentração de BHA e BHT adsorvida na superfície do eletrodo de BDD, que foram de $0,10 \text{ nmol cm}^{-2}$ e $11,0 \text{ nmol cm}^{-2}$, respectivamente. Esses resultados indicam uma baixa adsorção das espécies na superfície do eletrodo de BDD, o que é característico desse eletrodo.

3.4.1.3 Determinação simultânea de BHA e BHT por SWV empregando o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente

Inicialmente, foi realizado um estudo com o objetivo de comparar os voltamogramas obtidos na presença de uma mistura de BHA e BHT com um eletrodo de BDD e com outro eletrodo de carbono (carbono vítreo (GC)), a fim de qualificar algumas das vantagens de se utilizar o eletrodo de BDD. Na Figura 3.16 são mostrados os voltamogramas que foram obtidos.

Observou-se que os voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se esses eletrodos apresentaram boa definição de pico tanto para o BHA quanto para o BHT. No entanto, o voltamograma obtido com o eletrodo de BDD apresentou maior intensidade de corrente de pico principalmente para o BHT, e ainda apresentou melhor separação entre os picos dos antioxidantes, que foi de $0,30 \text{ V}$ enquanto que com o eletrodo de GC a separação foi de $0,25 \text{ V}$. Ademais,

durante os experimentos observou-se que o eletrodo de GC apresentou problemas de adsorção, os quais podem na quantificação destes analitos.

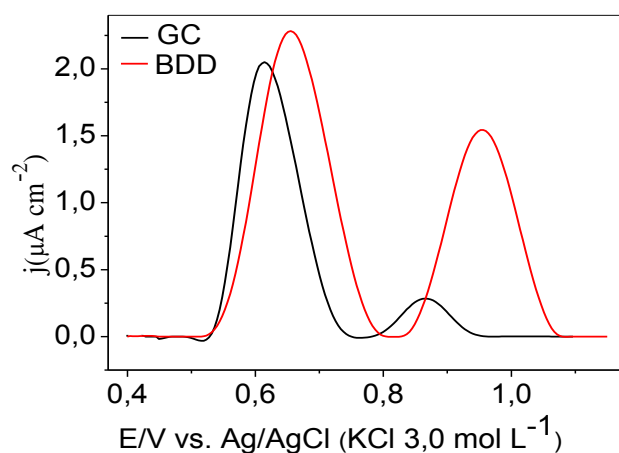


Figura 3.16 - Voltamogramas de onda quadrada (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) pré-tratado catódicamente (linha vermelha) e para eletrodo de GC (área geométrica = 0,20 cm²) (linha preta) em solução de BHA $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ + BHT $1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Eletrólito suporte: KNO₃ 0,01mol L⁻¹ (30% v/v de etanol; pH_{cond.} = 1,5); $f = 100$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV.

Em continuação a esses estudos, a resposta eletroquímica do BHA e do BHT na presença do um e do outro (determinação simultânea) também foi investigada. Na Figura 3.17(A) estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos no intervalo de potencial de 0,45 a 1,15 V, na qual foram feitas adições sucessivas de BHA em diferentes concentrações ($6,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) mantendo a concentração de BHT constante em $7,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Observa-se que, mesmo em concentrações maiores, o BHT não interfere na quantificação do BHA, cuja curva analítica ($I_{pa}/\mu A = 0,0443 + 2,09 \times 10^5 [c/(mol L^{-1})]$, $r = 0,999$) obtida está inserida na Figura 3.17 (A). Ademais, a corrente de pico do BHT se mantém constante mesmo com as adições sucessivas de BHA, com um desvio padrão relativo de 3,02%.

Na Figura 3.17 (B) é apresentado o estudo das adições sucessivas de BHT em diferentes concentrações ($6,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) mantendo-se a concentração de BHA constante em $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Observou-se que o BHA não interfere na quantificação do BHT, cuja curva analítica ($I_{pa}/\mu\text{A} = 0,0443 + 1,23 \times 10^5 [c/(\text{mol L}^{-1})]$, $r = 0,998$) obtida está inserida na Figura 3.17 (B), e que a corrente de pico do BHA também se manteve constante com um desvio padrão relativo de 8,50%.

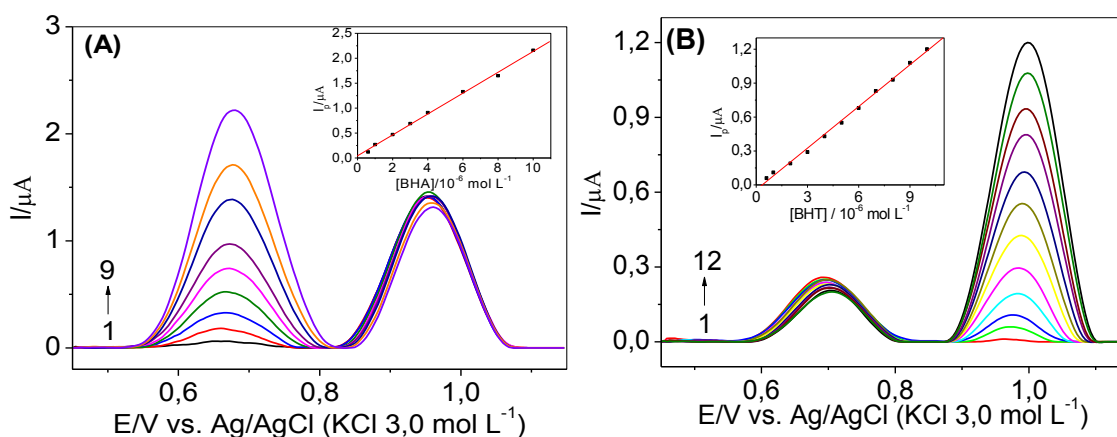


Figura 3.17 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,72 \text{ cm}^2$) em soluções de: (A) BHA: (2-9) $6,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e BHT (1-9) $7,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (constante); (B) BHT: (2-12) $6,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e BHA (1-12) $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (constante). Eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$); $f = 100 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

Posteriormente, foram obtidos os voltamogramas com adições sucessivas e simultâneas de BHA e BHT, nas concentrações de $5,99 \times 10^{-7}$ a $1,01 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para ambos os analitos. Na Figura 3.18 (A) são mostrados os voltamogramas de onda quadrada obtidos e, em (B) e (C), as respectivas curvas analíticas.

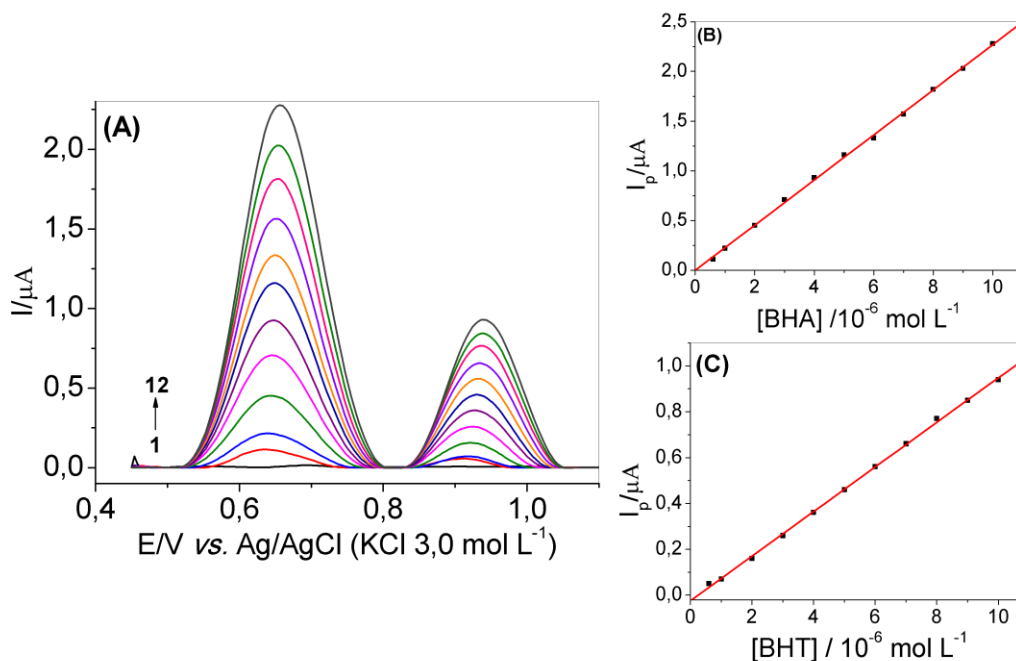


Figura 3.18 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,72 cm²) em diferentes concentrações de BHA e BHT: (1) branco; (2) $6,0 \times 10^{-7}$; (3) $1,0 \times 10^{-6}$; (4) $2,0 \times 10^{-6}$; (5) $3,0 \times 10^{-6}$; (6) $4,0 \times 10^{-6}$; (7) $5,0 \times 10^{-6}$; (8) $6,0 \times 10^{-6}$; (9) $7,0 \times 10^{-6}$; (10) $8,0 \times 10^{-6}$; (11) $9,0 \times 10^{-6}$ e (12) $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, para ambos os antioxidantes. (B) curva analítica obtida para o BHA e (C) curva analítica obtida para o BHT. Eletrólito suporte: KNO₃ 0,01 mol L⁻¹ (30% v/v de etanol; pH_{cond.} = 1,5); $f = 100$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV.

Analisando a Figura 3.18 (B) e (C) pode-se concluir que as curvas analíticas apresentaram boa linearidade nas concentrações estudadas para ambos os antioxidantes.

As equações correspondentes foram:

$$I_{pa}/\mu A = 0,00179 + 2,27 \times 10^5 [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (\text{para o BHA}) \quad (3.4)$$

$$I_{pa}/\mu A = -0,0244 + 9,73 \times 10^4 [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (\text{para o BHT}) \quad (3.5)$$

Os coeficientes de correlação foram iguais a 0,9996 para ambas as equações. O limite de detecção (3 S/N) foi igual a $1,45 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o BHA e $2,47 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o BHT.

A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia (n = 10) de soluções de BHA e BHT em 3 diferentes concentrações. Já a repetibilidade entre-dias foi determinada por medidas de 3 diferentes concentrações em 5 dias diferentes (n=5). Os desvios padrões relativos (RSD) obtidos estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias

| | intra-dias RSD^a (%) | entre-dias RSD^b (%) |
|---------------------------------|---|---|
| BHA (mol L⁻¹) | | |
| $1,0 \times 10^{-6}$ | 1,9 | 3,0 |
| $5,0 \times 10^{-6}$ | 0,96 | 1,9 |
| $1,0 \times 10^{-5}$ | 1,5 | 2,2 |
| BHT (mol L⁻¹) | | |
| $1,0 \times 10^{-6}$ | 3,4 | 4,3 |
| $5,0 \times 10^{-6}$ | 2,0 | 2,3 |
| $1,0 \times 10^{-5}$ | 1,8 | 1,4 |

^a(n = 10); ^b(n = 5)

Os resultados de repetibilidade intra e entre-dias obtidos foram bastante satisfatórios com desvios padrão relativos (RSD) menores que 5% para todas as concentrações estudadas.

3.4.1.3.1 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação

Para investigar a seletividade do eletrodo de BDD, o comportamento voltamétrico dos antioxidantes na presença de diversas substâncias geralmente adicionadas nas amostras analisadas (maionese e margarina) como: amido, ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) e EDTA, foi

estudado. Os testes foram feitos pela adição destes concomitantes à solução padrão de BHA e BHT, ambos na concentração de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O procedimento empregado está detalhado na parte experimental. Na Tabela 3.6 são apresentados os RSDs obtidos para cada analito em comparação com os possíveis interferentes, nas proporções estudadas.

Tabela 3.6 - Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes

| Proporções | RSD (%) | | | |
|------------|-----------|-----------|----------|----------|
| | BHA:Amido | BHT:Amido | BHA:EDTA | BHT:EDTA |
| 10:1* | -0,90 | -0,52 | 1,2 | 1,7 |
| 1:1* | -1,2 | -0,81 | 2,5 | 2,8 |
| 1:10* | -1,5 | -0,90 | 5,7 | 3,1 |
| | BHA:AA | BHT:AA | BHA:AC | BHT:AC |
| 10:1* | 0,30 | 1,1 | 0,00 | 0,51 |
| 1:1* | -1,5 | -3,6 | 0,78 | 0,65 |
| 1:10* | -2,9 | -5,1 | 1,1 | 0,87 |

* analito:interferente

Também foram realizados os experimentos com a mistura dos interferentes nas proporções de 1:1 com os analitos e os RSD obtidos foram 3,2% para BHA e -4,1% para o BHT. Esses resultados indicam que não houve interferência significativa dos compostos comumente encontrados nas amostras que foram analisadas.

O estudo de adição e recuperação do analito de interesse também pode fornecer informações sobre possíveis interferências existentes na matriz dessas amostras sobre a resposta obtida. Para este estudo foram feitos experimentos em triplicata, por meio da adição de alíquotas de solução padrão de BHA e BHT às amostras de maionese e margarina que posteriormente passaram pelo procedimento de extração. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 3.7 e 3.8.

Tabela 3.7 - Estudos de adição e recuperação de BHA em amostras de maionese

| Amostras | BHA (Adicionado)* | BHA (Recuperado)* | % |
|----------|----------------------|--------------------------------|------|
| 1 | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | 95,0 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(5,1 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ | 102 |
| 2 | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(2,2 \pm 0,3) \times 10^{-6}$ | 110 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(5,2 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | 104 |
| 3 | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(2,1 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ | 105 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(5,5 \pm 0,3) \times 10^{-6}$ | 110 |
| 4 | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | 85,0 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(4,8 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ | 96,0 |
| 5 | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | 85,0 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(5,4 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ | 108 |

*n = 3

Tabela 3.8 - Estudos de adição e recuperação de BHT em amostras de maionese e margarina

| Amostras | BHT (Adicionado)* | BHT (Recuperado)* | % |
|---------------|----------------------|--------------------------------|------|
| 1(maionese) | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(2,1 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ | 105 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(5,6 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ | 112 |
| 2(maionese) | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | 90,0 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(4,8 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ | 96,0 |
| 3(maionese) | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | 110 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(4,6 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ | 92,0 |
| 4(maionese) | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(2,1 \pm 0,3) \times 10^{-6}$ | 105 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(4,5 \pm 0,1) \times 10^{-6}$ | 90,0 |
| 5(maionese) | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ | 85,0 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$ | 88,0 |
| 6 (margarina) | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(1,7 \pm 0,6) \times 10^{-6}$ | 85,0 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(4,2 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ | 84,0 |
| 7 (margarina) | $2,0 \times 10^{-6}$ | $(1,8 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ | 90,0 |
| | $5,0 \times 10^{-6}$ | $(4,4 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ | 88,0 |

*n = 3

As recuperações variaram entre 85,0% e 110% para o BHA e 84,0% e 112% para o BHT. Esses valores obtidos indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras nas determinações de BHA e BHT, considerando que para os produtos alimentícios as recuperações aceitáveis podem variar entre 85,0% e 115%¹⁴⁴.

3.4.1.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência - método comparativo

Para avaliar o desempenho do procedimento eletroanalítico desenvolvido empregando a SWV e o eletrodo de BDD na determinação simultânea de BHA e BHT, 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 as moléculas de BHA e BHT apresentaram um tempo de retenção de 6,7 e 8,8 minutos, respectivamente. Na Figura 3.19 são mostrados os cromatogramas obtidos simultaneamente para o BHA e, para o BHT nos respectivos comprimentos de onda. Em destaque são apresentadas as curvas analíticas obtidas para cada antioxidante, no intervalo de concentração de $5,1 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o BHA e $5,8 \times 10^{-7}$ - $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o BHT.

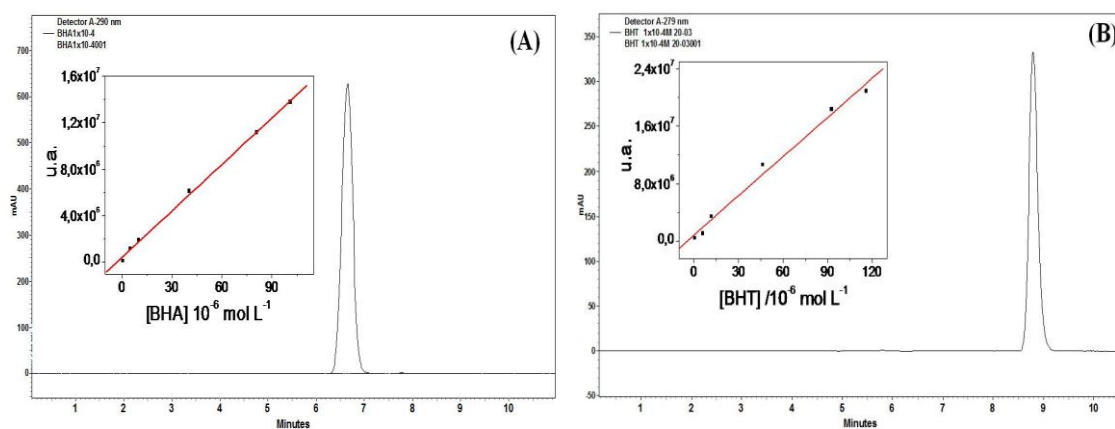


Figura 3.19 - Cromatogramas obtidos para o BHA 0,1 mmol L⁻¹ (A) e para o BHT 0,1 mmol L⁻¹ (B) simultaneamente. Os gráficos inseridos são as respectivas curvas analíticas obtidas em unidades de área para os antioxidantes. Concentrações da curva analítica: BHA: $5,1 \times 10^{-7}$, $5,1 \times 10^{-6}$, $1,1 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$, $8,1 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; BHT: $5,8 \times 10^{-7}$, $5,8 \times 10^{-6}$, $1,2 \times 10^{-5}$, $4,6 \times 10^{-5}$, $9,3 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Fase móvel: acetonitrila/metanol (50/50, v/v) (eluição isocrática), vazão: 1,0 mL /min, volume de injeção: 20,0 µL e os comprimentos de onda: 290 nm para o BHA e 278 nm para o BHT.

As equações das curvas obtidas foram:

$$A(\text{u.a.}) = 4,18 \times 10^5 + 1,33 \times 10^{11} [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (\text{para o BHA}) \quad (3.6)$$

$$A(\text{u.a.}) = 4,45 \times 10^5 + 1,82 \times 10^{11} [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (\text{para o BHT}) \quad (3.7)$$

Todas as amostras analisadas empregando-se o procedimento proposto também foram analisadas empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de validar o procedimento eletroanalítico desenvolvido neste trabalho de tese.

3.4.1.3.3 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando SWV na determinação simultânea de BHA e BHT em amostras comerciais

Amostras de alimentos industrializados (maionese e margarina) contendo esses antioxidantes foram analisadas, a fim de avaliar o procedimento proposto. Para a determinação simultânea destes analitos foi utilizado o método de adição de padrão, mesmo obtendo resultados satisfatórios com relação à interferência das matrizes das amostras. Na Tabela 3.9 estão os resultados obtidos dos teores de BHA e BHT determinados empregando-se os procedimentos voltamétrico e o cromatográfico para todas as amostras de maionese e margarina que foram analisadas.

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois procedimentos aplicou-se o teste *t-pareado*. Para o BHA o $t_{\text{exp}} = 2,45$ e para o BHT o $t_{\text{exp}} = 2,29$, ambos os valores são menores que o $t_{\text{crítico}} = 2,78$ para o BHA e $t_{\text{crítico}} = 2,44$ para o BHT. Sendo assim, os resultados da determinação simultânea de BHA e BHT obtidos empregando-se os métodos proposto (SWV) e o de referência (HPLC) não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95% e, estão dentro de um erro relativo aceitável.

Tabela 3.9 - Resultados obtidos na determinação simultânea de BHA e BHT em produtos alimentícios empregando-se HPLC e SWV

| Amostras | BHA (mg/100 g) | | BHT (mg/100 g) | | BHA | BHT |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| | HPLC ^a | SWV ^a | HPLC ^a | SWV ^a | Erro (%) ^b | Erro (%) ^b |
| Maionese | | | | | | |
| 1 | 2,0±0,1 | 1,9±0,1 | 1,1±0,1 | 1,1±0,1 | -5,0 | 0 |
| 2 | 1,7±0,2 | 1,7±0,1 | 1,3±0,2 | 1,2±0,2 | 0 | -7,7 |
| 3 | 2,3±0,2 | 2,2±0,2 | 1,8±0,2 | 1,7±0,2 | -4,3 | -5,5 |
| 4 | 2,3±0,1 | 2,3±0,1 | 1,4±0,2 | 1,5±0,1 | 0 | 7,4 |
| 5 | 1,9±0,1 | 1,8±0,1 | 1,6±0,2 | 1,6±0,2 | -5,2 | 0 |
| Margarina | | | | | | |
| 6 | ---* | ---* | 4,2±0,2 | 4,0±0,2 | | -4,8 |
| 7 | ---* | ---* | 3,8±0,2 | 3,7±0,1 | | -2,6 |

^a n = 3

^b Erro (%) = 100 × (valor voltamétrico - valor HPLC) / valor HPLC.

* As amostras de margarina não continham BHA.

O procedimento desenvolvido se mostrou simples, rápido e eficiente podendo ser utilizado para a determinação simultânea de BHA e BHT em produtos alimentícios contendo a combinação destes antioxidantes.

3.4.2 Determinação simultânea de BHA e BHT empregando a amperometria de múltiplos pulsos acoplada a um sistema de análise por injeção em fluxo (MPA-FIA) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente

Inicialmente, utilizou-se a técnica amperométrica convencional para a construção dos voltamogramas hidrodinâmicos de cada antioxidante. Como já apresentado anteriormente, os potenciais de oxidação de BHA e BHT estão em torno de 0,66 e 0,97 V, respectivamente. Para a construção dos voltamogramas hidrodinâmicos, os potenciais foram variados em torno dos potenciais de oxidação de cada antioxidante, e as correntes registradas foram colocadas em gráfico em função dos potenciais. Os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos são apresentados na Figura 3.20.

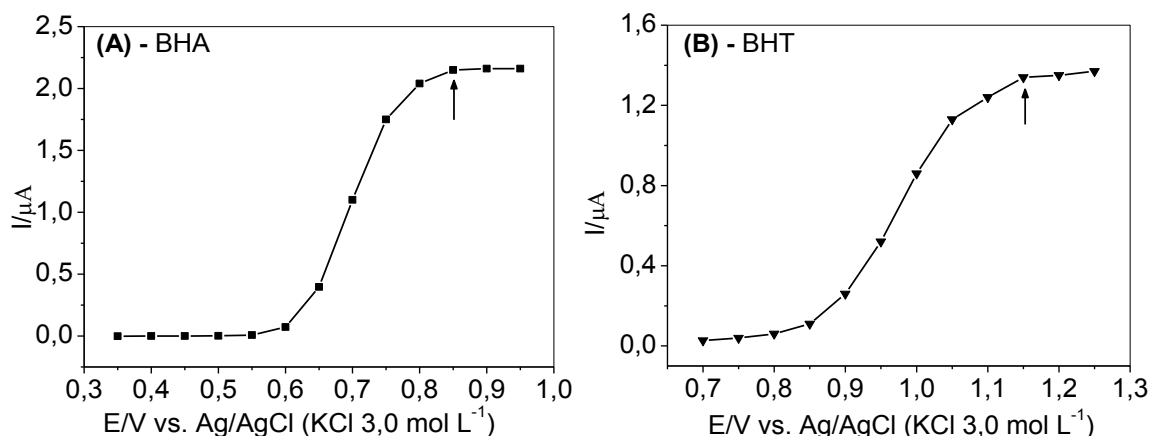


Figura 3.20 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para o BHA $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e BHT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B), empregando-se o eletrodo de BDD. Eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = $350,0 \mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$.

Analisando-se os resultados obtidos observou-se que para o BHA o sinal de a corrente aumenta a partir de $0,6 \text{ V}$ e atinge um máximo de corrente em $0,85 \text{ V}$, para o BHT a corrente aumenta a partir de $0,85 \text{ V}$ e atinge um máximo em $1,15 \text{ V}$. Sendo assim, um potencial igual ou maior a $0,85 \text{ V}$ (ou 850 mV) ou $1,15 \text{ V}$ (ou 1150 mV) pode ser aplicado para a oxidação eletroquímica com o maior sinal de corrente para o BHA e BHT, respectivamente, em um sistema FIA e, estes foram os potenciais selecionados para os estudos posteriores empregando-se a MPA.

3.4.2.1 Otimização dos parâmetros do sistema FIA

Para o desenvolvimento de um bom procedimento empregando um sistema de análise por injeção em fluxo faz-se necessária a otimização de alguns parâmetros como a vazão e o volume da alça de amostragem.

O aumento da vazão do sistema aumenta até certo ponto a magnitude do sinal analítico para cada um dos compostos estudados, isto devido ao fato das espécies estarem chegando mais rapidamente na superfície do

eletrodo, enquanto as espécies já oxidadas ou reduzidas também são rapidamente retiradas da superfície do eletrodo. Desta forma, é importante selecionar a melhor vazão para o procedimento. O volume da alça de amostragem é outro parâmetro importante que está relacionado com a intensidade do sinal de corrente obtido. O sinal de corrente aumenta linearmente com o volume da alça de amostragem até atingir um limite máximo e constante. Na Figura 3.21 é mostrada a dependência do sinal analítico com a vazão (A) e com o volume da alça de amostragem (B), para os antioxidantes BHA e BHT.

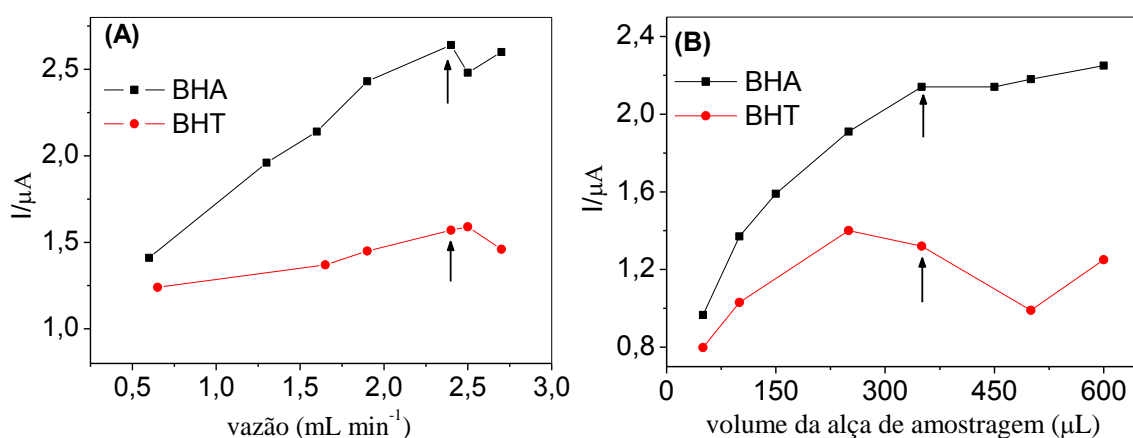


Figura 3.21 - Magnitude da média ($n = 3$) dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (KNO_3 $0,01\text{mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), vazões: $0,65$ a $2,75\text{ mL min}^{-1}$ (A) e em função do volume da alça de amostragem: 50 a $600\ \mu\text{L}$ (B). Concentrações de BHA e BHT: $0,1\text{ mmol L}^{-1}$.

A faixa de vazão estudada foi de $0,65$ a $2,75\text{ mL min}^{-1}$, usando uma solução contendo os dois analitos (BHA e BHT) e aplicando-se os potenciais de 850 e 1150 mV , potenciais ótimos para a determinação de BHA e BHT. A magnitude do sinal analítico (corrente) aumenta até uma vazão de $2,4\text{ mL min}^{-1}$, para ambos os antioxidantes, e se mantém constante, com pequenas oscilações, para valores maiores. Sendo assim, selecionou-se a vazão de $2,4\text{ mL min}^{-1}$ por proporcionar a o maior sinal analítico, boa frequência analítica (63 determinações por hora) e estabilidade da linha base.

O efeito do volume da alça de amostragem foi investigado na faixa entre 50 e 600 μL . A magnitude do sinal analítico aumentou com o aumento do volume da alça de amostragem até o volume de 350 μL . Sendo assim, esse volume da alça de amostragem foi selecionado nos estudos posteriores.

3.4.2.2 Comportamento amperométrico do eletrodo de BDD para BHA e BHT frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial

Após a seleção dos potenciais que serão aplicados e a otimização dos parâmetros do sistema FIA, avaliou-se esse método com a aplicação de uma sequência de dois pulsos de potencial em função do tempo, os quais são apresentados a seguir e na Figura 3.22.

- (1) $E_{\text{det.1}} = +850 \text{ mV}/200\text{ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a oxidação apenas de BHA;
- (2) $E_{\text{det.2}} = +1150\text{mV}/200 \text{ ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a oxidação de ambos os antioxidantes (BHA e BHT).

Cabe enfatizar que a aplicação da técnica MPA empregando-se outros eletrodos de trabalho, há necessidade de se aplicar um pulso de potencial adicional para promover a limpeza e regeneração da superfície do eletrodo de trabalho, devido à adsorção de produtos e/ou reagentes. No entanto, como no eletrodo de BDD, a adsorção de compostos orgânicos e/ou inorgânicos é muito baixa, essa etapa de limpeza da superfície do eletrodo não foi necessária, diminuindo assim a complexidade e aumentando a frequência analítica do procedimento desenvolvido.

Na Figura 3.22 são apresentados os resultados obtidos usando a técnica MPA acoplada ao sistema FIA com a aplicação dos pulsos de potenciais anteriormente discutidos. Este estudo foi realizado em meio de KNO_3 $0,01\text{mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol, $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$) sob o eletrodo de BDD pré-

tratado catodicamente. As soluções foram injetadas em triplicata na ordem: BHA ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$); BHT ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$); e a mistura de BHA e BHT nas mesmas concentrações ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).

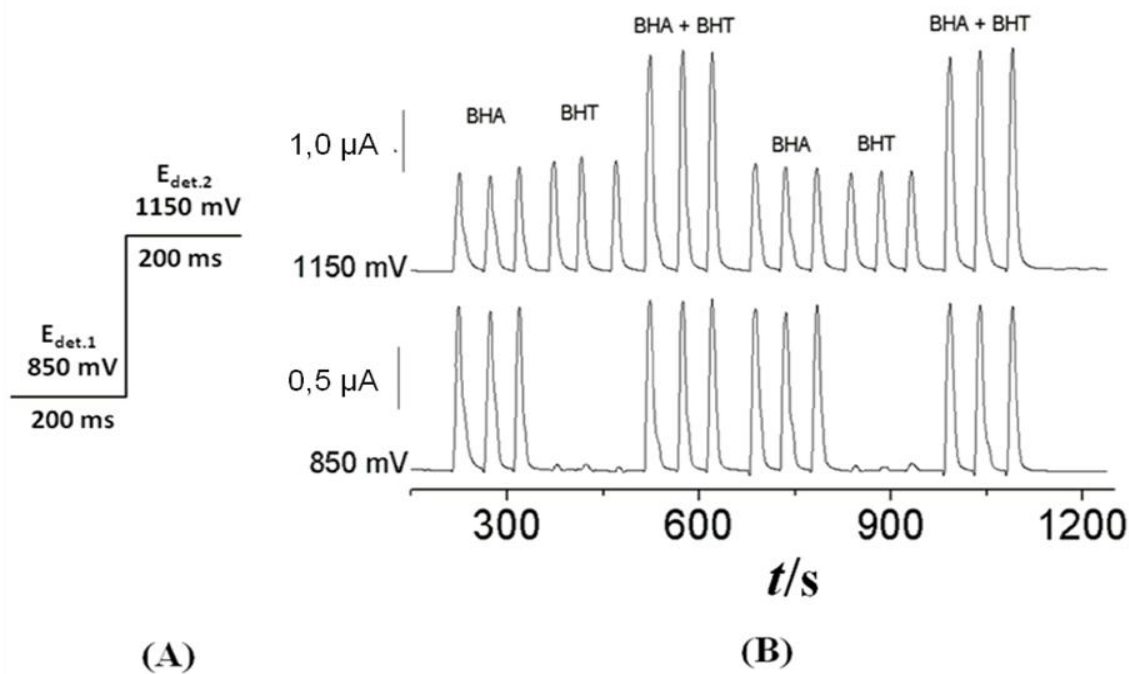


Figura 3.22- (A) Sequência de aplicações dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de BHA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, BHT $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e BHA + BHT nas mesmas concentrações. Solução transportadora e eletrólito suporte: KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = $350,0 \mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$.

Observou-se que em $E_{det.1}$ (850 mV) a corrente aumenta ao injetar uma solução contendo BHA, apenas BHA ou uma mistura, porém em ambos os casos o sinal de corrente obtido está relacionado somente a oxidação do BHA. Enquanto que em $E_{det.2}$ (1150 mV) a corrente aumenta ao injetar soluções contendo apenas BHA, apenas BHT ou uma mistura dos dois, isso significa que o sinal de corrente obtido está relacionado a oxidação de ambas as espécies.

Sendo assim, o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.1}}$ é proporcional a concentração apenas de BHA e, o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.2}}$ é proporcional a soma das concentrações de ambos os antioxidantes. Logo, a quantificação de BHA pode ser feita de forma direta, enquanto que para o BHT é necessária a subtração das correntes ($I_{\text{BHT}} = I_{\text{Edet.2}} - I_{\text{Edet.1}}$), para então se obter os valores de corrente correspondente apenas a concentração de BHT. Dessa forma, é possível determinar BHA e BHT simultaneamente sem a interferência de um sobre o outro.

Posteriormente, foram realizados experimentos com injeções sucessivas em triplicata de diferentes concentrações de uma mistura de BHA e BHT. Na Figura 3.23 estão os amperogramas obtidos para cada um dos pulsos de potencial aplicado e as respectivas curvas analíticas obtidas.

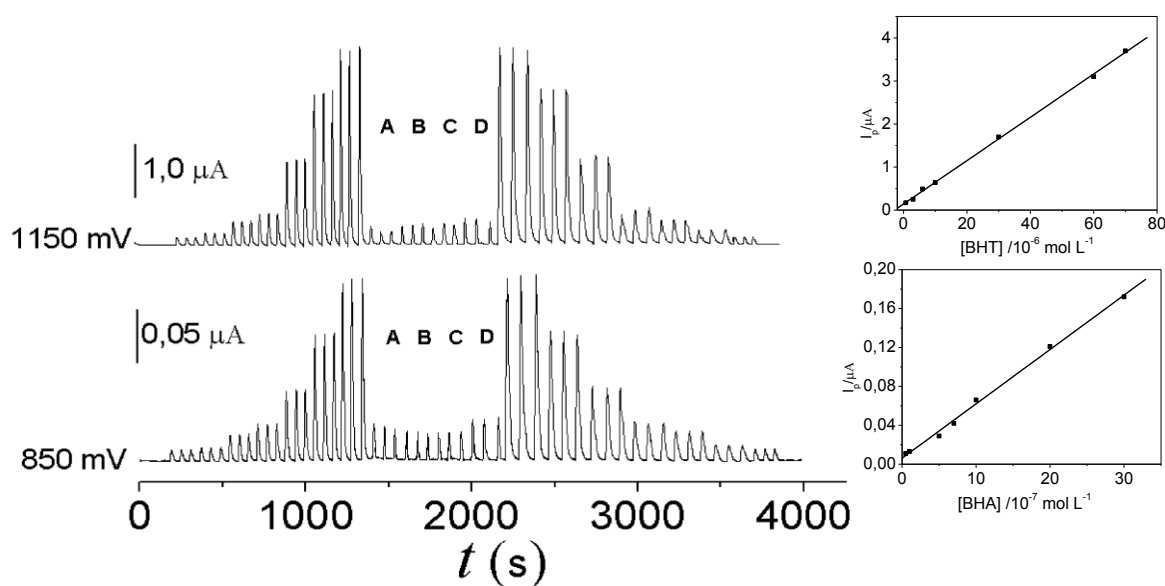


Figura 3.23 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes concentrações de uma mistura de BHA e BHT. Concentrações de BHA: 0,048; 0,10; 0,50; 0,70; 1,0; 2,0 e 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; e de BHT: 0,68; 3,0; 6,0; 10,0; 30,0; 60,0 e 68,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os gráficos (ao lado) são as curvas analíticas obtidas para o BHA e para o BHT. Solução transportadora e eletrólito suporte: KNO_3 0,01 mol L^{-1} (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = 350,0 μL e vazão = 2,4 mL min^{-1} . Os sinais obtidos em A, B, C e D correspondem a quatro amostras de maionese analisadas.

As curvas analíticas apresentaram boa linearidade e as equações correspondentes foram:

$I = I_{\text{Edet.1}}$, para o BHA)

$$I/\mu\text{A} = 0,00619 + 0,0559 [c/(\mu\text{mol L}^{-1})]; r = 0,998 \quad (3.8)$$

$(I = I_{\text{Edet.2}} - I_{\text{Edet.1}}$, para o BHT)

$$I/\mu\text{A} = 0,144 + 0,0503 [c/(\mu\text{mol L}^{-1})]; r = 0,999 \quad (3.9)$$

O limite de detecção ($3 S/N$) obtido foi igual a $3,00 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o BHA e $4,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o BHT.

A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia de 10 injeções de soluções padrão de uma mistura de BHA e BHT em 3 concentrações diferentes. Na Figura 3.24 são apresentados os amperogramas obtidos neste estudo.

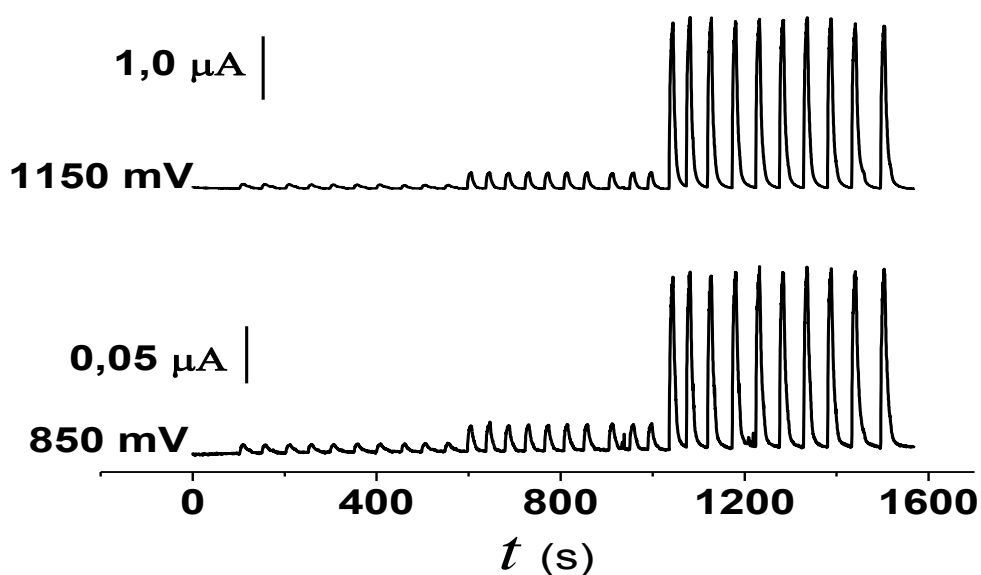


Figura 3.24 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de BHA (850 mV) e BHT (1150 mV) em três concentrações diferentes (10 injeções para cada concentração). Concentrações: BHA - 0,070; 0,50 e 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; BHT - 0,70; 6,0 e 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Solução transportadora e eletrólito suporte: KNO_3 0,01 mol L^{-1} (30% v/v de etanol; $\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,5$), volume de injeção = 350,0 μL e vazão = 2,4 mL min^{-1} .

Tabela 3.10 - Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias

| | intra-dias RSD ^a (%) | entre-dias RSD ^b (%) |
|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| BHA (mol L⁻¹) | | |
| 7,0 × 10 ⁻⁸ | 3,8 | 5,1 |
| 5,0 × 10 ⁻⁷ | 2,5 | 3,9 |
| 3,0 × 10 ⁻⁶ | 2,9 | 4,2 |
| BHT (mol L⁻¹) | | |
| 7,0 × 10 ⁻⁷ | 8,9 | 8,5 |
| 6,0 × 10 ⁻⁶ | 2,0 | 5,3 |
| 7,0 × 10 ⁻⁵ | 1,8 | 3,6 |

^a(n = 10); ^b(n = 5)

Já a repetibilidade entre-dias foi determinada por medidas de 3 diferentes concentrações em 5 dias diferentes (n=5). Os desvios padrões relativos (RSD) obtidos para a repetibilidade intra e entre-dias estão apresentados na Tabela 3.10. Observou-se que os RSD foram menores que 9,0% indicando uma boa repetibilidade do procedimento desenvolvido.

3.4.2.3 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação

Assim como para o procedimento voltamétrico desenvolvido, os estudos de análise de interferentes e teste de adição e recuperação foram realizados para este procedimento empregando MPA-FIA. As substâncias analisadas (amido, ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) e EDTA) como possíveis interferentes foram as mesmas do procedimento anterior já que as amostras analisadas também foram de maionese. Os testes foram feitos pela adição destes concomitantes à solução de BHA e BHT, sendo o método empregado descrito na parte experimental. Na Tabela 3.11 são mostrados os RSDs obtidos para cada analito em comparação com os possíveis interferentes, nas proporções estudadas.

Também foram realizados os experimentos com a mistura das substâncias supramencionadas nas proporções de 1:1 com os analitos (BHA e BHT) e os RSDs obtidos foram -6,2% para BHA e -3,7% para o BHT. Esses resultados foram satisfatórios e indicam que a matriz das amostras não interfere de forma significativa na determinação destes antioxidantes.

Tabela 3.11 - Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes

| Proporções | RSD (%) | | | |
|-------------|-----------|-----------|----------|----------|
| | BHA:Amido | BHT:Amido | BHA:EDTA | BHT:EDTA |
| 10:1 | -0 | -4,5 | -3,4 | 0 |
| 1:1 | -8,4 | -3,7 | -7,5 | 2,3 |
| 1:10 | -3,4 | -8,6 | 3,4 | 2,3 |
| | BHA:AA | BHT:AA | BHA:AC | BHT:AC |
| 10:1 | 0,9 | 0,5 | 1,1 | 1,5 |
| 1:1 | -2,5 | -4,8 | 0,9 | 1,6 |
| 1:10 | -3,1 | -6,1 | 1,3 | 1,8 |

Nos estudos de adição e recuperação as recuperações variaram entre 90% e 110% para o BHA e 84% e 112% para o BHT (dados não mostrados em forma de tabela). Esses valores obtidos também indicam que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de BHA e BHT neste procedimento empregando MPA-FIA.

3.4.2.4 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando MPA-FIA na determinação simultânea de BHA e BHT em amostras comerciais

Finalmente, o procedimento desenvolvido, empregando o eletrodo de BDD e a técnica MPA acoplada ao sistema FIA, para a determinação simultânea de BHA e BHT foi testado através da análise de quatro amostras comerciais de maionese. Na Figura 3.22, apresentada anteriormente, também são mostrados os sinais transientes obtidos através de quatro injeções em

triplicata para as quatro amostras de maionese (A, B, C e D). Na Tabela 3.12 são apresentados os resultados obtidos na análise dessas amostras e comparados com os resultados obtidos por HPLC (método comparativo descrito no item 3.3.1.3.2).

Tabela 3.12 - Resultados obtidos na determinação simultânea de BHA e BHT em produtos alimentícios empregando-se HPLC e MPA-FIA

| Amostras Maionese | BHA (mg/100 g) | | BHT (mg/100 g) | | BHA | BHT |
|----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| | HPLC ^a | MPA ^a | HPLC ^a | MPA ^a | Erro (%) ^b | Erro (%) ^b |
| 1 | 2,0±0,1 | 2,1 ±0,2 | 1,1±0,1 | 1,2±0,3 | 5,0 | 9,1 |
| 2 | 1,7±0,2 | 1,6±0,1 | 1,3±0,2 | 1,3±0,2 | -5,9 | 0,0 |
| 3 | 2,3±0,2 | 2,2±0,2 | 1,8±0,2 | 1,8±0,3 | -4,3 | 0,0 |
| 4 | 2,3±0,1 | 2,1±0,3 | 1,4±0,2 | 1,3±0,1 | -8,7 | -7,1 |

^a n = 3

^b Erro (%) = $100 \times (\text{valor amperométrico} - \text{valor HPLC}) / \text{valor HPLC}$

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois procedimentos aplicou-se o teste *t - pareado*. Para o BHA o $t_{\text{exp}} = 1,54$ e para o BHT o $t_{\text{exp}} = 1,66$, ambos os valores são menores que o $t_{\text{crítico}} = 3,18$. Portanto, os resultados obtidos na determinação simultânea de BHA e BHT pelo procedimento proposto empregando MPA-FIA 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.

O procedimento desenvolvido empregando MPA acoplada ao sistema FIA também se mostrou bastante simples, rápido e eficiente podendo ser utilizado para a determinação simultânea de BHA e BHT em produtos alimentícios contendo a combinação destes antioxidantes. Ademais, este procedimento possui algumas vantagens por empregar o sistema FIA, como por exemplo, menor consumo de reagentes e menor tempo de análise.

3.4.3 Procedimentos eletroanalíticos desenvolvidos nesta tese vs. procedimentos eletroanalíticos propostos na literatura para a determinação dos antioxidantes BHA e BHT

Na Tabela 3.13 é apresentada uma comparação entre os limites de detecção obtidos para o BHA e BHT nos procedimentos eletroanalíticos desenvolvidos nesta tese de doutorado e nos trabalhos existentes na literatura. Analisando essa tabela observou-se que os LDs obtidos para ambos os antioxidantes em ambos os procedimentos desenvolvidos (utilizando SWV e MPA-FIA), estão bastante satisfatórios frente aos procedimentos propostos na literatura, e estão entre os que alcançaram menores limites de detecção.

Ademais, apenas quatro desses trabalhos propostos na literatura fizeram a determinação voltamétrica simultânea de BHA e BHT, Agui *et al.*³³, Diaz *et al.*³⁶, Ni *et al.*⁴⁰ e Freitas e Fatibello-Filho⁴⁵, sendo que dois destes recorreram a métodos quimiométricos para construir as curvas analíticas (Diaz *et al.*³⁶, Ni *et al.*⁴⁰). O LD para o BHA obtido neste trabalho de doutorado empregando SWV foi 3, 5 e 7 vezes menor do que os LDs obtidos por Agui *et al.*³³, Diaz *et al.*³⁶ e Ni *et al.*⁴⁰, respectivamente, e o LD obtido para o BHT foi 61 e 3 vezes menor do que os LDs obtidos por Diaz *et al.*³⁶ e Ni *et al.*⁴⁰. Apenas o trabalho de Freitas e Fatibello-Filho⁴⁵ apresentou LDs cerca de 2 vezes menores do que os obtidos neste trabalho para ambos os antioxidantes.

Tabela 3.13 - Comparação dos limites de detecção obtidos nesta tese com outros procedimentos eletroanalíticos e/ou materiais de eletrodo para a determinação de BHA e BHT

| Método | Eletrodo | LD (BHA) mol L ⁻¹ | LD (BHT) mol L ⁻¹ | Ref. |
|---|--|---------------------------------|---------------------------------|---|
| SWV | BDD | $1,45 \times 10^{-7}$ | $2,47 \times 10^{-7}$ | Este trabalho |
| MPA-FIA | BDD | $3,00 \times 10^{-8}$ | $4,00 \times 10^{-7}$ | Este trabalho |
| SV-DPV | Pasta de carbono | $2,00 \times 10^{-8}$ | - | Wang e Freiha ³¹ |
| SWV | Microeletrodo de fibra de carbono cilíndrica | $4,00 \times 10^{-7}$ | $3,10 \times 10^{-7}$ | Aguí et al. ³³ |
| DPV e métodos quimiométricos | GC | $7,00 \times 10^{-7}$ | $1,52 \times 10^{-5}$ | Diaz et al. ³⁶ |
| DPV | Pt:PPy:NiPcTs | $1,04 \times 10^{-4}$ | - | De La Fuente et al. ³⁷ |
| CV | Ultramicroeletrodo de discos de carbono | $6,00 \times 10^{-6}$ | $1,12 \times 10^{-5}$ | Ceballos e Fernandez ³⁸ |
| Voltametria Linear e métodos quimiométricos | GC | $1,05 \times 10^{-6}$ | $6,81 \times 10^{-7}$ | Ni et al. ⁴⁰ |
| Cronoamperometria | Grafite/NAPCF | $2,77 \times 10^{-7}$ | - | Kumar et al. ⁴⁴ |
| SWV | MCCE/Cu ₃ (PO ₄) ₂ | $7,22 \times 10^{-8}$ | $9,3 \times 10^{-8}$ | Freitas e Fatibello-Filho ⁴⁵ |
| FIA-amperometria | GC | $1,40 \times 10^{-8}$ | $2,72 \times 10^{-8}$ | Yáñez-Sedeño et al. ⁴⁶ |
| DPV | Pasta de carbono modificado com NiPC | $2,00 \times 10^{-8}$ | - | Ruiz et al. ¹⁴⁵ |
| HPLC- amperometria | GC/NiPC | $6,10 \times 10^{-7}$ | $2,72 \times 10^{-6}$ | Ruiz et al. ⁴⁸ |
| FIA-amperometria | Grafite/PVC | $3,38 \times 10^{-6}$ | - | Luque et al. ⁴⁹ |
| FIA-amperometria | GCE/PPY/NiPCTs | $1,00 \times 10^{-6}$ | - | Riber et al. ⁵⁰ |
| FIA-amperometria | Grafite/AgHCF | $3,70 \times 10^{-6}$ | - | Jayasri e Narayanan ⁵¹ |
| Cronoamperometria | Grafite/MnHCF | $5,00 \times 10^{-8}$ | - | Jayasri e Narayanan ¹⁴⁶ |

Entre os procedimentos amperométricos propostos na literatura apenas um trabalho realizou a determinação simultânea de BHA e BHT, após separação por HPLC (Ruiz et al.⁴⁸), os limites de detecção obtidos foram 20 vezes maior para o BHA e 7 vezes maior para o BHT comparado aos LDs obtidos neste trabalho de doutorado empregando MPA-FIA.

3.4.4 Determinação dos corantes TT, AC e AB empregando as técnicas voltamétricas de pulso (SWV e DPV) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente

A CV foi utilizada para os estudos do efeito do eletrólito suporte, bem como sua concentração e pH. Os eletrólitos suporte utilizados foram: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 1,1$), e tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,8$), todos os eletrólitos foram preparados com água deionizada e purificada. Os voltamogramas obtidos para o eletrodo de BDD em solução de TT e AC nos diferentes eletrólitos suporte estão apresentados na Figura 3.25.

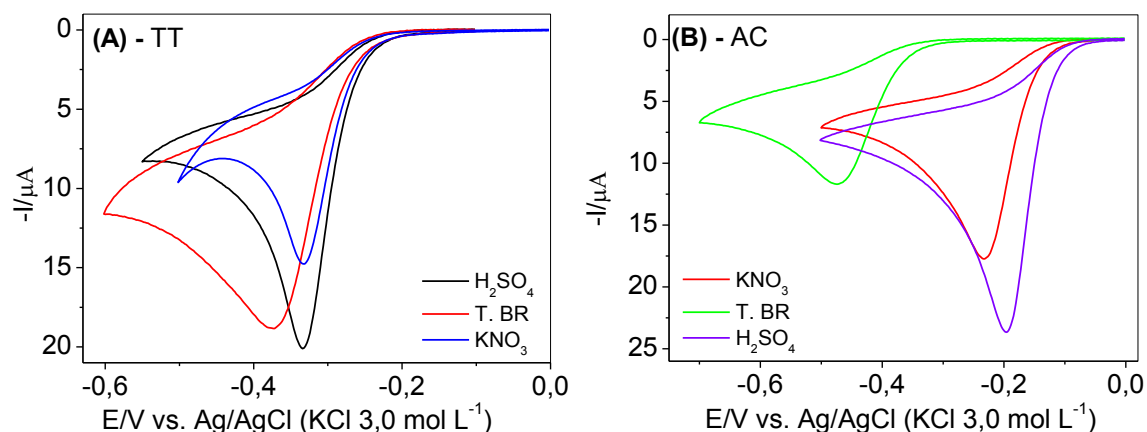


Figura 3.25 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) em solução de TT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) em diferentes eletrólitos suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 1,1$), e tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}_{\text{cond.}} = 1,8$), $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Analisando as respostas obtidas observou-se que os voltamogramas com o eletrólito suporte H_2SO_4 apresentou um bom perfil voltamétrico, maior intensidade de corrente de pico e potencial de oxidação mais próximo de zero para ambos os corantes, por isso, este foi o eletrólito suporte utilizado nos estudos posteriores.

Em seguida, estudou-se o efeito da concentração do H_2SO_4 na resposta voltamétrica do eletrodo de BDD para esses corantes. Na Figura 3.26 são apresentados os voltamogramas obtidos. Foi possível observar que a resposta voltamétrica do eletrodo de BDD tanto em solução de TT quanto em solução de AC muda com as diferentes concentrações do eletrólito suporte. Observou-se também que a intensidade de corrente de pico aumenta com a concentração de H_2SO_4 até uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, em concentrações maiores, essa resposta diminui, por isso optou-se por trabalhar com o $\text{H}_2\text{SO}_4 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

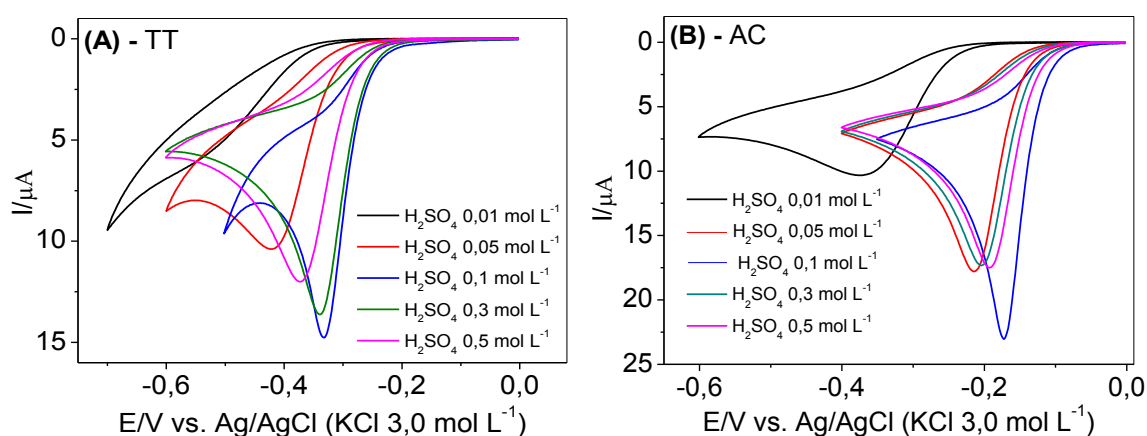


Figura 3.26 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) em solução de TT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e AC $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) em diferentes concentrações do eletrólito suporte H_2SO_4 : $0,05$; $0,01$; $0,1$, $0,3$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$).

Esses estudos do efeito do eletrólito suporte e sua concentração não foram realizados para o corante AB porque a princípio este trabalho seria realizado apenas com os corantes TT e AC. Porém ao pesquisar as amostras existentes no mercado nacional, encontraram-se as seguintes combinações de corantes nas amostras: TT e AC; AC e AB; e TT, AC e AB, sendo então o corante AB incluído nestes estudos. No entanto, como o $\text{H}_2\text{SO}_4 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ já tinha demonstrado ser um excelente eletrólito suporte para a TT e para o AC, e

apresentou uma boa resposta voltamétrica para o AB, sendo que, o objetivo principal eram as determinações simultâneas desses corantes, optou-se por também adotar este eletrólito suporte para o AB.

Após selecionar o melhor eletrólito suporte e sua concentração, realizou-se um estudo, ainda com voltametria cíclica, para obter informações adicionais sobre o processo eletroquímico entre o eletrodo de BDD e os corantes. Na Figura 3.27 são mostrados os voltamogramas obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de TT, AC e AB, em diferentes velocidades de varredura.

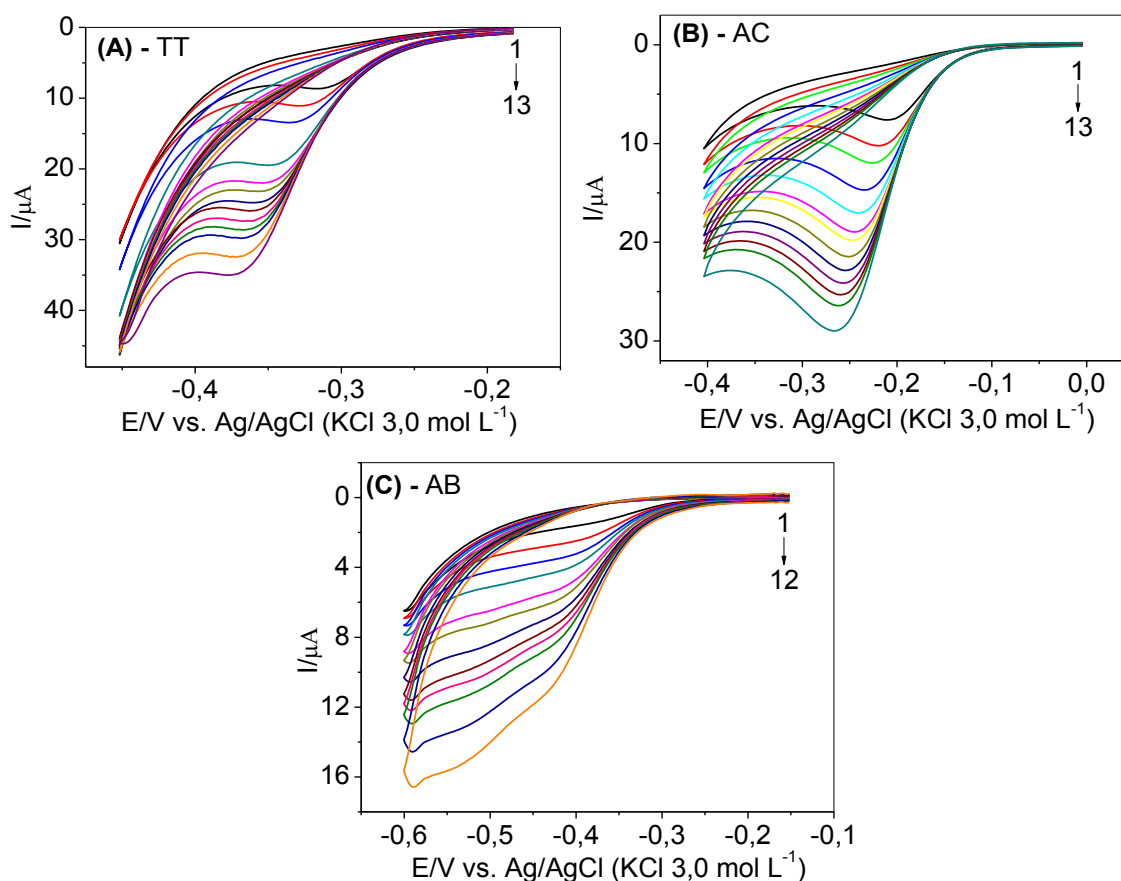


Figura 3.27 - Voltamogramas cíclicos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) em solução de TT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A), AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) e AB $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (C) em diferentes velocidades de varredura: 1-13: 10, 20, 30, 50, 70, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200 e 250 mVs^{-1} . Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Ao analisar os voltamogramas observou-se que o potencial de oxidação de ambos os corantes desloca-se para potenciais mais negativos com o aumento da velocidade varredura, sendo esse comportamento característico de processos irreversíveis¹⁴¹.

Os gráficos da dependência entre a corrente de pico de cada corante e a raiz quadrada da velocidade de varredura são mostrados na Figura 3.28.

Observou-se que para os três corantes essa dependência foi linear ($r = 0,993$ TT, $r = 0,999$ AB e $r = 0,985$ AC), indicando que o transporte de massa dos corantes é controlado preferencialmente por difusão das espécies na superfície eletródica¹⁴¹. Observou-se também que o coeficiente linear obtido é diferente de zero, provavelmente, devido a processos de adsorção que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho.

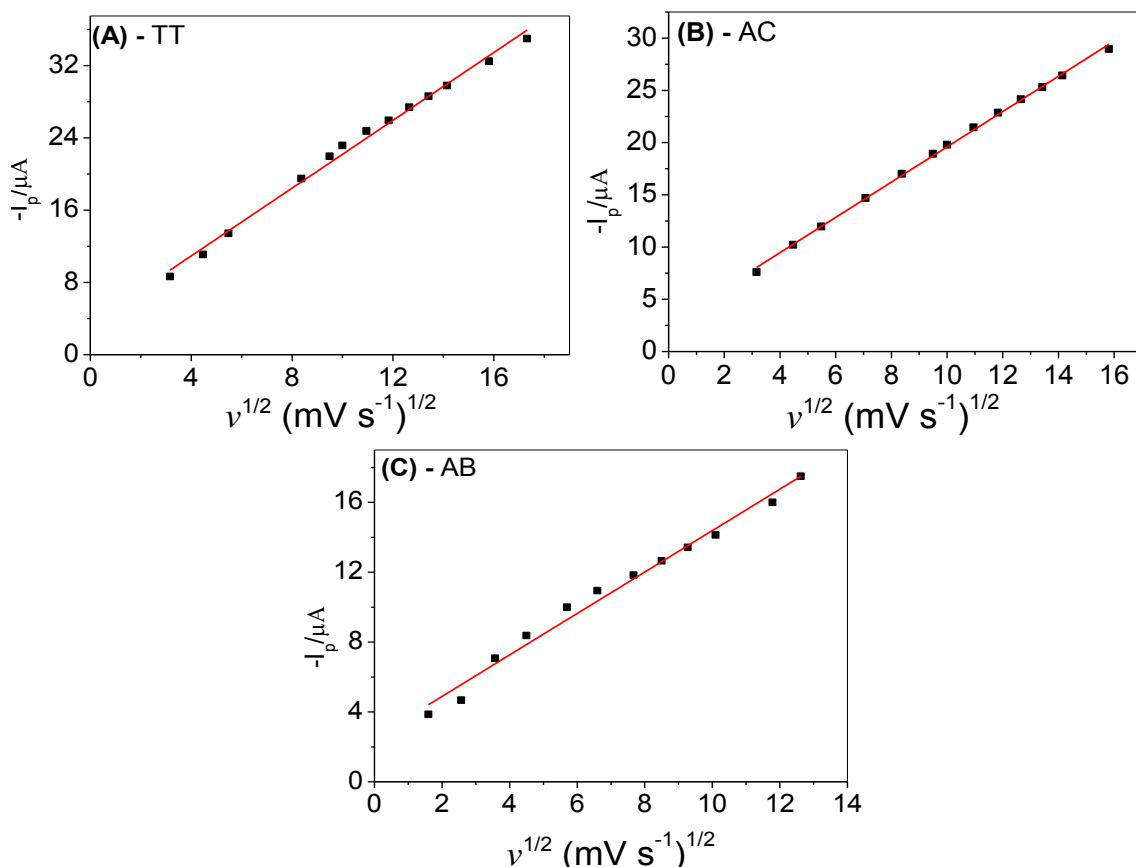


Figura 3.28 - Dependência da corrente de pico pela velocidade de varredura: (A) para o TT, (B) para o AC e (C) para o AB.

3.4.4.1 Voltametria de pulso diferencial (DPV) vs. Voltametria de onda quadrada (SWV)

Os potenciais de redução obtidos para os corantes TT, AC e AB, empregando a DPV foram -0,29 V, -0,15 V e -0,34 V, e, por SWV foram -0,32 V, -0,16 V e -0,37V, respectivamente. Para obter as melhores condições analíticas para a determinação desses corantes, inicialmente, foi realizada a otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas de pulso; DPV e SWV. Nas Tabelas 3.14 e 3.15 estão os intervalos de valores estudados para cada parâmetro, em cada técnica, e os valores destes parâmetros que foram selecionados para os experimentos seguintes.

Após a otimização dos parâmetros experimentais e dos parâmetros que envolvem a voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, a curva analítica foi construída para cada um dos corantes separadamente pelas duas técnicas. As condições analíticas obtidas para a determinação de AB, TT e AC pelas diferentes técnicas são apresentadas na Tabela 3.16.

Tabela 3.14 - Parâmetros da DPV investigados e os valores selecionados para a determinação de TT, AC e AB

| Parâmetros DPV | Faixa estudada | Valor selecionado |
|-----------------------------|----------------|-------------------|
| TT | | |
| ν (mV s ⁻¹) | 5 - 50 | 20 |
| a (mV) | 10 - 100 | 60 |
| t (ms) | 5 - 30 | 5 |
| AC | | |
| ν (mV s ⁻¹) | 5 - 70 | 30 |
| a (mV) | 10 - 100 | 60 |
| t (ms) | 5 - 30 | 5 |
| AB | | |
| ν (mV s ⁻¹) | 5 - 70 | 20 |
| a (mV) | 10 - 100 | 60 |
| t (ms) | 5 - 30 | 10 |

Tabela 3.15 - Parâmetros da SWV investigados e os valores selecionados para a determinação de TT, AC e AB

| Parâmetros SWV | Faixa estudada | Valor selecionado |
|-----------------|----------------|-------------------|
| TT | | |
| <i>f</i> (Hz) | 10 - 200 | 30 |
| <i>a</i> (mV) | 10 - 100 | 40 |
| ΔE (mV) | 1 - 6 | 3 |
| AB | | |
| <i>f</i> (Hz) | 10 - 200 | 50 |
| <i>a</i> (mV) | 10 - 100 | 40 |
| ΔE (mV) | 1 - 7 | 4 |
| AC | | |
| <i>f</i> (Hz) | 10 - 200 | 40 |
| <i>a</i> (mV) | 10 - 100 | 50 |
| ΔE (mV) | 1 - 7 | 3 |

Tabela 3.16 - Condições analíticas obtidas para a determinação de AC, TT e AB pelas técnicas DPV e SWV

| | AC | | TT | | AB | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | DPV | SWV | DPV | SWV | DPV | SWV |
| Potencial de redução (V) | -0,15 | -0,17 | -0,30 | -0,35 | -0,35 | -0,38 |
| Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | 0,049 - 2,9 | 0,049 - 0,99 | 0,35 - 9,1 | 0,35 - 9,1 | 0,49 - 9,1 | 0,49 -11,0 |
| Coef. angular ($\mu\text{A mol L}^{-1}$) | $-2,4 \times 10^5$ | $-7,0 \times 10^4$ | $-1,5 \times 10^5$ | $-6,6 \times 10^4$ | $-1,1 \times 10^5$ | $-2,2 \times 10^5$ |
| Coef. Linear (μA) | -0,023 | -0,0059 | -0,060 | 0,037 | 0,033 | 0,042 |
| <i>r</i> | 0,999 | 0,976 | 0,996 | 0,991 | 0,9950 | 0,971 |
| LD (mol L^{-1}) | $4,0 \times 10^{-8}$ | $4,5 \times 10^{-8}$ | $3,4 \times 10^{-7}$ | $3,5 \times 10^{-7}$ | $3,8 \times 10^{-7}$ | $4,2 \times 10^{-7}$ |

Como pode ser observado na Tabela 3.16, ao se utilizar a técnica DPV obteve-se maior sensibilidade, principalmente para a TT e o AC, e bons LDs para os três corantes, provavelmente devido a cinética de reação lenta desses analitos. Diante disso, optou-se por trabalhar com a técnica DPV, que proporcionou excelentes condições analíticas e não apresentou problemas de repetibilidade e alargamento de pico.

3.4.4.2 Mecanismo de redução dos corantes TT, AB e AB

TT e AC são azo-corantes, cujos mecanismos de redução já são bem conhecidos na literatura^{75, 77}. Esses mecanismos envolvem o grupo azo, com transferência de 4 elétrons e 4 prótons.

A teoria da SWV pode fornecer informações relacionadas ao mecanismo eletroquímico da reação, como abordado no item 3.3.1.2. Sendo assim, essa teoria foi empregada para confirmar o número de elétrons envolvidos no mecanismo de redução desses dois azo-corantes, TT e AC e, encontrar o número de elétrons envolvidos na reação de redução do AB, a fim de propor um possível mecanismo para essa reação. Na Figura 3.29 são apresentados os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o eletrodo de BDD em solução de TT, AC e AB nas diferentes frequências de aplicação dos pulsos de potencial. Os gráficos inseridos apresentam a dependência de E_p por $\log f$.

Os coeficientes angulares obtidos nos gráficos da Figura 3.29 (A) e (B) foram -0,032 para a TT e -0,031 para o AC. Empregando-se a equação 3.1, calculou-se os valores de αn para o TT e AC, que foram de 1,84 e 1,90, respectivamente. Como esses corantes são moléculas orgânicas, o valor de α segundo a literatura pode ser considerado como sendo 0,5. Desta forma, foi possível prever o número de elétrons envolvidos na etapa determinante do processo de oxidação da TT e do AC, por meio dos critérios de diagnósticos da SWV. O número de elétrons obtidos para a TT e para o AC foi de 4 elétrons, que está em consonância com o número de elétrons dos mecanismos propostos na literatura^{75, 77}. Na Figura 3.30 são mostrados os mecanismos de redução da TT e do AC envolvendo 4 elétrons e 4 prótons.

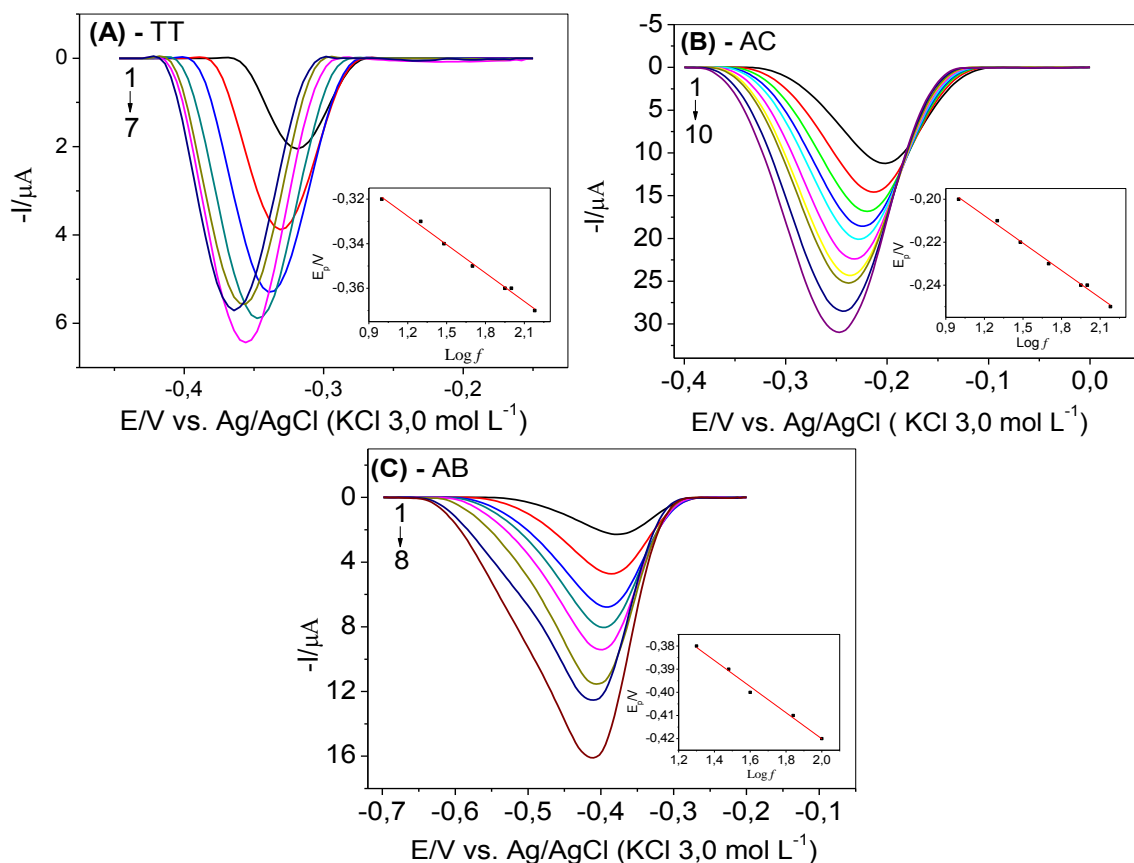


Figura 3.29 - Voltamogramas de onda quadrada (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) em solução de TT $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (A), AC $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) e AB $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, em diferentes frequências de aplicação de pulso de potencial (10 - 200 Hz). Os gráficos inseridos em (A), (B) e (C) são a dependência de E_p pelo logaritmo de f . Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.

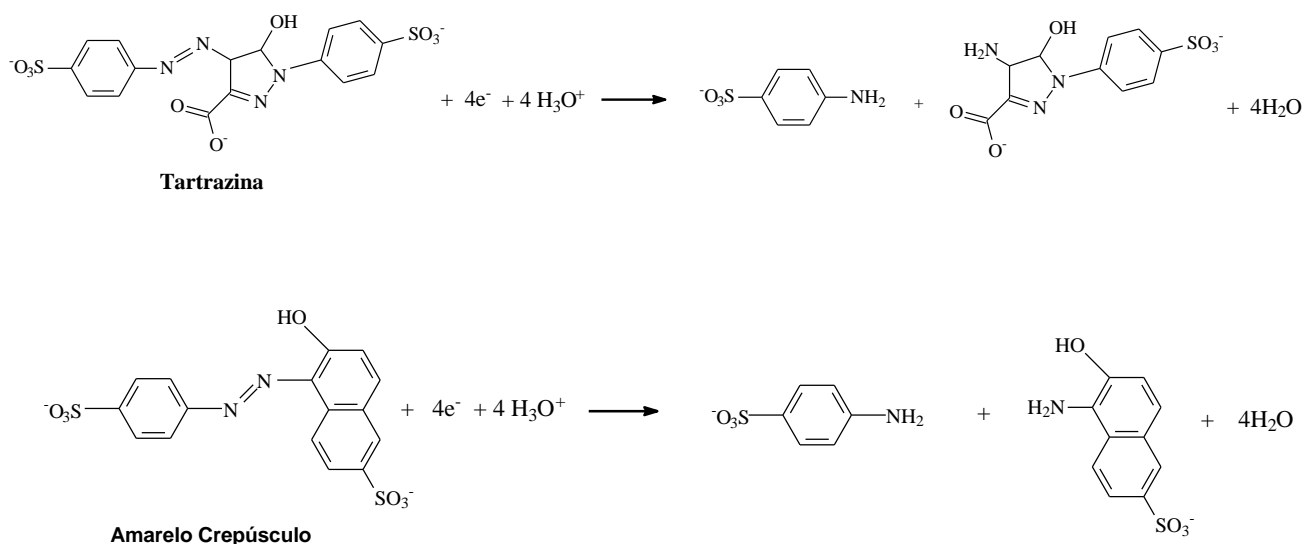


Figura 3.30 - Mecanismos de redução da TT e do AC.

Para o AB, que faz parte do grupo dos corantes trifenilmetanos, não há nenhum mecanismo eletroquímico de redução proposto na literatura. O coeficiente angular obtido no gráfico da Figura 3.29 (C) foi de -0,056 e empregando-se a equação 3.1, o valor de αn encontrado foi igual a 1,05. Dessa forma, foi possível prever o número de elétrons envolvidos na etapa determinante do mecanismo de redução do AB. De acordo com a teoria consultada, o valor de α para compostos orgânicos pode ser considerado com sendo igual a 0,5, sendo então o número de elétrons obtido igual 2.

Considerando-se alguns mecanismos eletroquímicos propostos na literatura para moléculas semelhantes⁷⁷ e baseando-se em uma proposta de degradação redutiva do AB¹⁴⁷, foi possível propor um provável mecanismo eletroquímico de redução para este corante. Na Figura 3.31 está apresentado o mecanismo de redução proposto para o AB, envolvendo 2 elétrons e 2 prótons.

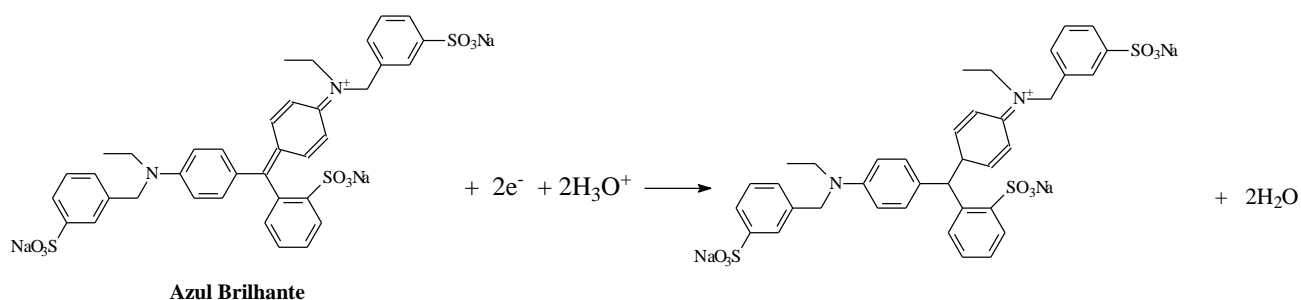


Figura 3.31 - Proposta de um mecanismo de redução para o AB.

A concentração de espécies adsorvidas na superfície do eletrodo também foi estimada através das equações envolvidas na teoria da SWV, como abordado anteriormente no item 3.3.1.2. Os valores calculados foram de 0,010, 0,014 e 0,036 nmol cm⁻², para a TT, AC e AB, respectivamente. Esses resultados indicam uma baixa adsorção das espécies na superfície do eletrodo de BDD, o que é característico desse eletrodo, como discutido.

3.4.4.3 Determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC por DPV empregando o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente

Inicialmente, foi realizado um estudo com o objetivo de comparar os voltamogramas obtidos para uma mistura de TT e AC ou AB e AC empregando-se o eletrodo de BDD e o eletrodo de carbono vítreo (GC), objetivando-se qualificar algumas das vantagens de se utilizar o eletrodo de BDD. Na Figura 3.32 são mostrados os voltamogramas que foram obtidos utilizando-se os dois eletrodos.

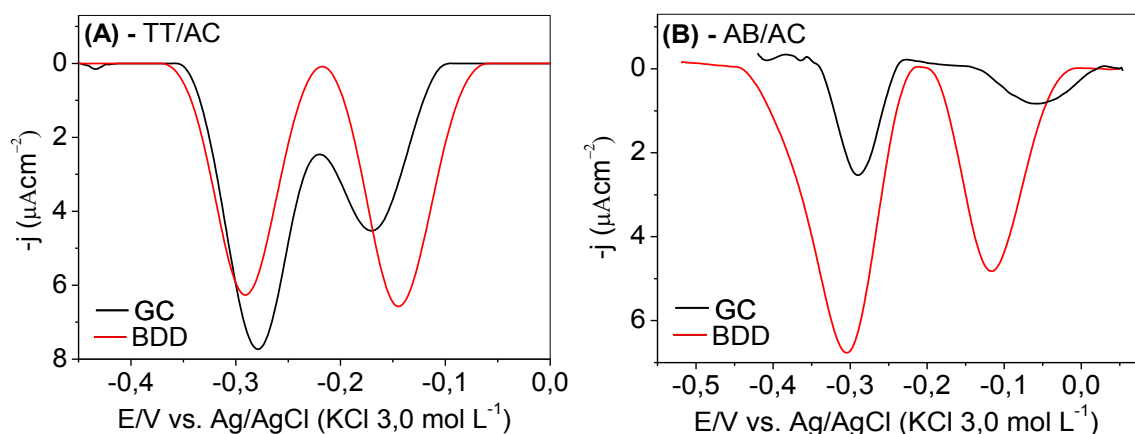


Figura 3.32 - Voltamogramas de pulso diferencial (com correção de linha base) obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) pré-tratado catodicamente (linha vermelha) e o eletrodo de GC (área geométrica = $0,20 \text{ cm}^2$) (linha preta) em solução de TT $2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ + AC $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e, em solução de AB $2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ + AC $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $t = 5 \text{ ms}$.

Observou-se que para o par de corantes TT e AC o voltamograma obtido com o eletrodo de GC não apresentou uma boa separação dos picos de corrente (110 mV) mesmo fazendo a correção de linha base, o que não acontece no voltamograma obtido com o eletrodo de BDD, no qual a separação dos picos é de aproximadamente 150 mV. Ademais, o eletrodo de BDD proporcionou maiores intensidade de correntes de pico para ambos os corantes.

Para o outro par de corantes AB e AC, as intensidades de corrente dos picos foram bem menores no voltamograma obtido com o eletrodo de GC e, não foi obtido um bom perfil voltamétrico, com um pico bastante alargado para o AC.

Esses resultados indicam que o eletrodo de BDD pode proporcionar melhores condições analíticas na determinação simultânea desses pares de corantes, como por exemplo, menores LDs, ausência de interferência de um sobre o outro devido à melhor separação dos picos de corrente (maior resolução), dentre outras.

Outro estudo realizado foi investigar a resposta eletroquímica da TT e do AC ou do AB e do AC um na presença do outro em diferentes concentrações. Na Figura 3.33 (A) são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial, no qual foram feitas adições sucessivas de TT em diferentes concentrações ($5,0 \times 10^{-7}$ - $6,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) mantendo a concentração de AC constante em $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Na Figura 3.33 (B) foram feitas adições sucessivas de AC em diferentes concentrações ($2,0 \times 10^{-7}$ - $2,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) mantendo a concentração de TT constante em $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Na Figura 3.33 estão os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o outro par de corantes AB e AC. Em (B) foram feitas adições sucessivas de AB em diferentes concentrações ($2,0 \times 10^{-7}$ - $4,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) mantendo a concentração de AC constante em $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Em (C) foram feitas adições sucessivas de AC em diferentes concentrações ($2,0 \times 10^{-7}$ - $2,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) mantendo a concentração de AB constante em $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Ao examinar os voltamogramas da Figura 3.33 (A) e (C) observou-se que a intensidade de corrente de pico dos corantes TT e AB aumentam regularmente com o aumento da concentração desses corantes mesmo na presença do corante AC, cuja intensidade do pico se mantém constante (RSD = 7,9% (Fig. 3.33 (A)) e RSD = 4,1% (Fig. 3.33 (C))). O mesmo acontece nos voltamogramas na Figura 3.33 (B) e (D), as intensidades de corrente de pico do corante AC aumentam regularmente com o aumento das concentrações desse corante mesmo na presença de TT ou AB, cujos picos de corrente se mantêm constantes (RSD = 7,9% Fig. 3.33 (B)) e RSD = 7,2% Fig. 3.33 (D)).

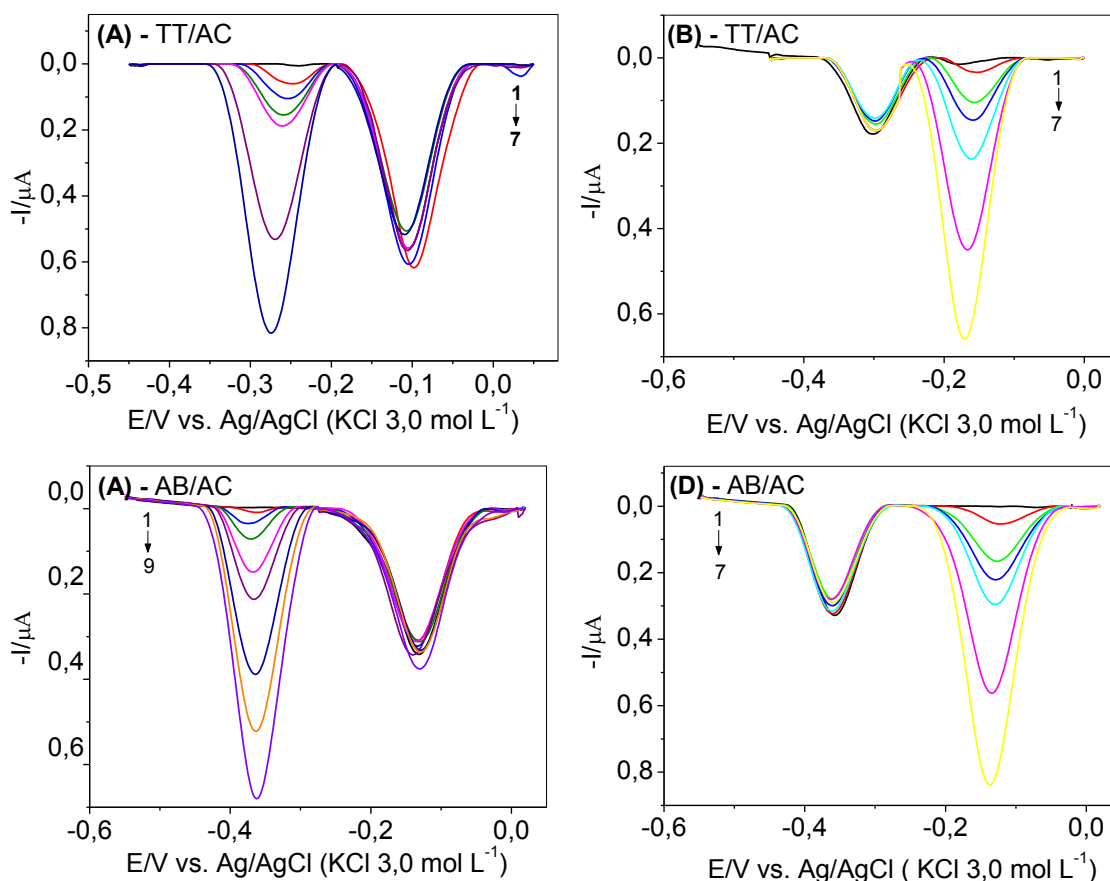


Figura 3.33 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = $0,30 \text{ cm}^2$) em soluções de: (A) TT: (2-7) $5,0 \times 10^{-7} - 6,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e AC (1-7) $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (constante); (B) AC: (2-7) $2,0 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e TT (1-7) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (constante); (C) AB: (2-9) $2,0 \times 10^{-7} - 4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e AC (1-9) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (constante); (D) AC: (2-7) $2,0 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e AB (1-7) $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (constante). Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $t = 5 \text{ ms}$.

Posteriormente, foram obtidos os voltamogramas com adições sucessivas e simultâneas de TT e AC, nas concentrações de $9,99 \times 10^{-8} - 5,66 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para TT e $2,00 \times 10^{-8} - 4,76 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para AC, e também foram obtidos os voltamogramas com adições sucessivas e simultâneas de AB e AC, nas concentrações de $5,96 \times 10^{-7} - 9,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, para o AB e $9,99 \times 10^{-8} - 4,76 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o AC. Nas Figuras 3.34 e 3.35 são

mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos e as respectivas curvas analíticas.

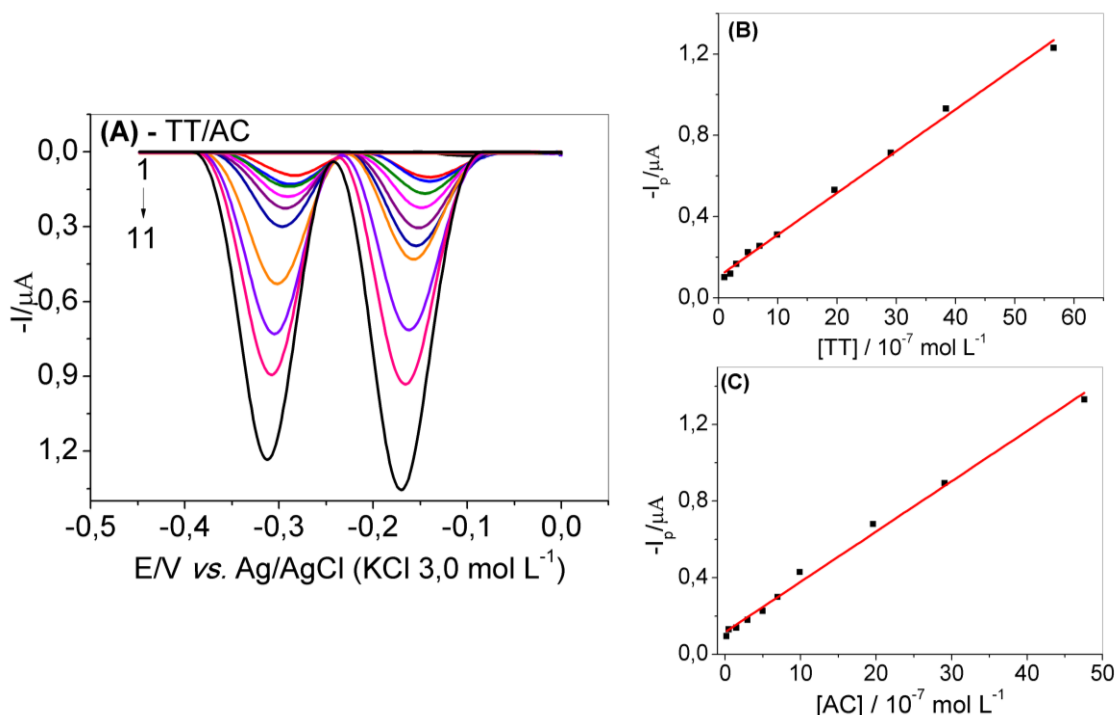


Figura 3.34 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm²) em diferentes concentrações de TT e AC: (1) branco, (2) $9,9 \times 10^{-8}$; (3) $2,0 \times 10^{-7}$; (4) $3,0 \times 10^{-7}$; (5) $5,0 \times 10^{-7}$; (6) $6,9 \times 10^{-7}$; (7) $9,9 \times 10^{-7}$; (8) $2,0 \times 10^{-6}$; (9) $2,9 \times 10^{-6}$; (10) $3,8 \times 10^{-6}$; (11) $5,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para a TT; para AC: (1) branco, (2) $2,0 \times 10^{-8}$; (3) $5,0 \times 10^{-8}$; (4) $1,5 \times 10^{-7}$; (5) $3,0 \times 10^{-7}$; (6) $5,0 \times 10^{-7}$; (7) $6,9 \times 10^{-7}$; (8) $9,9 \times 10^{-7}$; (9) $2,0 \times 10^{-6}$; (10) $2,9 \times 10^{-6}$; (11) $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. (B) curva analítica obtida para a TT e (C) curva analítica obtida para o AC. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹; $\nu = 20$ mV s⁻¹, $a = 60$ mV e $t = 5$ ms.

Analisando a Figura 3.34 (B) e (C) pode-se concluir que as curvas analíticas apresentaram boa linearidade nas concentrações estudadas para ambos os corantes. As equações correspondentes foram:

$$-I_{pc}/\mu A = 0,105 + 2,00 \times 10^5 [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,996, \text{ para a TT}) \quad \text{(3.10)}$$

$$-I_{pc}/\mu A = 0,116 + 2,62 \times 10^5 [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,994, \text{ para o AC}) \quad \text{(3.11)}$$

Os limites de detecção (3 S/N) obtidos foram $6,27 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $1,31 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, para a TT e AC, respectivamente.

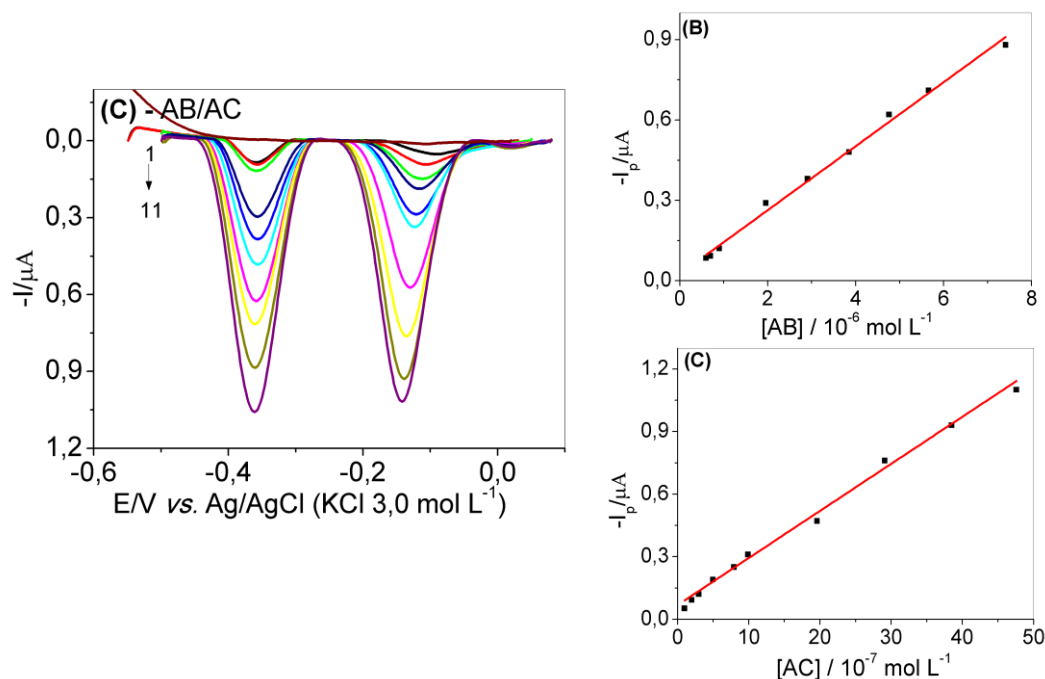


Figura 3.35 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos empregando-se o eletrodo de BDD (área geométrica = 0,30 cm²) em diferentes concentrações de AB e AC: (1) branco, (2) $6,0 \times 10^{-7}$; (3) $6,9 \times 10^{-7}$; (4) $8,9 \times 10^{-7}$; (5) $2,0 \times 10^{-6}$; (6) $2,9 \times 10^{-6}$; (7) $3,8 \times 10^{-6}$; (8) $4,8 \times 10^{-6}$; (9) $5,7 \times 10^{-6}$; (10) $7,4 \times 10^{-6}$; (11) $9,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, para o AB; para AC: (1) branco, (2) $9,9 \times 10^{-8}$; (3) $2,0 \times 10^{-7}$; (4) $3,0 \times 10^{-7}$; (5) $5,0 \times 10^{-7}$; (6) $7,9 \times 10^{-7}$; (7) $9,9 \times 10^{-7}$; (8) $2,0 \times 10^{-6}$; (9) $2,9 \times 10^{-6}$; (10) $3,8 \times 10^{-6}$; (11) $4,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. (B) curva analítica obtida para a TT e (C) curva analítica obtida para o AC. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹; $\nu = 20$ mV s⁻¹, $a = 60$ mV e $t = 5$ ms.

As curvas analíticas obtidas para ambos os corantes apresentaram boa linearidade nas concentrações estudadas. As equações correspondentes foram:

$$-I_{pc}/\mu A = 0,0260 + 1,18 \times 10^5 [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,997, \text{ para o AB}) \quad (3.12)$$

$$-I_{pc}/\mu A = 0,0681 + 2,25 \times 10^5 [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (r = 0,995, \text{ para o AC}) \quad (3.13)$$

O limite de detecção ($3 S/N$) obtido foi igual a $1,43 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o AB e $2,56 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o AC.

Os estudos de repetibilidade intra e entre-dias também foram realizados. A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia ($n = 10$) de soluções contendo TT e AC ou AB e AC em 3 diferentes concentrações. Já a repetibilidade entre-dias foi determinada por medidas de 3 diferentes concentrações em 5 dias diferentes ($n=5$). Os desvios padrões relativos (RSD) obtidos estão apresentados na Tabela 3.17.

Tabela 3.17 - Resultados obtidos para o estudo de repetibilidade intra e entre-dias para os pares de corantes determinados simultaneamente

| Par de corantes | intra-dias RSD ^a (%) | entre-dias RSD ^b (%) | Par de corantes | intra-dias RSD ^a (%) | entre-dias RSD ^b (%) |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| TT (mol L⁻¹) | | | AB (mol L⁻¹) | | |
| $1,0 \times 10^{-7}$ | 7,2 | 8,8 | $5,0 \times 10^{-7}$ | 5,3 | 6,9 |
| $9,9 \times 10^{-7}$ | 2,0 | 3,9 | $3,8 \times 10^{-6}$ | 1,5 | 7,8 |
| $3,8 \times 10^{-6}$ | 1,3 | 3,2 | $9,1 \times 10^{-6}$ | 1,1 | 8,2 |
| AC (mol L⁻¹) | | | AC (mol L⁻¹) | | |
| $5,0 \times 10^{-8}$ | 5,2 | 6,3 | $1,0 \times 10^{-7}$ | 5,6 | 5,8 |
| $7,0 \times 10^{-7}$ | 3,4 | 4,9 | $9,9 \times 10^{-7}$ | 2,6 | 1,6 |
| $2,9 \times 10^{-6}$ | 5,2 | 5,4 | $4,8 \times 10^{-6}$ | 0,85 | 5,5 |

^a($n = 10$); ^b($n = 5$)

Os resultados de repetibilidade intra e entre-dias obtidos foram satisfatórios com RSD menores que 9,0% para todas as concentrações estudadas.

3.4.4.3.1 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação

Para investigar a seletividade do eletrodo de BDD, foi realizado o estudo com possíveis interferentes. As substâncias analisadas foram ácido ascórbico (A. asc.), citrato de sódio (Cit. sódio), sacarose, sacarina, ácido cítrico (A. cit.), aspartame (Aspt.) e ciclamato de sódio (Cic. sódio). Os testes foram

feitos pela adição dessas substâncias à solução de TT + AC ou AB + AC, ambos na concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, a metodologia utilizada está detalhada na parte experimental. Na Tabela 3.18 estão os RSD obtidos para cada analito em comparação com os possíveis interferentes, nas proporções estudadas.

Tabela 3.18 - Desvios padrão relativos obtidos para o estudo de interferentes

| Proporções | RSD (%) | | |
|------------|---------------|----------------|----------------|
| | TT:A. asc. | AC:A. asc | AB: A. asc |
| 10:1 | -0,77 | -1,2 | -0,89 |
| 1:1 | -5,3 | -5,6 | -6,5 |
| 1:10 | -8,9 | -10 | -8,7 |
| | TT:Cit. sódio | AC:Cit. sódio | AB: Cit. sódio |
| 10:1 | 1,4 | 2,6 | 0,81 |
| 1:1 | 1,4 | 2,5 | 0,95 |
| 1:10 | -5,3 | -2,8 | -1,6 |
| | TT: Sacarose | AC: Sacarose | AB: Sacarose |
| 10:1 | 1,5 | 0,60 | 2,1 |
| 1:1 | 5,4 | 3,3 | 4,7 |
| 1:10 | 4,4 | 4,3 | 4,2 |
| | TT: Sacarina | AC: Sacarina | AB: Sacarina |
| 10:1 | 0,69 | 0,52 | 0,35 |
| 1:1 | 0,98 | 1,2 | 0,84 |
| 1:10 | 1,9 | 2,6 | 1,3 |
| | TT:A. cit. | AC: A. cit. | AB: A. cit. |
| 10:1 | 2,8 | 0 | 1,3 |
| 1:1 | 2,8 | 0 | -3,6 |
| 1:10 | -10 | -5,4 | -8,3 |
| | TT: Aspt. | AC: Aspt. | AB: Aspt. |
| 10:1 | 0,97 | 1,1 | 0,56 |
| 1:1 | 2,7 | 3,4 | 0,99 |
| 1:10 | 6,3 | 6,0 | 5,4 |
| | TT:Cic. sódio | AC: Cic. sódio | AB: Cic. sódio |
| 10:1 | -3,1 | -2,9 | -2,8 |
| 1:1 | -2,9 | -2,5 | -3,2 |
| 1:10 | -4,5 | -3,25 | -5,6 |

Também foram realizados os experimentos com a mistura de todos os possíveis interferentes nas proporções de 1:1 com os analitos e, os RSD obtidos foram -6,9% para a TT, -5,3% para o AC e -3,5% para o AB. Além disso, os maiores RSDs foram obtidos para o ácido ascórbico e para o ácido cítrico na proporção de 1:10, ou seja, uma concentração 10 vezes maior da

substâncias analisada como possível interferente. Essa proporção dificilmente será encontrada nas amostras, o que viabiliza a quantificação desses corantes sem uma interferência significativa dos outros compostos comumente presentes nas amostras.

Para investigar a interferência da matriz das amostras, na resposta voltamétrica obtida, também foram feitos estudos de adição e recuperação. Para este estudo foram feitos experimentos em triplicata, por meio da adição de alíquotas de solução padrão de TT + AC ou AB + AC às amostras de preparados sólidos para refrescos, gelatinas e hidrotônicos. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 3.19 (TT + AC) e 3.20 (AB + AC).

Tabela 3.19 - Estudos de adição e recuperação de TT e AC nas amostras analisadas

| Amostras | TT($\mu\text{mol L}^{-1}$) | | | Amostra | AC($\mu\text{mol L}^{-1}$) | | |
|-------------|------------------------------|-------------------|------|-------------|------------------------------|-------------------|------|
| | Ad. ^a | Rec. ^b | % | | Ad. ^a | Rec. ^b | % |
| 1(refresco) | 0,50 | (0,48±0,05) | 96,0 | 1(refresco) | 0,50 | (0,48±0,06) | 96,0 |
| | 1,5 | (1,3±0,3) | 86,7 | | 1,5 | (1,7±0,3) | 113 |
| 2(refresco) | 0,50 | (0,52±0,08) | 104 | 2(refresco) | 0,50 | (0,50±0,08) | 100 |
| | 1,5 | (1,6±0,4) | 107 | | 1,5 | (1,4±0,3) | 93,3 |
| 3(refresco) | 0,50 | (0,52±0,07) | 104 | 3(refresco) | 0,50 | (0,51±0,09) | 102 |
| | 1,5 | (1,6±0,2) | 107 | | 1,5 | (1,6±0,4) | 107 |
| 4(refresco) | 0,5 | (0,49±0,09) | 98,0 | 4(refresco) | 0,5 | (0,52±0,08) | 104 |
| | 1,5 | (1,6±0,5) | 107 | | 1,5 | (1,4±0,2) | 93,3 |
| 5(gelatina) | 0,50 | (0,49±0,03) | 98,0 | 5(gelatina) | 0,50 | (0,46±0,06) | 92,0 |
| | 1,5 | (1,4±0,1) | 93,3 | | 1,5 | (1,4±0,5) | 93,3 |
| 5(gelatina) | 0,50 | (0,47±0,09) | 94,0 | 5(gelatina) | 0,50 | (0,45±0,08) | 90,0 |
| | 1,5 | (1,4±0,3) | 93,3 | | 1,5 | (1,6±0,2) | 107 |
| 5(gelatina) | 0,50 | (0,44±0,08) | 88,0 | 5(gelatina) | 0,50 | (0,47±0,09) | 94,0 |
| | 1,5 | (1,6±0,6) | 107 | | 1,5 | (1,5±0,3) | 100 |
| 5(hidrot.) | 0,50 | (0,48±0,06) | 96,0 | 5(hidrot.) | 0,50 | (0,51±0,05) | 102 |
| | 1,5 | (1,5±0,4) | 100 | | 1,5 | (1,6±0,2) | 107 |
| 5(hidrot.) | 0,50 | (0,46±0,08) | 92,0 | 5(hidrot.) | 0,50 | (0,55±0,07) | 110 |
| | 1,5 | (1,54±0,3) | 103 | | 1,5 | (1,5±0,5) | 100 |

n = 3; ^a ad. = adicionado; ^b rec. = recuperado

As recuperações variaram entre 86,7% e 107% para a TT e 92,0% e 113% para o AC. Esses valores obtidos indicam que não houve interferência da

matriz das amostras na determinação simultânea desses corantes, considerando que para produtos alimentícios as recuperações aceitáveis podem ficar entre 85% e 115%¹⁴⁴.

Tabela 3.20 - Estudos de adição e recuperação de AB e AC nas amostras analisadas

| Amostras | AB($\mu\text{mol L}^{-1}$) | | | Amostra | AC($\mu\text{mol L}^{-1}$) | | |
|-------------|------------------------------|-------------------|------|-------------|------------------------------|-------------------|------|
| | Ad. ^a | Rec. ^b | % | | Ad. ^a | Rec. ^b | % |
| 1(refresco) | 0,70 | (0,72±0,04) | 103 | 1(refresco) | 0,50 | (0,55±0,08) | 110 |
| | 3,8 | (3,8±0,2) | 100 | | 1,5 | (1,6±0,2) | 107 |
| 2(refresco) | 0,70 | (0,65±0,06) | 92,8 | 2(refresco) | 0,50 | (0,53±0,07) | 106 |
| | 3,8 | (3,7±0,4) | 97,4 | | 1,5 | (1,5±0,4) | 100 |
| 5(gelatina) | 0,70 | (0,71±0,02) | 101 | 5(gelatina) | 0,50 | (0,48±0,03) | 96,0 |
| | 3,8 | (4,0±0,1) | 105 | | 1,5 | (1,3±0,2) | 86,7 |
| 5(gelatina) | 0,70 | (0,67±0,08) | 95,7 | 5(gelatina) | 0,50 | (0,44±0,09) | 88,0 |
| | 3,8 | (4,1±0,3) | 108 | | 1,5 | (1,6±0,3) | 107 |

n = 3; ^a ad. = adicionado; ^b rec. = recuperado

Para o par de corantes AB e AC as recuperações variaram entre 92,8 e 108% e 86,7 e 110%, respectivamente. Esses valores também indicam que não há interferência significativa da matriz das amostras na determinação simultânea deste par de corantes.

3.4.4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - método comparativo

Para avaliar o desempenho do procedimento eletroanalítico desenvolvido empregando a DPV e o eletrodo de BDD na determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC, foi adotado como método de referência para fins comparativos a cromatografia líquida de alta eficiência. As condições experimentais da técnica cromatográfica estão descritas na parte experimental. Naquelas condições estabelecidas, as moléculas de TT, AC e AB apresentaram um tempo de retenção de 9,90, 12,0 e 19,1 minutos, respectivamente. Na Figura 3.36 (A) estão os cromatogramas obtidos para o a

TT, para o AC e para o AB nos seus respectivos comprimentos de onda, e na Figura 3.37, as curvas analíticas obtidas para cada corante, no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para a TT, $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o AC e de $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o AB.

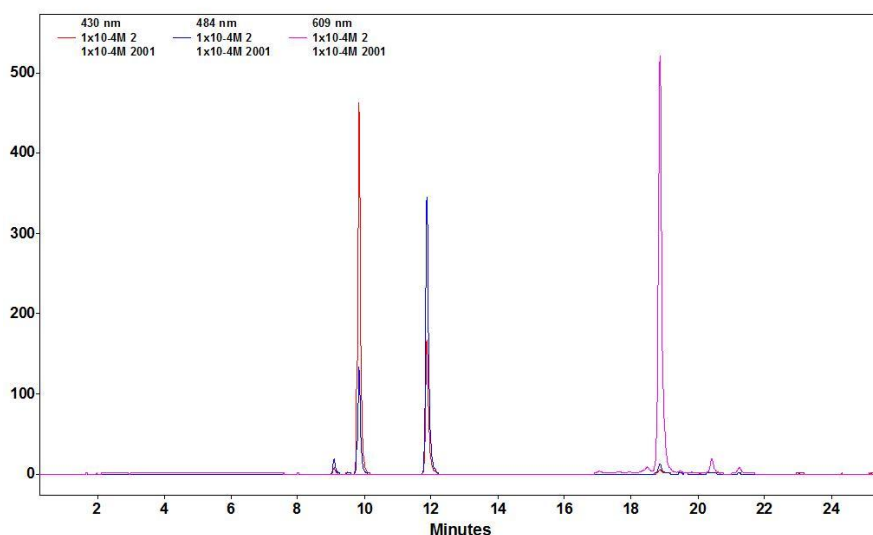


Figura 3.36 - Cromatogramas obtidos para o TT 0,1 mmol L⁻¹ (linha vermelha - 430 nm); para o AC 0,1 mmol L⁻¹ (linha azul - 484 nm) e para o AB 0,1 mmol L⁻¹ (linha rosa - 609 nm). Fase móvel: acetato de amônio 1% (m/v) (0,13 mol L⁻¹) (pH 7,5) (Fase Móvel A) e mistura metanol:acetonitrila 80:20 (v/v) (Fase Móvel B) (eluição gradiente), vaza = 1,0 mL /min e o volume das injeções: 20,0 µL, comprimentos de onda: 430 nm para a TT, 484 nm para AC e 610 nm para AB.

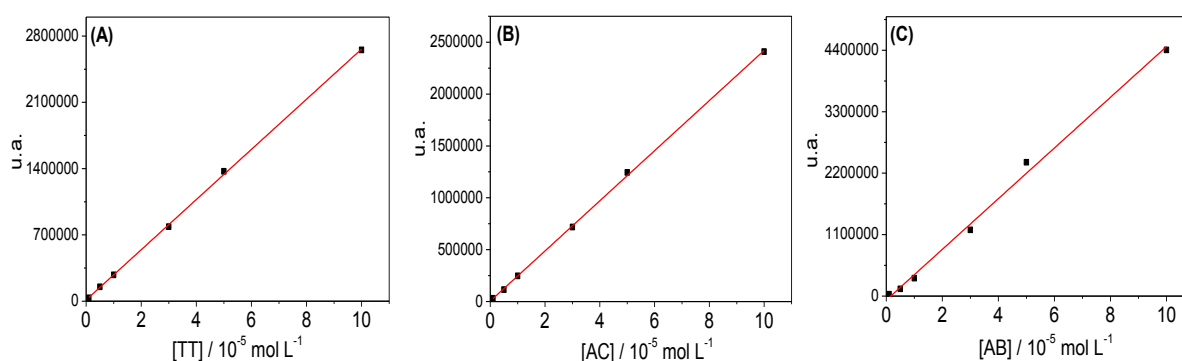


Figura 3.37 - Curvas analíticas obtidas para os corantes em unidades de área. Concentrações da curva analítica para TT, AC e AB: $1,0 \times 10^{-6}$, $5,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$, $3,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

As equações das curvas obtidas foram:

$$A(\text{u.a.}) = 1,39 \times 10^4 + 2,65 \times 10^{10} [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (\text{para a TT}) \quad (3.14)$$

$$A(\text{u.a.}) = -3,62 \times 10^4 + 4,63 \times 10^{10} [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (\text{para o AC}) \quad (3.15)$$

$$A(\text{u.a.}) = 4,75 \times 10^3 + 2,42 \times 10^{10} [c/(\text{mol L}^{-1})] \quad (\text{para o AB}) \quad (3.16)$$

Todas as amostras de preparado sólido para refresco, gelatina e hidrotônicos foram analisadas empregando-se este procedimento cromatográfico, a fim de validar o método eletroanalítico desenvolvido.

3.4.4.3.3 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando DPV na determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC em amostras comerciais

Algumas amostras de alimentos industrializados (preparados sólidos para refresco, gelatinas e hidrotônicos) contendo os corantes TT e AC ou AB e AC foram analisadas, a fim de avaliar o procedimento proposto. Para a determinação simultânea destes analitos foi utilizado o método de adição de padrão, mesmo obtendo resultados satisfatórios com relação à interferência das matrizes das amostras. Nas Tabelas 3.21 e 3.22 são apresentados os resultados obtidos dos teores de TT e AC ou AB e AC determinados empregando-se os procedimentos voltamétrico e o cromatográfico.

Tabela 3.21 - Resultados obtidos na determinação de TT e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e DPV

| Amostras | TT | | AC | | Erro 1 (%) ^b | Erro 2 (%) ^b |
|--------------------------------|-------------------|-----------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| | HPLC ^a | DPV | HPLC ^a | DPV ^a | | |
| Refresco (mg/100g) | | | | | | |
| 1 | 55±2 | 53±2 | 49±3 | 49±4 | -3,6 | 0 |
| 2 | 59±4 | 61±1 | 34±2 | 36±3 | 3,4 | 5,6 |
| 3 | 22±3 | 21±4 | 8,2±0,5 | 8,9±0,4 | -4,5 | 8,5 |
| 4 | 24±1 | 25±2 | 28±4 | 27±1 | 4,2 | 3,7 |
| Gelatina (mg/100g) | | | | | | |
| 1 | 14±2 | 14±1 | 3,1±0,6 | 2,8±0,5 | 0 | -9,8 |
| 2 | 5,8±0,3 | 5,6±0,8 | 1,2±0,4 | 1,3±0,6 | -3,4 | 8,3 |
| 3 | 14±1 | 13±1 | 3,1±0,6 | 3,2±0,3 | -7,1 | 3,2 |
| Hidrotônico (mg/100 mL) | | | | | | |
| 1 | 1,5±0,2 | 1,6±0,5 | 0,35±0,04 | 0,38±0,03 | 6,7 | 8,6 |
| 2 | 0,61±0,06 | 0,59±0,08 | 1,7±0,5 | 1,8±0,4 | -3,3 | 5,9 |

^a n = 3; ^b Erro 1/2(%) = 100 × (valor voltamétrico - valor HPLC) / valor HPLC.

Tabela 3.22 - Resultados obtidos na determinação de AB e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e DPV

| Amostras | AB | | AC | | Erro 1 (%) ^b | Erro 2 (%) ^b |
|---------------------------|-------------------|---------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| | HPLC ^a | DPV | HPLC ^a | DPV ^a | | |
| Refresco (mg/100g) | | | | | | |
| 1 | 4,3±0,2 | 4,7±0,6 | 8,7±0,4 | 9,4±0,5 | 9,3 | 8,0 |
| 2 | 32±3 | 33±1 | 13±1 | 12±2 | 3,1 | -7,7 |
| Gelatina (mg/100g) | | | | | | |
| 1 | 13±1 | 12±2 | 2,4±0,2 | 2,5±0,4 | -7,7 | 4,2 |
| 2 | 9,9±0,5 | 10±1 | 3,1±0,4 | 3,4±0,6 | 1,0 | 9,7 |

^a n = 3; ^b Erro 1/2 (%) = 100 × (valor voltamétrico - valor HPLC) / valor HPLC.

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois procedimentos aplicou-se o teste *t - pareado*. Para o par de corantes TT e AC o t_{exp} foi igual a 2,03 e 2,18, respectivamente. Esses valores de t_{exp} são menores que o valor de $t_{crítico}$ (2,31), e para o AB e AC o t_{exp} foi igual a 2,75 e 2,60, valores também menores que aquele crítico ($t_{crítico} = 3,18$). Portanto, os resultados da determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e

AC obtidos pelo procedimento proposto empregando DPV 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. O procedimento desenvolvido também se mostrou bastante simples, rápido e eficiente.

3.4.5 Determinação simultânea dos pares de corante TT e AC ou AB e AC empregando a amperometria de múltiplos pulsos acoplada a um sistema de análise por injeção em fluxo (MPA-FIA) e o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente

Primeiramente, foram construídos os voltamogramas hidrodinâmicos para cada corante (TT, AC e AB) através da técnica amperométrica convencional. Como já apresentado anteriormente, os potenciais de redução da TT, do AC e do AB estão em torno de -0,29, -0,15 e -0,34 V, respectivamente. Para a construção dos voltamogramas hidrodinâmicos os potenciais foram variados em torno dos potenciais de redução de cada corante, e as correntes registradas foram colocadas em gráfico em função dos potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho. Na Figura 3.38 são mostrados os voltamogramas hidrodinâmicos obtidos.

Analisando cada um dos voltamogramas hidrodinâmicos observou-se que para a TT a corrente aumenta a partir de -0,20 V e atinge um máximo de corrente em -0,45 V, enquanto que para o AC, a corrente aumenta a partir de 0,00V e atinge um máximo em -0,20 V. No caso do AB, a corrente aumenta a partir de -0,20 V e, atinge um máximo de corrente em -0,45 V, similar a TT. Sendo assim, um potencial igual ou maior do que -0,45 V (ou -450 mV) pode ser aplicado para a oxidação eletroquímica da TT ou do AB e, um potencial maior ou igual a -0,20 V (ou -200 mV) pode ser aplicado para a oxidação

eletroquímica do AC, em um sistema FIA, e esses foram os potenciais selecionados para os estudos envolvendo a MPA.

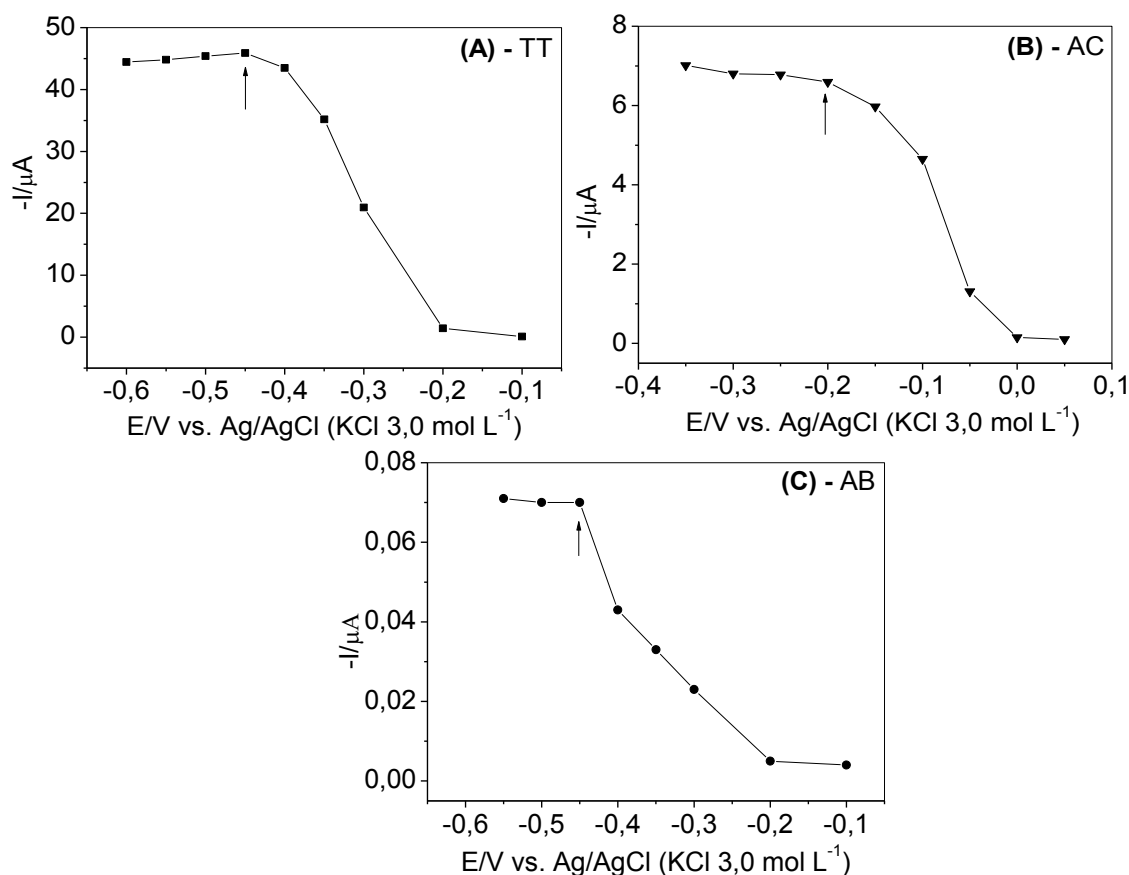


Figura 3.38 - Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos para a TT $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (A), para o AC $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) e para o AB $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ (C), utilizando o eletrodo de BDD. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $250,0 \mu\text{L}$ e vazão = $3,1 \text{ mL min}^{-1}$.

3.4.5.1 Otimização dos parâmetros do sistema FIA

Nas Figuras 3.39 e 3.40 estão os gráficos da dependência do sinal analítico com a vazão e com o volume da alça de amostragem, para os três corantes, TT, AC e AB.

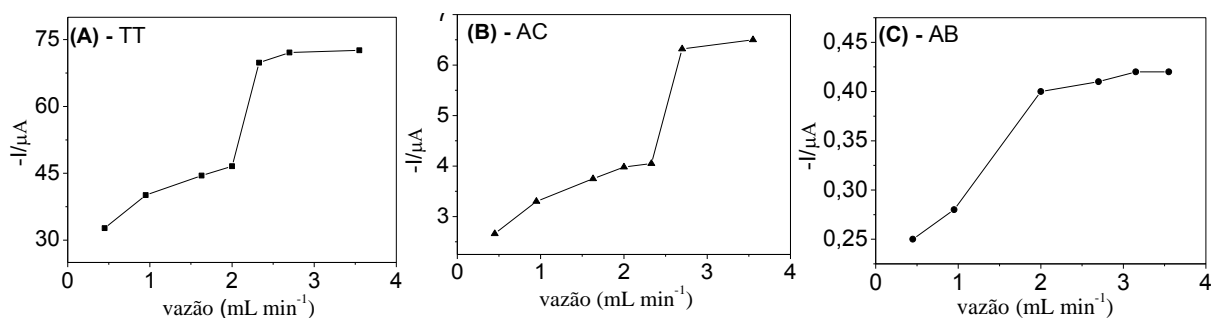


Figura 3.39 - Magnitude da média ($n = 3$) dos sinais de corrente em função da vazão da solução transportadora (H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), vazões: $0,45$ a $3,55 \text{ mL min}^{-1}$, (A) TT $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) AC $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e (C) AB $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$.

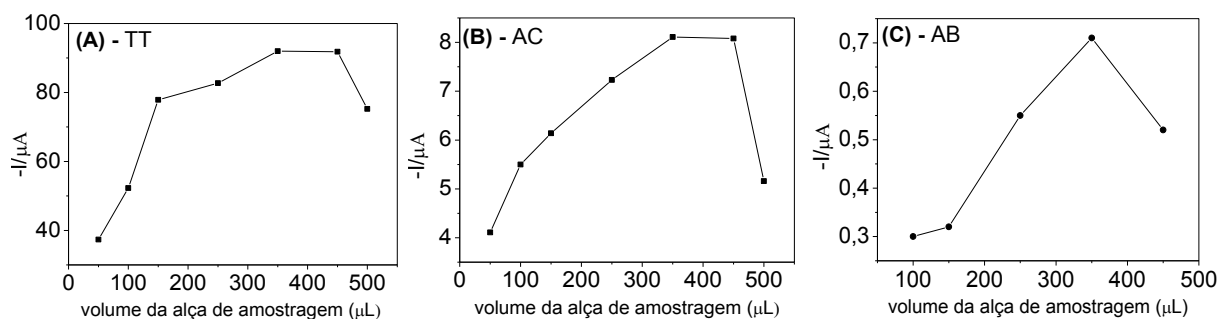


Figura 3.40 - Magnitude da média ($n = 3$) dos sinais de corrente em função do volume da alça de amostragem: 50 a $500 \mu\text{L}$, (A) TT $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) AC $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e (C) AB $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$.

A magnitude do sinal de corrente aumenta com a vazão até o valor de $2,7 \text{ mL min}^{-1}$, para os três corantes, e se mantém constante para vazões maiores. Sendo assim, a vazão de $2,7 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada, por proporcionar maior frequência analítica (78 determinações por hora), além de maior sinal analítico. O efeito do volume da alça de amostragem foi investigado na faixa entre 50 a $500 \mu\text{L}$. A magnitude do sinal amperométrico aumenta com o aumento do volume da alça de amostragem até o valor de $350 \mu\text{L}$, sendo este, o volume da alça de amostragem selecionado.

3.4.5.2 Estudo do efeito do tempo de aplicação dos pulsos de potencial em MPA-FIA

Como discutido na introdução, os pulsos de potencial são aplicados em MPA em função de um tempo pré-determinado pelo experimentador. Sendo assim, realizou-se um estudo do efeito de diferentes tempos de aplicação dos pulsos de potencial para cada corante. Neste trabalho, foram realizadas as determinações simultâneas dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC, os potenciais ótimos de redução desses corantes encontrados através dos voltamogramas hidrodinâmicos foram, -0,45, -0,2 e -0,45 V, para TT, AC e AB, respectivamente. Portanto dois pulsos de potencial foram aplicados para a determinação simultânea desses pares de corantes -0,45 V e -0,15 V.

Para avaliar a influência do tempo de aplicação desses pulsos de potencial, esses dois potenciais foram aplicados variando-se o tempo de aplicação de 100 a 500 ms, de forma univariada, empregando-se o eletrodo de BDD para cada solução de corante. Na Figura 3.41 estão os gráficos da magnitude de corrente obtida em função do tempo de aplicação do pulso de potencial de redução de cada um dos corantes.

Analisando as curvas apresentadas na Figura 3.41, observou-se que para a TT e AB, cujo pulso de potencial aplicado foi o mesmo (-0,45V), a magnitude de corrente diminui significativamente com o aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial, sendo que, o maior sinal analítico foi obtido para um tempo de 100 ms de aplicação do pulso. No caso do AC, cujo pulso de potencial aplicado foi de -0,15 V, a magnitude de corrente aumenta com o aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial até atingir um máximo de corrente em 400 ms. Sendo assim, selecionaram-se os tempos de aplicação de pulsos de potencial de 100 ms para -0,45V e de 400 ms para -0,15 V.

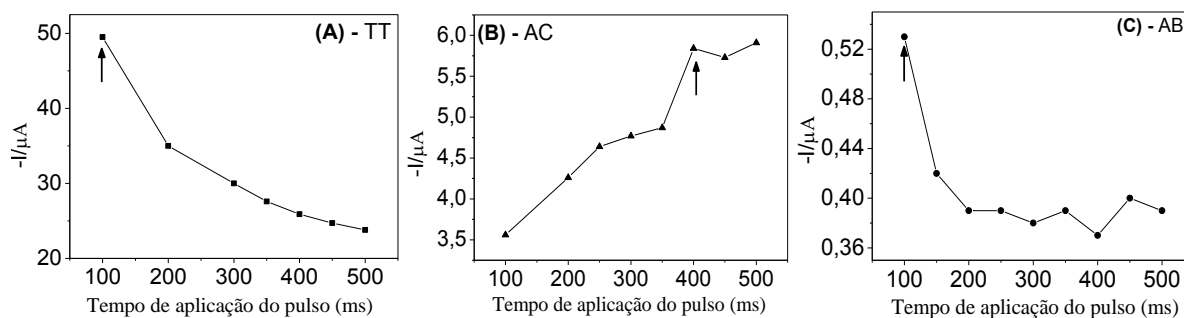


Figura 3.41 - Magnitude da média ($n = 3$) dos sinais de corrente em função do tempo de aplicação dos pulsos de potenciais: 100 a 500 ms, (A) TT $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pulso de potencial = $-0,45 \text{ V}$; (B) AC $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, pulso de potencial = $-0,15 \text{ V}$ e (C) AB $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, pulso de potencial = $-0,45 \text{ V}$.

3.4.5.3 Comportamento amperométrico do eletrodo de BDD para os pares de corantes TT e AC ou AB e AC frente à sequência de aplicação dos pulsos de potencial

Após a seleção dos potenciais que serão aplicados, do tempo de aplicação dos pulsos de potencial e a otimização dos parâmetros do sistema FIA, avaliou-se o método com a aplicação de uma sequência de dois pulsos de potencial em função do tempo, os quais são apresentados a seguir e nas Figuras 3.42 e 3.43.

- (1) $E_{\text{det.1}} = -150 \text{ mV}/400\text{ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a redução apenas de AC;
- (2) $E_{\text{det.2}} = -450 \text{ mV}/100 \text{ ms}$: pulso de potencial no qual ocorre a redução de ambos os corantes (TT e AC ou AB e AC).

Lembrando que, para a aplicação da técnica MPA empregando-se outros eletrodos de trabalho, geralmente, há a necessidade de se aplicar um pulso de potencial, em outro potencial pré-selecionado, para promover a limpeza e regeneração da superfície do eletrodo de trabalho, devido à adsorção de produtos e/ou reagentes. No entanto, como no eletrodo de BDD, a adsorção de

compostos orgânicos e/ou inorgânicos é muito baixa, essa etapa de limpeza da superfície do eletrodo não foi necessária, diminuindo assim a complexidade e aumentando a frequência analítica do procedimento desenvolvido.

É importante salientar que, não foi possível a determinação simultânea dos três corantes e sim dos pares de corantes comumente encontrados nos produtos alimentícios, TT e AC ou AB e AC, devido ao potencial de redução dos corantes TT e AB serem o mesmo (-0,45 V). E ainda, o potencial ótimo para a redução do AC, estimado por meio do voltamograma hidrodinâmico, foi de -0,20 V. No entanto, foi verificado que ao aplicar esse potencial, os corantes TT e AB também se reduziam. Sendo assim, como o objetivo é análise simultânea, optou-se por trabalhar com o pulso de potencial de -0,15 V (150 mV) para a redução do corante AC, uma vez que nesse potencial foram também obtidas elevadas magnitudes de corrente.

Na Figura 3.42 estão os resultados obtidos usando a técnica MPA acoplada ao sistema FIA com a aplicação dos pulsos de potenciais acima discutidos. Este estudo foi realizado em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ sob o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente, as soluções foram injetadas em triplicata na ordem: TT (50,0 μmol L⁻¹); AC (50,0 μmol L⁻¹); e a mistura de TT+AC nas mesmas concentrações (50,0 μmol L⁻¹).

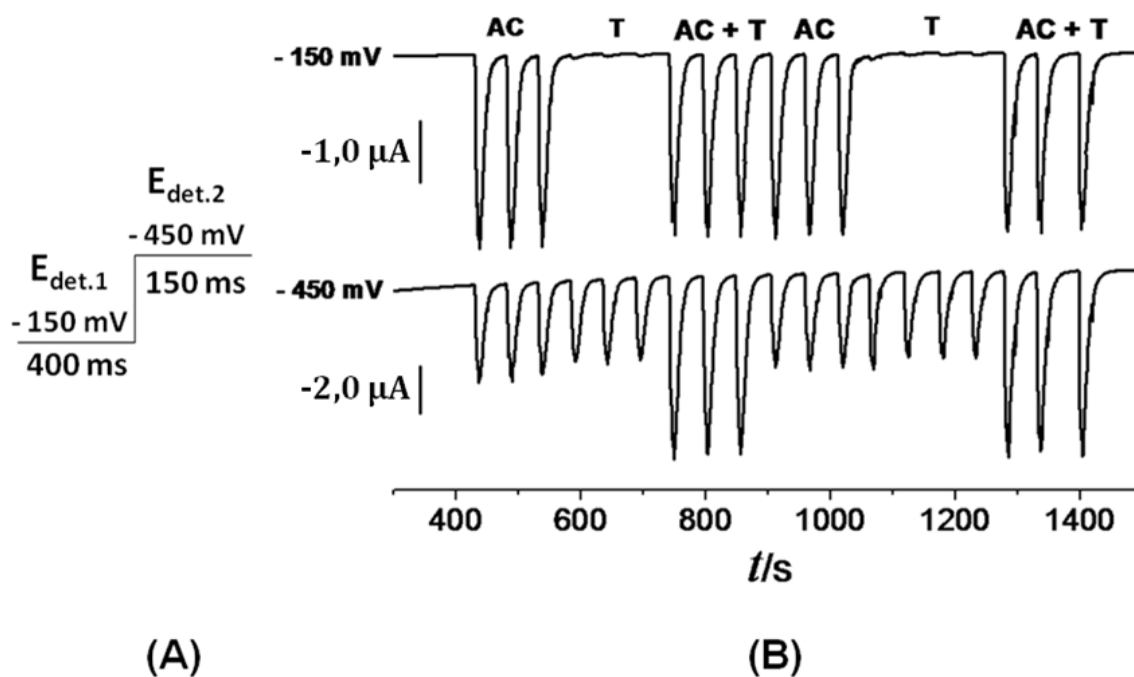


Figura 3.42 - (A) Sequência de aplicações dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de TT $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, AC $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e TT + AC nas mesmas concentrações. Solução transportadora e eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, volume de injeção = $350,0 \mu\text{L}$ e vazão = $2,4 \text{ mL min}^{-1}$.

Observou-se que em $E_{\text{det.1}}$ (-150 mV) a corrente aumenta ao injetar uma solução contendo apenas AC ou uma mistura, porém em ambos os casos o sinal de corrente obtido está relacionado a redução de AC. Enquanto que em $E_{\text{det.2}}$ (-450 mV) a corrente aumenta ao injetar soluções contendo apenas AC, apenas TT ou uma mistura dos dois, isso significa que o sinal de corrente obtido está relacionado com a redução de ambas as espécies.

Portanto, o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.1}}$ é proporcional a concentração apenas de AC ($I_{\text{AC}} = I_{\text{Edet.1}}$) e, o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.2}}$ é proporcional a soma das concentrações de ambos os corantes, AC e TT. Assim, a quantificação de AC pode ser feita de forma direta, enquanto para a TT é necessária a subtração das correntes ($I_{\text{TT}} = I_{\text{Edet.2}} - I_{\text{Edet.1}}$) para se obter os valores de corrente correspondente apenas a concentração de TT.

No entanto, o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.1}}$ para o AC não era igual ao sinal de corrente obtido para o mesmo AC em $E_{\text{det.2}}$, devido ao pulso de potencial selecionado e devido aos tempos de aplicação de cada pulso serem diferentes. Como pode ser observado no voltamograma hidrodinâmico da Figura 3.38 (B), o sinal de corrente do AC continua aumentando em potenciais maiores que -150 mV, aumentando assim o sinal analítico (aumento da corrente) desse analito na determinação simultânea com o TT no potencial de -0,450 V. Conseqüentemente, o sinal de corrente do AC, obtido em $E_{\text{det.2}}$, era 1,5 vezes maior do que o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.1}}$. Sendo assim, o sinal de corrente proporcional a concentração da TT é obtida empregando-se a equação: $I_{\text{TT}} = I_{\text{Edet.2}} - (I_{\text{Edet.1}} \times 1,5 \pm 0,1)$ e, o sinal de corrente proporcional a concentração do AC: $I_{\text{AC}} = I_{\text{Edet.1}}$.

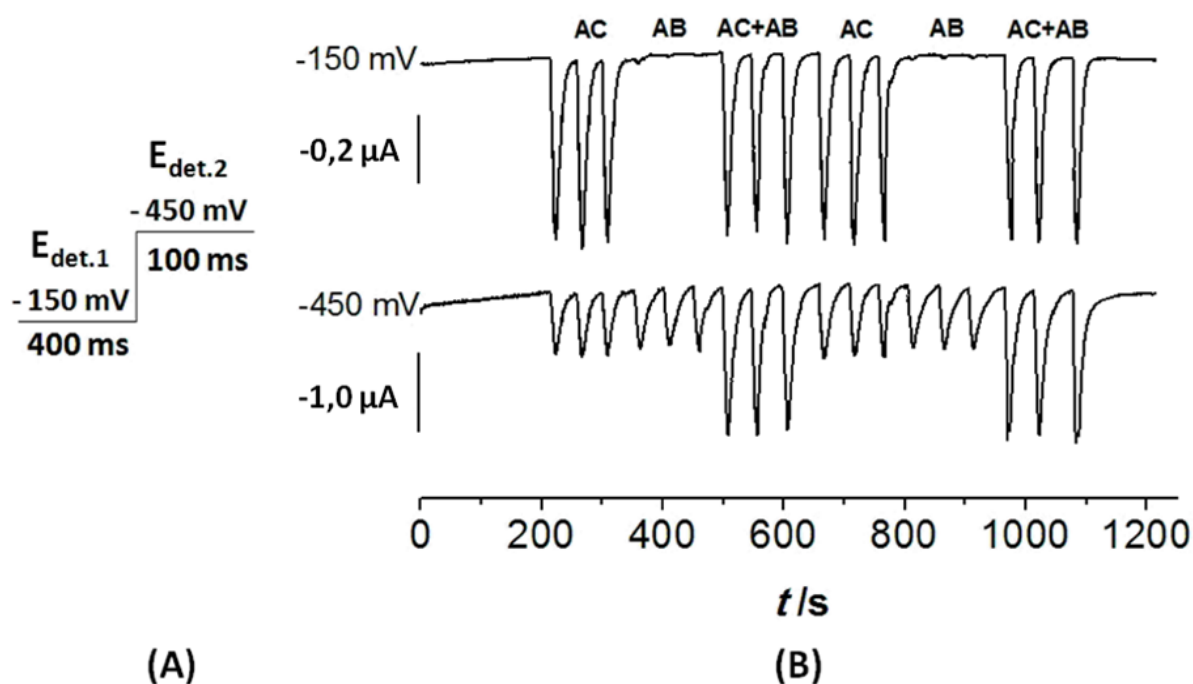


Figura 3.43 - (A) Sequência de aplicações dos pulsos de potencial em função do tempo; (B) Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em solução de AB 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, AC 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e AB + AC nas mesmas concentrações. Solução transportadora e eletrólito suporte: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , volume de injeção = 350,0 μL e vazão = 2,4 mL min^{-1} .

Na Figura 3.43 estão os resultados obtidos para o outro par de corantes, AB e AC, usando a técnica MPA acoplada ao sistema FIA com a aplicação dos pulsos de potenciais anteriormente discutidos. Este estudo foi realizado em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob o eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente, as soluções foram injetadas em triplicata na ordem: AB ($50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$); AC ($10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$); e a mistura de TT+AC nas mesmas concentrações ($50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ AB e $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ AC).

O comportamento deste par de corantes é bastante similar ao comportamento da TT e AC. Em $E_{\text{det.1}}$ (-150 mV) a corrente aumenta ao injetar uma solução contendo apenas AC ou uma mistura, porém em ambos os casos o sinal de corrente obtido está relacionado a redução somente de AC. Já, em $E_{\text{det.2}}$ (-450 mV), a corrente aumenta ao injetar soluções contendo apenas AC, apenas AB ou uma mistura dos dois corantes, indicando que o sinal de corrente obtido corresponde a redução de ambas as espécies.

Esses resultados indicam que, o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.1}}$ é proporcional a concentração apenas de AC e, o sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.2}}$ é proporcional a soma das concentrações de ambos os corantes, AC e AB. Logo, a quantificação de AC pode ser de forma direta, enquanto que para o AB é necessária a subtração das correntes ($I_{\text{AB}} = I_{\text{Edet.2}} - I_{\text{Edet.1}}$), para se obter os valores de corrente correspondente apenas a concentração de AB.

Porém, o mesmo que aconteceu com o sinal de corrente para a determinação de AC com a TT acontece na determinação de AC com AB. O sinal de corrente obtido em $E_{\text{det.1}}$ para o AC não era igual ao sinal de corrente obtido para o mesmo AC em $E_{\text{det.2}}$, o sinal obtido em $E_{\text{det.2}}$ era 1,5 vezes maior, por isso, para se obter o mesmo sinal de corrente para o AC em $E_{\text{det.1}}$ e $E_{\text{det.2}}$ fez-se a multiplicação de $E_{\text{det.1}}$ por um fator de correção de 1,5. Sendo assim, o sinal de corrente correspondente a concentração de AC foi $I_{\text{AC}} = I_{\text{Edet.1}}$, e o sinal de corrente correspondente a concentração de AB foi $I_{\text{AB}} = I_{\text{Edet.2}} - (I_{\text{Edet.1}} \times 1,5 \pm 0,2)$.

Dessa forma, foi possível determinar os pares de corantes: AC e TT ou AC e AB, simultaneamente sem a interferência de um sobre o outro como ocorre na técnica amperométrica convencional, na qual apenas um potencial constante pode ser aplicado em um determinado tempo.

Em sequência aos estudos, foram realizados experimentos com injeções sucessivas em triplicata de diferentes concentrações de uma mistura de TT e AC ou AB e AC. Na Figura 3.44 são mostrados os amperogramas obtidos para cada um dos pulsos de potencial aplicado e as respectivas curvas analíticas obtidas para o par de corantes TT e AC.

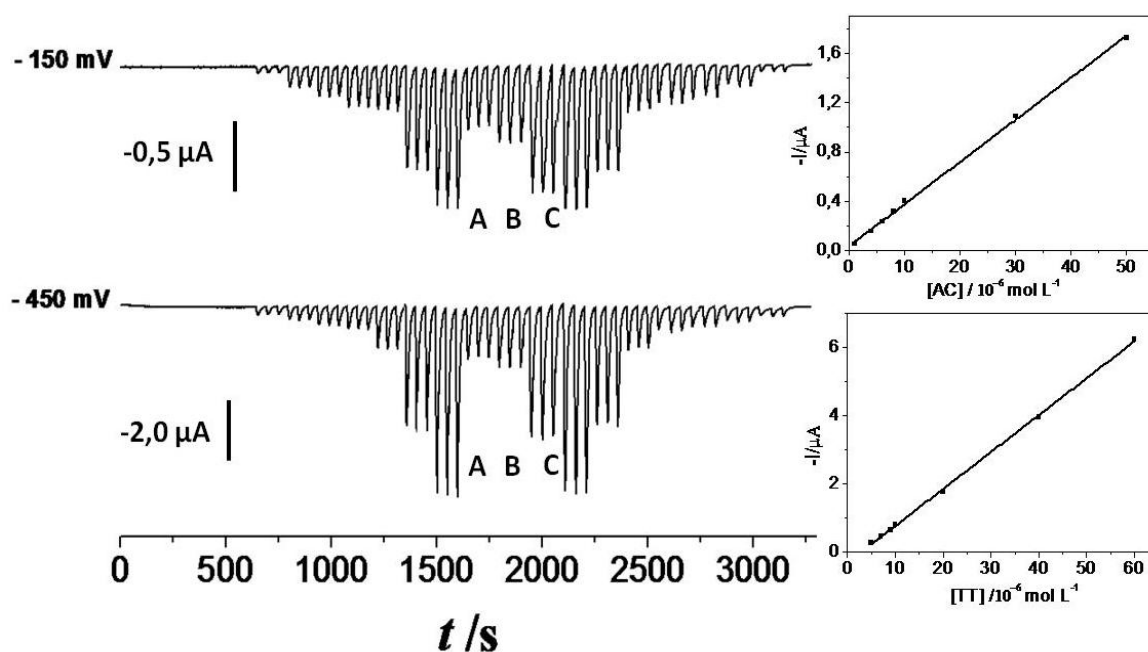


Figura 3.44 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se o eletrodo de BDD em diferentes concentrações de uma mistura de TT e AC. Concentrações de TT: 5,0; 7,0; 9,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; AC: 1,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 30,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os gráficos (ao lado) são as curvas analíticas obtidas para o AC e para a TT. Solução transportadora e eletrólito suporte: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , volume de injeção = 350,0 μL e vazão = 2,4 mL min^{-1} . Os sinais obtidos em A, B e C correspondem a três amostras analisadas.

Como pode ser observado na Figura 3.43, as curvas analíticas apresentaram boa linearidade e as equações correspondentes foram:

$$(I = I_{\text{Edet.1}}, \text{ para o AC})$$

$$-I/\mu\text{A} = 0,0347 + 0,0342 [c/(\mu\text{mol L}^{-1})]; r = 0,999 \quad (3.17)$$

$$(I = I_{\text{Edet.2}} - I_{\text{Edet.1}} \times (1,5 \pm 0,1), \text{ para a TT})$$

$$-I/\mu\text{A} = -0,316 + 0,108 [c/(\mu\text{mol L}^{-1})]; r = 0,999 \quad (3.18)$$

Os limites de detecção ($3 S/N$) obtidos foram a $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para a TT e $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o AC.

Na Figura 3.45 estão os amperogramas obtidos para cada um dos pulsos de potencial aplicado e as respectivas curvas analíticas obtidas para o outro par de corantes AB e AC.

As curvas analíticas apresentaram boa linearidade e as equações correspondentes foram:

$$(I = I_{\text{Edet.1}}, \text{ para o AC})$$

$$-I/\mu\text{A} = 0,0563 + 0,0174 [c/(\mu\text{mol L}^{-1})]; r = 0,997 \quad (3.19)$$

$$(I = I_{\text{Edet.2}} - I_{\text{Edet.1}} \times (1,5 \pm 0,2), \text{ para a AB})$$

$$-I/\mu\text{A} = 0,247 + 0,0949 [c/(\mu\text{mol L}^{-1})]; r = 0,995 \quad (3.20)$$

Os limites de detecção ($3 S/N$) obtidos foram a $3,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para a AB e $8,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para o AC.

Os estudos de repetibilidade intra e entre-dias também foram realizados. A repetibilidade intra-dias foi determinada por medidas sucessivas no mesmo dia de 10 injeções de soluções padrão de uma mistura de TT e AC ou AB e AC em 3 diferentes concentrações. Já a repetibilidade entre-dias foi

determinada por medidas de 3 diferentes concentrações em 5 dias diferentes (n=5). Os desvios padrões relativos (RSD) obtidos estão apresentados na Tabela 3.23.

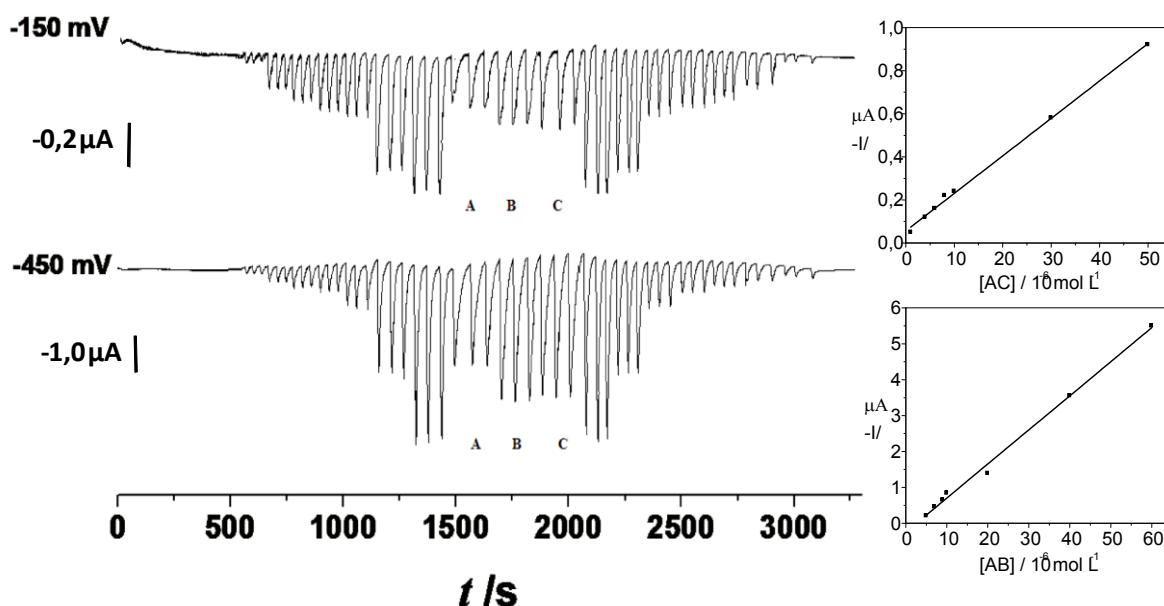


Figura 3.45 - Amperogramas de múltiplos pulsos obtidos empregando-se a o eletrodo de BDD em diferentes concentrações de uma mistura de AB e AC. Concentrações de AB: 5,0; 7,0; 9,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; AC: 1,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 30,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os gráficos (ao lado) são as curvas analíticas obtidas para o AC e para o AB. Solução transportadora e eletrólito suporte: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , volume de injeção = 350,0 μL e vazão = 2,4 mL min^{-1} . Os sinais obtidos em A, B e C correspondem a três amostras analisadas.

Tabela 3.23 - Resultados obtidos no estudo de repetibilidade intra e entre-dias para os pares de corantes determinados simultaneamente por MPA-FIA

| Par de corantes | intra-dias RSD ^a (%) | entre-dias RSD ^b (%) | Par de corantes | intra-dias RSD ^a (%) | entre-dias RSD ^b (%) |
|--|---------------------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| TT (mol L^{-1}) | | | AB (mol L^{-1}) | | |
| $5,0 \times 10^{-6}$ | 3,4 | 6,0 | $5,0 \times 10^{-6}$ | 7,6 | 8,1 |
| $2,0 \times 10^{-5}$ | 1,8 | 8,9 | $2,0 \times 10^{-5}$ | 2,0 | 6,1 |
| $6,0 \times 10^{-5}$ | 4,7 | 7,8 | $6,0 \times 10^{-5}$ | 1,9 | 0,7 |
| AC (mol L^{-1}) | | | AC (mol L^{-1}) | | |
| $1,0 \times 10^{-6}$ | 0,27 | 7,4 | $1,0 \times 10^{-6}$ | 6,6 | 8,9 |
| $1,0 \times 10^{-5}$ | 1,7 | 8,3 | $1,0 \times 10^{-5}$ | 6,4 | 6,8 |
| $5,0 \times 10^{-5}$ | 1,7 | 8,6 | $5,0 \times 10^{-5}$ | 5,5 | 4,4 |

(n = 10); ^b (n = 5)

Os resultados de repetibilidade intra e entre-dias obtidos foram satisfatórios com RSD menores que 9,0% para todas as concentrações estudadas.

3.4.5.4 Estudo de interferentes e testes de adição e recuperação

Assim, como para os procedimentos desenvolvidos apresentados anteriormente, os estudos de análise de interferentes e teste de adição e recuperação foram realizados para este procedimento empregando MPA. As substâncias analisadas (ácido ascórbico (A. asc.), sacarose, ácido cítrico (A. cit.), aspartame (Aspt.) e ciclamato de sódio (Cic. sódio)) como possíveis interferentes foram as mesma do procedimento voltamétrico já que as amostras analisadas também foram de preparados sólidos para refresco, gelatinas e hidrotônicos. Os testes foram feitos pela adição dessas substâncias à solução de TT e AC ou AB e AC e método utilizado está detalhada na parte experimental. Na Tabela 3.24 são mostrados os RSDs obtidos para cada analito em comparação com os possíveis interferentes, nas proporções estudadas.

Também foram realizados os experimentos com a mistura dos interferentes nas proporções de 1:1 com os analitos e os RSDs obtidos foram -5,2% para a TT, -3,1% para o AC e -4,6% para o AB.

Tabela 3.24 - Desvios padrão relativos obtidos no estudo de interferentes

| Proporções | RSD (%) | | |
|------------|---------------|----------------|----------------|
| | TT:A. asc. | AC:A. asc | AB: A. asc |
| 10:1 | -0,37 | -0,81 | -1,8 |
| 1:1 | -4,5 | -6,6 | -5,5 |
| 1:10 | -8,1 | -9,4 | -8,3 |
| | TT: Sacarose | AC: Sacarose | AB: Sacarose |
| 10:1 | 0,52 | 1,6 | 3,1 |
| 1:1 | 3,4 | 3,5 | 4,7 |
| 1:10 | 2,4 | 4,3 | 4,8 |
| | TT:A. cit. | AC: A. cit. | AB: A. cit. |
| 10:1 | 1,8 | 0,88 | 2,3 |
| 1:1 | 3,1 | 0,79 | -4,5 |
| 1:10 | -8,1 | -4,8 | -6,2 |
| | TT:Aspt. | AC: Aspt. | AB: Aspt. |
| 10:1 | -0,77 | 1,0 | 0,78 |
| 1:1 | 3,2 | -2,6 | 0,35 |
| 1:10 | -5,9 | 5,1 | -3,5 |
| | TT:Cic. sódio | AC: Cic. sódio | AB: Cic. sódio |
| 10:1 | -2,1 | -1,8 | 2,9 |
| 1:1 | -4,2 | -5,5 | 1,2 |
| 1:10 | -3,9 | -3,2 | -4,7 |

Para investigar a interferência da matriz das amostras na resposta amperométrica obtida, também foram feitos estudos de adição e recuperação. Para esse estudo foram feitos experimentos em triplicata, por meio da adição de alíquotas de solução padrão de TT + AC ou AB + AC as amostras de preparados sólidos para refrescos, gelatinas e hidrotônicos. As recuperações obtidas variaram entre 95,4% e 114% para a TT e 86,7% e 107% para o AC, e para o outro par de corantes variaram entre 86,1% e 103% para o AB e 94,0% e 113% para o AC (dados não mostrados em tabela). Esses valores obtidos indicam que assim como para o procedimento voltamétrico, não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação simultânea desses pares de corantes neste procedimento empregando MPA-FIA, considerando que para produtos alimentícios as recuperações aceitáveis podem ficar entre 85% e 115%¹⁴⁴.

3.4.5.5 Aplicação do procedimento eletroanalítico empregando MPA-FIA na determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC em amostras comerciais

Finalmente, o procedimento desenvolvido, empregando-se o eletrodo de BDD e a técnica MPA acoplada ao sistema FIA, para a determinação simultânea dos pares de corantes, TT e AC ou AB e AC foram empregadas amostras comerciais de preparados sólidos para refresco, gelatinas e hidrotônicos. Nas Figuras 3.41 e 3.42, apresentadas anteriormente, também são mostrados os sinais transientes de injeções em triplicata para três amostras analisadas (A, B, C).

Nas Tabelas 3.25 e 3.26 são apresentados os resultados obtidos dos teores de TT e AC ou AB e AC determinados empregando-se os métodos amperométrico (MPA-FIA) e cromatográfico (método comparativo descrito no item 3.3.1.3.2) para todas as amostras analisadas.

Tabela 3.25 - Resultados obtidos na determinação simultânea de TT e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e MPA-FIA

| Amostras | TT | | AC | | Erro 1 (%) ^b | Erro 2 (%) ^b |
|--------------------------------|-------------------|-----------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| | HPLC ^a | MPA | HPLC ^a | MPA ^a | | |
| Refresco (mg/100g) | | | | | | |
| 1 | 55±2 | 60±1 | 49±3 | 47±3 | 9,1 | -4,1 |
| 2 | 59±4 | 63±3 | 34±2 | 33±2 | 6,8 | -2,9 |
| 3 | 22±3 | 21±5 | 8,2±0,5 | 8,7±0,6 | -4,5 | 6,1 |
| Gelatina (mg/100g) | | | | | | |
| 1 | 14±2 | 14±1 | 3,1±0,6 | 2,8±0,5 | 0 | -9,8 |
| 2 | 5,8±0,3 | 5,6±0,8 | 1,2±0,4 | 1,3±0,6 | -3,4 | 8,3 |
| Hidrotônico (mg/100 mL) | | | | | | |
| 1 | 1,5±0,2 | 1,6±0,5 | 0,35±0,04 | 0,34±0,08 | 6,7 | -2,9 |
| 2 | 0,61±0,06 | 0,60±0,07 | 1,7±0,5 | 1,8±0,5 | -1,6 | 5,9 |

^a n = 3; ^b Erro 1/2 (%) = 100 × (valor amperométrico - valor HPLC) / valor HPLC.

Tabela 3.26 - Resultados obtidos na determinação simultânea de AB e AC em produtos alimentícios empregando-se HPLC e MPA-FIA

| Amostras | AB | | AC | | Erro 1 (%) ^b | Erro 2 (%) ^b |
|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| | HPLC ^a | MPA ^a | HPLC ^a | MPA ^a | | |
| Gelatina (mg/100g) | | | | | | |
| 1 | 10±1 | 11±3 | 3,3±3 | 3,2±2 | 10 | -3,0 |
| 2 | 13±1 | 14±4 | 2,4±0,2 | 2,6±0,8 | 7,7 | 8,3 |
| 3 | 9,9±0,5 | 10±2 | 3,1±0,4 | 3,2±0,7 | 1,0 | 3,2 |

^a n = 3; ^b Erro 1/2 (%) = 100 × (valor amperométrico- valor HPLC) / valor HPLC.

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos pelos dois procedimentos aplicou-se o teste *t - pareado*. Para o par de corantes TT e AC o t_{exp} foi igual a 1,83 e 2,12, respectivamente, ambos os valores são menores que o $t_{crítico} = 2,44$, e para o AB e AC o t_{exp} foi igual a 2,33 e 3,88 respectivamente, valores também menores do que o $t_{crítico} = 4,30$. Portanto, os resultados da determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC obtidos pelo procedimento proposto empregando MPA-FIA 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.

O procedimento desenvolvido empregando MPA acoplada ao sistema FIA também se mostrou bastante simples, rápido e eficiente podendo ser utilizado para a determinação simultânea de TT e AC ou AB e AC em produtos alimentícios contendo a combinação destes corantes. Ademais, este procedimento possui algumas vantagens por empregar o sistema FIA, como por exemplo, menor consumo de reagentes, menor tempo de análise e instrumentação mais automatizada, o que diminui a interferência do experimentador.

3.4.6 Procedimentos eletroanalíticos desenvolvidos nesta tese vs. Procedimentos eletroanalíticos propostos na literatura para a determinação dos corantes TT, AC e AB

Na literatura já existem alguns procedimentos eletroanalíticos propostos para a determinação de TT e AC. Na Tabela 3.27 é apresentada uma comparação entre os LDs obtidos nesta tese para a TT e AC e aqueles descritos na literatura.

Analisando essa tabela observou-se que os limites de detecção obtidos para ambos os corantes (TT e AC) em ambos os procedimentos desenvolvidos (utilizando SWV e MPA-FIA), são satisfatórios frente aos procedimentos propostos na literatura, e estão entre os que alcançaram menores limites de detecção. Ademais, os potenciais de redução obtidos para esses corantes neste trabalho foram menos negativos (TT: -0,29 V e AC: -0,15 V) do que aqueles obtidos na maioria dos procedimentos propostos na literatura com outros eletrodos de trabalho (TT: de -0,55 V a -0,71 V e AC: de -0,47 V a -0,63 V). Além disso, a maioria dos procedimentos propostos na literatura utiliza como eletrodo de trabalho o eletrodo de mercúrio, o qual necessita de desoxigenação da solução (remoção do O₂), não necessária ao se utilizar o eletrodo de BDD. Ademais, o emprego de eletrodo de mercúrio em fluxo é trabalhoso e requer algumas estratégias, dificultando o trabalho prático.

Outro fator importante é que não foi encontrado na literatura nenhum procedimento eletroanalítico para a determinação simultânea de TT e AC ou AB e AC. Além disso, também não foi encontrado nenhum procedimento eletroanalítico para a determinação do corante azul brilhante, nem mesmo individualmente.

Tabela 3.27 - Comparação dos limites de detecção obtidos na tese com os limites de detecção obtidos em outros procedimentos e/ou materiais de eletrodo para a determinação de TT e AC

| Método | Eletrodo | LD (TT) mol/L | LD (AC) mol/L | Ref. |
|--|------------------|-----------------------|-----------------------|---|
| DPV | BDD | $6,27 \times 10^{-8}$ | $1,31 \times 10^{-8}$ | Este trabalho |
| MPA-FIA | BDD | $2,5 \times 10^{-6}$ | $8,00 \times 10^{-7}$ | Este trabalho |
| DPV | HMDE | $2,5 \times 10^{-6}$ | - | Maslowska e Janiak ⁷² |
| AdSV-DPV | HMDE | $1,87 \times 10^{-8}$ | - | Nevado <i>et al.</i> ⁷⁵ |
| AdSV-SWV | | | | |
| AdSV-SWV | HMDE | - | $1,10 \times 10^{-8}$ | Nevado <i>et al.</i> ⁷⁶ |
| SV-LV | HMDE | - | $7,49 \times 10^{-9}$ | Kapor <i>et al.</i> ⁷⁷ |
| DP-polarografia e métodos quimiométricos | MDE | $6,90 \times 10^{-8}$ | $3,90 \times 10^{-8}$ | Lopez-de-Alba <i>et al.</i> ⁷⁸ |
| SWV | GC/polialilamina | $1,80 \times 10^{-6}$ | $3,50 \times 10^{-6}$ | Silva <i>et al.</i> ⁷⁹ |
| CV | MWCNT/PGE | $9,36 \times 10^{-7}$ | - | Song <i>et al.</i> ⁸⁰ |
| CV | MWCNT/GE | - | $1,10 \times 10^{-6}$ | Song <i>et al.</i> ⁸¹ |

Essas informações reforçam a importância dos métodos desenvolvidos nesta tese para a determinação simultânea desses pares corantes, considerando que eles são comumente encontrados, principalmente em combinação, nos alimentos industrializados.

Capítulo 4 – CONCLUSÃO

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, é possível fazer algumas considerações referentes ao eletrodo de diamante dopado com boro e sua aplicação como sensor no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea de antioxidantes ou corantes alimentícios.

A área eletroativa dos eletrodos de BDD, calculadas pela equação de Randles-Sevcik, apresentou valores um pouco menores do que a área geométrica, isso provavelmente devido ao fato destes eletrodos possuírem uma superfície predominantemente isolante com pequenas áreas condutoras. Ademais, a área eletroativa dos eletrodos de BDD aumentou após a realização de um pré-tratamento catódico na superfície do eletrodo, o que indica que com o pré-tratamento catódico a camada passiva presente na superfície do eletrodo é removida desbloqueando alguns sítios ativos, aumentando assim a área eletroativa do eletrodo.

A realização do pré-tratamento catódico sobre a superfície do eletrodo também proporcionou melhores resultados, como por exemplo, maior intensidade de corrente e menor potencial redox, frente a todos os compostos analisados neste trabalho, os antioxidantes: BHA e BHT e os corantes: TT, AC e AB.

Todos os analitos investigados se oxidam (BHA e BHT) ou se reduzem (TT, AC e AB) na superfície do eletrodo de BDD em reações irreversíveis, cujo transporte de massa é controlado por difusão das espécies à superfície do eletrodo.

A utilização do eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente mostrou-se bastante eficiente na determinação simultânea dos antioxidantes BHA e BHT, tanto pelo procedimento voltamétrico empregando a SWV, quanto pelo procedimento amperométrico empregando a MPA-FIA. Essas duas técnicas

proporcionaram excelentes limites de detecção comparáveis e até menores do que os limites de detecção obtidos em procedimentos propostos na literatura. Cabe também enfatizar que foram encontrados apenas quatro trabalhos descrevendo métodos eletroanalíticos para a determinação simultânea destes antioxidantes.

O eletrodo de BDD pré-tratado catodicamente, também se mostrou bastante adequado na determinação simultânea dos pares de corantes TT e AC ou AB e AC, tanto pelo procedimento voltamétrico empregando a DPV, quanto pelo procedimento amperométrico empregando a MPA-FIA. Infelizmente, não foi possível a determinação simultânea dos três corantes devido à sobreposição picos de corrente da TT e do AB, porém a determinação desse pares já foi satisfatória, já que são encontrados juntos em produtos alimentícios. Ademais, não foram encontrados na literatura procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea desses corantes, sendo que os procedimentos desenvolvidos foram aplicados para a determinação individual destes analitos empregando o eletrodo de mercúrio. Por outro lado, os eletrodos de BDD permitem a realização das medidas sem a necessidade da remoção de O₂, tornando mais simples o a configuração do sistema de análise por injeção em fluxo.

Frente aos quatro procedimentos desenvolvidos neste trabalho de doutorado, é possível concluir que todos apresentaram condições analíticas bastante satisfatórias para a quantificação simultânea dos antioxidantes e dos corantes, e que os resultados obtidos na análise das amostras foram concordantes com os resultados obtidos empregando-se um método comparativo (HPLC). Os quatro procedimentos são simples, rápidos e utilizam instrumentação de custo relativamente baixo.

Os procedimentos desenvolvidos empregando a MPA-FIA possuem algumas vantagens relacionadas a uso do sistema FIA, como por exemplo, menor consumo de reagente e maior frequência de amostragem.

No entanto, os procedimentos empregando as técnicas voltamétricas de pulso são bastante simples, não necessitam praticamente de nenhum outro equipamento além do potenciostato/galvanostato, e dependendo da amostra a ser analisada pode ser mais seletivo do que a MPA, já que na voltametria, a varredura de potencial é realizada em uma região definida e tudo que se oxidar ou reduzir antes ou depois dessa região provavelmente irá interferir nas medidas, ou seja, é uma técnica mais seletiva. Enquanto que na MPA, se algum outro composto se oxidar ou reduzir em potenciais menores do que os pulsos de potenciais selecionados no procedimento possivelmente esse composto irá interferir.

Capítulo 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aditivos alimentares: prato do dia: química. Disponível em: <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/aditivos.html>.
2. Alimentos Industrializados: Quais os riscos de tanta praticidade? Disponível em: <http://www.consumidorbrasil.com.br>.
3. MARQUES, L. "A conservação dos alimentos". Disponível em: www.videos.uevora.pt.
4. WATSON, D.H. *Food chemical safety*, LLC, C.P. Vol. 2, New York, 2000. cap. 2.
5. NUNES M.S. *O Direito Fundamental a Alimentação: Efeitos Adversos dos Alimentos Industrializados e a Saúde Humana*. São Paulo, Faculdade de Direito - PUC, 2006. Dissertação de mestrado, 269 p.
6. ADDITIVES, *Combined Compendium of Food Additive Specifications*, S, FAO/JECFA Monograph, Roma, 2006. p. 46.
7. "O que é aditivo alimentar?" Portaria SVS/MS 540, de 27/10/97. Disponível em: www.anvisa.gov.br.
8. ALBUQUERQUE, R.C. "A química dos alimentos". *Química e Derivados*, novembro: 10, 1985.
9. SKOOG, D.A., HOLLER, F. J. & NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª edição, BOOKMAN, 2002. seção IV.
10. WANG, J., *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, VCH Publishers: Deerfield Beach, 1985.
11. GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. & MACHADO, S.A.S. "Electroanalytical techniques for the determination of pesticides in foods.". *Quim. Nova*, **29**(1): 105, 2006.
12. HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, R.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y. & SWAIN, G.M. "Conductive diamond thin-films in electrochemistry". *Diam. Relat. Mat.*, **12**(10-11): 1940, 2003.

13. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **76**(3): 685, 2008.
14. PECKOVÁ, K.; MUSILOVÁ, J. & BAREK, J. "Boron-doped diamond film electrodes—new tool for voltammetric determination of organic substances". *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **39**: 148, 2009.
15. DEGÁSPARI, C.H. & WASZCZYNSKYJ, N. "Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos". *Visão Acadêmica*, **5**(1): 33, 2004.
16. TAKEMOTO, E. *Determinação Simultânea de Antioxidantes Sintéticos em Óleos Vegetais, Margarinas e Gorduras Hidrogenadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos - Unicamp, 2004. Tese de doutorado, 101p.
17. Resolução no 04/88 Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde- CNS/MS, ALIMENTOS, 1988: Diário Oficial da União - Seção I - 19/12/88.
18. Resolução de diretoria colegiada - RDC N°.23, de 15 de fevereiro de 2005. Disponível em: www.anvisa.gov.br.
19. JECFA. *Joint Expert Committee on Food Additives - Monographs and Evaluations*. Disponível em: www.jecfa.com.
20. RAMALHO, V.C. & JORGE, N. "Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos". *Quim. Nova*, **29**(4): 755, 2006.
21. ROBARDS, K. & DILLI, S. "Analytical-chemistry of synthetic food antioxidants - a review". *Analyst*. **112**(7): 933, 1987.
22. KOCHHAR, S.P. & ROSSELL, J.B., *Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems*, in *Food Antioxidants*, SCIENCE, E.A., Editor. 1997: London. p. 19.
23. RAJALAKSHMI, D. & NARASIMHAN, S., *Food Antioxidants: sources and methods of evaluation*, in *Food Antioxidants - Technological, Toxicological and Health Perspectives*, DEKKER, M., Editor. 1997: New York. p. 65.

24. ANDRE, C.; CASTANHEIRA, I.; CRUZ, J.M.; PASEIRO, P. & SANCHES-SILVA, A. "Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review". *Trends Food Sci. Tech.*, **21**(5): 229, 2010.
25. TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA, J. & GODOY, H.T. "Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV.". *Quim. Nova*, **32**(5): 1189, 2009.
26. SAAD, B.; SING, Y.Y.; NAWI, M.A.; HASHIM, N.; ALI, A.S.M.; SALEH, M.I.; SULAIMAN, S.F.; TALIB, K.M. & AHMAD, K. "Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC". *Food Chem.*, **105**(1): 389, 2007.
27. PERRIN, C. & MEYER, L. "Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection". *Food Chem.*, **77**(1): 93, 2002.
28. YAMADA, M.; MIYATA, M.; KATO, Y.; NAKAMURA, M.; NISHIJIMA, M.; SHIBATA, T. & ITO, Y. "Determination of 9 phenolic antioxidants in foods by high-performance liquid-chromatography". *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, **34**(6): 535, 1993.
29. CAMPOS, G.C.M. & TOLEDO, M.C.F. "The determination of BHA, BHT and TBHQ in fats and oils by high performance liquid chromatography". *Braz. J. Food Technol.*, **3**: 65, 2000.
30. RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R. & BOATELLA, J. "Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products". *J. Chromatogr. A*, **822**(2): 305, 1998.
31. WANG, J. & FREIHA, B.A. "Preconcentration and differential pulse voltammetry of BHA at a carbon paste electrode". *Anal. Chim. Acta*, **154**, 1983.
32. GONZALEZ, A.; RUIZ, M.A.; YANEZSEDENO, P. & PINGARRON, J.M. "Voltammetric determination of tert-butylhydroxyanisole in micellar and emulsified media". *Anal. Chim. Acta*, **285**(1-2): 63, 1994.
33. AGUI, M.L.; REVIEJO, A.J.; YANEZSEDENO, P. & PINGARRON, J.M. "Analytical applications of cylindrical carbon-fiber microelectrodes -

- simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants in food". *Anal. Chem.*, **67**(13): 2195, 1995.
34. CEBALLOS, C. & FERNANDEZ, H. "The electroanalytical determination of antioxidants in corn-oil using ultramicroelectrodes". *J. Braz. Chem. Soc.*, **6**(1): 1, 1995.
35. AGUI, L.; YANEZSEDENO, P. & PINGARRON, J.M. "Analytical applications of poly(3-methylthiophene)-coated cylindrical carbon fiber microelectrodes". *Electroanalysis*, **9**(6): 468, 1997.
36. DIAZ, T.G.; CABANILLAS, A.G.; FRANCO, M.F.A.; SALINAS, F. & VIRE, J.C. "Voltammetric behavior and simultaneous determination of the antioxidants propyl gallate, butylated hydroxyanisole, and butylated hydroxytoluene in acidic acetonitrile-water medium using PLS calibration". *Electroanalysis*, **10**(7): 497, 1998.
37. DE LA FUENTE, C.; ACUNA, J.A.; VAZQUEZ, M.D.; TASCÓN, M.L. & BATANERO, P.S. "Voltammetric determination of the phenolic antioxidants 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone at a polypyrrole electrode modified with a nickel phthalocyanine complex". *Talanta*, **49**(2): 441, 1999.
38. CEBALLOS, C. & FERNANDEZ, H. "Synthetic antioxidants determination in lard and vegetable oils by the use of voltammetric methods on disk ultramicroelectrodes". *Food Res. Int.*, **33**(5): 357, 2000.
39. CEBALLOS, C. & FERNANDEZ, H. "Synthetic antioxidants in edible oils by square-wave voltammetry on ultramicroelectrodes". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**(7): 731, 2000.
40. NI, Y.N.; WANG, L. & KOKOT, S. "Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and tert-butylhydroquinone by use of chemometric approaches". *Anal. Chim. Acta*, **412**(1-2): 185, 2000.
41. MICHALKIEWICZ, S.; MECHANIK, M. & MALYSZKO, J. "Voltammetric study of some synthetic antioxidants on platinum microelectrodes in acetic acid medium". *Electroanalysis*, **16**(7): 588, 2004.

42. CEBALLOS, C.D. "Using square wave voltammetry on ultramicroelectrodes to determine synthetic antioxidants in vegetable oils". *J. Chem. Educ.*, **83**(9): 1394, 2006.
43. RAYMUNDO, M.D.; PAULA, M.M.D.; FRANCO, C. & FETT, R. "Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques". *LWT-Food Sci. Technol.*, **40**(7): 1133, 2007.
44. KUMAR, S.S. & NARAYANAN, S.S. "Mechanically immobilized nickel aquapentacyanoferrate modified electrode as an amperometric sensor for the determination of BHA". *Talanta*, **76**(1): 54, 2008.
45. FREITAS, K.H.G. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu-3(PO₄)(₂) immobilized in polyester resin". *Talanta*, **81**(3): 1102, 2010.
46. YANEZSEDENO, P.; PINGARRON, J.M. & DIEZ, L.M.P. "Determination of tert-butylhydroxyanisole and tert-butylhydroxytoluene by flow-injection with amperometric detection". *Anal. Chim. Acta*, **252** (1-2): 153, 1991.
47. RUIZ, M.A.; BLAZQUEZ, M.G. & PINGARRON, J.M. "Electrocatalytic and flow-injection determination of the antioxidant tert-butylhydroxyanisole at a nickel phthalocyanine polymer-modified electrode". *Anal. Chim. Acta*, **305**(1-3): 49, 1995.
48. RUIZ, M.A.; GARCIA-MORENO, E.; BARBAS, C. & PINGARRON, J.M. "Determination of phenolic antioxidants by HPLC with amperometric detection at a nickel phthalocyanine polymer modified electrode". *Electroanalysis*, **11**(7): 470, 1999.
49. LUQUE, M.; RIOS, A. & VALCARCEL, M. "A poly(vinyl chloride) graphite composite electrode for flow-injection amperometric determination of antioxidants". *Anal. Chim. Acta*, **395**(1-2): 217, 1999.
50. RIBER, J.; DE LA FUENTE, C.; VAZQUEZ, M.D.; TASCÓN, M.L. & BATANERO, P.S. "Electrochemical study of antioxidants at a polypyrrole electrode modified by a nickel phthalocyanine complex. Application to their HPLC separation and to their FIA system detections". *Talanta*, **52**(2): 241, 2000.

51. JAYASRI, D. & NARAYANAN, S.S. "Electrocatalytic oxidation and amperometric determination of BHA at graphite-wax composite electrode with silver hexacyanoferrate as electrocatalyst". *Sens. Actuators B*, **119**(1): 135, 2006.
52. OSTROSKI, I.; BARICCATTI, R.A. & LINDINO, C.A. "Estabilidade dos corantes tartrazina e amarelo crepúsculo em refrigerantes". *Acta Science Technology*, **27**, 2005.
53. Resolução - CNNPA nº 44. de 1977. Disponível em: www.anvisa.gov.br.
54. PRADO, M.A. & GODOY, H.T. "Corantes Artificiais em Alimentos". *Alimentos e Nutrição*, **14**(2): 237, 2003.
55. SCHVARTSMAN, S. "Aditivos alimentares". *Pediatrics*, **4**: 202, 1982.
56. BRATU, M.C.; DANET, A.F. & BRATU, A. "The HPLC determination of synthetic food colorants". *Rev. Chim-Bucharest*, **56**(5): 453, 2005.
57. VIDOTTI, E.C.; COSTA, W.F. & OLIVEIRA, C.C. "Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples". *Talanta*, **68**(3): 516, 2006.
58. MINIOTI, K.S.; SAKELLARIOU, C.F. & THOMAIDIS, N.S. "Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector". *Anal. Chim. Acta*, **583**(1): 103, 2007.
59. ALVES, S.P.; BRUM, D.M.; ANDRADE, E.C.B. & NETTO, A.D.P. "Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection". *Food Chem.*, **107**(1): 489, 2008.
60. YOSHIOKA, N. & ICHIHASHI, K. "Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection". *Talanta*, **74**(5): 1408, 2008.
61. VACHIRAPATAMA, N.; MAHAJAROENSIRI, J. & VISESSANGUAN, W. "Identification and determination of seven synthetic dyes in foodstuffs and soft drinks on monolithic C18 column by

- high performance liquid chromatography". *J. Food Drug Anal.*, **16**(5): 77, 2008.
62. DIACU, E. & ENE, C.P. "Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow in soft drinks by liquid chromatography". *Rev. Chim-Bucharest*, **60**(8): 745, 2009.
63. CULZONI, M.J.; SCHENONE, A.V.; LLAMAS, N.E.; GARRIDO, M.; DI NEZIO, M.S.; BAND, B.S.F. & GOICOECHEA, H.C. "Fast chromatographic method for the determination of dyes in beverages by using high performance liquid chromatography-Diode array detection data and second order algorithms". *J. Chromatogr. A*, **1216**(42): 7063, 2009.
64. DINC, E.; AKTAS, A.H.; BALEANU, D. & USTUNDAG, O. "Simultaneous determination of tartrazine and allura red in commercial preparation by chemometric HPLC method". *J. Food Drug Anal.*, **14**(3): 284, 2006.
65. DINC, E.; AKTAS, A.H. & USTUNDAG, O. "New liquid chromatographic-chemometric approach for the determination of sunset yellow and tartrazine in commercial preparation". *J. AOAC Int.*, **88**(6): 1748, 2005.
66. NI, Y.N. & GONG, X.F. "Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants". *Anal. Chim. Acta*. **354**(1-3): 163, 1997.
67. LI, R.; JIANG, Z.T. & WANG, R.X. "Solid phase extraction combined direct spectrophotometric determination of brilliant blue in food using beta-cyclodextrin polymer". *Food Anal. Methods*, **2**(4): 264, 2009.
68. LLAMAS, N.E.; GARRIDO, M.; DI NEZIO, M.S. & BAND, B.S.F. "Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares". *Anal. Chim. Acta*, **655**(1-2): 38, 2009.
69. NI, Y.N.; WANG, Y. & KOKOT, S. "Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics". *Talanta*, **78**(2): 432, 2009.
70. AKTAS, A.H. & ERTOKUS, G.P. "Spectral Simultaneous Determination of Tartrazine, Allura Red, Sunset Yellow and Caramel in Drink Sample by Chemometric Method". *Rev. Anal. Chem.*, **29**(2): 107, 2010.

71. AKTAS, A.H. & PEKCAN, G. "Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, sunset yellow and allura red in commercial products by artificial neural network calibration". *Asian J. Chem.*, **18**(3): 2025, 2006.
72. MASLOWSKA, J. & JANIĄK, J. "Voltammetric and spectrophotometric studies on tartrazine - A food colorant". *Chemia Anal. (Warsaw)*, **41**(5): 855, 1996.
73. NI, Y.N.; BAI, J.L. & JIN, L. "Simultaneous adsorptive voltammetric analysis of mixed colorants by multivariate calibration approach". *Anal. Chim. Acta.*, **329**(1-2): 65, 1996.
74. NI, Y.N. & BAI, J.L. "Simultaneous determination of Amaranth and Sunset Yellow by ratio derivative voltammetry". *Talanta*, **44**(1): 105, 1997.
75. NEVADO, J.J.B.; FLORES, J.R. & LLERENA, M.J.V. "Adsorptive stripping voltammetry of Tartrazine at the hanging mercury drop electrode in soft drinks". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**(7): 989, 1997.
76. NEVADO, J.J.B.; FLORES, J.R. & LLERENA, M.J.V. "Square wave adsorptive voltammetric determination of sunset yellow". *Talanta*, **44**(3): 467, 1997.
77. KAPOR, M.A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P.A. & ZANONI, M.V.B. "Electroanalysis of food dyes: determination of indigo-carmin and tartrazine". *Eclética Quim.*, **26**: 53, 2001.
78. LOPEZ-DE-ALBA, P.L.; LOPEZ-MARTINEZ, L. & DE-LEON-RODRIGUEZ, L.M. "Simultaneous determination of synthetic dyes tartrazine, allura red and sunset yellow by differential pulse polarography and partial least squares. A multivariate calibration method". *Electroanalysis*, **14**(3): 197, 2002.
79. SILVA, M.L.S.; GARCIA, M.B.Q.; LIMA, J. & BARRADO, E. "Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system". *Talanta*, **72**(1): 282, 2007.

80. SONG, Y.Z.; XU, J.M.; LV, J.S.; ZHONG, H.; YE, Y. & XIE, J.M. "Electrochemical reduction of tartrazine at multi-walled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode". *Indian J. Chem. Sect. A.*, **49**(8): 1030, 2010.
81. SONG, Y.Z. "Electrochemical reduction of sunset yellow at a multiwalled carbon nanotube (MWCNT)-modified glassy carbon electrode and its analytical application". *Can. J. Chem.*, **88**(7): 676, 2010.
82. BARANAUSKAS, V. "O futuro brilhante dos diamantes sintéticos". *Ciencia Hoje*, **27**(161): 40, 2000.
83. PLESKOV, Y.V. "Electrochemistry of diamond: A review". *Russ. J. Electrochem.*, **38**(12): 1275, 2002.
84. DE BARROS, R.D.M.; RIBEIRO, M.C.; AN-SUMODJO, P.T.; JULIAO, M.S.D.; SERRANO, S.H.P. & FERREIRA, N.G. "Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I: Histórico, produção e caracterização". *Quim. Nova*, **28**(2): 317, 2005.
85. FERRO, S. "Synthesis of diamond". *J. Mater. Chem.*, **12**(10): 2843, 2002.
86. CARVALHO, A.E., *Caracterização Eletroquímica de Eletrodos de Diamante Dopado com Boro em Função de seu Pré-Tratamento*. São Carlos, Departamento de Química - UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 149 p.
87. TEÓFILO, R.F., *Métodos Quimiométricos em Estudos Eletroquímicos de Fenóis sobre Filmes de Diamante Dopado com Boro*. Campinas, Instituto de Química - Unicamp, 2007. Tese de doutorado, 329 p.
88. LUONG, J.H.T.; MALEB, K.B. & GLENNON, J.D. "Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications". *Analyst*, **134**: 1965, 2009.
89. BUTLER, J. E.; WOODIN, R.L.; BROWN, L.M. & FALLON, P. "Thin film diamond growth mechanisms". *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, **342**(1164): 209, 1993.
90. ALFARO, M.A.Q.; FERRO, S.; MARTINEZ-HUITLE, C.A. & VONG, Y.M. "Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment". *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**(2): 227, 2006.

91. PLESKOV, Y.V. "Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis". *J. Anal. Chem.*, **55**(11): 1045, 2000.
92. JULIAO, M.S.D.; ALMEIDA, E.C.; LA SCALEA, M.A.; FERREIRA, N.G.; COMPTON, R.G. & SERRANO, S.H.P. "Voltammetric behavior of nitrofurazone at highly boron doped diamond electrode". *Electroanalysis*, **17**(3): 269, 2005.
93. FERREIRA, N.G.; SILVA, L.L.G.; CORAT, E.J.; TRAVA-AIROLDI, V.J. & IHA, K. "Electrochemical characterization on semiconductors p-type CVD diamond electrodes". *Braz. J. Phys.*, **29**(4): 760, 1999.
94. FERREIRA, N.G.; SILVA, L.L.G.; CORAT, E.J. & TRAVA-AIROLDI, V.J. "Kinetics study of diamond electrodes at different levels of boron doping as quasi-reversible systems". *Diam. Relat. Mat.*, **11**(8): PII S0925, 2002.
95. PANIZZA, M. & CERISOLA, G. "Application of diamond electrodes to electrochemical processes". *Electrochim. Acta*, **51**(2): 191, 2005.
96. GRANGER, M.C. & SWAIN, G.M. "The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes". *J. Electrochem. Soc.*, **146**(12): 4551, 1999.
97. SWAIN, G.M., in *Electroanalytical Chemistry*, RUBINSTEIN, 2004, Marcel Dekker: New York.
98. WANG, S.H. & SWAIN, G.M. "Spatially heterogeneous electrical and electrochemical properties of hydrogen-terminated boron-doped nanocrystalline diamond thin film deposited from an argon-rich CH₄/H₂/Ar/B₂H₆ source gas mixture". *J. Phys. Chem. C.*, **111**(10): 3986, 2007.
99. YU, H.B.; WANG, H.; QUAN, X.; CHEN, S. & ZHANG, Y.B. "Amperometric determination of chemical oxygen demand using boron-doped diamond (BDD) sensor". *Electrochem. Commun.*, **9**: 2280, 2007.
100. MASCIA, M.; VACCA, A.; POLCARO, A.M.; PALMAS, S.; RUIZ, J.R. & DA POZZO, A. "Electrochemical treatment of phenolic waters in presence of chloride with boron-doped diamond (BDD) anodes: Experimental study and mathematical model". *J. Hazard. Mater.*, **174**(1-3): 314, 2010.

101. RODRIGO, M.A.; CANIZARES, P.; BUITRON, C. & SAEZ, C. "Electrochemical technologies for the regeneration of urban wastewaters". *Electrochim. Acta*, **55**(27): 8160, 2010.
102. COMPTON, R.G.; FOORD, J.S. & MARKEN, F. "Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes". *Electroanalysis*, **15**(17): 1349, 2003.
103. CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S. & AVACA, L.A. "Square wave voltammetry on boron-doped diamond electrodes for analytical determinations". *Diam. Relat. Mat.*, **11**(9): 1670, 2002.
104. JONES, S.E.W. & COMPTON, R.G. "Stripping analysis using boron-doped diamond electrodes". *Curr. Anal. Chem.*, **4**(3): 170, 2008.
105. JOLLEY, S.; KOPPANG, M.; JACKSON, T. & SWAIN, G.M. "Flow injection analysis with diamond thin-film detectors". *Anal. Chem.*, **69**(20): 4099, 1997.
106. LAWRENCE, N.S.; PAGELS, M.; MEREDITH, A.; JONES, T.G.J.; HALL, C.E.; PICKLES, C.S.J.; GODFRIED, H.P.; BANKS, C.E.; COMPTON, R.G. & JIANG, L. "Electroanalytical applications of boron-doped diamond microelectrode arrays". *Talanta*, **69**(4): 829, 2006.
107. YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes". *J. Electroanal. Chem.*, **473**(1-2), 1999.
108. FERRO, S. & DE BATTISTI, A. "Electron transfer reactions at conductive diamond electrodes". *Electrochim. Acta*, **47**(10): PII S0013, 2002.
109. SUFFREDINI, H.B.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S.A.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment". *Electrochim. Acta*, **49**(22-23): 4021, 2004.
110. BATISTA, E.F.; SARTORI, E.R.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Differential pulse voltammetric determination of sildenafil citrate (Viagra[®]) in pharmaceutical

- formulations using a boron-doped diamond electrode". *Anal. Lett.*, **43**(6), 2010.
111. LOURENÇÃO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous differential pulse voltammetric determination of ascorbic acid and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Electroanalysis*, **22**(15): 1717, 2010.
112. LOURENÇÃO, B.C.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C.; MAZO, L.H. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **78**: 748, 2009.
113. SARTORI, E.R.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode without the need of previous alkaline hydrolysis step". *J. Braz. Chem. Soc.*, **20**(2): 360, 2009.
114. SARTORI, E.R.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **81**: 1418, 2010.
115. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro". *Quim. Nova*, **31**(6): 1405, 2008.
116. MEDEIROS, R.A.; DE CARVALHO, A.E.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetry determination of aspartame in dietary products using a boron-doped diamond electrode". *Anal. Lett.*, **40**(16-18): 3195, 2007.
117. BRETT, A.M.O. & BRETT, C.M.A., *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, INC, 1993: New York.
118. MABBOTT, G.A. "An introduction to cyclic voltammetry". *J. Chem. Educ.*, **60**(9): 697, 1983.

119. DE SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S. & AVACA, L.A. "Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos". *Quim. Nova*, **26**(1): 81, 2003.
120. DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A.R.; TOLEDO, R.A.; PEDROSA, V.A.; OLIVEIRA, R.T.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. & MACHADO, S.A.S. "Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações". *Quim. Nova*, **27**(5): 790, 2004.
121. SCHOLZ, F. *Electroanalytical methods*. 2005, Springer: New York.
122. LOVRIC, M.; KOMORSKYLOVRIC, S. & MURRAY, R.W. "Adsorption effects in square-wave voltammetry of totally irreversible redox reactions". *Electrochim. Acta*, **33**(6): 739, 1988.
123. TERASHIMA, C.; RAO, T.N.; SARADA, B.V.; TRYK, D.A. & FUJISHIMA, A. "Electrochemical oxidation of chlorophenols at a boron-doped diamond electrode and their determination by high-performance liquid chromatography with amperometric detection". *Anal. Chem.*, **74**(4): 895, 2002.
124. MARZOUK, S.A.M.; SAYOUR, H.E.M.; RAGAB, A.M.; CASCIO, W.E. & HASSAN, S.S.M. "A simple fia-system for simultaneous measurements of glucose and lactate with amperometric detection". *Electroanalysis*, **12**(16): 1304, 2000.
125. IVANDINI, T.A.; HONDA, K.; RAO, T.N.; FUJISHIMA, A. & EINAGA, Y. "Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography". *Talanta*, **71**(2): 648, 2007.
126. DOS SANTOS, W.T.P. *Desenvolvimento de metodologias de análise em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos*. Uberlândia, Instituto de Química - Universidade Federal de Uberlândia, 2005. Tese de doutorado, 125 p.
127. DOS SANTOS, W.T.P.; DE ALMEIDA, E.G.N.; FERREIRA, H.E.A.; GIMENES, D.T. & RICHTER, E.M. "Simultaneous flow injection analysis of paracetamol and ascorbic acid with multiple pulse amperometric detection". *Electroanalysis*, **20**(17): 1878, 2008.

128. SURAREUNGCHAI, W.; DEEPUNYA, W. & TASAKORN, P. "Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose". *Anal. Chim. Acta*, **448**: 215, 2001.
129. GIMENES, D.T.; DOS SANTOS, W.T.P.; TORMIN, T.P.; MUNOZ, R.A.A. & RICHTER, E.M. "Flow-Injection amperometric method for indirect determination of dopamine in the presence of a large excess of ascorbic acid". *Electroanalysis*, **20**(1): 74, 2010.
130. ARRUDA, M.A.Z. & COLLINS, C.H. "Informações essenciais para a caracterização de um sistema de análise em fluxo". *Quim. Nova*, **28**(4): 739, 2005.
131. RUZICKA J. & HANSEN, S.H., *Flow Injection Analysis*, ed. SONS, 1979, New York.
132. SALAZAR-BANDA, G.R.; ANDRADE, L.S.; NASCENTE, P.A.P.; PIZANI, P.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments". *Electrochim. Acta*, **51**(22): 4612, 2006.
133. GANDINI, D.; MICHAUD, P.A.; DUO, I.; MAHE, E.; HAENNI, W.; PERRET, A. & COMNINELLIS, C. "Electrochemical behavior of synthetic boron-doped diamond thin film anodes". *New Diam. Front. C. Tec.*, **9**(5): 303, 1999.
134. PEDROTTI, J.J.; ANGNES, L. & GUTZ, I.G.R. "Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions". *Electroanalysis*, **8**(7): 673, 1996.
135. RICHTER, E.M.; JESUS, D.P.D.; NEVES, C.A.; LAGO, C.L.D. & ANGNES, L. "Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de cds graváveis". *Quim. Nova*, **26**(6): 839, 2003.
136. ICH, *Validation of analytical procedures: text and methodology*, GUIDELINE, I.H.T., 2005. p. 1.
137. EFTEKHARI, A. "Comment on "Carbon nanowalls as material for electrochemical transducers" [Appl. Phys. Lett. 95, 014104 (2009)]". *Appl. Phys. Lett.*, **96**(12), 2010.

138. HOLT, K.B.; BARD, A.J.; SHOW, Y. & SWAIN, G.M. "Scanning electrochemical microscopy and conductive probe atomic force microscopy studies of hydrogen-terminated boron-doped diamond electrodes with different doping levels". *J. Phys. Chem. B*, **108**(39): 15117, 2004.
139. BECKER, D. & JUTTNER, K. "Impedance measurements on boron-doped diamond electrodes at different doping levels". *New Diam. Front. C. Tec.*, **13**(2): 67, 2003.
140. SALAZAR-BANDA, G.R.; DE CARVALHO, A.E.; ANDRADE, L.S.; ROCHA-FILHO, R.C. & AVACA, L.A. "On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments". *J. Appl. Electrochem.*, **40**(10): 1817, 2010.
141. GOSSER, D.K., *Cyclic Voltammetry: Simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1993, New York: VCH. 165.
142. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Application*. 2000, New York: John Wiley & Sons, INC. 833.
143. LOVRIC, M. & KOMORSKYLOVRIC, S. "Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant". *J. Electroanal. Chem.*, **248**(2): 239, 1988.
144. Resolução 899 de 29 de maio de 2003 - *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*. Disponível em: ww.anvisa.com.br.
145. RUIZ, M.A.; CALVO, M.P. & PINGARRON, J.M. "Catalytic-voltammetric determination of the antioxidant tert-butylhydroxyanisole (bha) at a nickel phthalocyanine modified carbon-paste electrode". *Talanta*, **41**(2): 289, 1994.
146. JAYASRI, D. & NARAYANAN, S.S. "Manganese(II) hexacyanoferrate based renewable amperometric sensor for the determination of butylated hydroxyanisole in food products". *Food Chem.*, **101**(2): 607, 2007.
147. PAVANELLI, S.P.; BISPO, G.L.; NASCENTES, C.C. & AUGUSTI, R. "Degradation of food dyes by zero-valent metals exposed to ultrasonic irradiation in water medium: optimization and electrospray ionization mass spectrometry monitoring". *J. Braz. Chem. Soc.*, **22**(1): 111, 2011.