



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**"Desenvolvimento de sensor
potenciométrico baseado em eletrodos de
carbono grafite para determinação de
ácido cítrico em bebidas"**

Orientando: Celso Luciano de Araujo

Orientadora: Profa. Dra. Nívia Maria Melo Coelho

Uberlândia

Junho - 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

"Desenvolvimento de sensor potenciométrico baseado em eletrodos de carbono grafite para determinação de ácido cítrico em bebidas"

Celso Luciano de Araújo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientando: Celso Luciano de Araújo

Orientadora: Prof. Dra. Nívia Maria Melo Coelho

Uberlândia

Junho – 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A659d Araújo, Celso Luciano de, 1972-

Desenvolvimento de sensor potenciométrico baseado em eletrodos de carbono grafite para determinação de ácido cítrico em bebidas / Celso Luciano de Araújo. - 2009.

63 f. : il.

Orientadora: Nivia Maria Melo Coelho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Detectores químicos - Teses. 2. Ácido cítrico - Teses. I. Coelho, Nivia Maria Melo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química.. III. Título.

CDU: 543.07



CELSO LUCIANO DE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR POTENCIOMETRICO BASEADO EM
ELETRODOS DE CARBONO GRAFITE PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO
CÍTRICO EM BEBIDAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Nivia Maria melo Coelho

Uberlândia
2009

Dedico este trabalho,

Ao meu filho: Estevão pelo carinho e dinamismo que deu em minha vida.

A minha companheira Maria Emilia, pelo apoio, amor e principalmente pela compreensão de conviver com minhas ausências.

Aos meus Pais: Adelina e Haroldo pelo carinho, apoio, dedicação e incentivo sempre.

A meus irmãos Haroldo ⁺, André, Carlos e Ana por fazerem parte de minha vida.

"... Vamos rir, chorar e aprender. Aprender especialmente como casar Céu e Terra, vale dizer, como combinar o cotidiano com o surpreendente, a imanência opaca dos dias com a transcendência radiosa do espírito, a vida na plena liberdade com a morte simbolizada como um unir-se com os ancestrais, a felicidade discreta nesse mundo com a grande promessa na eternidade. E, ao final, teremos descoberto mil razões para viver mais e melhor, todos juntos, como uma grande família, na mesma Aldeia Comum, generosa e bela, o planeta Terra."

[Leonardo Boff]

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a DEUS, pela minha iluminada vida e meus caminhos, para atingir meus ideais e estando comigo todos os instantes da minha vida.

A minha orientadora Nívia Maria Melo Coelho pelo apoio, conselhos, orientações e acima de tudo pela paciência e amizade, além de respeitar as idéias e opiniões originadas de seus orientandos.

Aos professores, Dr. João Marcos Madurro e Dra. Ana Graci Brito Madurro pelas orientações e apoio na realização de ensaios e discussões, em específico pela colaboração estabelecida e uso das instalações e equipamentos do Laboratório de Filmes Poliméricos (LAFIP).

Aos colegas discentes e amigos do Laboratório de Espectroscopia Aplicada (LEA), Edmar, Luciano, Odilon, Helen, Cleide, Vanessa e Rafael, pelo companheirismo e amizade estabelecidos.

Aos colegas discentes do LAFIP, Lucas, Sabrina, Diego e André Afonso, pela ajuda, idéias e comprometimento.

A CAPES, ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, pelo suporte técnico e financeiro.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

"O estudo, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido sermos crianças por toda a vida."

[Albert Einstein]

Sumário

<i>Lista de figuras</i>	I
<i>Lista de tabelas</i>	IV
<i>Lista de abreviaturas e siglas</i>	V
<i>Resumo</i>	VII
<i>Abstract</i>	VIII
1. Revisão bibliográfica	01
1.1. Aditivos alimentares.....	05
1.1.1. Tipos de aditivos.....	07
1.1.2. Ácido cítrico.....	10
1.2. Metodologias usadas na quantificação de ácidos em bebidas.....	11
1.3. Métodos eletroanalíticos aplicados à quantificação de ácidos em alimentos.....	12
1.3.1. Detectores potenciométricos em fluxo.....	14
1.4. Sensores.....	17
2. Objetivos	23
3. Parte experimental	24
3.1. Reagentes.....	24
3.2. Materiais e equipamentos utilizados.....	25
3.3. Soluções.....	30
3.3.1. Solução $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$	30
3.3.2. Solução tampão fosfato.....	30
3.3.3. Solução transportadora.....	30
3.3.4. Solução de ácido cítrico.....	31
3.4. Preparação de eletrodos.....	31
3.4.1. Eletrodo de referência.....	31

<i>3.4.2. Eletrodo de trabalho.....</i>	31
<i>3.5. Preparação do sistema de detecção potenciométrico</i>	32
<i>3.6. Medidas de voltamogramas dos eletrodos.....</i>	32
<i>3.7. Resposta do sensor de grafite.....</i>	33
<i>3.7.1. Em função do volume e da vazão de fluxo.....</i>	33
<i>3.7.2. Em função da concentração de ácido cítrico.....</i>	33
<i>3.7.3. Em função do pH.....</i>	33
<i>3.7.4. Em função da concentração de tampão fosfato.....</i>	34
<i>3.8. Estudo de interferentes.....</i>	34
<i>3.9. Comparação de métodos.....</i>	35
<i>3.10. Aplicação do método.....</i>	35
4. Resultados e discussões.....	36
<i>4.1. Medidas eletroquímicas dos eletrodos de carbono grafite.....</i>	36
<i>4.2. Resposta do sensor de grafite.....</i>	37
<i>4.3. Sensor potenciométrico.....</i>	40
<i>4.4. Otimização da resposta do sensor.....</i>	41
<i>4.5. Estudo de interferentes.....</i>	48
<i>4.6. Aplicação do método.....</i>	48
5. Conclusões.....	50
6. Propostas de continuidade do trabalho.....	52
7. Referências bibliográficas.....	53

Lista de Figuras

<i>Figura 1</i> – Fórmula estrutural plana do ácido cítrico.....	10
<i>Figura 2</i> – Esquema geral dos principais componentes de um sensor eletroquímico.....	19
<i>Figura 3</i> - Sensor potenciométrico.....	21
<i>Figura 4</i> – Equipamentos utilizados para o fornecimento de água (A), medidas de pH (B) e limpeza dos eletrodos por ultra-som(C).....	25
<i>Figura 5</i> – Materiais utilizados nos estudos eletroquímicos: (A) cela eletroquímica de três compartimentos, (B) placa de platina, (C) eletrodo de referência, (D) eletrodo de trabalho e (E) sistema (VC).....	26
<i>Figura 6</i> – Equipamentos utilizados nos experimentos eletroquímicos e limpeza dos eletrodos: (A) potencioscópio CH Instruments modelo 1120 A, (B) potencioscópio da CH Instruments Modelo 760C, (C) politriz Aropol 2V da Arotec.....	27
<i>Figura 7</i> – Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado neste trabalho. <i>R</i> ₁ , solução transportadora; <i>P</i> , bomba peristáltica; <i>W</i> , resíduo; <i>L</i> , alças injetora; <i>I</i> válvula injetora; <i>A</i> soluções padrões de ácido cítrico preparados em solução transportadora; <i>B</i> , bobina de reação; <i>C</i> , detector potenciométrico.....	27
<i>Figura 8</i> – Imagens do (A) sistema FIP tipo tubular, (B e C) injetor e (D) bomba peristáltica Gilson®. Balança analítica.....	28
<i>Figura 9</i> – Célula eletroquímica usada como sistema de detecção potenciométrico: (a) suporte de teflon; (b) pino de contato; (c) revestimento de	

teflon; (d) peça de latão; (e) carbono grafite; (f) anel de vedação; (g) peça de acrílico; (h) ponteira com eletrodo de referência..... 29

Figura 10 – Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite em solução contendo 5 mmol L^{-1} de $K_3Fe(CN)_6$, 5 mmol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1} KNO_3$, 100 mV s^{-1} 36

Figura 11 – Resposta potenciométrica do eletrodo de grafite em relação à solução de ácido cítrico $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ nas vazões (A) $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; (B) $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; (C) $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ 38

Figura 12 – Resposta potenciométrica do eletrodo de grafite foi avaliada injetando $65 \mu\text{L}$ de soluções padrões de ácido cítrico, em triplicata em relação à concentração da solução de ácido cítrico: (A) $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$; (C) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; (D) $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; (E) $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$; (F) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (G) $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (H) $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (I) 10 mmol L^{-1} . Sob condições experimentais: solução transportadora ($KCl 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $pH 7,00$), vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e bobina de 25 cm 39

Figura 13 – Resposta do sensor potenciométrico (carbono grafite) em função do pH do meio reacional. Condições experimentais: $65 \mu\text{L}$ de ácido cítrico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em solução transportadora contendo $0,10 \text{ mol L}^{-1} KCl$; vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ 42

Figura 14 – Resposta do sensor potenciométrico (carbono grafite) em função da vazão para diferentes volumes de injeção; condições experimentais: $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$

<i>de ácido cítrico preparado em solução transportadora contendo 0,10 mol L⁻¹ de KCl, pH 7,00.....</i>	44
---	----

<i>Figura 15 – Tempo de restabelecimento da linha base-TRL em função da vazão para diferentes volumes de injeção: (■)33; (●)65 e (▲) 130µL. condições experimentais: 1,0 mmol L⁻¹ de ácido cítrico preparado em solução transportadora contendo 0,10 mol L⁻¹ KCl, pH 7,00.....</i>	45
--	----

<i>Figura 16 – Curva de calibração do ácido cítrico em solução transportadora KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0.....</i>	46
--	----

<i>Figura 17 – Diagrama da proposta de hifenação do sistema HPLC ao sistema de detecção desenvolvido nesta dissertação.....</i>	52
---	----

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Aplicações de alguns ácidos carboxílicos e seus sais na indústria alimentícia.....</i>	08
<i>Tabela 2 - Tipo de detectores potenciométricos utilizados em sistemas FIA.....</i>	16
<i>Tabela 3 – Informações técnicas das substâncias presentes em isotônicos (gatoredede®).....</i>	34
<i>Tabela 4 – Informações técnicas de substâncias presentes em sucos.....</i>	34
<i>Tabela 5 – Figuras de mérito para o sensor de grafite em função da concentração de ácido cítrico.....</i>	47
<i>Tabela 6 – Efeito de interferência (%) das espécies estudadas no sinal analítico.....</i>	48
<i>Tabela 7 – Comparaçao de métodos para determinação de ácido cítrico em amostras de suco e isotônico.....</i>	49

Lista de Abreviaturas e Siglas

ΔE, variação de potencial;

ADP, adenosina difosfática

BHA, 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA - butil-hidroxianisol)

BHT, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT - butil-hidroxitolueno)

BIA, “batch injection analysis” (análise por injeção em batelada)

CLAE, cromatografia liquida de alta eficiêncıa

ESI, eletrodos seletivos de ions

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations

FIA Flow Injection analysis (análise por injeção em fluxo)

FIP, *Flow Injection Potentiometry* (potenciometria por injeção em fluxo)

IAL, Instituto Adolfo Lutz

INS 330, inscrição nacional de saúde 330

LD, limite de detecção;

LQ, limite de quantificação;

LR, faixa linear de resposta;

NADH, hidrogênio nicotinamida adenina dinucleotídeo

OMS, *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

RSD, desvio padrão relativo

SFA, *segment flow analysis* (fluxo contínuo segmentado)

SVS/MS, Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde

TRL, tempo de restabelecimento de linha base;

UV/VIS, ultravioleta/ visível

VC, voltametria cíclica

RESUMO

Neste trabalho foi investigado um sensor potenciométrico à base de eletrodo de grafite para a determinação de ácido cítrico em bebidas utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo. A resposta máxima do sensor foi obtida por injeção de 65 μ L de ácido cítrico na solução carregadora contendo KCl 0,1 mol L⁻¹ à vazão de 1,0 mL min⁻¹. O sensor apresentou uma faixa linear de resposta de 0,07 - 7,0 mmol L⁻¹ e o limites de quantificação e detecção de 15,60 e 5,15 nmol L⁻¹, respectivamente. Foi observada boa seletividade para várias espécies interferentes (carboxilatos e ácidos orgânicos). O sensor é de fácil construção e apresenta rápida resposta analítica (120 segundos) mantendo ainda suas características. O método proposto foi aplicado para determinação de ácido cítrico em amostras de bebidas.

Os resultados mostraram que o sensor proposto pode ser usado como sistema de detecção em fluxo, para a determinação de ácido cítrico em amostras de bebidas, tais como, sucos e bebidas isotônicas.

ABSTRACT

In this work, a potentiometric sensor based graphite carbon electrodes was constructed. The proposed sensor was applied for determination of citric acid in beverages using a flow system. The maximum response was obtained for 1.0 mL min⁻¹ flow rate of the carrier stream (0.1mol L⁻¹ KCl at pH 7.0) and 65 µL of citric acid. This electrode has a wide linear dynamic range between 0.07 - 7.0 mmol L⁻¹, quantification limit and detection limit of 15,60 nmol L⁻¹ and 5,15 nmol L⁻¹, respectively. The proposed sensor displayed good selectivities over a variety for other anions (carboxylates and organic acids).The electrode is easily constructed at a relatively low cost with fast response time (within 120 s) without significant change in its performance characteristic.

The potentiometric sensor was successfully applied to the determination of citric acid in real food samples, that is, juices and isotonic drinks.

1. Revisão bibliográfica

No crescente consumo mundial de alimentos e bebidas relata-se, por meios de comunicação, cada vez mais práticas na conservação destes alimentos para atender as necessidades do consumo. Segundo *CUBEROT et. al. (2004)*, isto se deve as alterações dos alimentos, causada por microorganismos, que é uma das causas mais preocupantes da indústria alimentícia. Porque, além de perder grande quantidade de nutrientes, podem dar lugar a intoxicações graves.

Para que isto não ocorra, existe uma série de fatores que influenciam no desenvolvimento de uma alteração microbiana tais como: tempo, temperatura, pH, potencial redox, pressão osmótica e água livre.

Por isto, toda indústria alimentícia tem os objetivos que consistem basicamente em prolongar o período durante o qual o alimento permanece adequado para o consumo, aumentar a variedade da dieta, fornecer os nutrientes necessários para a manutenção da saúde e gerar lucros para os fabricantes (*FELLOWS, 2006*).

Os alimentos que não estão aptos para o consumo, são aqueles que por diferentes causas não estão dentro das especificações da Lei. Podem ser:

- a) Alimentos contaminados;
- b) Alimentos alterados;
- c) Alimentos falsificados;
- d) Alimentos adulterados.

Desta forma faz-se necessária a análise de alimentos. E esta análise é importante dentro dos seguintes setores:

- ✓ *Indústrias* – controle de qualidade, controle de processos em águas, alimentos, matérias-primas, produto acabado, embalagens, etc.
- ✓ *Universidades e institutos de pesquisa* – desenvolvimento de metodologia, controle de processos, prestação de serviços, etc.
- ✓ *Órgãos governamentais* – registro de alimentos, fiscalização na venda e distribuição, etc.

A análise de alimentos pode apresentar as seguintes finalidades:

- ✓ *Controle de qualidade de rotina* – é utilizado tanto para checar a matéria-prima que chega a indústria, como o produto acabado que sai de uma indústria, além de controlar os diversos estágios do processamento. Nestes casos, de análises de rotina, costuma-se, sempre que possível, utilizar métodos instrumentais que são bem mais rápidos que os convencionais.
- ✓ *Fiscalização* – é utilizada para verificar o cumprimento da legislação, através de métodos analíticos que sejam precisos e exatos e, de preferência, oficiais.
- ✓ *Pesquisa* – é utilizada para desenvolver ou adaptar métodos analíticos exatos, precisos, sensíveis, rápidos, eficientes, simples e de baixo custo na determinação de um dado componente do alimento.

Em análise de alimentos, os objetivos se resumem em determinar um componente específico do alimento, ou vários componentes. A determinação do componente deve ser através da medida de alguma propriedade física como: medida de massa ou volume, medida de absorção de radiação, medida de potencial elétrico, etc.

Existem dois tipos básicos de métodos em análise de alimentos: métodos convencionais e instrumentais. Os primeiros são aqueles que não necessitam de nenhum equipamento sofisticado, isto é, utilizam apenas a vidraria e reagentes, e geralmente são utilizados em métodos gravimétricos e volumétricos. Os métodos instrumentais, como o próprio nome diz, são utilizados equipamentos eletrônicos de configuração simples até os mais sofisticados. São utilizados, sempre que possível os métodos instrumentais no lugar dos convencionais por serem mais precisos, sensíveis e ainda alguns destes métodos são não-destrutivos de amostras, o que já não ocorre nos métodos convencionais (gravimétricos e titulométricos) o que seria uma vantagem em termos da Química limpa e produção de efluentes químicos.

A palavra bromatologia deriva do grego *Broma*, *bromatos* significa “*dos alimentos*”; e *logos* significa ciência, portanto *bromatologia* significa *ciência dos alimentos*. A bromatologia estuda os alimentos, sua composição química, sua ação no organismo, seu valor alimentício e calórico, suas propriedades físicas, químicas, toxicológicas e também adulterantes, contaminantes, fraudes e etc. Enfim, tem a ver com todos os diferentes aspectos que envolvem um alimento, com isto permitindo o juízo sobre a qualidade do alimento.

A análise bromatológica, dentro do contexto da química analítica aplicada, desempenha importante papel avaliador da qualidade e segurança dos alimentos. Em determinados momentos, a sua utilização torna-se decisiva para equacionar e resolver problemas de saúde pública e também para definir e complementar ações de vigilância sanitária. Atua, também, como coadjuvante nas inovações tecnológicas de alimentos. Devido à complexidade da sua constituição orgânica,

os alimentos muitas vezes são considerados matrizes difíceis de serem manipuladas; o analista deverá estar devidamente treinado, e somente a experiência ao longo dos anos poderá fornecer segurança analítica. Dentre os requisitos essenciais para evidenciar a qualidade de um trabalho laboratorial e fornecer confiabilidade aos resultados emitidos, a escolha adequada de metodologia analítica é, sem dúvida nenhuma, de grande relevância. De nada adianta um laboratório dispor de instalação e equipamentos de ponta, se o método analítico selecionado não for apropriado.

Em razão dos avanços tecnológicos na ciência dos alimentos, tanto nos aspectos toxicológico como de identidade e qualidade, tornam-se imperativas a necessidade da modernização e a contínua atualização dos métodos analíticos. Novas técnicas instrumentais, baseadas em determinados princípios físicos e químicos, freqüentemente são desenvolvidas, assim como, a utilização da biologia molecular, para cada vez mais quantificar espécies químicas em concentrações muito baixas.

São inúmeros, na literatura científica corrente, os métodos para detectar e quantificar níveis de contaminantes químicos e avaliar a autenticidade de alimentos. Muitas vezes, o laboratório fica incapacitado para acompanhar tamanha mudança e modernidade. Há necessidade da disposição de métodos alternativos de análises, quando possível, que estejam ao alcance da maioria dos laboratórios, notadamente, os de saúde pública. Nem sempre o método que faz uso do equipamento sofisticado e dispendioso é o mais adequado; às vezes, dependendo do analito e da sua concentração em um dado alimento, a utilização de metodologia tradicional e de baixo custo torna-se mais eficiente. Por exemplo, os

métodos volumétricos e espectrofotométricos na região do ultravioleta/ visível (UV/VIS) não devem ser considerados obsoletos e ultrapassados.

Em face à grande dinâmica na atualização da legislação de alimentos no Brasil, principalmente nos últimos anos, e à luz dos novos conhecimentos científicos mundiais, torna-se inevitável a adequação de metodologia analítica para que os laboratórios possam cumprir as novas exigências legais. Nos últimos anos, foram publicadas várias Resoluções e Decretos a respeito de alimentos, tanto no Ministério da Agricultura como no Ministério da Saúde (*INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008*).

A bromatologia é muito importante, pois ela é quem atua em vários segmentos do controle de qualidade, do processamento e do armazenamento dos alimentos processados. Muitas vezes, o termo análise de alimentos é substituído pelo termo “*química de alimentos*”.

1.1. Aditivos alimentares

Com o advento do desenvolvimento tecnológico, é grande e variado o número de substâncias químicas empregadas no decorrer de todo o processo de produção de alimentos. Dentre estas substâncias inócuas, destacam-se os aditivos, que podem apresentar grandes vantagens para melhorar a qualidade dos alimentos do ponto de vista tecnológico, desde que seu uso seja seguro. Para isto, é necessário verificar se obedecem às normas de identidade e pureza estabelecidas pela *World Health Organization* e *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/OMS, 1999)* ou pelo *Food Chemicals Codex*, e exigidos pela legislação brasileira (*DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 1998*).

As substâncias usadas como aditivos alimentares, de acordo com ANVISA, são agrupadas em classes cujo uso é permitido, sendo estabelecidos alguns critérios tais como, os alimentos em que podem ser usados e os limites máximos no produto final. Estas classes são revisadas e acrescidas com novas substâncias sempre que necessário.

A partir de 1997, houve muitas alterações na legislação de aditivos alimentares, a fim de compatibilizar a legislação nacional com o estabelecido nas resoluções do Mercosul, a começar com a Portaria nº 540 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS) de 27/10/1997 (ANVISA, 1997), que aprova o regulamento técnico de aditivos alimentares e os define como “*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. Ao agregar-se, poderá resultar que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.*” Esta Portaria também altera a classificação dos aditivos alimentares, aumentando de 11 para 23 classes funcionais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os aditivos alimentares, espécies químicas adicionadas aos alimentos, devem ser substâncias inócuas ao homem e utilizadas para o benefício geral dos alimentos industrializados.

Esta mesma legislação obriga os produtores a mencionarem nas embalagens de alimentos e bebidas os aditivos utilizados (FAO/WHO, 1999) e também proíbe que os aditivos substituam a matéria-prima básica, alterem o valor nutritivo, sejam tóxicos ou mascarem falhas de fabricação. Muitos aditivos utilizados em alimentos e bebidas apresentam propriedades toxicológicas. Portanto, é dever dos órgãos competentes fiscalizarem a qualidade dos alimentos industrializados para preservar a saúde dos consumidores.

1.1.1. Tipos de aditivos

A seguir encontram-se comentadas algumas classes de aditivos, cujas definições foram extraídas da Portaria nº 540/97:

Acidulantes/Reguladores de acidez - substâncias que aumentam a acidez ou conferem um sabor ácido aos alimentos, dentre estas são de maior emprego os ácidos orgânicos, tais como: o ácido cítrico, tartárico, láctico, fumárico e málico; além do ácido fosfórico. Estes ácidos também podem ser utilizados como reguladores de acidez, substâncias que alteram ou controlam a acidez ou a alcalinidade dos alimentos.

Antioxidantes - substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos. Geralmente são utilizados os galatos (propila, octila ou duodecila), ácido ascórbico e seus isômeros, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) e 2-terc-butil-4-hidroxianisol ou 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA).

Conservantes - são substâncias que impedem ou retardam as alterações dos alimentos provocadas por microorganismos ou enzimas. Entre os de maior emprego estão: dióxido de enxofre, ácido benzóico, ácido sórbico, ácido propiônico na forma livre, ou de sais de sódio ou potássio e nitritos e nitratos de sódio e de potássio.

No Brasil, são permitidos mais de 300 aditivos.

A Tabela 1 nos mostra algumas aplicações de aditivos em alimentos de acordo com suas respectivas classes.

Tabela 1: Aplicações de alguns ácidos carboxílicos e seus sais na indústria alimentícia.

Aditivo	Função	Ação	Alimentos
Propionato de sódio ou cálcio	Conservante	Propionato de cálcio: previne o crescimento do mofo em pães. Propionato de sódio: usado em tortas e bolos	Pães, tortas e bolos
Ácido cítrico/ Citrato de sódio	Acidulante, Aromatizante, agente quelante	Ácido cítrico: usado como ácido forte, um aromatizante cítrico, e como antioxidante. Citrato de sódio: um constituinte de tampão que controla acidez de gelatina, geléia, sorvetes, balas e outros alimentos.	Sorvetes, sucos de frutas, balas, bebidas carbonatadas, fritas (batatas)
Ácido fumárico	Acidulante	É uma fonte ideal de acidez em gêneros alimentícios secos.	Bebidas energéticas, pudins, gelatinas, tortas.
Ácido lático	Regulador de acidez	Inibe a deterioração de azeitonas, controla a acidez em queijos industrializados. Confere sabor picante a sobremesas congeladas, bebidas carbonatadas e aromatizadas com aromas de frutas, etc.	Azeitonas, queijos, sobremesas congeladas e bebidas carbonatadas
Benzoato de sódio	Conservante	Indústrias o têm usado por mais de 70 anos para prevenir o crescimento de microorganismos em alimentos ácidos.	Sucos de fruta, bebidas Carbonatadas e conservas
Ácido sóblico/ Sorbito de potássio	Antimofo	Ocorre naturalmente em plantas e em alimentos, previne o mofo	Queijo, bolos, vinhos, frutas desidratadas, xaropes e geléias
Ácido ascórbico	Antioxidante, Estabilizante	Previne a perda de cor e sabor por reagir com o “indesejável” oxigênio em alimentos; também evita a formação de nitroaminas, que se formam do nitrito de sódio usado com inibidor de crescimento de microorganismos	Carnes, sucos e alimentos Enriquecidos
Tartarato ácido de Potássio	Acidulante	Ingrediente ácido de fermentos em pó e controlador de acidez	Fermentos em pó, massas assadas

Fonte: QUÍMICA NOVA NA ESCOLA Ácida orgânicos N° 15, MAIO 2002

Os excessos destes aditivos químicos podem causar vários problemas de saúde, em geral em pessoas mais sensíveis. Se por um lado os aditivos são bons para conservar, realçar sabor, etc, por outro lado o excesso destes pode acarretar a vários problemas de saúde.

É vetado o uso de aditivos quando:

- ✓ Houver evidência ou suspeita de que o mesmo possui toxicidade ou um potencial de toxicidade;
- ✓ Interferir sensivelmente e desfavoravelmente no valor nutritivo dos alimentos; induzir o consumidor a um erro, engano ou confusão.

Segundo *CARVALHO (2005)*, alguns males que o excesso de aditivos químicos pode causar à saúde humana:

- ✓ Fosfolipídios causam colesterol e arteriosclerose;
- ✓ Aromatizantes causam alergias, crescimento retardado de câncer;
- Sacarina pode provocar algum tipo de câncer;
- ✓ Nitritos e nitratos câncer de estômago e esôfago;
- ✓ Ácido benzóico, polissorbados e umectantes causam alergias e distúrbios gastrointestinais;
- ✓ Dióxido de enxofre causa redução do nível de vitamina B1 e mutações genéticas;
- ✓ Alguns corantes artificiais causam anemia, alergias, toxicidade sobre fetos, podendo nascer crianças mal formadas;
- ✓ Ácido cítrico causa cirrose hepática e descalcificação dos ossos;
- ✓ Os BHT e BHA são tóxicos aos rins e fígado e interferem na reprodução.

1.1.2. Ácido cítrico

A Figura 1 mostra a fórmula estrutural do ácido cítrico.

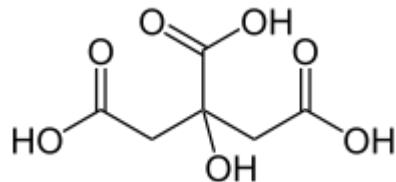
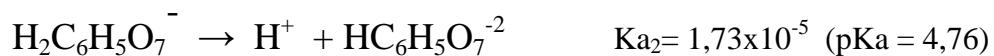
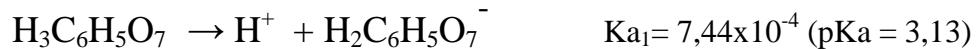


Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido cítrico (fonte: Wikipédia.org)

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, é um ácido orgânico fraco, que se pode encontrar nos citrinos. É usado como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 330, dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e de bebidas. Em bioquímica, é importante o seu papel como intermediário do ciclo do ácido cítrico, de forma que ocorre no metabolismo de quase todos os seres vivos.

O ácido cítrico é um ácido triprótico por ser um ácido que possui três constantes de equilíbrio (Ka). As equações abaixo representam estes processos de ionização do ácido cítrico:



Em determinações físico-químicas de aditivos, conservantes e acidulantes, faz-se a técnica ao qual se determina a acidez total titulável (ATT). Em bebidas, de acordo com a *ANVISA (1997) e CODEX (1996)*, é determinada geralmente a acidez em termos da concentração do ácido cítrico, por devido esta espécie a ser a espécie ácida encontrado em maior quantidade nestas soluções.

1.2. Metodologias usadas na quantificação de ácidos totais em bebidas.

A determinação da acidez nos alimentos (*COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX, 1996*) é enquadrada dentro dos respectivos métodos físico-químicos na área de análise de alimentos. Estes basicamente se dividem em dois métodos clássicos: a gravimetria e a titulometria. Mas geralmente os métodos mais utilizados, são os métodos titulométricos, na determinação da acidez total titulável em alimentos especialmente em bebidas, lembrando que em alguns alimentos são expressos em termos da concentração de ácido cítrico.

Para esta quantificação do acidulante, o ácido cítrico, usa-se comumente a titulação volumétrica com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} , solução de fenolftaleína 1% m/v. Cada mL de NaOH 1mol L^{-1} é equivalente a 64,04 mg de $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

A determinação da acidez em amostras, segundo *CHAVES et al (2004)*, foi determinada através de uma técnica simples de titulação com base padronizada, utilizando a norma do *INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008)*. O Valor médio da caracterização físico-química do suco da acerola em termos da acidez titulável foi de $74,9 \text{ mmol L}^{-1}$ (% ácido cítrico foi de $1,44 \pm 0,02$).

GODOY et al (2008), determinaram os ácidos tartárico, málico, ascórbico e cítrico por cromatografia líquida de alta performance. Neste caso um detector de arranjo de diodos (DAD), foi ajustado a 250 nm para ácido ascórbico e a 210 nm para os demais ácidos. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm ID, 3 μ m) para a separação dos diferentes compostos pela interação com a coluna. A fase móvel utilizada para separação dos ácidos foi uma solução aquosa de KH_2PO_4 0,01 mol L^{-1} , com pH ajustado para 2,6 com ácido fosfórico na vazão de 0,5 mL/min. A identificação foi feita através dos tempos de retenção, espectros de absorção e com cromatografia quando necessário. A quantificação foi realizada por curva de padronização externa com 7 pontos para cada ácido orgânico. As maiores concentrações dos padrões para elaboração das curvas foram 0,01; 0,25; 0,5 e 0,8 mg mL^{-1} para os ácidos tartárico, málico, ascórbico e cítrico, respectivamente, os outros seis pontos foram obtidos pela diluição em série com fase móvel (1/1). As curvas de calibração também foram utilizadas na avaliação da faixa de linearidade. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas em membrana 0,45 μ m que por meio de uma separação por exclusão, devido ao tamanho da partícula, excluísssem as impurezas nesta solução, procedimento de segurança para a manutenção da coluna. Portanto uma técnica que requer muito suporte técnico altamente especializado e custo alto de manutenção/operação.

1.3. Métodos eletroanalíticos aplicados a quantificação de ácidos em alimentos

Dentre as técnicas analíticas existentes, os métodos eletroanalíticos compreendem um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de soluções do analito (*SKOOG et al, 2008*). A crescente

elaboração de metodologias eletroanalíticas para o monitoramento de fármacos em fluídos biológicos (*MAZO et al, 2003; SOUZA et al, 2004*), em formulações farmacêuticas (*FATIBELLO-FILHO et al, 2003; RIZZON & SGANZERLA, 2007*) e também de pesticidas e vitaminas em alimentos e outras matrizes (*STRADIOTTO et al, 2004; SILVA et al, 2002*) estão diretamente relacionadas com a simplicidade, sensibilidade e custo das análises, quando comparada com outros métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As técnicas eletroquímicas constituem-se numa ferramenta para os químicos analíticos especialmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado e portabilidade (*BRETT & BRETT, 1998; WANG, 2000; BARD & FAULKNER, 2001*). A versatilidade das técnicas eletroquímicas também merece destaque visto que é possível controlar as reações eletródicas modificando-se a interface eletrodo-solução e selecionando-se criteriosamente o potencial aplicado à célula. A facilidade de automação em virtude da medição de sinais elétricos, a possibilidade de proceder à especiação de íons metálicos em certos casos também consistem em aspectos que conferem aos métodos eletroanalíticos uma posição de destaque no contexto da Química Analítica.

Inerentes às propriedades acima destacadas, aparecem aspectos desvantajosos das medições eletroquímicas, principalmente quando comparadas às efetuadas com técnicas espectroscópicas. Um dos problemas refere-se à interação do eletrodo com a amostra, que em muitos casos ocasiona perda ou irreprodutibilidade nas medidas, mas existem alternativas que contornam essas dificuldades.

No que tange ao uso de detectores potenciométricos em sistemas hidrodinâmicos, cumpre destacar que a possibilidade de redução da exposição do eletrodo a contaminações provenientes de amostras reais constitui-se em fator relevante e que justifica os seguidos progressos oriundos da introdução de mostras por sistemas de fluxo (RUZICKA & HANSEN, 1988; QUINTINO, 2004).

1.3.1. Detectores potenciométricos em fluxo

A necessidade de simplificar os procedimentos analíticos de preparação das amostras, miniaturização, mecanização, redução dos custos e alta freqüência analítica a efetuar, justificam um grande interesse no desenvolvimento e aplicação da análise automática nestes últimos 40 anos. Tendo em conta que a maior parte dos processos de separação se realiza em fase aquosa, SKEGGS (1957) deu o primeiro passo no desenvolvimento de uma metodologia baseada em análise em fluxo segmentado (SFA), em 1957, com monitorização contínuas dos parâmetros em fluxo. Durante cerca de duas décadas, recorreu-se ao uso da segmentação, como forma de evitar a dispersão, e consequentemente, mantendo a identidade de cada amostra para promover análises contínuas de amostras.

Foi apenas em 1975 que surgiu o conceito de análise por injeção em fluxo (FIA), no qual, pequenos volumes de amostra, rigorosamente medidos, eram introduzidos de forma intermitente discreta num fluido (líquido) transportador, que a arrastava através de um sistema de fluxo não segmentado (RUZICKA & HANSEN, 1975). No percurso desse transporte, uma série de etapas de extração sólido-líquido dos interferentes presentes na amostra que poderiam ser realizadas, em unidades modulares adequadas, intercaladas em linha assim tornando o sistema mais específico, aumentando sua especificidade.

As determinações em sistemas em fluxo, FIA, além de apresentarem a possibilidade de procedimentos analíticos com alta produtividade, empregando equipamento de baixo custo apresentavam vantagens tais como: o uso de pouca vidraria (somente no preparo das soluções), baixo consumo de reagente (pequenos volumes), o que diminui o volume de efluente a ser tratado antes do descarte; é um sistema fechado, o que minimiza os riscos de contaminação tornando-o vantajoso em comparação com os procedimentos manuais. Particularmente em relação ao fluxo segmentado, a possibilidade de efetuar as determinações em condições de não equilíbrio físico ou químico, que permitiam um processamento de dados mais versátil (facultando a análise da altura, área e largura de pico ou distância entre picos).

Embora a metodologia FIA seja uma das mais recentes técnicas em fluxo, a sua aplicação comprehende já mais de 5000 artigos publicados, abrangendo desde analitos inorgânicos a orgânicos, desde íons a macromoléculas, desde quantidades vestigiais a altas concentrações, podendo ser utilizada em meios aquosos ou não aquosos (RUZICKA, 1992; RUZICKA, 1994). O próprio conceito e definição de análise por injeção em fluxo têm evoluído, decorrendo este fator seja das potencialidades que a técnica foi oferecendo ao longo dos tempos, seja da sua grande versatilidade de aplicação. Muito embora grande parte dos trabalhos realizados nesta área contemplasse, como técnica de detecção, a espectrofotometria, Ruzicka (RUZICKA *et al*, 1977; RUZICKA & HANSEN, 1978; RUZICKA *et al*, 1977) e Pungor (PUNGOR *et al*, 1975; PUNGOR *et al*, 1976; PUNGOR *et al*, 1978) exploraram também a possibilidade de aplicar FIA conjuntamente com a detecção potenciométrica, sugerindo o desenvolvimento dos sistemas denominados potenciometria por injeção em fluxo (FIP).

De acordo com a tabela 2 existem várias aplicações de sensores potenciométricos com diferentes eletrodos de referencia para se efetuar analise de diferentes espécies analíticas.

Tabela 2: *Tipo de detectores potenciométricos utilizados em sistemas FIA*

Tipos de eletrodos	Referências
Eletrodos de membrana cristalina	Araújo et al, 1998; Couto et al, 1998
Eletrodos Redox	Ohura et al, 1996
Eletrodos de 1 ^a espécie	Chen & Alexander, 1997; Chen & Alexander, 1996.
Eletrodos de 2 ^a espécie	Altunbulduk et al, 1995; Frenzel et al, 1995

Os eletrodos seletivos de íons (ESI) são sensores eletroquímicos (*IUPAC, 1994*) que funcionam como detectores de superfície, pelo que a natureza do processo eletroquímico, que geralmente decorre à superfície do sensor, os torna especialmente atrativos para sistemas de análise em fluxo (*VALCÁRCEL & LUQUE de CASTRO, 1987*). A simplicidade da aparelhagem que lhes está associada torna-os particularmente indicados para processos de controle analítico, como alternativo às normalmente morosas e dispendiosas metodologias convencionais. Adicionalmente, são de fácil construção, as suas medições não são afetadas pela coloração ou turvação das amostras e não destrutivas para amostra, o que permite a avaliação multiparamétrica.

Por forma a que os resultados experimentais com os sistemas FIP sejam os melhores possíveis, os eletrodos deverão apresentar certos requisitos, destacando-se, uma rápida velocidade de resposta, reduzidos ruído elétricos, repetibilidade de

resposta, compatibilidade com os restantes componentes da montagem FIA e facilidade de adaptação à mesma.

A inserção deste tipo de detectores em sistemas de FIA contribui igualmente para uma melhoria das suas características operacionais (*SHPIGUN, 1994; FRENZEL, 1988*), destacando-se a reproduzibilidade do sinal analítico, a velocidade rápida de resposta e o condicionamento contínuo da membrana sensora. Contribui ainda para uma melhoria da seletividade analítica, eliminação da contaminação resultante do eletrodo de referência, pouco ou nenhum pré-tratamento da amostra, já que este pode ser feito em linha, obtenção de elevados ritmos de amostragem, facilidade de automatização dos métodos analíticos e diminuição do consumo de reagentes quando comparado com a potenciometria com eletrodos convencionais (*FRENZEL, 1988*).

Pelas vantagens enumeradas comprehende-se que a técnica da potenciometria, como de detecção, tenha sofrido um grande desenvolvimento nas últimas duas décadas, tendo-se estabelecido novos tipos de sensores potenciométricos, novos processos de construção e diferentes tipos de acoplamento aos sistemas de fluxo. Desta forma, pretendeu-se dar resposta aos problemas e limitações que foram sendo encontrados e reavivar um novo interesse pela potenciometria como metodologia analítica (*FERREIRA & LIMA, 1993*).

1.4. Sensores

O sensor é um dispositivo que transforma a informação química em sinal analiticamente útil. De modo geral um sensor possui dois elementos básicos: (i) a fase sensora ou de reconhecimento, em que ocorre a interação com o analito; (ii) o transdutor que tem a propriedade de converter a grandeza físico-química em um

sinal mensurável. Dependendo da natureza física do sinal, os sensores podem ser classificados em eletromagnético, elétrico ou térmico. No caso em que o sinal é elétrico, o sensor ora denominado de "sensor eletroquímico" pode ser amperométrico, potenciométrico ou condutimétrico (CASTILHO, 2003).

Os sensores estão nas novas tendências atuais no desenvolvimento das operações em química analítica. Desta forma, os resultados obtidos podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros no ambiente em que estão inseridos. Estes dispositivos possuem características peculiares que os distinguem de métodos instrumentais de largo porte, os quais, por sua vez, são cada vez mais precisos, sensíveis e seletivos, mas não permitem a obtenção de informações *in situ* e em tempo real. Dados nestas condições experimentais são facilmente obtidos com sensores e, mesmo que as medidas não tenham precisão e exatidão comparáveis às dos métodos instrumentais, em muitas ocasiões têm-se elementos suficientes para tomadas de decisão tais como:

- Na indústria em termos da qualidade do produto final;
- No meio ambiente em termos da emissão de gases tóxicos
- E na medicina em termos da necessidade ou não de cirurgias.

Características vantajosas também inerentes ao uso de sensores referem-se à portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização, química limpa e baixo custo operacional.

A Figura 2 apresenta um esquema geral dos principais componentes de um sensor eletroquímico. A obtenção de informação analítica depende essencialmente da capacidade da membrana, usualmente posicionada na extremidade do dispositivo, em reconhecer a espécie de interesse de maneira seletiva. Por sua vez, o sinal transmitido deve ser maximizado em relação às informações sobre o

analito, ou seja, deseja-se minimizar o efeito de contribuições estranhas como, por exemplo, interferentes, ruídos eletrônicos ou erros experimentais como por exemplo a câmara de bolhas e a câmara redutora de pulsos. Neste sentido, a efetiva capacidade do dispositivo em discriminar o analito constitui-se em aspecto de grande importância na fabricação de sensores de uso geral e em larga escala, devendo-se ressaltar, entretanto, que aspectos referentes à sensibilidade, estabilidade e robustez também devem ser considerados.



Figura 2 - Esquema geral dos principais componentes de um sensor eletroquímico (fonte: Quim. Nova, vol. 29, nº 6, 2006)

Dentre os sensores, há várias classificações possíveis às quais podem se basear no tamanho, tipo de aplicação ou mecanismo de transdução da resposta. De acordo com o banco de dados do ISI Web of KnowledgeSM, existem aproximadamente 47 mil artigos científicos publicados contendo a palavra-chave “sensor” ou “sensors”, desde 2000.

Mesmo no que concerne às técnicas eletroquímicas, verifica-se a existência de milhares de trabalhos sobre o assunto em que são abordados tópicos sobre novos materiais, aplicações em amostras ambientais, biológicas e de interesse industrial, novos métodos de fabricação, estratégias para melhoria na seletividade e nos limites de detecção, etc. O vigor nesta área é atestado pela publicação de

aproximadamente 2,7 mil artigos em igual período de tempo, selecionados com base nas palavras-chave “electrochemical and sensor” e “electrochemical and sensors”, alguns dos quais consistindo em excelentes e abrangentes revisões relativamente recentes sobre o tema (*PEREIRA et al, 2006; SALES et al, 2008; FERREIRA & AVACA, 2008; STRADIOTTO et al, 2004; MACHADO et al, 2006; CAVALHEIRO et al, 2008; NUNES et al 2007; FATIBELLO-FILHO et al, 2008; STRADIOTTO et al, 2003; ASHLEY, 2003; STETTER et al, 2003; BAKKER, 2004; HANRAHAM et al, 2004; WRÓBLEWSKY et al, 2004*). Aplicações destes dispositivos para obtenção de informações no campo e em amostras de interesse ambiental (*LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006; ASHLEY, 2003; HANRAHAM et al, 2004*) exemplificam a importância desta área de pesquisa no contexto social, econômico e da saúde.

A fabricação de sensores descartáveis (*ANGNES et al, 2000; VALBERES & ANGNES, 1998; CHENG et al, 2003*) e o desenvolvimento de tecnologias que permitem a imobilização de enzimas em sistemas eletródicos para confecção de biossensores com elevada estabilidade também têm atraído o contínuo interesse de pesquisadores ligados à Eletroanalítica (*NUNES et al, 2007; FREIRE et al, 2003*). Sofisticados métodos para “screen-printing” surgem rotineiramente na literatura (*NASCIMENTO & ANGNES, 1998; HONEYCHURCH & HART, 2003; HART et al, 2004*) e a possibilidade de fabricação de microeletrodos viabilizam ganho de sensibilidade e abrem perspectivas para monitoramento multielementar (*HERDAN et al, 1998; WILLIANS & D’SILVA, 1994*), impulsionam pesquisas com vistas a aplicações rotineiras dos dispositivos dentro da medicina, na indústria e no meio ambiente.

Entre os sensores eletroquímicos, os amperométricos e potenciométricos tem sido os mais utilizados. (*THEVENOT et al, 2001; LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006; SCHULZE et al, 2002*).

A Figura 3 mostra o esquema de uma medida potenciométrica cujo princípio básico é o desenvolvimento de potenciais sobre um eletrodo pelo acúmulo de cargas, aumentando assim a densidade de carga na superfície de um eletrodo.

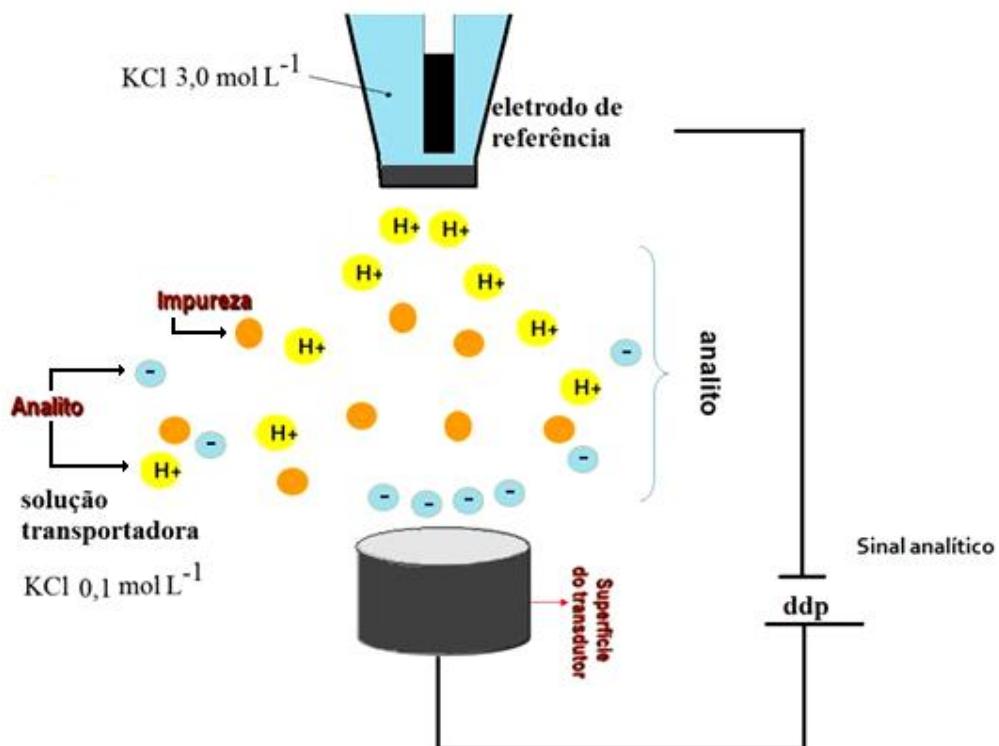


Figura 3: Sensor potenciométrico.

Este processo ocorre pela medida do potencial de célula eletroquímica na ausência de uma corrente apreciável. O potencial desenvolvido é descrito pela atividade da espécie analítica numa amostra através da equação de Nernst:

$$E = E_0 - \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln A_i$$

Onde E_0 é o potencial padrão para $a_i = x \text{ mol L}^{-1}$ (atividade iônica), R é a constante dos gases ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), T é a temperatura em K ($298,2 \text{ K}$), n é o número de elétrons envolvidos na reação. A magnitude do potencial desenvolvido é medida em decorrência da diferença de potencial entre o eletrodo indicador (sensor) e um eletrodo de referência (e.g. Ag/AgCl, Hg/Hg₂Cl₂) em solução de KCl sobre concentração definida. A diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência é proporcional ao logaritmo da atividade do íon ou da concentração da espécie analítica de interesse.

Nos sensores, o funcionamento ocorre pelo aparecimento de um potencial na interface eletrodo-solução, que é dependente de uma das espécies envolvidas.

A literatura relata sensores à base de carbono nas formas de carbono vítreo, pasta de carbono e carbono grafite química mente modificado, mas, pouco se relata do uso somente de carbono grafite sem modificação química.

SANTINI et al (2009) descreveram a modificação da superfície de carbono grafite para a determinação de ácido sórbico em alimentos onde usando a célula electroquímica do tipo Ag|AgCl | KCl ($0,010 \text{ mol L}^{-1}$) KNO₃ ($0,490 \text{ mol L}^{-1}$) | KNO₃ ($0,500 \text{ mol L}^{-1}$)| KSOB ($x \text{ mol L}^{-1}$) KNO₃ ($0,500 - x \text{ mol L}^{-1}$)| Pt | Hg | Hg₂(SOB)₂ | Grafite, determinou-se íon sorbato com uma faixa de trabalho $5,0 \times 10^{-7} - 1,05 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ com uma faixa de pH entre $6,0 - 9,0$ com rápida resposta entre 15-30 segundos (alta freqüência analítica). CHEN e YU (1999)

determinaram íon ascorbato usando um eletrodo de carbono grafite em solução de NaOH 100 mmol L⁻¹ por potenciometria. As figuras de mérito foram: faixa linear de 1,0x10⁻³ mmol L⁻¹ a 10 mmol L⁻¹, limite de detecção 5,0x10⁻³ mmol L⁻¹, pH entre 12-13 e com rápidas respostas menores que 60 s (alta freqüência analítica).

2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi propor uma metodologia de baixo custo, simples e rápida para a determinação de ácido cítrico utilizando um sensor potenciométrico, em fluxo. Desta forma, destacam-se:

- Desenvolvimento de metodologia baseada na detecção de aditivos com ênfase ao ácido cítrico aplicados em amostras de bebidas.
- Caracterizar as figuras de mérito do método proposto tais como: curvas analíticas, linearidade, detectabilidade (limite de detecção e limite de quantificação), precisão (repetividade, intervalo de confiança, desvio padrão relativo).
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de bebidas dando ênfase a algumas consumidas por esportistas (sucos de frutas e isotônicos).

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes

- Ácido Cítrico anidro PA, ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 99,5%; ISOFAR M.M. = 192,13 g mol⁻¹.
- Ácido perclórico (HClO_4), 70%, A.C.S, M.M. = 100,46 g.mol⁻¹.
- Cloreto de potássio (KCl), 99%; M.M = 74,56; NUCLEAR.
- Cloreto de sódio (NaCl), 100%, BIOTEC; M.M.= 58,44 g.mol⁻¹.
- Ferricianeto de potássio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], 100%, REAGEN M.M.= 329,25 g.mol⁻¹.
- Ferrocianeto de potássio [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$], 100%, Vetec, M.M.= 422,39 g. mol⁻¹.
- Fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), 99%; CINÉTICA; M.M.= 136,09 g.mol⁻¹.
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 99%; CINÉTICA; M.M.= 268,07 g.mol⁻¹.
- Hidróxido de sódio (NaOH), 100%, Vetec, M.M.= 40,00 g.mol⁻¹.
- Nitrato de potássio (KNO_3), 99%; M.M.= 101,10 g.mol⁻¹.

3.2. Materiais e equipamentos utilizados

Toda a vidraria utilizada foi deixada em banho de ácido nítrico (solução 10% v/v) por aproximadamente 24 horas e lavada com água deionizada.

Água deionizada foi obtida de sistema de purificação de água por osmose reversa - Master System Gehaka (figura 4 A). Medidas de pH foram realizadas utilizando pHmetro Digital PG1800 (figura 4 B). Foi utilizado ainda um ultra-som Ultrasonic Cleaner 1450 USC (figura 4 C) para a limpeza dos eletrodos.

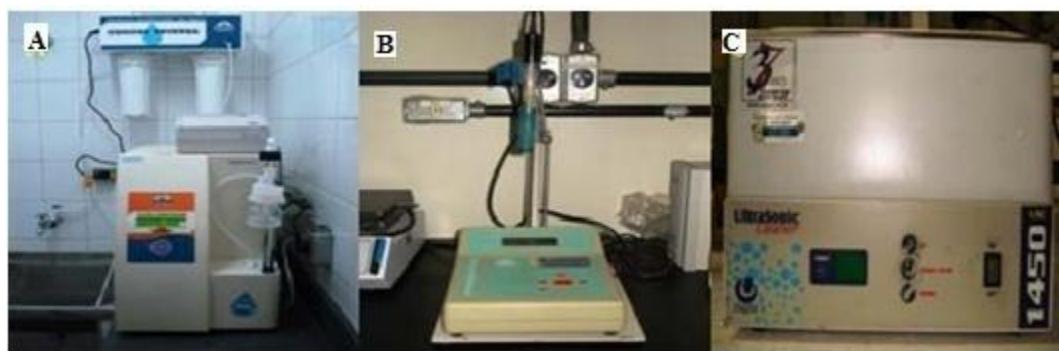


Figura 4 - Equipamentos utilizados para o fornecimento de água (A), medidas de pH (B) e limpeza dos eletrodos por ultra-som(C).

Para os estudos eletroquímicos foi utilizada uma célula eletroquímica de três compartimentos (figura 5A). Como eletrodo auxiliar foi utilizado uma placa de platina de 2cm^2 de área aparente (figura 5 B). Todos os potenciais são referidos a um eletrodo de referência de prata cloreto de prata (Ag/AgCl) saturado (figura 5 C). O eletrodo de trabalho utilizado foi um disco de carbono grafite, com 6mm de diâmetro, (figura 5 D). Um sistema eletroquímico para a voltametria cíclica (VC) montado pode ser visto na figura 5 E.

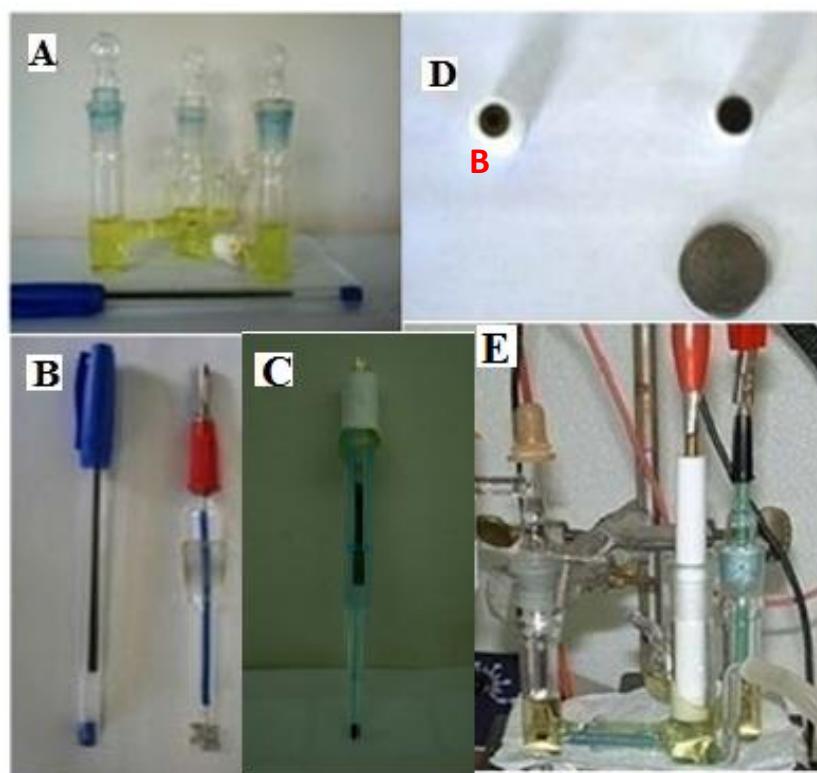


Figura 5 - Materiais utilizados nos estudos eletroquímicos: cela eletroquímica de três compartimentos (A), placa de platina (B), eletrodo de referência (C), eletrodo de trabalho (D) e sistema VC (E).

Para as medidas eletroquímicas foi utilizado um potenciostato CH Instruments modelo 1120 A (figura 6 A). Medidas potenciométricas foram realizadas utilizando um potenciostato da CH Instruments Modelo 760C (figura 6 B). Uma politriz Aropol 2V da Arotec (figura 6 C) foi utilizada para polimento mecânico dos eletrodos de trabalho.



Figura 6 – Equipamentos utilizados nos experimentos eletroquímicos e limpeza dos eletrodos: (A) potenciostato CH instruments modelo 1120 A, (B) potenciostato/galvanostato AutoLab e (C) politriz Aropol 2V da Arotec.

A figura 7 ilustra o diagrama do sistema em fluxo utilizado neste trabalho.

Tubos de polietileno (0,5 mm de diâmetro interno) foram usados para alças de injeção, linhas de transmissão, bobina de reação e injetor. As soluções foram bombeadas usando uma Bomba peristáltica Minipuls 3 da Gilson e tubos de Tygon® para bombeamento.

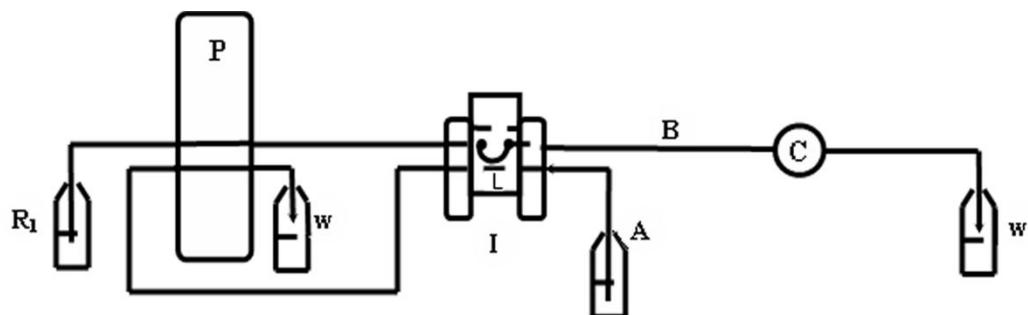


Figura 7 - Diagrama esquemático do sistema em fluxo utilizado neste trabalho. R_1 , solução transportadora; P, bomba peristáltica ; W, resíduo; L alça injetora; I, válvula injetora; A, soluções padrões de ácido cítrico preparadas em solução transportadora; B, bobina de reação; C, detector potenciométrico.

A figura 8 ilustra o tipo de injetor utilizado nas injeções de amostras (Figura 8 B e C), bomba peristáltica (figura 8 D) e o sistema FPI (figura 8 A).

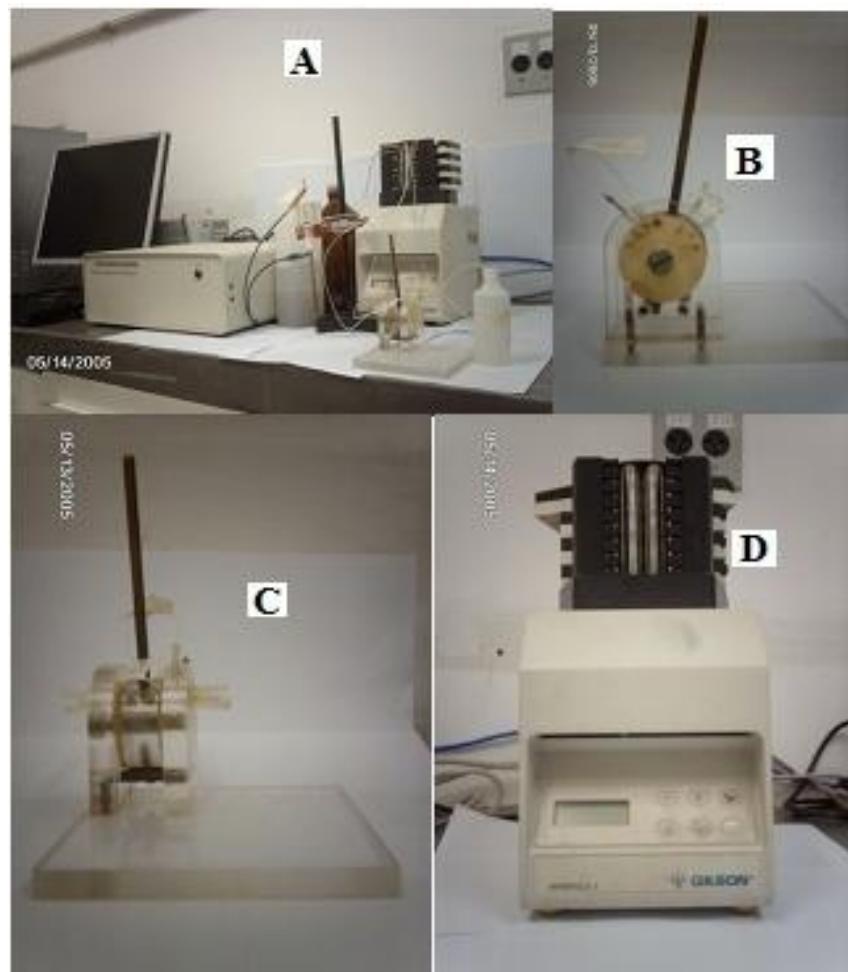


Figura 8 – Imagens do sistema FIP (A), Injetor vista lateral (B), Injetor vista frontal(C) e Bomba peristáltica Gilson ® (D).

O sistema de detecção proposto é uma célula eletroquímica (figura 9), onde o eletrodo de referência é um fio de prata com cloreto de prata eletrodepositado ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{Sat.})}$), e o eletrodo indicador é um disco de carbono grafite de 6 mm de diâmetro. O compartimento interno da célula possui capacidade para $460\mu\text{L}$ de solução sendo que suas peças foram construídas em materiais em base de teflon e acrílico.

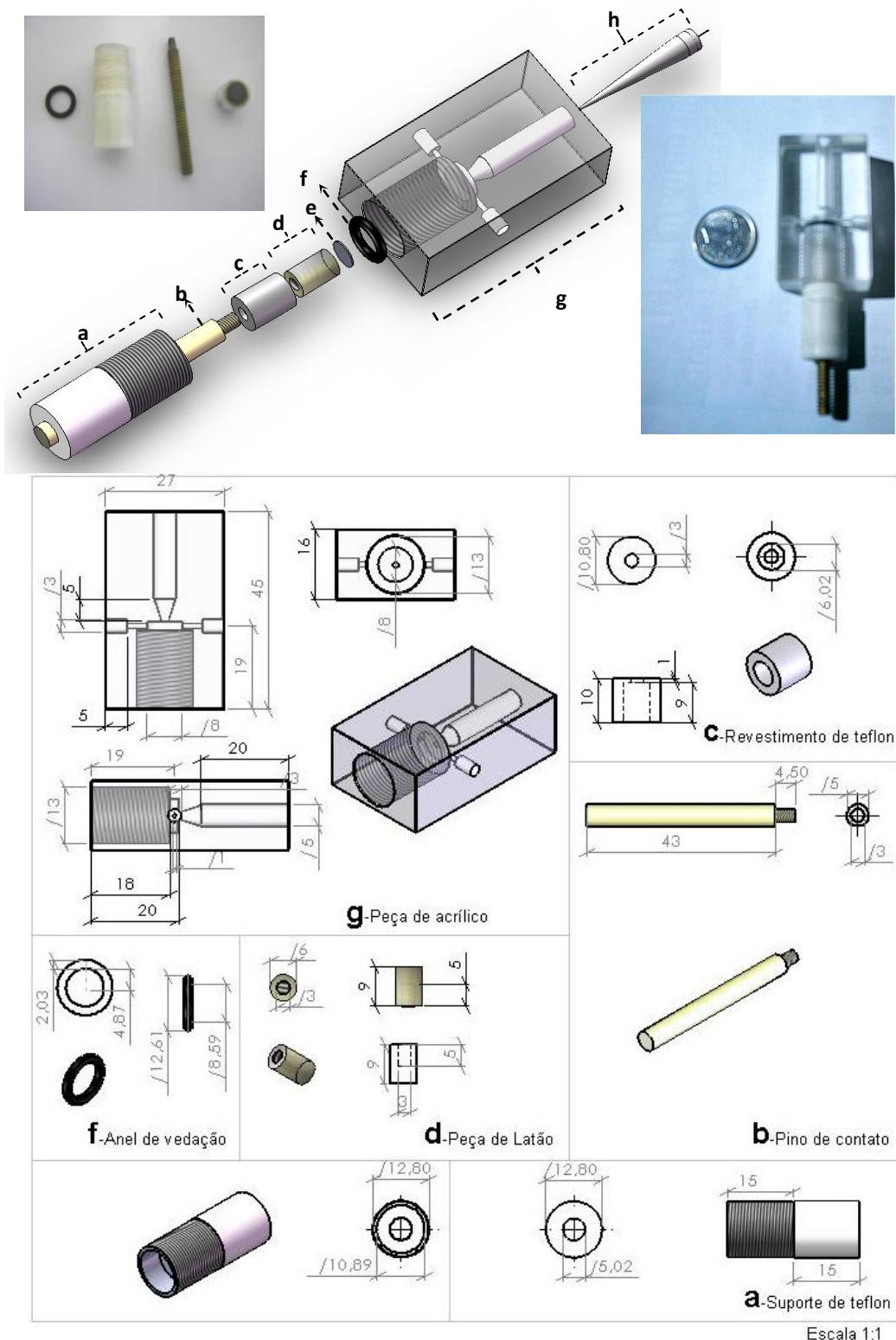


Figura 9 – Célula eletroquímica usada como sistema de detecção potenciométrico: (a) suporte de teflon; (b) pino de contato; (c) revestimento de teflon; (d) peça de latão; (e) carbono grafite; (f) anel de vedação; (g) peça de acrílico; (h) ponteira com eletrodo de referência.

3.3. Soluções

Foram preparadas soluções estoque a partir de quantidades adequadas de reagentes com grau analítico e água deionizada. A água ainda foi deaerada por 45 minutos com nitrogênio ultra-puro. A partir de soluções estoque, foram preparadas as soluções de trabalho e, em seguida, foram testadas.

3.3.1. Solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

Soluções padrão contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ foram preparadas utilizando-se $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L⁻¹) / $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L⁻¹) em 0,1 mol L⁻¹ de KNO_3 . As soluções foram deaeradas por 45 minutos com nitrogênio ultra-puro.

3.3.2. Solução Tampão Fosfato

Uma solução estoque de tampão fosfato (0,4 mol L⁻¹) foi preparada pesando-se 2,7218 g de KH_2PO_4 e 2,8414 g de Na_2HPO_4 e transferidos para um balão de 100 mL que foi completado com água deionizada. A partir desta solução padrão foram feitas as diluições necessárias para as soluções de trabalho.

3.3.3. Solução Transportadora

A solução transportadora (KCl 0,1 mol L⁻¹) utilizada no sistema em fluxo, foi preparada pesando-se 14,9100 g de KCl e, em seguida, transferido para um balão volumétrico de 2 litros e o volume foi completado com água deionizada. Se necessário, o pH da solução era corrigido para 7,00 com solução de NaOH ou HCl. Esta solução foi usada no preparo das soluções de trabalho de ácido cítrico.

3.3.4. Solução de ácido cítrico

Esta solução foi preparada em KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH de 7,0) pesando-se 0,01931g de ácido cítrico que foi transferida para um balão de 100 mL. Esta era a solução padrão de concentração de 100 mmol L⁻¹, ao qual foi usada para a reparaçāo das soluções de trabalho do ácido cítrico.

3.4. Preparação de eletrodos

3.4.1. Eletrodo de referência

O eletrodo de Ag/AgCl_(Sat.) foi obtido por eletrodeposição de AgCl na superfície de um fio de Ag como anodo, e como catodo foi utilizado uma placa de platina de 2cm² de área aparente, na presença de solução de ácido clorídrico 0,10 mol.L⁻¹. A eletrodeposição de AgCl no anodo foi realizada sob corrente constante de 1 mA, durante duas horas, utilizando um Potenciómetro/Galvanostato PAR-M-270. Terminada a eletrodeposição, o fio de prata foi colocado no interior de uma ponteira com extremidade inferior devidamente vedada, e preenchida com uma solução de cloreto de potássio 3,00 mol L⁻¹, saturada de AgCl (*PEDROTTI et. al, 2005*).

3.4.2. Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho (carbono grafite) foi polido mecanicamente em politriz e, em seguida, polido manualmente em feltro umedecido com uma suspensão de alumina 0,3 µm e água deionizada. Após esse tratamento, os eletrodos foram levados a um banho ultra-som para remoção de partículas residuais de alumina.

Os eletrodos polidos foram transferidos para a célula eletroquímica (figura 6 E), contendo a solução com o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ previamente desoxigenadas. Com objetivo de manter sempre o mesmo “padrão de superfície” para os eletrodos utilizados, foram obtidos voltamogramas cíclicos variando-se o potencial entre -0,10V a +0,50 V a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

3.5. Preparação do sistema de detecção

A construção do sensor potenciométrico foi realizada utilizando um eletrodo de trabalho contendo carbono grafite e um eletrodo de referência Ag/AgCl saturado. A superfície do eletrodo de carbono foi preparada conforme procedimento descrito no item 3.4.2 deste trabalho. O eletrodo de carbono foi seco em nitrogênio e guardado, em frasco hermeticamente vedado, até o uso. A célula eletroquímica usada para as medidas de potencial foi:

Eletrodo de grafite | ácido cítrico, solução KCl 0,1M| | 3,0 M KCl, AgCl(s) | Ag(s)

3.6. Medidas de voltamogramas dos eletrodos

As medidas de voltametria cíclica, dos eletrodos de grafite, foram realizadas com objetivo de verificar as diferenças eletroquímicas provocadas pelos processos de polimento mecânico da superfície.

Voltamogramas cíclicos dos eletrodos foram obtidos em cela de três compartimentos (figura 5 E) contendo 5 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆, 5 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆ e 0,05 mol L⁻¹ KNO₃, variando-se o potencial entre -0,10V a +0,50 V a uma velocidade de varredura de 100mV. s⁻¹.

3.7.Resposta do sensor de grafite

3.7.1. Em função do volume e da vazão de fluxo

A vazão de fluxo e volume da alça de amostragem foram otimizados. O comprimento da bobina não foi avaliado, pois não há reação entre a solução transportadora e a amostra injetada. Os valores de vazão da solução transportadora (KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,00) foram de 1,0; 2,0 e 3,0 mL min⁻¹, utilizando 33, 65 e 130 μ L de uma solução padrão de ácido cítrico 0,1 mmol L⁻¹.

3.7.2. Em função da concentração de ácido cítrico

A resposta do sensor de grafite, na presença de ácido cítrico, foi monitorada em potencial de circuito aberto vs. Ag/AgCl (3 mol L⁻¹) em função do tempo, utilizando um potenciómetro da CH Instruments modelo 760 C. Foram injetados 65 μ L de solução padrão de ácido cítrico nas concentrações de 0,03 a 10 mmol L⁻¹ preparadas em solução transportadora (KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,00). Todas as medidas foram realizadas em fluxo no sistema proposto (figura 9), utilizando vazão de 1,0 mL min⁻¹ e bobina de 25 cm.

3.7.3. Em função do pH

Para avaliar a resposta do sensor de grafite, em função do pH do meio reacional, foram preparadas soluções de ácido cítrico (0,1mmol L⁻¹) em solução transportadora de pH 7,00. O pH foi variado na solução transportadora (KCl 0,1 mol L⁻¹) entre 3,00 a 8,40 usando soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de potássio (KOH) para as correções do pH. Para cada avaliação de pH, o volume de padrão com ácido cítrico era o mesmo (65 μ L). A vazão e a bobina utilizadas foram de 1,0 mL min⁻¹ e 25 cm, respectivamente.

3.7.4. Em função da concentração de tampão fosfato

Neste estudo foram utilizadas soluções tampão fosfato nas concentrações de 0,001 a 0,10 mol L⁻¹, preparadas em KCl 0,1 mol L⁻¹ e pH corrigido para 7,00. A variação do potencial da célula foi monitorada em fluxo, após adição de 65 µL de solução de ácido cítrico (10 - 0,03 mmol L⁻¹), vazão da solução transportadora, 1,0 mL min⁻¹ e bobina de 25 cm.

3.8. Estudo de interferentes

Por Lei federal todo alimento tem que constar suas informações técnicas em seus rótulos. E de acordo com as tabela 3 e 4 têm-se então as especificações destes alimentos, os rótulos que respectivamente são: os sais de acetato, benzoato, citrato e ácidos como o benzóico e ascórbico.

Tabela 3: Informação das substâncias presentes em isotônico (gatorede®).

Compostos	Quantidade por porção
Fosfato de potássio	24 mg/200mL
Citrato de sódio	90mg/200mL
Cloreto de sódio	84mg/200mL
Ácido cítrico	NI

NI – não informado pelo fabricante.

Tabela 4: substâncias presentes em sucos.

Compostos	Quantidade por porção
Ácido ascórbico	25mg/250 mL
Benzoato de sódio	NI
Ácido cítrico	NI

NI – não informado pelo fabricante.

E então foram feitos estudos preparando soluções de acetato de potássio, benzoato de potássio, citrato de potássio, ácido benzóico e ácido ascórbico, nas respectivas concentrações 1,0 mmol L⁻¹ e 5,0 mmol L⁻¹ a fim de aferir a interferência destes na resposta analítica do ácido cítrico. Os sais e ácidos foram escolhidos de acordo com os respectivos rótulos destes alimentos. Os efeitos de interferência dos sais e ácidos foram avaliados em proporções de concentrações de 1:1 e 1:5 para a espécie analítica estudada.

3.9. Comparação de métodos

Estudos comparativos de métodos foram efetuados determinando o teor de ácido cítrico em amostras de bebidas pelo método proposto e pelo método titulométrico com NaOH/fenolftaleína. Para isto, 100 mL da amostra foram transferidos para um balão de 500mL e, em seguida, completou-se o volume com água deionizada. Retirou-se uma alíquota de 25 mL desta solução e transferiu-a para um erlenmeyer para titular com solução padrão de NaOH 0,1 mol L⁻¹ usando fenolftaleína 0,1% (m/v) como indicador.

3.10. Aplicação do método

O método proposto foi aplicado para detecção do ácido cítrico em amostras de bebidas, obtidas no comércio da cidade de Uberlândia-MG. As amostras foram diluídas com solução transportadora (KCl 0,1 mol L⁻¹; pH 7,00) a uma concentração de 5% v/v e, em seguida, injetada no sistema de fluxo.

4. Resultados e Discussões

4.1. Medidas eletroquímicas dos eletrodos de carbono grafite

Os eletrodos de grafite polidos foram avaliados frente ao par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ utilizando-se voltametria cíclica. Os eletrodos adequados para uso seguiram o perfil observado na figura 10. A carga elétrica (Coulomb) foi calculada integrando-se o voltamograma [corrente (A) vs. potencial (V) /velocidade de varredura ($V\ s^{-1}$)]. O valor de carga obtido para este voltamograma foi $1,885 \times 10^{-3} \text{ C}$ (da zona de oxidação ou redução) e todos os eletrodos de grafite utilizados foram selecionados seguindo este valor, como critério de seleção, considerando um coeficiente da variação de 5%.

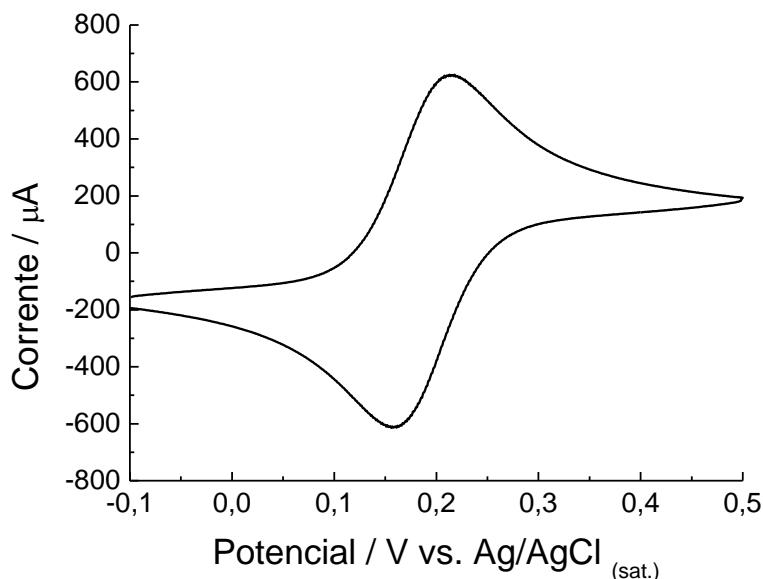


Figura 10 – Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite em solução contendo 5 mmol L^{-1} de $K_3Fe(CN)_6$, 5 mmol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6$ e 0,1 mol L^{-1} KNO_3 , $100mV\ s^{-1}$.

4.2. Resposta do sensor de grafite

Com a finalidade de verificar se os eletrodos de grafite podem ser utilizados como sensores potenciométricos, investigaram-se o comportamento dos respectivos eletrodos, em fluxo, quando em contato com soluções aquosas de ácido cítrico em triplicatas. Para tanto foram injetados 65 μL de solução padrão de ácido cítrico a uma concentração de 0,1 mmol L^{-1} . Os parâmetros de fluxo foram: solução transportadora de KCl 0,1 mol. L^{-1} em pH neutro (7,00), bobina de 25 cm para vazões de 1,0; 2,0 e 3,0 mL min^{-1} .

O aparecimento de um potencial desenvolvido na célula eletroquímica na ausência de corrente apreciável, devido à diferença de potencial estabelecida entre o eletrodo indicador (sensor) e o eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat.})}$, é o sinal elétrico ou a resposta analítica traduzida pelo eletrodo indicador provocada pela presença do ácido cítrico na interface da superfície do eletrodo. Esta resposta analítica foi observada em todos os sensores estudados para uma concentração de ácido cítrico de 0,1 mmol L^{-1} (figura 11). Nesta concentração de ácido cítrico, os eletrodos de grafite apresentaram resposta analítica de 10,52 mV. O eletrodo de grafite apresentou para vazões 1,0; 2,0 e 3,0 mL min^{-1} , os desvios padrões relativos de 1,14; 0,77 e 0,52%, respectivamente. Observa-se que os desvios para uma vazão maior são relativamente menores, porém o volume de efluente químico produzido é muitas vezes maior que em baixa vazão, então a produção de pouco efluente químico é o que justifica o uso da menor vazão.

Os tempos de restabelecimento da linha base foram relativamente próximos. E também se observa um aumento do sinal analítico com o aumento da vazão, isto se deve a limpeza eficiente na superfície do eletrodo e observa-se também o

menor desvio padrão relativo do sinal analítico. Isto significa que quanto maior o fluxo maior é a resposta analítica em relação ao ácido cítrico presente.

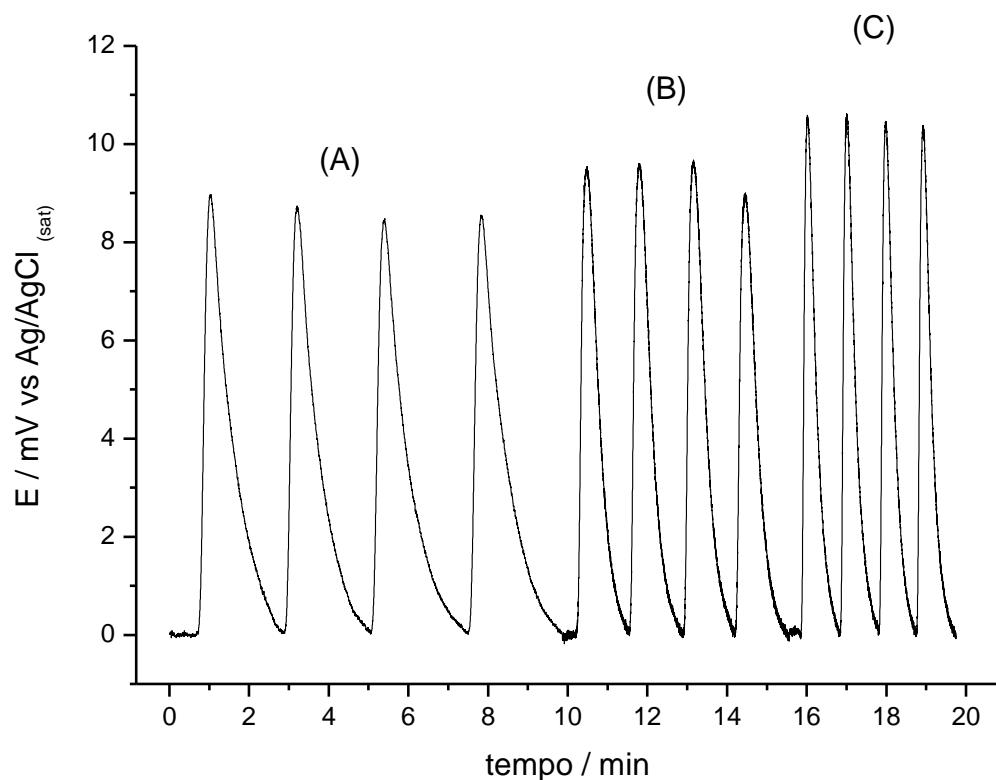


Figura 11 – Resposta potenciométrica do eletrodo de grafite em relação à solução de ácido cítrico $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ nas vazões (A) $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; (B) $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; (C) $3,0 \text{ mL min}^{-1}$.

O comportamento da resposta analítica em função da concentração de ácido cítrico (figura 11) foi avaliado injetando-se $65\mu\text{L}$ de soluções padrões de ácido cítrico, em triplicata, nas concentrações de $0,03$ a 10 mmol L^{-1} nas condições experimentais: solução transportadora de $\text{KCl} 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} 7,00$ em uma vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e bobina de 25 cm .

De acordo com a figura 12, temos que o eletrodo de grafite apresentou uma faixa linear de resposta entre $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$ a 7 mmol L^{-1} . A resposta potenciométrica em função da concentração para os eletrodos mostra uma sensibilidade à variação da concentração do ácido cítrico na forma de seus íons.

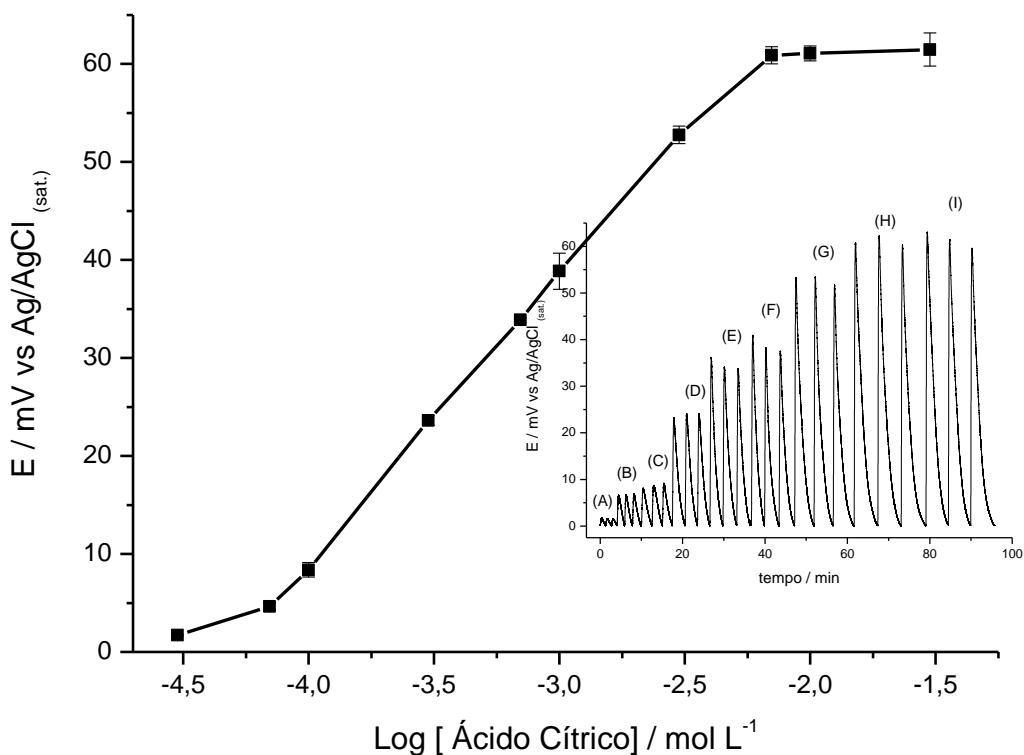


Figura 12 – Resposta potenciométrica do eletrodo de grafite foi avaliada injetando $65\mu\text{L}$ de soluções padrões de ácido cítrico, em triplicata em relação à concentração da solução de ácido cítrico: (A) $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$; (B) $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$; (C) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; (D) $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; (E) $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$; (F) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (G) $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (H) $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$; (I) 10 mmol L^{-1} . Sob condições experimentais: solução transportadora ($\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH } 7,00$), vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e bobina de 25 cm .

4.3. Sensor potenciométrico

A resposta do sensor é definida como a variação de potencial causada pelo ácido cítrico injetado na solução transportadora. O sensor foi acoplado na célula eletroquímica (figura 9) e esta foi usada como detector no sistema em fluxo descrito na figura 9 A. As condições experimentais foram: vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, bobina de 25 cm, solução transportadora de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ em pH 7,00. Foram injetados $65 \mu\text{L}$ de solução padrão de ácido cítrico nas concentrações de 0,03 a 10 mmol L^{-1} preparadas em solução transportadora de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ em pH 7,00.

O sensor apresentou um comportamento de resposta em relação à concentração de ácido cítrico, mostrado na figura 14. A resposta do sensor é proporcional à concentração da espécie analítica, para um valor de concentração até $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e após esta concentração o potencial manteve-se constante devido à saturação da superfície.

Para avaliar o tempo de restabelecimento da linha base e a resposta do sensor foi utilizada uma concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ do ácido cítrico. A variação de potencial observada para o sensor de grafite foi de 10,52mV. O tempo de restabelecimento da linha base para o sensor de grafite não foi significativamente menor para vazões maiores ($2,0$ e $3,0 \text{ ml min}^{-1}$) do que a vazão de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, o que é interessante, pois a freqüência analítica do método e a repetibilidade da resposta dependem deste restabelecimento da linha base.

4.4. Otimização da resposta do sensor

Como definido no item 4.3 a resposta do sensor de grafite é devido variação de potencial causada pela passagem no carregador de ácido cítrico na superfície do sensor.

Considerando tal fato foi avaliada a resposta do sensor potenciométrico, em relação a diferentes condições experimentais, buscando aperfeiçoar sua resposta frente à concentração de ácido cítrico. As seguintes condições experimentais foram investigadas: pH, concentração de tampão fosfato na solução transportadora, além dos parâmetros de fluxo, vazão e volume da alça de injeção.

Para avaliar a resposta do sensor de grafite, em função do pH do meio reacional, foram preparadas soluções de ácido cítrico ($0,1\text{mmol L}^{-1}$) em solução transportadora de pH 7,00. O pH foi variado na solução transportadora (KCl 0,1 mol L^{-1}) entre 3,00 a 8,40. Para cada avaliação de pH, o volume de padrão com ácido cítrico era o mesmo ($65\text{ }\mu\text{L}$). A vazão e a bobina utilizadas foram de $1,0\text{ mL min}^{-1}$ e 25 cm, respectivamente. Os resultados estão mostrados na figura 12.

A influencia do pH sobre a resposta do sinal analítico nos demonstrou na figura 13, claramente que o sensor teria maior sensibilidade na presença de uma solução em que seu pH, seria igual a 7,0. Isto confere uma maior sensibilidade do sensor nestas condições experimentais.

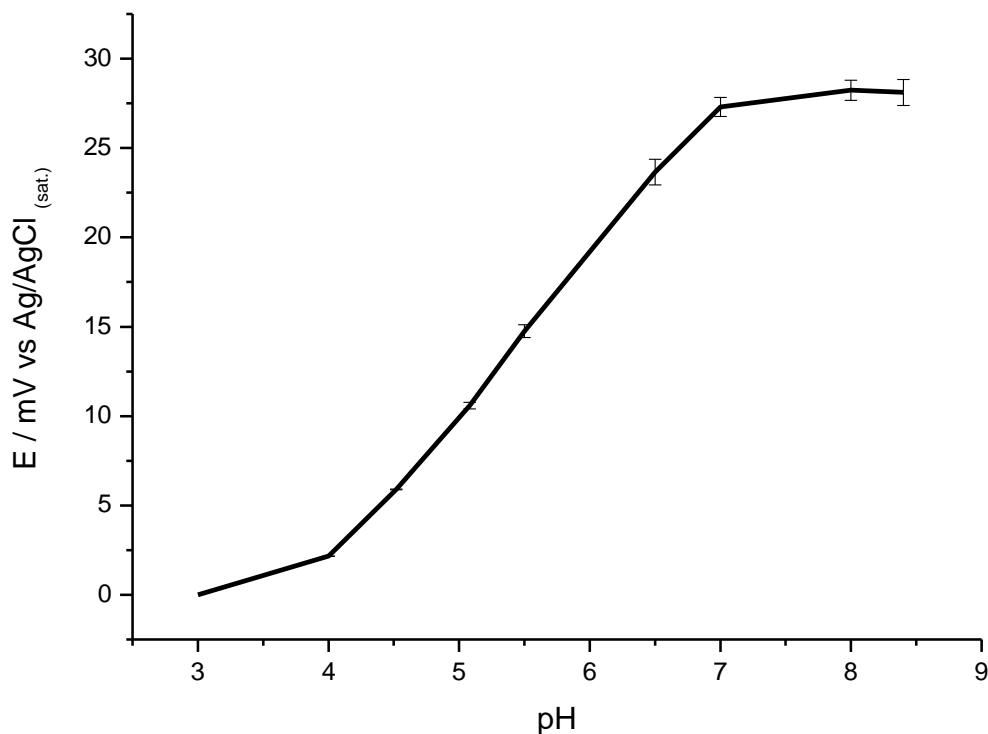


Figura 13 – Resposta do sensor potenciométrico (carbono grafite) em função do pH do meio reacional. Condições experimentais: $65\mu\text{L}$ de ácido cítrico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em solução transportadora contendo $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$; vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Para valores de pH menores que 7,00 observa-se uma queda acentuada da resposta potenciométrica, isto se deve a uma protonação do meio. No entanto, para valores de pH maiores que 7,0 observa-se que a resposta analítica manteve-se praticamente constante o que nos leva a crer pelo consumo de H^+ pelos íons OH^- do meio (solução transportadora) já que a solução encontrava-se em pH alcalino.

A resposta do sensor potenciométrico à variação do pH provavelmente se deve à protonação ou desprotonação das diferentes espécies químicas do ácido cítrico na superfície do eletrodo de grafite.

Outro parâmetro investigado foi o efeito da concentração do tampão fosfato na solução transportadora em virtude da resposta do sensor potenciométrico. Neste caso, soluções de ácido cítrico, em pH 7,00, foram injetadas em meio a solução transportadora ao qual seu pH era mantido constante a custa de um agente tamponante.

A resposta analítica ($\Delta E / \text{mV vs Ag/AgCl}_{(\text{Sat.})}$) para a concentração de fosfato variando entre 1,0 a 100,0 mmol L^{-1} , mostra que este tampão inibe a resposta analítica. Isto é, para concentrações entre 1,0 a 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato, os valores de potenciais com relação a injeção do analito se mantiveram praticamente constantes e próximos a linha base, isto é, mantivera-se próximos a linha base da leitura potenciométrica (0,0 mV). Este comportamento pode ser explicado pelo consumo de todo H^+ do ácido cítrico pelo tampão de fosfato, isto é, ocorreu o efeito tamponante do fosfato no meio. Mesmo que se variasse a concentração do ácido cítrico entre 1,0 a 100 mmol L^{-1} . Assim ocorrendo a passivação da superfície do eletrodo de grafite que inibiu a resposta analítica do sensor potenciométrico.

A resposta potenciométrica do sensor foi medida em fluxo, haja visto que o mesmo foi acoplado à célula eletroquímica (figura 10) e usada como detector no sistema em fluxo descrito na figura 8. Parâmetros de fluxo como vazão e volume da alça de injeção foram avaliados com parada de fluxo e os resultados obtidos desta avaliação são mostrados na figura 14.

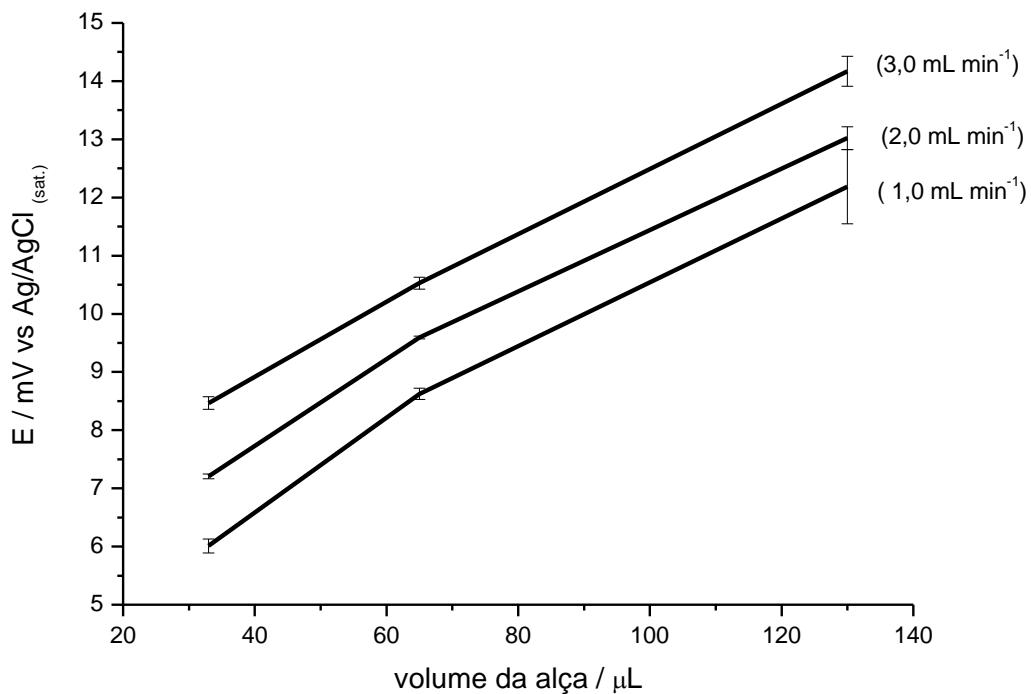


Figura 14 – Resposta do sensor potenciométrico (carbono grafite) em função da vazão para diferentes volumes de injeção; condições experimentais: $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido cítrico preparado em solução transportadora contendo $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl , $\text{pH} 7,00$.

Para maiores volumes observa-se um aumento na resposta do sensor potenciométrico. Este comportamento pode ser explicado pela maior quantidade de íons do ácido cítrico na superfície do eletrodo de grafite. Porém maiores desvios foram observados para os volumes de 33 e $130 \mu\text{L}$ em relação ao volume de $65 \mu\text{L}$.

Além disso, os volumes de 33 e $130 \mu\text{L}$ apresentaram um tempo de restabelecimento da linha base maiores (figura 15), o que diminui consideravelmente a freqüência de análise. Vazões maiores que $3,0 \text{ mL min}^{-1}$

não são aplicáveis, pois, se deve levar em conta o volume de rejeito químico produzido e o consumo de reagentes. Sendo assim a vazão de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção de $65\mu\text{L}$ foram utilizados como parâmetros da otimização do ácido cítrico.

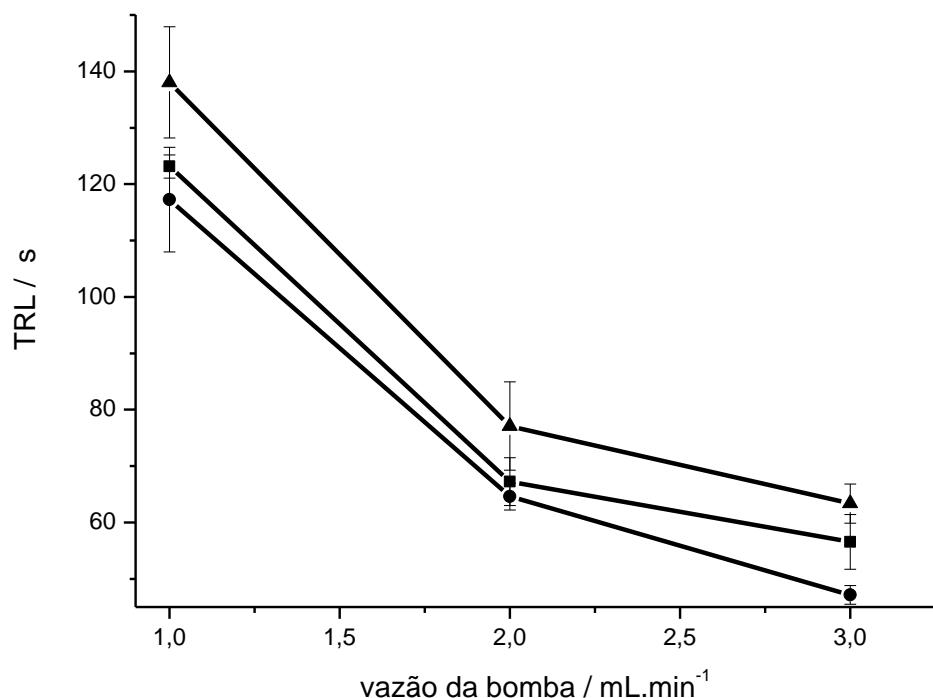


Figura 15 – Tempo de restabelecimento da linha base-TRL em função da vazão para diferentes volumes de injeção: (■)33; (●)65 e (▲) 130 μL . condições experimentais: $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido cítrico preparado em solução transportadora contendo $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, pH 7,00.

Com objetivo de melhorar o limite de quantificação e freqüência analítica para o método proposto foram realizados ensaios usando o sensor acoplado no sistema de fluxo contínuo. A resposta potenciométrica foi obtida utilizando solução de ácido cítrico de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH igual a 7,00. A solução padrão de ácido cítrico ($65\mu\text{L}$) foi injetada sem parada de fluxo.

Os resultados da resposta potenciométrica em função da concentração do ácido cítrico estão apresentados na figura 16. A curva analítica obtida apresenta faixa linear de 0,07 a 7,00 mmol L⁻¹ para a concentração de ácido cítrico e segue a equação $E = 28,97 \log[\text{ácido cítrico}] + 125,16$ com coeficiente de correlação de 0,99949 (em concordância com a figura 16).

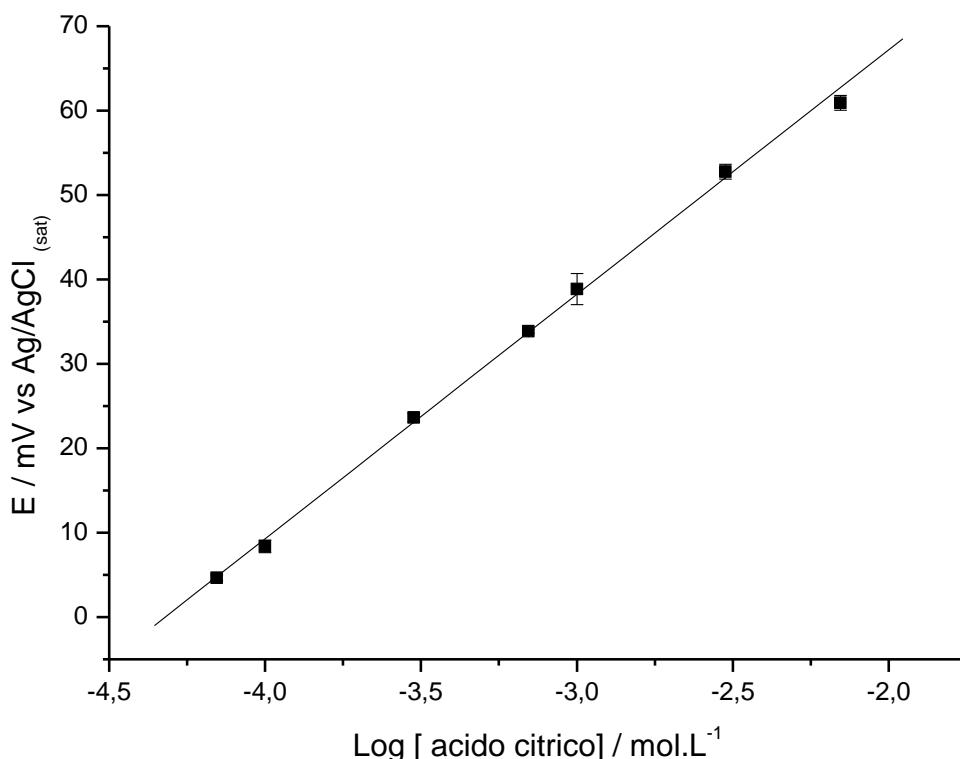


Figura 16 – Curva de calibração para o ácido cítrico sob solução transportadora contendo 0,10 mol L⁻¹ KCl, pH 7,00.

Como a resposta analítica é dada pelo aumento na variação de potencial causada pelo ácido cítrico injetado no fluxo de KCl 0,1 mol L⁻¹, então a resposta do branco pode ser o desvio padrão da resposta potenciométrica da solução de KCl 0,1 mol. L⁻¹. O valor do desvio padrão da resposta correspondente de 18

injeções de KCl 0,1 mol. L⁻¹ foi usado para calcular os limites de detecção e quantificação do método proposto, conforme equações a seguir:

$$LD = 3 \frac{s_b}{S} \quad LQ = 10 \frac{s_b}{S}$$

Onde s_b é o desvio padrão obtido a partir da resposta potenciométrica (n=18 dada pela presença de KCl 0,1 mol L⁻¹; S é sensibilidade do método proposto, obtida com o coeficiente angular da curva analítica padrão (figura 16).

O limite de detecção e o limite de quantificação foram de 5,15 nmol L⁻¹ e 15,60 nmol L⁻¹, respectivamente. Este valor foi bastante satisfatório para atender o objetivo do método proposto. Os dados da tabela 5 mostram as figuras de mérito para o sensor potenciométrico proposto.

Tabela 5 – Figuras de mérito para o sensor de grafite em função da concentração de ácido cítrico.

Figuras de Mérito	Grafite
LR/ mmol L ⁻¹	0,07 -7,00
LD/ nmol L ⁻¹	5,15
LQ/ nmol L ⁻¹	15,60
*ΔE /mV	10,52
*RSD/ %	0,52
*TRL / s	$117,56 \pm 9,3$
Linearidade	$E = 125,16 + 28,97t$
Sensibilidade	28,97

4.5. Estudo de Interferentes

Foram feitos testes de interferência com sais de ácidos orgânicos (acetato, citrato e benzoato) e ácidos (benzóico e ascórbico) para se ver o comportamento destas espécies químicas associadas na resposta do sinal analítico para o sensor proposto. Os resultados deste estudo encontram-se na tabela 6 ao qual observou que o ácido cítrico sofreu interferência mais acentuada quando a concentração destas espécies interferentes é 5 vezes maior que a concentração de ácido cítrico. O ácido benzóico interfere muito se a concentração for 5 vezes maior, mas quando ele possui a mesma concentração do ácido cítrico praticamente não há interferência.

Tabela 6: Efeito de interferência (%) das espécies estudadas no sinal analítico.

Relação			Acido	Acido
Sinal analítico:	Benzoato	Citrato	Acetato	Ascórbico
Interferente	$(C_6H_5COO^-)$	$(C_6H_5O_7^{3-})$	(CH_3COO^-)	$(C_6H_8O_6)$
				(C_6H_5COOH)
1:1	87,9	48,7	84,6	101,2
1:5	60,5	13,3	51,9	89,6
				110,1
				133,3

Concentração de ácido cítrico = 1 mmol L⁻¹

4.5. Aplicação do método.

O método proposto foi aplicado para detecção de ácido cítrico em amostras de bebidas isotônicas (*gatorede®*) e sucos de fruta (maracujá, abacaxi, laranja e frutas verdes) obtidos no comércio da cidade de Uberlândia-MG. As amostras

foram analisadas diretamente, isto é, foram feitas as leituras das soluções padrão e, em seguida, das amostras diluídas (5% v/v) em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹.

A Tabela 7 mostra os valores da concentração de ácido cítrico obtidos pelo método proposto e pelo método convencional. Os valores obtidos para amostras de Gatorade ® (morango, cool blue framboesa) e sucos (maracujá, abacaxi, laranja e frutas verdes) utilizando o método proposto. Os resultados compararam favoravelmente com o método convencional para o nível de confiança de 99%.

Tabela 7. Comparação de métodos para determinação de ácido cítrico em amostras de suco e isotônico.

Amostras ^(a)	Ácido cítrico (g/100mL)	
	Método proposto	Método convencional
Gatoredede morango	0,27±0,03	0,31±0,03
Gatoredede cool blue	0,41±0,04	0,45±0,03
Suco de maracujá	0,44±0,03	0,49±0,01
Suco de abacaxi	0,18±0,04	0,20±0,02
Suco de laranja	0,40±0,09	0,57±0,05
Suco de frutas verdes	0,17±0,04	0,27±0,05

(a) N=3, nível de confiança 99%

De acordo com a tabela 76, temos que o método proposto se aproximou dos resultados do método convencional apesar do universo de amostras terem sido muito pequeno e o número de injeções também ($N=3$). O proposto trabalho tem certa vantagem em relação aos métodos convencionais (titulometria) por ser mais econômico em termos da quantidade de reagente, menos rejeitos tóxicos são gerados, há uma maior freqüência analítica e é um método não destrutivo da amostra.

5. Conclusões

Estudos realizados com eletrodo de grafite mostram que estes eletrodos podem ser usados como suporte e, consequentemente, na construção de sensores. O eletrodo de grafite apresentou características analíticas promissoras em relação à concentração de ácido cítrico, avaliada em fluxo, tais como, sensibilidade, coeficiente de variância e limite de quantificação. Esta capacidade de resposta analítica possibilitou a utilização do carbono grafite na construção do sensor potenciométrico, usado como proposta de detecção de ácido cítrico em bebidas, em fluxo.

As medidas de voltametria cíclica confirmam um padrão do sensor de carbono grafite a ser utilizado.

O máximo de resposta para o sensor (grafite), em relação à concentração de ácido cítrico, foi obtida usando uma solução transportadora contendo $KCl 0,1$ mol L^{-1} e $pH 7,00$. A vazão do sistema $1,0$ $mL\ min^{-1}$ e volume de injeção de $65\ \mu L$, também proporcionaram uma resposta satisfatória já que o objetivo também

era de se obter um método de baixo consumo de reagente e de produção de efluentes químicos, cerca de 250 mL para 80 análises.

A resposta em relação à concentração de ácido cítrico, obtida sem parada de fluxo, aliada as condições experimentais otimizadas, proporcionaram o desenvolvimento de um método análise que apresentou limites de quantificação e detecção de 15,60 e 5,15 nmol L⁻¹, respectivamente.

O método proposto foi aplicado para detecção de ácido cítrico em amostras de bebidas (suco e isotônico).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o eletrodo de carbono grafite apresentou considerável capacidade de responder a presença de ácido cítrico, proporcionando o desenvolvimento do sensor potenciométrico usado como sistema de detecção em fluxo para determinação deste aditivo alimentar em amostras de bebidas.

6. Propostas de continuidade do trabalho

De acordo com as excelentes características apresentadas pelo sensor propõe-se a hifenação da célula eletroquímica a um sistema de cromatografia líquida (HPLC), de acordo com a Figura 17, para se obter uma seletividade do proposto sistema. Propõe-se ainda a aplicação do método para outros tipos de alimentos, para que se obtenha um universo maior de amostras que possam se deste sistema como proposta de continuidade do trabalho.

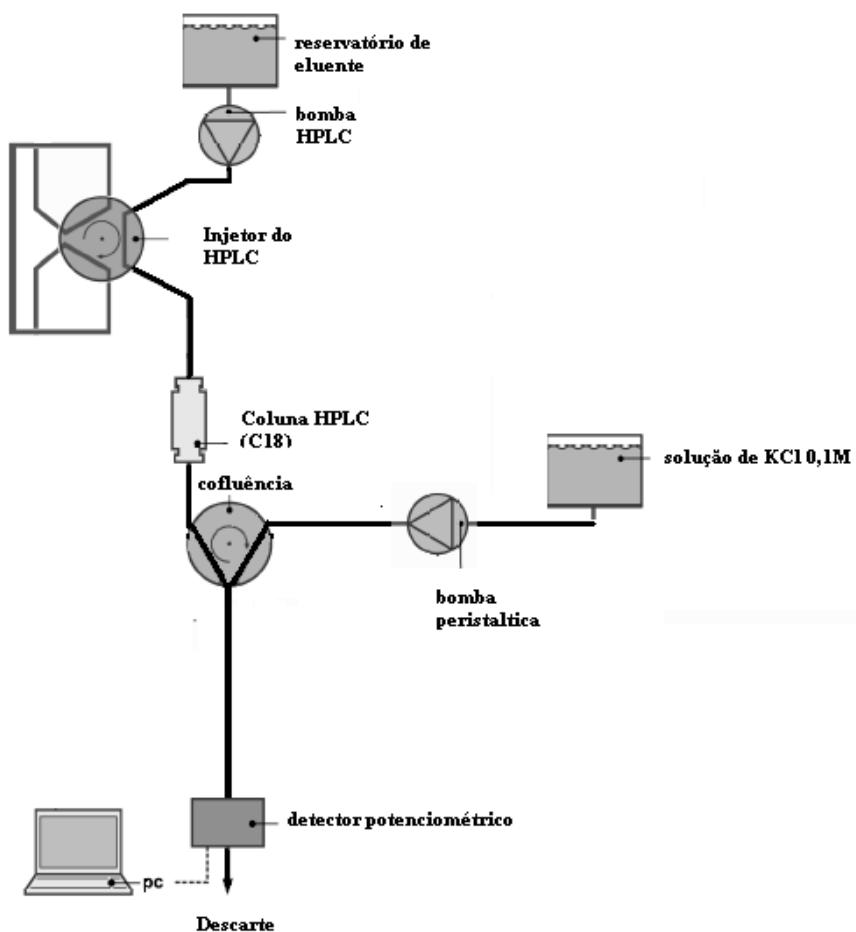


Figura 17: Diagrama da proposta de hifenação do sistema HPLC ao sistema de detecção desenvolvido nesta dissertação. **Fonte:** Celso Luciano de Araújo

7. Referências Bibliográficas

ANGNES, L.; RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H.; *Anal. Chem.*, 72, 5503, 5503–5506; 2000.

ANVISA, Portaria nº 540 da SVS/MS de 27/10/1997, que se encontra disponível no site http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm, data de acesso fevereiro; 2009.

ARAÚJO, A. N.; COUTO, C. M. C. M.; LIMA, J. L. F. C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; *J. Agric. Food Chem.* 46, 168-172; 1998.

ASHLEY, K.; *Journal of Hazardous Materials* 102, 1, 1-12; 2003.

BAKKER, E.; *Anal. Chem.*, 76, 3285-3298; 2004.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; John Wiley & Sons, Inc.: New York; 2001.

BERTOTTI, M. E LOWINSOHN, D.; *Quim. Nova*, 29, 6, 1318-1325; 2006.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; *Electroanalysis*, Oxford University Press; Oxford; 1998.

CARVALHO, P. R. ; *Revista LOGOS*, 12, 57-69; 2005.

CASTILHO, T. J.; tese de doutorado, Unicamp, campinas, São Paulo; 2003.

CAVALHEIRO, É. T. G.; CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; *Quim. Nova*, 31, 8, 2194-2198; 2008.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P.G.; ALMEIDA, F. A. C.; ARAÚJO LEITE, J. C.; SILVA, F. L. H.; *biol. e ciências da terra*, 4, 2; 2004.

CHEN, Z. L.; ALEXANDER P. W.; *J. Chromatogr.* 758, 227; 1997.

CHEN, Z.; ALEXANDER P. W.; *Anal. Chim. Acta*, 332, 187; 1996.

CHEN, Z; YU, J. C; *Talanta*, vol. 49 ,6661-665; 1999.

CHENG, J.; JANDIK, P.; AVDALOVIC, N.; *J. Chromatogr.*, A, 997, 73; 2003.

COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. *Food Chemicals Codex*. 4. ed. Washington D. C.: National Academic Press, 102 e 753; 1996.

COUTO, C. M. C. M.; LIMA, J. L. F. C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; *Analusis*, 26; 1998.

COUTO, C. M. C. M.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; *Quim. Nova*, vol. 23, 6; 2000.

CUBEROT, N.; MONFERRER, A.; VILLALTA, J. *Colecion Tecnologia del alimentares*; Ed. MP libros; 2004.

Dec. n.º 55.871 de 26 de março de 1965, com modificações introduzidas até 31 de dezembro de 1975 aditivos alimentares.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 544. , BRASIL, Brasília, 16 de novembro de 1998.

FAO/WHO. *Summary of evaluations performed by the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA)*. Washington: ILSI Press; 1999.

FARRELL, J. R.; ILES, P. J.; DIMITRAKOPOULOS, T. *Anal. Chim. Acta*, 334, 133; 1996.

FATIBELLO-FILHO, O.; DE CARVALHO, A. E.; ROCHA-FILHO, R. C. E MEDEIROS, R. A.; *Quim. Nova*, 31, 1405; 2008.

FATIBELLO-FILHO, O.; LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; *Quim. Nova*, 26, 197; 2003.

- FELLOWS PJ; “Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas” . 2^a edición. Porto Alegre (Brasil): Artmed, 19-22; 2006.
- FERREIRA, I. M. P. L .O., LIMA, J. L. F. C.; J. Flow Injection Anal. 10, 17; 1993.
- FERREIRA, R. Q.; AVACA, L. A.; Quim. Nova, 31, 2169; 2008.
- FIORUCCI, A. R.; BARBOSA SOARES, M. H. F.; CAVALHEIRO, É. T. G.; Quím. Nova na Escola, 15; 2002.
- FRENZEL, W.; Analyst, 113, 1039; 1988.
- FRENZEL, W.; RAUTERBERGER-WULFF, A.; SCHEPERS, D.; FRESENIUS Z. Anal. Chem., 353, 123; 1995.
- GODOY, H.T.; SCHERER, R.; RYBKA , A. C. P., Quim. Nova, 31, 1137; 2008.
- HANRAHAM, G.; PATIL, D. G.; WANG, J.; J. Environ. Monit., 6, 657; 2004.
- HANSEN, E. H.; KRUG, F. J.; GROSER, A. K.; RUZICKA, J.; Analyst, 102, 714; 1977.
- HART, J. P.; CREW, A.; CROUCH, E.; HONEYCHURCH, K. C.; PEMBERTON, R. M.; Anal. Lett., 37, 789; 2004.
- HERDAN, J.; FEENEY, R.; KOUNAVES, S. P.; FLANNERY, A. F.; STORMENT, C. W.; KOVACS, G. T. A.; DARLING, R. B.; Environ. Sci. Technol., 32, 131; 1998.
- HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P.; Trends Anal. Chem., 22, 456; 2003.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL), “Métodos físico-químicos para análise de alimentos”, IV edição 1^a edição digital, SES - CCD –IAL, Secretaria de Estado da Saúde Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo; 2008.
- ISQUIERDO, A.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Electroanalysis, 7, 505; 1995.

ITO, S.; HACHIYA, H.; BABA, K.; ETO, M.; ASANO, Y.; WADA, H.; *Talanta*, 43, 1421; 1996.

IUPAC, *Pure and Appl. Chem.*, 66, 2527; 1994.

JURKIEWICS, M.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S.; MARTINEZ-FABREGAS, E.; *Anal. Chim. Acta*, 327, 243; 1996.

LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÇÃO E DEFESA DO CONSUMIDOR, sob a Lei n° 8.078, de 11 de setembro de 1990.

LUQUE-PEREZ, E.; RIOS A.V.L.M. *Anal. Chim. Acta*, 366, 231; 1998.

MACHADO, S. A. S.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; GALLI, A.; De SOUZA, D.; *Quim. Nova*, 29, 105; 2006.

MAZO, L. H.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A. DE; COMAR, D. DA S.; CASTILHO, M.; BARTHUS, R. C.; *Revista Analytica*, 4, 44; 2003.

MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; LUCA, G. C.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; *Anal. Chim. Acta*, 366, 193; 1998.

MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; JÚNIOR, L. R.; NETO, G. O.; LIMA, J. L. F. C.; *Quím. Nova*, 19, 549; 1996.

MULLER, H.; SPICHERMANN, A.; *Chem. Anal.*, 40, 599; 1995.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L.; *Quim. Nova*, 21, 5; 1998.

NUNES, G. S.; LIMA, R. S.; NOGUER, T.; MARTY, J.; *Quim. Nova*, 30, 9; 2007.

OHURA, H.; IMATO, T.; YAMASAKI, S.; *Bunseki Kagaku*, 45, 689; 1996.

ALTUNBULDUK, T.; KOCKER, H. M.; FRENZEL, W.; FRESENIUS; Z. *Anal. Chem.*, 351, 593; 1995.

PEDROTTI, J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R.; *Electroanalysis*, 8, 673; 2005.

- PEREIRA, F. C.; BERGAMO, E. P.; ZANONI, M. V. B.; Quim. Nova, 29, 1054; 2006.
- PUNGOR, E.; TOTH, K.; NAGY, G.; Ed. M. Kessler, Urban ans Schwarzenberger, Munchen; 1976.
- PUNGOR, E.; TOTH, K.; NAGY, G.; Hung. Sci. Instrum., 35, 1; 1975.
- QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L.; Electroanalysis, 16, 22; 2004.
- RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ciência Rural, 37, 911; 2007.
- RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ciência Rural, 37, 911; 2007.
- RUZICKA, J.; Anal. Chim. Acta, 261, 3; 1992.
- RUZICKA, J.; Analyst, 119, 1925; 1994.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; 2nd ed., John Wiley & Sons: New York; 1988.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; Anal. Chim. Acta, 78, 145; 1975.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; Anal. Chim. Acta, 99, 37; 1978.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; ZAGATTO, E. A.; Anal. Chim. Acta, 88, 1; 1977.
- SALES, M. G. F.; CASTANHEIRA, M.S.A.; FERREIRA, R. M. S.; VAZ, M. C. V. F.; DELERUE-MATOS, C.; Portugaliae Electrochimica Acta 26, 147; 2008.
- SCHULZE, H.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; VORLOVA, S.; SCHMID, R. D.; BACHMANN, T. T.; Biosensors and Bioelectronics 17, 1095; 2002.
- SHPIGUN, L. K.; Spec. Public. R. Soc. Chem. (Reviews on Analytical Chemistry, Euroanalysis VIII), 154, 246; 1994.
- SILVA, F. A. DE M.; NOGUEIRA, F. D; GUIMARÃES, P. T. G.; GODINHO, A.; MALTA, M. R.; Ciênc. agrotec., Lavras. Edição Especial, 1391-1395; 2002.
- SIMÃO, A. M.; 2 Ed. São Paulo: Nobel., 274; 1989.
- SKEGGS, L. T.; Anal. Am. J. Clin. Pathol, 28, 311; 1957.

SKOOG,D.A. ; WEST,D.M. ; HOLLER,F.J. ; CROUCH, S.R. ; 8^a Edição, Editora Cenage learning; 2008.

SOUZA, D. DE; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, OLIVEIRA, V. A.; R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. E MACHADO, S. A. S.; Quim. Nova, 27, 790; 2004.

STETTER, J. R.; PENROSE, W. R.; YAO, S.; J. Electrochem. Soc., 150, 11; 2003. STRADIOTTO, N. R.; CARMO, D. R.; SILVA, R. M.; Portugaliae Electrochimica Acta 22 , 71-79; 2004.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B.; J. Braz. Chem. Soc., 14, 159; 2003.

THEVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Biosensors & Bioelectronics, 16, 121; 2001.

VALCÁRCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Ellis Horwood, Chichester; 1987.

VEGA, P. V; México: OMS, Editor: World Health Organization.. 218; 1986.

WANG, J.; Anal. Electrochem., 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc.: New York; 2000.

WILLIAMS, G.; D'SILVA, C.; Analyst, 119, 2337; 1994

WRÓBLEWSKI, W.; DYBKÓ, A.; MALINOWSKA, E.; BRZÓZKA, Z.; Talanta, 63, 33; 2004.