



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM COGUMELOS**

**Mestrando: Gabriel Ferreira Pinto
Orientador: Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva**

**Uberlândia
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DE FORMALDEÍDO EM COGUMELOS**

Mestrando: Gabriel Ferreira Pinto

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva

Área de concentração: Química Analítica

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química

Uberlândia

Julho/2017

GABRIEL FERREIRA PINTO

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P659d
2017 Pinto, Gabriel Ferreira, 1989-
Desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação de
formaldeído em cogumelos / Gabriel Ferreira Pinto. - 2017.
98 f. : il.

Orientador: Sidnei Gonçalves da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Formaldeído - Análise (Química) - Teses. 3.
Cogumelos - Cultivo - Teses. 4. - Teses. I. Silva, Sidnei Gonçalves da.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

CDU: 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 262/PPQUI.

DATA: 28/07/2017

DISCENTE: Gabriel Ferreira Pinto

MATRÍCULA: 11522QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação de formaldeído em cogumelos.

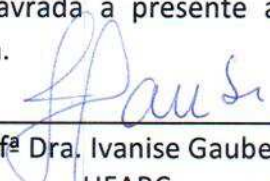
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

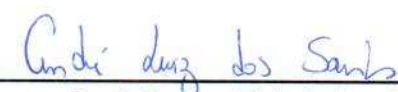
LINHA DE PESQUISA: Espectroanalítica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de procedimentos empregando sistemas de análises em fluxo para a determinação de espécies orgânicas e inorgânicas em amostras de alimentos.

Às oito horas e trinta minutos do dia vinte e oito de julho do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, do Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Ivanise Gaubeur, da Universidade Federal do ABC, André Luiz dos Santos e Sidnei Gonçalves da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Profª Dra. Ivanise Gaubeur
UFABC


Prof. Dr. André Luiz dos Santos
UFU


Orientador(a): Prof Dr. Sidnei Gonçalves da Silva – IQUFU

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo

Aos meus familiares que me apoiaram desde a volta ao Brasil principalmente meus pais, Rosilene e José Ricardo. Sem vocês eu não teria conseguido atingir meus objetivos.

À minha namorada, Paula, que mesmo distante sempre me apoiou.

Ao meu orientador Sidnei, por ter me aceitado como aluno e ter me ajudado desde o início, suas contribuições e sugestões ajudaram muito durante todo o mestrado.

Ao professor Rodrigo Muñoz pela parceria durante o trabalho e por toda ajuda durante os experimentos e discussões.

Ao professor Alex pela ajuda e contribuição durante os experimentos de análise em fluxo.

A todos alunos do laboratório LEA e NUPE pela ajuda e compreensão, principalmente ao Diego por ter me ajudado durante todos experimentos eletroquímicos e também pelas discussões e contribuições.

Aos meus amigos de graduação que me incentivaram a fazer o mestrado, Diego, Rodrigo Banana, Rafael Melo, Roberto Krebs e Éverton.

A CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química (IQUFU) pela estrutura concedida e pela oportunidade de realização da pesquisa.

Aos técnicos e funcionários da UFU pela ajuda.

Aos professores membros da banca de qualificação, Nívea Coelho e André Luiz, pelas contribuições.

Aos membros da banca pelo aceite do convite de participar da defesa.

Muito obrigado!

RESUMO

Formaldeído é utilizado como desinfetante, fungicida e pesticida na indústria alimentícia. No entanto, alguns cogumelos dentre eles shiitake e shimeji, podem produzir esse aldeído naturalmente, apresentando níveis de concentração de formaldeído entre 21 a 370 $\mu\text{g g}^{-1}$. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS 1996) a dose diária tolerável de formaldeído é 0,15 mg kg^{-1} de peso corporal. Vários métodos foram reportados na literatura para determinação de formaldeído em ar, alimentos, água e madeira baseado em métodos colorimétricos, fluorimétricos e cromatográficos. Neste trabalho foram desenvolvidos dois procedimentos para determinação de formaldeído em amostras de cogumelo (shiitake e shimeji), ambos envolvendo a reação da acetilacetona em meio de acetato de amônio (reagente de Nash, pH 5,5) levando a formação da 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL). Em um primeiro trabalho foi desenvolvido um sistema de análise em fluxo com multicomutação e detecção espectrofotométrica empregando válvulas solenoide controladas por computador. Resposta linear foi observada entre 0,2 – 7,0 mg L^{-1} , com limite de detecção de 0,02 mg L^{-1} (99,7% de confiança), desvio padrão relativo de 1,08 % ($n = 15$), frequência de amostragem de 17 amostras h^{-1} , consumindo 10,9 mg de acetilacetona e 30 mg de acetato de amônio por determinação. Em um segundo trabalho foi desenvolvido um procedimento eletroanalítico empregando voltametria de onda quadrada para determinação indireta de formaldeído explorando a formação do DDL com eletrodo de carbono vítreo. Resposta linear foi observada entre 0,4 – 40 mg L^{-1} , com limite de detecção estimado em 0,05 mg L^{-1} (99,7% de grau confiança), desvio padrão relativo de 0,71 % ($n=10$) consumindo 1,56 mg de acetilacetona e 117 mg de acetato de amônio por determinação. Ambos procedimentos foram aplicados na determinação de formaldeído em amostras de shimeji e shiitake após destilação simples do analito empregando solução de ácido fosfórico 10%. Os resultados obtidos foram concordantes entre si, de acordo com o teste-t de Student pareado, em um nível de confiança de 95%, indicando exatidão satisfatória. De uma maneira geral, pode-se afirmar que os procedimentos desenvolvidos apresentaram características que permitem a determinação de formaldeído em cogumelos, devido à seletividade e sensibilidade, além de serem procedimentos simples, rápidos e com redução na quantidade de reagentes e resíduos gerados em comparação com os métodos cromatográficos para a determinação deste aldeído em amostras de alimentos.

Palavras-chave: Formaldeído, shiitake, shimeji, sistema de análise em fluxo com multicomutação, voltametria de onda quadrada.

ABSTRACT

Formaldehyde is employed as a fungicide, pesticide and disinfectant in food production. However, some types of mushroom, such as shiitake and shimeji, may produce formaldehyde during their growth. Shiitake mushrooms can have formaldehyde at 21–370 $\mu\text{g g}^{-1}$. A tolerable daily intake (TDI) of 0.15 mg kg^{-1} body weight per day has been set for formaldehyde consumption by the World Health Organization (WHO 1996). Several methods have been reported for formaldehyde determination in different samples such as air, food, water and wood, with different techniques, for example, spectrophotometry, fluorimetry and chromatography. In this work two procedures for determination of formaldehyde in mushrooms samples (shiitake and shimeji) were developed, both determination involves the reaction with acetylacetone in ammonium acetate medium (Nash reagent, pH 5.5) leading to the formation of 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin (DDL). Firstly, a multicommuted flow analysis system with spectrophotometric detection were design using solenoid valves controlled by a computer. A linear response was observed from 0.2 – 7.0 mg L^{-1} , with a detection limit of 0.02 mg L^{-1} , (99,7% confidence level) relative standard deviation of 1.08% ($n = 15$), sampling frequency of 17 samples h^{-1} , consuming 10.9 mg of acetylacetone and 30 mg of ammonium acetate per determination. Secondly, an electroanalytical procedure was developed using square wave voltammetry to determine formaldehyde indirectly by exploring the formation of DDL with glassy carbon electrode. A linear response was observed from 0.4 – 40 mg L^{-1} , with a detection limit of 0.05 mg L^{-1} (99,7% confidence level), relative standard deviation of 0.71% ($n = 10$) and consuming 1.56 mg of acetylacetone and 117 mg of ammonium acetate per determination. Both procedures were applied on the analysis of shiitake and shimeji samples after formaldehyde steam distillation with 10 % phosphoric acid. No statistical difference was observed applying the Student t- test paired at 95% of confidence interval for the concentration results obtained with both developed procedures. The results showed that both procedures were selectives and sensitives, simple, fast and reduces waste production when compared to chromatographic procedures that determine this aldehyde in food samples.

Key-words: Formaldehyde, shiitake, shimeji, multicommuted flow analysis system, square wave voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do formaldeído [2].	2
Figura 2: Reação do formaldeído com a água formando formalina. Adaptado: [4].	3
Figura 3: Comparação do crescimento da produção mundial de cogumelo (bilhões de kg) com o crescimento da população mundial (bilhões) ao longo dos anos. Adaptado: [14].	4
Figura 4: Porcentagem estimadas de cada gênero de cogumelo produzidas no mundo em 2010. Adaptado: [14].	5
Figura 5: Produção mundial de cogumelos em 1997. Adaptado: [15].	6
Figura 6: Cultivo do cogumelo shiitake (<i>Lentinula edodes</i>) em troncos de árvore [29].	7
Figura 7: Ciclo de vida do cogumelo <i>Lentinula edodes</i> (shiitake). Adaptado: [20].	8
Figura 8: Produção mundial de shiitake entre os anos 1936 e 1990. Adaptado: [31].	8
Figura 9: Produção de shiitake Mundial entre os anos 1980 e 2012. Adaptado: [19,32,33].	9
Figura 10: Cultivo do shimeji (<i>Pleurotus Ostreatus</i>) em potes com serragem como substrato [41].	11
Figura 11: Reação entre o reagente de Nash e o formaldeído formando o 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL). Adaptado: [63].	15
Figura 12: Reação entre formaldeído e ácido cromotrópico (ACT) em meio fortemente ácido. Adaptado: [64].	15
Figura 13: Reação do formaldeído na oxidação da rodamina B em meio de bromato de potássio e ácido sulfúrico. Adaptado: [55].	16
Figura 14: Reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila formando hidrazona. Adaptado: [67].	17
Figura 15: A) Reação enzimática e B) Reação eletroquímica. Adaptado: [76].	17
Figura 16: Perfil do sinal transiente geralmente obtido em sistemas de análises de injeção em fluxo e ilustração do gradiente de concentração na zona de amostragem.	19
Figura 17: Funcionamento de uma válvula solenoide. I desativada e II ativada. A, B ou C posições para inserção ou saída de solução.	21
Figura 18: (A) Varredura de potencial vs. tempo (B) Voltamograma da corrente obtida em função do potencial. Ei: potencial inicial Es: potencial de inversão Ef: potencial final. Fonte: [84].	23
Figura 19: Forma da aplicação da curva corrente potencial na voltametria de onda quadrada Adaptado: [90].	24
Figura 20: Esquema do arranjo eletrônico para a ativação das válvulas solenoide.	29
Figura 21: Sistema de análises em fluxo com multicomutação para determinação de formaldeído: V ₁ – V ₄ – válvulas solenoide, Bp – Bomba peristáltica, A: bobina de reação B: ponto de confluência, D: Detector e W: descarte.	30
Figura 22: Esquema do sistema eletroquímico contendo potenciostato, célula eletroquímica e três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) para medidas da oxidação do DDL utilizando voltametria de onda quadrada.	32
Figura 23: Efeito do tempo de acionamento da válvula 1 contendo o analito. Concentração de formaldeído igual a 5 mg L ⁻¹ , tempo de acionamento da válvula do reagente 1,2 s (acetilacetona 0,0195 mol L ⁻¹ em meio de acetato de amônio 1,95 mol L ⁻¹ , pH 5,5), 7 de ciclos de amostragem, temperatura do banho termostático 50°C, tempo de parada de fluxo de	

150 s, vazão da bomba peristáltica $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, tamanho da bobina de reação de 200 cm e $\lambda = 412 \text{ nm}$.	38
Figura 24: Efeito do tempo de acionamento da válvula 2 contendo o reagente. Demais parâmetros iguais ao da Figura 23, alterando somente o parâmetro otimizado anteriormente 4,0 segundos (tempo de acionamento da válvula 1).	39
Figura 25: Efeito do número de ciclos de amostragem. Demais parâmetros iguais ao da Figura 24. Alterando somente o parâmetro otimizado anteriormente 1,4 segundos (tempo de acionamento da válvula 2).	40
Figura 26: Efeito do tempo da parada de fluxo. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 25.	41
Figura 27: Efeito da temperatura do banho termostático. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 25, alterando somente o parâmetro otimizado anteriormente 60 segundos (tempo de parada de fluxo).	43
Figura 28: Efeito da concentração de acetilacetona no reagente de Nash. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 27.	44
Figura 29: Efeito da concentração de acetato de amônio no reagente de Nash. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 28, alterando somente a concentração de acetilacetona presente no reagente de Nash para $0,39 \text{ mol L}^{-1}$.	45
Figura 30: Efeito do pH no reagente de Nash. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 29, alterando somente a concentração de acetato de amônio $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ presente no reagente de Nash.	46
Figura 31: Espectro de absorção do DDL e reagente de Nash. Utilizou-se 4,3 mL de formaldeído (4 mg L^{-1}) e 1,5 mL de reagente de Nash (acetilacetona $0,39 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetato de amônio $1,4 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5) levando a formação do DDL. Tempo de reação: 10 minutos à 80°C .	47
Figura 32: Sinais transientes obtidos em triplicata em diferentes concentrações de formaldeído 0 – $7,0 \text{ (mg L}^{-1})$ e construção da curva analítica a partir das alturas dos picos gerados.	49
Figura 33: Voltamogramas cíclicos do formaldeído, reagente de Nash e formação do DDL utilizando 4,2 mL de formaldeído (30 mg L^{-1}) e 0,8 mL de reagente de Nash (acetilacetona $0,0195 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetato de amônio $1,95 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5) levando a formação do DDL. Tempo de reação: 10 minutos, temperatura ambiente. Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Velocidade de varredura (v): 50 mV s^{-1} . Incremento de potencial (ΔEs): 5 mV.	55
Figura 34: Voltamogramas cíclicos do reagente de Nash e formação do DDL nas mesmas condições da Figura 33, alterando somente a concentração de formaldeído para 15 mg L^{-1} .	56
Figura 35: Estudo cinético da reação química entre o formaldeído e do reagente de Nash levando a formação do DDL, nas mesmas condições da Figura 34.	57
Figura 36: Voltamogramas cíclicos da reação entre o DDL e reagente de Nash em função da velocidade de varredura nas mesmas condições da Figura 33, variando somente as velocidades de varredura. Sendo 1) 10 mV s^{-1} ; 2) 20 mV s^{-1} ; 3) 30 mV s^{-1} ; 4) 40 mV s^{-1} ; 5) 50 mV s^{-1} ; 6) 60 mV s^{-1} ; 7) 70 mV s^{-1} ; 8) 80 mV s^{-1} 9) 90 mV s^{-1} 10) 100 mV s^{-1} 11) 200 mV s^{-1} 12) 300 mV s^{-1} 13) 400 mV s^{-1} os valores das velocidades de varredura.	58
Figura 37: Gráfico da relação entre corrente de pico vs velocidade de varredura.	59

Figura 38: Gráfico da relação entre área de corrente de pico vs. (velocidade de varredura) ^{1/2} .	60
Figura 39: Gráfico da relação entre log da corrente de pico vs. log da velocidade de varredura.	60
Figura 40: Voltamogramas de onda quadrada do formaldeído, reagente de Nash e DDL, utilizando 4,2 mL de formaldeído (30 mg L ⁻¹) e 0,8 mL de reagente de Nash (acetilacetona 0,0195 mol L ⁻¹ em meio de acetato de amônio 1,95 mol L ⁻¹ , pH 5,5). Tempo de reação: 10 minutos (temperatura ambiente). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. ΔEs: 5 mV, a: 30 mV e f: 50 Hz.	61
Figura 41: Gráfico da relação entre área do pico do DDL vs. variação do tempo de aquecimento à 80 °C, nas mesmas condições da Figura 40, alterando apenas a concentração de formaldeído para 12 mg L ⁻¹ . Tempos analisados: 1, 5, 10, 15 e 20 minutos.	62
Figura 42: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 40, alterando somente o parâmetro previamente otimizado na seção anterior tempo de reação 10 minutos à 80 °C, em diferentes valores de incremento de potencial (ΔEs). Sendo 1) 1 mV; 2) 2 mV; 3) 3 mV; 4) 4 mV; 5) 5 mV; 6) 6 mV; 7) 7 mV; 8) 8 mV 9) 9 mV 10) 10mV os valores de (ΔEs).	63
Figura 43: Gráfico da relação entre corrente de pico e a variação do incremento de potencial (ΔEs).	64
Figura 44: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 42, alterando somente o parâmetro previamente otimizado ΔEs: 6 mV, em diferentes valores de amplitude de pulso de potencial (a). Sendo 1) 10 mV; 2) 20 mV; 3) 30 mV; 4) 40 mV; 5) 50 mV; 6) 60 mV; 7) 70 mV; 8) 80 mV 9) 90 mV 10) 100 mV os valores de (a).	65
Figura 45: Relação entre corrente de pico e a variação da amplitude de potencial (a).	66
Figura 46: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 44, alterando somente o parâmetro previamente otimizado a: 50 mV, em diferentes frequências de aplicação de pulso de potencial (f). Sendo 1) 10 Hz; 2) 20 Hz; 3) 30 Hz; 4) 40 Hz; 5) 50 Hz; 6) 60 Hz; 7) 70 Hz; 8) 80 Hz 9) 90 Hz 10) 100 Hz os valores de f.	67
Figura 47: Relação entre corrente de pico e a variação da frequência de aplicação pulso de potencial (f).	68
Figura 48: Relação entre corrente de pico e a variação da raiz quadrada da frequência de aplicação pulso de potencial (f).	68
Figura 49: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação do DDL empregando o eletrodo de carbono vítreo. Sendo 1) 0; 2) 0,4; 3) 1,0; 4) 5,0; 5) 10; 6) 20; 7) 30; 8) 40 mg L ⁻¹ de formaldeído e reagente de Nash. Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. ΔEs = 6 mV; a= 50 m; e f = 50 Hz.	70
Figura 50: Curva analítica, relação entre a área de pico e a variação da concentração de formaldeído em mg L ⁻¹ .	71
Figura 51: Repetibilidade do método (n=10, 10 mg L ⁻¹). Voltamogramas de onda quadrada para oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 49.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da produção dos cogumelos <i>Pleurotus</i> spp. em vários países entre 1997 e 2010 Adaptado: [14,15,32,33,42,43].	12
Tabela 2: Etapas de operação do sistema em linha para determinação de formaldeído pelo método da acetilacetona com detecção espectrofotométrica.	30
Tabela 3: Variáveis estudadas e otimizadas do sistema em fluxo com multicomutação.	48
Tabela 4: Características analíticas do sistema em fluxo com multicomutação.	50
Tabela 5: Avaliação do efeito da massa de amostra.	52
Tabela 6: Média das concentrações de formaldeído nas amostras de shiitake desidratado e fresco em diferentes volumes de solução extratora.	53
Tabela 7: Características analíticas do método eletroquímico com voltametria de onda quadrada.	72
Tabela 8: Comparação da determinação de formaldeído em amostras de cogumelo empregando o sistema de análises em fluxo com multicomutação com detecção espectrofotométrica e a voltametria de onda quadrada em diferentes amostras de cogumelo.	73
Tabela 9: Valores do $T_{\text{calculado}}$ a partir do teste t de Student pareado em diferentes amostras de cogumelo.	74
Tabela 10: Teste de adição e recuperação utilizando o sistema em fluxo com multicomutação e o sistema eletroquímico com voltametria de onda quadrada para diferentes amostras de cogumelo. Média das recuperações (n=3) em porcentagem.	75
Tabela 11: Trabalhos apresentados na literatura relacionados a quantificação de formaldeído em cogumelos (shiitake fresco e desidratado).	76
Tabela 12: Características analíticas dos métodos desenvolvidos e no método em batelada.	79
Tabela 13: Trabalhos empregando técnicas eletroanalíticas relacionados a quantificação de formaldeído.	81

LISTA DE SIGLAS

IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*

EPA (*Environmental Protection Agency*) Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

OMS Organização mundial da Saúde

ACT Ácido cromotrópico

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

ssp espécie

Ei potencial inicial

Es potencial de inversão

Ef potencial final.

f frequência de aplicação de pulso

ΔE_s incremento de potencial

a amplitude de pulso

DDL 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina

AOX álcool oxidase

FDH formaldeído desidrogenase

NAD Dinucleótido de nicotinamida e adenina

GL Graus de liberdade

Sumário

Capítulo 1: Introdução.....	1
1. Introdução.....	2
1.1. Formaldeído	2
1.2. Cogumelos.....	3
1.2.1. Lentinula edodes (Shiitake).....	6
1.2.2. Pleurotus Ostreatus (Shimeji)	10
1.3. Toxicidade do formaldeído	12
1.4. Métodos analíticos utilizados para quantificação de formaldeído	14
1.5. Extração de formaldeído em cogumelos	18
1.6. Sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA).....	18
1.7. Técnicas Eletroanalíticas.....	21
1.7.1. Voltametria cíclica	22
1.7.2. Voltametria de onda quadrada.....	23
Capítulo 2: Objetivos	25
2. Objetivos	26
2.1. Objetivos Gerais.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
Capítulo 3: Procedimento Experimental	27
3. Procedimento Experimental	28
3.1. Equipamentos e acessórios.....	28
3.1.1. Sistemas de análises em fluxo com multicomutação com detecção espectrofotométrica	28
3.1.2. Sistema de detecção voltamétrica	31
3.1.2.1. Eletrodos.....	31
3.1.2.2. Instrumentação	31
3.2. Reagentes e soluções.....	32
3.3. Padronização da solução de formaldeído	33
3.4. Preparo do reagente de Nash.....	33
3.5. Extração do formaldeído em amostras de cogumelo	34
Capítulo 4: Resultados e Discussões	35
4. Resultados e Discussões.....	36

4.1. Desenvolvimento de procedimento analítico empregando sistemas de análise em fluxo com multicomutação para a determinação espectrofotométrica de formaldeído	36
4.1.1. Estudo do tempo de acionamento da válvula do analito	37
4.1.2. Estudo do tempo de acionamento da válvula do reagente de Nash	38
4.1.3. Número de ciclos de amostragem binária	39
4.1.4. Tempo de parada de fluxo	41
4.1.5. Temperatura de aquecimento	42
4.1.6. Concentrações de acetato de amônio, acetilacetona e valor do pH no reagente de Nash.....	43
4.1.7. Características analíticas	48
4.2. Otimização da extração das amostras de cogumelo	50
4.2.1. Avaliação da extração de formaldeído	51
4.2.2. Avaliação do efeito da massa de amostra na extração de formaldeído em cogumelos.	51
4.2.3. Avaliação da quantidade de solução extratora na extração de formaldeído em cogumelos.....	52
4.3. Determinação eletroquímica	54
4.3.1. Voltametria Cíclica	54
4.3.2. Voltametria de onda quadrada.....	61
4.3.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada	62
4.3.2.2. Características Analíticas	69
4.4. Determinação de formaldeído em amostras de cogumelo empregando os dois procedimentos propostos.....	73
4.5. Teste de adição e recuperação de padrão	74
4.6. Comparação de diferentes procedimentos para determinação de formaldeído em cogumelos.....	75
4.7. Comparação de diferentes trabalhos empregando técnicas eletroanalíticas para determinação de formaldeído	79
Capítulo 5: Conclusão	82
5. Conclusão	83
Capítulo 6: Referências Bibliográficas	84
6. Referências Bibliográficas	85

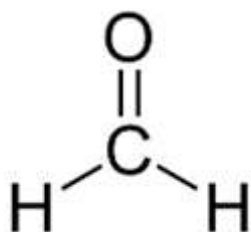
Capítulo 1: Introdução

1. Introdução

1.1. Formaldeído

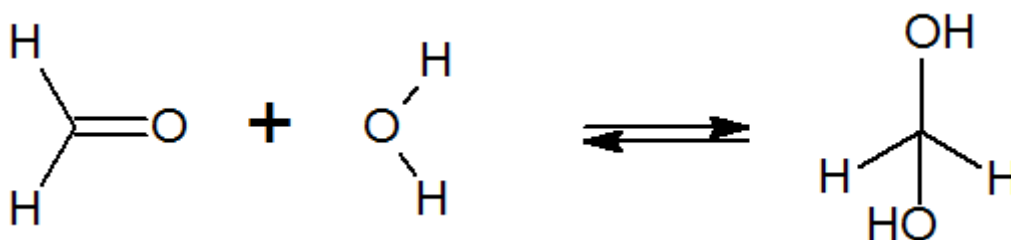
Formaldeído, também conhecido como aldeído fórmico ou metanal (IUPAC), é o aldeído mais simples encontrado na natureza [1]. Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 1.

Figura 1: Fórmula estrutural do formaldeído [2].



Este aldeído não é facilmente isolado e manipulado em seu estado puro em razão da elevada reatividade e instabilidade, é então encontrado na forma gasosa nas condições normais de temperatura e pressão. Por esse motivo é comercializado em solução aquosa e denominado de formol ou formalina. Este reagente possui entre 37% a 40% de formaldeído em presença de cerca de 8% a 15% de metanol para evitar a polimerização. Nestas condições, esta solução é um líquido incolor, de odor cáustico, miscível com água, etanol e acetona e imiscível com clorofórmio e éter [3]. A Figura 2 mostra a reação de equilíbrio químico envolvido na formação da formalina.

Figura 2: Reação do formaldeído com a água formando formalina. Adaptado: [4].



Os pontos de ebulição do formaldeído e da formalina são respectivamente, -20°C e 98°C [5,6]. Nota-se o ponto de ebulição da formalina é muito maior do que a do formaldeído devido as ligações de hidrogênio intermoleculares.

O formaldeído é uma das substâncias químicas industrializadas mais abundantes no mundo, sendo o mais abundante e importante aldeído no meio ambiente. Produzido industrialmente por meio da oxidação catalítica do metanol desde 1889, este aldeído é utilizado como matéria-prima em várias indústrias devido a sua elevada reatividade e baixo custo, sendo empregado em larga escala na indústria têxtil, de papel, adesivos, lubrificantes e resinas. É também aplicado como fungicida e pesticida na indústria alimentícia [6-9].

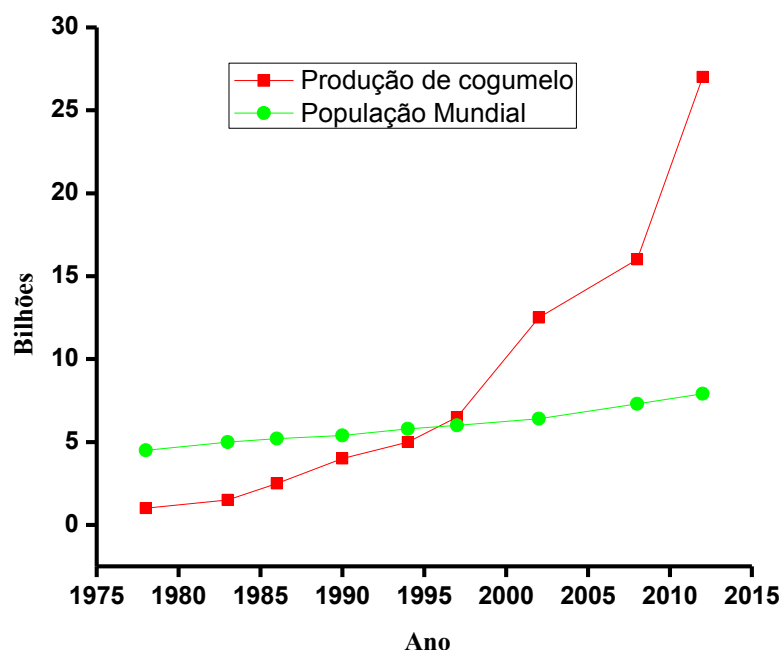
Outra aplicação do formaldeído é sua utilização como desinfetante de ar no cultivo de cogumelos, apesar de não ser aplicado diretamente sobre a plantação. Estudos feitos com cogumelos cultivados organicamente, ou seja, sem a utilização deste desinfetante concluíram que o cogumelo shiitake é capaz de produzir naturalmente esse aldeído [10].

1.2. Cogumelos

Os cogumelos passaram a ser utilizados como alimento e medicamento nos anos 600 a.C. na Ásia. Os chineses foram os pioneiros no desenvolvimento do cultivo de cogumelos, sendo o cogumelo shiitake o primeiro a ser produzido utilizando tronco de árvores [11,12]. Com o passar dos anos, o cultivo de cogumelos passou a ser disseminado em vários países da

América do Norte e Europa [13]. Seu crescimento ocorre em lugares úmidos com decomposição de matéria orgânica e são muito importantes na ciclagem de nutrientes [12]. Sua produção vem crescendo rapidamente nos últimos anos, principalmente a partir do ano de 1990 como é mostrado na Figura 3.

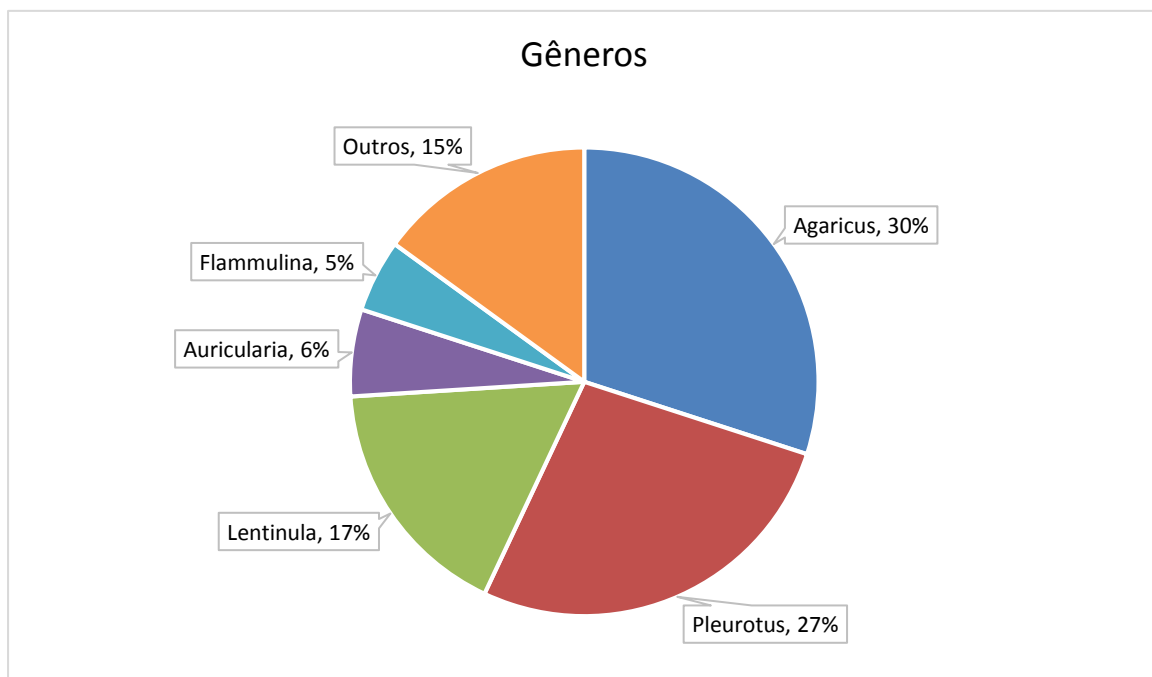
Figura 3: Comparação do crescimento da produção mundial de cogumelo (bilhões de kg) com o crescimento da população mundial (bilhões) ao longo dos anos. Adaptado: [14].



A produção de cogumelos entre os anos 1978 e 2012 aumentou de aproximadamente 1 bilhão para 27 bilhões de kg. É um aumento considerável quando comparado com o crescimento da população mundial no mesmo período. Portanto, o consumo per capita de cogumelos aumentou a um ritmo relativamente rápido e excede 4 kg por pessoa no ano de 2012, em comparação com apenas cerca de 1 kg em 1997. As espécies de cogumelos mais cultivadas no mundo estão divididas em 5 principais gêneros: 1) *Agaricus*: *Bisporus* (paris) e *Brasilensis* 2) *Pleurotus*: possuindo 6 diferentes espécies sendo o *Ostreatus* (shimeji) o mais

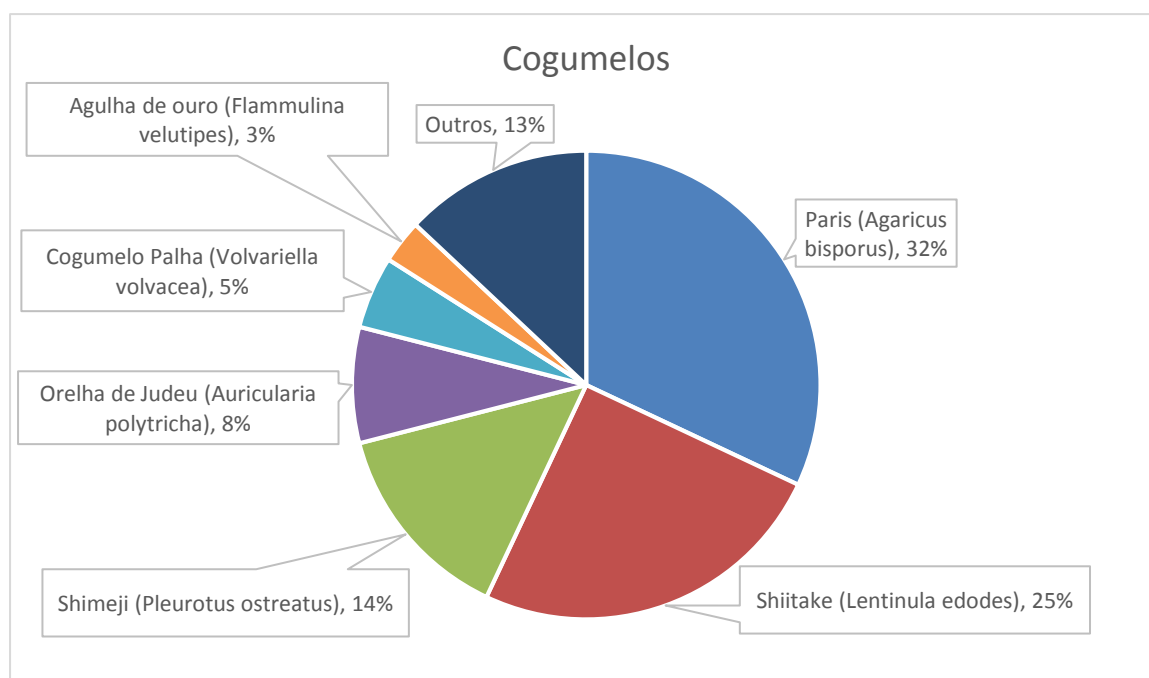
conhecido 3) *Lentinula edodes* (shiitake) 4) *Auricularia* 5) *Flammulina*. A Figura 4 mostra as porcentagens estimadas de cada gênero de cogumelo produzidas no mundo em 2010 [14].

Figura 4: Porcentagem estimadas de cada gênero de cogumelo produzidas no mundo em 2010. Adaptado: [14].



Entretanto, considerando a produção mundial de cada cogumelo isolado, os três mais produzidos são: 1) *Agaricus bisporus* (paris) 2) *Lentinula edodes* (shiitake) 3) *Pleurotus ostreatus* (shimeji). A Figura 5 mostra as porcentagens de cogumelos produzidas no mundo em 1997 [15].

Figura 5: Produção mundial de cogumelos em 1997. Adaptado: [15].



A China é o maior produtor de cogumelos comestíveis no mundo. O governo chinês tem incentivado cada vez mais os agricultores a mudar sua produção agrícola de culturas tradicionais para culturas com valor agregado para exportação [16]. No Brasil a colheita e o uso de cogumelos eram prática comum entre os indígenas, no entanto essa prática foi extinta. No ano de 1950, imigrantes asiáticos trouxeram técnicas de cultivo de cogumelos comestíveis para o Brasil [17].

1.2.1. *Lentinula edodes* (Shiitake)

A origem do nome shiitake é devido a utilização do tronco da árvore denominada Shii no cultivo [18]. Considerado um alimento com elevado valor nutritivo, este cogumelo possui baixo teor de gorduras e carboidratos e quantidades significativas de vitaminas, enzimas e proteínas [19-21]. Além do valor nutritivo têm sido atribuídas ao shiitake algumas propriedades medicinais, dentre elas: ação contra infecções viróticas, diminuição do crescimento de tumores em ratos [22,23] e redução no nível sérico de colesterol [24]. O shiitake é geralmente produzido

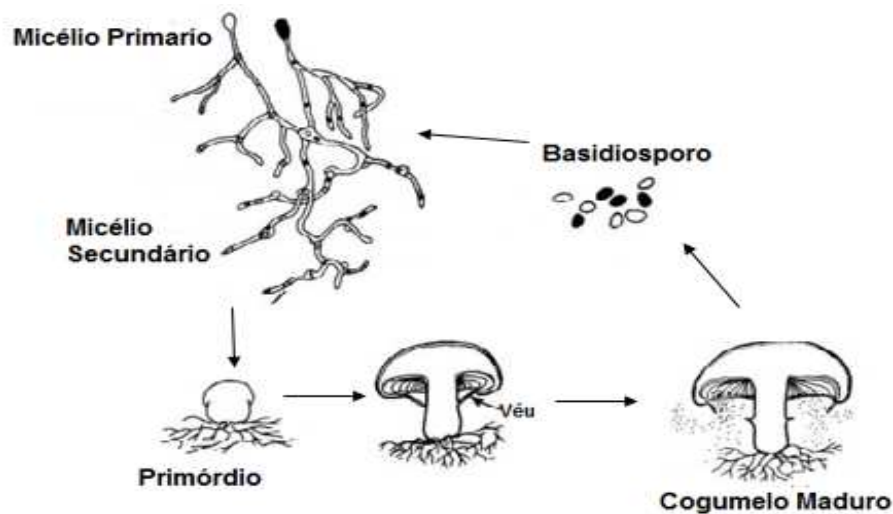
em toras de eucalipto (Figura 6), no entanto, outros substratos à base de diferentes resíduos agrícolas vêm sendo utilizados para melhoramento de colheita e eficiência biológica do fungo [20,25,26]. Este cogumelo faz o uso da lignina, celulose e hemicelulose como fonte de energia (carbono e nutrientes) e pode ser cultivado em diferentes resíduos agrícolas, como por exemplo, em bagaço de cana de açúcar.[27,28].

Figura 6: Cultivo do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) em troncos de árvore [29].



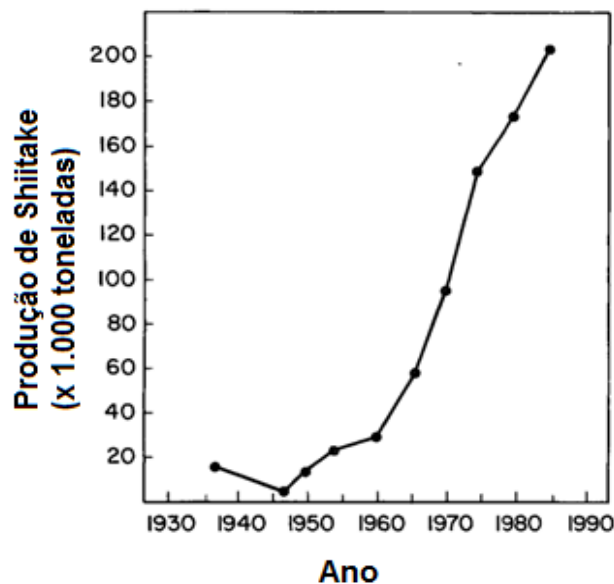
O ciclo de vida do cogumelo shiitake é mostrado na Figura 7. O cogumelo maduro dá origem aos basidiósporos que são estruturas reprodutivas. Os basidiósporos são um pó branco liberado pelo cogumelo durante a maturação e podem causar problemas de alergia respiratória em algumas pessoas. O micélio primário é formado quando ocorre a germinação dos basidiósporos e tem a metade do número de genes do cogumelo. O micélio primário se funde (plasmogamia) com outro micélio primário para formação do micélio secundário, este apresenta o mesmo número de genes do cogumelo e pode dar origem a novos cogumelos. O micélio secundário é chamado de inóculo ou semente do cogumelo [30].

Figura 7: Ciclo de vida do cogumelo *Lentinula edodes* (shiitake). Adaptado: [20]



A produção do cogumelo shiitake aumentou rapidamente após o fim da segunda guerra Mundial (1945) como pode-se observar na Figura 8.

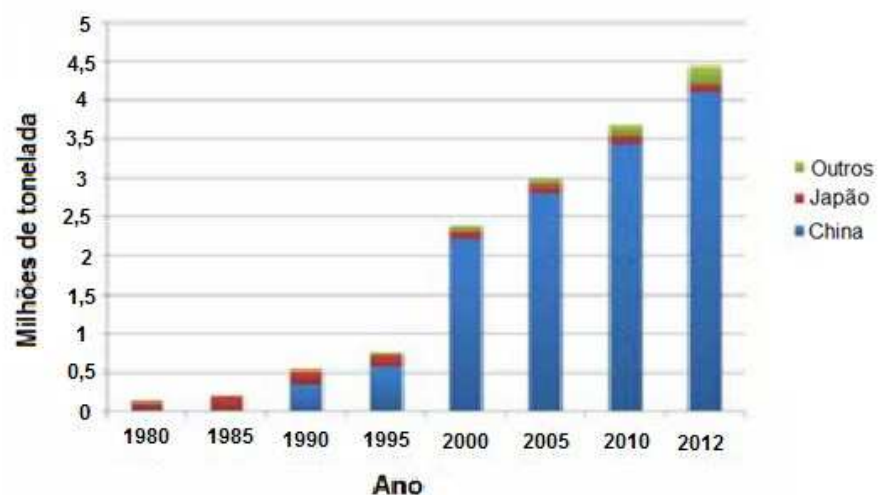
Figura 8: Produção mundial de shiitake entre os anos 1936 e 1990. Adaptado: [31].



O Japão era o maior produtor de shiitake no ano de 1980, mas a partir de 1990, o maior produtor desse cogumelo passou a ser a China. Entre os anos 1995 e 2000, os cultivadores de shiitake chineses aumentaram a produção de aproximadamente 0,5 milhões de toneladas para

mais de 2 milhões de toneladas, um aumento elevado como observa-se na Figura 9. Nota-se também que no ano de 2012 a China cultivou aproximadamente 90% de todo shiitake produzido no mundo, este valor foi estimado por Yamanaka [32]. Muitas comunidades na China foram tiradas da pobreza por causa das oportunidades econômicas trazidas por causa do aumento da produção de shiitake [19].

Figura 9: Produção de shiitake Mundial entre os anos 1980 e 2012. Adaptado: [19,32,33].



Nos últimos 20 anos, a produção comercial de shiitake foi iniciada nos Estados Unidos, Brasil, Austrália e na Europa. Esse cogumelo pode ser encontrado no comércio na forma fresca ou desidratada. Sendo que a forma desidratada geralmente é utilizada como medicamento fitoterápico [10].

Durante o cultivo desses cogumelos o formaldeído é empregado como desinfetante de ar, apesar de não ser aplicado diretamente sobre a plantação. Estudos feitos com cogumelos cultivados organicamente, ou seja, sem a utilização deste desinfetante, concluíram que os cogumelos shiitake provavelmente produzam o formaldeído naturalmente, a partir de processos catalíticos consecutivos [10,34,35]. Em um estudo feito pela Agência de Normas Alimentares do Reino Unido (FSA) amostras de Shiitake fresco e desidratado apresentaram níveis de

concentração de formaldeído endógeno entre 100 a 300 $\mu\text{g g}^{-1}$. Esta concentração refere-se ao formaldeído livre e ligado que é derivado da quebra de moléculas de cadeia longa por meio da degradação térmica, por meio de hidrólise ácida e enzimática que ocorre durante a extração de formaldeído [36].

1.2.2. *Pleurotus Ostreatus* (Shimeji)

O cogumelo *Pleurotus Ostreatus* é conhecido pelos orientais como hiratake, mas no restante do mundo é chamado de shimeji. É também chamado de cogumelo ostra, devido a sua forma. É um dos cogumelos comestíveis mais nutritivos e saborosos [37,38]. Esse cogumelo é um dos mais cultivados e comercializados do mundo por causa das suas propriedades nutricionais e efeitos medicinais, tais como: antitumoral, imunomodulatório, antiviral, anti-inflamatório dentre outros [39,40]. Este fungo é rico em vitaminas, aminoácidos e minerais [37,38]. O cultivo de shimeji empregando serragem como substrato iniciou-se no final da década de 50. No início da década de 60 começou-se a empregar outros substratos como palhas secas, capim, palha de arroz e palha de trigo para a produção em escala comercial [37]. A Figura 10 mostra o cultivo deste cogumelo em potes de serragem como substrato.

Figura 10: Cultivo do shimeji (*Pleurotus Ostreatus*) em potes com serragem como substrato [41].



A produção do cogumelo do gênero *Pleurotus* aumentou rapidamente no mundo entre os anos de 1997 e 2010. A China foi o principal responsável pelo aumento da produção de 0,8 milhões de toneladas para 6 milhões de toneladas aproximadamente, um aumento de 618%. A China foi responsável por 85% de todo cultivo desse tipo de cogumelo no ano de 2010, como mostra a Tabela 1. Cerca de 25% de toda produção de cogumelo chinês no ano de 2010 foram de duas espécies de *Pleurotus*, *P. ostreatus* (shimeji) e *P. cornucopiae*. O Japão juntamente com outros países asiáticos, como Coreia do Sul, Taiwan, Tailândia, Vietnã, e Índia, são outros grandes produtores dos cogumelos do gênero *Pleurotus*. Observa-se um aumento relativamente alto na produção desse tipo de cogumelo nesses países de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Comparação da produção dos cogumelos *Pleurotus* spp. em vários países entre 1997 e 2010 Adaptado: [14,15,32,33,42,43].

País	Produção em 1997		Produção em 2010	
	ton (x1000)	(%)	ton (x1000)	(%)
China	760,0	86,8	5391	85,7
Japão	13,3	1,5	39,6	0,6
América do Norte	88,4	10,1	786	12,5
Resto da Ásia	1,5	0,2	8,6	0,1
América central e do Sul	0,2	-	1,5	-
União Europeia	6,2	0,7	32,0	0,5
Resto da Europa	5,8	0,7	28,0	0,5
África	0,2	-	1,3	-
Total	875,6	100	6288	99,9

1.3. Toxicidade do formaldeído

O maior interesse na determinação de formaldeído e seus derivados ocorre devido sua alta reatividade, que resulta na formação de poluentes secundários e também o seu confirmado efeito tóxico para a saúde humana. O formaldeído é uma substância química considerada como potencial agente carcinogênico para seres humanos e animais, segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer [44].

A ingestão de formalina resulta em imediata inflamação das mucosas, garganta e trato gastrointestinal [45], e eventual ulceração e necrose coagulativa do trato gastrointestinal [46] e

por consequência, danos nos rins e colapso do sistema circulatório levando a morte. A ingestão de aproximadamente 30 mL de formalina pode levar a morte em apenas 3 horas, mas a dose considerada fatal por seres humanos é de aproximadamente 60 mL [46]. Outros efeitos associados a ingestão de formalina são pneumonia, nefrite e em gestantes, podem induzir o aborto [47].

É possível ocorrer exposição oral crônica de formaldeído devido a ingestão de alimentos que possuem concentrações relativamente baixas dessa substância. Neste sentido, destacam-se alguns alimentos que contém formaldeído e fazem parte da dieta alimentar humana, tais como: legumes e frutas entre 3 a 60 mg kg⁻¹, peixes e carnes entre 1 e 34 mg kg⁻¹, frutos do mar entre 1 e 98 mg kg⁻¹ e leite e derivados em torno de 1 mg kg⁻¹[48]. A ingestão crônica entre 22-200 mg dia por 13 semanas não apresenta efeitos tóxicos em seres humanos [49], no entanto, não existem informações mais detalhadas na literatura a respeito da ingestão oral de menores níveis de formaldeído.

A maior parte dos estudos relacionados à toxicidade do formaldeído é por via nasal (inalação), que é provavelmente a maior causa de exposição. Estudos envolvendo formaldeído relacionados aos efeitos de ingestão e contato com a pele são limitados. Mesmo assim, é importante se preocupar com os níveis diários toleráveis dessa substância pois não se tem informações das reais consequências da exposição por ingestão. A dose diária tolerável de formaldeído estabelecida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) é de 0,2 mg kg⁻¹ de peso corporal [50], sendo que para a Organização Mundial da Saúde (OMS) a dose tolerável de formaldeído é menor, igual a 0,15 mg kg⁻¹ de peso corporal [51]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) através do programa internacional de segurança química estabeleceu com base em experimentos com animais que a dose tolerável de ingestão de formaldeído é de 2,6 mg L⁻¹ [52]. Esse último valor é expresso em unidades de mg L⁻¹ (não em mg kg⁻¹ por dia), por que os efeitos observados no trato gastrointestinal são mais

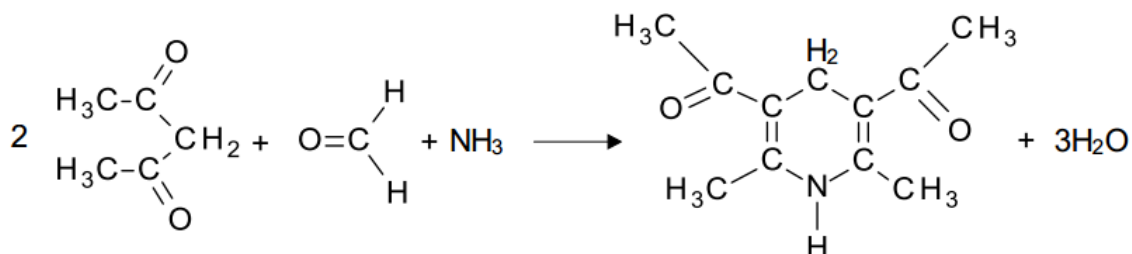
provavelmente relacionados à concentração de formaldeído consumido, do que sua ingestão cumulativa [53].

1.4. Métodos analíticos utilizados para quantificação de formaldeído

Diversos procedimentos para a determinação de formaldeído em amostras de cogumelos estão relatados na literatura. Estes procedimentos são baseados em diferentes técnicas analíticas, tais como: espectrofotometria [9,49-51], fluorimetria [57,58] e cromatografia líquida de alta eficiência [10,59].

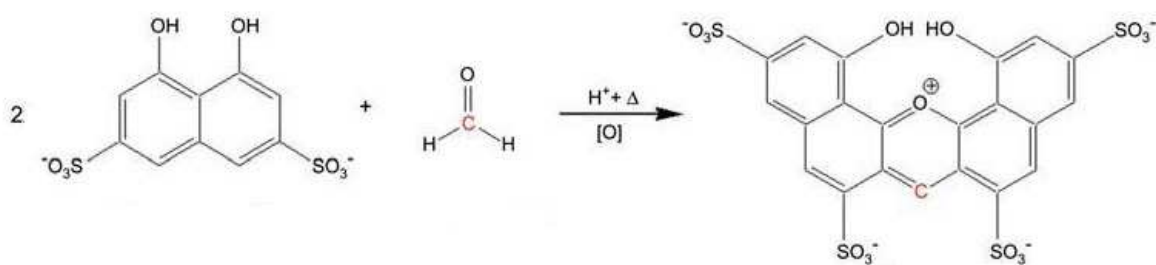
Entre os métodos espectrofotométricos relatados na literatura um dos mais utilizados para quantificação de formaldeído é baseado na reação da espécie analítica com 2,4-pentanediona (acetilacetona), em meio de acetato de amônio levando à formação do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL), com máximo de absorção em 412 nm (Figura 11) [60]. Este método foi desenvolvido por Nash em 1953 baseando-se no mecanismo da reação de Hantzsch. Esta reação possui cinética lenta, e seu equilíbrio é atingido em pouco mais de uma hora em temperatura ambiente [60,61]. Dentre as vantagens da determinação de formaldeído explorando a formação do DDL está a elevada sensibilidade do método, além de desejável seletividade, uma vez que esta reação é específica para formaldeído [62]. A principal desvantagem do procedimento é a cinética lenta da formação do composto mensurável [60,61]. Desta forma, é necessário um controle rigoroso de tempo e temperatura, quando as medidas não são realizadas em seu estado de equilíbrio.

Figura 11: Reação entre o reagente de Nash e o formaldeído formando o 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL). Adaptado: [63].



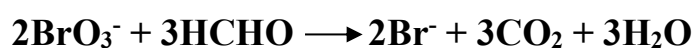
Alternativamente o formaldeído pode ser determinado pela sua reação com o ácido 4,5-diidroxinaftaleno-2,7-dissulfônico (ácido cromotrópico) gerando um produto violeta com máximo de absorção em 580 nm (Figura 12). Esta reação ocorre em meio de ácido sulfúrico concentrado e requer aquecimento em temperaturas superiores à 90 °C. Georghiou and Ho (1989) propuseram o mecanismo da reação e afirmaram que o produto da reação da Figura 12 é o responsável pela cor violeta observada [64]. No entanto, é importante salientar que esta reação apresenta baixa seletividade, além de empregar reagentes relativamente tóxicos e em concentrações elevadas.

Figura 12: Reação entre formaldeído e ácido cromotrópico (ACT) em meio fortemente ácido. Adaptado: [64].



A rodamina B e 6G foram empregados, respectivamente, para determinação espectrofotométrica e fluorimétrica de formaldeído. A utilização da rodamina B proporcionou o desenvolvimento de um método rápido e sensível para determinação de formaldeído. Este método é baseado no efeito catalítico do formaldeído na oxidação da rodamina B em meio de bromato de potássio e ácido sulfúrico, conforme mostrado na Figura 13 [55]. Para a determinação fluorimétrica utilizou-se a Rodamina 6G por ser mais sensível do que a Rodamina B [58]. Porém, ambos métodos apresentam seletividades limitadas.

Figura 13: Reação do formaldeído na oxidação da rodamina B em meio de bromato de potássio e ácido sulfúrico. Adaptado: [55].

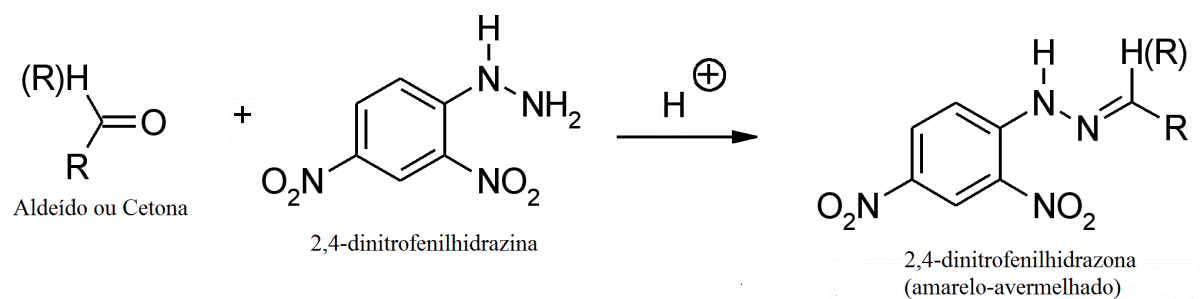


O Cicloexano-1,3-diona é utilizado para formar compostos com fluorescência mais intensa do que a 2,4-pentanodiona (acetilacetona), essa reação também é baseada no mecanismo de reação de Hantzsch. No entanto, esta reação não é seletiva para formaldeído [57].

O formaldeído pode ser determinado por cromatografia líquida após derivatização química com 2,4-dinitrofenilhidrazina em meio ácido. Aldeídos e cetonas reagem com a 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar hidrazonas com coloração amarelo avermelhada que absorvem em um comprimento de onda na faixa de 360 nm, como é apresentado na Figura 14 [65]. Neste caso, o procedimento não é muito seletivo. O formaldeído pode ser também determinado por cromatografia líquida após derivatização química com dimedona (5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona) também baseada no mecanismo de reação de Hantzsch. No entanto, não é seletiva para formaldeído podendo reagir com outros aldeídos [66].

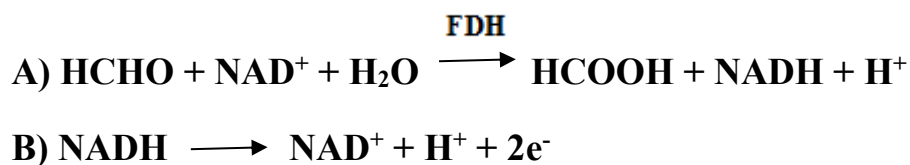
Figura 14: Reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila formando hidrazona.

Adaptado: [67].



Formaldeído também pode ser determinado empregando métodos eletroquímicos, alguns trabalhos apresentados na literatura relatam a determinação de formaldeído por voltametria cíclica [68], amperometria [69] e por biosensores baseados em células ou enzimas [70,71], bem como álcool oxidase (AOX) [60-62] e formaldeído desidrogenase (FDH) [74,75], para quantificação de formaldeído. A quantificação de formaldeído é baseada na oxidação enzimática do formaldeído pelo FDH levando a formação de ácido fórmico, provocando a redução de NAD^+ para NADH. Então o NADH reduzido é oxidado para NAD^+ por meio de uma reação eletroquímica, como mostra a Figura 15.

Figura 15: A) Reação enzimática e B) Reação eletroquímica. Adaptado: [76].



No entanto, a determinação de formaldeído explorando a formação do DDL não é relatada na literatura para detecção eletroquímica.

1.5. Extração de formaldeído em cogumelos

O formaldeído endógeno presente nos cogumelos pode ser formado a partir de vários precursores, dependendo da estratégia de extração pode-se quantificar o formaldeído livre e ligado. Normalmente utiliza-se destilação simples para extrair o formaldeído ligado à cadeias de moléculas grandes utilizando a degradação térmica, por meio de hidrólise ácida e enzimática. O formaldeído extraído durante a hidrólise ácida é provavelmente derivado de compostos metoxi-oxigênio, enxofre e nitrogênio, que são importantes precursores de formaldeído em sistemas biológicos. [77,78]. O ácido lintínico gerador da lentionina (responsável pelo aroma característico deste cogumelo) é outra potencial fonte de formaldeído. [78,79].

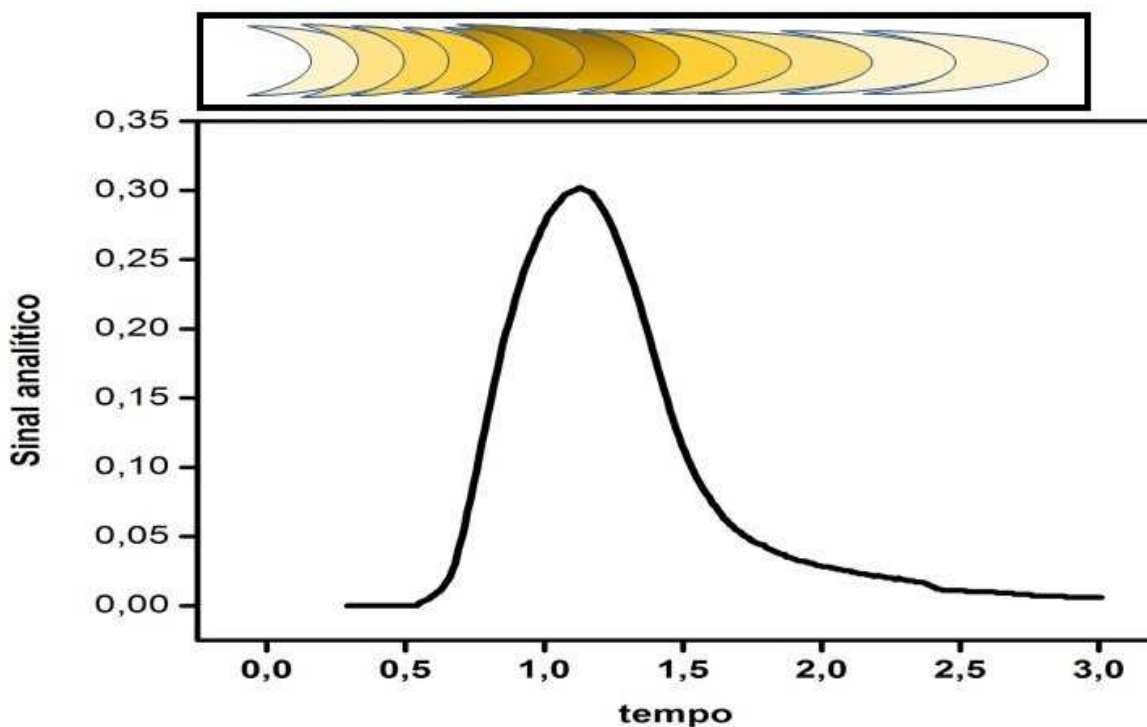
Na literatura são apresentadas diversas alternativas de extração de formaldeído entre elas a imersão em água [54,56,80] , destilação simples [10,55,80] ou sonicação[57–59,80]. Yi Zhu e colaboradores apresentaram um trabalho na literatura avaliando diferentes métodos de extração de formaldeído em carne defumada, com posterior detecção espectrofotométrica empregando acetilacetona [80]. Três métodos de extração do analito foram avaliados, entre eles imersão em água, destilação e sonicação. Melhores resultados de recuperação foram obtidos empregando a destilação simples com uso de ácido fosfórico 10%. O ácido fosfórico (H_3PO_4) é provavelmente utilizado para extrair o formaldeído ligado a grupos proteicos presentes no cogumelo.

1.6. Sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA)

Os sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA) foram propostos por Ruzicka e Hansen em 1975 [81]. Essa técnica foi responsável pela mecanização de processos analíticos e baseia-se na inserção de alíquotas da amostra em solução por uma solução transportadora em

um fluxo contínuo não segmentado, sendo que a zona de amostragem sofre dispersão através do percurso analítico e mistura-se com o reagente e o fluido transportador. A amostra resultante é então conduzida até o detector gerando sinais transientes. A quantificação do analito é geralmente feita utilizando a altura máxima dos picos. Na Figura 16 é mostrado o perfil do sinal transiente geralmente obtido em sistemas FIA e também a ilustração do gradiente de concentração durante o percurso analítico

Figura 16: Perfil do sinal transiente geralmente obtido em sistemas de análises de injeção em fluxo e ilustração do gradiente de concentração na zona de amostragem.



Durante o percurso analítico o analito pode sofrer tratamento em linha com a adição de reagentes, através de colunas contendo reagentes sólidos, para separação ou pré-concentração. Estes sistemas possibilitam o emprego de alguns dispositivos para inserção da amostra como o injetor proporcional, válvulas rotatórias e válvulas ou minibombas solenoide. A versatilidade da injeção em fluxo ficou então estabelecida, devido ao fato de executar essas operações em

linha e não mais em batelada. Dessa forma, notou-se um aumento da associação da análise por injeção em fluxo com diferentes técnicas.

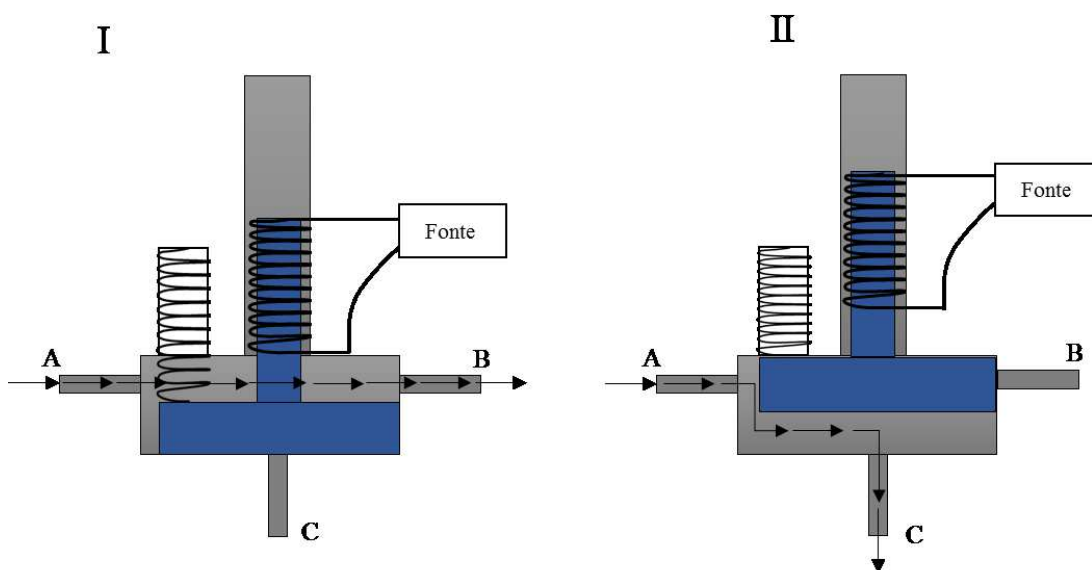
As principais vantagens e características desse sistema são: 1) Economia de reagentes, diminuindo a quantidade de resíduos 2) Menor contato do operador com as amostras, diminuindo assim contaminações 3) Aumento da frequência analítica 4) Análises químicas fora do estado de equilíbrio 5) Associação com diferentes tipos de detectores. Outra característica importante relacionada aos sistemas FIA é a precisão, devido ao controle do tempo de reação.

Em 1994, Reis e colaboradores foram pioneiros no emprego de válvulas solenoide para inserir amostras e reagentes em FIA. Esses dispositivos são controlados independentemente através de um software no computador. O emprego destes dispositivos, como ferramenta para inserção de soluções, deu origem ao processo de multicomutação [82].

Os dispositivos mais utilizados na construção de sistemas de análises em fluxo com multicomutação são as válvulas solenoide, o que permite a comutação das soluções em tempos otimizados pré-estabelecidos. Esse tipo de dispositivo necessita de um sistema de propulsão, como por exemplo: bomba peristáltica ou seringas ou até mesmo ação da força da gravidade.

O mecanismo de funcionamento de válvula solenoide é mostrado da Figura 17. No modo desativado, uma mola mantém o êmbolo interno na posição inferior, a solução movimenta-se entre A e B. No modo ativado, o êmbolo é atraído para cima e a mola é contraída, a solução movimenta-se entre A e C e a saída B é fechada. A escolha do posicionamento das soluções entre A, B e C é de acordo com a necessidade do sistema a ser construído.

Figura 17: Funcionamento de uma válvula solenoide. I desativada e II ativada. A, B ou C posições para inserção ou saída de solução.



O uso da multicomutação possibilitou a automação de sistemas de análises em fluxo, garantindo maior flexibilidade, facilidade e versatilidade na manipulação de amostras. É possível controlar a inserção de soluções no percurso analítico de maneira intercalada (amostragem binária), esse tipo de amostragem melhora a homogeneização do analito com o reagente na zona de amostragem.

1.7. Técnicas Eletroanalíticas

As técnicas eletroquímicas vêm sendo cada vez mais utilizadas em diversas áreas do conhecimento por ser possível obter informações fundamentais sobre as propriedades intrínsecas das substâncias. As aplicações mais comuns dessas técnicas são: estudos de processos de redução e oxidação em diversos meios, mecanismos de transferência de elétrons e prótons e estudos de adsorção em superfícies [83].

É de extrema valia entender como ocorre o transporte de massa do seio da solução para o eletrodo. Sendo que esse transporte pode ocorrer de três maneiras: migração, difusão e

convecção. A migração ocorre quando existe movimentação de espécies iônicas no meio por causa da ação de um campo elétrico, a difusão ocorre quando há uma diferença de concentração da espécie no seio da solução e na região próxima ao eletrodo e a convecção ocorre quando há movimentação de espécies neutras ou iônicas por causa da agitação mecânica da solução ou em função do gradiente de temperatura (normalmente não gera influência).

As técnicas eletroanalíticas são relativamente simples e de baixo custo, dessa forma surgem como uma alternativa para determinação de analitos variados. Com o avanço da instrumentação analítica aumentou-se o uso de técnicas de detecção eletroquímicas, tais como: voltametria cíclica, de onda quadrada, pulso diferencial e a amperometria. Algumas dessas técnicas são capazes de quantificar analitos com sensibilidade comparável as técnicas cromatográficas de separação com detecção espectrofotométrica [84].

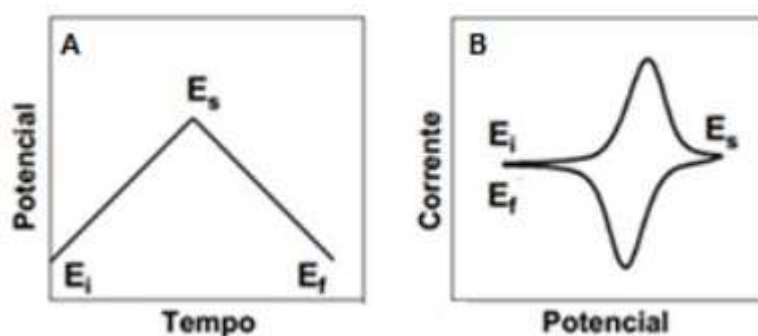
1.7.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é utilizada para análise quantitativa ou qualitativa de qualquer espécie química eletroativa, ou seja, que possa ser reduzida ou oxidada eletroquimicamente. Essa técnica permite o estudo de processos de oxidação e redução em diversos eletrólitos, bem como processos de adsorção em materiais diversos.

Para entendimento dos processos que ocorrem no eletrodo, a varredura de potencial é provavelmente a perturbação mais utilizada e consiste na aplicação de um potencial variável no eletrodo de trabalho durante um período de tempo. As técnicas de varredura de potencial são mais utilizadas com eletrodos estacionários mas podem ser também utilizadas em condições hidrodinâmicas. São muito utilizadas para compreender mecanismos de reações eletroquímicas e para identificar espécies contidas na solução e também para análises de velocidade de reação [85].

É uma técnica bastante utilizada quando se inicia o estudo de um sistema desconhecido. A partir do tratamento de dados e construção do voltamograma, é possível obter informações sobre a eletroatividade do analito, fazer estudos de produtos formados na reação, saber em qual potencial ocorre os processos de transferência de elétrons, fazer estudo da reversibilidade de reações redox e detecção de intermediários da reação. O voltamograma é construído a partir do perfil da corrente elétrica em função do potencial do registro da corrente elétrica associado a variação de potencial, como é mostrado da Figura 18 [84,86,87].

Figura 18: (A) Varredura de potencial vs. tempo (B) Voltamograma da corrente obtida em função do potencial. Ei: potencial inicial Es: potencial de inversão Ef: potencial final. Fonte: [84].



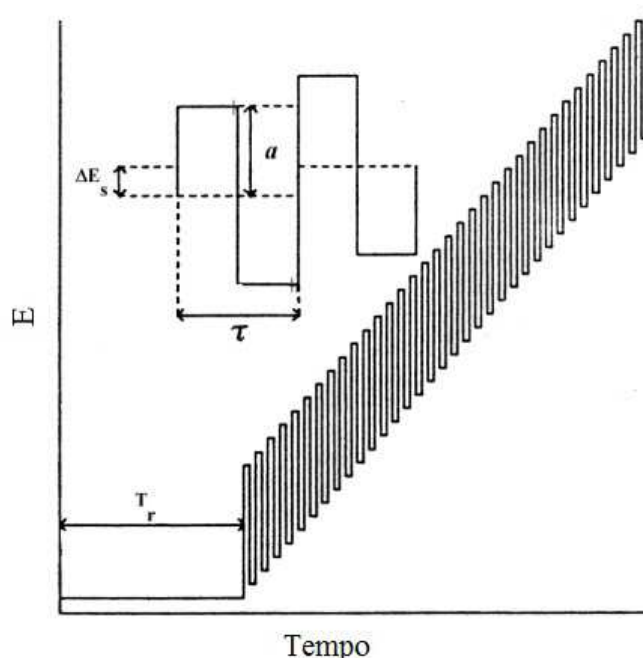
A voltametria cíclica não é comumente utilizada para fins quantitativos. Geralmente utiliza-se a voltametria de onda quadrada para obter maiores sensibilidades.

1.7.2. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês square wave voltammetry) é uma técnica de pulso que tem como vantagem a grande velocidade e alta sensibilidade, tornando-se possível a obtenção de um voltamograma completo em poucos segundos. Os limites de detecção desta técnica podem ser comparados com os das técnicas espectroscópicas. [88]

Osteryoung, Turner e Christie, no final da década de 1970, desenvolveram o modelo atual da voltametria de onda quadrada que realiza medidas de corrente com velocidade de varredura superior a 100 mV s^{-1} . Além disso, a corrente é amostrada duas vezes, uma no fim do pulso direto e outra no fim do pulso reverso, ocorrendo uma diminuição da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total lida. Com esta abordagem foi possível melhorar a sensibilidade da técnica, ampliando seu campo de aplicação [89–91].

Figura 19: Forma da aplicação da curva corrente potencial na voltametria de onda quadrada Adaptado: [90].



Na voltametria de onda quadrada a forma da curva corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de amplitude (a), que variam de acordo com a escada de potencial de altura ΔE_s (incremento de potencial) e duração de τ (período), como mostra a Figura 19. A frequência (f) da onda quadrada em Hz é $1/\tau$. [91]

Capítulo 2: Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação de formaldeído em cogumelos (shiitake e shimeji)

2.2. Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho

- (i): Construção de sistema de análises em fluxo com multicomutação empregando válvulas solenoide para a determinação espectrofotométrica de formaldeído em cogumelos.
- (ii) Avaliação da extração de formaldeído em amostras de shiitake e shimeji.
- (iii) Desenvolvimento de um procedimento eletroquímico empregando voltametria de onda quadrada para determinação de formaldeído em cogumelos (shiitake e shimeji).
- (iv) Comparação dos dois procedimentos analíticos propostos para determinação de formaldeído em amostras de cogumelo (shiitake fresco e desidratado e shimeji fresco).

Capítulo 3: Procedimiento Experimental

3. Procedimento Experimental

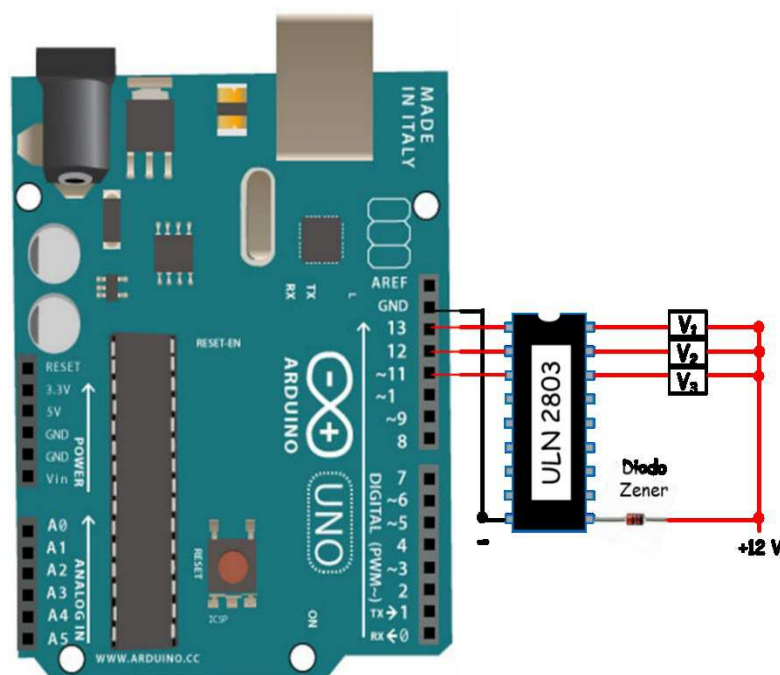
3.1. Equipamentos e acessórios

3.1.1. Sistemas de análises em fluxo com multicomutação com detecção espectrofotométrica

Uma plataforma de hardware livre (Figura 20) e de placa única (Arduíno®), conectada à porta USB 2.0 de um microcomputador (processador Celeron 2.4 Ghz, 256 Mb de memória RAM) foi utilizada para o controle dos dispositivos. Um circuito integrado ULN2803 (Figura 20) foi utilizado para a compatibilização da diferença de potencial (12V) que é a corrente necessária para o acionamento das válvulas solenoide, utilizando-se um diodo regulador de tensão (Diodo Zener). As variáveis para a rotina da análise desenvolvida em linguagem C++ (com algumas modificações) no software fornecido pelo fabricante da plataforma. O sistema de análises por injeção em fluxo com multicomutação foi desenvolvido empregando quatro válvulas solenoide de três vias (NResearch, West Caldwell, Nova Jérsei, Estado Unidos), tubos de polietileno (Ismatec, Alemanha, 1,0 milímetros), confluência de acrílico e uma bobina de reação de 200 cm (Ismatec, Alemanha, 1,0 milímetros). Uma bomba peristáltica Minipuls TM 3 (Gilson, Villiers Le Bel, França) de oito canais e tubos Tygon® foram usados para a propulsão das soluções através do sistema. Para a aquisição dos dados foi utilizado um software fornecido pelo fabricante do espectrofotômetro conectado pela porta RS232C.

Medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Femto 600S (São Paulo, Brasil) equipado com uma célula de fluxo (Hellma) volume interno de 80 μ L e 10 mm de percurso analítico.

Figura 20: Esquema do arranjo eletrônico para a ativação das válvulas solenoide.



O esquema do módulo de análises em fluxo para determinação de formaldeído em cogumelos (shiitake e shimeji) é apresentado na Figura 21 e a rotina de acionamento das válvulas solenoide é apresentada na Tabela 2. O sistema foi construído empregando 4 válvulas solenoide e a propulsão dos fluídos foi conduzida por uma bomba peristáltica posicionada antes das válvulas, a vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$. A rotina para a determinação de formaldeído em cogumelos, apresentada na Tabela 2 inicia-se com a inserção de uma alíquota de amostra no percurso analítico, seguida por uma alíquota do reagente (reagente de Nash), completando o ciclo de amostragem. A zona de amostra gerada por 7 ciclos ficou retida no reator A pela implementação de uma etapa de parada de fluxo por 60 s. Durante esta etapa, todas as válvulas do sistema ficaram recirculando as soluções. Como a formação do produto medido apresenta cinética lenta, o reator foi submetido ao aquecimento constante em banho termostatzado por 50°C . Por fim, a solução carregadora foi inserida no sistema pelo acionamento da válvula V_3 , conduzindo a zona de amostra gerada ao sistema de detecção

espectrofotométrico. A V₄ foi acionada somente quando foi necessária a substituição de amostras e reagentes. Em todos os casos, as medidas foram realizadas em triplicatas.

Figura 21: Sistema de análises em fluxo com multicomutação para determinação de formaldeído: V₁ – V₄ – válvulas solenoide, Bp – Bomba peristáltica, A: bobina de reação B: ponto de confluência, D: Detector e W: descarte.

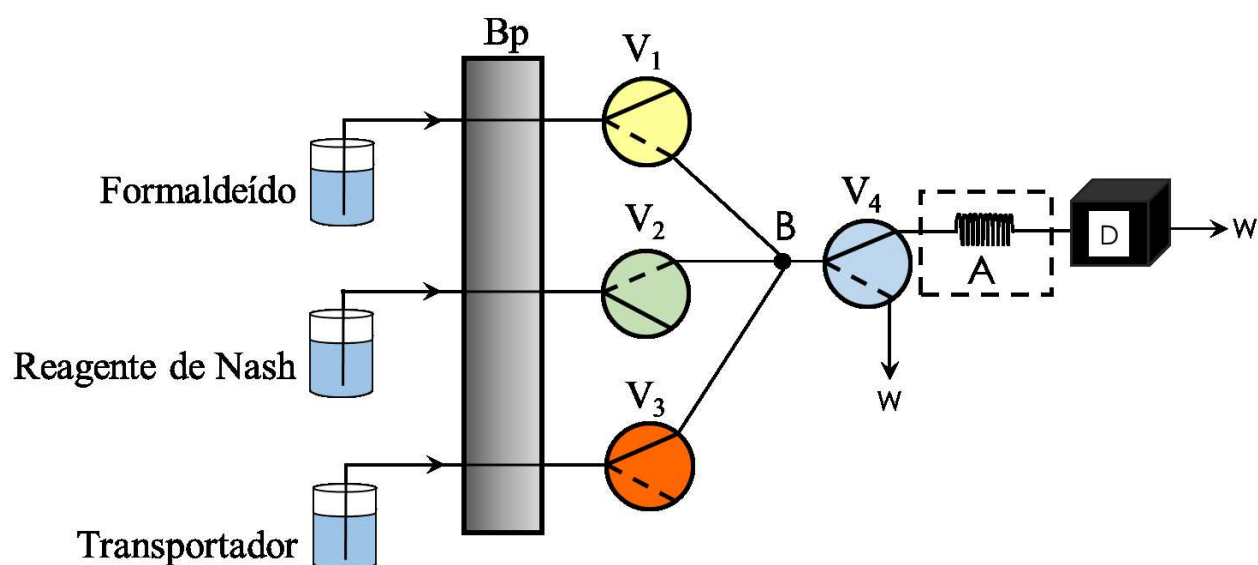


Tabela 2: Etapas de operação do sistema em linha para determinação de formaldeído pelo método da acetilacetona com detecção espectrofotométrica.

Etapa	Descrição	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	Tempo (s)
1	Introdução da amostra*	1	0	0	0	4,0
2	Introdução do reagente*	0	1	0	0	1,4
3	Retenção da zona de amostra	0	0	0	0	60
4	Transporte, medida do sinal e limpeza	0	0	1	0	110
5	Substituição de amostra	1	0	0	1	10

*7 ciclos de amostragem

3.1.2. Sistema de detecção voltamétrica

3.1.2.1. Eletrodos

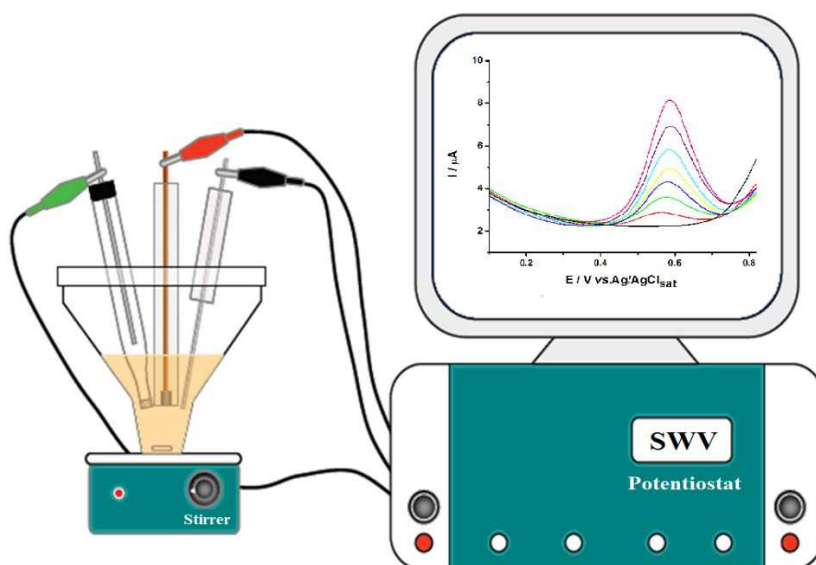
Medidas voltamétricas foram conduzidas empregando um eletrodo de carbono vítreo com diâmetro de 1,5 mm (BASi, West Lafayette, EUA). Antes da realização das medidas, voltamogramas cíclicos em eletrólito suporte (acetato de amônio) foram registrados para o condicionamento e descontaminação do eletrodo. Após as análises, a limpeza do eletrodo foi feita manualmente, com a utilização de alumina e então enxaguado com água deionizada e posteriormente seco com pano de algodão.

O eletrodo de referência (RE) foi obtido pela eletrodeposição de cloreto de prata (AgCl) sobre um fio de prata (Ag) de aproximadamente 30,0 mm x 1,0 mm de diâmetro por meio da oxidação, em 0,3 V versus Ag/AgCl, do fio de prata em meio de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹ durante uma hora. Depois da eletrodeposição, o fio de Ag/AgCl foi inserido em uma ponteira de micropipeta de 100 µL. A extremidade menor desta ponteira foi obstruída com uma junção porosa e então preenchida com uma solução saturada de KCl e AgCl, construindo então um mini referência. O eletrodo auxiliar consistiu de um fio de platina (3 cm) inserido em uma ponteira de micropipeta de 100 µL.

3.1.2.2. Instrumentação

As medidas eletroquímicas do 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL) foram feitas utilizando um potenciostato (Vertex, Ivium, Holanda) e o software IviumSoft 2.5 para aquisição e tratamento de dados. Foi utilizado um béquer de 10 mL como célula eletroquímica e três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar mencionados na seção anterior). Um esquema do sistema eletroquímico empregado para a determinação de formaldeído é apresentado na Figura 22).

Figura 22: Esquema do sistema eletroquímico contendo potenciostato, célula eletroquímica e três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) para medidas da oxidação do DDL utilizando voltametria de onda quadrada.



3.2. Reagentes e soluções

Todas soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água deionizada (18,2 MΩ cm, Gehaka, São Paulo, Brasil). Formaldeído 37 % (m/V) e Acetilacetona 99% (m/V) obtidos da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha), Acetato de amônio obtido da Panreac (Barcelona, Espanha), Iodato de potássio da Mallinckrodt (St. Louis Missouri, Estados Unidos), Ácido orto fosfórico P.A, Ácido sulfúrico P.A e Iodeto de potássio obtidos da Vetec (Rio de Janeiro Brasil), Tiosulfato de sódio pentahidratado e Amido obtidos da LabSynth (Diadema Brasil), Ácido acético glacial P.A (HAc) obtido da Proquimios (Rio de Janeiro Brasil) e Iodo micropérolas obtido da Dinâmica (São Paulo Brasil).

3.3. Padronização da solução de formaldeído

Para a padronização da solução de formaldeído, cerca de 2,5 g (2,8 mL) de solução concentrada de formaldeído (37%) foi diluída com água deionizada em um balão volumétrico de 1000 mL. Esta solução foi padronizada com solução padrão de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) em concentração de aproximadamente $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, previamente padronizada com iodato de potássio (KIO_3). A padronização foi realizada adicionando-se iodeto de potássio (KI) em meio ácido e utilizou-se a solução de amido como indicador do ponto final da titulação. Para o cálculo da concentração de formaldeído foi necessário a titulação de um branco, ou seja, titulou-se nas mesmas condições uma solução que não continha formaldeído. Todas as medidas foram realizadas em triplicata para padronização da solução de formaldeído. Esta solução de formaldeído padronizada pode ser estocada por 6 meses [92].

3.4. Preparo do reagente de Nash

O reagente de Nash foi preparado de duas formas diferentes, sendo que para o procedimento eletroquímico utilizou-se o reagente conforme encontrado na literatura [60]. No entanto, para o procedimento com multicomutação as concentrações de acetilacetona, acetato de amônio e o pH foram otimizadas.

Para a determinação eletroquímica preparou-se o reagente de Nash da seguinte maneira diluiu-se aproximadamente 7,5 g de acetato de amônio em 40 mL de água deionizada e adicionou-se 50 μL de acetilacetona e ajustou-se pH para 5,5 com ácido acético glacial P.A., completou-se então o volume final para um balão volumétrico de 50 mL com água deionizada.

Para a determinação com sistema em fluxo multicomutado preparou-se o reagente de Nash da seguinte maneira diluiu-se aproximadamente 5,4 g de acetato de amônio em 40 mL de água deionizada logo após adicionou-se 2,0 mL de acetilacetona e ajustou-se o pH para 5,5

com ácido acético glacial P.A., completou-se então o volume final para um balão volumétrico de 50 mL com água deionizada.

3.5. Extração do formaldeído em amostras de cogumelo

Todas as amostras de cogumelos (shiitake fresco e desidratado e shimeji fresco) foram compradas em mercado local. As amostras foram trituradas em um liquidificador, e então embaladas e mantidas entre 2 e 4 ° C até análise. Para o shiitake fresco ou shimeji, 0,5 g de amostra foi transferido para um balão de destilação e adicionado solução contendo 3 mL de H_3PO_4 10% e 22 mL de água, totalizando 25 mL de solução extratora. Para o shiitake desidratado, 0,1 g de amostra foi transferido para um balão de destilação e adicionado solução contendo 3 mL de H_3PO_4 10 % e 57 mL de água, totalizando 60 mL de solução extratora. A extração de formaldeído a partir da amostra de cogumelos foi baseada trabalho encontrado na literatura de Yi Zhu et al [80]. As destilações simples foram realizadas até que não houvesse mais líquido no balão de destilação, para garantir a extração de todo formaldeído da amostra.

Capítulo 4: Resultados e Discussões

4. Resultados e Discussões

O desenvolvimento deste trabalho foi realizado em duas partes, ambas explorando determinação indireta de formaldeído a partir da formação do composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL). Inicialmente, foi proposto a determinação de formaldeído por espectrofotometria empregando sistemas de análise em fluxo com multicomutação. Em uma segunda etapa, foi proposta a determinação de formaldeído por determinação eletroquímica empregando voltametria de onda quadrada. Para melhor discussão, os resultados obtidos foram separados em duas partes. No final desta seção uma comparação entre os dois procedimentos desenvolvidos será apresentada.

4.1. Desenvolvimento de procedimento analítico empregando sistemas de análise em fluxo com multicomutação para a determinação espectrofotométrica de formaldeído

Para o desenvolvimento do procedimento empregando sistemas de análises em fluxo com multicomutação e determinação espectrofotométrica, diversos parâmetros foram avaliados e otimizados visando obter-se uma condição de compromisso entre sensibilidade, consumo de reagentes e frequência de amostragem. Todas as medidas foram realizadas monitorando o comprimento de onda de máxima absorção do DDL, em 412 nm [93] e medidas baseadas na altura do pico do sinal transiente.

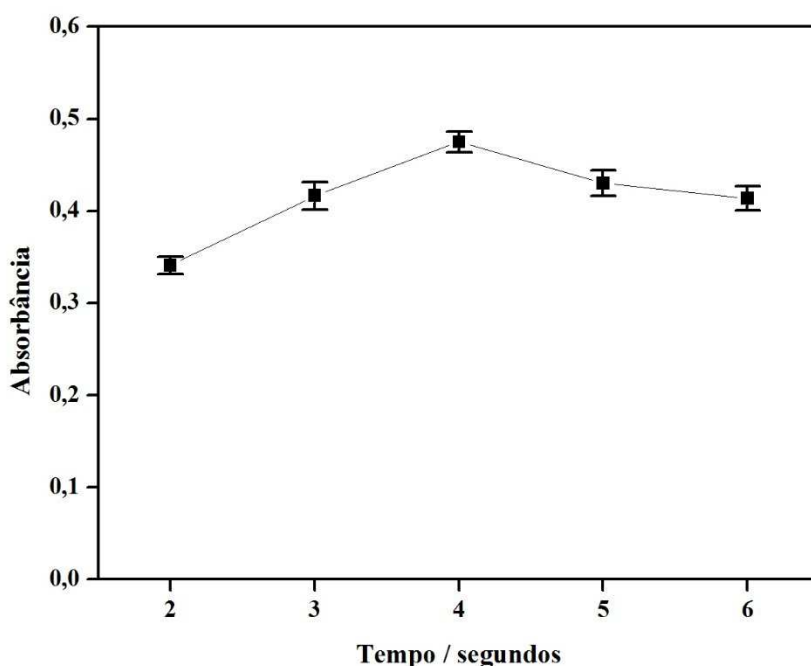
Considerando a cinética da reação para a formação do DDL, que requer mais de uma hora para atingir o estado de equilíbrio [60,61], o emprego de sistemas de análise em fluxo com multicomutação se torna uma alternativa ideal para melhorar a precisão do método. E, alternativamente diminuir o consumo de reagentes e de resíduos gerados, sendo possível fazer medidas sem que o estado de equilíbrio seja alcançado. Para o desenvolvimento deste procedimento, os seguintes parâmetros foram otimizados: volume de amostra e reagente,

número de ciclos de amostragem binária, tempo de parada de fluxo, temperatura do banho termostático, concentrações de reagentes e pH de preparo do reagente.

4.1.1. Estudo do tempo de acionamento da válvula do analito

Os volumes das soluções inseridas no percurso analítico afetam a sensibilidade do procedimento analítico. Portanto, é importante otimizar o tempo de acionamento de cada válvula solenoide considerando o compromisso entre sinal analítico e consumo de reagentes. Neste estudo, o tempo de acionamento da válvula da amostra, uma solução de 5 mg L⁻¹ de formaldeído foi empregada e o tempo de acionamento foi alterado. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 23, pode-se observar que o sinal analítico aumentou até 4,0 s. Após esse tempo, o sinal analítico diminuiu, devido a diluição da zona de amostra e consequente diminuição do sinal analítico. Desta forma, para estudos posteriores, o tempo de acionamento da válvula para inserção de amostra foi fixado em 4,0 segundos. Nestas condições a quantidade de formaldeído foi igual a $1,32 \times 10^{-7}$ mols, e a quantidade de acetilacetona igual a $4,64 \times 10^{-6}$ mols.

Figura 23: Efeito do tempo de acionamento da válvula 1 contendo o analito. Concentração de formaldeído igual a 5 mg L^{-1} , tempo de acionamento da válvula do reagente 1,2 s (acetilacetona $0,0195 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetato de amônio $1,95 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5), 7 de ciclos de amostragem, temperatura do banho termostático 50°C , tempo de parada de fluxo de 150 s, vazão da bomba peristáltica $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, tamanho da bobina de reação de 200 cm e $\lambda = 412 \text{ nm}$.

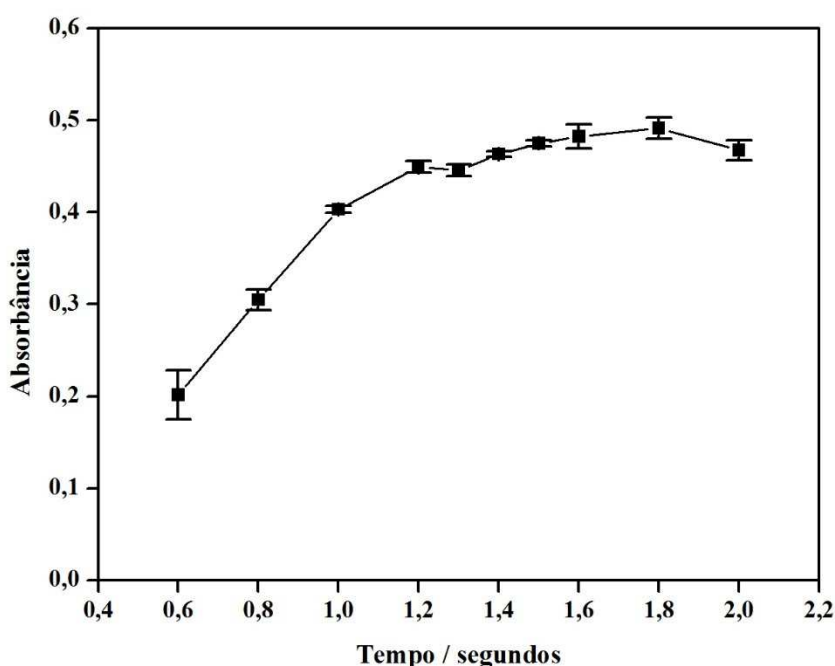


4.1.2. Estudo do tempo de acionamento da válvula do reagente de Nash

O efeito do tempo de acionamento da válvula da reagente de Nash foi otimizado no intervalo de 0,6 a 2,0 s, fixando 4,0 s o tempo de em que a válvula da amostra contendo 5 mg L^{-1} de formaldeído foi acionada. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 24. Pode-se concluir que em tempos superiores a 1,4 s o sinal analítico obtido é máximo e não há diferenças significativas no sinal analítico obtido para tempos superiores de acionamento da válvula do reagente. Nesta condição, a quantidade de reagente no meio já é satisfatória para reagir com o formaldeído, portanto o tempo selecionado foi 1,4 segundos para evitar consumo desnecessário de reagente e diluição da zona de amostra. Quando 1,4 s de acionamento da

válvula do reagente é empregada, cerca de $5,41 \times 10^{-6}$ mols de acetilacetona é inserido no sistema.

Figura 24: Efeito do tempo de acionamento da válvula 2 contendo o reagente. Demais parâmetros iguais ao da Figura 23, alterando somente o parâmetro otimizado anteriormente 4,0 segundos (tempo de acionamento da válvula 1).

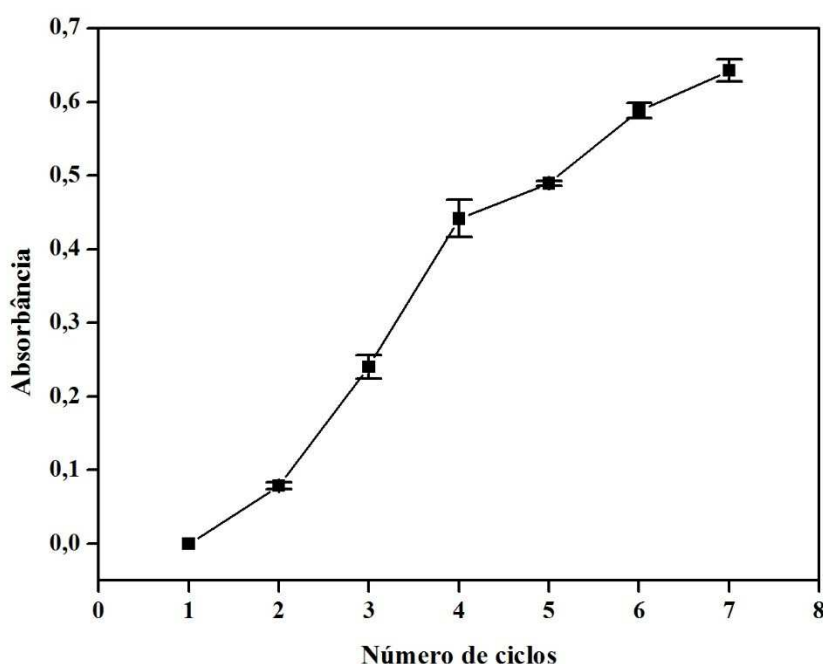


4.1.3. Número de ciclos de amostragem binária

Neste estudo o número de ciclos de amostragem foi otimizado no intervalo de 1 a 7 ciclos, mantendo fixo as condições otimizadas anteriormente. O número de ciclos de amostragem foi otimizado visando obter-se maior sensibilidade na determinação de formaldeído. Mantendo fixo o comprimento do reator, o efeito do aumento do número de ciclos resultada em menor dispersão da zona de amostra gerada, e consequentemente, aumento do sinal analítico. Além disso, quando reações que apresentam cinética lenta estão envolvidas na formação de um produto que será monitorado, o aumento do número de ciclos de amostragem

também promove aumento de sensibilidade. Uma vez que em sistemas de análise em fluxo com multicomutação e amostragem binária, a reação se inicia já quando o primeiro ciclo é formado, aumentando assim o tempo de residência da zona de amostra e a taxa de formação do produto formado [94]. Considerando estes aspectos, o número de ciclos de amostragem foi variado de 1 – 7. Valores maiores foram evitados pois acima de 7 ciclos o volume da zona de amostra gerado ultrapassou o volume total da bobina (1,57 mL) e parte desta zona de amostra foi gerada no interior da cela de medida. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25.

Figura 25: Efeito do número de ciclos de amostragem. Demais parâmetros iguais ao da Figura 24. Alterando somente o parâmetro otimizado anteriormente 1,4 segundos (tempo de acionamento da válvula 2).



Observa-se que a medida que se aumenta o número de amostragem binária aumenta o sinal analítico. Melhores resultados foram obtidos quando 7 ciclos de amostragem foram

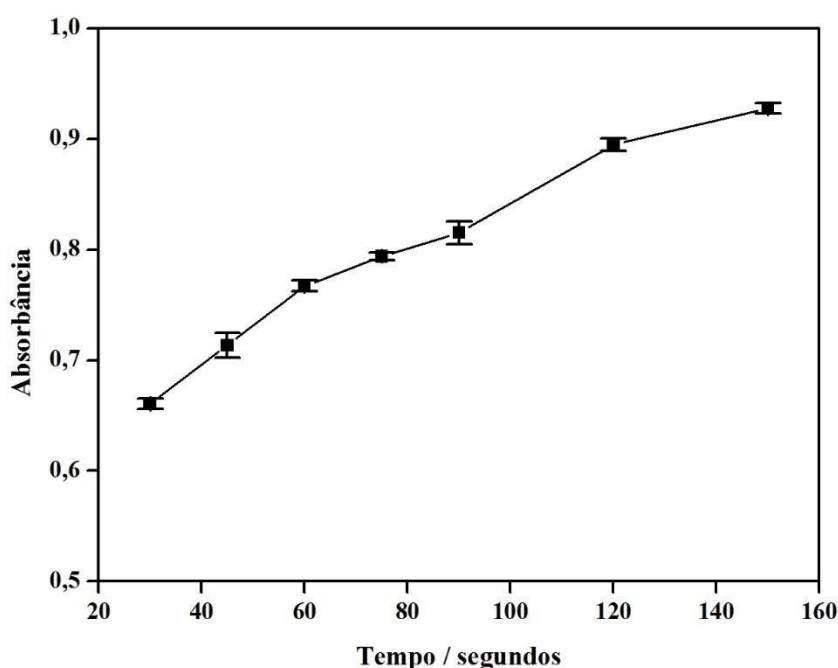
empregados, nestas condições, as medidas foram realizadas próximo à situação de volume infinito. O volume da zona de amostragem foi igual à 1,07 mL.

4.1.4. Tempo de parada de fluxo

Neste estudo o tempo de parada de fluxo foi otimizado no intervalo de 30 a 150 s, matendo fixo os demais parâmetros otimizados.

Pelo fato da reação entre o formaldeído e o reagente de Nash possuir cinética lenta foi necessário implementar uma etapa de parada de fluxo visando o aumento de sensibilidade. O tempo de parada de fluxo foi avaliado em até 150 s, interrompendo o fluxo das soluções no percurso analítico, confinando a zona de amostra gerada no reator. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 26.

Figura 26: Efeito do tempo da parada de fluxo. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 25.



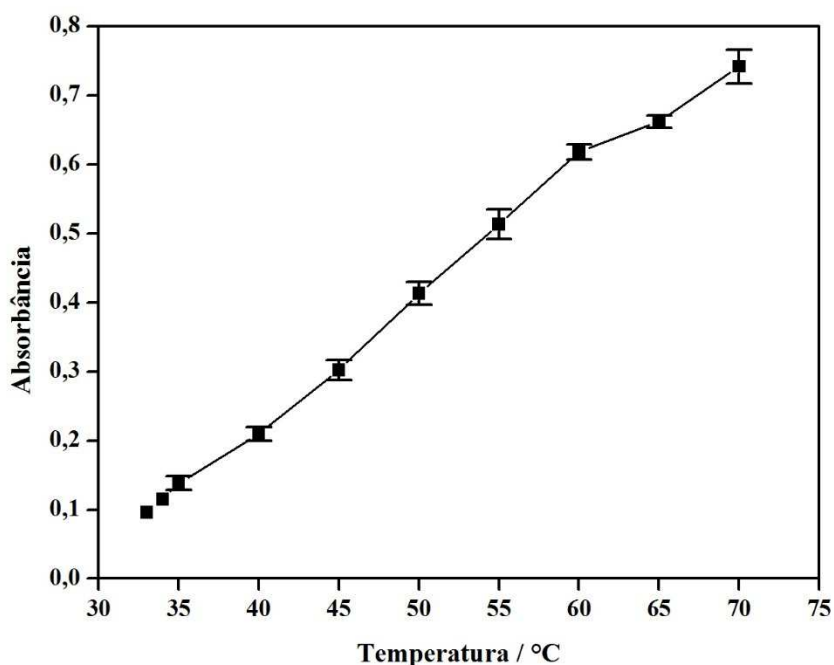
Observa-se que a medida que o tempo aumenta há também um aumento de sinal. Isso era o efeito esperado por ser uma reação de cinética lenta, ou seja, quanto maior o tempo de parada de fluxo maior será o desenvolvimento da reação, até que se o estado de equilíbrio seja atingido. Considerando os resultados obtidos, em que é preciso encontrar uma relação de compromisso entre sensibilidade e frequência analítica, o tempo de parada de fluxo de 60 s foi fixado para estudos posteriores.

4.1.5. Temperatura de aquecimento

Neste estudo a temperatura de aquecimento foi avaliada nas demais condições otimizadas, no intervalo de 33 a 70 °C. No estudo anterior, no qual foi avaliado o tempo de parada de fluxo, em todo intervalo de tempo avaliado o sinal continuou aumentando, indicando que a reação não atingiu seu estado de equilíbrio. Uma maneira de aumentar a sensibilidade pelo deslocamento do equilíbrio favoravelmente à formação do produto é inserir uma etapa de aquecimento. Neste caso, uma etapa de aquecimento foi implementada inserindo a bobina de reação em um banho de aquecimento controlado. Durante a etapa de parada de fluxo ocorre a transferência de calor por indução do banho termostático para a zona de amostra gerada na bobina de reação.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 27. Pode-se observar que a medida que a temperatura do banho é aumentada há também aumento de sinal. Quanto maior a temperatura maior será a taxa de formação do produto. Porém, em temperaturas superiores à 50 °C, foi observado a formação de bolhas no sistema, que impossibilitam as medidas espectrofotométricas. Desta forma, a temperatura foi fixada em 50 °C.

Figura 27: Efeito da temperatura do banho termostático. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 25, alterando somente o parâmetro otimizado anteriormente 60 segundos (tempo de parada de fluxo).

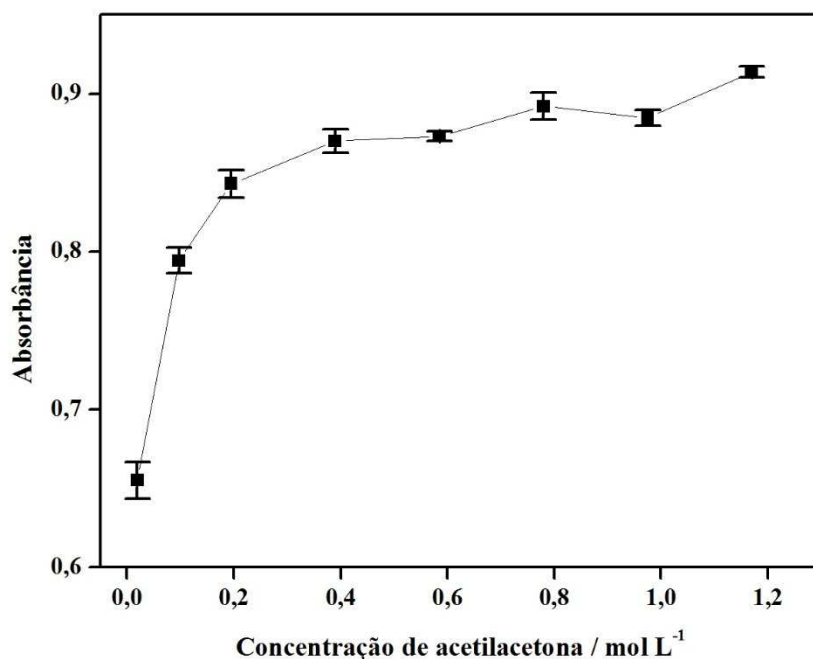


4.1.6. Concentrações de acetato de amônio, acetilacetona e valor do pH no reagente de Nash

Após a otimização dos parâmetros físicos do sistema de análises em fluxo proposto para a determinação espectrofotométrica de formaldeído, diversos parâmetros químicos foram avaliados, tais como concentrações de reagentes e pH do meio. Devido a cinética lenta da reação de formação do DDL, o estudo da concentração de acetilacetona e acetato de amônio é muito importante para possível deslocamento de equilíbrio no sentido de formação do DDL. O pH do reagente de Nash também é outro parâmetro importante a ser avaliado, para escolha do pH ótimo deste sistema em fluxo com multicomutação. A concentração de acetilacetona foi avaliada no intervalo de 0,05 a 1,2 mol L⁻¹, mantendo constante a concentração de acetato de

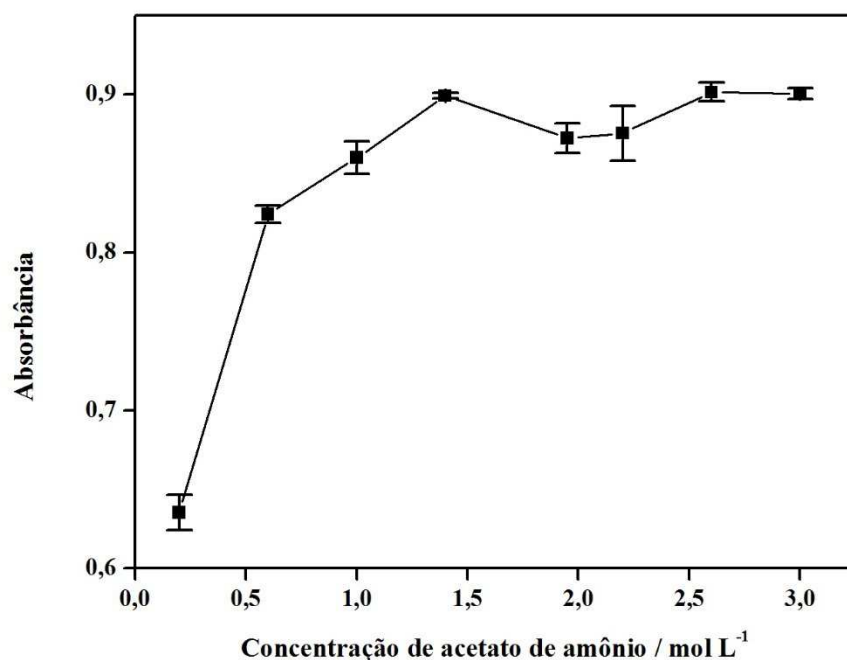
amônio $1,9 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,5 (Figura 27). Em todos os casos, os sinais apresentados representam os valores de absorvância total sem o desconto dos valores de branco.

Figura 28: Efeito da concentração de acetilacetona no reagente de Nash. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 27.



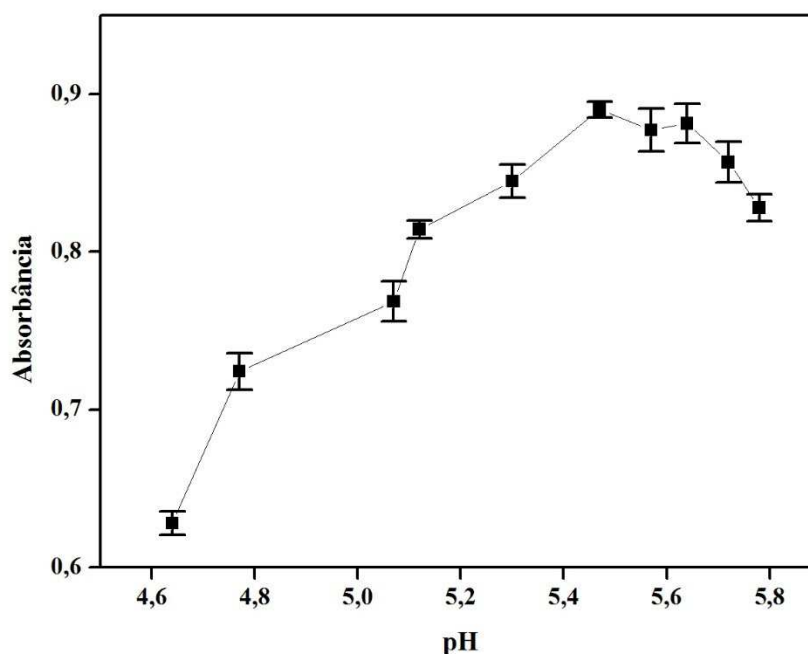
Foi observado um aumento do sinal analítico com o aumento da concentração de acetilacetona no meio, o que era esperado pelo deslocamento de equilíbrio no sentido de formação do DDL. Preocupando-se com a sensibilidade, sinal analítico e menor quantidade de resíduos gerados, foi fixado a concentração de acetilacetona de $0,39 \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de acetato de amônio foi avaliada no intervalo de 0,2 a $3,0 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo constante a concentração de acetilacetona $0,39 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,5 (Figura 29)

Figura 29: Efeito da concentração de acetato de amônio no reagente de Nash. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 28, alterando somente a concentração de acetilacetona presente no reagente de Nash para $0,39 \text{ mol L}^{-1}$.



Como a amônia participa do mecanismo da reação de Hantzsch observa-se aumento do sinal analítico conforme aumento da concentração de acetato de amônio no meio até a concentração de $1,4 \text{ mol L}^{-1}$. O aumento da concentração de amônia não altera a formação de DDL pois provavelmente a concentração máxima de amônia que participa da reação já foi atingida na concentração de $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de amônio. Preocupando-se com a sensibilidade, sinal analítico e menor quantidade de resíduos gerados foi fixado a concentração de acetato de amônio de $1,4 \text{ mol L}^{-1}$. O pH do reagente de Nash foi avaliado no intervalo de 4,7 a 5,8, mantendo constante as concentrações de acetilacetona $0,39 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de amônio $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 30).

Figura 30: Efeito do pH no reagente de Nash. Parâmetros empregados iguais ao da Figura 29, alterando somente a concentração de acetato de amônio $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ presente no reagente de Nash.

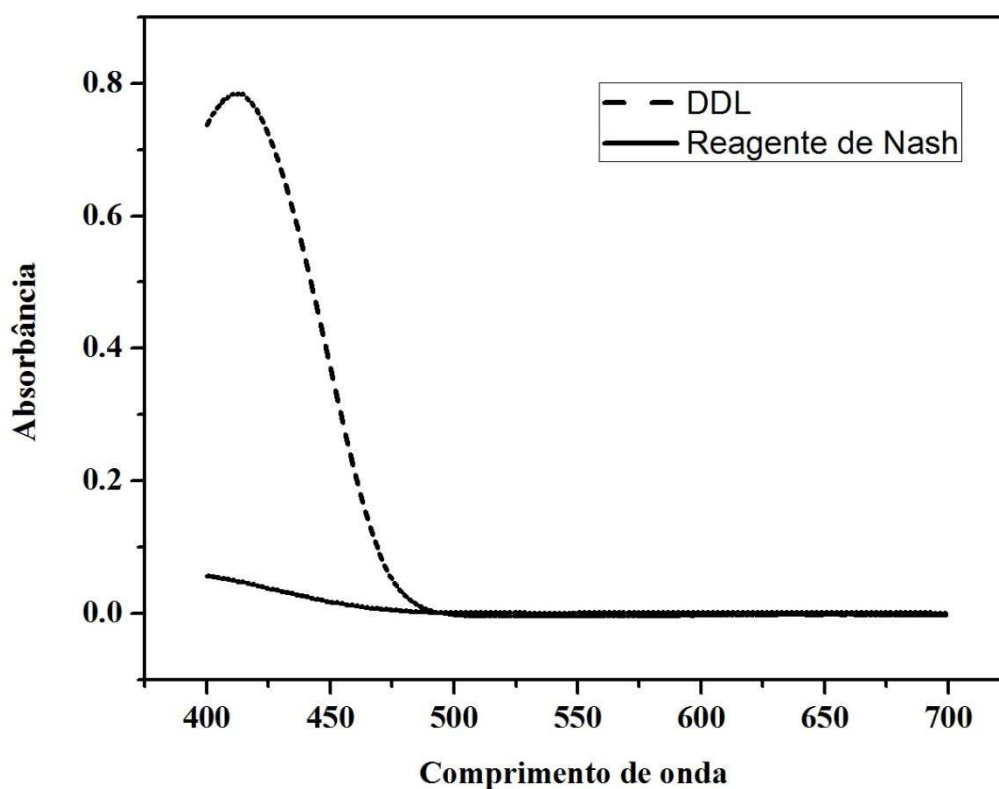


O melhor sinal analítico encontrado foi em pH 5,5, conforme encontrado na literatura pH entre 5,5 e 6,5 [60,95,96]. Isso pode ser explicado devido a protonação da amônia em pH menores que 5,5, o que diminuiria a quantidade de amônia livre para que a reação ocorra. Já em pH maiores do que 6,5 a quantidade de OH^- no meio pode competir com a amônia, influenciando na reação. Em relação ao procedimento padrão encontrado na literatura [60,97] para o reagente Nash pode-se afirmar que: 1) A massa de acetilacetona foi aumentada em 3,5 vezes (3,2 mg para 10,9 mg), para deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do DDL. 2) A massa de acetato de amônio foi diminuída em 8 vezes (234mg para 30 mg) 3) O pH foi semelhante.

Na literatura são encontrados trabalhos que apresentam diferentes comprimentos de onda máximo para absorção do DDL, como por exemplo 412 nm [60] e 415 nm [61]. Para

confirmação que o comprimento de onda máximo de 412 nm é o ideal a ser utilizado, obteve-se o espectro de absorção do reagente de Nash e do DDL entre os comprimentos de onda 400 a 700 nm, conforme Figura 31.

Figura 31: Espectro de absorção do DDL e reagente de Nash. Utilizou-se 4,3 mL de formaldeído (4 mg L^{-1}) e 1,5 mL de reagente de Nash (acetilacetona $0,39 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetato de amônio $1,4 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5) levando a formação do DDL. Tempo de reação: 10 minutos à 80°C .



Observa-se que o reagente de Nash apresenta absorção na mesma faixa de comprimento de onda do DDL. Portanto, para escolha do comprimento de onda ótimo foi descontado o valor do sinal analítico do reagente de Nash (branco) das medidas do DDL. Desta forma, o comprimento de onda máximo do produto da reação entre formaldeído e o reagente de Nash foi mantido em 412 nm.

Um resumo de todos os parâmetros otimizados e valores selecionados está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis estudadas e otimizadas do sistema em fluxo com multicomutação.

Variáveis	Faixa	
	Estudada	Valor selecionado
Tempo de acionamento V1 (s)	2,0 – 6,0	4,0
Tempo de acionamento V2 (s)	0,2 – 2,0	1,4
Número de ciclos de amostragem binária	1 – 7	7
Tempo de parada de fluxo (s)	30 – 150	60
Temperatura do banho termostático (°C)	30 – 70	50
Concentração de acetilacetona (mol L ⁻¹)	0,02 – 1,2	0,39
Concentração de acetato de amônio (mol L ⁻¹)	0,2 – 3,0	1,4
pH	4,7 – 5,8	5,5

4.1.7. Características analíticas

Após a otimização dos parâmetros do sistema em fluxo com multicomutação, as características analíticas do procedimento proposto foram estimadas. A resposta foi linear no intervalo de concentração entre 0,2 até 7,0 mg L⁻¹. Os sinais transientes e a curva de calibração obtidos pelo método proposto em fluxo otimizado são apresentados na Figura 32. A equação da reta obtida foi igual a $A = 0,124 C_{\text{Form.}} + 0,026$ com coeficiente de correlação de 0,999, em que A e C_{Form.} são a altura de pico para a absorbância e a concentração de formaldeído em mg L⁻¹, respectivamente. O limite de detecção (LD) foi estimado em de 0,02 mg L⁻¹. O limite de quantificação (LQ) foi estimado em 0,06 mg L⁻¹. O desvio padrão relativo (DPR %, n=15) para uma solução contendo 4 mg L⁻¹ de formaldeído foi estimado em 1,08%, com frequência de

amostragem de 17 amostras h^{-1} (Figura 32). A Tabela 4 apresenta um resumo das características analíticas do sistema em fluxo com multicomutação desenvolvido.

Figura 32: Sinais transientes obtidos em triplicata em diferentes concentrações de formaldeído 0 – 7,0 (mg L^{-1}) e construção da curva analítica a partir das alturas dos picos gerados.

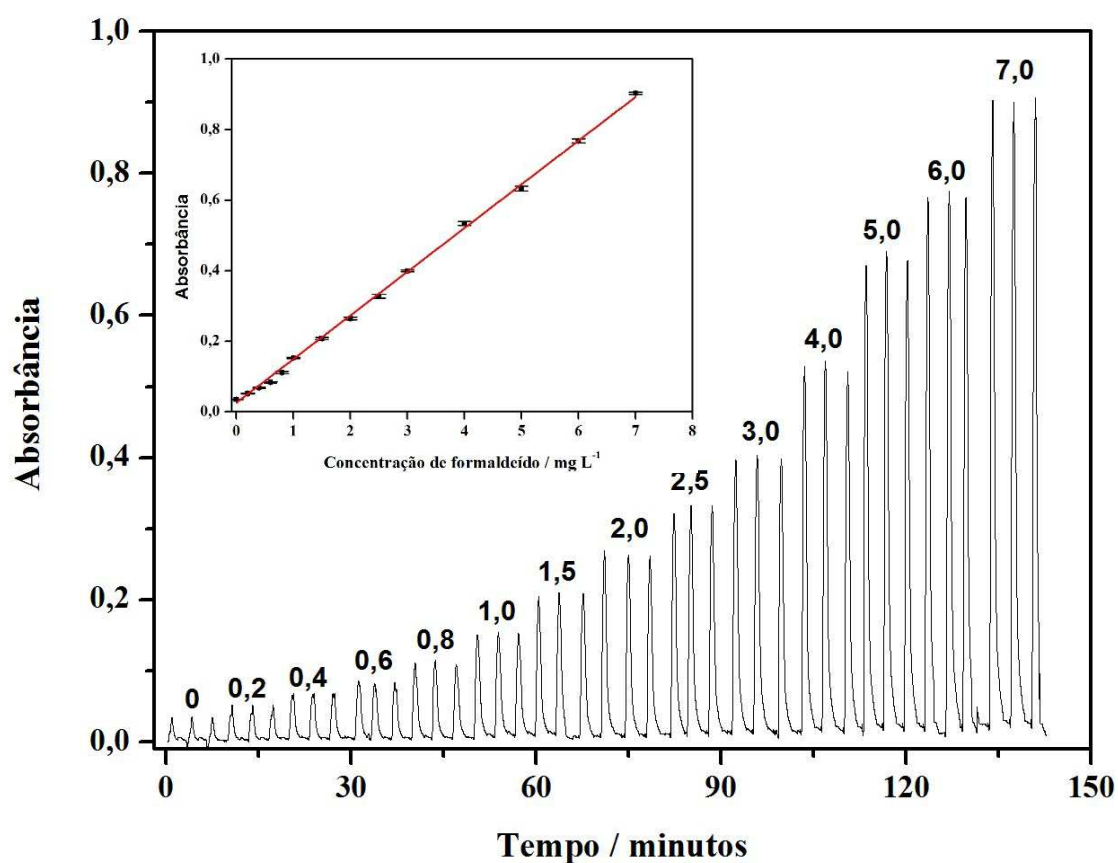


Tabela 4: Características analíticas do sistema em fluxo com multicomutação.

Características Analíticas	Valor
Equação da reta	$A = 0,124 C_{\text{Form.}} + 0,026$
Faixa Linear (mg L ⁻¹)	0,2 – 7,0
Desvio Padrão Relativo (4,0 mg L ⁻¹ , n = 15)	1,08%
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,02
Limite de quantificação (mg L ⁻¹)	0,06
Frequência de amostragem (amostras h ⁻¹)	17
Consumo de acetilacetona (mg)	10,9
Consumo de acetato de amônio (mg)	30,0

*Limite de detecção = $(3,0 \times \text{desvio padrão do branco}) / \text{coeficiente angular da curva}$

*Limite de quantificação = $(10 \times \text{desvio padrão do branco}) / \text{coeficiente angular da curva}$

4.2. Otimização da extração das amostras de cogumelo

A otimização utilizando destilação simples foi baseada em um trabalho apresentado na literatura [80], cujo autores avaliaram a extração de formaldeído em amostras de carne defumada. Neste trabalho, empregando 2 g de amostra, melhores resultados foram obtidos quando as amostras contendo formaldeído foram destiladas durante 50 minutos com 3 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 10%. Outros métodos de extração também foram avaliados como o uso de banho ultrassônico e o aquecimento da amostra para a extração do formaldeído em uma solução aquosa, no entanto, a destilação simples se mostrou como alternativa mais viável para a extração do analito.

Desta forma, o uso da destilação simples foi avaliado para a extração de formaldeído em cogumelos. A massa de amostra, tal como o volume e o tipo de extrator foram avaliados e os resultados estão apresentados a seguir. As destilações simples foram realizadas até que não

houvesse mais líquido no balão de destilação, para garantir extração satisfatória de formaldeído das amostras.

4.2.1. Avaliação da extração de formaldeído

Com o intuito de confirmar a extração satisfatória de formaldeído utilizando destilação simples foram feitas extrações de formaldeído empregando 50 mL de solução padrão de formaldeído 5 mg L⁻¹ utilizando a determinação indireta de formaldeído com reagente de Nash levando a formação do DDL, as absorbâncias de DDL encontradas nas soluções padrões de formaldeído destiladas foram comparadas com soluções padrões de formaldeído não destiladas. Os valores de absorbância encontrados apresentaram resultados de absorbância estatisticamente similares, comprovando que a destilação simples é satisfatória para extração de formaldeído.

4.2.2. Avaliação do efeito da massa de amostra na extração de formaldeído em cogumelos.

Inicialmente a extração foi avaliada utilizando destilação simples contendo 3 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 10% e 47 mL de água destilada. As medidas foram feitas no sistema em fluxo com multicomutação utilizando o método da acetilacetona com detecção espectrofotométrica.

Para as amostras de shiitake fresco e shimeji fresco, por possuírem quantidade de formaldeído mais baixa do que a do shiitake desidratado [10,57,59], foram utilizadas massas superiores. As amostras foram batidas em um liquidificador industrial antes da pesagem. A Tabela 5 mostra as diferentes massas utilizadas na otimização do shiitake desidratado e fresco e no shimeji fresco. A destilação foi realizada até a coleta total da solução extratora.

Tabela 5: Avaliação do efeito da massa de amostra.

Amostra	Massa (g)	Concentração de formaldeído (µg/g)
Shimeji fresco	0,5	16,15 ± 1,07
	1,5	9,20 ± 0,61
Shiitake fresco	0,5	34,57 ± 1,23
	1,5	28,34 ± 0,88
Shiitake desidratado	0,1	437,5 ± 10,1
	0,25	421,6 ± 6,80

Observa-se que para o shimeji fresco e shiitake fresco a massa ideal é 0,5 g por ter apresentado a maior concentração de formaldeído extraída. Provavelmente, 50 mL de solução extratora não conseguiu extrair todo formaldeído de amostras com massa de 1,5 g. Para o shiitake desidratado apesar do valor 0,25 g apresentar resultados similares ao de 0,1 g, foi escolhido a massa de 0,1 g por apresentar menor consumo de amostra.

4.2.3. Avaliação da quantidade de solução extratora na extração de formaldeído em cogumelos.

De acordo com o experimento feito anteriormente foi fixado o valor de 0,5 g para amostras de shiitake e shimeji fresco e 0,1 g para amostras de shiitake desidratado. Como a quantidade em massa das amostras de shiitake e shimeji fresco foram idênticas optou-se por otimizar a quantidade de solução extratora somente da amostra de shiitake fresco. As amostras foram destiladas com 3 mL de Ácido Fosfórico (H₃PO₄) 10 % e variou-se a quantidade de solução extratora final de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6: Média das concentrações de formaldeído nas amostras de shiitake desidratado e fresco em diferentes volumes de solução extratora.

Amostras	Solução Final (mL)	Concentração de formaldeído ($\mu\text{g/g}$)
Shiitake fresco	50	$33,71 \pm 1,84$
	25	$35,33 \pm 1,61$
	10	$17,81 \pm 1,52$
Shiitake desidratado	80	$468,2 \pm 14,2$
	60	$477,7 \pm 12,3$
	50	$435,1 \pm 9,8$
	20	$248,8 \pm 11,8$

Observa-se que para o shiitake desidratado a melhor quantidade de solução extratora é 60 mL por apresentar a maior extração de formaldeído, quando comparado com as quantidades de 50 mL e 80 mL de solução extratora. Para o shiitake fresco a melhor quantidade de solução extratora é 25 mL por apresentar a maior extração de formaldeído, quando comparado com as quantidades de 10 mL e 50 mL de solução extratora.

De acordo com a extração proposta neste trabalho utilizando destilação simples com H_3PO_4 10%, a concentração mínima de extração de formaldeído para o cogumelo fresco é de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ e o cogumelo seco é de $12 \mu\text{g g}^{-1}$ empregando o sistema de análise em fluxo com multicomutação.

4.3. Determinação eletroquímica

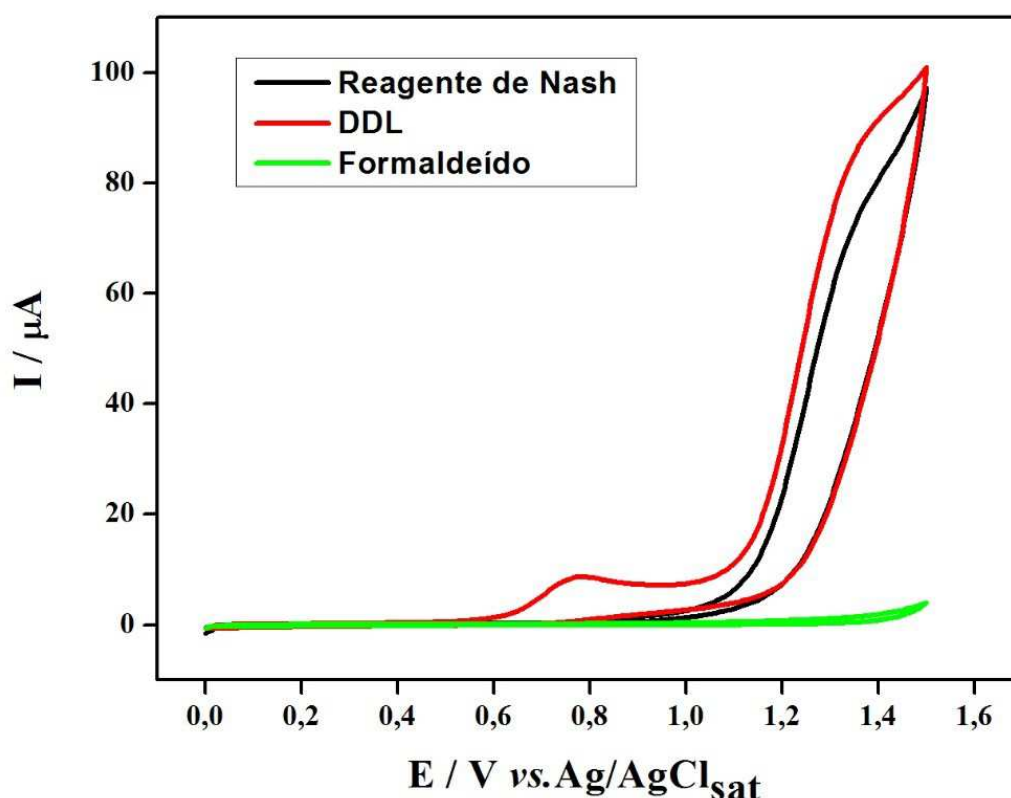
4.3.1. Voltametria Cíclica

Um procedimento eletroanalítico simples, preciso, rápido e de custo relativamente baixo foi desenvolvido para a determinação de formaldeído em cogumelos (shiitake e shimeji) utilizando eletrodo de carbono vítreo. Para determinar um analito por voltametria cíclica é necessário que o analito de interesse seja eletroativo, ou seja, ocorrer a oxidação ou redução deste em determinado potencial aplicado. A estratégia eletroquímica de determinação de formaldeído utilizando método da acetilacetona em meio de acetato de amônio é nova, pois a maioria dos trabalhos eletroanalíticos encontrados na literatura determinam o formaldeído de forma direta com eletrodos modificados [68,98–103].

Inicialmente, foram obtidos voltamogramas cíclicos de forma independente para soluções contendo formaldeído, reagente de Nash e do produto da reação, o composto 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (DDL) sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, pois a eletroatividade do reagente de Nash e do DDL eram desconhecidas. O eletrólito suporte empregado foi o próprio acetato de amônio presente no reagente de Nash.

Observa-se na Figura 33 que o formaldeído não é uma molécula eletroativa nas condições avaliadas, o reagente de Nash apresenta eletroatividade a partir do potencial + 1,0 V e o DDL apresenta eletroatividade em aproximadamente + 0,8 V.

Figura 33: Voltamogramas cíclicos do formaldeído, reagente de Nash e formação do DDL utilizando 4,2 mL de formaldeído (30 mg L^{-1}) e 0,8 mL de reagente de Nash (acetilacetona $0,0195 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetato de amônio $1,95 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5) levando a formação do DDL. Tempo de reação: 10 minutos, temperatura ambiente. Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. Velocidade de varredura (v): 50 mV s^{-1} . Incremento de potencial (ΔE s): 5 mV .

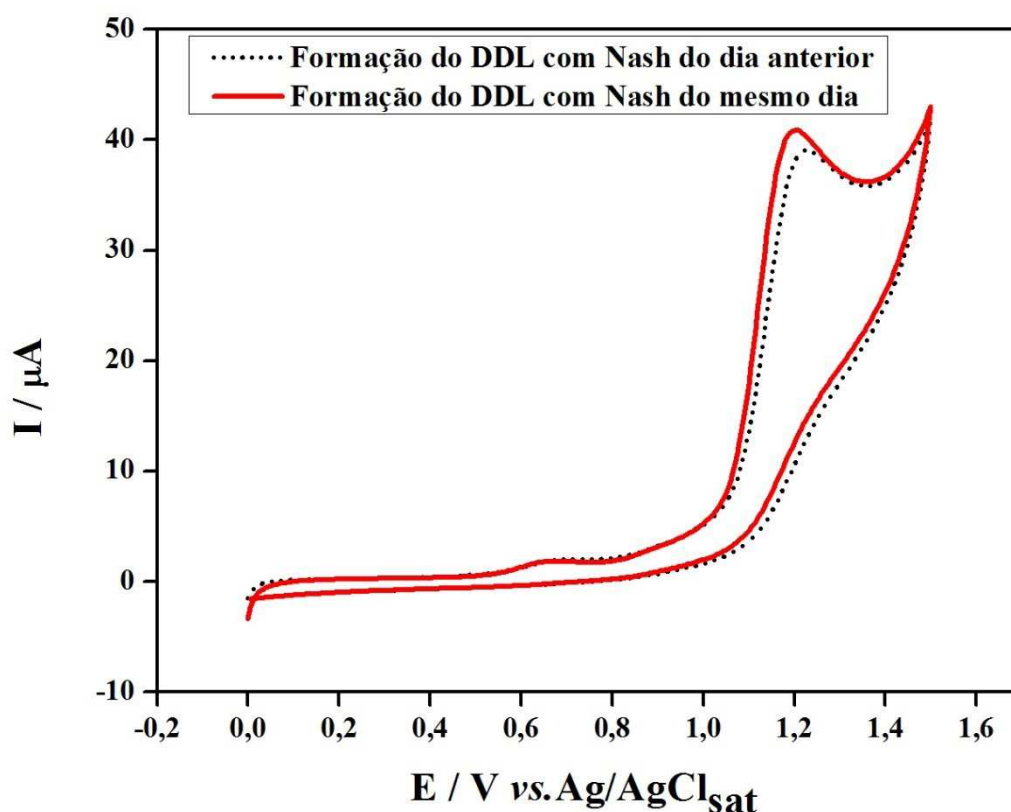


Portanto, é possível determinar formaldeído indiretamente nas condições avaliadas, sem a interferência dos reagentes empregados na reação. Pode-se dizer que o processo é provavelmente irreversível pois não apresenta pico de redução no sentido inverso [89].

Na literatura há divergência sobre a necessidade de preparo do reagente de Nash no mesmo dia da análise ou no dia anterior a análise [60,61]. Com a finalidade de comprovação do ideal preparado deste reagente, foi realizado um estudo para verificar o perfil voltamétrico do reagente em duas condições diferentes, sendo a primeiro preparando o reagente com a

antecedência de 24 horas e o segundo preparando no mesmo dia da medida. O resultado obtido esta apresentado na Figura 34.

Figura 34: Voltamogramas cíclicos do reagente de Nash e formação do DDL nas mesmas condições da Figura 33, alterando somente a concentração de formaldeído para 15 mg L^{-1} .

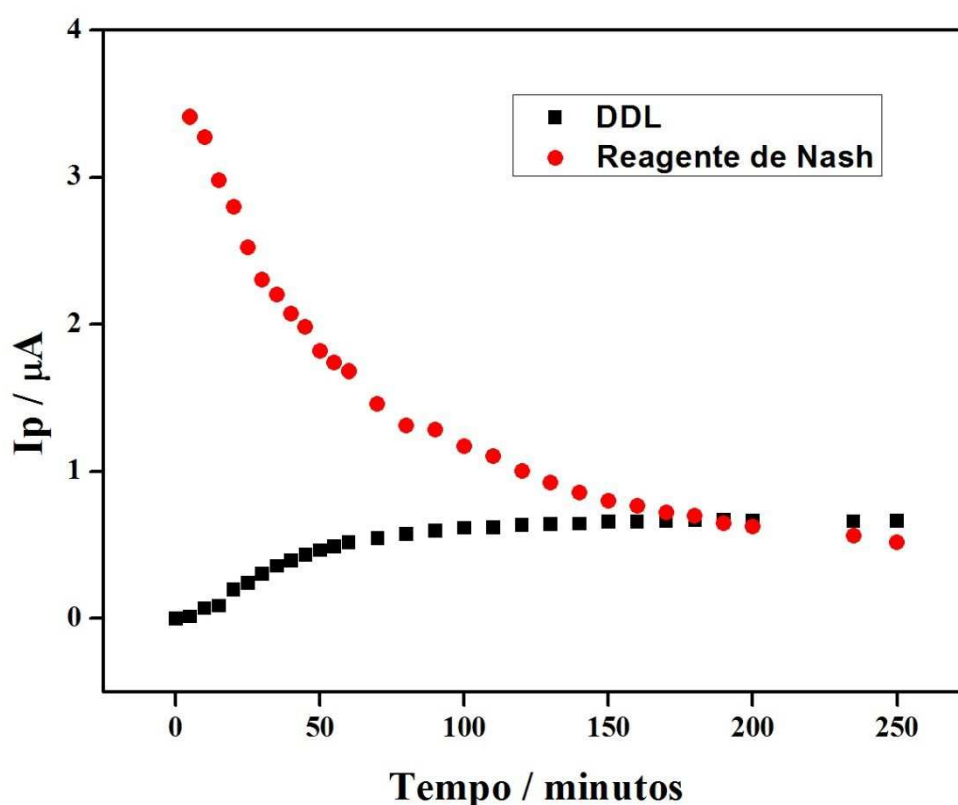


O sinal analítico do DDL e do reagente de Nash preparado no dia anterior e no mesmo dia são muito semelhantes, conclui-se que não tem diferença significativa o preparo do reagente no dia anterior ou no mesmo dia de uso.

Considerando que a cinética da reação da formação do DDL é lenta, e que nas condições avaliadas no sistema de análises em fluxo as medidas não foram realizadas no estado de equilíbrio, um estudo cinético foi realizado empregando voltametria. Utilizou-se a voltametria cíclica para estudo cinético da reação. O estudo foi realizado em temperatura ambiente

variando o tempo de reação entre 0 e 250 minutos, sendo que as correntes de pico foram obtidas dos voltamogramas cíclicos no intervalo de 5 minutos entre 0 e 60 minutos e no intervalo de 10 minutos entre 60 e 250 minutos, após cada leitura a solução foi agitada mecanicamente para renovação da solução presente na interface eletrodo/solução (Figura 35). Este estudo foi feito com o objetivo de confirmar que o reagente de Nash estava sendo consumido e o DDL estava sendo formado.

Figura 35: Estudo cinético da reação química entre o formaldeído e do reagente de Nash levando a formação do DDL, nas mesmas condições da Figura 34.

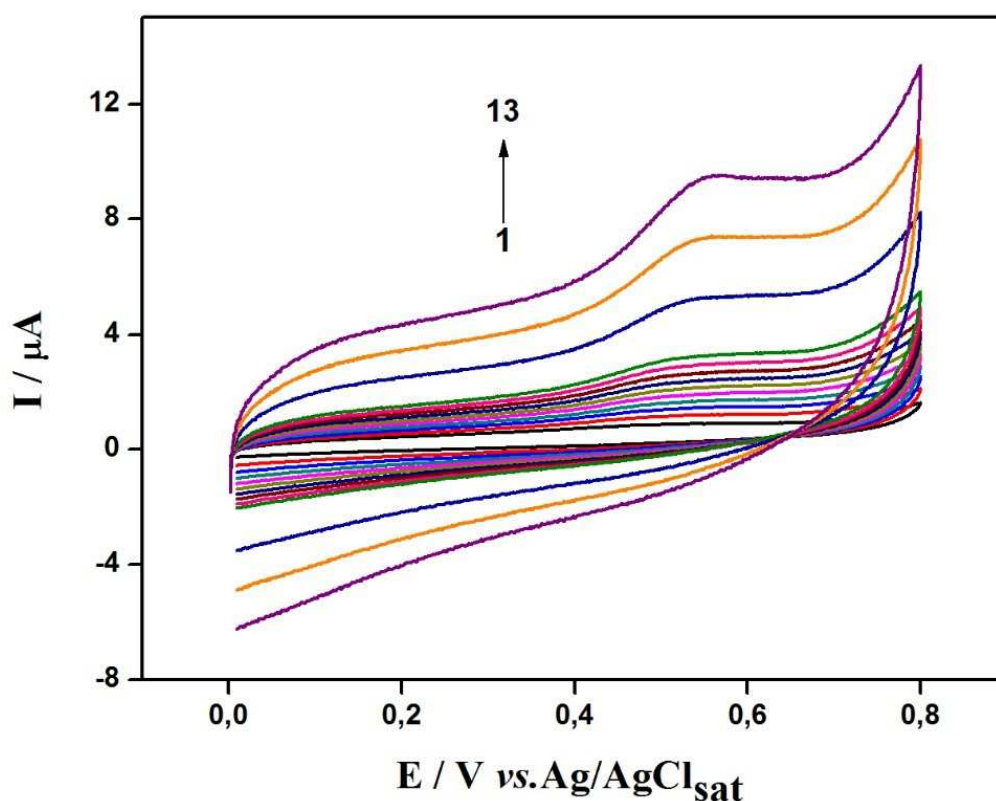


Observa-se que a medida que ocorre a reação entre o formaldeído e o reagente de Nash ocorre um aumento do sinal analítico do DDL, sendo que o consumo do reagente de Nash decresce exponencialmente e a formação do DDL aumenta sutilmente durante toda reação. Conclui-se então que mesmo após 250 minutos a reação não atingiu o estado de equilíbrio, mas

medidas feitas após o tempo de 100 minutos até 250 minutos não apresentam diferenças estatísticas no sinal analítico do DDL. Pode-se dizer que o reagente de Nash é provavelmente adsorvido na superfície do eletrodo.

A influência da velocidade de varredura foi analisada no intervalo de 10 a 400 mV s^{-1} com o objetivo de avaliar a natureza do transporte do DDL para o eletrodo (Figura 36). Observa-se que o aumento da velocidade de varredura provoca um deslocamento do potencial de pico para regiões mais positivas, isto é característico de processos irreversíveis [104].

Figura 36: Voltamogramas cíclicos da reação entre o DDL e reagente de Nash em função da velocidade de varredura nas mesmas condições da Figura 33, variando somente as velocidades de varredura. Sendo 1) 10 mV s^{-1} ; 2) 20 mV s^{-1} ; 3) 30 mV s^{-1} ; 4) 40 mV s^{-1} ; 5) 50 mV s^{-1} ; 6) 60 mV s^{-1} ; 7) 70 mV s^{-1} ; 8) 80 mV s^{-1} 9) 90 mV s^{-1} 10) 100 mV s^{-1} 11) 200 mV s^{-1} 12) 300 mV s^{-1} 13) 400 mV s^{-1} os valores das velocidades de varredura.



A linearidade observada entre a variação da corrente de pico versus a variação da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 400 mV s^{-1} indica que o processo é adsorptivo [104], como mostra a Figura 37. Sendo o valor do coeficiente de correlação $r = 0,998$. Quando a corrente de pico varia linearmente com a variação da raiz quadrada da velocidade de varredura é indicativo que o processo é difusional [104], mas a Figura 38 mostra o contrário. Um gráfico do logaritmo da área de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura foi obtido e está apresentado na Figura 39.

Figura 37: Gráfico da relação entre corrente de pico vs velocidade de varredura.

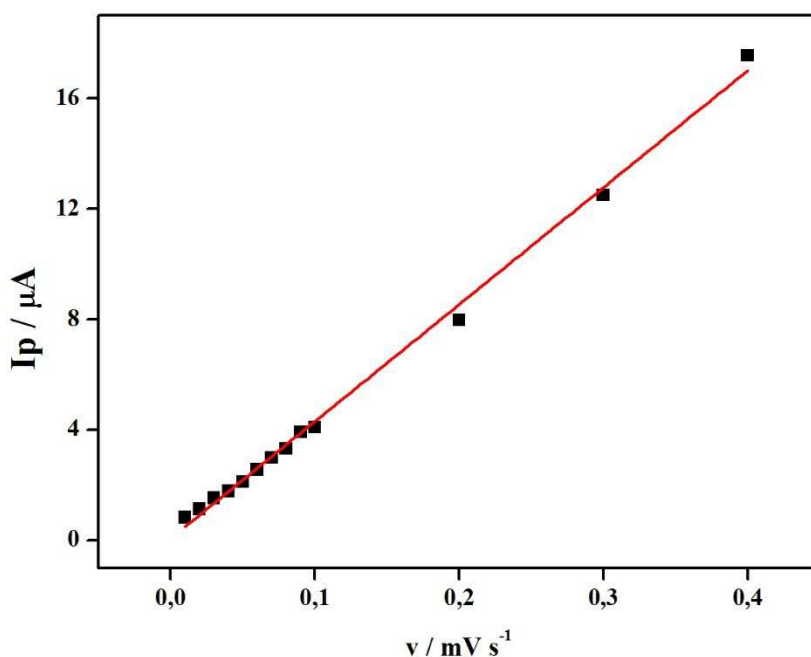


Figura 38: Gráfico da relação entre área de corrente de pico vs. (velocidade de varredura)^{1/2}.

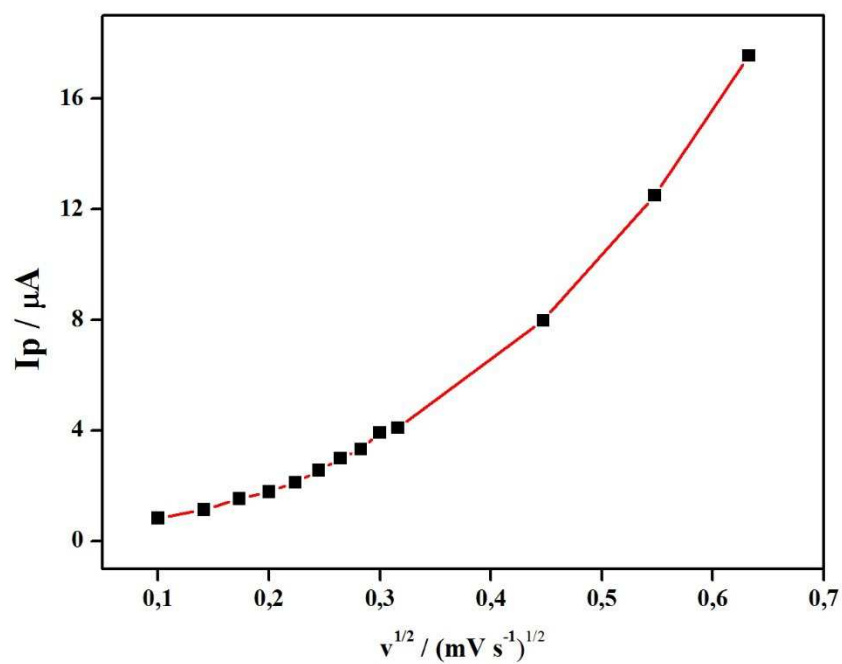
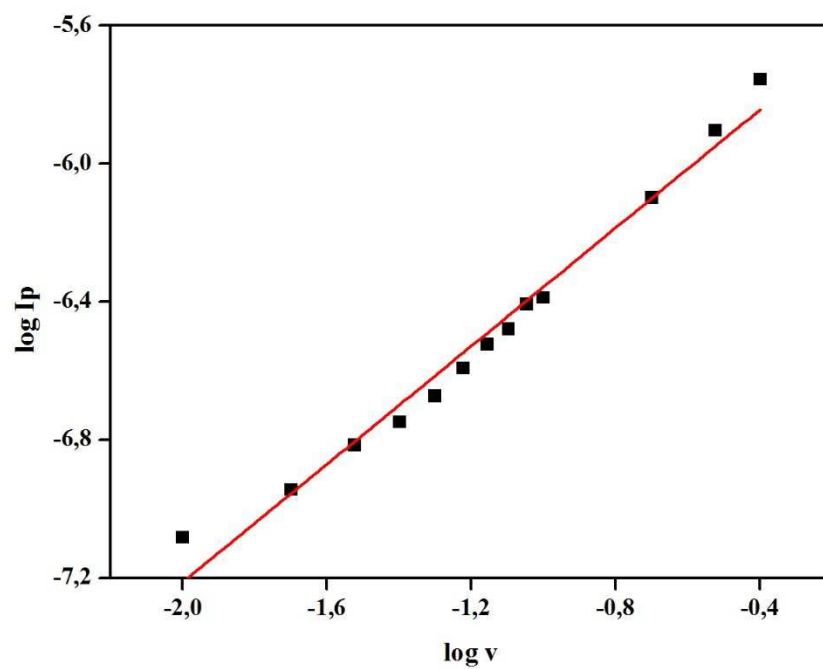


Figura 39: Gráfico da relação entre log da corrente de pico vs. log da velocidade de varredura.

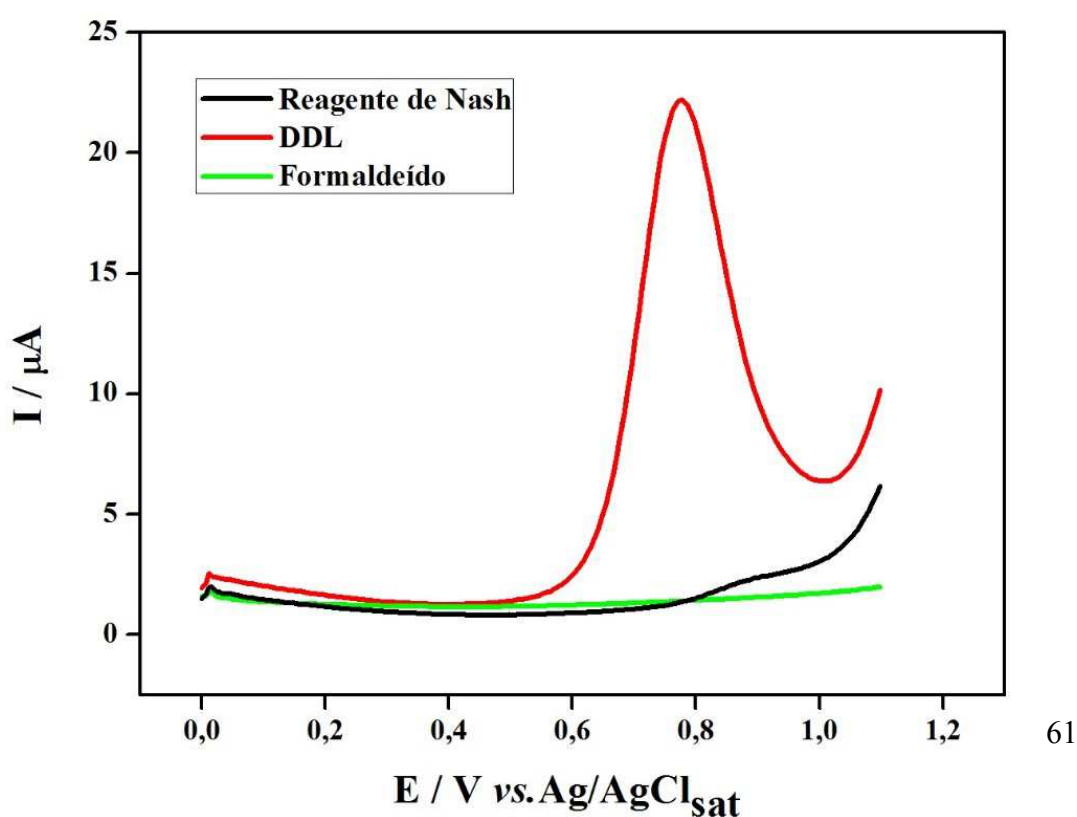


O gráfico da relação entre logaritmo da corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura obtido apresentou comportamento linear ($r = 0,988$) com inclinação da curva de 0,86, próximo do previsto na literatura (1,0), característico de processos adsorptivos [104].

4.3.2. Voltametria de onda quadrada

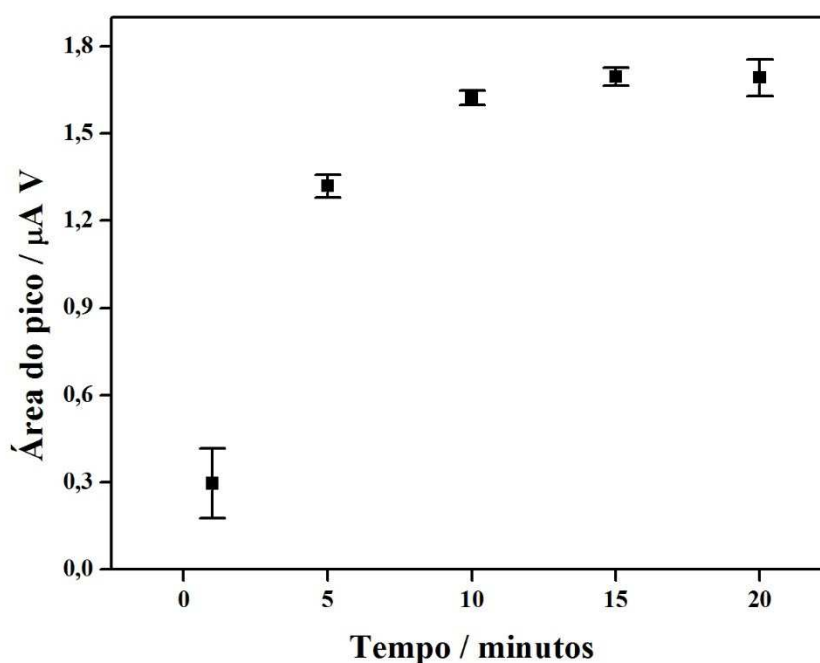
Foram feitos experimentos empregando a voltametria de onda quadrada, empregando as mesmas condições utilizadas na voltametria cíclica. Os voltamogramas de onda quadrada apresentaram um comportamento semelhante daquele obtido por voltametria cíclica, apresentando somente o pico de oxidação do DDL em torno de +0,8 V vs Ag/AgCl, como mostra a Figura 40.

Figura 40: Voltamogramas de onda quadrada do formaldeído, reagente de Nash e DDL, utilizando 4,2 mL de formaldeído (30 mg L^{-1}) e 0,8 mL de reagente de Nash (acetilacetona $0,0195 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetato de amônio $1,95 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5). Tempo de reação: 10 minutos (temperatura ambiente). Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. ΔE s: 5 mV, a: 30 mV e f: 50 Hz.



Como a reação entre o formaldeído e o reagente de Nash formando o DDL possui cinética lenta foi feito um experimento do tempo de aquecimento utilizando a voltametria de onda quadrada, com a finalidade de se alcançar o equilíbrio químico da reação, melhorando a precisão das medidas, os resultados estão apresentados na Figura 41.

Figura 41: Gráfico da relação entre área do pico do DDL vs. variação do tempo de aquecimento à 80 °C, nas mesmas condições da Figura 40, alterando apenas a concentração de formaldeído para 12 mg L⁻¹. Tempos analisados: 1, 5, 10, 15 e 20 minutos.



Observa-se que a partir de 10 minutos a formação do DDL permanece constante, indicado que o estado de equilíbrio da reação foi alcançado. O tempo de aquecimento utilizado em todos outros experimentos relacionados a voltametria de onda quadrada foi fixado em 10 minutos à 80 °C.

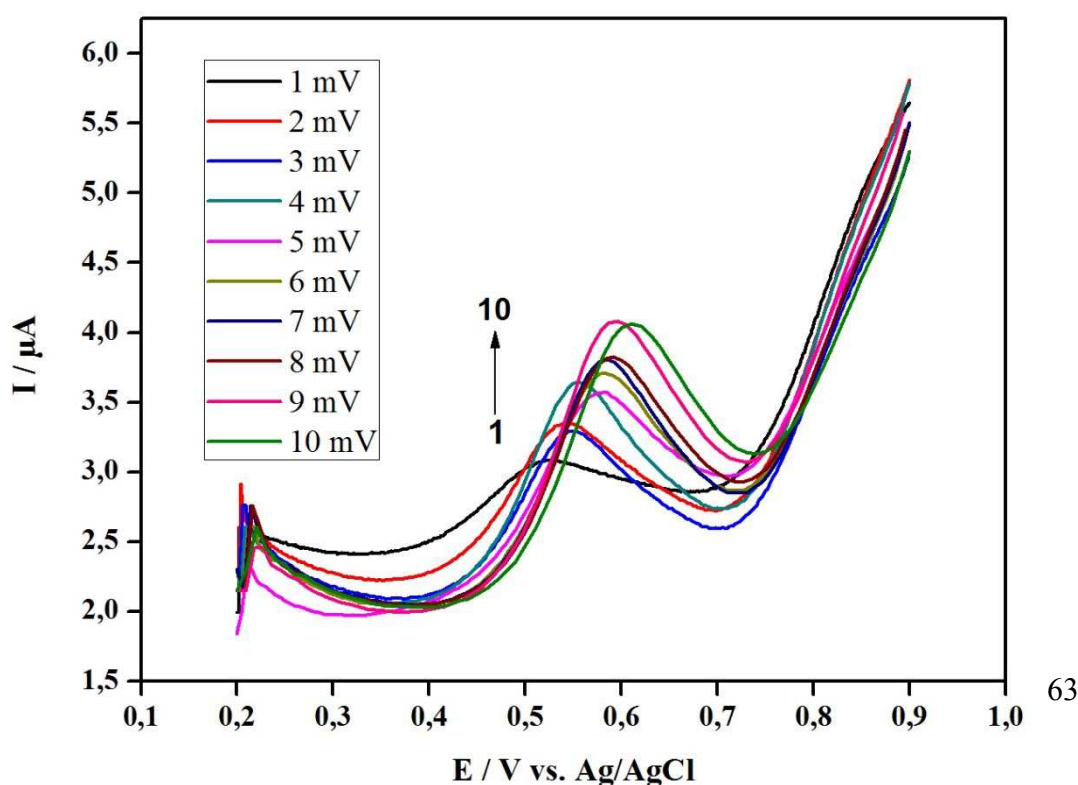
4.3.2.1. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Para o desenvolvimento do procedimento eletroanalítico empregando a voltametria de onda quadrada, diversos parâmetros que possam influenciar a resposta voltamétrica foram

avaliados, tais como: frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f), a amplitude de pulsos de potencial (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s).

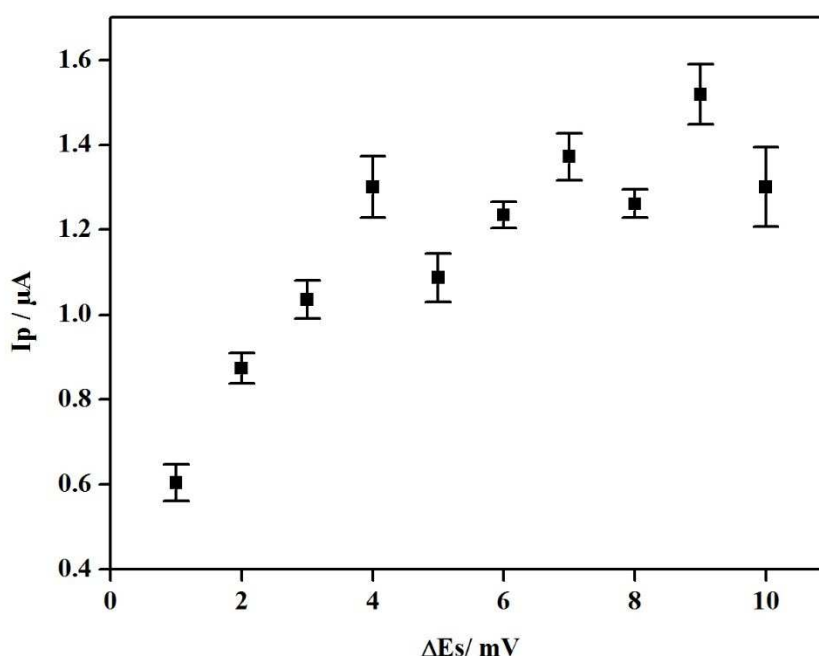
O primeiro parâmetro otimizado foi o incremento de varredura de potencial (ΔE_s). Valores maiores deste parâmetro podem aumentar o sinal analítico obtido melhorando a sensibilidade do método mas pode ocasionar alargamento nos picos, e consequentemente, a resolução dos voltamogramas pode ser comprometida, diminuindo a sensibilidade da medida. A variação do incremento de varredura de potencial (ΔE_s) foi avaliada no intervalo de 1 mV a 10 mV mantendo-se constante a frequência de aplicação de pulso (f) em 50 Hz e a amplitude de pulso (a) em 30 mV. A Figura 42 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação do DDL em diferentes valores de incremento de varredura de potencial (ΔE_s).

Figura 42: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 40, alterando somente o parâmetro previamente otimizado na seção anterior tempo de reação 10 minutos à 80 °C, em diferentes valores de incremento de potencial (ΔE_s). Sendo 1) 1 mV; 2) 2 mV; 3) 3 mV; 4) 4 mV; 5) 5 mV; 6) 6 mV; 7) 7 mV; 8) 8 mV 9) 9 mV 10) 10mV os valores de (ΔE_s).



Para melhor escolha do valor de ΔE_s , foi construído um gráfico da corrente de pico em função do incremento de varredura (ΔE_s), como é mostrado na Figura 43. Apesar do valor da área da corrente de pico ser maior para o $\Delta E_s = 9\text{mV}$, o alargamento dos picos provocou perda da resolução do voltamograma, portanto, o valor de ΔE_s selecionado foi 6 mV por apresentar melhor resolução e melhor sinal analítico.

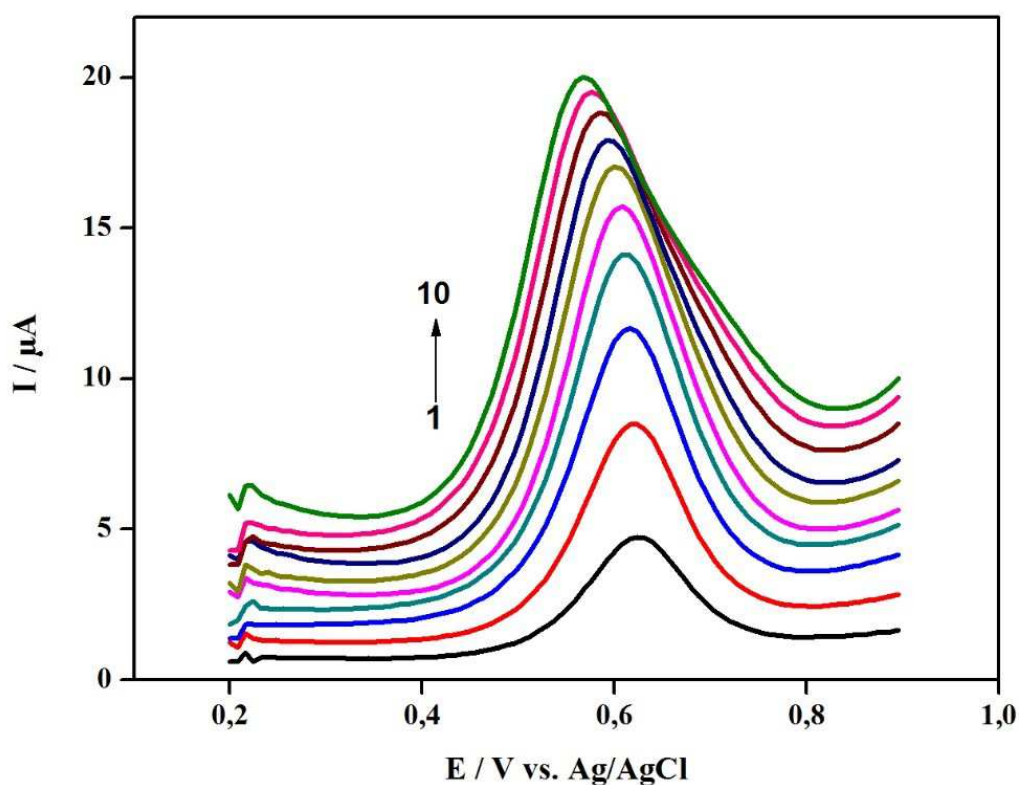
Figura 43: Gráfico da relação entre corrente de pico e a variação do incremento de potencial (ΔE_s).



O segundo parâmetro otimizado foi a influência da variação da amplitude de pulsos de potencial (a) na corrente de pico para oxidação do DDL. Este parâmetro pode avaliar o tipo de processo redox envolvido. Sendo que em processos reversíveis ou quase reversíveis, o potencial de pico não sofre deslocamento com o aumento de amplitude, e, em processos irreversíveis, ocorre deslocamento do potencial de pico [90]. A Figura 44 mostra os

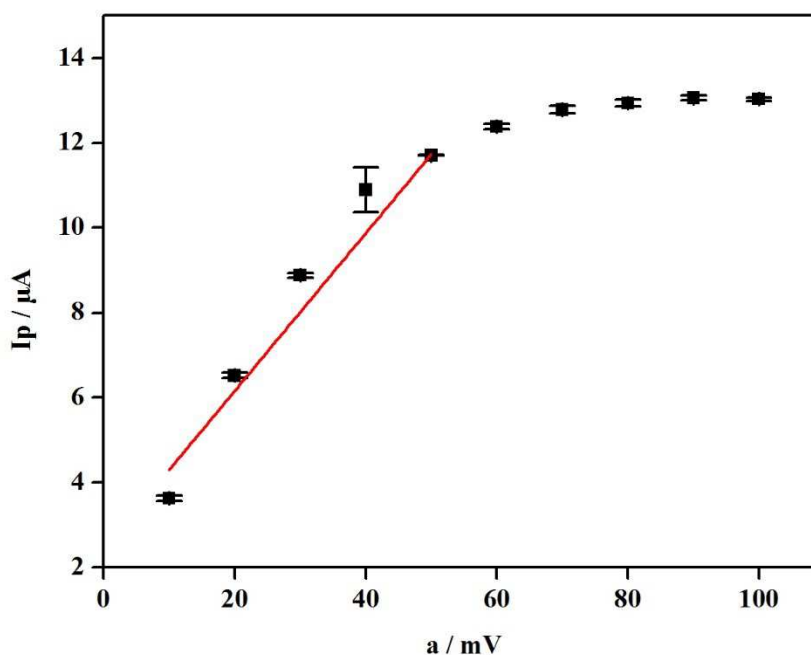
voltamogramas de onda quadrada obtidos para oxidação do DDL em diferentes aplicações de amplitude de pulso de potencial.

Figura 44: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 42, alterando somente o parâmetro previamente otimizado ΔE s: 6 mV, em diferentes valores de amplitude de pulso de potencial (a). Sendo 1) 10 mV; 2) 20 mV; 3) 30 mV; 4) 40 mV; 5) 50 mV; 6) 60 mV; 7) 70 mV; 8) 80 mV 9) 90 mV 10) 100 mV os valores de (a).



A partir do voltamograma de onda quadrada obtido foi obtido o gráfico da relação entre corrente de pico e variação da amplitude de potencial (a), mostrado na Figura 45.

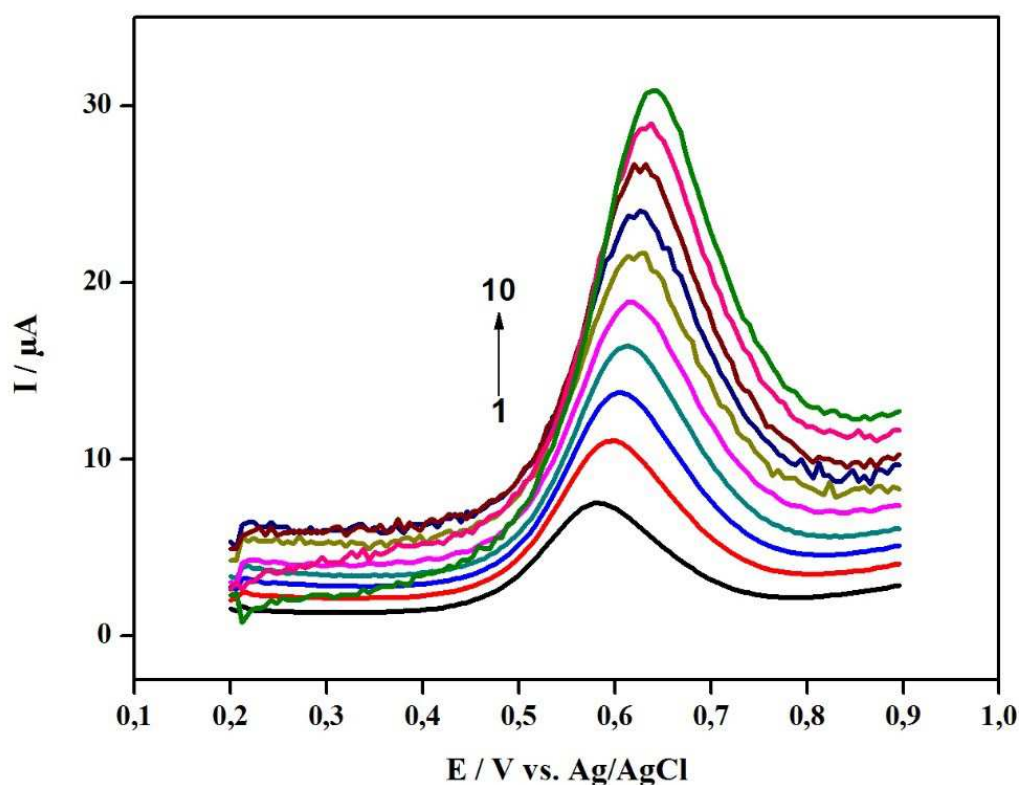
Figura 45: Relação entre corrente de pico e a variação da amplitude de potencial (a).



Nota-se que para valores de amplitude até 50 mV o potencial de pico é mantido linear e para valores acima deste ocorre deslocamento dos picos para potenciais menos positivos, confirmando a irreversibilidade do sistema. A corrente de pico aumenta linearmente até 50 mV, apresentado coeficiente de correlação $r = 0,980$. Para valores de amplitudes maiores, o aumento não foi linear como pode ser observado na Figura 45. Portanto, o valor da amplitude de pulso de potencial 50 mV foi escolhido.

O último parâmetro otimizado foi a frequência de aplicação de pulsos de potencial (f) que é um parâmetro que determina a intensidade dos sinais. No processo de oxidação do DDL, a variação da frequência sobre as quais os pulsos de potenciais foram aplicados provocou aumento na corrente de pico mas observam-se ruídos nos picos de frequência maior que 50 Hz (Figura 46). Desta forma a frequência escolhida foi 50 Hz, pois apresentou melhor sinal analítico e perfil voltamétrico.

Figura 46: Voltamogramas de onda quadrada da oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 44, alterando somente o parâmetro previamente otimizado a: 50 mV, em diferentes frequências de aplicação de pulso de potencial (f). Sendo 1) 10 Hz; 2) 20 Hz; 3) 30 Hz; 4) 40 Hz; 5) 50 Hz; 6) 60 Hz; 7) 70 Hz; 8) 80 Hz 9) 90 Hz 10) 100 Hz os valores de f.



Em sistemas que envolvem processos de adsorção de espécies eletroativas na superfície do eletrodo a corrente de pico varia linearmente com a frequência de aplicação de pulso[90]. De acordo com a Figura 47, observa-se que as correntes de pico são proporcionais à frequência de aplicação de pulso, apresentando coeficiente de correlação $r = 0,994$. Portanto, o processo de oxidação do DDL envolve adsorção significativa de reagente/e ou produto.

Figura 47: Relação entre corrente de pico e a variação da frequência de aplicação pulso de potencial (f).

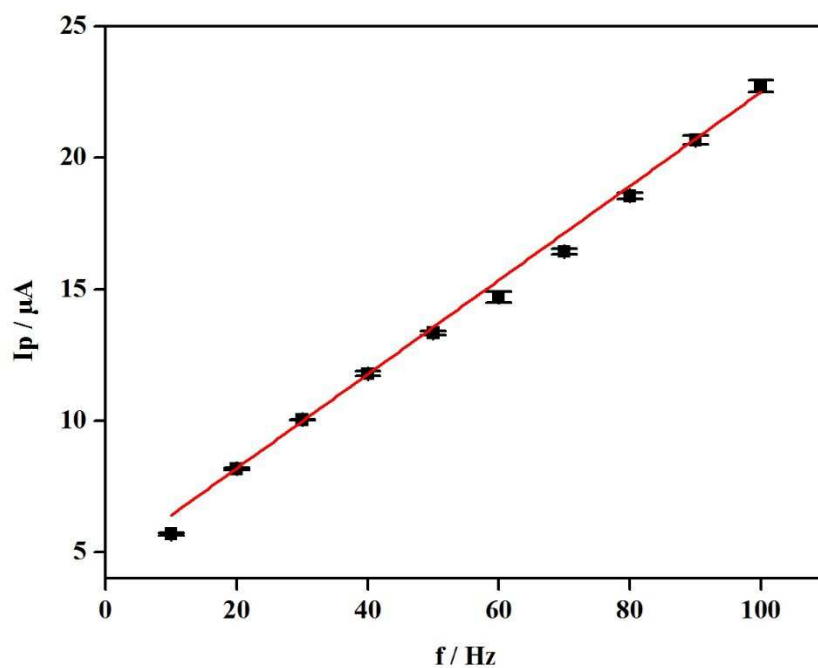
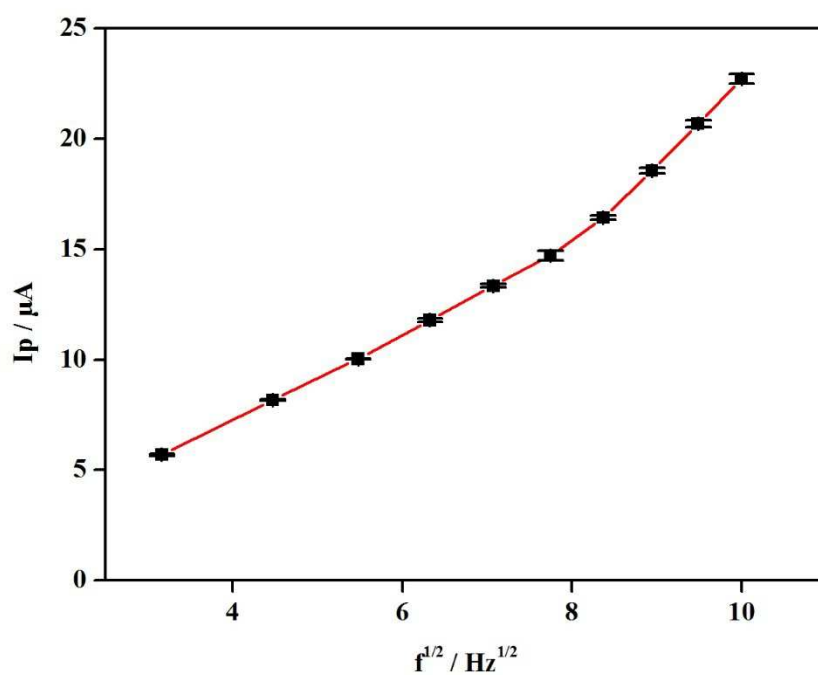


Figura 48: Relação entre corrente de pico e a variação da raiz quadrada da frequência de aplicação pulso de potencial ($f^{1/2}$).

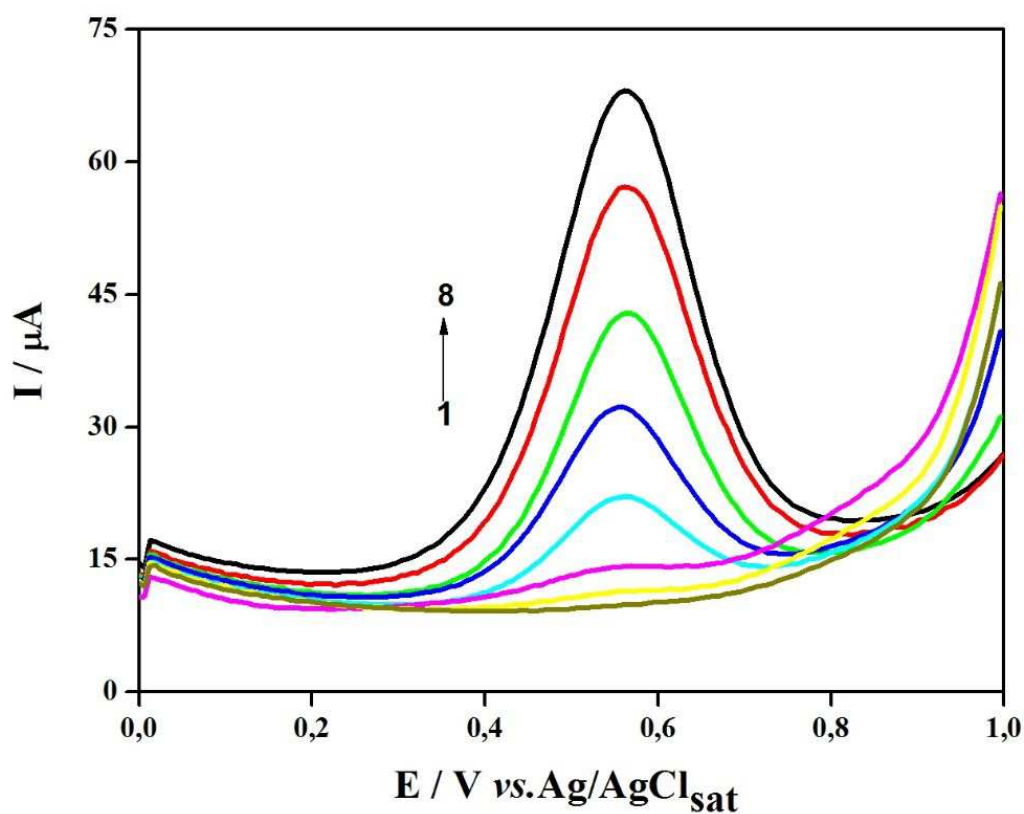


Analisando os resultados, observou-se que a relação entre corrente de pico e frequência apresentou tendência linear (Figura 47) diferentemente da relação entre corrente de pico e raiz quadrada da frequência (Figura 48). Na voltametria de onda quadrada a relação linear entre corrente de pico e frequência é um indicativo de processo irreversíveis controlados por adsorção, e uma relação linear entre corrente de pico e raiz quadrada da frequência é um indicativo de processos reversíveis controlados por difusão. Portanto, de acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o processo é irreversível e controlado por adsorção, apresentando resultados semelhantes aos observados na voltametria cíclica.

4.3.2.2. Características Analíticas

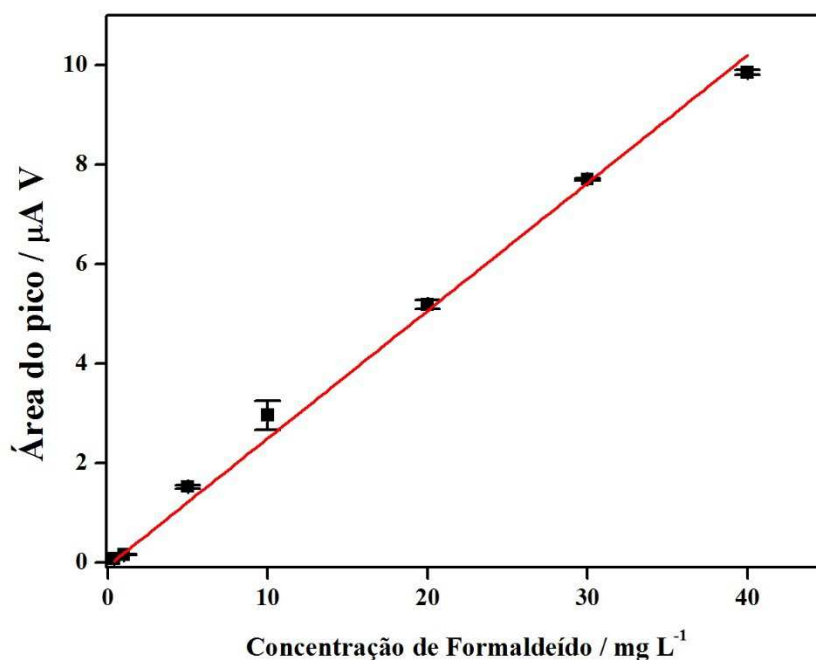
Após a otimização dos parâmetros voltamétricos, foi obtida a curva analítica e as características analíticas do procedimento proposto foram estimadas. Para construção da curva, utilizou-se o reagente de Nash (acetilacetona $0,0195 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de acetato de amônio $1,95 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5), de acordo com os dados apresentados na literatura para determinação espectrofotométricas.[60,61] Observou-se um aumento proporcional da corrente de pico para valores entre 0,4 até 40 mg L^{-1} de formaldeído. Os voltamogramas registrados desta faixa linear estão exibidos na Figura 49.

Figura 49: Voltamogramas de onda quadrada para oxidação do DDL empregando o eletrodo de carbono vítreo. Sendo 1) 0; 2) 0,4; 3) 1,0; 4) 5,0; 5) 10; 6) 20; 7) 30; 8) 40 mg L⁻¹ de formaldeído e reagente de Nash. Eletrodo de trabalho: Carbono vítreo. $\Delta E_s = 6$ mV; $a = 50$ m; e $f = 50$ Hz.



Com base na média das áreas dos picos do DDL, obtidos pela reação do formaldeído em diferentes concentrações e reagente de Nash, a curva analítica foi construída conforme demonstrado na Figura 50.

Figura 50: Curva analítica, relação entre a área de pico e a variação da concentração de formaldeído em mg L^{-1} .



A partir dos dados obtidos na construção da curva analítica foi determinada a equação da reta sendo, $\text{Área do pico} = 0,257 C_{\text{Form.}} - 0,066$ e também o coeficiente de correlação $r = 0,998$. Para estimar o desvio padrão relativo foram realizadas 10 leituras sucessivas de uma solução de formaldeído 10 mg L^{-1} como apresentado na Figura 51, e o valor do desvio padrão relativo em porcentagem foi de 0,71. A Tabela 7 apresenta todas as características analíticas do sistema eletroquímico com voltametria de onda quadrada. O limite de detecção e quantificação foi calculado conforme Tabela 4, mas utilizou-se o desvio padrão do ponto $0,4 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 51: Repetibilidade do método (n=10, 10 mg L⁻¹). Voltamogramas de onda quadrada para oxidação do DDL nas mesmas condições da Figura 49.

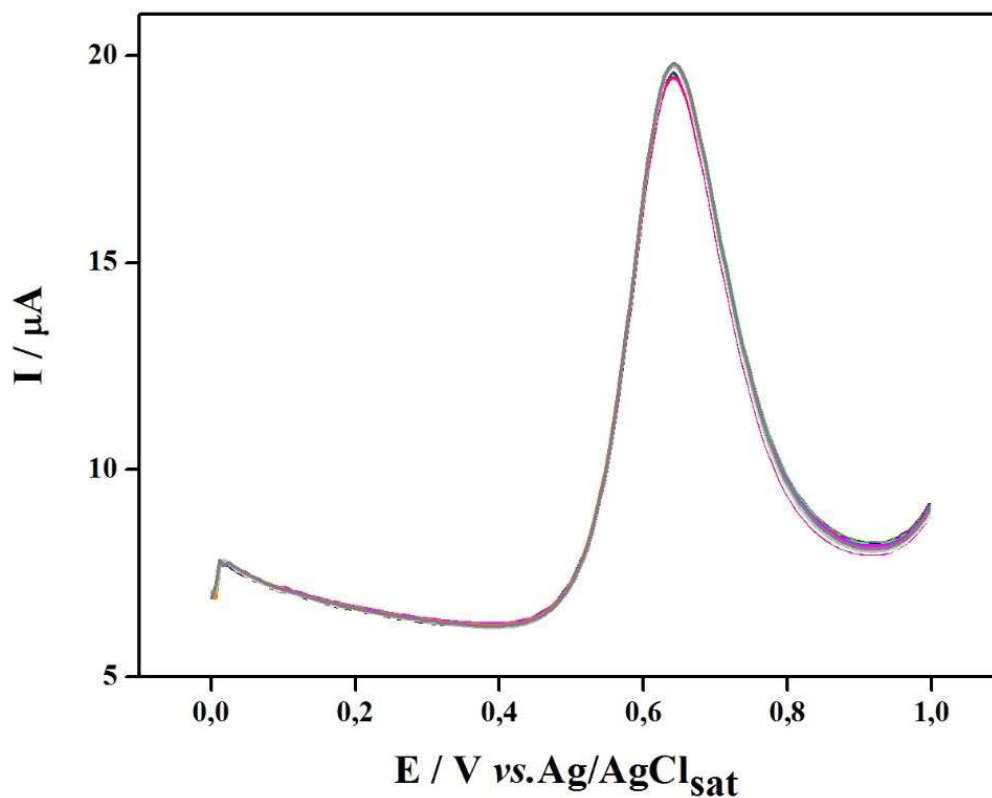


Tabela 7: Características analíticas do método eletroquímico com voltametria de onda quadrada.

Características Analíticas	Valor
Equação da reta	$A = 0,257 C_{\text{Form.}} - 0,066$
Faixa Linear (mg L ⁻¹)	0,4 – 40
Desvio Padrão Relativo (10 mg L ⁻¹ , n = 10)	0,71%
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,05
Limite de quantificação (mg L ⁻¹)	0,17
Consumo de acetilacetona (mg)	1,56
Consumo de acetato de amônio (mg)	117

4.4. Determinação de formaldeído em amostras de cogumelo empregando os dois procedimentos propostos

Após a extração do formaldeído das amostras reais dos cogumelos shimeji, shiitake fresco e desidratado utilizando a destilação simples em triplicada, conforme procedimento anteriormente otimizado, as soluções extraídas foram então analisadas. Os resultados obtidos foram então comparados utilizando os dois procedimentos propostos neste trabalho e estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Comparação da determinação de formaldeído em amostras de cogumelo empregando o sistema de análises em fluxo com multicomutação com detecção espectrofotométrica e a voltametria de onda quadrada em diferentes amostras de cogumelo.

Amostras	Concentração de Formaldeído ($\mu\text{g/g}$)		$F_{\text{calculado}}$
	Espectrofotométrico	Eletroquímico	
Shimeji fresco	$29,7 \pm 1,21$	$29,7 \pm 0,67$	3,26
Shiitake fresco	$36,0 \pm 0,84$	$35,7 \pm 1,99$	5,61
Shiitake desidratado	$477,7 \pm 12,3$	$493,0 \pm 9,05$	1,85

$F_{\text{tabelado}} = 19$ (GL=2, 95% de confiança). *Graus de liberdade (GL)

O teste F indica que as variâncias entre ambos procedimentos propostos são semelhantes ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$). Desta forma, é possível comparar os dois procedimentos propostos utilizando o teste t de Student pareado (Tabela 9).

Tabela 9: Valores do $T_{\text{calculado}}$ a partir do teste t de Student pareado em diferentes amostras de cogumelo.

Amostras	$T_{\text{calculado}}$
Shimeji fresco	0,0003
Shiitake fresco	0,24
Shiitake desidratado	1,74

$T_{\text{tabelado}} = 2,78$ (GL = 4, 95% de confiança). *Graus de liberdade (GL).

Conclui-se que os resultados obtidos para todas as amostras analisadas estão concordantes ($T_{\text{calculado}} < T_{\text{tabelado}}$), atestando a boa exatidão dos procedimentos propostos.

4.5. Teste de adição e recuperação de padrão

Para avaliar possíveis efeitos de interferência e exatidão dos métodos, foram realizados testes de adição e recuperação. A Tabela 10 mostra os valores em porcentagem de recuperação média ($n=3$) de adições de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ para amostras de shimeji fresco e shiitake desidratado e fresco utilizando sistemas de análise em fluxo com multicomutação utilizando o procedimento espectrofotométrico e utilizando o procedimento voltamétrico.

Os experimentos foram realizados da seguinte maneira, para as amostras de cogumelo fresco foram utilizadas soluções extratoras de 25 mL dopadas com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de formaldeído. Para amostras de cogumelo desidratado foram utilizadas soluções extratoras de 60 mL dopadas com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de formaldeído

Tabela 10: Teste de adição e recuperação utilizando o sistema em fluxo com multicomutação e o sistema eletroquímico com voltametria de onda quadrada para diferentes amostras de cogumelo. Média das recuperações (n=3) em porcentagem.

Amostras	Recuperação (%)	
	Sistema em fluxo	Eletroquímico
Shimeji fresco + 1,0 mg L ⁻¹	86,7 ± 0,43	86,9 ± 0,59
Shimeji fresco + 2,0 mg L ⁻¹	86,8 ± 0,61	88,7 ± 0,67
Shiitake fresco + 1,0 mg L ⁻¹	93,8 ± 0,79	88,9 ± 1,02
Shiitake fresco + 2,0 mg L ⁻¹	90,6 ± 0,76	108,2 ± 3,21
Shiitake desidratado + 1,0 mg L ⁻¹	92,0 ± 1,90	102 ± 4,53
Shiitake desidratado + 2,0 mg L ⁻¹	89,2 ± 1,51	94,5 ± 4,92

Recuperações satisfatórias foram obtidas para adições de formaldeído, indicando ausência de efeitos de matriz.

4.6. Comparação de diferentes procedimentos para determinação de formaldeído em cogumelos

Existem vários métodos analíticos (colorimétricos, fluorimétricos e cromatográficos) que podem ser empregados para a quantificação de formaldeído em cogumelos (Tabela 11).

Tabela 11: Trabalhos apresentados na literatura relacionados a quantificação de formaldeído em cogumelos (shiitake fresco e desidratado).

Referência	Técnica	Reagentes utilizados	Extração	LD (mg L ⁻¹)
[59]	HPLC	2,4-dinitrofenilhidrazina	Ultrassom e microextração L-L	0,005
[10]	UV-Vis/ LC-MS	Ácido cromotrópico Dimedona	Destilação simples com ácido sulfúrico	- 14
[55]	UV-Vis	Rodamina B	Destilação simples com ácido fosfórico	0,003
[54]	UV-Vis	Acetilacetona	Imersão	0,8
[56]	UV-Vis	Acetilacetona	Imersão	0,03
[57]	Fluorimetria	Cicloexano-1,3-diona	Ultrassom	0,00002
[58]	Fluorimetria	Rodamina 6G	Ultrassom	0,02
Procedimentos desenvolvidos	UV-Vis	Acetilacetona	Destilação simples	0,02
	SWV		com ácido fosfórico	0,05

* LD Limite de detecção

Os reagentes utilizados nos métodos colorimétricos são a acetilacetona, o ácido cromotrópico, e a Rodamina B. O reagente utilizado nos métodos cromatográficos é a 2,4-dinitrofenilhidrazina. Os reagentes utilizados nos métodos fluorimétricos são o Cicloexano-1,3-diona e a Rodamina 6G. O ácido cromotrópico apresenta como desvantagem o uso de quantidade relativamente elevada de ácido sulfúrico concentrado, solução com 72% de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Essa quantidade de ácido sulfúrico concentrada não se adequa aos princípios da química verde que propõem o uso de soluções mais diluídas de ácidos para diminuição da

quantidade de resíduos e consequentemente menor impacto ambiental [105]. Outra desvantagem desse método é a interferência de acetaldeído e o método não apresenta boa sensibilidade [106]

Entre os procedimentos colorimétricos relatados na literatura, um dos mais utilizadas para quantificação de formaldeído é o método da acetilacetona. As maiores vantagens do sistema proposto é a alta seletividade para o formaldeído, sem interferência relevante de outros aldeídos, principalmente acetaldeído. Uma das desvantagens desse método é que a reação entre o formaldeído e o reagente de Nash tem cinética lenta [60,61].

Apesar de alguns trabalhos que utilizam a rodamina B e rodamina 6G garantirem que não há interferência de outras substâncias na determinação de formaldeído, é possível encontrar na literatura artigos utilizando esses compostos para determinação de outras substâncias, principalmente nitrito [107]. A desvantagem do uso da rodamina B é a interferência de acetaldeído. A desvantagem do uso da rodamina 6G é a interferência de acetaldeído, cloreto e fosfato. Ambos reagentes utilizam ácido sulfúrico, geralmente 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 3 mol L^{-1} [107].

O Cicloexano-1,3-diona é utilizado para formar compostos com fluorescência mais intensa quando comparado com a acetilacetona. A desvantagem do uso deste reagente é que a reação não é seletiva para formaldeído, outros aldeídos tais como acetaldeído, propanaldeído e n-butiraldeído interferem na reação [108]

O procedimento em fluxo com multicomutação proposto neste trabalho apresenta LD de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ e o procedimento eletroquímico proposto neste trabalho apresenta LD de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, portanto os procedimentos propostos apresentaram detectabilidade semelhantes. Quando comparados com outros procedimentos propostos na Tabela 11 nota-se que os procedimentos fluorimétricos e o procedimento cromatográfico possuem melhor sensibilidade. Apesar da fluorimetria possuir a melhor sensibilidade, têm como desvantagens o uso de

instrumentação complexa e de alto custo e também maior efeito de interferentes. O procedimento cromatográfico também possui menor LD, quando comparado com os dois procedimentos propostos, mas a grande desvantagem do uso da cromatografia líquida é a grande quantidade de reagentes utilizados, e por consequência grande quantidade de resíduos gerados. A interferência de outras substâncias que possuem grupo carbonila, tais como acetaldeído e cetona é outra desvantagem. Além disso a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas apresenta um custo elevado.

Nota-se que somente dois trabalhos foram feitos utilizando sistema de análises em fluxo e ambos apresentam maior frequência analítica que o método proposto neste trabalho que é de 17 amostras h^{-1} [56,57]. Mas isso pode ser explicado pelo fato do sistema em fluxo com multicomutação proposto neste trabalho ser menos complexo que ambos.

Em relação ao tipo de extração de formaldeído na amostra de cogumelo, pode-se utilizar a destilação simples com ácido sulfúrico ou fosfórico, ultrassom ou ultrassom seguida de extração líquido-líquido e simplesmente imersão em água. Foram feitos estudos iniciais para possível utilização do ultrassom como técnica extratora, mas não foi possível utilizá-la devido a coloração da solução final que interferia nos resultados de absorbância detectados no espectrofotômetro. Somente a imersão da amostra em água também apresentava coloração que atrapalhava na leitura das amostras. Portanto, ambos os métodos propostos neste trabalho utilizaram a extração com ácido fosfórico 10%, optou-se por utilizar o ácido fosfórico 10% baseado no trabalho de Yi Zhu e colaboradores [80].

A Tabela 12 mostra as características analíticas do método da acetilacetona em batelada, sistema em fluxo com multicomutação e eletroquímico com voltametria de onda quadrada. Nota-se que com a utilização do sistema em fluxo multicomutado é possível diminuir a quantidade de resíduos gerados, é possível fazer análises químicas precisas fora do estado de equilíbrio, bem como diminuir contaminações e desperdício de reagentes e amostras. Em

relação a detecção eletroquímica com voltametria de onda quadrada nota-se que a faixa linear é mais abrangente quando comparamos com a detecção espectrofotométrica.

Tabela 12: Características analíticas dos métodos desenvolvidos e no método em batelada.

Características Analíticas	Batelada [97]	Multicomutação	Eletroquímico
Consumo de amostra	8,6 mL	0,8 mL	4,3 mL
Consumo de acetilacetona	3,12 mg	10,9 mg	1,56 mg
Consumo de acetato de amônio	234 mg	30 mg	117 mg
Resíduo gerado	10 mL	4,2 mL	5 mL
Faixa linear	–	0,2 – 7,0 mg L ⁻¹	0,4 – 40 mg L ⁻¹
Limite de detecção	0,02 mg L ⁻¹	0,02 mg L ⁻¹	0,05 mg L ⁻¹
Limite de quantificação	0,06 mg L ⁻¹	0,06 mg L ⁻¹	0,17 mg L ⁻¹

4.7. Comparação de diferentes trabalhos empregando técnicas eletroanalíticas para determinação de formaldeído

Na literatura são encontrados diversos trabalhos empregando técnicas eletroanalíticas para determinação de formaldeído[68,69,98,101–103,110,112]. De acordo com a Tabela 13, os trabalhos que empregam eletrodos não modificados geralmente determinam este analito indiretamente, diferentemente dos trabalhos que empregam eletrodos modificados que determinam este analito diretamente.

Em relação aos trabalhos que empregam eletrodos não modificados, percebe-se que a utilização do eletrodo de ouro, por apresentar janela de potencial mais ampla do que o eletrodo de carbono vítreo, possibilitou a determinação direta de formaldeído [109]. No entanto, o LD de 0,39 mg L⁻¹ do trabalho empregando eletrodo de ouro [109] foi superior ao LD de 0,05 mg

L^{-1} do procedimento desenvolvido. Nota-se que o trabalho utilizando eletrodo de mercúrio de gota estática utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina [110], além de apresentar LD superior ao do procedimento desenvolvido tem como desvantagem a utilização do eletrodo de mercúrio que não é comumente utilizado devido à toxicidade, além da 2,4-dinitrofenilhidrazina não ser seletiva para formaldeído. O outro trabalho emprega eletrodo de carbono vítreo e determinação indireta utilizando NAD^{+} -Hexacianoferrato (III) [69], mesmo apresentando LD inferior ao do procedimento desenvolvido o emprego do biosensor NAD^{+} apresenta algumas desvantagens, bem como, alto custo, instabilidade, tempo de análise longo e, em alguns casos, não apresenta resultados reprodutíveis [111].

Em relação aos trabalhos que empregam eletrodos modificados, percebe-se que todos os trabalhos fazem determinação direta de formaldeído [68,98,101–103,112]. A grande maioria dos trabalhos que empregam eletrodos modificados apresenta LD superior ao do procedimento desenvolvido [68,98,101,102]. Os trabalhos empregando eletrodo de carbono vítreo com nanofios de paládio [103] e eletrodo de ouro com NAD^{+} depositado na membrana nafion [112] apresentaram LD menor que o do procedimento desenvolvido, sendo que apresentam como desvantagem a necessidade de modificação do eletrodo que eleva o custo do procedimento, o eletrodo quimicamente modificado apresenta menor tempo de vida útil, além da desvantagem descrita no parágrafo anterior sobre o uso de biosensores (NAD^{+}).

O valor de LD do procedimento desenvolvido apresentou resultado melhor que a maioria dos trabalhos apresentados na Tabela 13, apresentando uma abordagem alternativa viável para determinação de formaldeído sem a necessidade da etapa de modificação do eletrodo.

Tabela 13: Trabalhos empregando técnicas eletroanalíticas relacionados a quantificação de formaldeído.

Referência	Técnica	Determinação	Eletrodo	LD (mg L ⁻¹)
[110]	Polarografia de onda quadrada	2,4-dinitrofenilhidrazina	Mercúrio de gota estática	0,25
[69]	Amperometria	NAD ⁺ – Hexacianoferrato (III)	CV	0,01
[109]	Amperometria pulsada	Direta	Ouro	0,39
[101]	Cronoamperometria	Direta	Ouro platinizado	1,50
[98]	Voltametria cíclica	Direta	CV com grafeno e nanopartículas de platina	1,2
[102]	Amperometria	Direta	Pasta de carbono com nano-zeólito de Níquel	0,17
[68]	Voltametria cíclica	Direta	CV com nanocompósitos de platina, paládio e grafeno	0,08
[112]	Voltametria de pulso diferencial	Direta	Ouro com NAD ⁺ depositado na membrana de nafion	0,016
[103]	Amperometria	Direta	CV com nanofios de paládio	0,015
Procedimento Desenvolvido	Voltametria de onda quadrada	Acetilacetona	CV	0,05

* LD Limite de detecção

Capítulo 5: Conclusão

5. Conclusão

Conclui-se que os procedimentos desenvolvidos apresentaram características analíticas similares e permitem a determinação de formaldeído em cogumelos, devido à adequada seletividade e sensibilidade, além de serem procedimentos simples, rápidos e com redução na quantidade de reagentes e resíduos gerados em comparação com os métodos cromatográficos para a determinação deste aldeído em amostras de alimentos. Além disso, este é o primeiro trabalho que utiliza o método da acetilacetona baseado na reação de Hantzsch com detecção voltamétrica.

Para confirmar a exatidão dos procedimentos desenvolvidos foi feito o teste t pareado de Student com nível de confiança de 95%, após confirmação feita pelo teste F que os desvios eram comparáveis entre si. As concentrações de formaldeído obtidas para todas amostras de cogumelo foram concordantes entre si, o que confirma a exatidão e viabilidade dos procedimentos propostos. Foram feitos estudos de adição e recuperação e os resultados de ambos os métodos tiveram recuperações satisfatórias para adições de formaldeído, confirmando a ausência do efeito de matriz e também boa precisão.

Capítulo 6: Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- [1] CECILL, H. F.; JOHNSON, F. B.; WHITINING, J.; ROLLER, P. P. Formaldehyde Fixation. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 845–853, 2009.
- [2] The Truth About Formaldehyde in the Workplace. Disponível em: <<http://blog.watsonfurniture.com/truth-about-formaldehyde-in-the-workplace>>. Acesso em: 2 jan. 2017.
- [3] GERBERICH, H. R.; SEAMAN, G. C. Formaldehyde. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, v. 12, p. 107–128, 2005.
- [4] BRUICE, P. Y. Química Orgânica. 2ª ed. São Paulo: Pearson Education, 2006.
- [5] IPCS (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY AND THE EUROPEAN COMMISSION). Formaldehyde. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0275.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2017.
- [6] MACKISON, F. W.; STRICOFF, R. S.; PARTRIDGE, L. J. Pocket Guide to Chemical Hazards. 3ª ed. Washington, DC: Niosh/OSHA, 1981.
- [7] INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). Formol ou Formaldeído. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=795#topo>. Acesso em: 15 fev. 2017.
- [8] DELFINO, E.; MACHADO, S. Principais Carbonilas no ar de locais públicos no Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 249–253, 2008.
- [9] ARTS, J. H. E.; RENNEN, M. A. J.; DE HEER, C. Inhaled formaldehyde: Evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 144–160, 2006.

- [10] MASON, D. J.; SYKES, M. D.; PANTON, S. W.; RIPPON, E. H. Determination of naturally-occurring formaldehyde in raw and cooked Shiitake mushrooms by spectrophotometry and liquid chromatography-mass spectrometry. **Food additives and contaminants**, v. 21, n. 11, p. 1071–1082, 2004.
- [11] BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Aproveitamento de resíduo de curtume como suplemento no cultivo de *Pleurotus Ostreatus*. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 75, n. 2, p. 243–246, 2008.
- [12] SUBRAMANIAN, C. V. Mushrooms: Beauty, diversity, relevance. **Current Science**, v. 69, n. 12, p. 986–997, 1995.
- [13] KUES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 141–152, 2000.
- [14] ROYSE, D. J. A Global Perspective on the High Five : *Agaricus* , *Pleurotus* , *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, p. 1–6, 2014.
- [15] CHANG, S. T. World Production of Cultivated Edible and Medicinal Mushrooms in 1997 with Emphasis on *Lentinus edodes*. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, n. 4, p. 291–300, 1997.
- [16] UNITED STATES INTERNATIONAL TRADE COMMISSION. Mushrooms. Industry & Trade Summary. Office of Industries, 2010. Disponível em: <http://www.usitc.gov/publications/332/ITS_7.pdf>.
- [17] URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. 2ª ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

- [18] WASSER, S. P. Shiitake (*Lentinus edodes*). Encyclopedia of Dietary Supplements, p. 653–664, 2005.
- [19] CHANG, S. T.; MILES, P. G. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [20] PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. Shiitake Growers Handbook: The Art and Science of Mushroom Cultivation. 1^a ed. Dubuque: Kendall Hunt, 1988.
- [21] HARRIS, B. Growing shiitake commercially. 2^a ed. Tennessee: Science Technology, 1993.
- [22] FUJII, T.; MAEDA, H.; SUZUKI, F.; ISHIDA, N. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS2, extracted from culture mycelia of *Lentinula edodes*. **The Journal of antibiotics**, v. 31, n. 1, p. 1079–1090, 1978.
- [23] CHIHARA, G. Antitumor and immunological properties of polysaccharides from fungal origin. **Mushroom Science**, v. 9, n. 2, p. 797–814, 1978.
- [24] YAMAMURA, Y.; COCHRAN, K. W. Chronic hypocholesterolemic effect of *Lentinus edodes* in mice and absence of effect on scrapie. International Congress on the science and cultivation of edible fungi. Tokyo, 1974.
- [25] HIROMOTO, B. T. Comparative analysis of shiitake culture systems. International Congress on the science and cultivation of edible fungi. Dublin, 1991.
- [26] LEVANON, D.; ROTHSCILDD, N.; DANAI, O.; MASAPHY, S. Bulk treatment of substrate for the cultivation of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) on straw. **Bioresource Technology**, v. 45, p. 63–64, 1993.

- [27] BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. *International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Pennsylvania State University, 1996.
- [28] EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1996.
- [29] Toras de eucalipto são ideais para o cultivo de cogumelos. Disponível em: <http://www.folhalitoral.com.br/site/?p=noticias_ver&id=2939>. Acesso em: 4 fev. 2017.
- [30] PICCININ, E. Cultivo do Cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*) Em Toras de Eucalipto: Teoria e Prática. São Paulo: Escola Superior de Agricultura, 2000.
- [31] ROYSE, D. J.; SCHISLER, L. C.; DIEHLE, D. A. Shiitake Mushrooms Consumption, Production and Cultivation. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 10, n. 4, p. 329–335, 1985.
- [32] YAMANAKA, K. Mushroom cultivation in Japan. *World Society Mushroom Biology and Mushroom Products Bulletin*, 2011. Disponível em: <http://wsmbmp.org/Bulletin_4_Content.html>
- [33] USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). Mushrooms. National Agricultural Statistics Service, Agricultural Statistics Board. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/Mush/Mush-08-20-2014.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2016.
- [34] FENNEMA, R.; PARKIN, K.; DAMODARAN, S. Química de Alimentos de Fennema. 4ª ed. Artmed, 2010.

- [35] KOVÁCS, L.; CSUPOR, D.; LENTE, G.; GUNDA, T. 100 Chemical Myths: Misconceptions, Misunderstandings, Explanations. 1^a ed. Springer International Publishing, 2014.
- [36] FSA (FOOD SAFETY AUTHORITY). Survey of chemical migration from can coatings into food and beverages – 1, Formaldehyde. London: Food Safety Agency, 1998.
- [37] BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M.; MAZIEIRO, R; TRUFEM; S. F. B. Cultivo de Cogumelos Comestíveis. 2^a ed. São Paulo: Icone, 1995.
- [38] COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 582–594, 2002.
- [39] WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 275, n. 3, p. 810–816, 2000.
- [40] SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S. K.; MALLICK, S. K.; MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 8, p. 1287–1297, 2006.
- [41] Shimeji. Disponível em: <<http://www.cogumelosurakami.com.br/variedades-cultivadas/shimeji>>. Acesso em: 2 abr. 2017.
- [42] LI, Y. Present Development Situation and Tendency of Edible Mushroom Industry in China. **Mushroom Science**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2012.
- [43] SÁNCHEZ, J. E.; MATA, G. Hongos Comestíveis en Iberoamérica: investigacion y desarrollo en un entorno multicultural. Tapachula, México: El Colegio de la Frontera Sur, 2012.

- [44] IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Formaldehyde , 2-Butoxyethanol, 2006.
- [45] WARTEM, G. A. The Health Hazards of Formaldehyde. **Journal of Applied Toxicology**, v. 3, n. 3, p. 121–126, 1983.
- [46] KITCHENS, J. F.; CASTNER, R. E.; EDWARDS, G. S.; HARWARD III, W. E.; MACRI, B. Investigation of selected potential environmental contaminants: formaldehyde. Washington DC, 1976.
- [47] NEWELL, G. W. Overview of formaldehyde. In: GIBSON, J. E. (Ed.). Formaldehyde Toxicity. Washington DC: Hemisphere Publishing, p. 2–12, 1983
- [48] OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Formaldehyde. Air Quality Guidelines- Second Edition, v. 3, p. 1–25, 2001.
- [49] ZURLO, N. Occupational Health and Safety. 1^a ed. San Francisco: McGraw-Hill, 1971.
- [50] USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Formaldehyde, 1989. Disponível em: < <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/formaldehyde.pdf>> Acesso em 28 fev. 2017.
- [51] OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Guidelines for Drinking-water Quality. 2^a ed. Geneva. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf>. Acesso em 28 fev. 2017.
- [52] OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). Concise International Chemical Assessment Document 40. Geneva, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad40.pdf>>

- [53] COGLIANO, V.; GROOSE, Y.; BAAN, R.; STRAIF, K.; SECRETAN, B.; GHISSASSI F. E. Advice on formaldehyde and glycol ethers. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 9, p. 528, 2004.
- [54] WANG, S.; CUI, X.; FANG, G. Rapid determination of formaldehyde and sulfur dioxide in food products and Chinese herbals. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1487–1493, 2007.
- [55] CUI, X.; FANG, G.; JIANG, L.; WANG, S. Kinetic spectrophotometric method for rapid determination of trace formaldehyde in foods. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, n. 2, p. 253–259, 2007.
- [56] TEERASONG, S.; AMORNTHAMMARONG, N.; GRUDPAN, K.; TESHIMA, N.; SAKAY, T.; NACAPRICHA, D.; RATANAWIMARNWONG, N. A. A Multiple Processing Hybrid Flow System for Analysis of Formaldehyde Contamination in Food. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 629–633, 2010.
- [57] ZHAO, X. Q.; ZHANG, Z. Q. Microwave-assisted on-line derivatization for sensitive flow injection fluorometric determination of formaldehyde in some foods. **Talanta**, v. 80, n. 1, p. 242–245, 2009.
- [58] HE, L.; YANG, X.; REN, M.; KONG, X.; LIU, Y.; LIN, W. An ultra-fast illuminating fluorescent probe for monitoring formaldehyde in living cells, shiitake mushrooms, and indoors. **Chem. Commun.**, v. 52, n. 61, p. 9582–9585, 2016.
- [59] LIU, J. F.; PENG, J. F.; CHI, Y. G.; JIANG, G. B. Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. **Talanta**, v. 65, n. 3, p. 705–709, 2005.
- [60] NASH, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 416–417, 1953.

- [61] CASTELL, C. H.; SMITH, B. Measurement of Formaldehyde in Fish Muscle Using TCA Extraction and the Nash Reagent. **Fisheries Research Board of Canada**, v. 30, n. 1, p. 91–98, 1973.
- [62] SALTHAMMER, T.; MENTESE, S.; MARUTZKY, R. Formaldehyde in the indoor environment. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 4, p. 2536–2572, 2010.
- [63] SOUSA, E. T.; DE OLIVERA, F. S.; ALVES, A. C.; DE ANDRADE, J. B. A semi-continuous analyzer for the fluorimetric determination of atmospheric formaldehyde. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 259–265, 2009.
- [64] GEORGHIOU, P. E.; HO, C. K. J. The chemistry of the chromotropic acid method for the analysis of formaldehyde. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, p. 871–876, 1989.
- [65] NASCIMENTO, R. F.; CERRONI, J. L.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 350–356, ago. 1998.
- [66] MOPPER, K.; STAHOVEC, W. L.; JOHNSON, L. Trace analysis of aldehydes by reversed-phase high-performance liquid chromatography and precolumn fluorogenic labeling with 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione. **Journal of Chromatography A**, v. 256, p. 243–252, 1983.
- [67] LIPARI, F.; SWARIN, S. J. Determination of formaldehyde and other aldehydes in automobile exhaust with an improved 2,4-dinitrophenylhydrazine method. **Journal of Chromatography A**, v. 247, n. 2, p. 297–306, 1982.

- [68] QIAO, J.; CHANG, J.; WANG, H.; SUN, T.; DONG, C. Determination of Formaldehyde with a Platinum–Palladium–Graphene Nanocomposite Glassy Carbon Electrode. **Analytical Letters**, v. 50, n. 1, p. 80–90, 2017.
- [69] NONIDEZ, K. M. J. Amperometric determination of formaldehyde via the hexacyanoferrate(III) - coupled dehydrogenase reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 233, p. 59–63, 1990.
- [70] KORPAN, Y. I.; GONCHAR, M. V.; STARODUB, N. F.; SHULGA, A. A.; SIBIRNY, A. A.; EL'SKAYA, A. V. A cell biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive transistors coupled to methylotrophic yeast cells with genetically adjusted metabolism. **Analytical biochemistry**, v. 215, p. 216–222, 1993.
- [71] KORPAN, Y. I.; GONCHAR, M. V.; SIBIRNY, A. A.; MARTELET, C.; EL'SKAYA, A. V.; GIBSON, T. D.; SOLDATKIN, A. P. Development of highly selective and stable potentiometric sensors for formaldehyde determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 1–2, p. 77–83, 2000.
- [72] KORPAN, Y. I.; SOLDATKIN, A. P.; GONCHAR, M. V.; SIBIRNY, A. A.; GIBSON, T. D.; EL'SKAYA, A. V. A Novel Enzyme Biosensor Specific for Formaldehyde Based on pH-Sensitive Field Effect Transistors. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 68, p. 209–213, 1997.
- [73] DZYADEVYCH, S. V.; ARKHYPOVA, V. N.; KORPAN, Y. I.; EL'SKAYA, A. V.; SOLDATKIN, A. P.; RENAULT, N. J.; MARTELET, C. Conductometric formaldehyde sensitive biosensor with specifically adapted analytical characteristics. **Analytica Chimica Acta**, v. 445, n. 1, p. 47–55, 2001.

- [74] HERSCHKOVITZ, Y.; ESHKENAZI, I.; CAMPBELL, C. E.; RISHPON, J. Electrochemical biosensor for formaldehyde. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 491, n. 1–2, p. 182–187, 2000.
- [75] KATAKY, R.; BRYCE, M. R.; GOLDENBERG, L.; HAYES, S.; NOWAK, A. A biosensor for monitoring formaldehyde using a new lipophilic tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane salt and a polyurethane membrane. **Talanta**, v. 56, n. 3, p. 451–458, 2002.
- [76] KATO, N.; KANO, M.; TANI, Y.; OGATA, K. Purification and Characterization of Formaldehyde Dehydrogenase in a Methanol-utilizing Yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 13, p. 2411–2419, 1972.
- [77] TYIHÁK, E.; BLUNDEN, G.; YANG, M. Formaldehyde, as its dimedone adduct, from *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 211–215, 1996.
- [78] YAMAZAKI, H.; OGASAWARA, Y.; SAKAI, C.; YOSHIKI, M.; MAKINO, K.; KISHI, T.; KAKIUCHI, Y. Studies on formaldehyde in *Lentinus edodes*. **Journal of the Food Hygiene Society of Japan**, v. 21, n. 3, p. 165–170, 1980.
- [79] YASUMOTO, K.; IWAMI, K.; MITSUDA, H. A new sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine. **Agricultural and biological chemistry**, v. 35, n. 13, p. 2059–2069, 1971.
- [80] ZHU, Y.; PENG, Z.; WANG, M.; WANG, R.; RUI, L. Optimization of extraction procedure for formaldehyde assay in smoked meat products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 1, p. 1–7, 2012.
- [81] RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145–157, 1975.

- [82] FREIRE DOS REIS, B. Análise Química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 1, n. 19, p. 51–58, 1996.
- [83] SILVA, M. F. C. G. Voltametria Cíclica — Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reações Induzidas por Transferência Electronica. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, n. 70, p. 20–26, 1998.
- [84] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principles of Instrumental Analysis. 5^a ed. Philadelphia: Saunders College, 1998.
- [85] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. Electrochemistry. Principles, methods and applications. Almedina, Coimbra: Oxford University, 1996.
- [86] MABBOTT, G. A. An introduction to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 697–702, 1983.
- [87] KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. Cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 702–706, 1983.
- [88] BARD, A.J.; STRATMANN, M.; UNWIN, P. R. Encyclopedia of Electrochemistry, v. 3, Instrumentation and Electroanalytical Chemistry. New York: Wiley, 2003.
- [89] DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.
- [90] O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. A. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 695-701, 1981.
- [91] DE SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, 2004.

- [92] WALKER, J. F. Formaldehyde. 3^a ed. New York: Reinhold, 1964.
- [93] LEBLANC, E. L.; LEBLANC, R. J.; ERVIN, D. M. Comparison of Three Methods of Formaldehyde Determination on Frozen Sole, Pollock, Haddock and Cod Fillets. **Journal of Food Biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 79–96, 1988.
- [94] ROCHA, F. R.; BOAVENTURA, F. R.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, n. 1, p. 119–131, 2002.
- [95] BELMAN, S. The fluorimetric determination of formaldehyde. **Analytica Chimica Acta**, v. 29, n. C, p. 120–126, 1963.
- [96] BISGAARD, P.; MOLHAVE, L.; RIETZ, B.; WILHARDT, P. Quantitative Determination of Formaldehyde In Air Using the Acetylacetone Method. **Analytical Letters**, v. 16, n. A17,18, p. 1457–1468, 1983.
- [97] SILVEIRA, D.; FERNADES, J. O.; PEREIRA, E. A. Avaliação de diferentes reagentes colorimétricos para a determinação de formaldeído em amostras de ar em ambientes internos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.
- [98] CHEN, Y.; LIU, X.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; LI, L.; CAO, Z.; WANG, H.; JIA, G.; GAO, Y.; LIU, J. Electrocatalytic oxidation of formaldehyde on direct electrodeposited graphene–platinum nanoparticles composites electrode. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3915–3919, 2013.
- [99] DE LIMA, R. B.; MASSAFERA, M. P.; BATISTA, E. A.; IWASITA, T. Catalysis of formaldehyde oxidation by electrodeposits of PtRu. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 603, n. 1, p. 142–148, 2007.

- [100] ENYO, M. Anodic formaldehyde oxidation on Pt, Pd, Au and Pd-Au alloy electrodes in NaOH and Na₂CO₃ solutions. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 15, n. 6, p. 907–911, 1985.
- [101] DEMKIV, O.; SMUTOK, O.; GONCHAR, M.;. A Reagentless Amperometric Formaldehyde-Selective Chemosensor Based on Platinized Gold Electrodes. **Materials**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2017.
- [102] AZIZI, S. N.; GHASEMI, S.; AMIRIPOUR, F. Nickel/P nanozeolite modified electrode: A new sensor for the detection of formaldehyde. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 227, p. 1–10, 2016.
- [103] ZHANG, Y.; ZHANG, M.; CAI, Z.; CHEN, M.; CHENG, F. A novel electrochemical sensor for formaldehyde based on palladium nanowire arrays electrode in alkaline media. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 172–177, 2012.
- [104] GOSSER, D. K. Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms. New York: VCH, 1994.
- [105] PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 738–744, 2003.
- [106] GRYLLAKI-BERGER, M.; MUGNY, C.H.; PERRENOUD, D.; PANNATHER, A.; FRENK, E. A comparative study of formaldehyde detection using chromotropic acid, acetylacetone and HPLC in cosmetics and household cleaning products. **Contact Dermatitis**, v. 26, p. 149–154, 1992.
- [107] LI, J.; DASGUPTA, P. K.; LUKE, W. Measurement of gaseous and aqueous trace formaldehyde: Revisiting the pentanedione reaction and field applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 531, n. 1, p. 51–68, 2005.

- [108] SAWICKI, E.; CARNES, R. A. Spectrophotofluorimetric determination of aldehydes with dimedone and other reagents. **Mikrochimica Acta**, v. 56, n. 1, p. 148–159, 1968.
- [109] NGAMCHANA, S.; SURAREUNGCHAI, W. Sub-millimolar determination of formalin by pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 510, n. 2, p. 195–201, 2004.
- [110] YILMAZ, B.; KUCUKOGLU, K.; ASCI, A.; ALBAYRAK, M. Determination of Formaldehyde in Human Tissue through Derivatization with 2,4-Dinitrophenylhydrazine by Square Wave Polarography Method. **International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 4–9, 2016.
- [111] CHAPLIN, M. Enzyme Technology. The use of enzymes in analysis. Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/analysis.html>>. Acesso em: 15 maio. 2017.
- [112] MARZUKI, N. I.; BAKAR, F. A.; SALLEH, A. B.; HENG, L. Y.; YOSOF, N. A.; SIDDIQUEE, S. Development of electrochemical biosensor for formaldehyde determination based on immobilized enzyme. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 7, p. 6070–6081, 2012.