



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
Curso de Graduação em Química: Licenciatura
Rua Vinte, 1600, Bairro Tupã, CEP 38304-402, Ituiutaba/MG



Giulia Côrtes Pereira Freitas

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ÁCIDO SALICÍLICO EM
AMOSTRAS DE LEITE COM UM ELETRODO DE FIO DE COBRE**

ITUIUTABA

2026

GIULIA CÔRTEZ PEREIRA FREITAS

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ÁCIDO SALICÍLICO EM
AMOSTRAS DE LEITE COM UM ELETRODO DE FIO DE COBRE**

Trabalho de Conclusão de Curso à Comissão
Avaliadora como parte das exigências do
Curso de Graduação em Química:
Licenciatura do Instituto de Ciências Exatas
e Naturais do Pontal da Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Santos

ITUIUTABA

2026

GIULIA CÔRTEZ PEREIRA FREITAS

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE ÁCIDO SALICÍLICO EM
AMOSTRAS DE LEITE COM UM ELETRODO DE FIO DE COBRE**

Trabalho de Conclusão de Curso à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Licenciatura do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

Ituiutaba, 13/03/2026

COMISSÃO AVALIADORA:

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

Profª. Dra. Bruna Cláudia Lourenção

Prof. Dr. André Luiz dos Santos (Orientador)

DEDICATÓRIA

A meus pais, que sempre me
garantiram o privilégio de estudar,
mesmo com todas as dificuldades
que passamos até hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Cristiane e Luiz Carlos, que me ensinaram que o que eu aprendo ninguém me tira, que me mostraram inúmeros lugares maravilhosos e se pudessem teriam me mostrado o mundo. Que priorizaram minha educação desde o início e com a universidade em outra cidade, conseguiram me sustentar e me apoiar do início ao fim dessa jornada que não foi fácil. Também ao meu irmão Enzo por sua companhia, permitindo-me ser criança também, sempre tirando minha cabeça da universidade durante as férias.

Aos amigos que fiz, aos que ficaram para trás e aos que eu nunca vou deixar, Bela, Carol Fogo, Vivian, Fred, Mateus Boenso, agradeço por estarem comigo nos momentos bons, nos ruins, nos chatos, nos divertidos, sozinha teria sido impossível passar por esses 5 anos (quase 4,5) de curso.

À minha turma da universidade com seus agregados, Francidalva, Kadu, João Eterno, Mateus Boenso, Luiz e Fred, que desde o início foi a turma certa, tivemos nossas perdas, dos colegas que desistiram, mas sempre nos mantivemos unidos em todas as disciplinas.

À minha professora de química do 9º ano, Angélica, a primeira que fez com que eu me apaixonasse pela matéria. Aos meus professores e professoras do ensino médio e do curso técnico, cada um foi importante da própria maneira para meu crescimento e responsável por eu ter chegado até aqui.

Aos meus professores e professoras do campus Pontal por me ensinarem que a química é mais complexa e mais bonita do que vemos na escola e que ainda tenho muito a aprender, sobre ser química e sobre ser professora.

Aos meus orientadores, André e Regina, sem os quais eu não teria esse trabalho que é tão querido, agradeço por suas brigas e seus conselhos dentro e fora do laboratório, sem vocês não conheceria o mundo acadêmico da mesma forma.

Ao meu grupo de pesquisa GPMEL, pelo apoio na hora da pesquisa, na escrita de resumos para congressos, nas apresentações, nas horas de descontração.

Aos membros da banca por aceitarem o convite de ler e avaliar meu trabalho.

Ao ICENP/UFU pela infraestrutura concedida para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida. À CAPES, FAPEMIG (Processo. APQ-01316-22) pelos recursos financeiros disponibilizados ao GPMEL, sem os quais, esta pesquisa não seria possível.

EPÍGRAFE

*“Tenho andado distraído
Impaciente e indeciso
E ainda estou confuso, só que agora é diferente
Estou tão tranquilo e tão contente
[...]*”

– Legião Urbana (Quase Sem Querer)

RESUMO

O ácido salicílico (AS) é muito utilizado na indústria dermatológica e farmacêutica graças as suas funções antisséptica, anti-inflamatória e esfoliante, porém seu uso como aditivo alimentício não é permitido. Apesar dessa proibição, casos de adulteração de leite com AS são frequentemente relatados em diversos países. Além de comprometer a qualidade do leite e derivados, esta adulteração representa um grave risco à saúde dos consumidores, demonstrando a relevância de métodos analíticos eficientes para a quantificação de AS em matrizes complexas como o leite. Este trabalho apresenta um método voltamétrico ambientalmente amigável para determinação do AS no leite, com uso de um eletrodo de trabalho fabricado com um fio de cobre comercial, posteriormente submetido a uma modificação química em meio alcalino, para formação de uma camada rica em CuO que protege a superfície do eletrodo contra o envenenamento e melhora a resposta eletroquímica do AS. A técnica empregada foi a voltametria de pulso diferencial que, após otimização de parâmetros, forneceu uma faixa linear de 10 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Outro ponto de destaque é o tratamento da amostra utilizando apenas ZnSO_4 e NaOH, o primeiro precipita as proteínas do leite, o segundo ioniza o AS, facilitando sua extração e posterior detecção. Esse procedimento diminui o consumo de reagentes e amostra, elimina solventes orgânicos e permite pré-tratamento rápido de várias amostras simultaneamente. No estudo de adição e recuperação para amostras fortificadas, as porcentagens de recuperação de AS variaram de 91 a 107%, com valores de RSD de 2,1 a 5,3%, resultados condizentes com o guia da AOAC para avaliação do desempenho de métodos analíticos. Portanto, esse trabalho oferece um procedimento de baixo custo, mais sustentável do que o método estabelecido para a determinação de AS em alimentos e com desempenho analítico satisfatório, configurando uma estratégia promissora para a quantificação de AS em amostras de leite.

Palavras-chave: Voltametria de Pulso Diferencial, Ácido Salicílico, Leite, Eletroanálise.

ABSTRACT

Salicylic acid (SA) is widely used in the dermatological and pharmaceutical industries due to its antiseptic, anti-inflammatory, and exfoliating properties; however, its use as a food additive is not permitted. Despite this prohibition, cases of milk adulteration with SA are frequently reported in several countries. Besides compromising the quality of milk and dairy products, this adulteration represents a serious health risk to consumers, demonstrating the relevance of efficient analytical methods for the quantification of SA in complex matrices such as milk. This work presents an environmentally friendly voltammetric method for the determination of SA in milk, using a working electrode made of commercial copper wires, subsequently subjected to a chemical modification in an alkaline medium to form a CuO-rich layer that protects against electrode fooling and improves the electrochemical response of SA. The technique employed was Differential pulse voltammetry, which, after parameter optimization, yielded a linear range of 10 to 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a detection limit of 3.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Another highlight is the sample treatment using only ZnSO_4 and NaOH, the former precipitates milk proteins, while the latter ionizes the SA, facilitating its extraction and subsequent detection. This procedure reduces reagent and sample consumption, eliminates organic solvents, and allows for rapid pre-treatment of multiple samples simultaneously. In the spike-and-recovery study for fortified samples, the recovery percentages of AS ranged from 91 to 107%, with RSD values from 2.1 to 5.3%, results consistent with the AOAC guidelines for evaluating the performance of analytical methods. Therefore, this work offers a low-cost procedure, more sustainable than the established method for determining AS in food, and with satisfactory analytical performance, representing a promising strategy for the quantification of AS in milk samples.

Keywords: Differential Pulse Voltammetry, Salicylic Acid, Milk, Electroanalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da molécula do ácido salicílico.	13
Figura 2. (a) Imagem dos componentes usados para fabricação do eletrodo de trabalho de cobre (Cu-WE): (A1) ponteira descartável, (A2) Fio de cobre, e (A3) eletrodo montado. (b) Imagem mostrando a superfície do Cu-WE.	18
Figura 3. Imagens (a) do eletrodo de cobre montado com as partes indicadas, (b) da superfície polida.	19
Figura 4. Voltamograma cíclico do eletrodo de Cu recém polido ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH a 50 mV s ⁻¹	21
Figura 5. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Cu recém polido ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH a 50 mV s ⁻¹	23
Figura 6. Gráficos de corrente (μ A) vs. tempo (s) obtidos nas mesmas condições experimentais do voltamograma cíclico da Figura 4. A área hachurada de cada replicata ilustra a área voltamétrica do pico de oxidação do Cu a Cu ₂ O, e foram utilizadas para se estimar a ECSA do eletrodo de Cu.	24
Figura 7. Voltamogramas cíclicos sucessivos do eletrodo de Cu recém polido ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados com potencial de 0 a +0,75 V, a 100 mV s ⁻¹ em NaOH a 0,1 mol L ⁻¹	25
Figura 8. Imagens por MEV (a) eletrodo de Cu. (b) eletrodo de Cu/CuO.	26
Figura 9. Potencial de circuito aberto em função do tempo para o eletrodo de Cu e de Cu/CuO.	27
Figura 10. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Cu ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH a 100 mV s ⁻¹ , na presença e na ausência de 3,0 mmol L ⁻¹ de AS.	28
Figura 11. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Cu/CuO ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH, na presença e na ausência de 3,0 mmol L ⁻¹ de AS.	29
Figura 12. Três voltamogramas cíclicos registrados na presença de 3 mmol L ⁻¹ de AS, em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH, com o mesmo eletrodo de Cu, mas com três condicionamentos independentes.	30
Figura 13. Voltamogramas cíclicos sucessivos registrados na presença de 3 mmol L ⁻¹ de AS, entre 0 e +0,75 V a 100 mV s ⁻¹ em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH, utilizando um mesmo eletrodo de Cu/CuO. A solução foi submetida a 30 s de agitação magnética entre cada ciclo.	31
Figura 14. Voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH contendo 3 mmol L ⁻¹ de AS a 100 mV s ⁻¹ com diferentes eletrodos de trabalho. (—) Cu/CuO ($\varnothing = 1,3$ mm); (—) Pt ($\varnothing = 3,0$ mm); (—) GCE ($\varnothing = 3,0$ mm).	32
Figura 15. Sequência reacional simplificada da reação de eletrooxidação do AS.	32
Figura 16. Voltamogramas cíclicos registrados com o eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L ⁻¹ de NaOH contendo 3,0 mmol L ⁻¹ de AS à 100 mV s ⁻¹ . A linha pontilhada preta e a linha vermelha correspondem a varreduras sucessivas, enquanto a linha pontilhada verde corresponde ao voltamograma cíclico registrado após agitação da solução.	33

Figura 17. (a) Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura de potencial com o eletrodo de Cu/CuO. Medidas realizadas em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 3,0 mmol L⁻¹ de AS. (b) gráfico de log i_{pa} vs. log v. ----- 34

Figura 18. (a) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 50 μmol L⁻¹ de AS, com as condições: (—) iniciais: ΔE = 25 mV; largura de pulso = 50 ms; step = 2 mV. (—) otimizadas: ΔE = 50 mV; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. (b) Voltamogramas de onda quadrada com correção de linha de base registrado com eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 100 μmol L⁻¹ de AS, com as condições: (—) iniciais: ΔE = 25 mV; f = 25 Hz; ΔEs = 2 mV. (—) otimizadas: ΔE = 25 mV; f = 50 Hz; ΔEs = 4 mV. ----- 35

Figura 19. Voltamogramas com correção de linha de base para (a) DPV; e (c) SWV; registrados em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com o eletrodo de Cu/CuO, diferentes concentrações de AS e suas condições otimizadas. Com suas respectivas curvas analíticas (b) DPV; e (d) SWV; com as barras de erro representando o desvio padrão da i_{pa} (n = 3). ----- 36

Figura 20. Curvas analíticas realizadas intradia e interdía para o AS com DPV nas condições otimizadas. ----- 37

Figura 21. Sinal voltamétrico para 100 μmol L⁻¹ de AS medido durante 8 dias de trabalho. O tamanho da barra corresponde à média de valores para três medidas e a barra de erro representa o desvio padrão. ----- 38

Figura 22. Influência das possíveis substâncias interferentes sobre i_{pa} relativa de 100 μmol L⁻¹ de AS. As linhas vermelhas tracejadas indicam o intervalo de confiança com 95% de grau de confiança para a média da i_{pa} do AS puro. As barras de erro representam o desvio padrão para a i_{pa} (n = 3) para cada condição. As proporções molares avaliadas de AS para interferentes foram de 1:0,5, 1:1 e 1:10.----- 40

Figura 23. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH na presença de 100 μmol L⁻¹ de AS + concentrações variantes de substâncias interferentes. Condições voltamétricas: ΔE = 50 mV; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS + 50 μmol L⁻¹ de interferentes. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS + 100 μmol L⁻¹ de interferentes. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS + 1000 μmol L⁻¹ de interferentes. ----- 41

Figura 24. Imagens representativas ilustrando as etapas do pré-tratamento das amostras de leite. A) Amostras de leite não tratadas. B) 500 μL das amostras de leite transferidas para o tubo de polipropileno de microcentrífuga de 1,5 mL. C) Amostras após a adição de 100 μL de ZnSO₄ 15% (m/v) e 400 μL de solução aquosa de NaOH 2,5 mol L⁻¹. D) amostras após 10 min de banho ultrassônico. E) Extratos finais das amostras após centrifugação de 5 min a 12000 rpm. Amostras de leite: 1 – Cru; 2 – Integral; 3 – Semidesnatado; 4 – Desnatado; 5 – Integral fortificado com vitaminas; 6 – Integral sem lactose.----- 42

Figura 25. Resultados do AGREEp^{rep} para procedimentos usados da determinação do AS: (A) O método com DPV proposto. (B) O método oficial nº 975,30 da AOAC (AOAC, 2023). (C) O método apresentado por (Gentili *et al.*, 2012). ----- 43

Figura 26. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO no eletrólito e nos extratos finais das amostras de leite. Condições voltamétricas: $\Delta E = 50$ mV; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. Concentrações de AS: (—) 0; (—) 10; (—) 20; (—) 50; (—) 70; (—) 100; (—) 150; (—) 200; (—) 300, e (—) 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. ----- 44

Figura 27. (a) Curvas analíticas obtidas por DPV nos extratos finais diluídos das diferentes amostras de leite. (b) Sensibilidades obtidas e normalizadas para cada um dos extratos diluídos. As sensibilidades foram normalizadas de acordo com a sensibilidade obtida no eletrólito de suporte (considerada como 100%). ----- 45

Figura 28. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO nos extratos finais do leite. (—) Sinal para as amostras fortificadas. (—) Adições sucessivas de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de padrão de AS. Condições voltamétricas: $\Delta E = 50$ mV; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. Os gráficos inseridos mostram as respectivas curvas analíticas. As barras de erro representam o desvio padrão da i_{pa} ($n = 3$). ----- 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalos dos parâmetros experimentalmente avaliados e selecionados para a DPV e para a SWV.----- 35

Tabela 2. Porcentagens de recuperação e determinação das concentrações de AS nas amostras de leite fortificadas. ----- 46

Tabela 3. Desempenho analítico de alguns métodos eletroquímicos de determinação do AS. -- 47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	16
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	17
3.2. INSTRUMENTAÇÃO.....	17
3.3. CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODOS.....	18
3.4. PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE LEITE.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO DE COBRE.....	21
4.2. COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DO AS NO ELETRODO DE COBRE.....	28
4.3. DESEMPENHO ANALÍTICO DA DPV E DA SWV PARA A DETERMINAÇÃO DO AS	34
4.4. SELETIVIDADE PARA O AS	39
4.5. PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE LEITE	41
4.6. ANÁLISE DAS AMOSTRAS	45
5. CONCLUSÕES.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais consumidos do mundo, é rico em proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, todos essenciais para saúde humana. Devido aos seus vários benefícios, sua produção e consumo têm aumentado significativamente, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, servindo de fonte de renda para muitos produtores (Jesus *et al.*, 2024; Nascimento *et al.*, 2017).

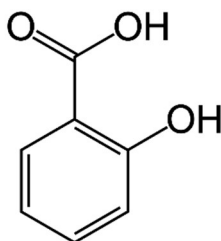
Segundo o Anuário Leite 2025 (Tomich *et al.*, 2025) a média de consumo de lácteos mundial é de 183 litros por habitante/ano, enquanto no Brasil a média é de 188 litros por habitante/ano. A produção brasileira de leite foi de 35,37 bilhões de litros no ano de 2023, sendo que o estado de Minas Gerais produziu 26,63% desse total, com destaque para a mesorregião do Triângulo Mineiro/Alto do Paranaíba (MG) com 6,60% da produção total do país. Além disso, essa atividade está presente em 98% dos municípios brasileiros, majoritariamente em produtores de pequeno e médio porte, contabilizando quase 1 milhão de propriedades e 4 milhões de pessoas empregadas (Tomich *et al.*, 2025).

Considerando os benefícios alimentares e econômicos do leite, a produção desse alimento é de suma importância para a sociedade atual, porém, infelizmente, os casos de adulteração têm aumentado. O processo UHT (do inglês *Ultra High Temperature*) elimina microrganismos e aumenta a durabilidade do leite tornando-o seguro para consumo. No entanto, adulterações podem ocorrer na etapa primária de produção, ou seja, nas fazendas produtoras. Os casos mais comuns de adulteração, envolvem a adição de substâncias com ação conservante, como formaldeído (CH_2O), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hipoclorito de sódio (NaClO) e ácido salicílico (AS). A adição dessas substâncias visa mascarar falhas no processo de armazenamento e transporte e no manejo do gado. Esses adulterantes são prejudiciais à saúde humana, causando problemas gastrointestinais, falência de rins, inflamações, sangramentos e mais complicações a longo prazo (Azad; Ahmed, 2016; Nascimento *et al.*, 2017). Não obstante, manter a integridade do leite é essencial para proporcionar o consumo seguro desse alimento tão essencial na dieta humana, assim como de seus derivados.

Dentre os conservantes proibidos, o ácido salicílico (AS), também conhecido como ácido 2-hidroxibenzoico de acordo com a nomenclatura IUPAC, é um composto fenólico originado de plantas, constituído por um anel benzênico com grupos carboxila ($-\text{COOH}$) e hidroxila ($-\text{OH}$) em posição orto, conforme mostrado na Figura 1. Sua estrutura garante propriedades únicas, como acidez moderada ($\text{pK}_a \approx 3$), e alguns efeitos bioativos, como

ação antisséptica, anti-inflamatória e esfoliante. Além disso, é um precursor do ácido acetilsalicílico, utilizado em analgésicos, tornando o AS amplamente utilizado na indústria farmacêutica, dermatológica e de cosméticos (Macario; López; Blanco, 2024).

Figura 1. Representação da molécula do ácido salicílico.



Mesmo sendo proibido, o AS ainda tem sido ilicitamente adicionado ao leite com as concentrações variando de 0,04 – 0,05 % (m/m). Apesar da dose oral fatal para adultos (de aproximadamente 70 Kg) ser de 20 a 30 g, a quantidade adicionada é suficiente para causar problemas de saúde, desde prejudicar a digestibilidade do leite, causar irritações gástricas, diarreias e até implicações com caráter letal para crianças e bebês (Das; Biswas, 2025). Por isso, a importância de existirem métodos analíticos eficientes para detectar adulterações do leite com AS.

O método oficial de detecção do AS é da AOAC (do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) de número 975,30, amplamente utilizado para detectar AS em alimentos e bebidas, incluindo leite. Consiste em um método colorimétrico, qualitativo, no qual ocorre a formação de um complexo púrpura entre o salicilato e íons Fe^{3+} . Apesar de ser um método eficaz, não fornece dados quantitativos, requer grande quantidade de amostra (100 mL) para garantir a detecção e utiliza um solvente orgânico tóxico, o éter dietílico, também em grandes quantidades (50 mL) (AOAC, 2023). Além disso, o procedimento é demorado e trabalhoso, sendo uma análise difícil de ser feita rotineiramente.

Quando presente no leite, as moléculas do AS interagem fortemente com as proteínas e gorduras do leite por interações não covalentes, tornando a quantificação desse analito uma tarefa complexa (Gentili *et al.*, 2012; Lupton *et al.*, 2018). Para contornar esses efeitos de matriz, os métodos analíticos geralmente requerem solventes tóxicos e procedimentos de tratamento de amostra complexos, frequentemente associados a técnicas instrumentais sofisticadas, como cromatografia líquida de alta eficiência (Szkop *et al.*, 2017) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com armadilha

de íons (Gallo *et al.*, 2008; Gentili *et al.*, 2012; van Pamel; Daeseleire, 2015). Esses são métodos caros, que mesmo tendo alta sensibilidade e detectabilidade, dependem de instrumentações sofisticadas e caras, limitando seu acesso, principalmente por laboratórios com poucos recursos financeiros.

Dessa forma, uma alternativa instrumental promissora são as técnicas eletroanalíticas. A eletroanalítica se baseia na leitura de propriedades elétricas, como diferença de potencial, corrente elétrica, resistência, carga elétrica, entre outros, e na utilização dessas medidas para a obtenção de informações qualitativas ou quantitativas sobre uma espécie química (analito) (Elgrishi *et al.*, 2018; Fatibello-Filho *et al.*, 2022; Pacheco *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas eletroanalíticas, destaca-se a voltametria, suas vantagens incluem alta sensibilidade, baixos limites de detecção, além de fácil operação, tempo curto de análise, baixo custo e possibilidade de miniaturização (Fatibello-Filho *et al.*, 2022). Essa técnica se fundamenta na interação do analito com a superfície do eletrodo de trabalho, ou seja, a quantificação do analito é obtida por meio da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, a partir da aplicação de uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (Pacheco *et al.*, 2013).

Dentro das técnicas voltamétricas, a voltametria cíclica (CV, do inglês, *Cyclic Voltammetry*) se sobressai no diagnóstico de reações redox, e como etapa inicial do desenvolvimento de um novo método, contudo, ela não é a técnica mais indicada para análises quantitativas por ser afetada pela corrente capacitiva. As voltametrias de pulso surgiram com o objetivo de diminuir a influência da corrente capacitiva, com destaque para a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Diferencial Pulse Voltammetry*) e para a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) que são técnicas com maior sensibilidade e detectabilidade (Fatibello-Filho *et al.*, 2022).

Técnicas voltamétricas têm sido amplamente utilizadas para a determinação de AS em diversas matrizes, como medicamentos, folhas de plantas, sucos de fruta, sangue, fluidos biológicos e leite. Para essas determinações foram usados e desenvolvidos diferentes eletrodos, como eletrodos quimicamente modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, (Zhang *et al.*, 2010) eletrodos de fibra de carbono, (Park; Eun, 2016) eletrodo de pasta de carbono modificado com óxido de zircônio, (Alizadeh; Nayeri, 2018) eletrodo composto de grafite-epóxi, (Zhu, Yongchun; Guan; Ji, 2009), eletrodos impressos por serigrafia (Rawlinson *et al.*, 2018), eletrodos a base de grafeno,

(Liu *et al.*, 2021) eletrodos de fio de aço inoxidável descartáveis, (Tang *et al.*, 2024) entre outros.

Contudo, a determinação do AS por voltametria ainda enfrenta desafios, o principal é a formação de filmes poliméricos originados da oxidação do AS, que se aderem à superfície do eletrodo, reduzindo a sensibilidade, a exatidão e a repetibilidade das medidas, ou seja, ocorre o envenenamento do eletrodo. Para eliminação desse problema, as principais estratégias descritas na literatura envolvem polarizações anódicas ou limpezas frequentes do eletrodo utilizando bases fortes (Alizadeh; Nayeri, 2018; Park; Eun, 2016).

Eletrodos de cobre são amplamente utilizados na eletroanalítica devido a sua alta condutividade e seu baixo custo, além disso são oxidados em meio alcalino, formando espécies como CuO , Cu_2O e $\text{Cu}(\text{OH})_2$ em sua superfície (Franceschini *et al.*, 2025; Giziński *et al.*, 2020; Ngamchuea, 2023). Essa camada oxidada atua como um eletrocatalisador, intensificando a eletrooxidação de diversas espécies orgânicas, e como camada protetora contra corrosão e envenenamento do eletrodo (Franceschini *et al.*, 2025; Karim-Nezhad; Jafarloo; Dorraji, 2009). Esse processo de oxidação é um pré-tratamento muito utilizado em eletrodos sólidos, para impedir que espécies indesejadas sejam adsorvidas pela superfície do eletrodo e impeçam a sua interação com o analito (Fatibello-Filho *et al.*, 2022).

Portanto, diferentemente de outros métodos, com uso de um simples processo voltamétrico o eletrodo de cobre fornece uma análise de baixo custo e fácil acesso, com excelentes propriedades eletroquímicas e com uma rápida modificação de superfície capaz de melhorar suas propriedades eletrocatalíticas e proteger a superfície do eletrodo, tornando-o uma das melhores opções para análise de substâncias orgânicas em meio básico.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo geral desenvolver e aplicar um método voltamétrico de baixo custo, com a voltametria de pulso diferencial e um eletrodo fabricado com fio de cobre para determinação do ácido salicílico em diferentes amostras de leite.

Para que esse objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Fabricar o eletrodo de trabalho a partir de fio de cobre comercial, empregando materiais de baixo custo e procedimentos de montagem acessíveis;
- Realizar o condicionamento eletroquímico do eletrodo de cobre por meio de ciclagem potencial em meio alcalino, visando promover a formação controlada de uma camada superficial rica em CuO/Cu(OH)_2 ;
- Caracterizar morfológicamente e eletroquimicamente o eletrodo antes e após o condicionamento, utilizando voltametria cíclica e microscopia eletrônica de varredura;
- Investigar o comportamento eletroquímico do ácido salicílico no eletrodo Cu/CuO , avaliando a definição, intensidade e estabilidade do pico de oxidação;
- Otimizar os parâmetros voltamétricos das técnicas de voltametria de pulso diferencial (DPV) e a voltametria de onda quadrada (SWV), com o objetivo de maximizar a sensibilidade, minimizar correntes capacitivas e aprimorar a resolução do sinal analítico;
- Desenvolver e validar um procedimento de pré-tratamento de amostras de leite, avaliando a eficiência da separação da matriz e a recuperação do analito;
- Validar e aplicar o método desenvolvido em amostras reais de diferentes tipos de leite.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Soluções

Para esse trabalho, todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura ASTM tipo 1, com resistividade de aproximadamente 18 M Ω cm. As soluções do eletrólito suporte, com concentrações de 0,1 mol L⁻¹ a 2,5 mol L⁻¹, foram preparadas a partir de NaOH sólido (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções estoque do analito de 0,2 mol L⁻¹ foram preparadas semanalmente, a partir do AS sólido (ACS Científica, Sumaré, Brasil) dissolvido em NaOH 2,5 mol L⁻¹, e posteriormente refrigeradas. Para as análises voltamétricas, a solução estoque foi utilizada diariamente para preparar soluções de AS mais diluídas, com concentrações de 10 a 500 μ mol L⁻¹.

Para o pré-tratamento das amostras de leite, foi preparada uma solução aquosa contendo 15% (m/v) de ZnSO₄ (ACS Científica, Sumaré, Brasil).

3.2. Instrumentação

A água ultrapura utilizada para o preparo das soluções foi obtida no sistema de purificação Gehaka MS3000 (Gehaka, São Paulo, Brasil). As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato, modelo PGSTAT 101 (Metrohm-Autolab, Utrecht, Países Baixos) conectado a um microcomputador e controlado pelo software NOVA 2.1.6 (Metrohm-Autolab, Utrecht, Países Baixos).

A morfologia da superfície do eletrodo de trabalho de Cu foi examinada com um microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo TESCAN Vega 3 (Brno, República Tcheca) controlado pelo software Vega TC e operado com uma energia de feixe de elétrons de 20 kV. As imagens do MEV foram obtidas com o eletrodo recém polido, que será representado nesse trabalho por Cu e após o polimento + condicionamento eletroquímico do eletrodo, que será representado como Cu/CuO, a fim de comparar as características da superfície e os efeitos da modificação eletroquímica.

Para o pré-tratamento das amostras de leite, foram utilizados um banho ultrassônico (modelo LS-3DA-3/X, Ultrasonic, Indaiatuba, Brasil) e uma microcentrífuga (modelo DT-10K-BI, Daiki, Osaka, Japão).

3.3. Célula eletroquímica e eletrodos

Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica contendo 10 mL de solução para ajuste dos parâmetros, e, posteriormente, 5 mL para análise da amostra, em ambas as situações, foi utilizada a configuração de três eletrodos. O eletrodo de referência utilizado foi um eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl/KCl – saturado, (Pedrotti; Angnes; Gutz, 1996) confeccionado no laboratório. O eletrodo auxiliar, também confeccionado no laboratório, foi um fio de Pt em espiral fixado em uma ponteira de micropipeta.

O eletrodo de trabalho utilizado foi um eletrodo previamente confeccionado pelo grupo de pesquisa e baseado em outros trabalhos, (Araújo *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2021), utilizando uma ponteira de pipeta de 1 mL (Combitip, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) como suporte do eletrodo, e para o corpo, um fio de cobre utilizado em instalações elétricas domésticas, com diâmetro de 1,3 mm. As partes foram unidas com uma cola epóxi (Araldite, Tek Bond, Embu das Artes, Brasil), após a secagem, a parte inferior do eletrodo foi lixada, sucessivamente, com lixas de gramaturas 220, 1500 e 2500, até remoção total da cola e obtenção de uma superfície de cobre lisa. Antes dos experimentos voltamétricos, a superfície do eletrodo de cobre foi polida com uma suspensão de alumina de 0,5 μm (Teclago, Vargem Grande Paulista, Brasil) em um pano de polimento metalográfico.

A Figura 2 mostra os componentes utilizados para montagem do eletrodo e a aparência de sua superfície, enquanto a Figura 3 representa o eletrodo pronto e sua superfície polida.

Figura 2. (a) Imagem dos componentes usados para fabricação do eletrodo de trabalho de cobre (Cu-WE): (A1) ponteira descartável, (A2) Fio de cobre, e (A3) eletrodo montado. (b) Imagem mostrando a superfície do Cu-WE.

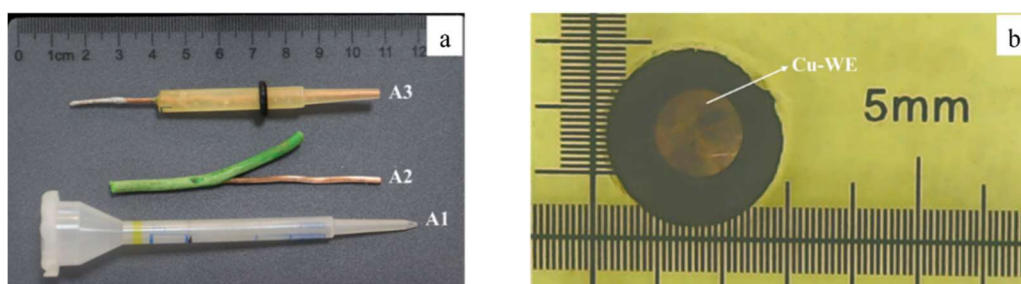
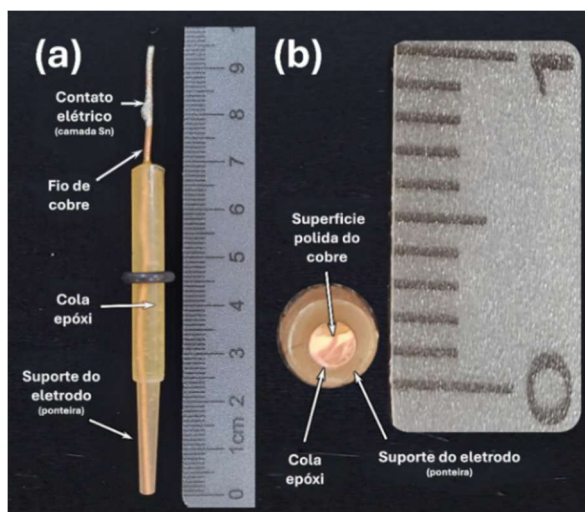


Figura 3. Imagens (a) do eletrodo de cobre montado com as partes indicadas, (b) da superfície polida.



O eletrodo polido foi condicionado eletroquimicamente mediante dez ciclos de potencial no intervalo de 0 a +0,75 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} a 100 mV s⁻¹ em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. No decorrer do trabalho, verificou-se que o eletrodo preparado com polimento + condicionamento eletroquímico (Cu/CuO) pôde ser utilizado em uma série de estudos no mesmo dia de trabalho, sendo necessário refazer o condicionamento apenas com o início de uma nova série de experimentos, com a troca de solução ou no início de um novo dia de trabalho.

3.4. Pré-tratamento das amostras de leite

As amostras de leite foram mantidas refrigeradas, em geladeira comum (~ 4°C), até o momento da análise. Para o pré-tratamento, uma alíquota de 500 µL de leite foi transferida para um tubo de polipropileno de microcentrífuga de 1,5 mL, em seguida, foram adicionados 100 µL de uma solução aquosa de ZnSO₄ 15% (m/v) (Gomes; Oliveira, 2013) e 400 µL de solução de NaOH 2,5 mol L⁻¹. A mistura foi colocada no banho ultrassônico por 10 min e depois centrifugada a 12.000 rpm durante 5 min. Após a centrifugação, formou-se uma fase sólida. Em seguida, uma alíquota de 500 µL da fase líquida e límpida, foi recolhida com uma micropipeta e transferida para a célula eletroquímica contendo 4,5 mL de água ultrapura, com essa última diluição a concentração de NaOH se adequa a concentração utilizada de eletrólito de suporte.

Para o experimento de adição e recuperação do AS, as amostras de leite foram fortificadas com 5 µL de solução estoque de AS, na concentração desejada, diretamente

no tubo de polipropileno, em seguida foram adicionados 95 μL da solução de ZnSO_4 , e o restante do procedimento foi realizado sem alterações..

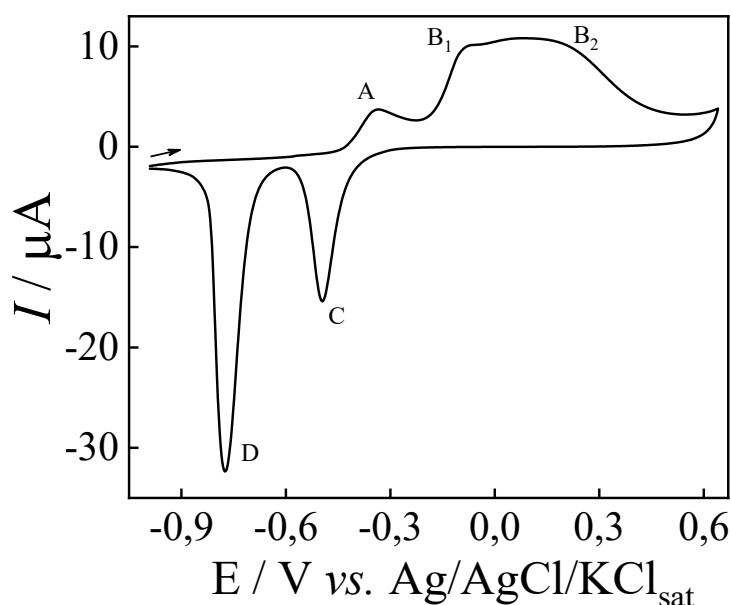
Esse pré-tratamento de amostra utiliza o sulfato de zinco pela sua capacidade de precipitar proteínas, (Alichi; Movassaghghazani; Afshar Mogaddam, 2024) e envolve a conversão do AS para o íon salicilato em meio alcalino, o que diminuiu suas interações com as proteínas e gorduras do leite e facilita a extração do analito para a fase aquosa (Gentili *et al.*, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

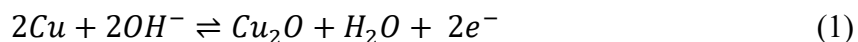
4.1. Caracterização do eletrodo de cobre

O comportamento eletroquímico do eletrodo de Cu em meio alcalino foi estudado empregando-se a técnica de voltametria cíclica. A Figura 4 mostra o voltamograma cíclico registrado com o eletrodo recém polido na presença de NaOH 0,1 mol L⁻¹, registrados no intervalo de potencial de -1,00 a +0,65 V. O perfil observado na Figura 4 é condizente com o comportamento do Cu em soluções alcalinas (Franceschini *et al.*, 2025; Giri; Sarkar, 2016; Silva *et al.*, 2025; Zhu, Pengcheng; Zhao, 2017).

Figura 4. Voltamograma cíclico do eletrodo de Cu recém polido ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH a 50 mV s⁻¹.

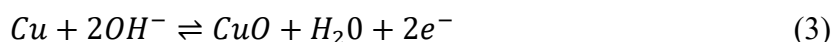
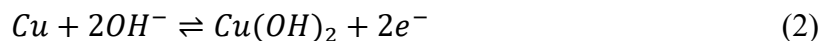


Na varredura direta, são observados três picos anódicos A (-0,331 V), B₁ (-0,087 V) e B₂ (+0,162 V). O pico A está associado a formação de Cu₂O (óxido cuproso), conforme a Equação 1.



A atribuição dos picos B₁ e B₂ tem sido objeto de controvérsias na literatura e duas possíveis atribuições têm prevalecido. Segundo alguns autores, esses picos correspondem à oxidação do Cu metálico ou do Cu₂O, formando Cu(OH)_{2(s)} ou hidróxi-complexos solúveis, como o Cu(OH)₄²⁻. Entretanto, outros autores atribuem os picos B₁ e B₂ à

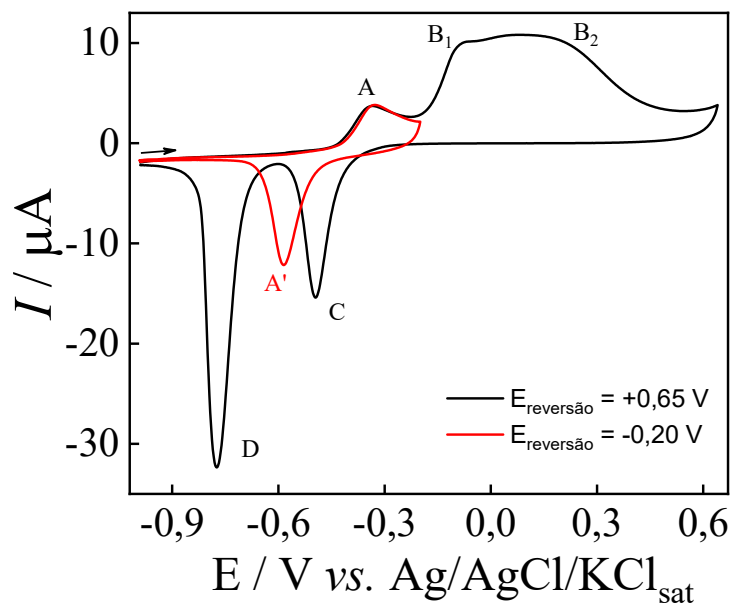
formação de CuO, seja pela eletrooxidação do Cu ou pela desidratação do Cu(OH)₂. (Franceschini *et al.*, 2025; Giri; Sarkar, 2016; Zhu, Pengcheng; Zhao, 2017). Independentemente do mecanismo, existem duas espécies predominantes formadas pelos picos B₁ e B₂, Cu(OH)₂ e CuO (Equações(2 e (3).



É importante ressaltar que essas equações químicas correspondem a um modelo simplificado. As duas espécies, Cu(OH)₂ e CuO, também podem se formar a partir da eletrooxidação do Cu₂O. Além disso, diversos hidróxi-complexos solúveis de cobre podem se formar, dependendo de diversos fatores, como a concentração de íons hidroxila, a concentração de Cu²⁺ e a velocidade de varredura (Anantharaj *et al.*, 2021). Giri e Sarkar (2016) realizaram estudos por Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios-X (XPS, do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), e encontraram evidências de que o pico B₁ está predominantemente associado à formação do Cu(OH)₂, enquanto o pico B₂ pode ser atribuído principalmente à formação do CuO. Entretanto, estes autores observaram, por XPS, que eletrodos condicionados em diferentes potenciais na região dos picos B₁ e B₂ sempre apresentaram uma mistura entre Cu(OH)₂ e CuO. Assim, a literatura mostra que os processos anódicos do Cu em meio alcalino envolvem mecanismos complexos que ainda não foram completamente elucidados.

A situação é semelhante para os processos catódicos do Cu em meio alcalino. Como mostra a Figura 4, na varredura reversa, são observados dois picos catódicos, sendo C (-0,494 V) e D (-0,775 V). Segundo alguns autores, estes picos são associados, respectivamente, a redução do CuO para Cu, e do Cu(OH)₂ ou Cu(OH)₄²⁻ para Cu (Giri; Sarkar, 2016). Entretanto, alguns autores apresentam uma interpretação distinta, com o pico C correspondendo à redução do Cu₂O para Cu e o pico D à redução do CuO ou Cu(OH)₂ para Cu (Hasanzadeh *et al.*, 2010). Considerando essas divergências, foi realizado um estudo voltamétrico no qual o potencial de inversão foi definido exatamente após o pico A, conforme mostrado na Figura 5.

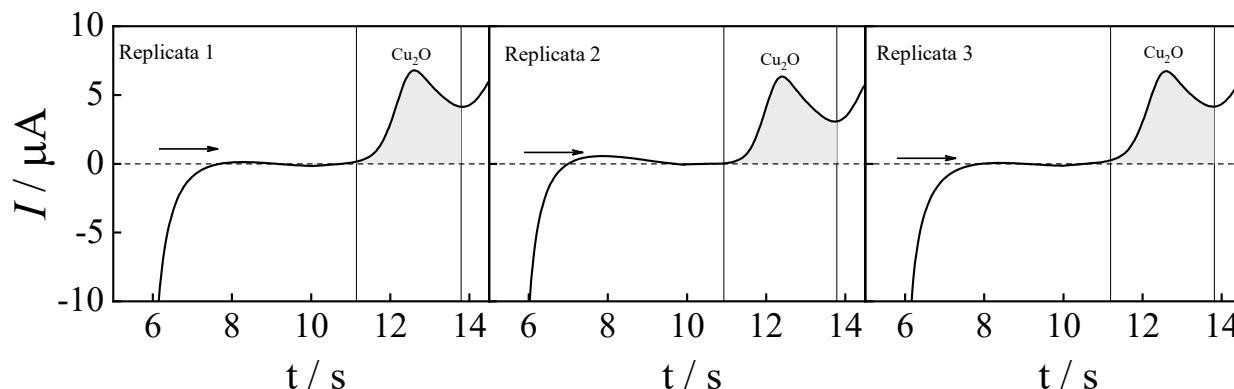
Figura 5. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Cu recém polido ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH a 50 mV s^{-1} .



Conforme mostrado na Figura 5, quando o potencial de inversão é limitado em -0,2 V (curva em vermelho) há o aparecimento do pico A', em um potencial entre os picos C e D. O pico A' obrigatoriamente está relacionado à redução do Cu_2O , portanto, é pouco provável que os picos C e D correspondam à redução dessa espécie e, nessas condições experimentais, a proposta de Giri e Sarkar (2016) parece ser a mais coerente.

Há consenso na literatura de que o pico A da Figura 4 corresponde à oxidação do Cu a Cu_2O , o qual forma uma monocamada na superfície do eletrodo. Portanto, a partir da área desse pico voltamétrico, pode-se obter a carga associada a formação de uma monocamada de Cu_2O . A partir da razão dessa carga pela sua carga específica, é possível estimar a área eletroquimicamente ativa do eletrodo (ECSA, do inglês *Electrochemically Active Surface Area*). De acordo com a literatura, a carga específica necessária para formação de uma monocamada do Cu_2O é de aproximadamente $360 \mu\text{C cm}^{-2}$, (Giri; Sarkar, 2016; Wei *et al.*, 2019). A carga voltamétrica do pico A foi obtida pela área sob o pico, a partir das curvas de corrente (μA) em função do tempo (s) do voltamograma cíclico, conforme mostra a Figura 6. O pico foi delimitado e sua área contabilizada, fornecendo uma carga média de $10,3 \pm 0,5 \mu\text{C}$ ($n = 3$). Portanto, a ECSA estimada por esse método foi de $0,029 \pm 0,001 \text{ cm}^2$ (área real).

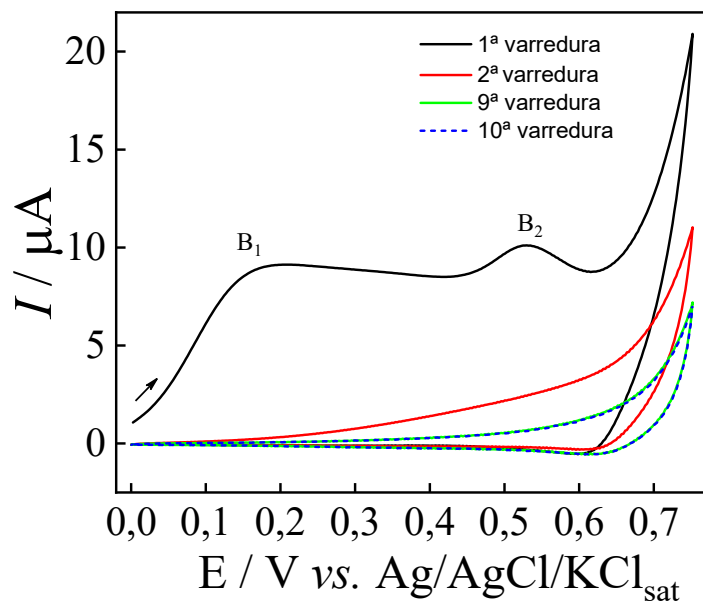
Figura 6. Gráficos de corrente (μA) vs. tempo (s) obtidos nas mesmas condições experimentais do voltamograma cíclico da Figura 4. A área hachurada de cada replicata ilustra a área voltamétrica do pico de oxidação do Cu a Cu_2O , e foram utilizadas para se estimar a ECSA do eletrodo de Cu.



Considerando a área geométrica do eletrodo de Cu ($0,013 \text{ cm}^2$), o fator de rugosidade (definido pela razão entre a área real e a geométrica), foi estimado em $2,2 \pm 0,1$. Este valor é maior do que o de 1,6 encontrado por Giri e Sarkar (2016). O maior fator de rugosidade pode ser atribuído à etapa de lixamento intensivo durante a fabricação do eletrodo para remover a cola epóxi, tratamento mecânico que, provavelmente, causou o aumento de irregularidades na superfície do eletrodo. Do ponto de vista eletroanalítico, esse maior fator de rugosidade pode ser benéfico, pois indica um possível aumento da intensidade do sinal analítico.

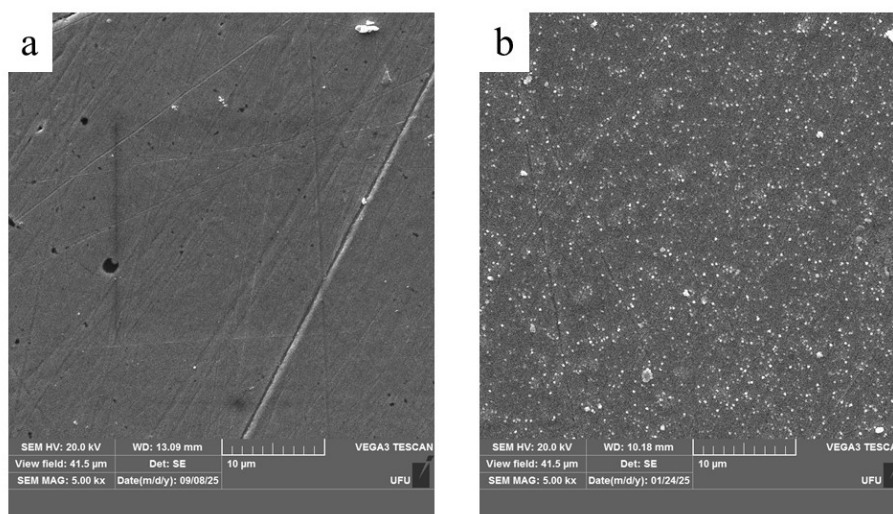
Posteriormente, foram registrados voltamogramas cíclicos restringindo o intervalo de potencial de 0 até $+0,75 \text{ V}$. Nesta condição, foi observado que o pico B_2 se tornou mais definido na primeira varredura, conforme mostra a Figura 7. Contudo, a intensidade de ambos os picos, B_1 e B_2 , diminuiu gradativamente à medida que ciclos sucessivos de potencial foram registrados. Observou-se que um perfil voltamétrico estável foi obtido após a realização de 10 ciclos de potencial.

Figura 7. Voltamogramas cíclicos sucessivos do eletrodo de Cu recém polido ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados com potencial de 0 a +0,75 V, a 100 mV s^{-1} em NaOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



Na literatura, a diminuição das intensidades dos picos B_1 e B_2 tem sido associada ao crescimento eletroquímico irreversível de uma camada de CuO/Cu(OH)_2 . Essa camada protege o cobre metálico de ser oxidado, explicando o desaparecimento dos picos voltamétricos relativos à eletrooxidação do cobre (Franceschini *et al.*, 2025; Karim-Nezhad; Jafarloo; Dorraji, 2009). Com o intuito de avaliar a morfologia dessa camada, foram obtidas duas imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) comparativas, conforme mostra a Figura 8, uma de um eletrodo de Cu (recém polido), e outra do eletrodo Cu/CuO, preparado registrando-se 10 ciclos de potencial entre 0 e +0,75 V, após polimento.

Figura 8. Imagens por MEV (a) eletrodo de Cu. (b) eletrodo de Cu/CuO.



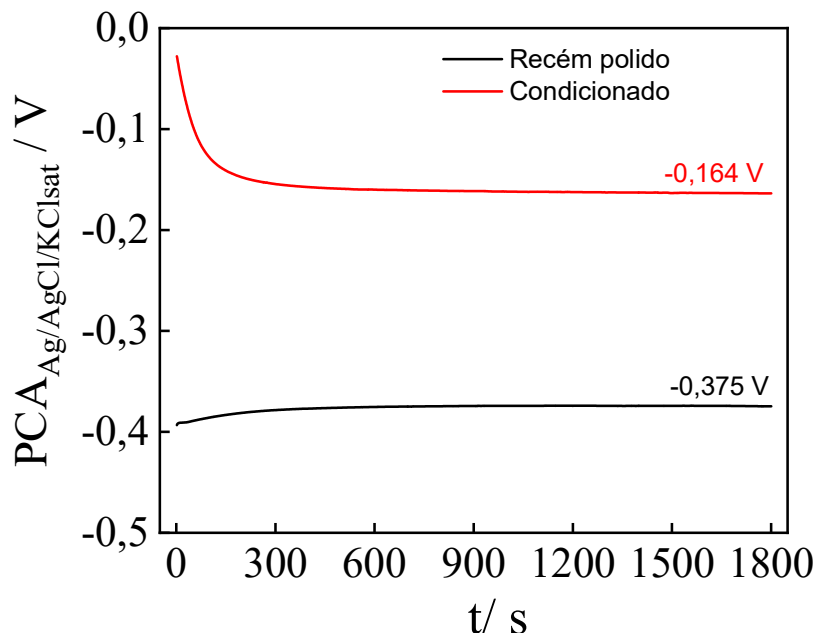
É possível observar que o eletrodo polido (Figura 8-a), apresenta uma superfície predominantemente lisa, com alguns riscos resultantes do polimento, enquanto o eletrodo Cu/CuO (Figura 8-b), tem uma superfície rugosa, com microestruturas densas e uniformemente distribuídas, consistente com o crescimento eletroquímico de uma camada que recobre a superfície do eletrodo.

De acordo com Anantharaj et al. (2021) a anodização de folhas de Cu com baixas densidades de corrente em KOH 0,1 mol L⁻¹, favorece a formação de CuO, enquanto altas densidades de correntes e concentrações altas de KOH, como 6,0 mol L⁻¹, favorecem a formação de Cu(OH)₂. Portanto, considerando o procedimento utilizado no presente trabalho para o preparo do eletrodo Cu/CuO, com baixas densidade de corrente e concentração NaOH, é mais provável que a camada formada consista, de fato, principalmente em CuO. A técnica de espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS, do inglês *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*), identificou Cu e O como os principais elementos químicos na superfície do eletrodo. Porém, essa técnica não conseguiu detectar diferenças nas quantidades relativas desses elementos na superfície recém polida e na superfície do eletrodo de Cu/CuO. A porcentagem em massa de O variou entre 3 e 6% para ambos os eletrodos Cu e Cu/CuO. Portanto, não foi possível diferenciar a composição superficial desses eletrodos, utilizando-se a técnica de EDS.

Com o objetivo obter informações sobre os processos redox ocorrendo na superfície do eletrodo de Cu e de Cu/CuO e, com isso, inferir algo sobre as espécies formadas durante o condicionamento eletroquímico, foram efetuadas medidas de potencial de

circuito aberto (OCP, o inglês *Open Circuit Potential*). As medidas foram realizadas por 1800 s e os resultados são apresentados na Figura 9.

Figura 9. Potencial de circuito aberto em função do tempo para o eletrodo de Cu e de Cu/CuO.



Para o eletrodo recém polido, o valor de OCP se estabilizou em -0,375 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} (-0,178 V vs. eletrodo padrão de hidrogênio) após um período de aproximadamente 300 s. Esse valor está dentro do intervalo de estabilidade do Cu₂O de acordo com o diagrama de Pourbaix do cobre em pH 13, que corresponde a NaOH de 0,1 mol L⁻¹ (Barragan *et al.*, 2018). Esse resultado sugere que uma camada fina de Cu₂O é formada na superfície do eletrodo de forma espontânea quando o eletrodo é imerso na solução do eletrólito de suporte (0,1 mol L⁻¹ de NaOH).

Por outro lado, o eletrodo Cu/CuO apresentou um valor de OCP menos negativo, -0,164 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} (+0,033 V vs. eletrodo padrão de hidrogênio), correspondendo ao valor de estabilidade do CuO (Barragan *et al.*, 2018). É importante ressaltar que a variação do OCP observada durante os 300 s iniciais, para ambos os eletrodos, não indica instabilidade da superfície, mas corresponde a um comportamento típico associado a processos de reorganização ou de equilíbrio após a imersão do eletrodo na solução do eletrólito ou a transição de um estado polarizado para a condição de potencial de circuito aberto.

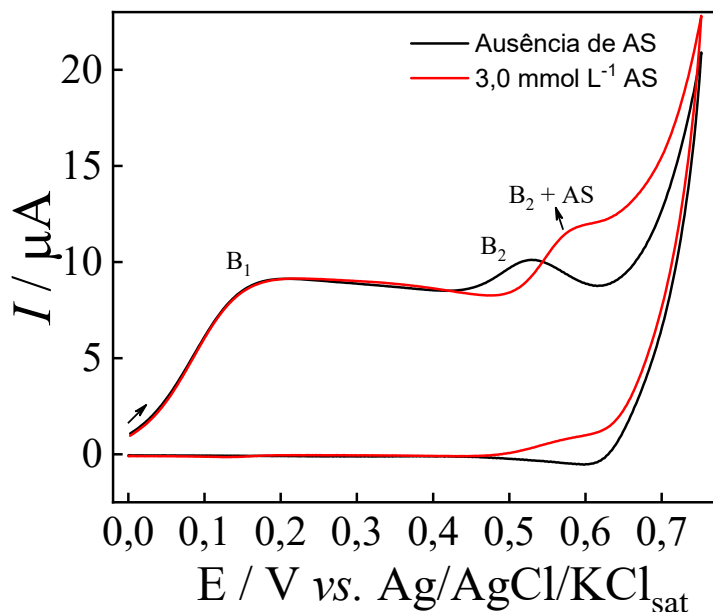
Os diferentes valores de OCP observados para o eletrodo de Cu e de Cu/CuO sugerem que o condicionamento eletroquímico promove a formação de uma superfície mais

oxidada, presumidamente rica em CuO, e estável em condições de circuito aberto. Caso essa camada não fosse estável na solução do eletrólito de suporte, seriam observadas variações contínuas e gradativas no OCP. Uma vez verificada a estabilidade dessa camada, ela pode ser explorada para aplicações eletroanalíticas, trazendo propriedades vantajosas para o eletrodo, como minimização do envenenamento da superfície durante a eletrooxidação do AS, além da intensificação do sinal para o AS, como será apresentado na próxima seção.

4.2. Comportamento voltamétrico do AS no eletrodo de cobre

A Figura 10 apresenta os voltamogramas cíclicos na ausência e na presença do AS, ambos com o eletrodo recém polido. O pico correspondente à oxidação do AS apresentou-se pouco definido e sobreposto ao pico de formação do CuO (B_2), além disso, o sinal do AS variou à medida que ciclos sucessivos de potencial foram registrados, evidenciando que apenas o polimento do eletrodo não é suficiente para viabilizar a detecção do AS.

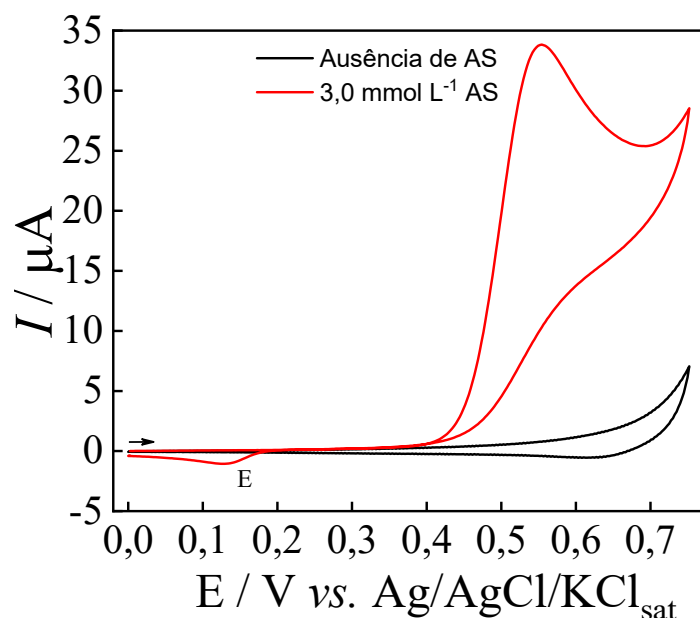
Figura 10. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Cu ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH a 100 mV s^{-1} , na presença e na ausência de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS.



Para melhorar o sinal do AS, após o polimento, o eletrodo de Cu foi condicionado eletroquimicamente, a partir da aplicação de 10 ciclos de potencial no intervalo de 0 a +0,75 V em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH a 100 mV s^{-1} , para formação da camada protetora rica

em CuO (formação do eletrodo Cu/CuO). A Figura 11 mostra o comportamento do AS sobre o eletrodo de Cu/CuO.

Figura 11. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Cu/CuO ($\varnothing = 1,3$ mm) registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, na presença e na ausência de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de AS.



Analisando a Figura 11, é perceptível que o condicionamento do eletrodo de Cu diminuiu as correntes apresentadas pelo eletrodo de Cu no eletrólito de suporte, produzindo um branco com menores correntes residuais, como demonstrado na Figura 7, o que é desejável para a obtenção de baixos limites de detecção. Além disso, a intensidade da resposta voltamétrica do AS aumentou substancialmente, originando um pico anódico intenso e bem definido em $+0,52 \text{ V}$. A presença do pico catódico E será discutida posteriormente.

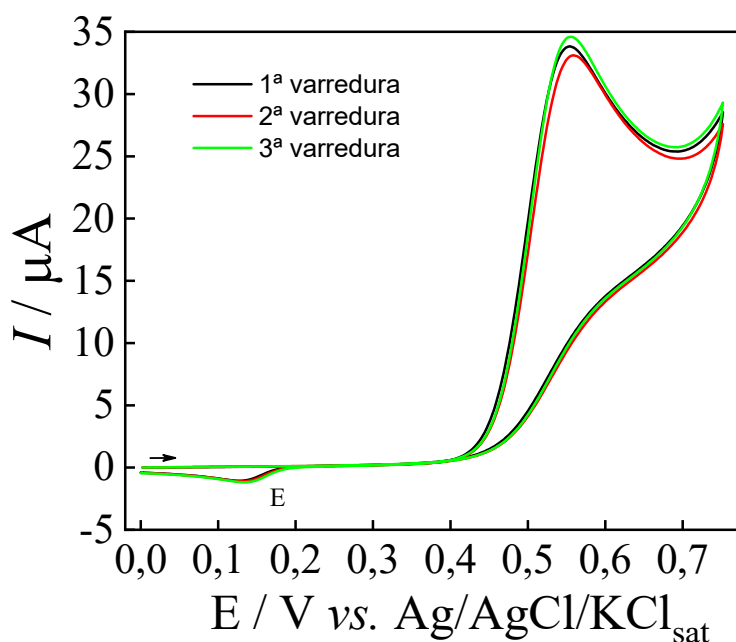
A camada rica em CuO é amplamente reconhecida por sua atividade eletrocatalítica para a oxidação de vários compostos orgânicos, principalmente a glucose (Aun et al., 2023), porém o mecanismo que explica esse efeito eletrocatalítico ainda é debatido. Alguns autores defendem que este efeito envolva uma mediação por meio de espécies de Cu (III). Outros atribuem esses efeitos eletrocatalíticos à adsorção de hidroxila na superfície do eletrodo, combinada com as propriedades semicondutoras da camada de CuO (Barragan *et al.*, 2018).

Independentemente do mecanismo exato, a Figura 11 demonstra como a camada rica em CuO facilita a eletrooxidação do AS, com a otimização do sinal. Além de melhorar a

resposta voltamétrica do AS, o condicionamento do eletrodo assegurou a repetitividade do perfil voltamétrico.

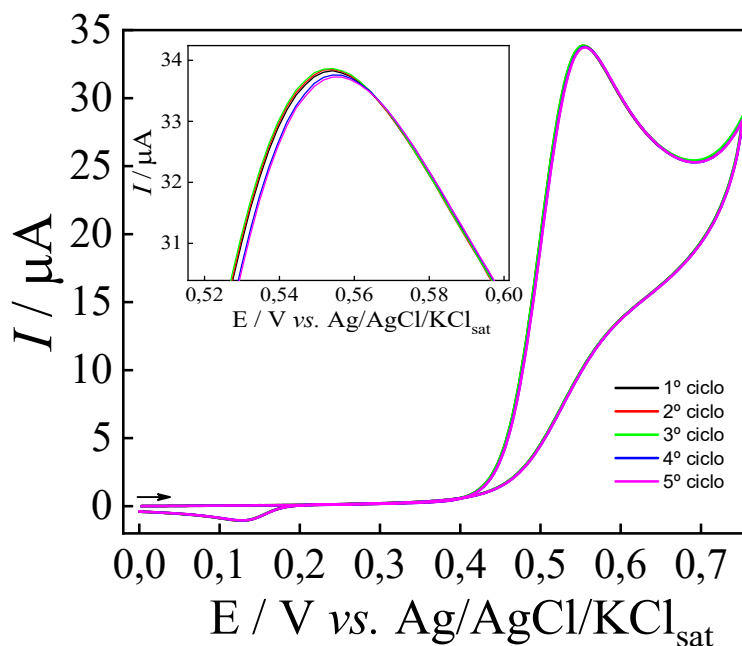
Na Figura 12, são apresentados voltamogramas cíclicos registrados com o mesmo eletrodo, mas com condicionamentos independentes, um para cada varredura. Esses voltamogramas cíclicos apresentam um RSD de 2,0% ($n = 3$) para a corrente de pico anódica (i_{pa}) de 3,0 mmol L⁻¹ de AS.

Figura 12. Três voltamogramas cíclicos registrados na presença de 3 mmol L⁻¹ de AS, em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH, com o mesmo eletrodo de Cu, mas com três condicionamentos independentes.



Outro estudo realizado consistiu em avaliar se, se o eletrodo de Cu/CuO poderia ser utilizado em múltiplas medidas voltamétricas. Os voltamogramas cíclicos obtidos neste estudo são apresentados na Figura 13, sendo registrados com um mesmo eletrodo de Cu/CuO e com 30 s de agitação magnética da solução entre cada ciclo. Nestas condições, obteve-se um RSD para as correntes de pico anódicas de 0,5% ($n = 5$), indicando que o pico voltamétrico para o AS permanece estável durante as medidas sucessivas. Portanto, pode-se concluir que a superfície do Cu eletroquimicamente condicionada pode ser utilizada para múltiplas medidas voltamétricas, ou seja, um mesmo eletrodo de Cu/CuO pode ser utilizado para múltiplas medidas voltamétricas.

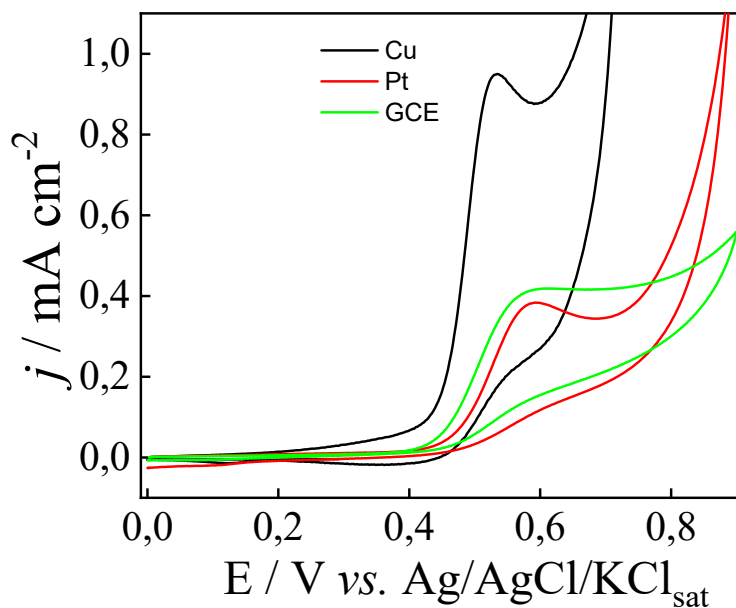
Figura 13. Voltamogramas cíclicos sucessivos registrados na presença de 3 mmol L^{-1} de AS, entre 0 e $+0,75 \text{ V}$ a 100 mV s^{-1} em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH, utilizando um mesmo eletrodo de Cu/CuO. A solução foi submetida a 30 s de agitação magnética entre cada ciclo.



Os resultados obtidos demonstraram que a camada rica em CuO, tem dois papéis fundamentais na eletrooxidação do AS, melhora a taxa de transferência de elétrons e protege a superfície do eletrodo contra o envenenamento, ambas funções já descritas na literatura (Franceschini *et al.*, 2025).

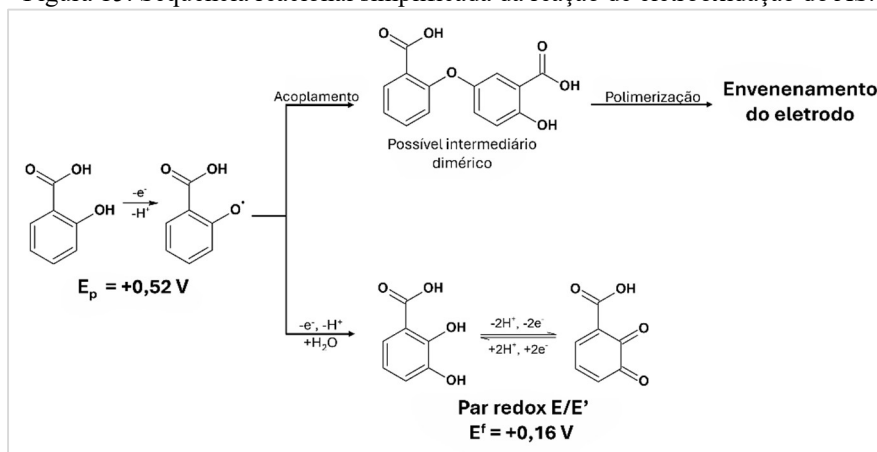
A resposta voltamétrica do AS com o eletrodo de cobre foi comparada às respostas obtidas em eletrodos de carbono vítreo (GCE) e de platina (Pt), que são materiais bem estabelecidos na eletroquímica. Os resultados são apresentados na Figura 14, sendo observado que o eletrodo de Cu/CuO exibiu a maior densidade de corrente de pico e o menor potencial de pico para a eletrooxidação do AS. Portanto, além de apresentar menor custo do que o GCE e a Pt, o Cu ainda fornece a maior intensidade de sinal, sendo um material promissor para a quantificação de AS em amostras de leite.

Figura 14. Voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 3 mmol L⁻¹ de AS a 100 mV s⁻¹ com diferentes eletrodos de trabalho. (—) Cu/CuO (Ø = 1,3 mm); (—) Pt (Ø = 3,0 mm); (—) GCE (Ø = 3,0 mm).



De acordo com a literatura, o pico anódico observado em +0,52 V para superfície do eletrodo de Cu/CuO (Figura 11), corresponde à oxidação do AS ao correspondente radical fenoxila pela perda de um elétron e de um próton, esse radical pode seguir duas sequências reacionais: pode ser oxidado novamente a ácidos carboxílicos solúveis; ou participar de reações de acoplamento, formando quinonas que podem se polimerizar, gerando filmes poliméricos passivantes na superfície do eletrodo (Park; Eun, 2016; Rawlinson *et al.*, 2018). A Figura 15 ilustra as possíveis sequências reacionais para a eletrooxidação do AS.

Figura 15. Sequência reacional simplificada da reação de eletrooxidação do AS.

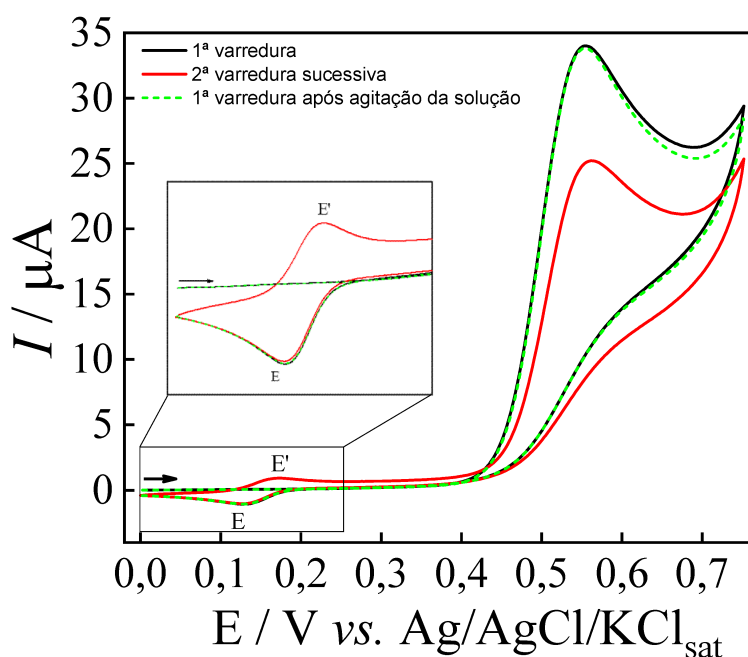


Fonte: Autora.

A ausência de um pico catódico, de mesma intensidade, na varredura reversa relativo à redução do AS (Figura 11) é bem documentada na literatura e tem sido atribuída principalmente a uma transferência de elétrons irreversível, (Park; Eun, 2016; Sun *et al.*, 2014; Torriero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010; Zhu, Yongchun; Guan; Ji, 2009).

Os voltamogramas da Figura 16 mostram um par redox E/E', na segunda varredura, com potencial de +0,16 V, originado da redução observada já na primeira varredura, o pico E destacado nos voltamogramas anteriores. O surgimento desse par redox apenas na segunda varredura indica que ele é um produto gerado durante a eletrooxidação do AS (pico em +0,52 V).

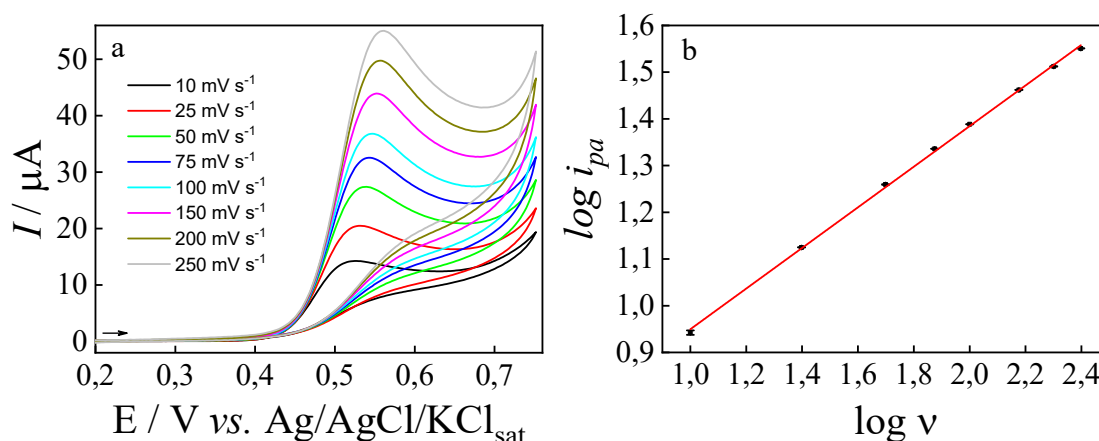
Figura 16. Voltamogramas cíclicos registrados com o eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 3,0 mmol L⁻¹ de AS à 100 mV s⁻¹. A linha pontilhada preta e a linha vermelha correspondem a varreduras sucessivas, enquanto a linha pontilhada verde corresponde ao voltamograma cíclico registrado após agitação da solução.



O comportamento observado nos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 16 é típico para a eletrooxidação do AS em eletrodos de carbono, sendo o par redox com potencial formal (E^f) de +0,16 V atribuído ao grupo quinona dos produtos de eletrooxidação do AS, como derivados de carboxil-ortobenzoquinona (Park; Eun, 2016; Torriero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010).

Para aprofundar a investigação do comportamento do AS com o eletrodo de Cu/CuO, voltamogramas cíclicos foram registrados com velocidades de varredura crescentes, apenas com agitação da solução entre cada medida, conforme mostra a Figura 17.

Figura 17. (a) Voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura de potencial com o eletrodo de Cu/CuO. Medidas realizadas em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 3,0 mmol L⁻¹ de AS. (b) gráfico de log i_{pa} vs. log v .



A Figura 17-a mostra o pico do AS deslocando positivamente com o aumento da velocidade de varredura, indicando um processo irreversível, consistente com a literatura (Park; Eun, 2016; Torriero *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010).

A Figura 17-b mostra o gráfico de log i_{pa} vs. log v , revelando uma relação linear, de acordo com a equação: $\log i_{pa} (\mu A) = 0,51 + 0,44 \log v (mV s^{-1})$, e o $R^2 = 0,99935$. O coeficiente angular de $0,44 \pm 0,03$ ($n = 3$) é estatisticamente equivalente a 0,5 no nível de confiança de 95%, confirmando que a eletrooxidação do AS no eletrodo de Cu é um processo controlado por difusão. O gráfico de i_{pa} vs. $v^{1/2}$ também foi linear, com $R^2 > 0,99$.

4.3. Desempenho analítico da DPV e da SWV para a determinação do AS

Para definir a melhor técnica voltamétrica de pulso para determinação do AS, as técnicas de voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) e voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) tiveram seus desempenhos analíticos comparados. O primeiro passo consistiu na otimização dos parâmetros operacionais de cada técnica, conforme apresentado na Tabela

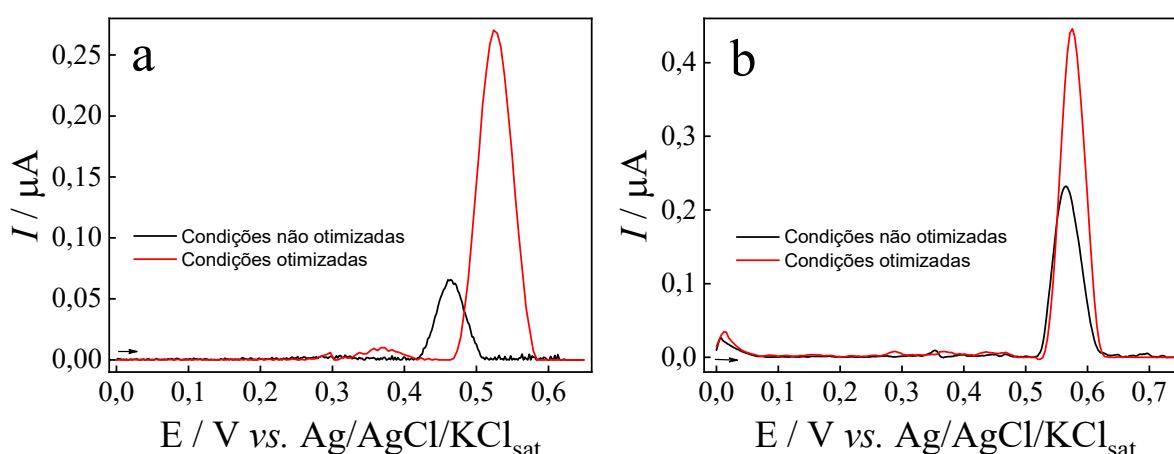
1, considerando que os estudos foram realizados com eletrólito de suporte de NaOH 0,1 mol L⁻¹, e com o eletrodo de Cu/CuO.

Tabela 1. Intervalos dos parâmetros experimentalmente avaliados e selecionados para a DPV e para a SWV.

Técnica	Parâmetro	Intervalo avaliado	Valor selecionado
DPV	Amplitude de pulso, ΔE (mV)	25 - 150	50
	Largura de pulso, (ms)	5 - 100	25
	Incremento de potencial (step), (mV)	2 - 6	5
SWV	Amplitude de pulso, ΔE (mV)	10 - 150	25
	Frequência, f (Hz)	10 - 100	50
	Incremento de potencial, ΔE_s (mV)	2 - 6	4

A única diferença durante a otimização foi a concentração de AS utilizada, para a DPV foi de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e para SWV de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, isso foi necessário porque a técnica SWV não conseguiu detectar concentrações menores que 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ nas condições inicialmente adotadas. Os voltamogramas registrados antes e depois da otimização estão mostrados na Figura 18, as linhas de base foram corrigidas utilizando o modo de média móvel com tamanho de janela 2,0.

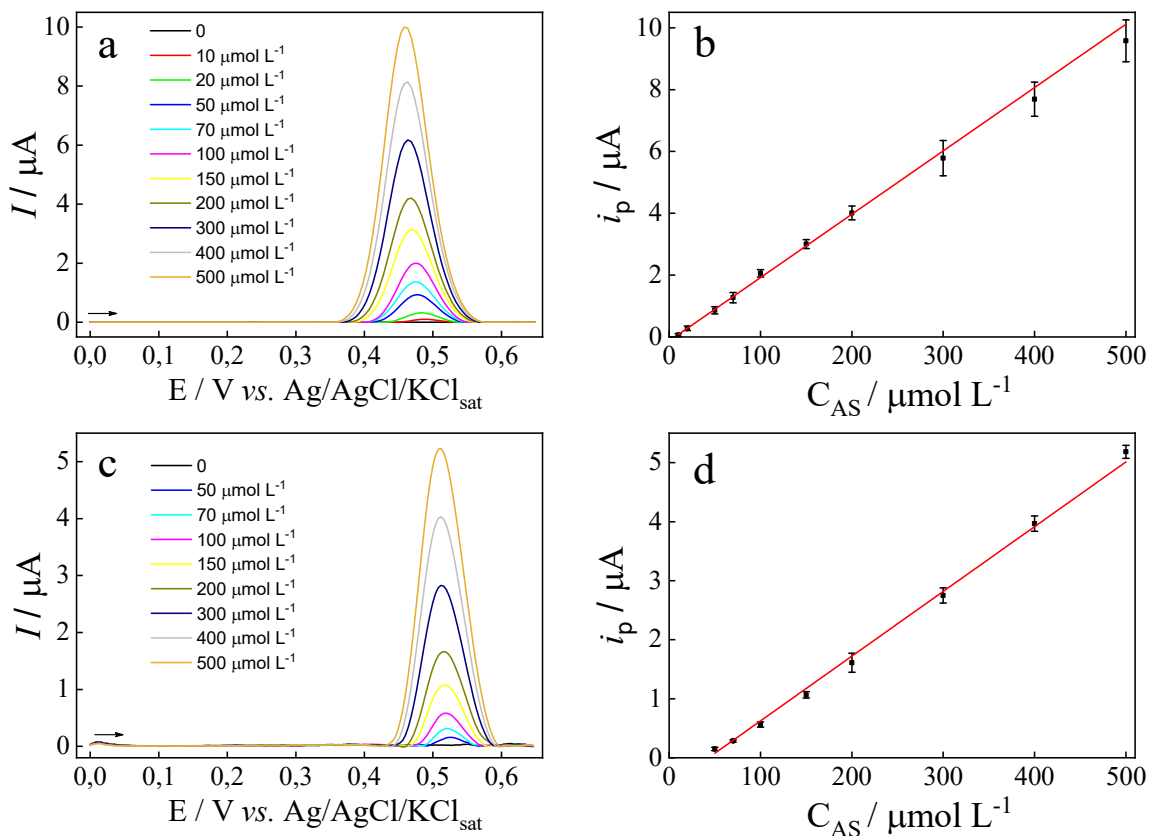
Figura 18. (a) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS, com as condições: (—) iniciais: ΔE = 25 mV; largura de pulso = 50 ms; step = 2 mV. (—) otimizadas: ΔE = 50 mV; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. (b) Voltamogramas de onda quadrada com correção de linha de base registrado com eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS, com as condições: (—) iniciais: ΔE = 25 mV; f = 25 Hz; ΔE_s = 2 mV. (—) otimizadas: ΔE = 25 mV; f = 50 Hz; ΔE_s = 4 mV.



A Figura 18, evidencia como a otimização dos parâmetros melhorou a resposta voltamétrica do AS para as duas técnicas. Dessa forma, foram registrados voltamogramas

com diferentes concentrações de AS e as curvas analíticas correspondentes a cada técnica foram construídas, conforme mostrado na Figura 19.

Figura 19. Voltamogramas com correção de linha de base para (a) DPV; e (c) SWV; registrados em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH com o eletrodo de Cu/CuO, diferentes concentrações de AS e suas condições otimizadas. Com suas respectivas curvas analíticas (b) DPV; e (d) SWV; com as barras de erro representando o desvio padrão da i_{pa} (n = 3).



Um pequeno deslocamento do pico do AS para potenciais mais negativos foi observado com o aumento da concentração para ambas as técnicas. Entretanto, constatou-se que esse efeito foi causado pela correção da linha base, uma vez que não foi observado nos voltamogramas não tratados. Portanto, trata-se de um artefato introduzido pelo processamento dos dados e não por fenômenos eletroquímicos. Entre cada adição sucessiva de AS, a solução foi agitada para garantir sua homogeneização, mantendo-se o eletrodo na célula eletroquímica sem novo condicionamento.

A curva analítica para a DPV, Figura 19-b, foi linear de 10 a 500 $\mu mol L^{-1}$, de acordo com a equação: $i_p(\mu A) = -0,129 + 0,0250C_{AS}(\mu mol L^{-1})$, com R^2 0,99767, o Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit Of Detection*) e o Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit Of Quantification*) foram calculados utilizando as Equações 4 e 5, onde s_{dB}

representa o desvio padrão para o sinal branco, estimado a partir do coeficiente linear das curvas analíticas.

$$LOD = \frac{3 \times sd_B}{coeficiente\ angular} \quad (4)$$

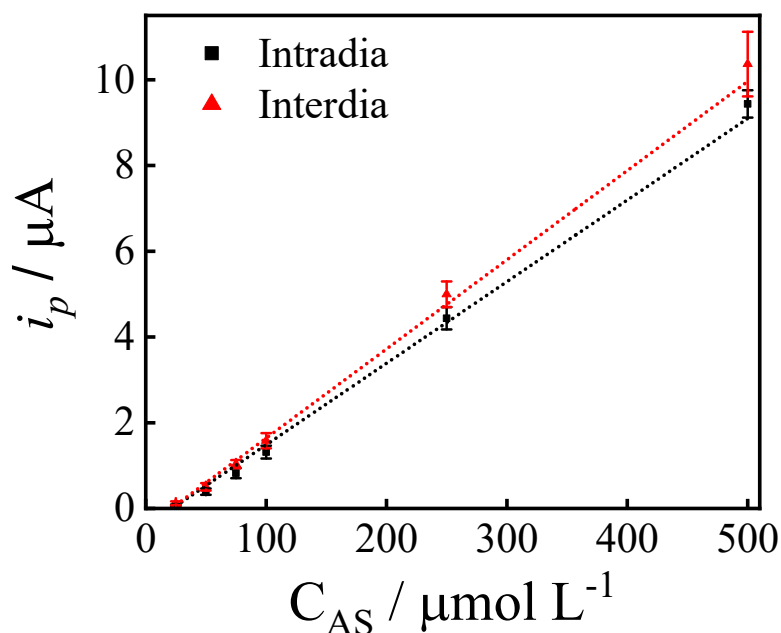
$$LOQ = \frac{10 \times sd_B}{coeficiente\ angular} \quad (5)$$

Os valores obtidos de LOD e LOQ para a DPV foram 3 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A curva analítica para a SWV, Figura 19-d, foi linear de 50 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, segundo a equação: $i_p(\mu A) = -0,472 + 0,0109C_{AS}(\mu\text{mol L}^{-1})$, com $R^2 = 0,99515$, os valores de LOD e LOQ para SWV foram 10 e 33 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Portanto, considerando o menor valor de LOD, a maior intensidade do sinal analítico e os picos mais estreitos e bem definidos nos voltamogramas, a DPV foi a técnica escolhida para continuação dos estudos.

Com a técnica definida e otimizada, foram construídas curvas analíticas em triplicata em um único dia de trabalho e em três dias consecutivos, sendo apresentadas na Figura 20, sendo importante destacar que o eletrodo de Cu passou por condicionamentos independentes para cada curva analítica.

Figura 20. Curvas analíticas realizadas intradia e interdia para o AS com DPV nas condições otimizadas.



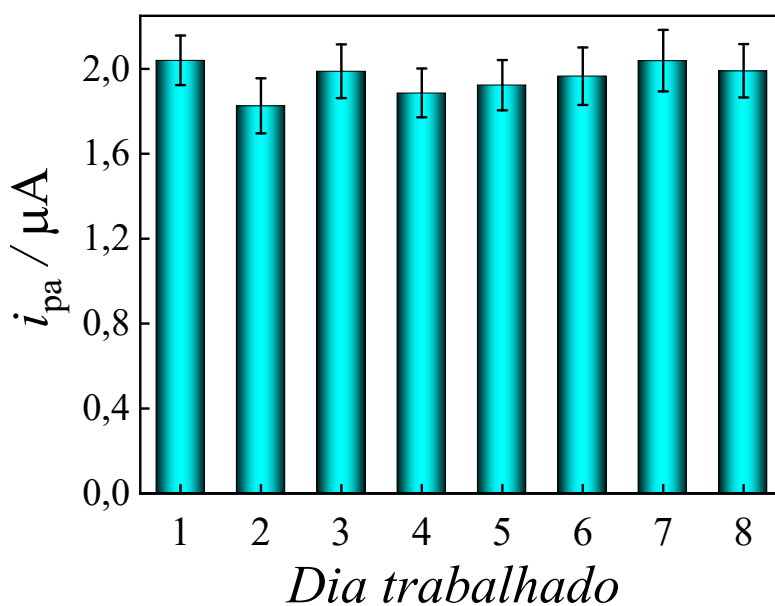
As curvas analíticas intradia e interdia apresentam coeficientes angulares de $0,0190 \pm 0,0008$ e $0,0208 \pm 0,0009 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$, respectivamente. Foram realizadas análises estatísticas, utilizando o teste t e o teste F, conforme as respectivas Equações 6 e 7 ($\bar{x}$ = média; sd = desvio padrão; n = número de medidas) (HARRIS; LUCY, 2023).

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{sd_1^2(n_1 - 1) + sd_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}} * \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}} \quad (6)$$

$$F = \frac{sd_1^2}{sd_2^2} \quad (7)$$

Os valores obtidos, para o teste t = 2,59 e para o teste F = 1,27, ficaram abaixo de seus valores críticos, sendo $t_{\text{crítico}} = 2,78$ e $F_{\text{crítico}} = 19$ (para 4 graus de liberdade com nível de confiança de 95%). Os resultados indicam que não existe diferença estatística entre os coeficientes angulares ou seus desvios padrões, confirmando a precisão do método. Além disso, a i_{pa} de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS foi medida durante oito dias de trabalho, apresentando RSD = 3,8%, conforme mostra a Figura 21.

Figura 21. Sinal voltamétrico para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS medido durante 8 dias de trabalho. O tamanho da barra corresponde à média de valores para três medidas e a barra de erro representa o desvio padrão.



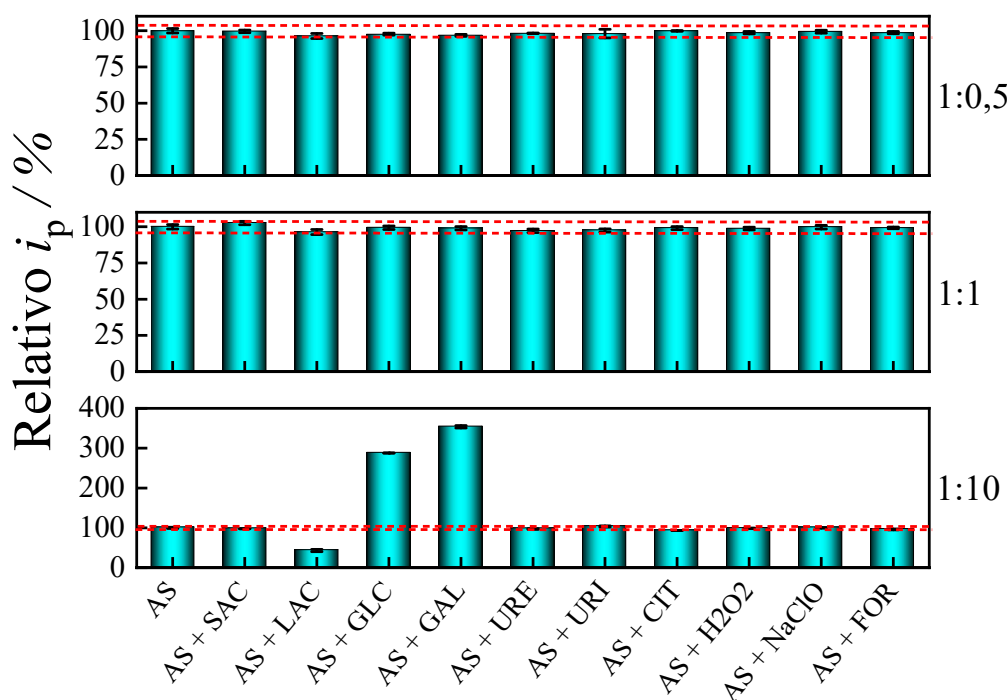
Dessa forma, os resultados indicam que o condicionamento do eletrodo de, garantiu a repetibilidade do sinal do AS, a curto e longo prazo com a DPV.

4.4. Seletividade para o AS

Com o procedimento eletroanalítico definido, realizou-se um estudo de interferentes para avaliar a seletividade do eletrodo de Cu para o AS na presença de potenciais interferentes que são rotineiramente encontrados no leite. Os interferentes incluíram açúcares naturalmente presentes: sacarose (SAC), lactose (LAC), glicose (GLC) e galactose (GAL), também ureia (URE) e ácido úrico (URI) que ocorrem naturalmente ou são adicionados ao leite de forma fraudulenta, e substâncias ilícitas adicionadas para estender o tempo de prateleira do leite: ácido cítrico (CIT), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hipoclorito de sódio (NaClO) e formaldeído (FOR).

O estudo avaliou o efeito dos possíveis interferentes no sinal de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AS. A i_{pa} média ($n = 3$) para o AS puro foi normalizada para representar 100 % do sinal, e seu intervalo de confiança foi calculado (com nível de confiança 95%). Foram registrados três voltamogramas para cada mistura de AS + interferente, para as proporções molares de 1:0,5, 1:1 e 1:10. A interferência das substâncias foi considerada positiva quando suas i_{pa} excederam o intervalo de confiança para o sinal do AS puro, os resultados obtidos estão apresentados na Figura 22.

Figura 22. Influência das possíveis substâncias interferentes sobre i_{pa} relativa de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AS. As linhas vermelhas tracejadas indicam o intervalo de confiança com 95% de grau de confiança para a média da i_{pa} do AS puro. As barras de erro representam o desvio padrão para a i_{pa} ($n = 3$) para cada condição. As proporções molares avaliadas de AS para interferentes foram de 1:0,5, 1:1 e 1:10.

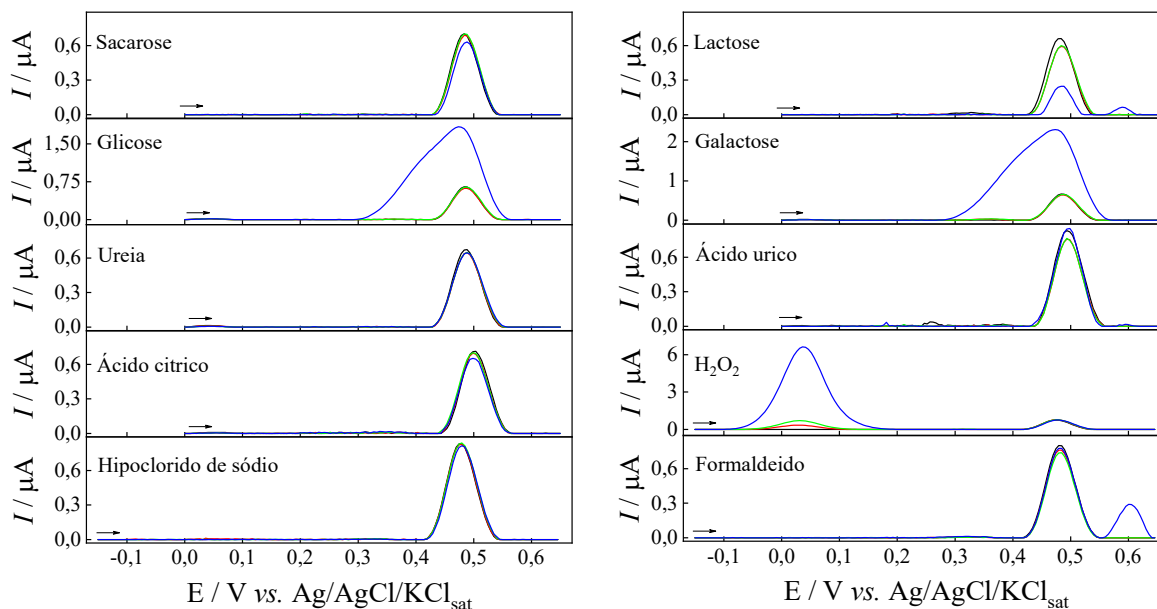


O estudo de interferentes indicou que nenhuma espécie interfere no sinal do AS se estiver com concentração menor ou igual à concentração do AS. Contudo, para concentrações 10 vezes maiores que o AS, GLC e GAL, interferiram, aumentando o sinal do AS em 300% e 400%, respectivamente, enquanto LAC interferiu com a diminuição do sinal em 57%, nenhuma outra espécie mostrou interferência significativa.

Esses resultados mostram a importância de um pré-tratamento de amostra capaz de eliminar GLC e GAL, a interferência da LAC pode ser contornada por meio do método de calibração por adição de padrão. Portanto, apesar das interferências observadas, o método apresenta seletividade satisfatória em relação ao AS.

Além disso, analisando os voltamogramas registrados durante o estudo, apresentados na Figura 23, é possível observar que a maioria das espécies não apresentou eletroatividade no intervalo de potencial investigado.

Figura 23. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH na presença de 100 μmol L⁻¹ de AS + concentrações variantes de substâncias interferentes. Condições voltamétricas: ΔE = 50 mV; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS + 50 μmol L⁻¹ de interferentes. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS + 100 μmol L⁻¹ de interferentes. (—) 100 μmol L⁻¹ de AS + 1000 μmol L⁻¹ de interferentes.

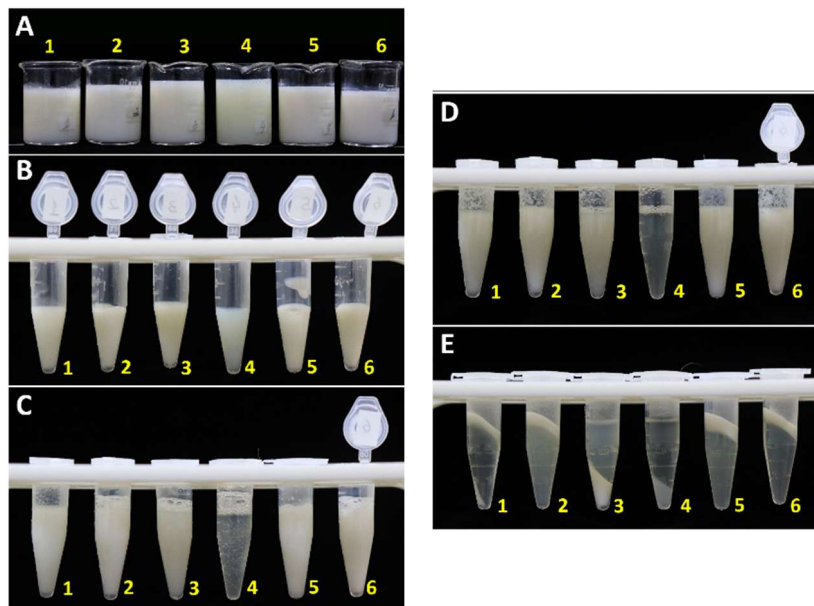


Com a Figura 23, também é possível observar que as espécies GLC e GAL, geraram picos que mascararam completamente o pico do AS. Além disso, o H₂O₂ produziu um pico voltamétrico em +0,05 V, e para concentrações dez vezes maiores do que o AS, o FOR produziu um pico em +0,60 V, ambos bem separados do pico do AS. Portanto, esse método também se mostra promissor para a determinação de peróxido de hidrogênio e formaldeído em amostras de leite.

4.5. Pré-tratamento das amostras de leite

Para aplicação do método voltamétrico desenvolvido, foram utilizadas seis amostras diferentes de leite: cru, integral, semidesnatado, desnatado, integral fortificado com vitaminas e integral sem lactose. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento experimental detalhado na seção 3.4. Esse procedimento oferece diversas vantagens, como pouco consumo de reagentes, 500 μL por amostra, eliminação de solventes orgânicos e tempo de processamento curto, permitindo a preparação de 8 amostras em aproximadamente 15 minutos. O pré-tratamento separou a matriz do leite em duas fases, uma fase semissólida, composta por frações proteicas e lipídicas, e uma fase líquida e límpida rica em água, conforme evidenciado pela Figura 24.

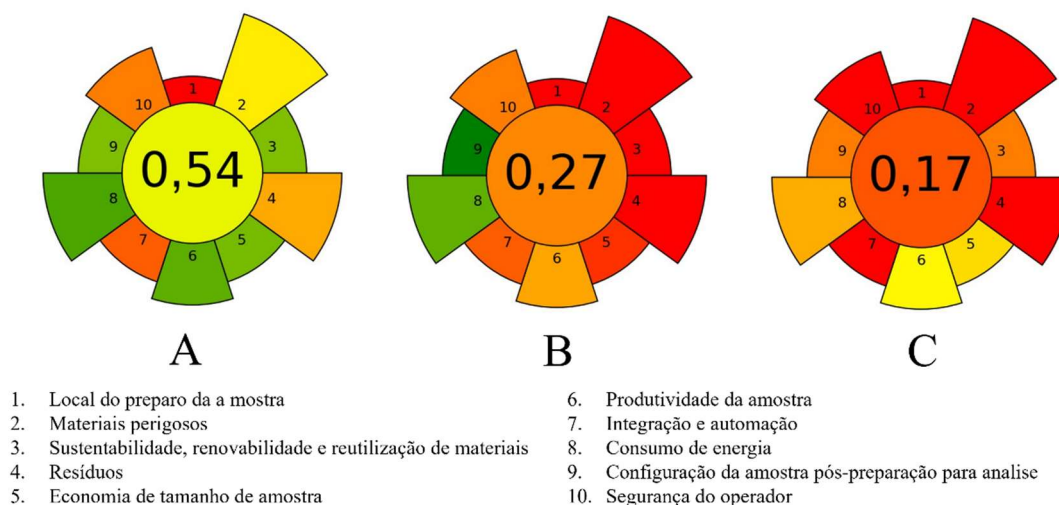
Figura 24. Imagens representativas ilustrando as etapas do pré-tratamento das amostras de leite. A) Amostras de leite não tratadas. B) 500 μL das amostras de leite transferidas para o tubo de polipropileno de microcentrifuga de 1,5 mL. C) Amostras após a adição de 100 μL de ZnSO_4 15% (m/v) e 400 μL de solução aquosa de NaOH 2,5 mol L^{-1} . D) amostras após 10 min de banho ultrassônico. E) Extratos finais das amostras após centrifugação de 5 min a 12000 rpm. Amostras de leite: 1 – Cru; 2 – Integral; 3 – Semidesnatado; 4 – Desnatado; 5 – Integral fortificado com vitaminas; 6 – Integral sem lactose.



É importante ressaltar que durante o pré-tratamento são adicionados 400 μL de 2,5 mol L^{-1} de NaOH nos 500 μL de amostra de leite, e, após a diluição do extrato na célula eletroquímica, a concentração resultante de NaOH é de aproximadamente 0,1 mol L^{-1} , concentração de eletrólito de suporte previamente otimizada.

O impacto ambiental do pré-tratamento proposto, foi medido de forma quantitativa com a métrica do AGREEprep, (Pena-Pereira *et al.*, 2022; Wojnowski *et al.*, 2022) sendo obtida uma pontuação de 0,54, apresentada na Figura 25-a com os pontos específicos analisados, mostrando que o método é moderadamente verde.

Figura 25. Resultados do AGREEprep para procedimentos usados da determinação do AS: (A) O método com DPV proposto. (B) O método oficial nº 975,30 da AOAC (AOAC, 2023). (C) O método apresentado por (Gentili *et al.*, 2012).



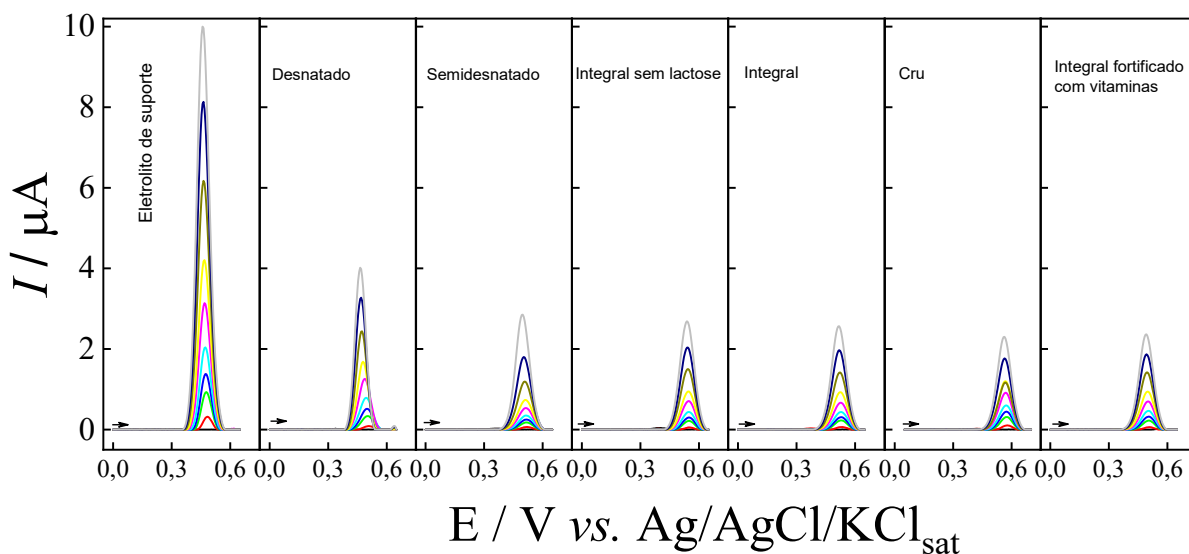
O método proposto foi comparado com o método oficial nº 975,30 da AOAC de pontuação 0,27 na Figura 25-b, procedimento que consiste na adição de 100 mL de leite em um béquer com 5 mL de ácido clorídrico, seguido de filtração e adição de 50 mL de éter etílico para formação de duas camadas, onde a parte aquosa é separada e a evaporação natural do éter ocorre, para posterior adição de uma gota de solução tricloreto de ferro, para mudança de cor na presença do AS (Tronco, 2018). Também foi comparado com o método apresentado por Gentili *et al.* (2012) de pontuação 0,17 na Figura 25-c, cujo procedimento envolve a adição de 5 mL de leite em um tubo de centrifuga, seguida de 10 mL de acetonitrila, mistura que é submetida a agitação, banho ultrassônico e centrifugação, a temperatura de 0°C, seguida de banho maria, corrente de nitrogênio e nova centrifugação. Portanto, de acordo com o AGREEprep, o método proposto apresenta menor impacto ambiental quando comparado aos outros métodos propostos para a quantificação de AS em leite.

O método proposto para o pré-tratamento das amostras de leite envolve duas etapas de diluição, a primeira uma diluição 1:1 da amostra original, seguido de uma diluição 1:10, do extrato no eletrólito de suporte. Na segunda etapa, 500 µL do extrato são adicionados a 4,5 mL de água ultrapura na célula eletroanalítica. Essas diluições sequenciais resultam em um fator de diluição total de 20, aumentando os valores efetivos de LOD e LOQ do método, para 60 e 200 µmol L⁻¹ (8,2 e 27,6 mg L⁻¹), respectivamente. Apesar dos novos valores estarem acima dos valores alcançados com técnicas mais

avanzadas, como HPLC, eles continuam suficientes para quantificar concentrações de AS tipicamente utilizadas em adulterações, que variam entre 400 e 500 mg L⁻¹ (Das; Biswas, 2025).

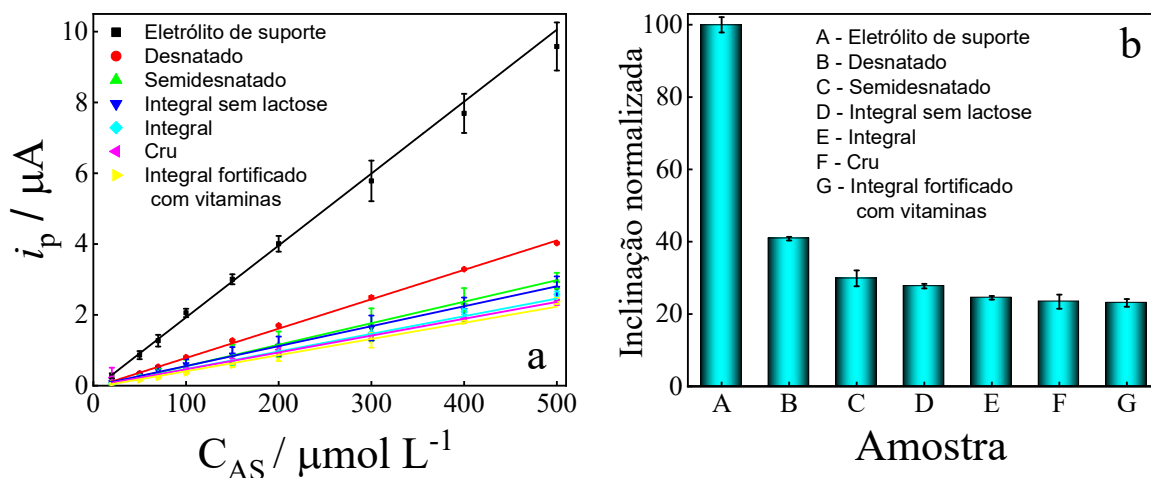
Voltamogramas de pulso diferencial foram registrados na ausência e na presença de diferentes concentrações de AS, para os extratos finais das seis amostras de leite, após o pré-tratamento e a diluição, e comparados com os voltamogramas do eletrólito de suporte, conforme mostra a Figura 26. É importante destacar que as diferentes concentrações de AS foram adicionadas sucessivamente apenas na célula eletroquímica. Esses voltamogramas evidenciam que o pré-tratamento das amostras removeu as espécies interferentes GAL e GLC, o que é confirmado pela ausência de qualquer sinal voltamétrico nos extratos diluídos antes da adição do AS.

Figura 26. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO no eletrólito e nos extratos finais das amostras de leite. Condições voltamétricas: $\Delta E = 50$ mV; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. Concentrações de AS: (—) 0; (—) 10; (—) 20; (—) 50; (—) 70; (—) 100; (—) 150; (—) 200; (—) 300, e (—) 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Posteriormente, foram construídas curvas analíticas para o AS em cada um dos extratos diluídos (Figura 27-a). A Figura 27-b apresenta as sensibilidades obtidas em cada extrato diluído e no eletrólito de suporte.

Figura 27. (a) Curvas analíticas obtidas por DPV nos extratos finais diluídos das diferentes amostras de leite. (b) Sensibilidades obtidas e normalizadas para cada um dos extratos diluídos. As sensibilidades foram normalizadas de acordo com a sensibilidade obtida no eletrólito de suporte (considerada como 100%).



A Figura 27-b mostra a diferença de sensibilidade dos extratos de leite com o eletrólito de suporte, indicando que o pré-tratamento não foi capaz de eliminar completamente os efeitos da matriz. O método teve maior sensibilidade para o leite desnatado (seguido do semidesnatado), sugerindo que a ausência de lipídeos influencia no sinal do AS. Ademais, comparando os demais extratos, o método teve maior sensibilidade para o leite sem lactose, evidenciando a interferência da LAC que provoca queda do sinal.

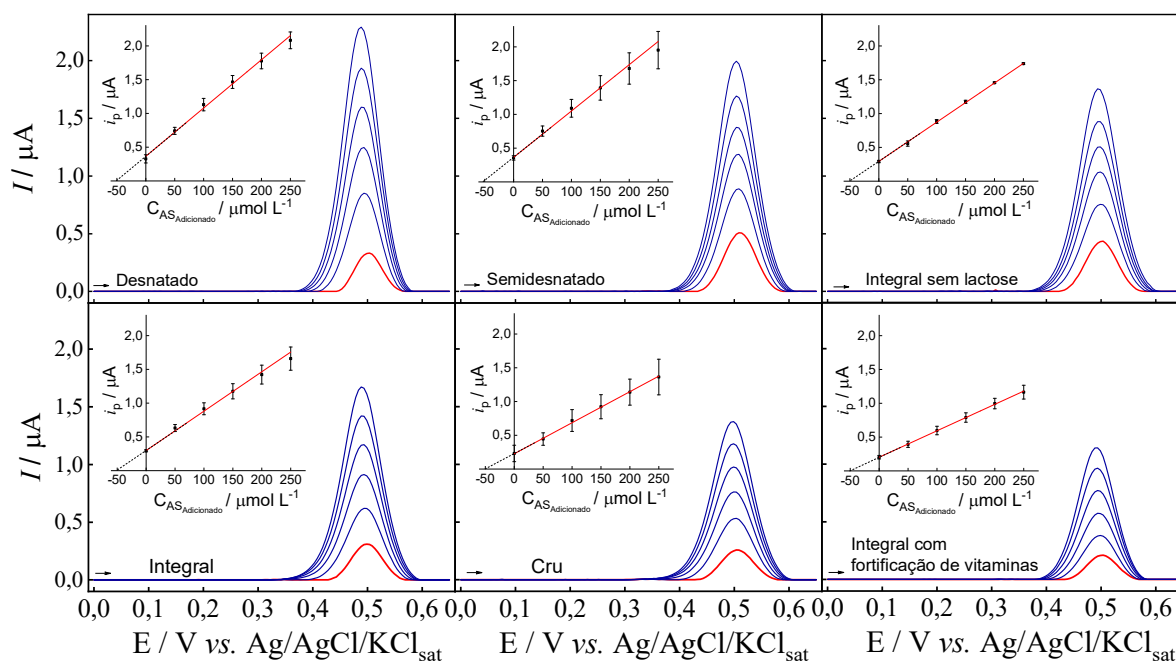
Para a maioria dos extratos, houve um decréscimo de mais de 50% da sensibilidade comparada à obtida em eletrólito de suporte, portanto para compensar os efeitos de matriz, o método de calibração por adição de padrão foi usado para determinação do AS em amostras fortificadas, como será apresentado na próxima seção.

4.6. Análise das amostras

Dentre as seis amostras de leite analisadas, nenhuma apresentou pico voltamétrico referente ao AS, indicando sua ausência, ou presença abaixo do LOD do método. Portanto, para avaliação do método proposto, foram realizados experimentos de adição e recuperação em todas as amostras.

Cada amostra foi fortificada com $138 mg L^{-1}$ de AS, correspondendo a $50 \mu mol L^{-1}$ na célula eletroquímica. As amostras foram fortificadas e depois submetidas ao processo de pré-tratamento completo, e as concentrações de AS foram determinadas pelo método de adição de padrão. Os voltamogramas de pulso diferencial registrados e as respectivas curvas de adição de padrão para as amostras fortificadas são apresentadas na Figura 28.

Figura 28. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base registrados com eletrodo de Cu/CuO nos extratos finais do leite. (—) Sinal para as amostras fortificadas. (—) Adições sucessivas de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de padrão de AS. Condições voltamétricas: $\Delta E = 50 \text{ mV}$; largura de pulso = 25 ms; step = 5 mV. Os gráficos inseridos mostram as respectivas curvas analíticas. As barras de erro representam o desvio padrão da i_{pa} ($n = 3$).



A Figura 28 mostra como o perfil voltamétrico do AS nos extratos de leite ficou consistente com o perfil observado no eletrólito suporte. Além disso, todas as curvas analíticas apresentam linearidade satisfatória, com R^2 com valores maiores do que 0,99.

As concentrações encontradas de AS e as respectivas porcentagens recuperadas estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagens de recuperação e determinação das concentrações de AS nas amostras de leite fortificadas.

Amostra de leite	Adicionado (mg L^{-1}) ^a	Encontrado (mg L^{-1}) ^b	Recuperado (%)	$t_{\text{crítico}}$
Desnatado	138	146 ± 8	106 ± 6	1,7
Semidesnatado	138	141 ± 3	102 ± 2	1,7
Integral sem lactose	138	139 ± 4	101 ± 3	2,9
Integral sem lactose	138	148 ± 5	107 ± 3	3,4
Cru	138	124 ± 5	91 ± 3	4,0
Integral fortificado com vitaminas	138	141 ± 7	102 ± 5	0,7

^a Adicionado à amostra, resultando na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na célula eletroquímica. ^b Valor médio $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). $t_{\text{crítico}} = 4,30$ com 2 graus de Liberdade e 95% de confiança (Miller; Miller, 2010).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, as porcentagens de recuperação do AS variaram de 91 a 107%, com valores de RSD de 2,1 a 5,3%, concordando com os critérios de desempenho da AOAC para métodos padrão na concentração de 100 mg L⁻¹, sendo a porcentagem recuperada de 90 a 107%, com RSD ≤ 5,3% (AOAC, 2016). O teste t confirmou a ausência de desvio significativo das recuperações individuais em relação a 100%, sendo que todos os valores estavam abaixo do valor crítico no nível de confiança de 95%. Todos esses resultados demonstram a exatidão satisfatória do método voltamétrico proposto para quantificação de AS em amostras de leite.

A Tabela 3 lista alguns métodos eletroquímicos descritos na literatura para a determinação de AS em diferentes matrizes. Comparando o desempenho analítico do eletrodo de Cu com os outros métodos é evidente que o método proposto no presente trabalho não apresenta o menor LOD. Ainda assim, o eletrodo de Cu apresenta algumas vantagens, como custo-benefício favorável por ser fabricado com materiais baratos e amplamente disponíveis, simplicidade por não depender de procedimentos complexos para a modificação química, e repetibilidade satisfatória.

Tabela 3. Desempenho analítico de alguns métodos eletroquímicos de determinação do AS.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Amostra	Referência
Filme de PTFE/RGO	DPV	0,0001 - 10	$2,3 \times 10^{-5}$	Formulações farmacêuticas	(Yu <i>et al.</i> , 2020)
Cu-MOFs-CB-nafion/SPE	DPV	100 - 90	12,5	Mudas de pepino	(Yang <i>et al.</i> , 2020)
MIPs/TiO ₂	DPV	0,1 - 50	0,039	Formulações farmacêuticas	(Xiong <i>et al.</i> , 2020)
Ce/ZrO ₂ -CPE	SWV	5 - 1000	1,1	Leite, sêrum	(Alizadeh; Nayeri, 2018)
CFE	DPV	2 - 3000	1,68	Formulações farmacêuticas	(Park; Eun, 2016)
GCE	DPV	7 - 343	7	Formulações farmacêuticas	(Torriero <i>et al.</i> , 2004)
MWCNTs	Amperometria	2 - 3000	0,8	Formulações farmacêuticas	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)
C-SPE	SWV	16 - 3000	5,6	Urina	(Rawlinson <i>et al.</i> , 2018)
Fita de Carbono	DPV	0,5 - 100	0,05	Folhas de tomate	(Sun <i>et al.</i> , 2014)
Compósito de Grafite-Epóxi	DPV	5 - 200	5	Sangue de rato	(Zhu, Yongchun; Guan; Ji, 2009)
GCE-ZnO/CuO/Y ₂ O ₃	DPV	1,5 - 15	0,18	Suco de fruta	(Aljabri <i>et al.</i> , 2025)
Cu	DPV	10 - 500	3	Leite	Esse método/ (Freitas <i>et al.</i> , 2025)

Dentre os métodos listados na Tabela 3, apenas um outro método determina AS no leite, utilizando um eletrodo de pasta de carbono (CPE). Embora os CPE também apresentem baixo custo e sejam fáceis de fabricar, a síntese do Ce/ZrO₂ envolve procedimentos que consomem muito tempo e energia. Embora o LOD obtido com o CPE-Ce/ZrO₂ seja menor do que o obtido com o eletrodo de Cu, este último ainda é competitivo para a determinação de AS no leite, devido à sua fabricação simples e de baixo custo, baseada em materiais comerciais e amplamente disponíveis.

É importante salientar que todas as medidas eletroquímicas foram conduzidas com um único eletrodo de cobre, que exibiu resposta voltamétrica estável durante todo o período experimental. O desempenho contínuo combinado com a rotina do condicionamento eletroquímico antes do início de cada experimento, demonstra que o eletrodo de cobre tem estabilidade a longo prazo.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que um eletrodo de Cu fabricado a partir de um fio de cobre comumente empregado em instalações elétricas residenciais apresentou desempenho superior ao de eletrodos comerciais de Pt e GCE para a quantificação do AS em meio alcalino. Esse eletrodo foi quimicamente modificado mediante a formação de uma camada oxidada, rica em CuO, obtida por um condicionamento eletroquímico (Cu/CuO) simples e rápido usando a técnica de voltametria cíclica em meio alcalino. Essa camada modificadora intensificou o sinal voltamétrico do AS e evitou a desativação do eletrodo pelos intermediários formados durante sua eletrooxidação, garantindo repetitividade do sinal.

Dentre as técnicas de pulso avaliadas, a DPV apresentou a melhor detecção do AS em NaOH à 0,1 mol L⁻¹. A técnica apresentou alta seletividade para o AS, com exceção dos interferentes glicose e galactose, que em concentrações maiores que do AS mascararam seu sinal, interferência corrigida com o pré-tratamento da amostra. Ademais, a lactose provocou queda do sinal em altas concentrações, interferência que foi corrigida com adição de padrão.

O método utilizado, apresenta valores de LOD e LOQ dentro dos valores de AS que utilizados para adulteração e, apresentou resultados satisfatórios de recuperação para as amostras fortificadas, indicando sua eficiência. Além de baixo consumo de amostra e de reagentes, eliminação do uso de solventes orgânicos, e um procedimento rápido capaz de analisar 8 amostras simultaneamente.

Analisando a pegada ambiental do pré-tratamento da amostra, o AGREEprep de 0,54 indica uma sustentabilidade moderada, que, apesar de não ser ideal, é superior aos procedimentos já utilizados. Portanto, este método se comprova uma ferramenta promissora para quantificação do AS, em amostras de leite bovino.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICHI, Mahdis; MOVASSAGHHAZANI, Mohammadhosein; AFSHAR MOGADDAM, Mohammad Reza. Dispersive solid phase extraction of some sulfonamide antibiotics from milk combined with dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, [N.p.], vol. 135, 1 nov. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106631>.

ALIZADEH, Taher; NAYERI, Sahar. Electrocatalytic oxidation of salicylic acid at a carbon paste electrode impregnated with cerium-doped zirconium oxide nanoparticles as a new sensing approach for salicylic acid determination. **Journal of Solid State Electrochemistry**, [N.p.], vol. 22, n° 7, p. 2039–2048, 1 jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10008-018-3907-1>.

ALJABRI, Mahmood D.; MAHMUD ALAM, Md; FAZLE RABBEE, Muhammad; AHMED, Jahir; AL-HUMAIDI, Jehan Y.; ABDEL-FADEEL, Mohamed A.; ALMAHRI, Albandary; RAHMAN, Mohammed M. Electrochemical detection of salicylic acid in fruit products with ternary ZnO/CuO/Y2O3 nanocomposites embedded PEDOT:PSS by differential pulse voltammetry. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, [N.p.], vol. 240, 30 jan. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2024.115583>.

ANANTHARAJ, Sengeni; SUGIME, Hisashi; YAMAOKA, Shohei; NODA, Suguru. Pushing the Limits of Rapid Anodic Growth of CuO/Cu(OH)₂ Nanoneedles on Cu for the Methanol Oxidation Reaction: Anodization pH Is the Game Changer. **ACS Applied Energy Materials**, [N.p.], vol. 4, n° 1, p. 899–912, 25 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsaem.0c02822>.

AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements,. **Official Methods of Analysis**. 20. ed. Rochville: AOAC International, 2016. ed 20, p. 1–18.

AOAC. **Official Methods of Analysis, AOAC 975.30: Salicylic Acid in Food and Beverages**. 22. ed. Rochville: AOAC International, 2023.

ARAÚJO, Diele A.G.; OLIVEIRA, Ana C.M.; PRADELA-FILHO, Lauro A.; TAKEUCHI, Regina M.; SANTOS, André L. A novel miniaturized electroanalytical device integrated with gas extraction for the voltammetric determination of sulfite in beverages. **Analytica Chimica Acta**, [N.p.], vol. 1185, 15 nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339067>.

AUN, Tan Tiek; SALLEH, Noordini Mohamad; ALI, Umi Fazara Md; MANAN, Ninie Suhana Abdul. Non-Enzymatic Glucose Sensors Involving Copper: An Electrochemical Perspective. **Taylor and Francis Ltd.**, vol. 53, n° 3, p. 537–593, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1967720>.

AZAD, Tanzina; AHMED, Shueb. Common milk adulteration and their detection techniques. **BioMed Central Ltd.**, vol. 3, n° 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3>.

BARRAGAN, José T.C.; KOGIKOSKI, Sergio; DA SILVA, Everson T.S.G.; KUBOTA, Lauro T. Insight into the Electro-Oxidation Mechanism of Glucose and Other

Carbohydrates by CuO-Based Electrodes. **Analytical Chemistry**, [N.p.], vol. 90, nº 5, p. 3357–3365, 6 mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04963>.

DAS, Upama; BISWAS, Rajib. Developing and implementing a facile colorimetric method for detecting salicylic acid in raw milk via biogenic plasmonic nanostructures. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, [N.p.], vol. 242, 1 jan. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2024.115818>.

ELGRISHI, Noémie; ROUNTREE, Kelley J.; MCCARTHY, Brian D.; ROUNTREE, Eric S.; EISENHART, Thomas T.; DEMPSEY, Jillian L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, [N.p.], vol. 95, nº 2, p. 197–206, 13 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.

FATIBELLO-FILHO, Orlando; SILVA, Tiago Almeida; MORAES, Fernando Cruz de; SITTA, Elton. **Eletroanálises – Aspectos teóricos e práticos**. São Carlos: EdUFSCar, 2022. 1–504 p.

FRANCESCHINI, Filippo; FERNANDES, Catarina; SCHOUTEDEN, Koen; USTARROZ, Jon; LOCQUET, Jean Pierre; TAURINO, Irene. Tailoring the glucose oxidation activity of anodized copper thin films. **Catalysis Science and Technology**, [N.p.], vol. 15, nº 10, p. 3022–3035, 1 abr. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d4cy01248h>.

FREITAS, Giulia C.P.; MESSIAS, Vitoria B.; TAKEUCHI, Regina M.; SANTOS, André L. Cost-Effective Voltammetric Determination of Salicylic Acid in Milk Using Copper Wire Electrodes. **ACS Omega**, [N.p.], vol. 10, nº 41, p. 48875–48886, 21 out. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c06973>.

GALLO, Pasquale; FABBROCINO, Serena; VINCI, Floriana; FIORI, Maurizio; DANESE, Vincenzo; SERPE, Luigi. Confirmatory identification of sixteen non-steroidal anti-inflammatory drug residues in raw milk by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [N.p.], vol. 22, nº 6, p. 841–854, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.3430>.

GENTILI, Alessandra; CARETTI, Fulvia; BELLANTE, Simona; MAINERO ROCCA, Lucia; CURINI, Roberta; VENDITTI, Alessandro. Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [N.p.], vol. 404, nº 5, p. 1375–1388, set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6231-0>.

GIRI, Sachin D.; SARKAR, A. Electrochemical Study of Bulk and Monolayer Copper in Alkaline Solution. **Journal of The Electrochemical Society**, [N.p.], vol. 163, nº 3, p. H252–H259, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1149/2.0071605jes>.

GIZIŃSKI, Damian; BRUDZISZ, Anna; SANTOS, Janaina S.; TRIVINHO-STRIXINO, Francisco; STĘPNIOWSKI, Wojciech J.; CZUJKO, Tomasz. Nanostructured anodic copper oxides as catalysts in electrochemical and photoelectrochemical reactions. **MDPI**, vol. 10, nº 11, p. 1–38, 1 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal10111338>.

GOMES, José Carlos; OLIVEIRA, Gustavo Fonseca. Determinação de alguns índices em alimentos. **Análises físico-químicas de alimentos**. 2^a reimpressão. Viçosa: Editora UFV, 2013. ed 2^a reimpressão, p. 119–300.

HARRIS, Daniel C.; LUCY, Charles A. **Análise Química Quantitativa**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2023. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788521638544/>. Acessado: 18 mar. 2026.

HASANZADEH, Mohammad; KHALILZADEH, Balal; SHADJOU, Nasrin; KARIM-NEZHAD, Ghasem; SAGHATFOROUSH, Lotfali; KAZEMAN, Isa; ABNOSI, Mohammad Hossein. A new kinetic-mechanistic approach to elucidate formaldehyde electrooxidation on copper electrode. **Electroanalysis**, [N.p.], vol. 22, n° 2, p. 168–176, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elan.200900294>.

JESUS, Lorena Rosa de; VIEIRA, Paulo Rufino Paulino; PEREIRA, Saulo Gonçalves; OLIVEIRA, Nayara Maria de. PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL, MINAS GERAIS E MESORREGIÃO DO ALTO PARANAÍBA: Uma breve revisão narrativa de literatura. **Scientia Generalis**, [N.p.], vol. 5, n° 2, p. 500–507, 31 out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.22289/sg.v5n2a53>.

KARIM-NEZHAD, Ghasem; JAFARLOO, Roghieh; DORRAJI, Parisa Seyed. Copper (hydr)oxide modified copper electrode for electrocatalytic oxidation of hydrazine in alkaline media. **Electrochimica Acta**, [N.p.], vol. 54, n° 24, p. 5721–5726, 1 out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.05.019>.

LIU, Dandan; LI, Mingji; LI, Hongji; LI, Cuiping; WANG, Guilian; LI, Penghai; YANG, Baohe. Core-shell Au@Cu₂O-graphene-polydopamine interdigitated microelectrode array sensor for in situ determination of salicylic acid in cucumber leaves. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [N.p.], vol. 341, 15 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130027>.

LUPTON, Sara J.; SHAPPELL, Nancy W.; SHELVER, Weilin L.; HAKK, Heldur. Distribution of Spiked Drugs between Milk Fat, Skim Milk, Whey, Curd, and Milk Protein Fractions: Expansion of Partitioning Models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [N.p.], vol. 66, n° 1, p. 306–314, 10 jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04463>.

MACARIO, Alberto; LÓPEZ, Juan Carlos; BLANCO, Susana. Molecular Structure of Salicylic Acid and Its Hydrates: A Rotational Spectroscopy Study. **International Journal of Molecular Sciences**, [N.p.], vol. 25, n° 7, 1 abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25074074>.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. ed. [N.p.]: Pearson Education: Gosport, 2010.

NASCIMENTO, Carina F.; SANTOS, Poliana M.; PEREIRA-FILHO, Edenir Rodrigues; ROCHA, Fábio R.P. Recent advances on determination of milk adulterants. **Elsevier Ltd**, vol. 221, p. 1232–1244, 15 abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>.

NGAMCHUEA, Kamonwad. An overview of the voltammetric behaviour of Cu single-crystal electrodes. **Elsevier B.V.**, vol. 37, 1 fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2022.101193>.

OLIVEIRA, Ana C.M.; ARAÚJO, D. A.G.; PRADELA-FILHO, Lauro A.; TAKEUCHI, Regina M.; SANTOS, André L. A robust and versatile micropipette tip-based miniaturized electrochemical cell for determination of carbendazim. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [N.p.], vol. 327, 15 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128880>.

PACHECO, W F ; SEMAAN, F S ; ALMEIDA, V G K ; RITTA, A G S L ;; AUCÉLIO, R Q. **Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos Voltammetry: A Brief Review About Concepts**. [N.p.]: [S.n.], 2013. 516–537 p. Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>.

PARK, Jinwoo; EUN, Changsun. Electrochemical Behavior and Determination of Salicylic Acid at Carbon-fiber Electrodes. **Electrochimica Acta**, [N.p.], vol. 194, p. 346–356, 10 mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.02.103>.

PEDROTTI, Jairo J.; ANGNES, Lúcio; GUTZ, Ivano G.R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. **Electroanalysis**, [N.p.], vol. 8, nº 7, p. 673–675, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elan.1140080713>.

PENA-PEREIRA, Francisco; TOBISZEWSKI, Marek; WOJNOWSKI, Wojciech; PSILLAKIS, Eleftheria. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. **Advances in Sample Preparation**, [N.p.], vol. 3, 1 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100025>.

RAWLINSON, Sean; MCLISTER, Anna; KANYONG, Prosper; DAVIS, James. Rapid determination of salicylic acid at screen printed electrodes. **Microchemical Journal**, [N.p.], vol. 137, p. 71–77, 1 mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.09.019>.

SILVA, Priscila S.L.; ARAUJO, Diele A.G.; MEDEIROS, Débora N.; ANDO, Rômulo A.; PRADELA-FILHO, Lauro A.; PAIXÃO, Thiago R.L.C. Copper Electrodes via 3D Printing and Laser Sintering Fabrication for Nonenzymatic Glucose Detection. **ACS Applied Electronic Materials**, [N.p.], vol. 7, nº 14, p. 6520–6528, 22 jul. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsaelm.5c00862>.

SUN, Li Jun; FENG, Qiu Mei; YAN, Yong Feng; PAN, Zhong Qin; LI, Xiao Hui; SONG, Feng Ming; YANG, Haibing; XU, Jing Juan; BAO, Ning; GU, Hai Ying. Paper-based electroanalytical devices for in situ determination of salicylic acid in living tomato leaves. **Biosensors and Bioelectronics**, [N.p.], vol. 60, p. 154–160, 15 out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.04.021>.

SZKOP, Michał; SZKOP, Urszula; KĘSZYCKA, Paulina; GAJEWSKA, Danuta. A Simple and Robust Protocol for fast RP-HPLC Determination of Salicylates in Foods. **Food Analytical Methods**, [N.p.], vol. 10, nº 3, p. 618–625, 1 mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0621-4>.

TANG, Lingjuan; LI, Daodong; LIU, Wei; TANG, Yihui; ZHANG, Rongcheng; TIAN, Yiran; TAN, Rong; YANG, Xiaolong; SUN, Lijun. Microneedle electrochemical sensor

based on disposable stainless-steel wire for real-time analysis of indole-3-acetic acid and salicylic acid in tomato leaves infected by Pst DC3000 in situ. **Analytica Chimica Acta**, [N.p.], vol. 1316, 8 ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342875>.

TOMIC, Thierry Ribeiro; BARBOSA, William Fernandes; REINER, Nelson; ALBUQUERQUE, Alian (orgs.). **Anuário Leite 2025**. [N.p.]: Embrapa Gado de Leite, 2025. 1–128 p. Disponível em: embrapa.br/gado-de-leite. Acessado: 11 nov. 2025.

TORRIERO, Angel A.J.; LUCO, Juan M.; SERENO, Leonides; RABA, Julio. Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. **Talanta**, [N.p.], vol. 62, nº 2, p. 247–254, 6 fev. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.07.005>.

TRONCO, Vania Maria. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 5. ed. Santa Maria: editoraufsm, 2018.

VAN PAMEL, Els; DAESELEIRE, Els. A multiresidue liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the detection and quantitation of 15 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [N.p.], vol. 407, nº 15, p. 4485–4494, 1 jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8634-1>.

WEI, Chao; SUN, Shengnan; MANDLER, Daniel; WANG, Xun; QIAO, Shi Zhang; XU, Zhichuan J. Approaches for measuring the surface areas of metal oxide electrocatalysts for determining their intrinsic electrocatalytic activity. **Chemical Society Reviews**, [N.p.], vol. 48, nº 9, p. 2518–2534, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8CS00848E>. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C8CS00848E>.

WOJNOWSKI, Wojciech; TOBISZEWSKI, Marek; PENA-PEREIRA, Francisco; PSILLAKIS, Eleftheria. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **Elsevier B.V.**, vol. 149, 1 abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.

XIONG, Xiuxiu; LI, Chao; YANG, Xiaoyu; SHU, Yun; JIN, Dangqin; ZANG, Yang; SHU, Yusheng; XU, Qin; HU, Xiao Ya. In situ grown TiO₂ nanorod arrays functionalized by molecularly imprinted polymers for salicylic acid recognition and detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [N.p.], vol. 873, 15 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114394>.

YANG, Lei; CHEN, Da; WANG, Xiaodong; LUO, Bin; WANG, Cheng; GAO, Guangheng; LI, Hongji; LI, Aixue; CHEN, Liping. Ratiometric electrochemical sensor for accurate detection of salicylic acid in leaves of living plants. **RSC Advances**, [N.p.], vol. 10, nº 64, p. 38841–38846, 23 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d0ra05813k>.

YU, Qinghua; ZHAO, Ying; HUANG, Lihui; SUN, Jiawei; JIN, Dangqin; SHU, Yun; XU, Qin; HU, Xiao. A flexible rGO electrode: a new platform for the direct voltammetric detection of salicylic acid. **Royal Society of Chemistry**, [N.p.], vol. 12, nº 31, 2020.

ZHANG, Wei De; XU, Bin; HONG, Yu Xiang; YU, Yu Xiang; YE, Jian Shan; ZHANG, Jia Qi. Electrochemical oxidation of salicylic acid at well-aligned multiwalled carbon nanotube electrode and its detection. **Journal of Solid State Electrochemistry**, [N.p.],

vol. 14, n° 9, p. 1713–1718, set. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10008-010-1014-z>.

ZHU, Pengcheng; ZHAO, Yuyuan. Effects of electrochemical reaction and surface morphology on electroactive surface area of porous copper manufactured by Lost Carbonate Sintering. **RSC Advances**, [N.p.], vol. 7, n° 42, p. 26392–26400, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7ra04204c>.

ZHU, Yongchun; GUAN, Xinyan; JI, Hongguo. Electrochemical solid phase micro-extraction and determination of salicylic acid from blood samples by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. **Journal of Solid State Electrochemistry**, [N.p.], vol. 13, n° 9, p. 1417–1423, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10008-008-0707-z>.