



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



Dispositivo eletroquímico miniaturizado e microextração em gota única por headspace: uma combinação promissora para determinação de nitrito

Dissertação de mestrado

LETICIA BALDISSERA FERNANDES

Orientadora

PROFA. DRA. REGINA MASSAKO TAKEUCHI

UBERLÂNDIA,
2022

Dispositivo eletroquímico miniaturizado e microextração em gota única por headspace: uma combinação promissora para determinação de nitrito

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

Candidata: **Leticia Baldissera Fernandes**

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Regina Massako Takeuchi

Linha de pesquisa: Eletroquímica Aplicada

UBERLÂNDIA,

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F363 2022	Fernandes, Leticia Baldissera, 1997- Dispositivo eletroquímico miniaturizado e microextração em gota única por headspace: uma combinação promissora para determinação de nitrito [recurso eletrônico] / Leticia Baldissera Fernandes. - 2022. Orientadora: Regina Massako Takeuchi. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.648 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Química. I. Takeuchi, Regina Massako, 1974- (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Química. III. Título.
--------------	---

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpqquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química					
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico PPGQUI					
Data:	Dezesseis de novembro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17h00	
Matrícula do Discente:	12012QMI007					
Nome do Discente:	Leticia Baldissera Fernandes					
Título do Trabalho:	Dispositivo eletroquímico miniaturizado e microextração em gota única por headspace: uma combinação promissora para determinação de nitrito					
Área de concentração:	Química					
Linha de pesquisa:	Eletroquímica Aplicada					
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a análise de amostras de interesse ambiental da microrregião de Ituiutaba (Noroeste do Triângulo Mineiro)					

Reuniu-se por meio de webconferência, link <https://teams.microsoft.com/j/meetupjoin/19%3a1eef25313347477baf328f121d6ed0a7%40thread.tacv2/1665873115827?context=%7b%22id%22%3a%22cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451%22%2c%22oid%22%3a%221efe4033-14e6-4704-9a55-0b1b285258b7%22%7d>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: **Edmar Isaías de Melo**, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; **Renata Pereira Alves Balvedi**, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e **Regina Massako Takeuchi**, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Regina Massako Takeuchi, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Regina Massako Takeuchi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/11/2022, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edmar Isaias de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 16/11/2022, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Pereira Alves Balvedi, Usuário Externo**, em 16/11/2022, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4026054** e o código CRC **A9C77F5F**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, por todo incentivo.

Conseguimos!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família e, principalmente, aos meus pais, pela força, apoio, paciência e amor durante toda a minha caminhada. Ainda que muitas dificuldades tenham surgido ao longo destes 6 anos e meio, sempre estiveram presentes mesmo à distância. Por isso, este trabalho é por eles e para eles! Agradeço também ao meu companheiro, Luiz Eduardo, pela calma, bondade, paciência e companheirismo nessa reta final. Obrigada por fazer com que essa caminhada ficasse um pouco leve. À sua família, que me acolheu como filha. Muito obrigada a todos!

Agradeço também à minha família científica, meus orientadores, André e Regina, por terem me acolhido no grupo de pesquisa há 5 anos. Agradeço também por todo o crescimento profissional e, sem sombra de dúvidas, meu crescimento pessoal até aqui. Vocês são fonte de inspiração! Ao grupo de pesquisa, por ter tido a oportunidade de conviver com pessoas maravilhosas e, também, pelos inúmeros momentos que partilhamos no laboratório: Vitória, João Vitor, Vinicius, Luiz André, Nathália, Cynthia, Débora, Dayane, Giovanne e Carem. Em especial, agradeço à Diele por ter me acompanhado todo este período do mestrado, pela paciência (e bota paciência rs) e por me incentivar a continuar mesmo quando eu achava que já não tinha mais jeito. Muito obrigada a todos, vocês são muito especiais para mim!

Agradeço à minha outra família científica, meus amigos da vida, do laboratório, de graduação e aos meus professores que me acompanharam durante toda a minha trajetória: Élide, Marcos, Henrique, Lauro, Victoria, Mayara, Ana Clara, Naiara, Allanna, Jonathan, Isabela, Laís, Leonardo, Pablo, Poliana, Anizio, Rosana, Rodrigo, Renata e Gilberto por todos os ensinamentos, pela amizade, momentos de descontração, apoio e parceria. Não poderia deixar de agradecer, em especial, ao Allyson, por toda a paciência, força, cuidado e companheirismo (dentro e, principalmente, fora do laboratório); ele sabe o quanto sou grata e o quanto ele é especial nessa minha caminhada.

Agradeço à UFU, e ao ICENP, por terem sido a minha “casa” todos estes anos e pela estrutura para que eu pudesse desenvolver este trabalho; a todos os seus funcionários meu muito obrigada também.

À FAPEMIG, (proc.: APQ-02905-15, APQ-02078-15 e APQ-01316-22), pelos recursos financeiros disponibilizados ao grupo de pesquisa, sem os quais, este trabalho não teria sido possível.

Agradeço também aos membros da banca, por aceitarem o convite, pela disponibilidade para ler meu trabalho e pelas contribuições tão valiosas.

Enfim, é com muito carinho que escrevo para todas estas pessoas listadas neste agradecimento. É impossível imaginar uma reta final sem a contribuição de cada uma delas. “Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”. Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

Levando em consideração a vasta aplicabilidade do nitrito em diversos setores, da agricultura à indústria e, principalmente no campo alimentício em que é empregado como conservantes de bebidas e alimentos processados, é irrefutável que o íon nitrito tem contribuído no desenvolvimento da sociedade. Todavia, a descoberta de sua potencial toxicidade tem gerado inúmeras preocupações e, por este motivo, a detecção de nitrito é bastante relevante para a saúde pública e monitoramento ambiental. Face ao exposto, o desenvolvimento de dispositivos miniaturizados fabricados a partir de materiais reutilizáveis combinado a uma técnica de microextração, é uma estratégia mais ambientalmente amigável, acessível e promissora para a quantificação de nitrito. Esta combinação diminui substancialmente o custo total do sistema, além da quantidade de reagentes e de amostra consumidos e de resíduos gerados, pois as análises são realizadas em volumes na ordem de μL , sem a necessidade do emprego de solventes orgânicos na extração. Neste sentido, a proposta deste trabalho foi empregar um dispositivo eletroquímico miniaturizado e fabricado a partir de materiais alternativos combinado à etapa de microextração em gota única por headspace, também considerada uma técnica de extração miniaturizada. Por meio dos resultados obtidos, é evidente que a combinação do dispositivo à etapa de microextração promoveu uma melhora no desempenho analítico do dispositivo, diminuindo os limites de detecção e quantificação, além de melhorar substancialmente a sensibilidade quando comparado com os resultados sem a etapa de extração. Estes efeitos observados são justificados devido à pré-concentração alcançada, ao serem empregados apenas 500 μL de solução nas análises eletroanalíticas. Além disso, uma vantagem do método está relacionada ao fato de que não houve a necessidade da modificação da superfície do eletrodo, etapa que, na maioria dos trabalhos, necessita de sínteses demoradas e que utilizam reagentes caros. Por fim, a aplicabilidade do sistema para quantificação de nitrito foi avaliada para diferentes amostras de água: de torneira, mineral e de aquário doméstico em diferentes níveis de concentração (30, 60, 90 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$), sendo obtidos valores de recuperação próximos a 100%. Frente a todos os aspectos elencados, este trabalho descreve um sistema analítico promissor para determinação de nitrito, fazendo com que metodologias acessíveis e ambientalmente amigáveis possam ser cada vez mais exploradas.

Palavras-chaves: dispositivo eletroquímico miniaturizado, microextração em gota única por headspace, nitrito, química analítica verde, materiais alternativos.

ABSTRACT

Considering the wide applicability of nitrite in various sectors, from agriculture to industry and, mainly used in the food field as preservatives for beverages and processed foods, it is undeniable that the nitrite ion has contributed to the development of society; however, the discovery of its potential toxicity has raised numerous concerns and for this reason, the detection of nitrite is quite relevant for public health and environmental monitoring. In view of the above, the development of miniaturized devices made from reused materials combined with a microextraction technique, is a more environmentally friendly, accessible, and promising approach for nitrite quantification. This combination reuses materials for the construction of the electrochemical device, remarkably decreasing the total cost of the system, also reducing the amount of chemicals and sample consumed and residues produced, since the analyzes are performed on the μL volume scale, without the need for organic solvents in the extraction. In this sense, the purpose of this work was to employ a miniaturized electrochemical device made from alternative and reused materials combined with a headspace single drop microextraction step, also considered a miniaturized extraction technique. Through the results, it is evident that the combination of the device with the microextraction step improved the analytical performance of the device, decreasing the detection and quantification limits, in addition to substantially improving the sensitivity when compared to the results without the extraction step. These observed effects are justified due to the pre-concentration achieved, when only 500 μL of solution were used in the electroanalytical analyses. In addition, an advantage of the method is related to the fact that there was no need to modify the electrode surface, a step that, in most works, requires time-consuming synthetic methodologies and uses expensive reagents. Finally, the applicability of the system for quantification of nitrite was evaluated for different samples of water, tap, mineral and aquarium at different concentration levels (30, 60, 90 and 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$), obtaining recovery values close to 100%. In view of all the listed aspects, this work describes a promising analytical system for nitrite determination, making accessible and ecological methodologies to be increasingly explored.

Keywords: miniaturized electrochemical device, headspace single-drop microextraction, nitrite, green analytical chemistry, alternative materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação esquemática do dispositivo miniaturizado desenvolvido. **A)** Conjunto de eletrodos auxiliar (AE) e trabalho (WE). **B)** Dispositivo e o compartimento de referência. **C)** Eletrodo de referência (RE). **D)** Dispositivo miniaturizado pronto para uso. **E)** Representação do dispositivo imerso na célula eletroquímica contendo eletrólito de suporte e barra magnética. **F)** Imagem digital obtida por microscopia ótica da parte inferior do dispositivo.....25
- Figura 2** – Representação esquemática do sistema de microextração por difusão gasosa. 28
- Figura 3** – Representação esquemática do sistema de microextração em gota única por headspace.....30
- Figura 4** – Voltamogramas cíclicos registrados em 500 μL de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . (---) 1° ciclo (—) 30° ciclo. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 32
- Figura 5** – Voltamogramas cíclicos registrados em 500 μL de diferentes eletrólitos de suporte na presença de 1 mmol L^{-1} de nitrito. (—) KCl 0,1 mol L^{-1} , (—) NaOH 0,01 mol L^{-1} (pH 12,0), (—) Tampão BR 0,04 mol L^{-1} (pH 10,0), (—) Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,8) e (—) Tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 5,3). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 33
- Figura 6** – **A)** Voltamogramas cíclicos registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,8) na presença de 1 mmol L^{-1} de nitrito em diferentes velocidades de varredura. (—) 10 (—) 20 (—) 30 (—) 40 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 150 (—) 200 mV s^{-1} . **B)** Gráfico da intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. **C)** Gráfico que relaciona o logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura.....35
- Figura 7** – Voltamogramas registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de 1 mmol L^{-1} de nitrito avaliando diferentes técnicas voltamétricas. (···) DPV (—) SWV. Condições voltamétricas: DPV: $\Delta E = 25 \text{ mV}$, $t_p = 50 \text{ ms}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; SWV: $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ 36
- Figura 8** – **A)** Voltamogramas de onda quadrada registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em diferentes frequências. (—) 10 (—) 25 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 150 (—) 200 Hz. **B)** Gráficos de I_p e largura de pico a meia-altura ($W_{1/2}$) em função da frequência. ($\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$) 38

Figura 9 – A) Voltamogramas de onda quadrada registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em diferentes amplitudes. (—) 10 (—) 25 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 125 mV. B) Gráficos de I_p e largura de pico a meia altura em função da amplitude. ($f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).....	39
Figura 10 – A) Voltamogramas de onda quadrada registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em diferentes incrementos de potencial. (—) 2 (—) 4 (—) 6 (—) 8 (—) 10 (—) 12 mV. B) Gráficos de I_p e largura de pico a meia altura em função do incremento de potencial. ($f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$)	40
Figura 11 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na ausência e presença de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito. (—) Branco (—) 1 (—) 2 (—) 3 (—) 4 (—) 5 (—) 6 (—) 7 (—) 8 (—) 9 (—) 10° registro. Condições otimizadas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	41
Figura 12 – A) Voltamogramas de onda quadrada com correção da linha de base registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de diferentes concentrações de nitrito. (—) Branco (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 350 (—) 600 (—) 850 (—) 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. B) Curva analítica	42
Figura 13 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na ausência de nitrito. (—) Branco na ausência de poliéster (—) Branco na presença de um chumaço de poliéster. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	46
Figura 14 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 10 minutos de extração de 1 mmol L^{-1} de nitrito empregando diferentes concentrações de ácido clorídrico. Massa de poliéster: 5 mg embebido com 50 μL de eletrólito de suporte. (—) Branco (—) 1 (—) 2 (—) 3 mol L^{-1} de HCl. B) Gráfico de barras comparando as intensidades de corrente e o desvio padrão. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	47
Figura 15 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 10 minutos de extração empregando HCl 3 mol L^{-1} na ausência e presença de diferentes concentrações de nitrito. Massa de poliéster: 5 mg embebido em 50 μL de eletrólito de suporte. (—) Branco (—) Ausência (—) 100 (—) 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito.	48

Figura 16 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} comparando a intensidade do sinal analítico obtido com uma das soluções padrão utilizadas para construir a curva analítica e o sinal analítico obtido após o procedimento de extração. (—) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (extração) (—) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva analítica) Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ 49

Figura 17 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 10 minutos de extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito empregando HCl 3 mol L^{-1} avaliando diferentes massas de poliéster. (—) Branco (—) 2,5 (—) 5,0 mg. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades de corrente e o desvio padrão. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ 50

Figura 18 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} avaliando a repetitividade da extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em dois dias diferentes. (—) Branco (—) Dia 1 (—) Dia 2. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ 51

Figura 19 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 10 minutos de extração empregando HCl 3 mol L^{-1} avaliando diferentes soluções no poliéster. (—) Branco (—) Água ultrapura (—) NaOH 0,1 mol L^{-1} (—) Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} 53

Figura 20 – **A)** Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} comparando o sinal analítico obtido após a extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito realizada à temperatura ambiente ($\sim 30^\circ\text{C}$) e na presença de um banho termostaticado a aproximadamente 40°C . (—) Branco (—) Temperatura ambiente () 40°C . **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades de corrente e o desvio padrão. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ 54

Figura 21 – Novos designs para o suporte do poliéster confeccionados. 55

Figura 22 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após a extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito comparando as intensidades de corrente obtidas para sistema antigo (anzol + poliéster) e microextração por gota única. (—) Branco (—) Anzol + poliéster (—) Gota. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades obtidas e o desvio padrão. 57

Figura 23 – A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após a extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito avaliando diferentes distâncias entre a gota formada e a amostra acidificada. (—) Branco (—) 0,3 (—) 0,8 (—) 1,3 cm. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades obtidas e o desvio padrão. 59

Figura 24 – A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após a extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito avaliando diferentes concentrações de HCl. (—) Branco (—) 1 (—) 2 (—) 3 mol L^{-1} . Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades obtidas e o desvio padrão para $N = 3$ 60

Figura 25 – Gráfico de barras ilustrando o efeito na intensidade de corrente e na porcentagem de extração (%Extração) ao serem utilizados diferentes volumes de amostra acidificada. Condições experimentais – Solução doadora: solução acidificada (3 mol L^{-1} de HCl) contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito; tempo de extração de 10 min. Solução receptora: 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} . Barras de erro indicam o desvio padrão de I_p para $N = 3$. (■) I_p (■) %Extração..... 61

Figura 26 – A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} avaliando diferentes tempos de extração. (—) Branco (—) 3 (—) 5 (—) 7 (—) 10 (—) 15 (—) 20 (—) 30 min. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Curva de extração para nitrito. Condições experimentais – Solução doadora: 10 mL de amostra acidificada (3 mol L^{-1} de HCl) contendo 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito. Solução receptora: 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} . **B)** Curva de I_p e %Extração em função do tempo. 63

Figura 27 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 15 minutos de extração para diferentes concentrações de nitrito. (—) Branco (—) 25 (—) 40 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 150 (—) 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Curva analítica para nitrito. Barras de erro indicam o desvio padrão para I_p para 3 superfícies eletródicas diferentes. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada avaliados.....	41
Tabela 2 – Métodos eletroanalíticos para detecção e quantificação de nitrito	44
Tabela 3 – Parâmetros analíticos obtidos ao ser construída a curva analítica com e sem a etapa de extração e pré-concentração.....	65
Tabela 4 – Procedimentos experimentais avaliados para determinação de nitrito em amostras de salsicha tipo hot-dog	66
Tabela 5 – Resultados do estudo de adição e recuperação de nitrito para diferentes amostras de água.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	(do inglês, <i>Auxiliary Electrode</i>) – Eletrodo Auxiliar
RE	(do inglês, <i>Reference Electrode</i>) – Eletrodo de Referência
SDME	(do inglês, <i>Single-drop Microextraction</i>) – Microextração em gota única
HS-SDME	(do inglês, <i>Headspace Single-drop Microextraction</i>) – Microextração em gota única por headspace
WE	(do inglês, <i>Working Electrode</i>) – Eletrodo de Trabalho
DPV	(do inglês, <i>Differential Pulse Voltammetry</i>) – Voltametria de Pulso Diferencial
SWV	(do inglês, <i>Square Wave Voltammetry</i>) – Voltametria de Onda Quadrada
RSD	(do inglês, <i>Relative Standard Deviation</i>) – Desvio Padrão Relativo
GCV	(do inglês, <i>Glassy Carbon Electrode</i>) – Eletrodo de Carbono Vítreo
GPSE	(do inglês, <i>Graphite Screen-printed Electrodes</i>) – Eletrodos Impressos de Grafite
CPE	(do inglês, <i>Carbon Paste Electrode</i>) – Eletrodo de Pasta de Carbono

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Sistemas eletroquímicos miniaturizados.....	16
1.2 Determinação de nitrito.....	17
1.3 Técnicas eletroanalíticas	18
1.4 Preparo de amostras e dispositivos miniaturizados	19
1.5 Microextração em gota única.....	20
1.5.1 Principais variáveis experimentais e modalidades da SDME	21
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Reagentes e soluções.....	24
3.2 Dispositivo Eletroquímico Miniaturizado.....	24
3.3 Instrumentação	26
3.4 Estudos Voltamétricos	26
3.5 Microextração por difusão gasosa	27
3.5.1 Preparação do material captador	27
3.5.2 Montagem do sistema de microextração gasosa de nitrito e otimizações	27
3.5.3 Microextração em gota única por <i>headspace</i>	29
3.5.4 Preparo das amostras de salsicha e água	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1 Estudos voltamétricos e de otimização	32
4.2 Microextração por difusão gasosa	45
4.3 Microextração em gota única por headspace	56
4.3.1 Aplicabilidade do método para amostras de salsicha e água.....	66
5 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas eletroquímicos miniaturizados

O emprego de sistemas miniaturizados em eletroanálise tem atraído notável atenção por parte dos pesquisadores, pois oferecem inúmeras características atrativas comparados aos métodos analíticos convencionais. A redução do volume das células eletroquímicas tradicionais de mL para μL contribuiu para a minimização dos impactos ambientais devido à diminuição da quantidade de resíduos gerados (SRIPROM, *et al.*, 2018). Além disso, devido à natureza interfacial das técnicas eletroquímicas, os dispositivos eletroquímicos podem ser miniaturizados, sem que haja um comprometimento da relação sinal-ruído preservando, portanto, a sensibilidade e a detectabilidade (OLIVEIRA, *et al.*, 2021).

Tendo em vista a ampla gama de tecnologias que permitem a construção de sistemas miniaturizados a um baixo custo, algumas abordagens bem-sucedidas para tal processo são bastante relatadas na literatura como os dispositivos baseados em papel (MARTINS, *et al.*, 2019; PRADELA-FILHO, *et al.*, 2017; PRADELA-FILHO, *et al.*, 2020; JEMMELI, *et al.*, 2020; FONSECA, *et al.*, 2021) e eletrodos impressos (WANG, *et al.*, 2021; HUGHES, *et al.*, 2018; MATERON, *et al.*, 2021), os quais exibem características bastante atrativas como produção reproduzível em larga escala e a baixo custo, devido ao emprego de materiais alternativos, permitindo que sejam utilizados como sensores descartáveis, e com desempenho analítico satisfatório.

Uma alternativa bastante interessante é o desenvolvimento de dispositivos miniaturizados fabricados a partir de ponteiros de micropipetas convencionais. Nesta perspectiva, Oliveira *et al.* (2021) desenvolveram um sensor eletroquímico de baixo custo, robusto e versátil, no qual os três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) foram integrados à mesma plataforma, sendo empregado na determinação de carbendazim em amostras de água e suco de laranja. Apesar da simplicidade, o dispositivo exibiu um desempenho analítico comparável ao de eletrodos comerciais, mostrando-se versátil para análises em soluções aquosas e com solventes orgânicos, em condições estáticas ou hidrodinâmicas. Seguindo a mesma linha, Silva *et al.* (2010) também desenvolveram um sensor eletroquímico integrado em uma ponteira de micropipeta que permite a análise em microvolumes ($10\ \mu\text{L}$) e que pode ser facilmente modificado, quando necessário.

Em outra abordagem, González-López *et al.* (2021) propuseram a confecção de um dispositivo simples e integrado na ponteira de micropipeta empregando materiais alternativos

como, pinos de aço inoxidável como eletrodos; o de trabalho foi modificado com uma tinta de carbono, enquanto o referência e auxiliar foram utilizados sem nenhuma modificação. O dispositivo exibiu um bom desempenho analítico, sendo aplicado na determinação de tensoativos aniônicos em água por meio da interação com azul de metileno.

Em um outro contexto, o trabalho proposto por Barragan e Kubota (2020), traz uma nova configuração para os equipamentos eletroquímicos convencionais; os pesquisadores desenvolveram um minipotenciostato acoplado a uma micropipeta eletrônica e controlado por um *smartphone* via conexão *Bluetooth*. O dispositivo necessita de um pequeno volume de amostras e reagentes, podendo ainda recuperá-los após a análise, contribuindo desta forma para o desenvolvimento de dispositivos capazes de realizar medidas com portabilidade e versatilidade.

Desta forma, diante de todas estas aplicações apresentadas, é evidente como a produção de dispositivos eletroquímicos miniaturizados tem se tornado uma tendência predominante na Química Analítica. Em especial, a confecção destes dispositivos utilizando ponteiros de micropipetas é uma alternativa bastante versátil, de fácil acesso e baixo custo, podendo ser empregada nas mais diversas configurações, características bastante desejáveis em se tratando de dispositivos eletroquímicos.

1.2 Determinação de nitrito

O íon nitrito tem uma vasta aplicabilidade em diversos setores, desde o alimentício, sendo empregado como conservante de alimentos e bebidas, e na produção de fertilizantes até o industrial utilizado na inibição de processos de corrosão (WANG, *et al.*, 2017). Desta forma, o íon nitrito contribui com o desenvolvimento da sociedade, no entanto, a descoberta de sua potencial toxicidade tem gerado inúmeras preocupações (RAMOS, *et al.*, 2006). Sabe-se que elevadas concentrações de nitrito podem causar danos à saúde humana pois, ao reagir com aminas são formadas as N-nitrosaminas, compostos com potencial carcinogênico (MOORCROFT, *et al.*, 2001). Em crianças, principalmente recém-nascidos, pode causar a metahemoglobinemia, conhecida como Síndrome do bebê-azul, responsável por oxidar a hemoglobina em metahemoglobina, a qual afeta drasticamente o transporte de oxigênio pelas hemácias, levando a perda da coloração característica do tecido (RAMOS, *et al.*, 2006). Do ponto de vista ecológico, o nitrito também pode ser considerado um agente poluidor de águas naturais, sendo proveniente da decomposição da matéria orgânica nitrogenada (RAMOS, *et al.*,

2006). Diante deste extenso panorama, devido à ampla utilização, a detecção de nitrito torna-se relevante para saúde pública e monitoramento ambiental.

Uma metodologia bastante popular para determinação de nitrito envolve procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess, desenvolvida por Johan Peter Griess em 1879, que descreve a reação do nitrito com a sulfanilamida em meio ácido formando um composto diazo. Este, por sua vez, reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), produzindo um composto de coloração vermelha intensa, a partir do qual a concentração de nitrito pode ser avaliada (RAMOS, *et al.*, 2006).

Por muito tempo, o ensaio de Griess desempenhou um papel incomparável na determinação de nitrito, por ser um método eficaz em uma variedade de matrizes, com limites de detecção na faixa de 0,02 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de acordo com as condições experimentais adotadas, no entanto, tal abordagem pode ser prejudicada quando se trata de matrizes mais complexas como amostras biológicas, por exemplo (MOORCROFT, *et al.*, 2001). Além disso, é reconhecido que alguns compostos antioxidantes presentes em amostras alimentícias ou fluidos biológicos como, o íon ascorbato e sulfidril tióis podem comprometer a exatidão do método (WANG, *et al.*, 2017), necessitando, deste modo, de etapas de pré-tratamento. Em decorrência destas limitações, métodos alternativos de determinação têm sido explorados, sendo as técnicas eletroanalíticas bastante promissoras, pois fornecem elevada sensibilidade e precisão a um baixo custo instrumental (SKOOG, *et al.*, 2002), além de permitir que análises de soluções coloridas sejam realizadas.

1.3 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas apresentam algumas vantagens em comparação à outras técnicas instrumentais, como instrumentação simples e de custo relativamente baixo e capacidade de serem acopladas a dispositivos miniaturizados, exibindo sensibilidade suficientemente alta, se comparada a métodos convencionais. Em especial, a amperometria e as técnicas voltamétricas de pulso, como voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, revelaram-se satisfatoriamente sensíveis na determinação de nitrito em diversas matrizes. Inúmeros estudos relatam a utilização de técnicas voltamétricas e amperométricas para este fim (TURDEAN e SZABO, 2015; ZHAO, *et al.*, 2017; DAI, *et al.*, 2016; ZHANG, *et al.*, 2017; ANNALAKSHMI, *et al.*, 2019; HALDORAI, *et al.*, 2016).

Apesar dos inúmeros benefícios apresentados pelas técnicas eletroanalíticas, a presença de possíveis interferentes em amostras reais pode inviabilizar as análises devido a sobreposição

dos picos voltamétricos de diferentes analitos (SU, *et al.*, 2017). Tal desvantagem pode ser superada com a utilização de métodos de extração, pois dependendo da complexidade das matrizes em amostras biológicas, ambientais e alimentícias, é desejável a remoção de compostos interferentes, resultando em extratos mais limpos para a medida analítica. Além disso, ainda que técnicas de detecção de alta sensibilidade com baixos limites de detecção sejam empregadas, é de extrema importância a adição de uma etapa de pré-concentração, devido à baixa concentração dos analitos nas amostras, característica bastante favorável ao emprego de uma etapa de extração (SILVA, *et al.*, 2018; ROSA, *et al.*, 2019).

1.4 Preparo de amostras e dispositivos miniaturizados

O emprego de técnicas eletroanalíticas associadas a procedimentos de preparo de amostra é bastante comum, de acordo com as vantagens citadas anteriormente. Aliada a isto, a combinação com as vantagens dos dispositivos miniaturizados pode fornecer uma plataforma analítica bastante promissora para análises em microvolumes, uma vez que há a redução do volume de solução/amostra e, conseqüentemente, de resíduos gerados e, ainda assim, garantir alta detectabilidade e seletividade. Além disso, o uso de materiais alternativos na fabricação destes dispositivos é uma ferramenta atrativa capaz de tornar a eletroanalítica acessível do ponto de vista financeiro e, por consequência, inclusiva. Na literatura, há um grande interesse por parte dos pesquisadores no desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos miniaturizados combinados a procedimentos de preparo de amostra (MORA-GRANADOS, *et al.*, 2021; MAXIMIANO, *et al.*, 2021; CINTI, *et al.*, 2018; PRASERTYING, *et al.*, 2022).

A determinação de nitrito por técnicas eletroanalíticas é relatada e bastante consolidada na literatura. No entanto, algumas dificuldades sobretudo em matrizes mais complexas, como biológicas e ambientais, são comumente observadas. Um exemplo a ser citado está na determinação simultânea de dopamina, ácido úrico, ácido ascórbico e nitrito, espécies bastante comuns em amostras biológicas, as quais estão associadas a algumas patologias, sendo necessário um rastreamento rápido e eficiente destas substâncias (ZHANG, *et al.*, 2012). A adoção de métodos eletroanalíticos nestes casos é comprometida pois estas moléculas se oxidam em potenciais muito próximos dificultando que sejam identificadas e quantificadas (SU, *et al.*, 2017). Na maioria dos casos, o emprego de eletrodos modificados é uma das alternativas para que a análise se torne possível nestas condições. Uma abordagem envolvendo o preparo de amostra bastante promissora e que pode resolver a problemática das matrizes mais complexas, está no emprego de uma técnica de microextração por difusão de gás, a qual

emprega uma membrana hidrofóbica responsável por separar as fases doadora e receptora, assim, a espécie volátil gerada é difundida para a solução receptora para a quantificação e, portanto, baseada na difusão do analito (PACHECO, *et al.*, 2010). A vantagem da utilização desta proposta é que, a depender da amostra em análise, a maioria dos interferentes não são voláteis, eliminando quaisquer outras etapas de preparo de amostra que eventualmente possam ser necessárias. Além disso, outra característica bastante interessante é que a redução do volume da amostra para o compartimento de análise permite que haja uma pré-concentração antes da determinação pela técnica analítica. Aprimorada por Phansi *et al.* (2016) os pesquisadores descreveram esta modalidade de extração baseada na difusão de gás, no entanto, sem a necessidade de uma membrana hidrofóbica para promover a separação gás-líquido. Estes cientistas apresentaram um dispositivo miniaturizado simples, rápido e de baixo custo baseado em papel microfluídico com separação por difusão de gás sem membrana para a quantificação de compostos voláteis e não voláteis. Como prova de conceito, o dispositivo desenvolvido foi aplicado na determinação de três analitos, etanol, sulfeto e amônio (PHANSI, *et al.*, 2016).

No trabalho desenvolvido por Araújo *et al.* (2021) os pesquisadores propuseram um dispositivo miniaturizado para quantificação de sulfeto em amostras de bebidas integrado à extração gasosa sem membrana, de forma que o preparo de amostra e a detecção fossem realizados em uma única etapa. O desempenho analítico do dispositivo avaliado foi satisfatório e até mesmo comparável com sistemas mais sofisticados, com um limite de detecção de $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um tempo de extração de apenas 10 minutos.

1.5 Microextração em gota única

Introduzida há pouco mais de 20 anos, a microextração em gota única (SDME) vem se destacando como uma das formas de preparo de amostras miniaturizada para determinação de compostos voláteis mais simples, barata, de fácil manuseio, praticamente isenta do uso de solventes. Além de todas estas vantagens, pode ser facilmente combinada a diversas técnicas instrumentais. Por ser uma técnica baseada na partição do analito da amostra (fase doadora) para a fase de extração (fase receptora), o mecanismo envolvido na SDME é projetado para atingir um alto poder de enriquecimento, além de mitigar as interferências da matriz (BORGES, *et al.*, 2015; TANG, *et al.*, 2018).

Por volta da década de 90, o trabalho de Liu e Dasgupta (1995) foi um dos pioneiros a utilizar uma gota de solvente como um coletor de analitos em química analítica. O trabalho tinha como objetivo extrair amônia e dióxido de enxofre do ar atmosférico. Um tubo capilar de

sílica foi utilizado como suporte para a gota ($\sim 5 \mu\text{L}$) para extrair os voláteis, a qual, posteriormente, foi submetida à detecção espectrofotométrica dos analitos. Algum tempo depois, os mesmos pesquisadores desenvolveram um sistema de microextração e detecção de dodecilsulfato de sódio em uma gota de clorofórmio ($\sim 1,3 \mu\text{L}$). Para a quantificação, foi utilizado um sistema de detecção espectrofotométrico com uma fibra ótica (LIU e DASGUPTA, 1996). No mesmo período, os pesquisadores Jeannot e Cantwell (1996) empregaram um sistema de extração miniaturizado e compatível com as análises cromatográficas. Para isto empregaram uma haste de Teflon[®] como suporte para uma gota de $8 \mu\text{L}$ de *n*-octano imersa em uma solução aquosa. Após a extração, a haste foi removida e uma seringa normalmente empregada na cromatografia gasosa foi utilizada na remoção do solvente orgânico seguido da injeção da solução no cromatógrafo a gás (JEANNOT e CANWELL, 1996).

Os anos seguintes foram marcados pela busca em aprimorar esta modalidade de extração; inúmeros grupos científicos, desenvolvendo suas pesquisas separadamente, propuseram um dispositivo capaz de extrair compostos orgânicos voláteis, os quais eram transferidos para uma única gota de solvente orgânico suspensa em uma região acima da amostra (sem contato com a fase aquosa), técnica denominada de microextração em gota única. A partir deste momento, inúmeras alterações foram realizadas no modo de operação, de forma a aperfeiçoar os parâmetros experimentais, melhorar a seletividade, tornar compatível com outras técnicas analíticas expandindo, desta forma, o âmbito das aplicações (BORGES, *et al.*, 2015; KAILASA, *et al.*, 2021).

1.5.1 Principais variáveis experimentais e modalidades da SDME

Desde que as pesquisas a respeito da SDME começaram, uma variedade de metodologias disponíveis para realizar a extração podem ser encontrados na literatura. Tais procedimento levam em consideração a natureza dos analitos e a possibilidade de poder utilizar o extrato diretamente nas análises por diferentes métodos instrumentais (JAIN, *et al.*, 2011). Desta forma, as técnicas que empregam o solvente extrator na forma de uma gota suspensa podem ser classificadas em duas categorias: sistema bifásico e sistema trifásico, a depender do número de fases coexistentes em equilíbrio. Embora existam diferentes modos, apenas a microextração em gota única por headspace (HS-SDME) será abordada neste trabalho. Nesta modalidade, uma gota de solvente orgânico (fase receptora) é mantida estável na extremidade de uma agulha, seringa ou outra plataforma e localiza-se logo acima do nível da solução aquosa

ou amostra (fase doadora), sem contato entre ambas. A interface entre as fases doadora e receptora é chamado de headspace, ou espaço confinante (BORGES, *et al.*, 2015). Neste contexto, a extração acontece da seguinte forma: os analitos voláteis vaporizam e migram/difundem para o headspace e, posteriormente, para a gota de solvente formada. Nestas condições, três estados coexistem: fase doadora (amostra), headspace e fase extratora/receptora (solvente). Atingido o equilíbrio entre as três fases, o êmbolo é retraído e a solução extratora recolhida para o interior da seringa, a qual pode ser introduzida diretamente no equipamento para identificação e quantificação dos compostos de interesse (BORGES, *et al.*, 2015).

Por ser uma técnica baseada na suspensão de uma gota de solvente, estudos de otimização nos parâmetros experimentais são muito importantes e devem ser ajustados minuciosamente de modo a aumentar a capacidade de extração desejada. A seguir, alguns destes parâmetros podem ser listados como, propriedades do analito e do solvente extrator, tipo de seringa, volume da gota formada, tempo de extração, agitação da amostra, temperatura, volume da amostra/headspace, entre outros (BORGES, *et al.*, 2015; TANG, *et al.*, 2018). O desejo por uma técnica de extração e pré-concentração de analitos voláteis em virtude do alto fator de enriquecimento e, além disso garantir que as interferências da matriz sejam eliminadas podem ser pontuados como os principais motivos pelo quais os pesquisadores têm dado preferência para esta modalidade de extração (TANG, *et al.*, 2018). Além do mais, a possibilidade do uso de fases extratoras verdes como os líquidos iônicos e soluções aquosas expande as perspectivas de aplicação desta técnica (SENRA-FERREIRO, *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de um método eletroanalítico para determinação de nitrito empregando um dispositivo miniaturizado fabricado a partir de materiais alternativos como ponteiros de micropipetas associado ao sistema de microextração por difusão de gás.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas empregando reagentes de pureza analítica (no mínimo 99% de pureza), os quais foram utilizados sem qualquer etapa de purificação adicional. Para o preparo das soluções de eletrólito de suporte e dos padrões foi utilizada água destilada e, posteriormente, ultrapurificada por meio do ultrapurificador da marca Megapurity[®], capaz de produzir água ASTM tipo I, com resistividade de 18,3 MΩ cm.

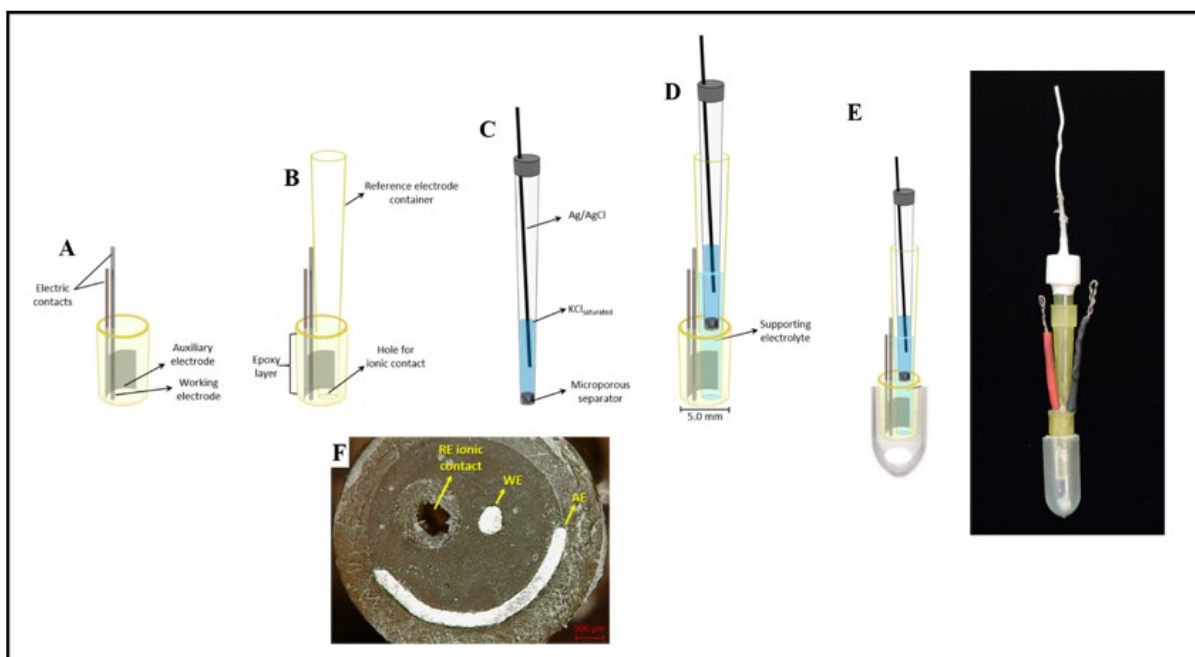
Inicialmente, para o estudo das melhores condições de determinação de nitrito, alguns eletrólitos de suporte foram testados: Tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 10) foi preparado a partir da mistura de dihidrogenofosfato de potássio (Vetec[®]), ácido bórico (Vetec[®]) e ácido acético (Vetec[®]) todos na concentração final de 0,04 mol L⁻¹. Tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,3) foi preparado pela mistura de ácido acético glacial (Vetec[®]) e acetato de sódio (Vetec[®]) e tampão fosfato (pH 6,8) foi preparado a partir de soluções dos sais fosfato de potássio monobásico (Vetec[®]) e dibásico (Vetec). A solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ foi preparada a partir do sal de KCl (Vetec[®]) e a solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹ (pH 12) foi preparada empregando NaOH (Vetec[®]). As soluções estoque de nitrito foram preparadas a partir do NaNO₂ (Vetec[®]). Em todos os experimentos de otimização, foi empregado HCl (Vetec[®]) para acidificar as amostras contendo nitrito no compartimento extrator.

3.2 Dispositivo Eletroquímico Miniaturizado

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi empregado um dispositivo miniaturizado desenvolvido pelo grupo de pesquisa já previamente otimizado (OLIVEIRA, *et al.*, 2021). O dispositivo foi confeccionado a partir de uma ponteira de micropipeta cortada, com capacidade para 200 µL, utilizada como suporte externo para o conjunto dos eletrodos. Para a construção do sistema, foi empregado um fio de platina como eletrodo de trabalho (WE) e uma placa, também de platina, como eletrodo auxiliar (AE), os quais foram acoplados e fixados na parte interior da ponteira de micropipeta utilizando-se de uma cola epóxi, também utilizada como uma forma de isolar os eletrodos evitando um possível curto-circuito. Para garantir o contato elétrico dos fios, parte deles foram fixados na parte externa da ponteira. Para o suporte do eletrodo de referência (RE), também confeccionado manualmente no laboratório, uma outra ponteira de micropipeta não cortada foi inserida também ao sistema como compartimento para o eletrodo de referência. Para confecção do eletrodo de referência, foi utilizada uma ponteira

de micropipeta com capacidade de 10 μL , na qual foi inserida um fio de prata imerso em uma solução saturada com KCl e com AgCl e todo o sistema foi vedado com auxílio de uma tampa de plástico. Semelhante aos outros eletrodos, um pequeno segmento do fio de prata também foi mantido na parte externa da tampa para realizar o contato elétrico com o eletrodo de referência. Para realizar as medidas eletroquímicas, o interior do suporte foi preenchido com eletrólito de suporte e, cuidadosamente, o eletrodo de referência confeccionado foi introduzido na ponteira de modo que encaixasse completamente no interior do suporte, o qual possui um pequeno orifício para manter o contato iônico com a solução do meio externo (OLIVEIRA, *et al.*, 2021). Uma representação esquemática do dispositivo miniaturizado está apresentada na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática do dispositivo miniaturizado desenvolvido. **A)** Conjunto de eletrodos auxiliar (AE) e trabalho (WE). **B)** Dispositivo e o compartimento de referência. **C)** Eletrodo de referência (RE). **D)** Dispositivo miniaturizado pronto para uso. **E)** Representação do dispositivo imerso na célula eletroquímica contendo eletrólito de suporte e barra magnética. **F)** Imagem digital obtida por microscopia ótica da parte inferior do dispositivo.



Fonte: adaptado de OLIVEIRA, *et al.* (2021).

Depois de finalizado o dispositivo, a cada início e fim dos estudos eletroquímicos, a superfície do sistema foi polida em uma superfície própria para polimento fixada sobre uma superfície lisa de cerâmica contendo algumas gotas de uma suspensão de alumina, sendo o

polimento realizado em movimentos na forma de infinito (∞), com subsequente enxágue com água ultrapura para iniciar as análises.

3.3 Instrumentação

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas empregando um potenciostato/galvanostato Autolab, modelo μ Autolab III interfaceado a um computador e gerenciado pelo *software* NOVA versão 2.1.4. Para correção da linha de base de alguns voltamogramas, a ferramenta “*moving average*” foi selecionada no *software*. Para a análise de dados e criação dos gráficos, o programa empregado foi o OriginPro[®] versão 8.6.

Para os estudos eletroquímicos, foi confeccionado um compartimento também miniaturizado para o eletrólito de suporte (500 μ L) cortando-se um microtubo de polipropileno tipo Eppendorff de fundo redondo com capacidade para 2 mL, de modo a reduzir a quantidade de soluções empregadas (eletrólito de suporte ou amostra) e, conseqüentemente, o resíduo gerado. Para agitação da solução no interior da célula miniaturizada foi utilizado um agitador eletromagnético da marca Velp[®] Científica e pequenas barras magnéticas (3x5 mm), sendo as análises realizadas à temperatura ambiente (~ 30 °C). Para sistematizar o procedimento, a mesma posição do botão de controle do agitador foi adotada a fim de que a mesma agitação fosse mantida em todos os experimentos.

3.4 Estudos Voltamétricos

Antes das medidas voltamétricas na presença do nitrito, o eletrodo de trabalho foi submetido a 30 ciclos sucessivos de potencial no intervalo de -0,25 a 1,3 V em 0,5 mol L⁻¹ de H₂SO₄, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ para ativação da superfície eletródica. Em seguida, o primeiro estudo teve como objetivo investigar o comportamento voltamétrico do nitrito empregando a voltametria cíclica (intervalo de varredura de -0,2 a 1,2 V, $v = 50$ mV s⁻¹) em alguns eletrólitos de suporte a saber: tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 10,0), tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,3), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,8), KCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,01 mol L⁻¹ (pH 12,0). O objetivo deste estudo foi avaliar qual eletrólito de suporte forneceria a resposta voltamétrica mais intensa para o íon nitrito.

Na sequência, os experimentos voltamétricos tiveram como objetivo avaliar qual seria a técnica voltamétrica mais adequada para a detecção do nitrito. Para isto, duas técnicas foram avaliadas: voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Definida a técnica que apresentou o melhor perfil voltamétrico, de modo a estabelecer as

condições ótimas na determinação de nitrito, foi investigada a influência dos parâmetros instrumentais que afetam a intensidade da corrente de pico (I_p) e o perfil dos voltamogramas como: frequência (10 – 200 Hz), amplitude (10 – 125 mV) e o incremento de potencial (2 – 12 mV). Todas as medidas foram realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na presença de 500 µmol L⁻¹ de nitrito. Definidas as condições experimentais mais adequadas, foi construída uma curva analítica para nitrito no intervalo de 50 a 1100 µmol L⁻¹ para verificar o desempenho analítico do dispositivo.

3.5 Microextração por difusão gasosa

3.5.1 Preparação do material captador

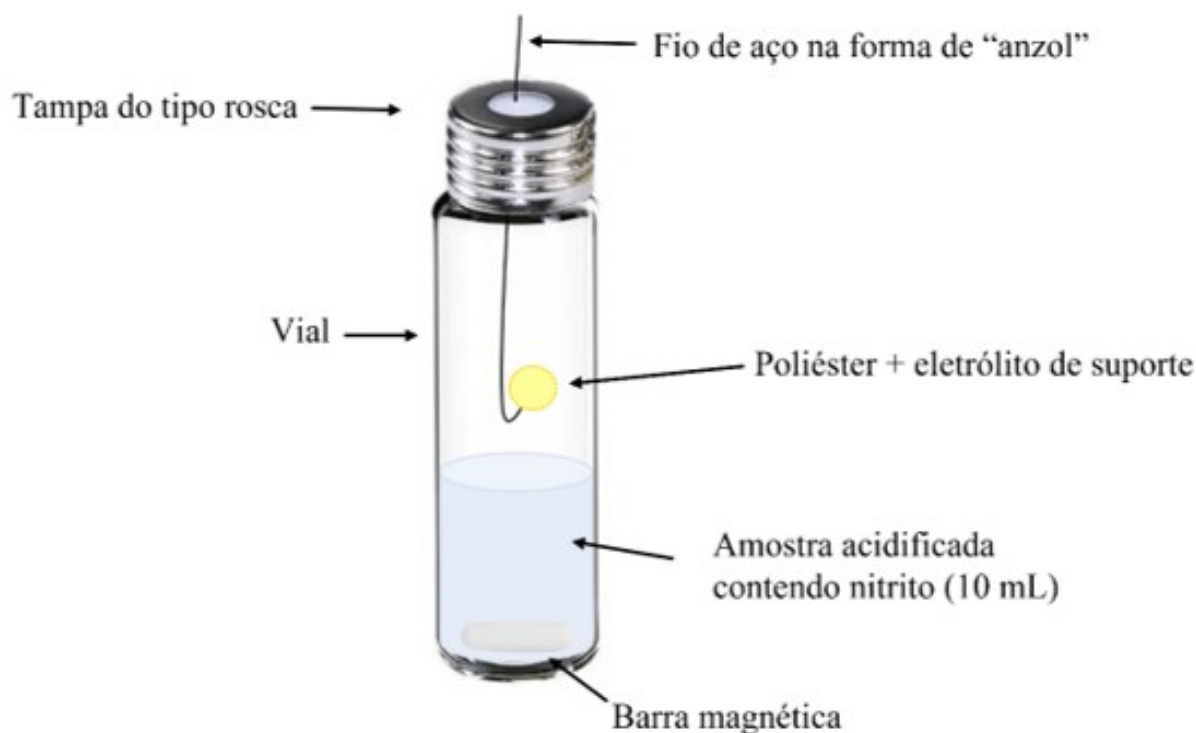
Uma manta de poliéster, normalmente utilizada para filtração da água de aquários, foi empregada como substrato para captar o HNO_{2(g)}. Para isto, foram pesados cerca de 5 mg do material, massa que foi otimizada posteriormente. Vale ressaltar que o material não foi submetido a nenhum tratamento prévio antes da sua utilização. Depois de pesado, o material foi manipulado manualmente de forma que pequenas “esferas” fossem formadas, a fim de facilitar a sua fixação no sistema de extração. Importante destacar que apenas uma “esfera” foi utilizada para cada extração realizada. Depois de fixado o material no suporte, foram adicionados 50 µL de eletrólito de suporte na esfera de poliéster. Após a análise eletroanalítica, é descartada, não sendo reutilizada.

3.5.2 Montagem do sistema de microextração gasosa de nitrito e otimizações

Neste trabalho, as condições experimentais de extração empregadas foram adaptadas de PENA-PEREIRA, *et al.* (2020). Basicamente, o procedimento de microextração consistiu em empregar um frasco cilíndrico do tipo “vial” com capacidade para 20 mL, fechado com uma tampa do tipo rosca, tendo o septo perfurado por um fio de aço na forma de “anzol”, contendo 10 mL de amostra acidificada na presença de nitrito. Este fio foi empregado no intuito de fornecer um suporte para que o poliéster permanecesse fixado dentro do compartimento e exposto à fase gasosa de maneira a “capturar” e pré-concentrar o ácido nitroso. A este compartimento foi adicionada uma barra magnética de tamanho compatível com o frasco escolhido, para promover a agitação da solução. A partir do momento em que todos os elementos necessários estão presentes, iniciou-se a agitação e a contagem do tempo de extração (10 min). Ao final deste processo, a agitação foi cessada e a tampa retirada do vial para que o

poliéster fosse, cuidadosamente, transferido com o auxílio de uma pinça para a célula eletroquímica miniaturizada contendo 500 μL de eletrólito de suporte (tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}) e mantido em agitação por cerca de 3 minutos para, posteriormente, realizar a quantificação do nitrito. O sistema de extração empregado é esquematicamente representado na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática do sistema de microextração por difusão gasosa.



Fonte: adaptado de PENA-PEREIRA, *et al.* (2020).

As otimizações iniciais foram realizadas empregando 1 mmol L^{-1} de nitrito, posteriormente, foram utilizados 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Alguns parâmetros envolvidos no procedimento de extração foram otimizados, tais como: concentração de ácido clorídrico (1, 2 e 3 mol L^{-1}) e massa do substrato (5 e 2,5 mg). Um estudo de extração na ausência de nitrito, utilizando apenas a amostra acidificada também foi realizado. Em seguida, definida qual a melhor concentração de HCl, foram estudadas diferentes concentrações de nitrito na extração (100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Por fim, a repetitividade do método foi avaliada comparando as extrações (em triplicata) de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em dias diferentes.

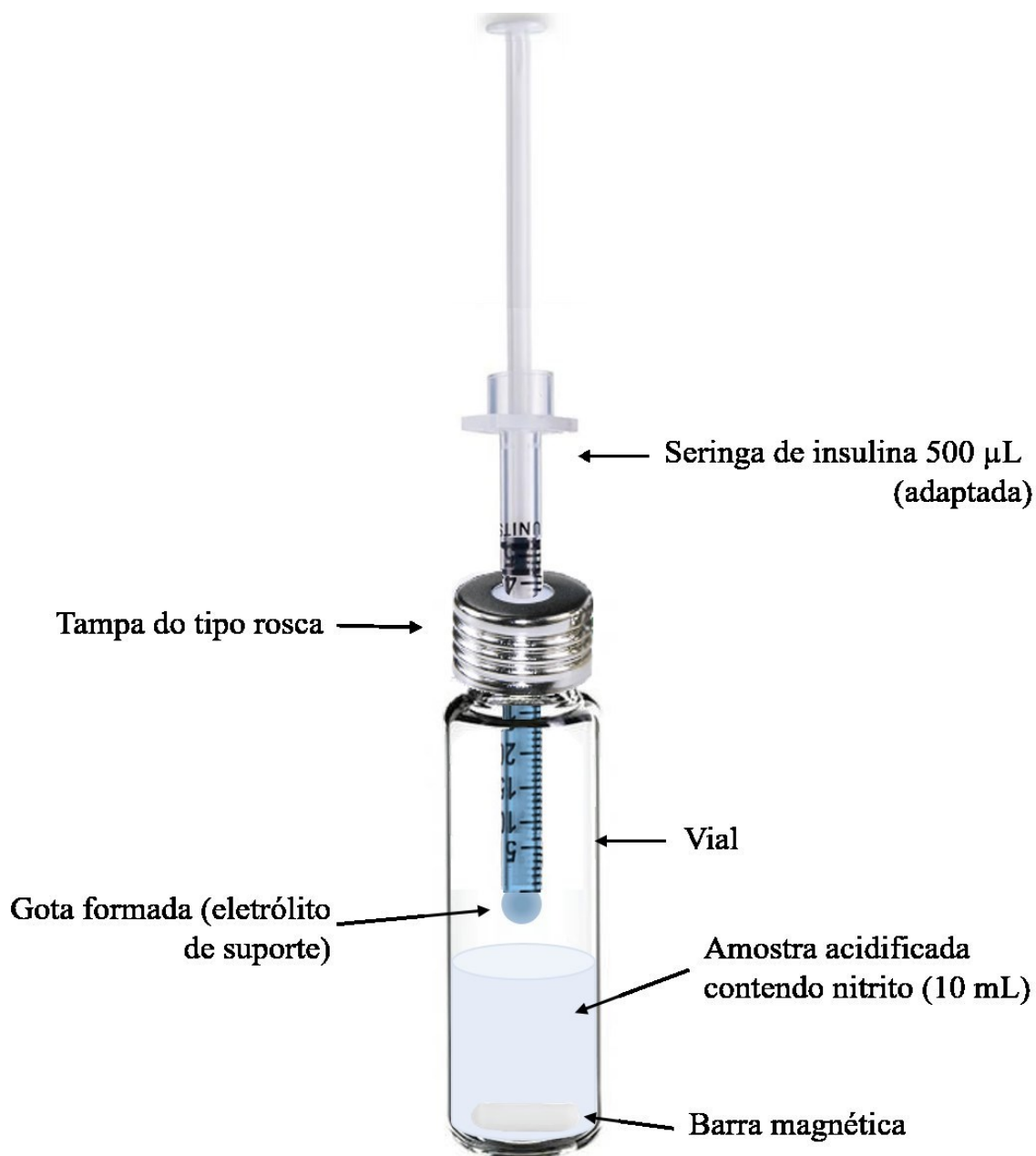
No intuito de melhorar os resultados obtidos, outros parâmetros do sistema de extração foram explorados como, a adição de diferentes soluções no poliéster (água ultrapurificada e NaOH 0,1 mol L^{-1}) e qual seria o efeito da extração realizada a uma temperatura mais elevada ($\sim 40^\circ\text{C}$). Realizadas todas as otimizações, foram observadas algumas limitações experimentais

relacionadas à manipulação do sistema de extração apresentado na Figura 2. Desta forma, alguns *designs* diferentes foram confeccionados de maneira a facilitar a manipulação do sistema de extração.

3.5.3 Microextração em gota única por *headspace*

De maneira semelhante ao aparato apresentado na Figura 2, o sistema de extração foi aprimorado e substituído por uma seringa de insulina com agulha fixa (6x0,25 mm) da marca Saldanha Rodrigues®, com capacidade para 0,5 mL. Comumente, nesta modalidade de extração, a seringa é utilizada juntamente com a agulha para a formação da gota, no entanto, para aumentar a sensibilidade, a agulha foi retirada da seringa e a parte inferior foi lixada até o início da marcação do volume com o intuito de aumentar o tamanho da gota de solução receptora, como mostra a Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática do sistema de microextração em gota única por headspace.



Para formação da gota, inicialmente, o êmbolo da seringa foi retraído criando um espaço vazio entre a borracha e a solução receptora, de modo a facilitar ao final da extração que toda solução seja dispensada de volta para a célula eletroquímica. Para isto, foram adicionados 500 µL de eletrólito de suporte dentro da célula eletroquímica e a seringa foi então imersa na solução e o êmbolo foi puxado de modo que praticamente todo o volume (500 µL) fosse aspirado para o interior da seringa, a qual foi cuidadosamente inserida no vial (compartimento extrator). A gota foi formada empurrando o êmbolo e observando a graduação existente na

seringa, sendo empregados aproximadamente 40 μL , volume máximo estudado de modo que permanecesse estável na ponta da seringa. Após a extração, a gota foi, delicadamente, sugada para dentro da seringa e todo o volume foi dispensando na célula eletroquímica para que as análises pudessem ser realizadas.

Neste novo *design* de extração, outros parâmetros foram otimizados como, a distância entre a gota formada e o nível da solução de amostra no vial (0,3, 0,8 e 1,3 cm). A medida foi realizada de maneira visual marcando o nível da solução e da gota no próprio material do vial com uma caneta e medindo as distâncias com o auxílio de uma régua. A distância de 0,3 cm estudada inicialmente, foi a menor distância alcançada sem que houvesse contato da gota com a solução aquosa. Para as demais, foram acrescentados 0,5 cm. Em seguida, a concentração de ácido clorídrico utilizada para acidificar a amostra foi novamente avaliada (1, 2 e 3 mol L^{-1}), o volume de amostra acidificada (5, 10 e 15 mL) e o tempo de extração (3, 5, 7, 10, 15, 20 e 30 minutos). Otimizada todas as condições experimentais deste sistema de extração, foi construída uma curva analítica para nitrito no intervalo de 25 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de modo a avaliar o dispositivo eletroquímico miniaturizado combinado à etapa de extração.

3.5.4 Preparo das amostras de salsicha e água

Por fim, a aplicabilidade do método desenvolvido foi avaliada para a quantificação de nitrito em amostras reais de salsicha e águas, de torneira, mineral e de aquário. Para as amostras de salsicha o pré-tratamento foi realizado seguindo o procedimento de PRADELA-FILHO, *et al.* (2015), no qual foram realizadas algumas adaptações. As amostras de salsicha foram cortadas em pequenos pedaços e 30 g desses pedaços foram pesados. Cerca de 70 mL de água ultrapurificada e aquecida a 50 °C foram adicionados e esta mistura foi agitada durante 20 minutos. Após este procedimento, o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e o sólido resultante foi lavado com algumas pequenas porções de água e, posteriormente, o volume do balão foi completado com água ultrapurificada. Uma alíquota de 7 mL desta solução foi utilizada para as análises.

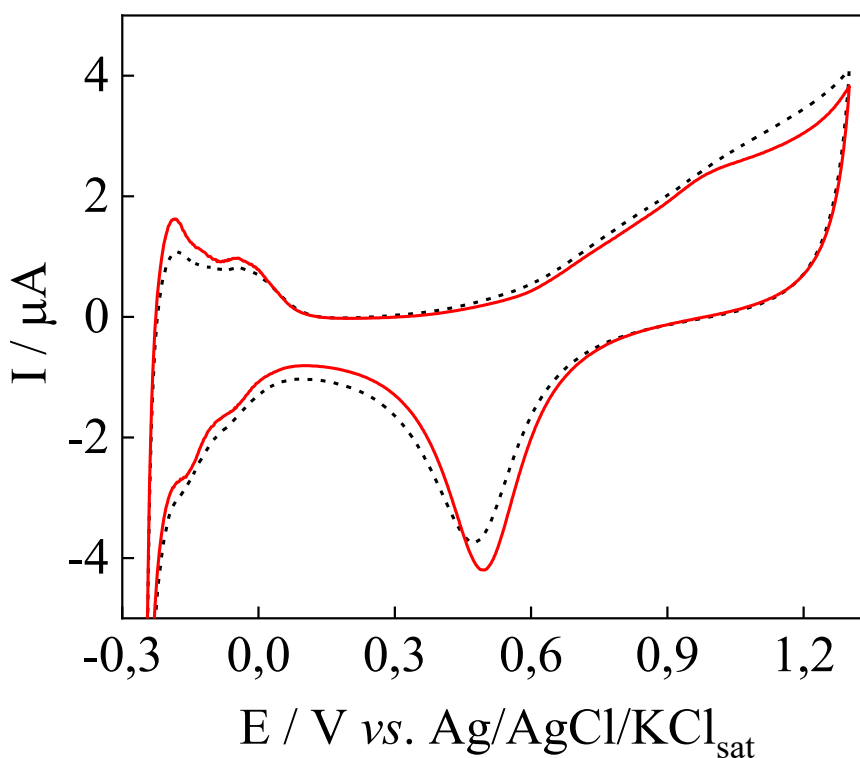
Para as amostras de água, a acidificação foi realizada previamente à análise. Uma alíquota de 10 mL desta solução já acidificada foi submetida ao método de extração e quantificação. Para avaliar a exatidão do método, estudos de adição e recuperação foram realizados em 4 níveis de concentração de nitrito, 30, 60, 90 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudos voltamétricos e de otimização

O primeiro estudo realizado foi a caracterização eletroquímica do dispositivo miniaturizado. Para esta finalidade, empregou-se a voltametria cíclica e o dispositivo foi submetido a 30 ciclos sucessivos de potencial no intervalo de -0,25 a 1,3 V a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} para verificar o comportamento do eletrodo de trabalho e ativar a superfície eletródica. O eletrólito de suporte escolhido para este estudo foi uma solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 4 compara os voltamogramas cíclicos obtidos para o primeiro e o trigésimo ciclo.

Figura 4 – Voltamogramas cíclicos registrados em $500 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. (---) 1° ciclo (—) 30° ciclo. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

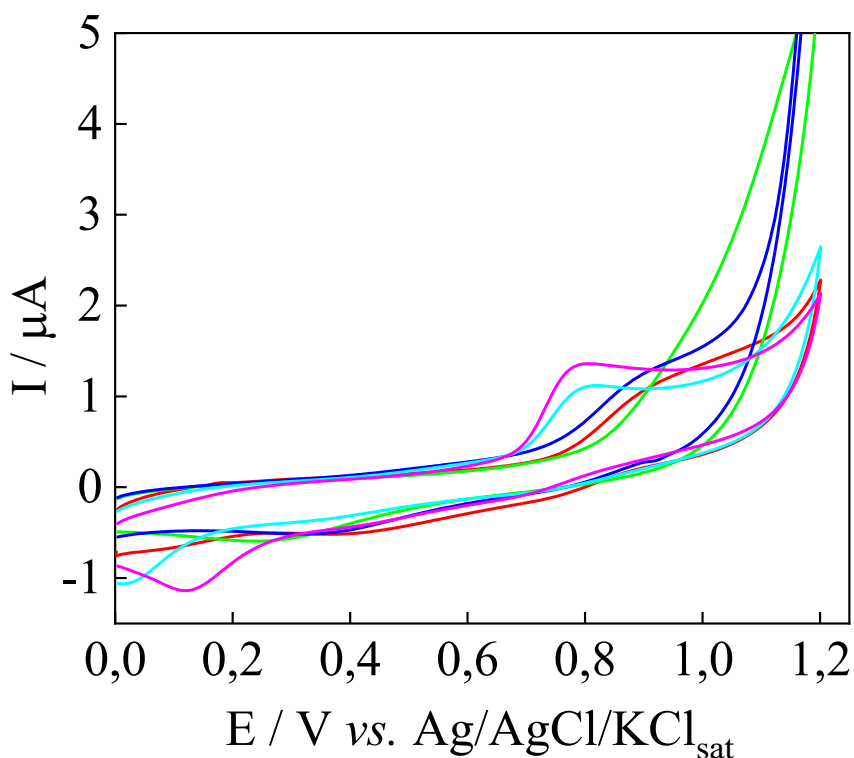


Por meio da Figura 4 pode ser observado que os voltamogramas cíclicos obtidos empregando o dispositivo miniaturizado demonstraram um comportamento típico para um eletrodo de Pt policristalina em meio ácido (FERNANDES, *et al.*, 2015; OLIVEIRA, *et al.*, 2021). Podem ser visualizados os processos de adsorção e dessorção de hidrogênio em potenciais mais negativos que 0 V e, além disso, pode ser identificada a formação dos óxidos

de platina representada pelo pico anódico em +0,98 V e a redução destes óxidos representado pelo pico catódico em +0,49 V. Ainda observando a Figura 4, infere-se que todos os picos voltamétricos mencionados ficam mais definidos após os 30 ciclos sucessivos de potencial no intervalo de -0,25 a 1,3 V, indicando que este procedimento de ativação eletroquímica da superfície do eletrodo é uma etapa importante a ser realizada diariamente antes da utilização do dispositivo.

A seguir, foi investigado o comportamento eletroquímico do nitrito em diferentes meios usando a voltametria cíclica, de modo a selecionar o eletrólito de suporte mais adequado para prosseguir os experimentos. Para este estudo, foram avaliados tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 10,0), tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,3), tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,8), KCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,01 mol L⁻¹ (pH 12,0) na presença de 1 mmol L⁻¹ de nitrito. Os voltamogramas cíclicos registrados são apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Voltamogramas cíclicos registrados em 500 µL de diferentes eletrólitos de suporte na presença de 1 mmol L⁻¹ de nitrito. (—) KCl 0,1 mol L⁻¹, (—) NaOH 0,01 mol L⁻¹ (pH 12,0), (—) Tampão BR 0,04 mol L⁻¹ (pH 10,0), (—) Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,8) e (—) Tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,3). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

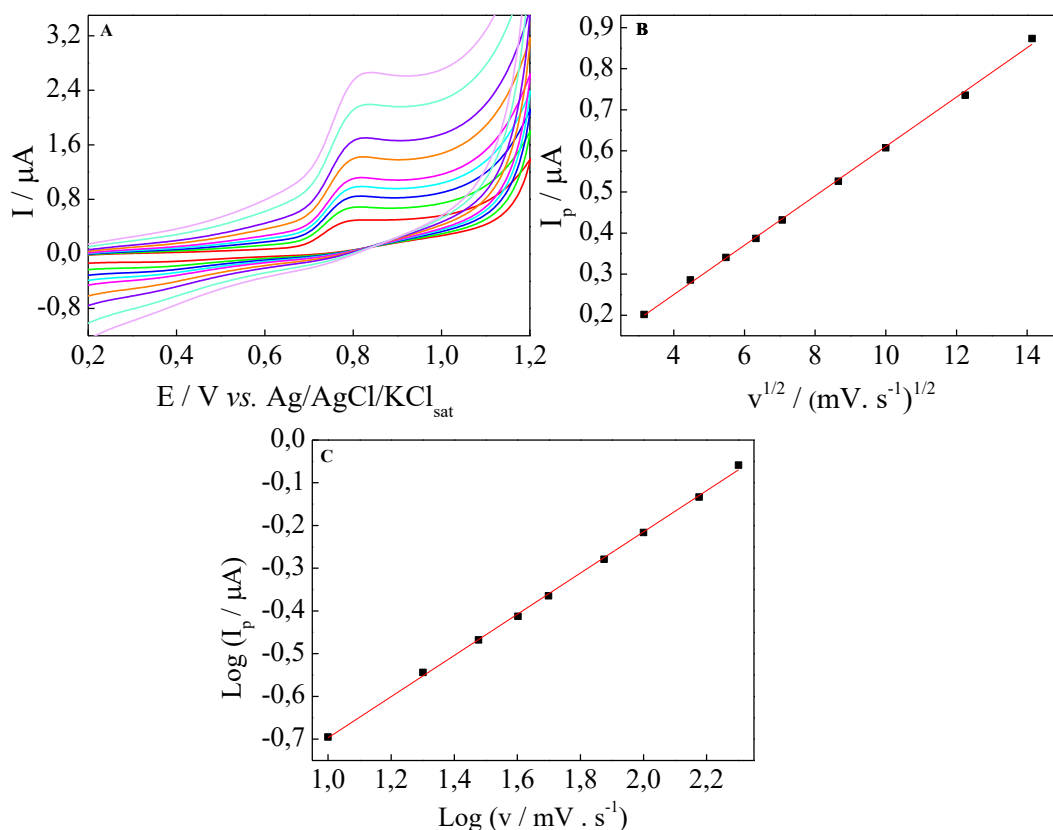


A Figura 5 revela que um sinal voltamétrico de caráter irreversível (próximo a +0,8 V), que pode ser atribuído a oxidação do nitrito pode ser observado tanto em tampão fosfato (pH

6,8) quanto em tampão acetato (pH 5,3). O mecanismo é baseado na oxidação do nitrito a nitrato, e este processo envolve a transferência de dois elétrons (ZHAO, *et al.*, 2017). Nos demais eletrólitos estudados, foram observados picos voltamétricos de baixa intensidade (KCl e tampão B.R. pH = 10) ou a ausência de picos voltamétricos (NaOH 0,01 mol L⁻¹), indicando que estes eletrólitos não são adequados para a determinação voltamétrica de nitrito. Embora a Figura 5 mostre que o pico voltamétrico do nitrito seja mais intenso em tampão acetato, o tampão fosfato foi escolhido pensando no posterior procedimento de extração, visto que o HNO_{2(g)} é um gás ácido e, portanto, presumiu-se que se dissolveria melhor em um eletrólito com maior pH. Alguns trabalhos na literatura também relatam o emprego do tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) como o eletrólito de suporte mais adequado para determinação de nitrito (ANNALAKSHMI, *et al.*, 2019; LIN, *et al.*, 2011; ZHAO, *et al.*, 2017; SANTOS, *et al.*, 2009).

A fim de estudar o comportamento eletroquímico do nitrito, avaliado por meio da voltametria cíclica, foram registrados voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura de 10 a 200 mV s⁻¹, na presença de 1 mmol L⁻¹ de nitrito. A Figura 6 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados, bem como o gráfico da intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

Figura 6 – **A)** Voltamogramas cíclicos registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,8) na presença de 1 mmol L^{-1} de nitrito em diferentes velocidades de varredura. (—) 10 (—) 20 (—) 30 (—) 40 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 150 (—) 200 mV s^{-1} . **B)** Gráfico da intensidade da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. **C)** Gráfico que relaciona o logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura.

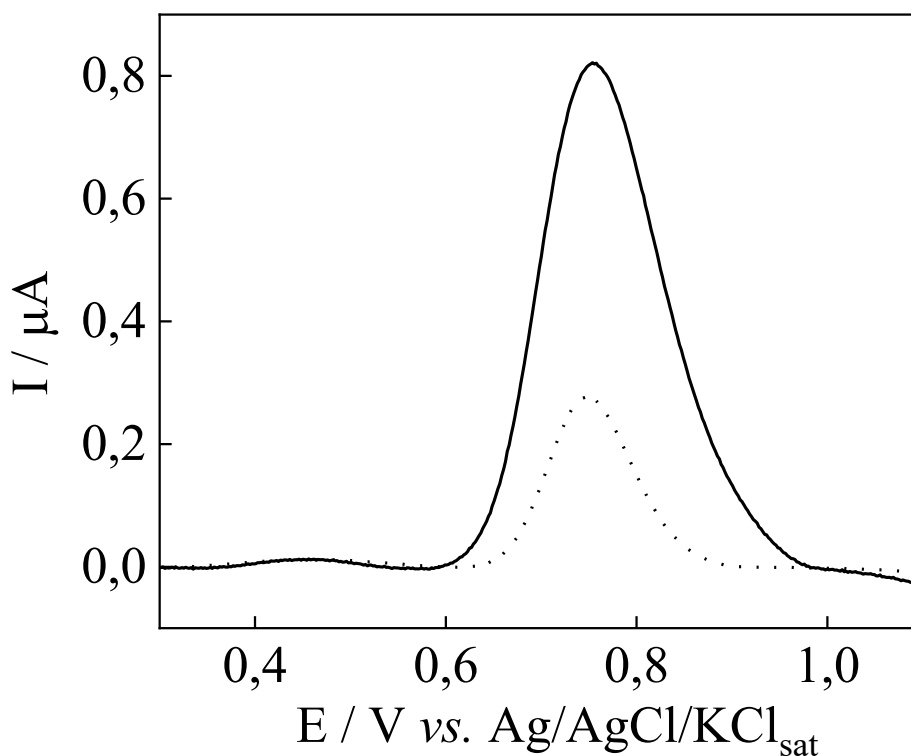


Como pode ser observado na Figura 6A, há um aumento da intensidade da corrente de pico como também, um deslocamento do pico para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura e, além disso, não é possível observar a ocorrência de um pico para redução do nitrito nas velocidades de varredura avaliadas; estes fatores, confirmam, então, que o processo de oxidação do nitrito é um processo eletródico irreversível (WANG, *et al.*, 2012; ZHANG, *et al.*, 2017). Além do mais, os resultados obtidos sugerem que a oxidação do nitrito na superfície do eletrodo seja controlada pela difusão (ZHAO, *et al.*, 2017). Ao construir um gráfico da corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 6B), uma relação linear é obtida, de acordo com a equação da reta: $I_{pa} (\mu\text{A}) = 0,0098 + 0,0601 \cdot v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})^{1/2}$, $R^2 = 0,9981$. Para confirmar tal conjectura, a partir destes resultados, foi construído também um gráfico que relaciona o logaritmo da corrente de pico de oxidação e o logaritmo da velocidade de varredura (Figura 6C). Analisando os resultados, verifica-se que há uma relação

linear entre o $\log I_p$ e $\log v$ ($R^2 = 0,9991$) e o coeficiente angular da reta é 0,48. Este valor indica que o processo de oxidação do nitrito na superfície eletródica é governado pelo processo difusional (BARD, *et al.*, 2001). Ademais, outro aspecto importante a ser pontuado refere-se ao fato de que a resposta voltamétrica obtida é bastante semelhante se compararmos o perfil alcançado para sistemas convencionais de três eletrodos indicando, desta forma, que a miniaturização não comprometeu a detecção voltamétrica do nitrito (ANNALAKSHMI, *et al.*, 2019; ZHAO, *et al.*, 2017).

No intuito de avaliar qual técnica voltamétrica seria a mais adequada para detectar o nitrito, foram registrados voltamogramas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,8 na presença de 1 mmol L^{-1} de nitrito empregando duas técnicas voltamétricas: voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV). As características que diferenciam cada uma das técnicas estão baseadas no modo de aplicação dos pulsos de potenciais e isto implica nas diferentes intensidades de correntes no perfil voltamétrico verificadas (SOUZA, *et al.*, 2003). As respostas obtidas para as duas técnicas avaliadas estão apresentadas na Figura 7.

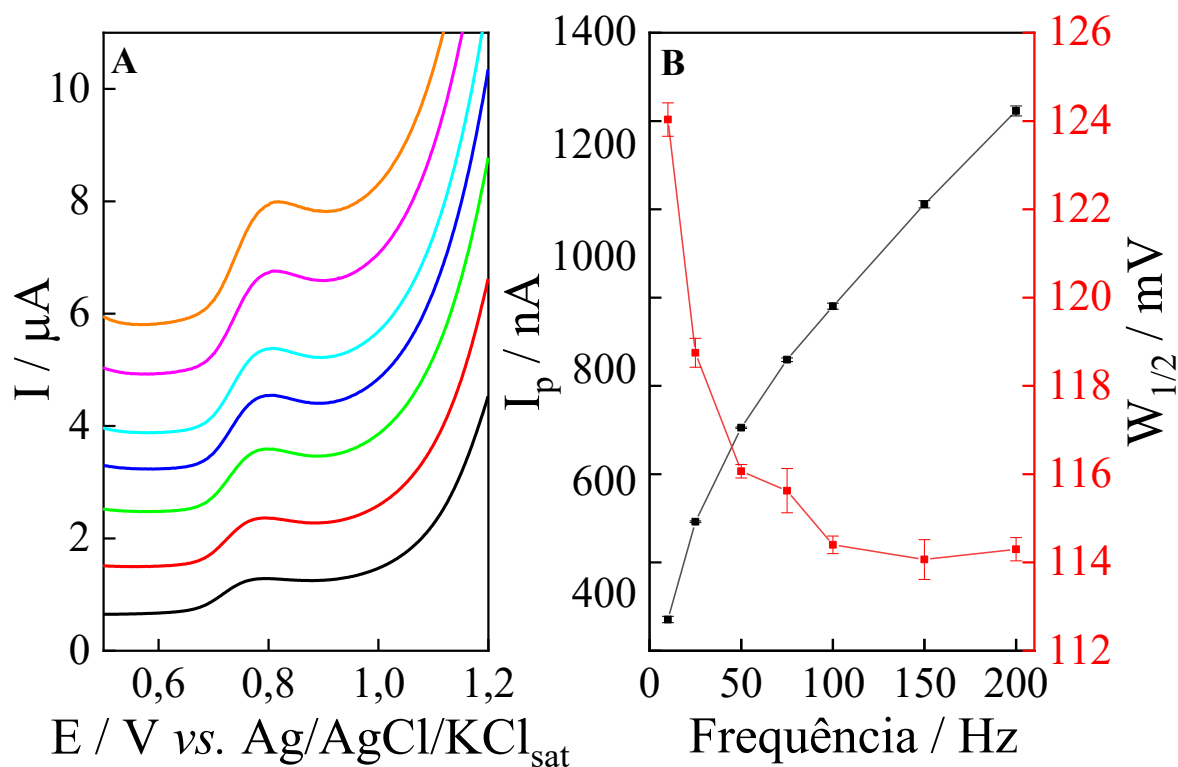
Figura 7 – Voltamogramas registrados em $500 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de 1 mmol L^{-1} de nitrito avaliando diferentes técnicas voltamétricas. (···) DPV (—) SWV. Condições voltamétricas: DPV: $\Delta E = 25 \text{ mV}$, $t_p = 50 \text{ ms}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; SWV: $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



A SWV foi escolhida em relação à DPV devido a resposta eletroquímica obtida, como pode ser observado por meio da Figura 7, dando origem a um sinal voltamétrico estreito, bem definido e mais intenso, cerca de 66% aproximadamente, se comparado ao sinal voltamétrico obtido empregando a DPV. Além disso, uma vantagem adicional da SWV está relacionada à velocidade na aquisição de dados, permitindo que medidas mais rápidas sejam realizadas, aumentando a frequência analítica (PACHECO, *et al.*, 2013). Após a escolha da técnica que forneceria o melhor perfil voltamétrico, foi realizada a otimização dos parâmetros experimentais que influenciam a resposta obtida pela SWV. A melhor condição para cada parâmetro avaliado foi determinada levando em consideração a intensidade da corrente de pico, mas também considerando o perfil do sinal analítico obtido. Os parâmetros e os intervalos estudados foram: frequência (10 – 200 Hz), amplitude de pulso (10 – 125 mV) e incremento de potencial (2 – 12 mV), nesta ordem. Para este estudo, dois parâmetros foram mantidos fixos, enquanto o outro foi variado para avaliar o efeito. Como o estudo para cada uma das condições analisadas foi realizado em triplicata, os pontos do gráfico referem-se à média e desvio padrão obtidos para três medidas. Em todo este trabalho, as barras de erro correspondem ao desvio padrão. Todas as medidas foram realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na presença de 500 µmol L⁻¹ de nitrito.

O primeiro parâmetro avaliado foi a frequência (f), mantendo a amplitude e o incremento de potencial fixados em 50 e 2 mV, respectivamente. Os voltamogramas e o gráfico da variação da corrente de pico e a largura a meia-altura em função da frequência estão apresentados na Figura 8.

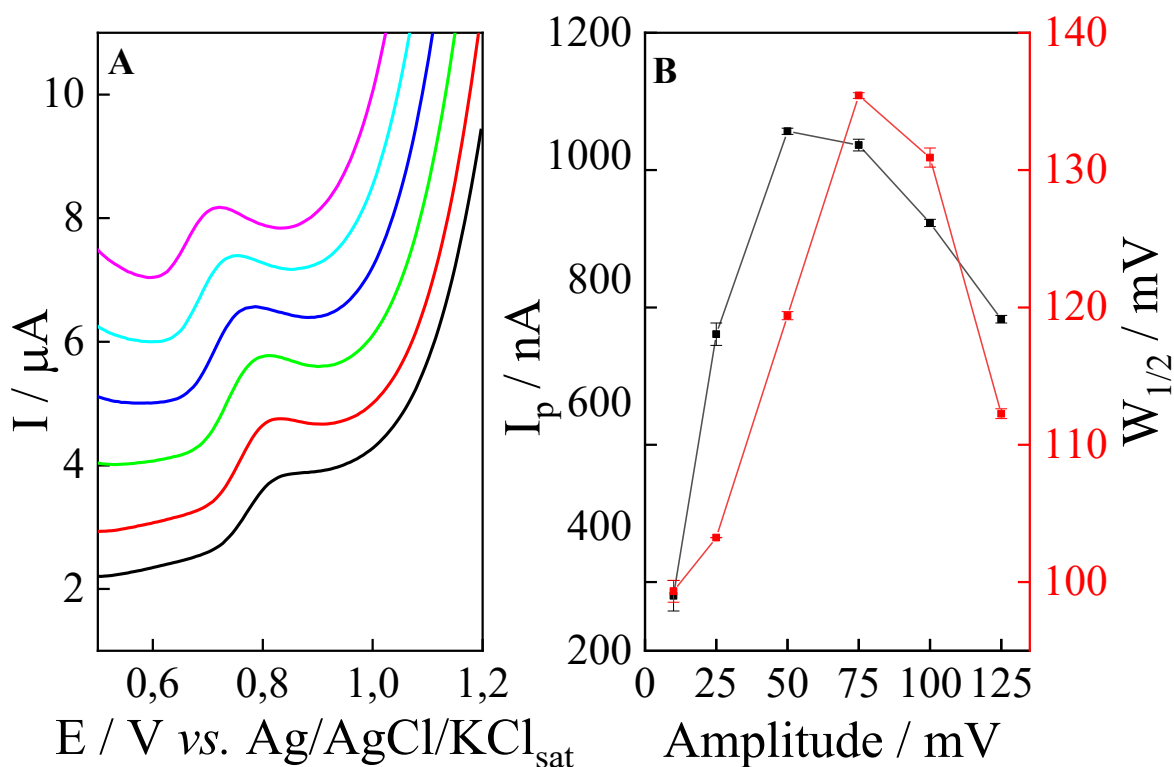
Figura 8 – **A)** Voltamogramas de onda quadrada registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em diferentes frequências. (—) 10 (—) 25 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 150 (—) 200 Hz. **B)** Gráficos de I_p e largura de pico a meia-altura ($W_{1/2}$) em função da frequência. ($\Delta E = 50$ mV, $\Delta E_s = 2$ mV).



Os resultados obtidos revelam que, com o aumento da frequência, há um aumento da intensidade da corrente de pico, no entanto, há um decréscimo da largura de pico a meia-altura, permanecendo estável para frequências superiores a 100 Hz. Além disso, foi observado também um pequeno deslocamento do potencial de pico para regiões mais positivas (Figura 8). Neste caso, a frequência escolhida foi baseada tanto na intensidade de corrente, quanto na largura de pico a meia-altura, mas também na repetitividade das medidas, evidenciada pelo desvio padrão. Desta forma, a frequência mais adequada e selecionada para os estudos seguintes de acordo com estes fatores, foi 50 Hz.

O próximo parâmetro otimizado foi a amplitude de pulso (ΔE). Para isto, dois parâmetros foram mantidos fixos: a frequência, já na condição otimizada ($f = 50$ Hz), e o incremento de potencial utilizado anteriormente ($\Delta E_s = 2$ mV), sendo a amplitude variada de 10 a 125 mV. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – **A)** Voltamogramas de onda quadrada registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em diferentes amplitudes. (—) 10 (—) 25 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 125 mV. **B)** Gráficos de I_p e largura de pico a meia altura em função da amplitude. ($f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

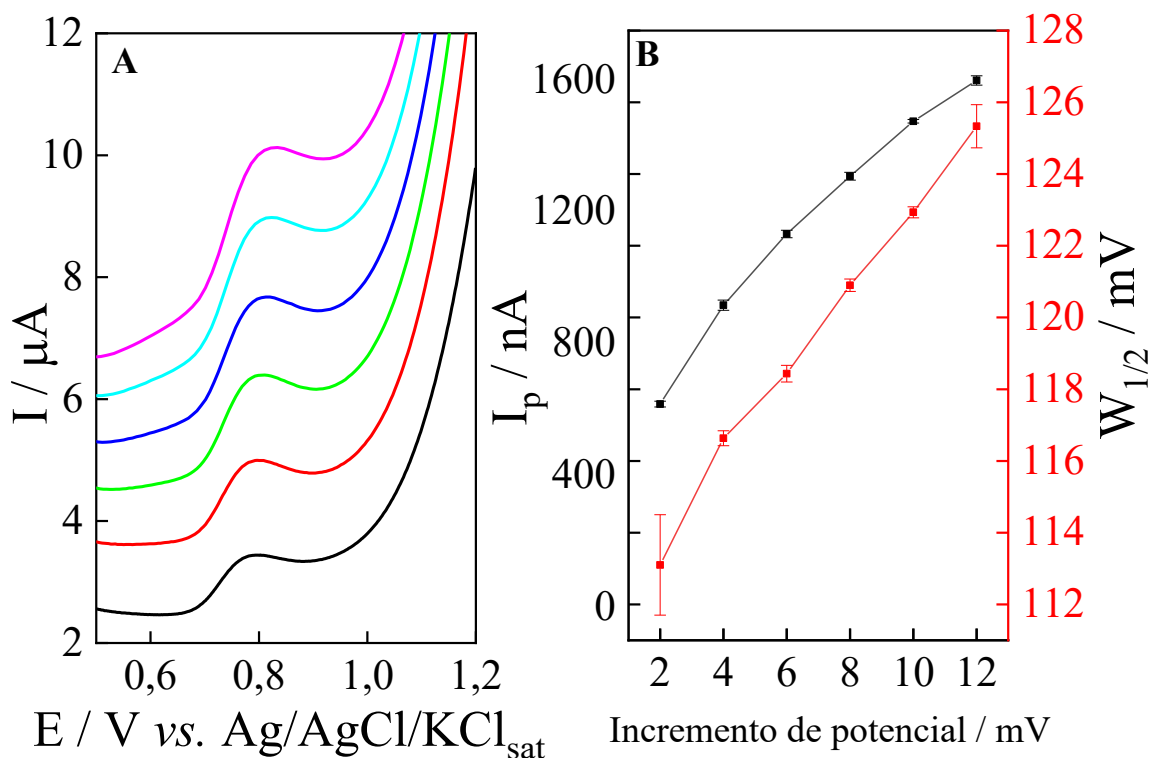


Como é possível constatar a partir da análise da Figura 9, há um aumento da intensidade de pico com o aumento da amplitude até 50 mV, sendo observado um perfil estável até 75 mV e um decréscimo para amplitudes maiores que 75 mV. De maneira análoga, há um aumento da largura do pico a meia-altura e, posteriormente, um decréscimo após 75 mV. Além do mais, também pode ser observado um deslocamento do potencial de pico para regiões menos positivas. Desta forma, a amplitude de 50 mV foi escolhida, pois, embora apresente um valor de largura de pico a meia-altura superior a determinadas amplitudes estudadas (10 e 25 e 125 mV), esta apresenta a maior intensidade de corrente de pico, além de medidas voltamétricas bastante repetitivas, evidenciadas pelo desvio padrão. Para as demais amplitudes estudadas, a largura de pico a meia-altura foi significativamente maior, e menores intensidades de corrente foram observadas. Assim, de posse destes resultados, infere-se que a amplitude de 50 mV seja a condição mais adequada.

Na sequência, o último parâmetro avaliado foi o incremento de potencial (ΔE_s). Para isto, foram fixadas as duas condições otimizadas: frequência ($f = 50 \text{ Hz}$) e amplitude

($\Delta E = 50$ mV), sendo o incremento de potencial (ΔE_s) variado de 2 a 12 mV. A Figura 10 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

Figura 10 – A) Voltamogramas de onda quadrada registrados em 500 μ L de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na presença de 500 μ mol L⁻¹ de nitrito em diferentes incrementos de potencial. (—) 2 (—) 4 (—) 6 (—) 8 (—) 10 (—) 12 mV. **B)** Gráficos de I_p e largura de pico a meia altura em função do incremento de potencial. ($f = 50$ Hz, $\Delta E = 50$ mV).



Os voltamogramas de onda quadrada e o gráfico apresentado na Figura 10B revelam que com o aumento do incremento de potencial (ΔE_s), há um aumento da intensidade da corrente de pico, bem como um aumento na largura de pico a meia-altura. O aumento do ΔE_s pode acarretar o alargamento dos picos e, conseqüentemente, pode comprometer a resolução do perfil voltamétrico (SOUZA, *et al.*, 2003). Nesta perspectiva, analisando os resultados obtidos, o incremento de potencial que produziu um perfil voltamétrico com uma boa resolução e intensidades de corrente foi de 4 mV, além de apresentar um baixo desvio padrão das medidas, sendo assim, esta condição foi selecionada como a mais adequada para as medidas voltamétricas.

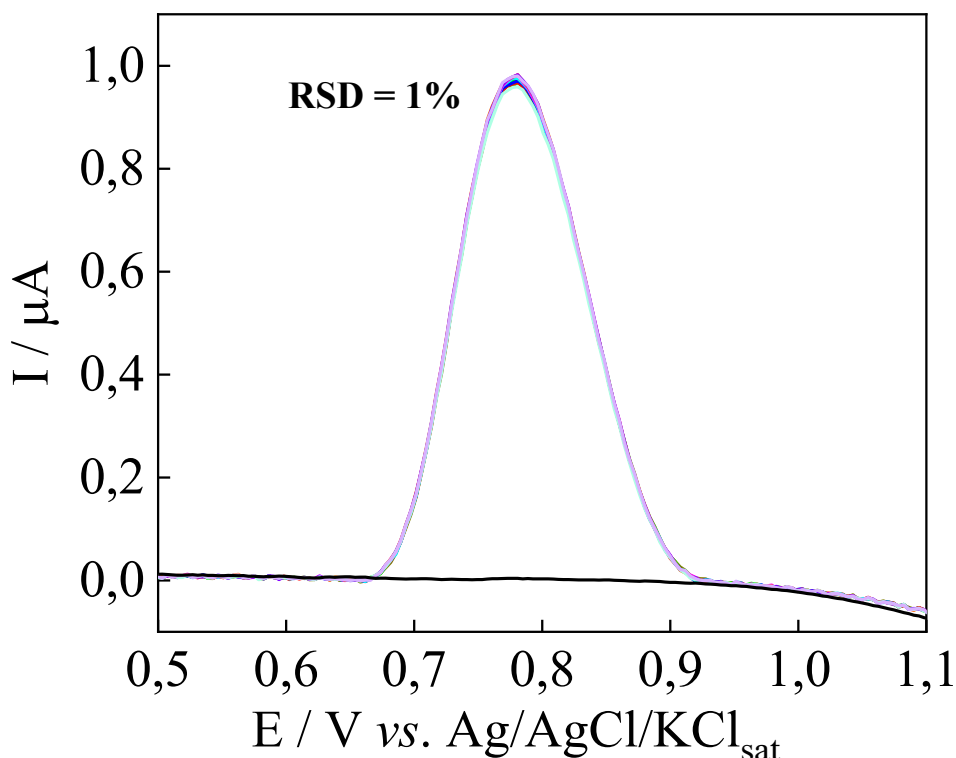
A Tabela 1 apresenta de forma resumida os parâmetros instrumentais, intervalos, bem como as condições selecionadas após o estudo de otimização.

Tabela 1 – Parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada avaliados.

Parâmetro instrumental	Intervalo avaliado	Condição selecionada
Frequência (f)	10 – 200 Hz	50 Hz
Amplitude (ΔE)	10 – 125 mV	50 mV
Incremento de potencial (ΔE_s)	2 – 12 mV	4 mV

Definidas as condições otimizadas, foram registrados 10 voltamogramas de onda quadrada na presença de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no intuito de avaliar a repetitividade nas condições otimizadas. Para este estudo foi empregada a mesma superfície eletródica e os voltamogramas foram registrados consecutivamente. Os voltamogramas obtidos neste estudo estão apresentados na Figura 11.

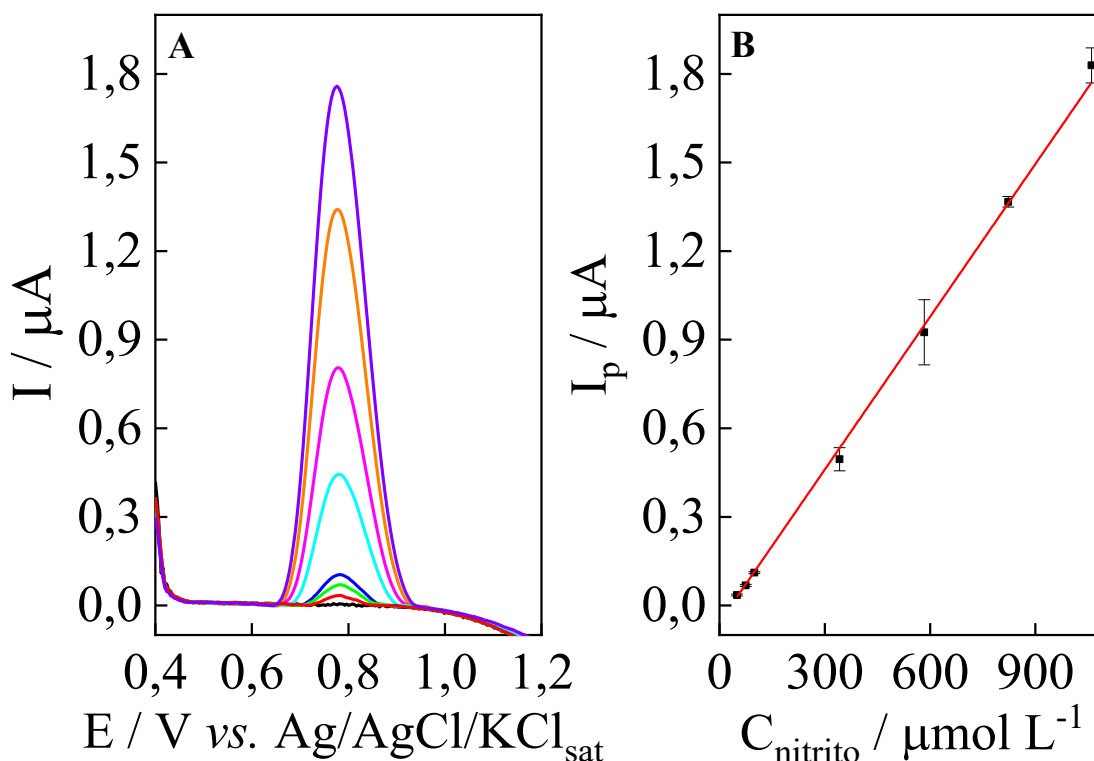
Figura 11 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em $500 \mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência e presença de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito. (—) Branco (—) 1 (—) 2 (—) 3 (—) 4 (—) 5 (—) 6 (—) 7 (—) 8 (—) 9 (—) 10° registro. Condições otimizadas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



A Figura 11 mostra que, na presença de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito foi observado um pico voltamétrico bem definido próximo a $+0,78 \text{ V}$. Além disso, o perfil dos voltamogramas registrados foi bastante repetitivo empregando a mesma superfície eletródica e a mesma

solução, sendo obtido um valor do desvio padrão relativo bastante satisfatório, próximo a 1% para os valores de intensidade de corrente anódica, para 10 voltamogramas sucessivos. Portanto, este resultado sugere que, nas condições experimentais empregadas, nenhum efeito de memória ou de desativação do eletrodo são verificados, não havendo alterações significativas nas intensidades dos picos voltamétricos, indicando uma estabilidade da superfície eletródica do dispositivo empregado. A partir das condições voltamétricas previamente otimizadas, foram registrados voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações de nitrito no intuito de verificar qual o desempenho analítico do dispositivo frente a este analito. Os voltamogramas foram utilizados para construir uma curva analítica, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 12. Vale ressaltar que este estudo foi realizado em triplicata empregando uma mesma superfície eletródica, mas trocando toda a solução de eletrólito de suporte do sistema e promovendo a limpeza do eletrodo com água ao fim de cada uma das replicatas.

Figura 12 – A) Voltamogramas de onda quadrada com correção da linha de base registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de diferentes concentrações de nitrito. (—) Branco (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 350 (—) 600 (—) 850 (—) 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. B) Curva analítica.



Por meio da Figura 12A pode-se observar que o sinal de oxidação para o nitrito aumentou linearmente com o aumento da concentração de nitrito no intervalo de 50 a 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Concentrações mais baixas do analito foram avaliadas (10 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), no entanto, não foi possível identificar nenhum sinal voltamétrico. A curva analítica apresentada na Figura 12B mostra uma relação linear entre os valores de corrente (I_p) e a concentração de nitrito na faixa estudada de acordo com a equação: $I_p (\mu\text{A}) = -0,05709 + 0,00172 \cdot C_{\text{nitrito}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, $R^2 = 0,9985$. Os valores para os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) puderam ser calculados a partir do desvio padrão do intercepto (s_{db}) e do coeficiente angular da curva analítica (S) obtida, de acordo com as equações: $LD = 3 \cdot s_{db}/S$ e $LQ = 10 \cdot s_{db}/S$, sendo obtidos os valores de 5,7 e 19 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O valor de LQ ficou abaixo da concentração mais baixa da curva analítica, a qual foi 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo esta uma estimativa mais realista para o LQ. Aqui é importante frisar que a curva analítica foi construída em um único dia, mas entre cada uma das replicatas, todo o sistema foi desmontado e montado novamente, trocando a solução do eletrólito de suporte e, portanto, os desvios padrões indicados no gráfico evidenciam uma boa precisão do dispositivo miniaturizado nas condições experimentais realizadas. A Tabela 2 evidencia alguns métodos eletroanalíticos desenvolvidos e relatados na literatura para quantificação de nitrito.

Tabela 2 – Métodos eletroanalíticos para detecção e quantificação de nitrito.

Eletrodo	Técnica Eletroanalítica	Faixa linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	V_{célula} eletroquímica	Referência
GCV/FeT4MPyP/ CuTSPc	DPV	0,5 – 7,5	0,14	5 mL	SANTOS, <i>et al.</i> , 2009
GCV/NrGO	Amperometria	0,5 – 5000	0,20	NR	CHEN, <i>et al.</i> , 2016
MCE/grafeno/ GNPs	DPV	0,3 – 720	0,10	NR	WANG, <i>et al.</i> , 2017
GCV/rGO-Pani- AsM	SWV	25 – 7500	10,71	10 mL	SUMA, <i>et al.</i> , 2019
EPC/NiFe ₂ O ₄	Amperometria	0,1 – 1000	0,12	NR	NITHYAYINI, <i>et al.</i> , 2019
GSPE/AgNPs/CS	DPV	30 – 1140	1,84	7 mL	PATRI, <i>et al.</i> , 2019
ECV/Co ₃ O ₄ /Au	SWV	1 – 4000	0,10	NR	MANIKANDAN, <i>et al.</i> , 2021
ECV/GO/Cu- TPA	SWV	5 – 625	0,30	10 mL	SUMA, <i>et al.</i> , 2020
Pt	SWV	50 – 1100	5,70	0,5 mL	Este trabalho

FeT4MPyP: ferro(III) tetra-(N-metil-4-piridil)-porfirina; CuTSPc: ftalocianina tetrassulfonada de cobre; NrGO: óxido de grafeno reduzido dopado com nitrogênio isento de metal; MCE: papel de filtro de éster de celulose misturado; GNPs: nanopartículas de ouro; rGO: óxido de grafeno reduzido; Pani: polianilina; AsM: arsenomolibdato; AgNPs/CS: nanopartículas de prata-quitosana; GO: óxido de grafeno; Cu-TPA: tereftalato de cobre; NR: não reportado.

Por meio da Tabela 2, observa-se que o LD obtido para o sistema miniaturizado é próximo aos relatados para alguns eletrodos quimicamente modificados. Outras características atrativas deste sistema podem ser elencadas como, a diminuição do volume de reagentes empregados e, conseqüentemente, o volume de resíduos gerados, já que são utilizados apenas 500 μL de eletrólito de suporte; se compararmos com os outros trabalhos listados, a maioria deles utiliza um volume de eletrólito de suporte significativamente maior, na escala de mL. Além disso, o sistema miniaturizado utiliza materiais alternativos e de baixo custo; uma vez

que o dispositivo foi confeccionado, não é necessária nenhuma outra etapa para sua utilização, no entanto, os procedimentos descritos para a modificação dos eletrodos, comumente empregados para fornecer uma melhora na atividade eletrocatalítica, além de mitigar o envenenamento do eletrodo (WANG, *et al.*, 2017), podem requerer, na maioria dos casos, sínteses demoradas e que utilizam reagentes caros. Por fim, é importante ressaltar que, a detectabilidade do método será melhorada ao combinar o dispositivo à etapa de extração, sendo os resultados apresentados e discutidos posteriormente.

Avaliados todos os parâmetros instrumentais da técnica analítica, a próxima etapa consistiu em verificar quais as vantagens de associar o dispositivo miniaturizado a outros parâmetros da metodologia de análise relativos ao preparo de amostra, neste caso, uma etapa de extração por difusão gasosa.

4.2 Microextração por difusão gasosa

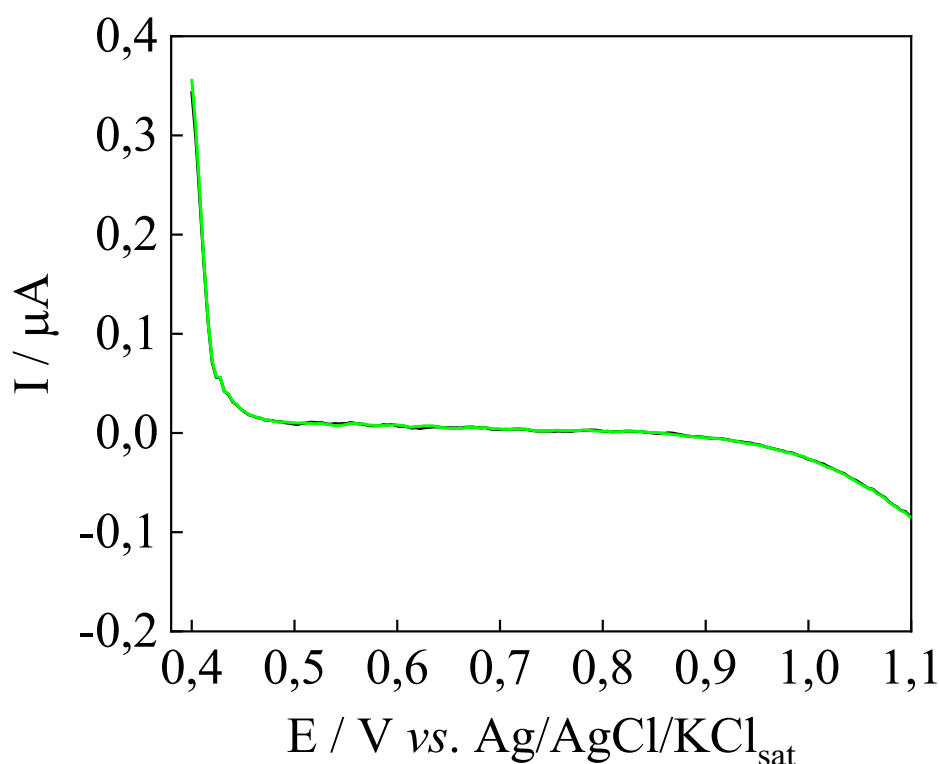
Como foi abordado inicialmente, há uma dificuldade em determinar nitrito em certas amostras, devido à complexidade da matriz. Uma estratégia no preparo de amostra que pode ser bastante eficiente resolvendo esta problemática está na geração de espécies voláteis, em se tratando de determinados analitos. De acordo com a proposta deste trabalho, ao ser empregado um ácido forte, haverá a conversão do NO_2^- (presente na amostra/solução doadora) em HNO_2 ácido bastante volátil, o qual será concentrado em uma solução receptora para, posteriormente, ser quantificado voltametricamente. A vantagem da utilização desta proposta é que a maioria dos interferentes não é volátil e, além disso, o analito é coletado em um menor volume de solução (fase receptora), concentrando-o. Portanto, esta estratégia é capaz de melhorar tanto a seletividade quanto a detectabilidade do método.

Na proposta tradicional, o método de microextração emprega uma membrana permeável a gás, promovendo a difusão da espécie volátil entre as duas fases, doadora (contendo o analito/amostra) e receptora (recebe o analito após a extração). Portanto, o analito se difunde pelo espaço que separa as duas fases (PACHECO, *et al.*, 2010). No entanto, conforme foi relatado, alguns problemas estão associados ao uso desta membrana, sendo o principal deles a baixa velocidade de transferência do analito do recipiente gerador para o receptor. Aprimorada por Phansi *et al.* (2016), foi relatada uma nova proposta deste modelo de microextração na qual não há o emprego desta membrana.

Inicialmente, foi verificado se algum processo redox seria observado ao colocar a manta de poliéster (material captador) em contato com a solução de eletrólito de suporte (500 μL de

tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) antes mesmo do procedimento de extração ser realizado. O resultado obtido foi comparado com um sinal no branco na ausência do material para avaliação. A Figura 13 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos.

Figura 13 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em $500 \text{ } \mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência de nitrito. (—) Branco na ausência de poliéster (—) Branco na presença de um chumaço de poliéster. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



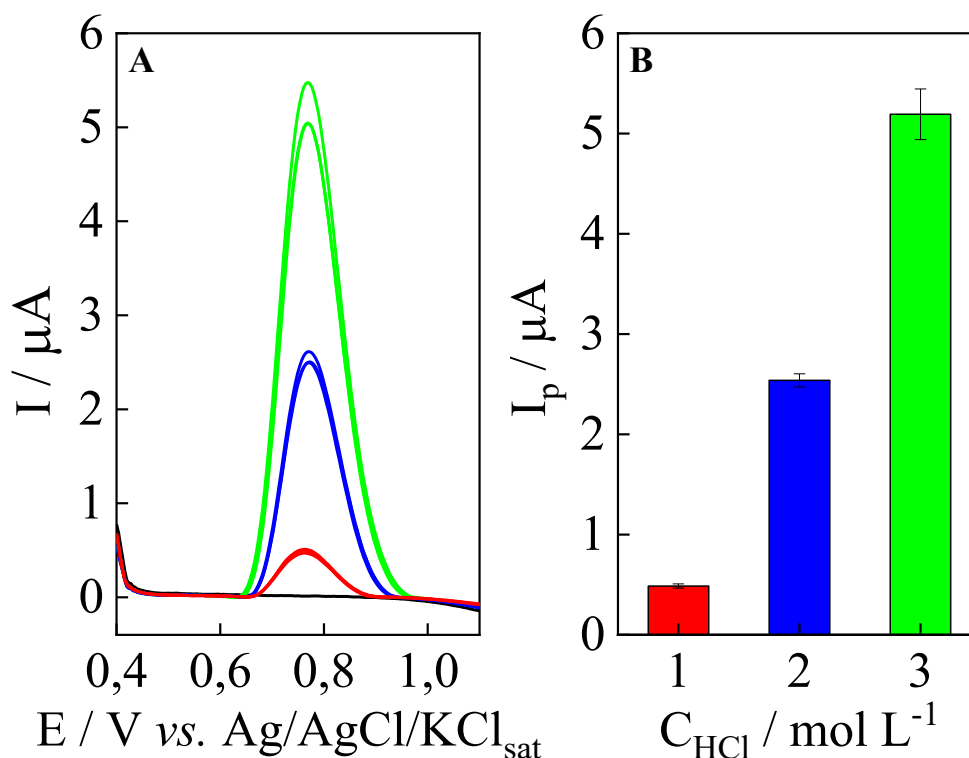
Como pode ser verificado na Figura 13, ao comparar os voltamogramas do branco na ausência e presença do poliéster, nenhum pico voltamétrico foi observado, indicando a ausência de qualquer processo redox nas condições experimentais empregadas, demonstrando que o material captador mesmo sem qualquer tipo de pré-tratamento não causará nenhuma interferência na determinação de nitrito e, portanto, pode ser utilizado para concentrar o ácido nitroso no sistema de extração.

Em seguida, o primeiro parâmetro avaliado na otimização do procedimento de extração foi a concentração de HCl , sendo avaliado 1, 2 e 3 mol L^{-1} . Este experimento tem como objetivo verificar qual o efeito do aumento da concentração da solução ácida empregada na volatilização do ácido nitroso. Para todas as concentrações avaliadas, a extração foi realizada em triplicata.

A partir deste momento todos os estudos já foram avaliados empregando o sistema de extração apresentado na Figura 2.

Neste estudo, após 10 minutos de extração, o poliéster foi retirado do sistema de extração e levado para a célula eletroquímica miniaturizada contendo o eletrólito de suporte para o registro dos voltamogramas. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

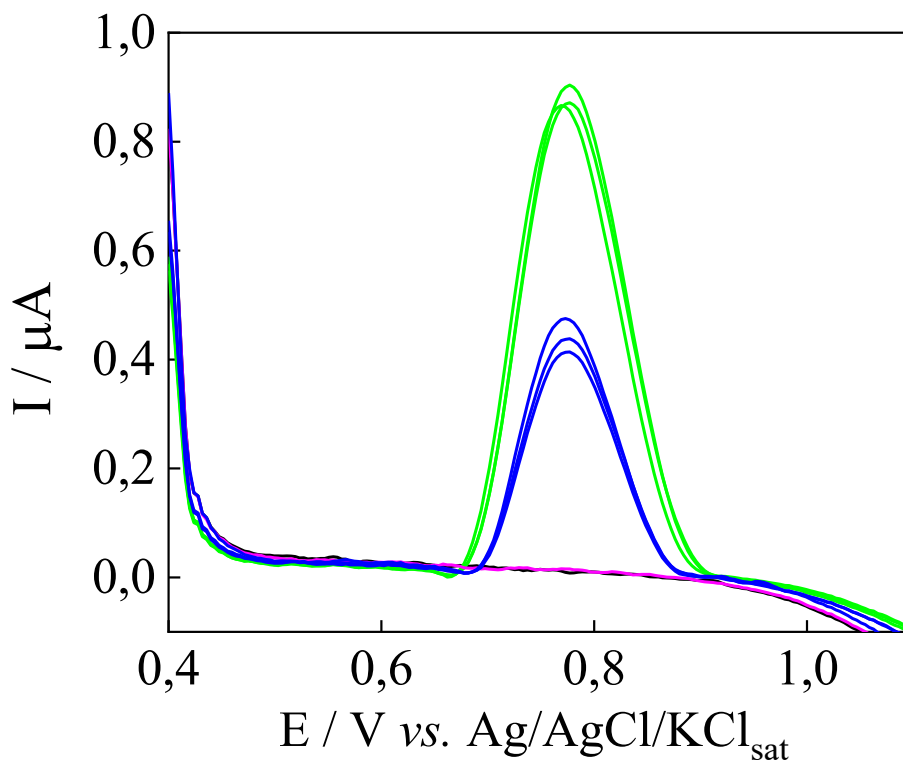
Figura 14 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 10 minutos de extração de 1 mmol L^{-1} de nitrito empregando diferentes concentrações de ácido clorídrico. Massa de poliéster: 5 mg embebido com 50 μL de eletrólito de suporte. (—) Branco (—) 1 (—) 2 (—) 3 mol L^{-1} de HCl. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades de corrente e o desvio padrão. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Os resultados revelam que o aumento da concentração de ácido clorídrico promove um aumento significativo na intensidade da corrente de pico, contribuindo para a extração de nitrito, como pode ser observado pela Figura 14B, evidenciando que este parâmetro afeta de maneira considerável e favorece a transferência do $\text{HNO}_{2(g)}$ da solução doadora para o material aceitor. Além disso, o RSD para cada uma das concentrações foi estimado em 4,2, 2,6 e 4,9% para 1, 2 e 3 mol L^{-1} , respectivamente. De acordo com estes resultados, optou-se por empregar a concentração de 3 mol L^{-1} de HCl para as etapas subsequentes.

Em seguida, de modo a avaliar a aplicabilidade do método para concentrações mais baixas do analito outras duas concentrações de nitrito (100 e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram avaliadas na extração, empregando a solução ácida na concentração otimizada. Além disso, para confirmar que, de fato, todo o sinal analítico obtido é proveniente apenas da volatilização do ácido nitroso e não tem contribuição de nenhuma outra espécie da solução acidificada, foi realizada uma extração em branco, ou seja, sem adição de nitrito na amostra acidificada, seguindo o procedimento padrão adotado. Além disso, como de costume, antes das medidas voltamétricas, foi realizada a voltametria cíclica em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para a ativação da superfície do eletrodo. Uma vez que este procedimento foi realizado, o eletrodo não era polido mais, e a mesma superfície era empregada ao longo de todo o experimento. Na sequência, foram realizadas algumas voltametrias de onda quadrada (nas condições otimizadas) seguida de voltametria cíclica apenas em eletrólito de suporte (10 ciclos no intervalo de varredura de $0,4$ a $1,2 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 15.

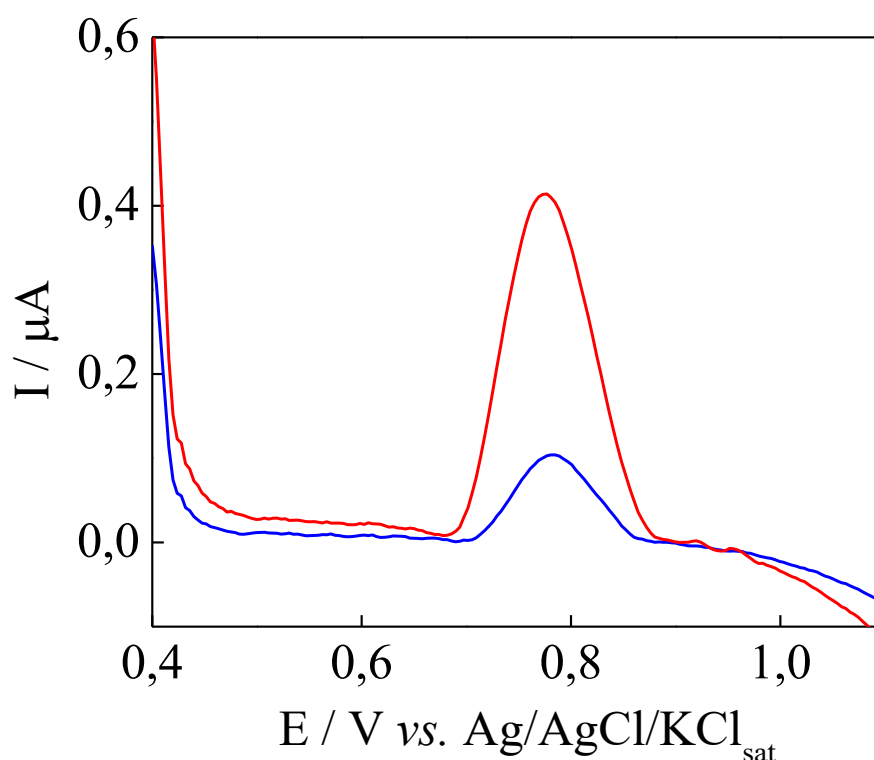
Figura 15 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em $500 \mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após 10 minutos de extração empregando HCl 3 mol L^{-1} na ausência e presença de diferentes concentrações de nitrito. Massa de poliéster: 5 mg embebido em $50 \mu\text{L}$ de eletrólito de suporte. (—) Branco (—) Ausência (—) 100 (—) $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito.



Como pode ser observado na Figura 15, houve um aumento da intensidade da corrente anódica de nitrito com o aumento da concentração, como esperado. Os valores de desvio padrão relativos foram de 8,2 e 2,2% para as concentrações de 100 e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, evidenciando que há uma repetitividade satisfatória entre as replicatas, indicando uma boa precisão do método analítico.

Uma das vantagens desta técnica é a de que com a redução do volume empregado na extração (10 mL) para o volume de eletrólito de suporte empregado na célula miniaturizada (500 μL) haja uma melhora na detectabilidade, pois promove uma pré-concentração do analito. Este efeito pode ser observado na Figura 16 ao compararmos as intensidades dos picos voltamétricos obtidos para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito com e sem extração (curva analítica).

Figura 16 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} comparando a intensidade do sinal analítico obtido com uma das soluções padrão utilizadas para construir a curva analítica e o sinal analítico obtido após o procedimento de extração. (—) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (extração) (—) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (curva analítica) Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

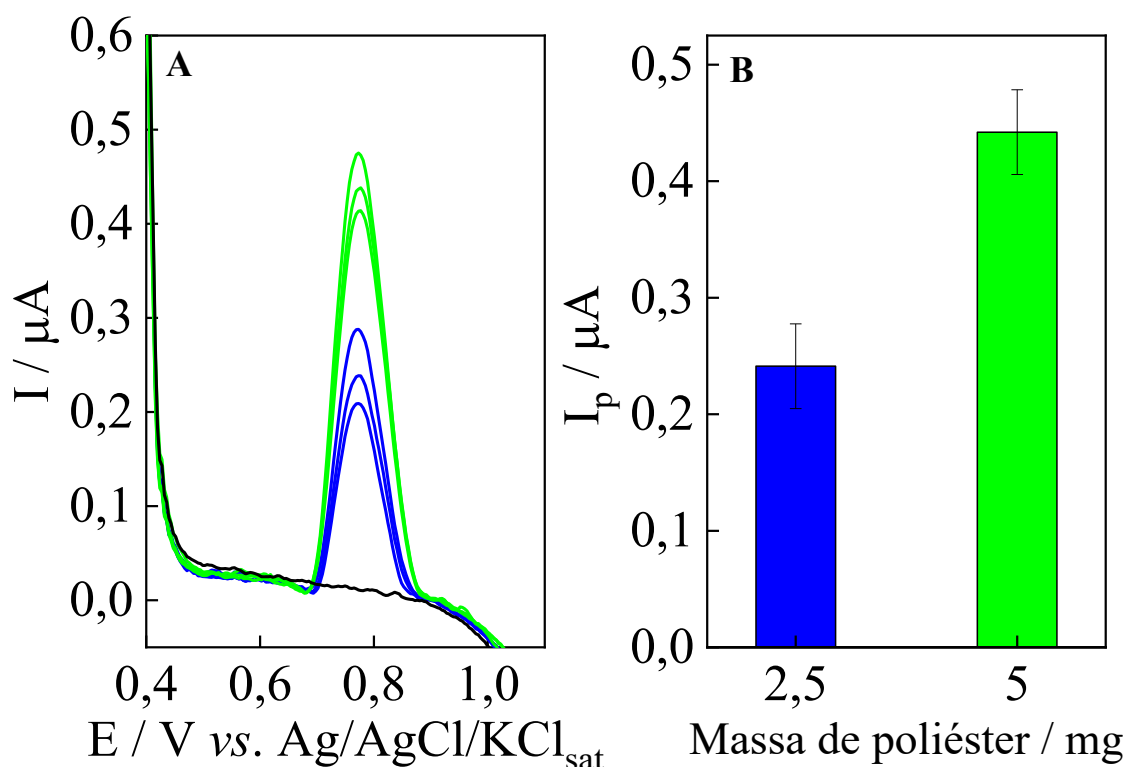


De fato, como pode ser observado, ao ser comparada a intensidade da corrente para o pico voltamétrico obtido para o padrão 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito com a intensidade da corrente para o pico voltamétrico obtido para esta mesma concentração de nitrito após a extração, é

evidente o ganho de intensidade de sinal de aproximadamente 82,3% e, conseqüentemente, o aumento da detectabilidade do método. Além disso, a extração não alterou o perfil voltamétrico do nitrito e não foi observado também um deslocamento no potencial (Figura 16).

Seguindo com as otimizações, o próximo parâmetro avaliado foi a diminuição da massa de poliéster de 5 para 2,5 mg e, conseqüentemente, a diminuição também do volume de eletrólito de suporte adicionado ao material de 50 para 25 μL . Esta e todas as demais otimizações foram realizadas empregando a concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito; as outras condições experimentais também foram mantidas, sendo os resultados apresentados na Figura 17. Este estudo também foi realizado em triplicata.

Figura 17 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 10 minutos de extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito empregando HCl 3 mol L^{-1} avaliando diferentes massas de poliéster. (—) Branco (—) 2,5 (—) 5,0 mg. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades de corrente e o desvio padrão. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

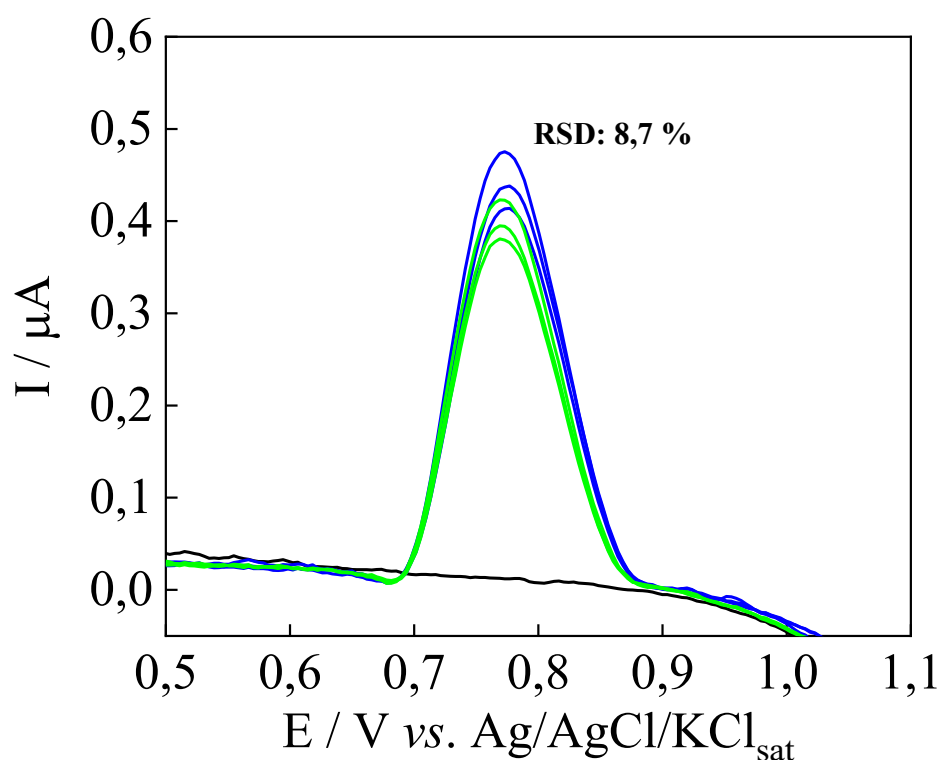


Como pode ser observado, a diminuição da massa de poliéster diminuiu a intensidade do pico voltamétrico do nitrito e ainda aumentou a dispersão dos resultados, sendo de aproximadamente 15 e 8,2% para 2,5 e 5 mg, respectivamente. Apenas as duas massas foram avaliadas, pois, por questões experimentais, o volume ocupado pela esfera de poliéster em

5 mg atingiu um limite que não atrapalhasse as medidas analíticas entrando em contato com a superfície do sistema miniaturizado levando em consideração o tamanho da célula eletroquímica e, como para a massa de 2,5 mg não houve uma melhora nas intensidades de corrente obtidas, optou-se por prosseguir utilizando 5 mg da manta de poliéster.

Por fim, com o intuito de avaliar a repetitividade do método, a extração para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito foi avaliada em dois dias e, conseqüentemente, duas superfícies eletródicas diferentes. Todos os parâmetros experimentais foram empregados nas suas condições otimizadas, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em $500 \mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ avaliando a repetitividade da extração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito em dois dias diferentes. (—) Branco (—) Dia 1 (—) Dia 2. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.



Conforme revelam os voltamogramas da Figura 18, a extração realizada em dois dias e superfícies eletródicas diferentes produziram resultados bastante repetitivos, indicando, novamente, uma boa precisão do método, avaliado por meio do desvio padrão relativo (8,7%).

A porcentagem de extração obtida com o sistema e as condições experimentais otimizadas foi calculada empregando-se a Equação 1. Para este cálculo, a concentração de

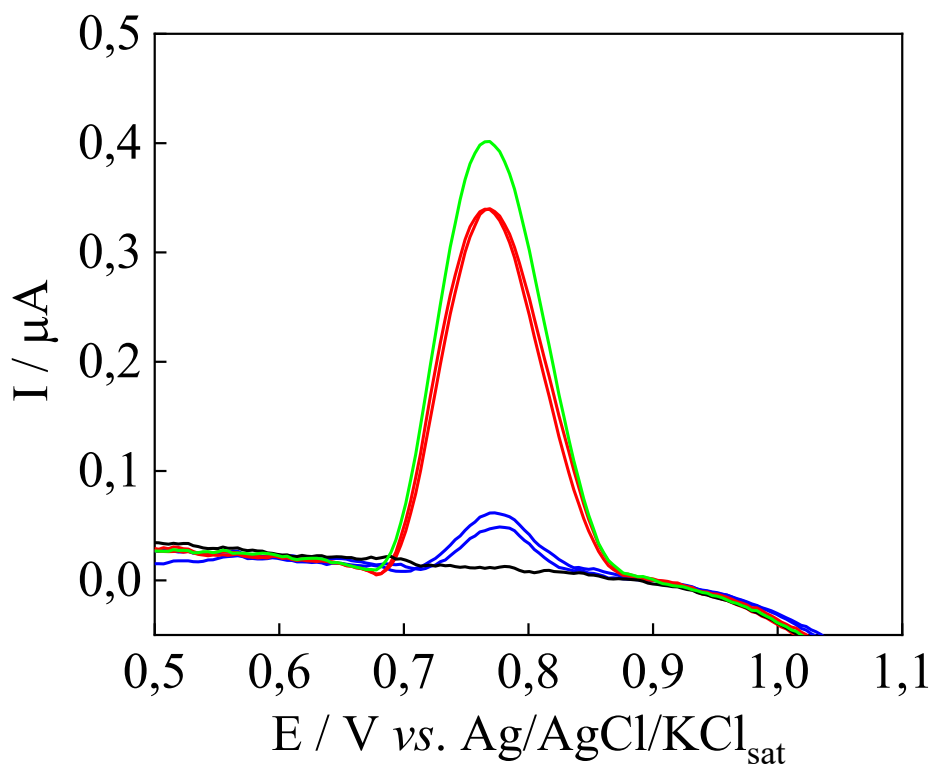
nitrito na célula miniaturizada foi calculada a partir das intensidades de corrente obtidos e da equação da reta obtida para a curva analítica apresentada na Figura 12.

$$\% \text{ Extração} = \frac{[NO_2^-]_{\text{célula eletroquímica}} \times V_{\text{célula eletroquímica}}}{[NO_2^-]_{\text{compartimento extrator}} \times V_{\text{compartimento extrator}}} \cdot 100 \quad 1$$

A porcentagem de extração relativamente baixa obtida (14%) pode ser explicada por algumas hipóteses como, uma conversão ineficiente do NO_2^- a $HNO_{2(g)}$ e assim, produzindo uma baixa quantidade de espécies volatilizadas. Além disso, pode ser que a extração necessite de um maior tempo já que este parâmetro ainda não foi otimizado, sendo empregados 10 minutos de extração durante todo o trabalho. Outra possibilidade também pode estar relacionada ao fato de que o volume de amostra (10 mL) utilizado não preencha a maior parte do interior do frasco, podendo fazer com que a espécie volatilizada se difunda por todo o compartimento vazio do frasco não ficando confinada apenas no material captador (poliéster) embora ele esteja situado bem próximo à solução da amostra. Além disso, alguns ajustes nestes parâmetros mencionados podem fazer com que resultados melhores sejam alcançados e estas hipóteses previstas sejam confirmadas ou contestadas. Sob outra perspectiva, em sistemas baseados no equilíbrio, baixas porcentagens de extração são comuns e estão dentro da normalidade para estes métodos (PINTO e PEDROSO, 2015). Este aspecto não é considerado uma desvantagem pois, uma vez que as medidas analíticas sejam repetitivas, apesar dos resultados indicarem uma porcentagem de extração baixa, este fato não será tão importante (PINTO e PEDROSO, 2015). Ademais, ficou comprovado que a combinação do sistema miniaturizado com a microextração por difusão de gás, promoveu uma melhora na detectabilidade do método, devido ao efeito de pré-concentração estabelecido ao empregar microvolumes (500 μ L) nas medidas voltamétricas. Assim, ainda que uma pequena quantidade de HNO_2 seja gerado e coletado no compartimento receptor, o pequeno volume de solução neste compartimento eleva drasticamente a concentração do analito melhorando a detectabilidade. Portanto, elevadas porcentagens de extração não são um pré-requisito para que o sistema miniaturizado forneça melhor detectabilidade.

Ainda assim, visando avaliar se seria possível aumentar a porcentagem de extração, diferentes soluções receptoras foram adicionadas ao poliéster. O intuito deste estudo foi avaliar se alguma das soluções estudadas seria mais eficiente para dissolver o HNO_2 desprendido da solução doadora. Foram avaliadas como soluções receptoras água ultrapura e NaOH 0,1 mol L⁻¹. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos.

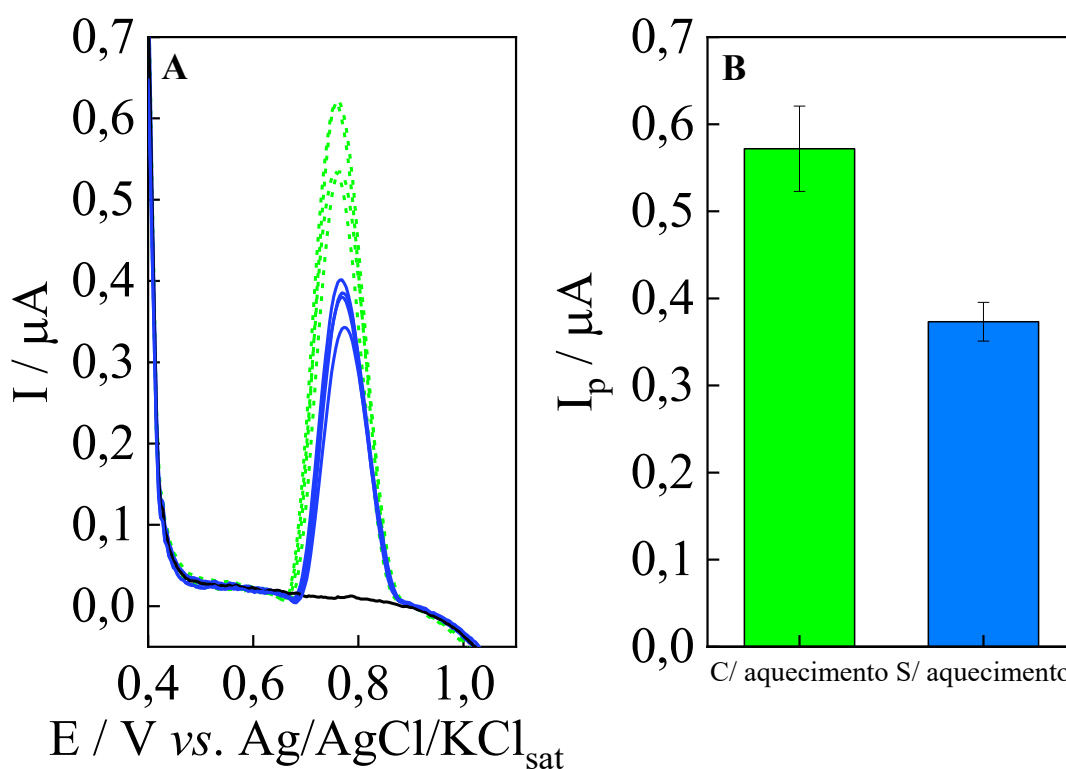
Figura 19 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após 10 minutos de extração empregando HCl 3 mol L^{-1} avaliando diferentes soluções no poliéster. (—) Branco (—) Água ultrapura (—) NaOH 0,1 mol L^{-1} (—) Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} .



Conforme apresentado na Figura 19, ao ser avaliado o emprego de diferentes soluções no poliéster, não foi observado uma melhora na intensidade do sinal tanto para a água quanto para a solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} quando comparados com o perfil voltamétrico obtido ao serem utilizados 50 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} comumente empregado. Desta forma, embora tenhamos presumido que o emprego de uma solução alcalina favoreceria a extração, este resultado não foi confirmado, não trazendo uma melhora nos resultados observados. Desta forma, a solução 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato continuou a ser usada como solução receptora.

Sabe-se que alguns parâmetros experimentais possuem influência em procedimentos de microextração por difusão gasosa, dentre eles, a temperatura é um dos fatores importantes e que deve ser controlado e otimizado, visto que o princípio de extração da técnica está baseado nos equilíbrios estabelecidos: 1) entre a amostra e “ar” e 2) entre o “ar” e a solução extratora e o aumento da temperatura, certamente forçaria o deslocamento do equilíbrio 1) favoravelmente à extração do analito. Deste modo, este parâmetro foi avaliado de forma a observar como seria o efeito da extração realizada na presença de um banho termostatzado a $\sim 40^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 – **A)** Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} comparando o sinal analítico obtido após a extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito realizada à temperatura ambiente ($\sim 30^\circ\text{C}$) e na presença de um banho termostatzado a aproximadamente 40°C . (—) Branco (—) Temperatura ambiente (---) 40°C . **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades de corrente e o desvio padrão. Condições voltamétricas: $f = 50\text{ Hz}$, $\Delta E = 50\text{ mV}$, $\Delta E_s = 4\text{ mV}$.

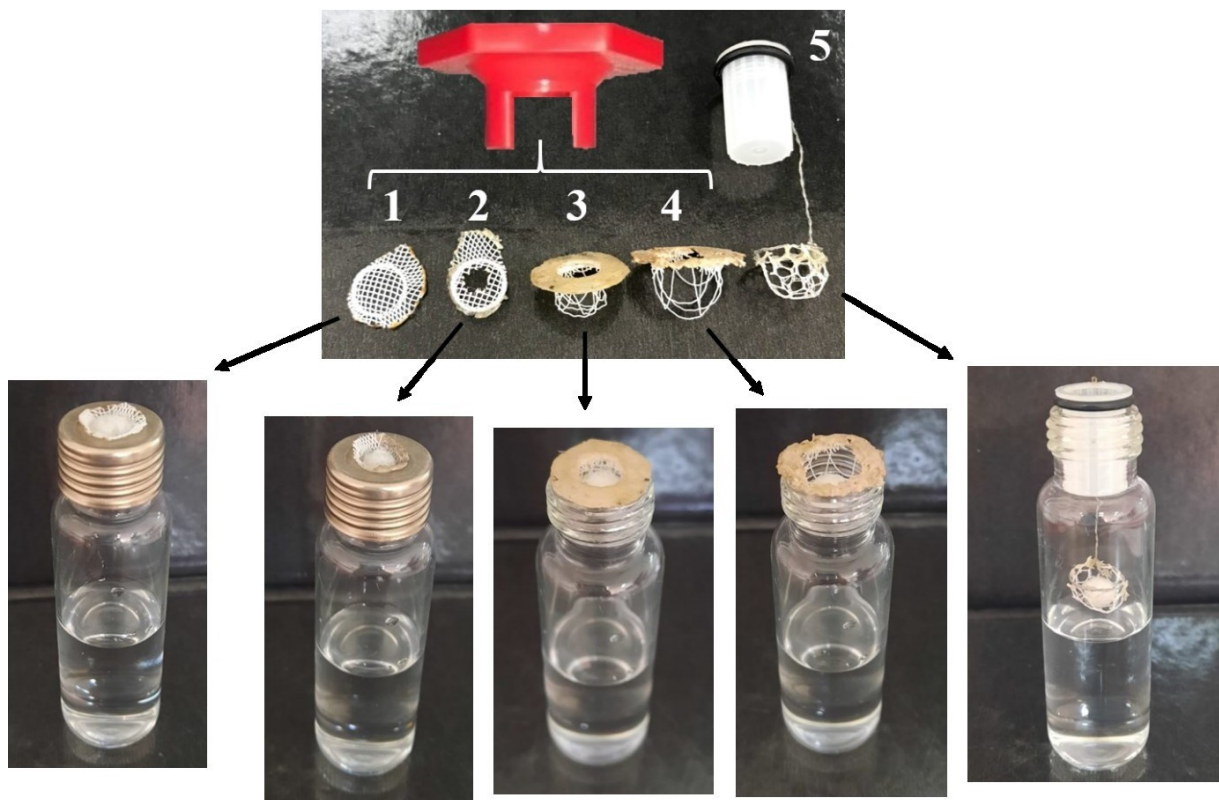


Como é possível observar por meio da Figura 20, é notório que a extração realizada a aproximadamente 40°C foi mais eficiente. No entanto, também pode ser observado que, a repetitividade das medidas foi comprometida, visto que o modelo do equipamento utilizado para promover o aquecimento não fornece um controle rigoroso da temperatura desejada, havendo pequenas variações durante a extração, fator este que pode explicar a variação das intensidades de corrente obtidas para as quatro replicatas realizadas. Assim, embora o ganho de intensidade de corrente contribua para a melhora na detectabilidade do método, a imprecisão observada durante as medidas comprometeu a confiabilidade dos resultados. Certamente, devido à importância deste parâmetro, caso haja disponibilidade de um equipamento com controle rigoroso da temperatura, recomenda-se que seja utilizado. Caso contrário, deve-se optar por realizar as medidas em temperatura ambiente, pois, nestas condições obtém-se melhor repetitividade. Neste caso, calibrações diárias são recomendadas para que variações na temperatura ambiente em dias diferentes não comprometam os resultados. Desta forma, a

temperatura ambiente ($\sim 30^\circ\text{C}$) foi selecionada por razões práticas, no entanto, em qualquer um dos casos, sempre que possível, o controle de temperatura é recomendado.

Na medida em que os experimentos eram realizados, foram observadas algumas limitações relacionadas à manipulação do sistema de extração como, por exemplo, a dificuldade em manter fixo o poliéster no “anzol”. De forma a facilitar a manipulação do sistema de extração e, além disso, melhorar as intensidades de corrente obtidas, foram confeccionados e avaliados novos *designs* para acomodar o poliéster no sistema de extração. A Figura 21 apresenta todas as configurações investigadas.

Figura 21 – Novos *designs* para o suporte do poliéster confeccionados.



Todos os *designs* foram pensados de forma que facilitasse a montagem/manipulação do sistema dentro do compartimento extrator, visando melhorar a configuração do “anzol” comumente empregada e representada na Figura 2. Deste modo, o design número *1* avaliado, consiste em uma espécie de “rede” constituída também de poliéster e que foi inserida na parte aberta da tampa do frasco. Esta configuração foi pensada de modo a facilitar a montagem do sistema, uma vez que necessitava apenas de adicionar o poliéster no interior da rede e, em seguida, rosquear a tampa no sistema de extração. Após alguns experimentos realizados, observou-se que nenhum sinal analítico era obtido. Constatou-se que, por se tratar de uma

espécie de tecido com uma “trama” muito fechada, a difusão do analito até o poliéster foi prejudicada e, desta forma, o próprio material atuou como uma “barreira” para o HNO_2 . Como uma tentativa para melhorar a acessibilidade do HNO_2 à solução receptora, foi realizada uma abertura na “rede” utilizada como suporte para o poliéster (sistema 2). No entanto, nenhuma melhora foi alcançada com este novo dispositivo. Desta forma, os *designs* 3 e 4 foram confeccionados no intuito de aumentar a área de contato do poliéster com o gás e, para isto, apenas algumas das tramas que compunham a rede foram mantidas somente para servir como o suporte para o material. A diferença entre o design 3 e 4, se dá na quantidade destas tramas que foram removidas e na altura em que o poliéster se situava dentro do compartimento, sendo que o *design* 4, possuía uma maior abertura para acesso do gás e estava localizado um pouco mais abaixo do que o design 3. No entanto, em nenhuma destas configurações foi detectado o sinal voltamétrico para o nitrito. Observando as configurações desenvolvidas até o presente momento, apesar de terem sido confeccionadas de formas diferentes, todas estão localizadas na tampa do compartimento extrator. Isso aumentou significativamente a distância entre o recipiente coletor e a superfície da solução doadora, prejudicando a transferência do HNO_2 para a solução receptora.

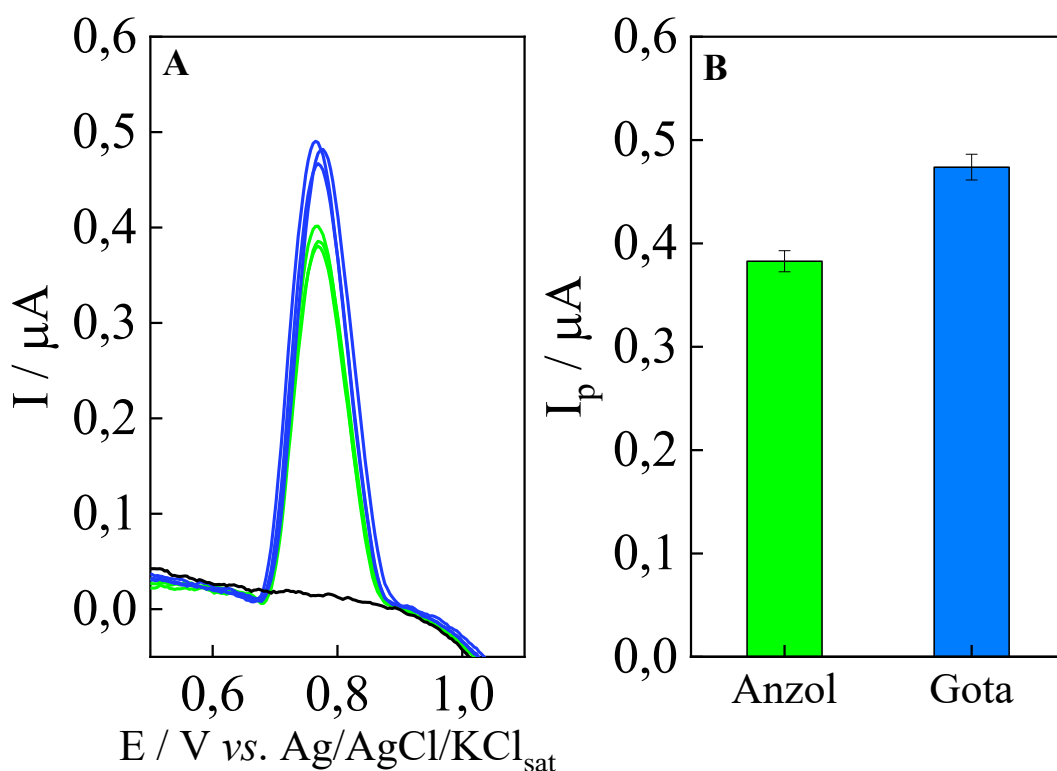
Desta forma, o último modelo avaliado (dispositivo 5) foi montado de modo que o poliéster contendo a solução receptora se situasse mais próximo à superfície da solução doadora. O sinal voltamétrico para o nitrito foi observado para este dispositivo, porém, a intensidade obtida foi inferior à obtida para o dispositivo original (Figura 2). Assim, aparentemente, mesmo com uma trama mais aberta, o suporte para o poliéster ainda funciona como uma barreira que limita o acesso do HNO_2 à solução receptora. Embora estes estudos não tenham permitido a fabricação de um sistema mais eficiente, eles mostraram a importância de que a solução receptora esteja completamente acessível aos gases desprendidos da solução doadora. Imaginou-se, portanto, que o próprio poliéster usado como suporte para solução receptora atuaria como uma barreira dificultando que o HNO_2 se dissolvesse nesta solução. Desta forma, foi avaliada uma configuração na qual uma gota da solução receptora ficasse suspensa sobre a solução doadora.

4.3 Microextração em gota única por headspace

Para que a gota da solução receptora fosse estabilizada sobre a solução doadora, o fio de aço (“anzol”) com o poliéster cedeu espaço a uma seringa comercial para administração de insulina. Esta seringa foi empregada como suporte para a gota da solução receptora

(0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato) sendo esta técnica denominada de microextração em gota única por headspace, que foi representada na Figura 3. Além de facilitar a montagem e o manuseio do sistema de extração, a utilização da seringa com a gota pendente da solução receptora promoveu também uma melhora na intensidade do sinal voltamétrico do nitrito (Figura 22).

Figura 22 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μ L de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ após a extração de 100 μ mol L⁻¹ de nitrito comparando as intensidades de corrente obtidas para sistema antigo (anzol + poliéster) e microextração por gota única. (—) Branco (—) Anzol + poliéster (—) Gota. Condições voltamétricas: $f = 50$ Hz, $\Delta E = 50$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades obtidas e o desvio padrão.



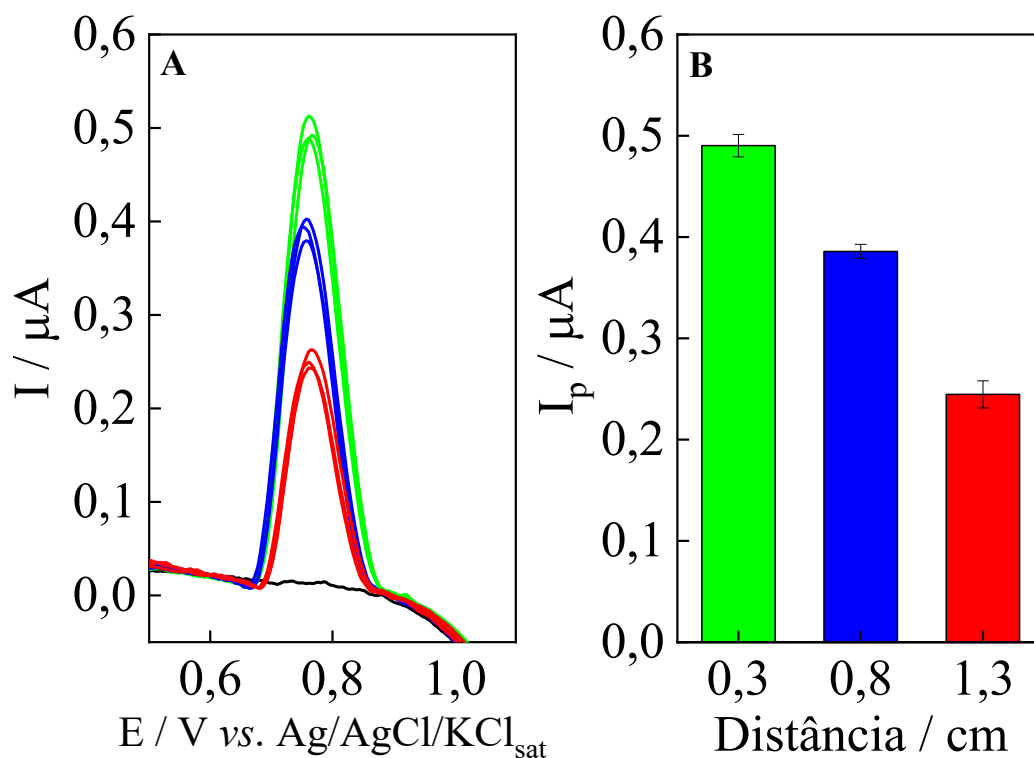
Por meio da Figura 22, fica evidente que o novo *design*, no qual a seringa é utilizada como suporte para a gota da solução receptora, forneceu um ligeiro aumento na intensidade de corrente quando comparado com o *design* baseado no poliéster. Além disso, a repetitividade não foi comprometida ao ser empregado esta nova configuração evidenciado pelo pequeno desvio padrão (RSD 2,5%) em comparação ao RSD obtido para o “anzol” de 2,7%. Neste contexto, além do ganho de intensidade de corrente de aproximadamente 20% para este novo *design*, esta estratégia facilitou a montagem e o manuseio do dispositivo. Desta forma, diante de todas as justificativas apresentadas, esta nova configuração foi adotada nos estudos posteriores.

Sabe-se que o volume da gota formada influencia diretamente na taxa de extração das espécies voláteis. Quanto maior o volume, maior será a taxa de extração, no entanto, a estabilidade da gota pode ser comprometida, uma vez que gotas maiores são mais difíceis de manipular, instáveis e tem mais facilidade de se desprenderem da extremidade da seringa (BORGES, *et al.*, 2015; TANG, *et al.*, 2018). Pensando nestes aspectos, após uma série de tentativas, gotas de 40 μL de solução receptora foram utilizadas, pois foram estáveis e forneceram sinais voltamétricos para nitrito bastante repetitivos, como será demonstrado nos estudos subsequentes.

Outra variável importante está relacionada à agitação da amostra, uma vez que um aumento na agitação promove também um aumento na movimentação das moléculas na solução aquosa, diminuindo a distância entre as fases (doadora e receptora) e favorecendo os processos de difusão e transferência de massa; todos estes aspectos combinados podem levar a uma redução do tempo necessário para se atingir o equilíbrio termodinâmico (SENRA-FERREIRO, *et al.*, 2010; SHARIATI-FEIZABADI, *et al.*, 2003). No entanto, assim como o volume da gota discutido anteriormente, uma agitação excessiva também pode levar à instabilidade e, levando em conta estes fatores abordados, foi empregada a agitação máxima do próprio agitador magnético, a qual garantiu um melhor desempenho na extração sem causar o destacamento da gota do suporte. Portanto, esta variável não foi submetida a um estudo de otimização.

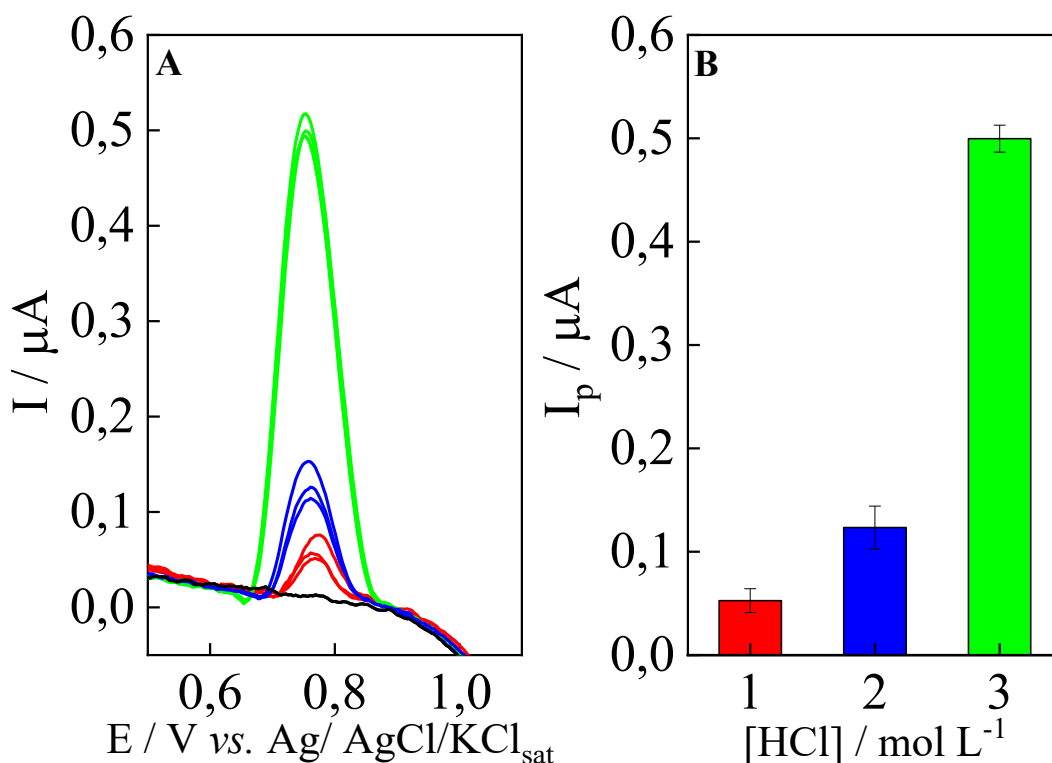
Na sequência das otimizações, foi realizado um estudo avaliando a distância entre a gota formada e a superfície da solução doadora. Para isto, foram utilizadas as distâncias de 0,3, 0,8 e 1,3 cm. Os resultados obtidos podem ser observados por meio da Figura 23.

Figura 23 – A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após a extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito avaliando diferentes distâncias entre a gota formada e a amostra acidificada. (—) Branco (—) 0,3 (—) 0,8 (—) 1,3 cm. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Gráfico de barras comparando as intensidades obtidas e o desvio padrão.



A Figura 23 revela uma diminuição da intensidade do sinal analítico à medida que a distância entre a gota formada e a superfície da solução doadora aumenta. Com base nestes e nos resultados obtidos anteriormente (avaliação dos outros designs), fica ainda mais evidente que uma maneira de favorecer a pré-concentração é justamente reduzir a distância que as moléculas do analito volatilizado devem percorrer até a solução receptora. Novamente, a concentração do HCl foi avaliada, visando verificar se uma menor concentração do ácido poderia ser empregada nesta nova configuração. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 24.

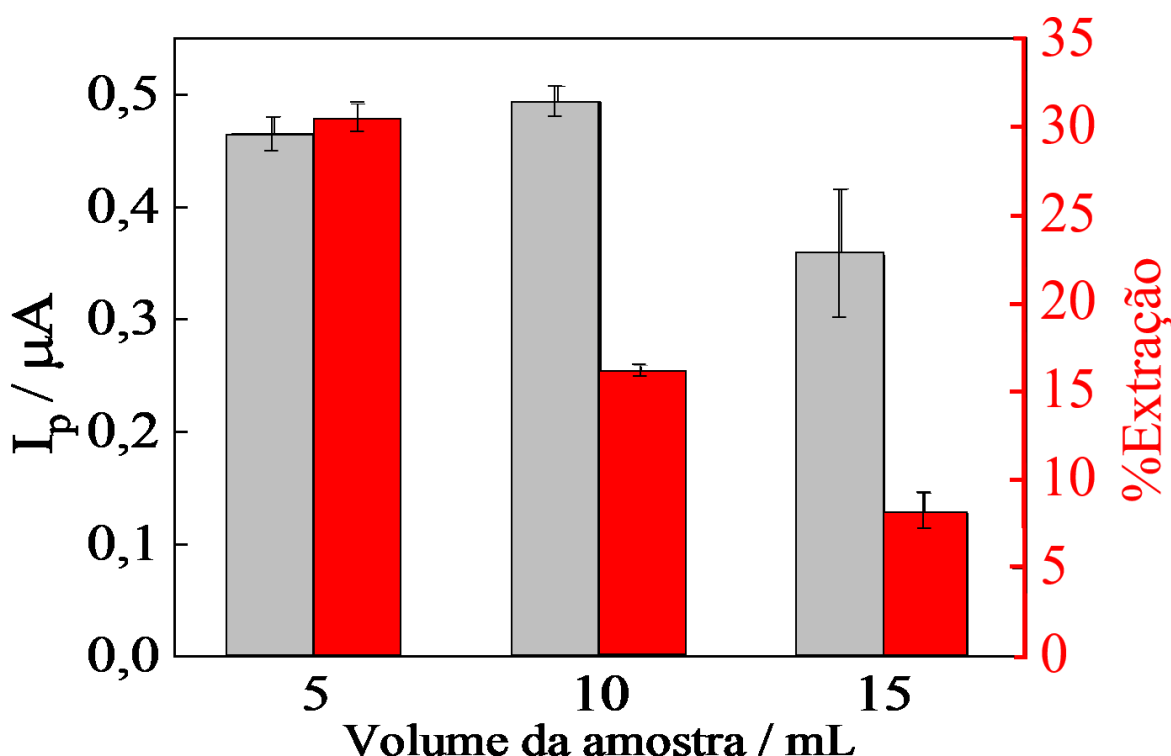
Figura 24 – A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em 500 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} após a extração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito avaliando diferentes concentrações de HCl. (—) Branco (—) 1 (—) 2 (—) 3 mol L^{-1} . Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. B) Gráfico de barras comparando as intensidades obtidas e o desvio padrão para $N = 3$.



A Figura 24 demonstra que não é possível diminuir a concentração da solução de HCl adicionada à solução doadora. Desta forma, uma solução 3 mol L^{-1} de HCl continuou a ser empregada para acidificar a solução doadora.

O volume da amostra também é uma variável importante e que deve ser investigada com cautela. Um aumento no volume da amostra diminuiria o volume do *headspace*, diminuindo, desta forma, a espaço para as moléculas do analito nesta fase, favorecendo o seu aprisionamento na gota da solução receptora e, consequentemente, aumentando a quantidade de analito extraída, melhorando a detectabilidade (JEANNOT, *et al.*, 2010; SHARIATI-FEIZABADI, *et al.*, 2003). Deste modo, o efeito deste parâmetro foi avaliado em três condições diferentes, 5, 10 e 15 mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Gráfico de barras ilustrando o efeito na intensidade de corrente e na porcentagem de extração (%Extração) ao serem utilizados diferentes volumes de amostra acidificada. Condições experimentais – Solução doadora: solução acidificada (3 mol L^{-1} de HCl) contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito; tempo de extração de 10 min. Solução receptora: 500 μL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Barras de erro indicam o desvio padrão de I_p para $N = 3$. (■) I_p (■) %Extração.

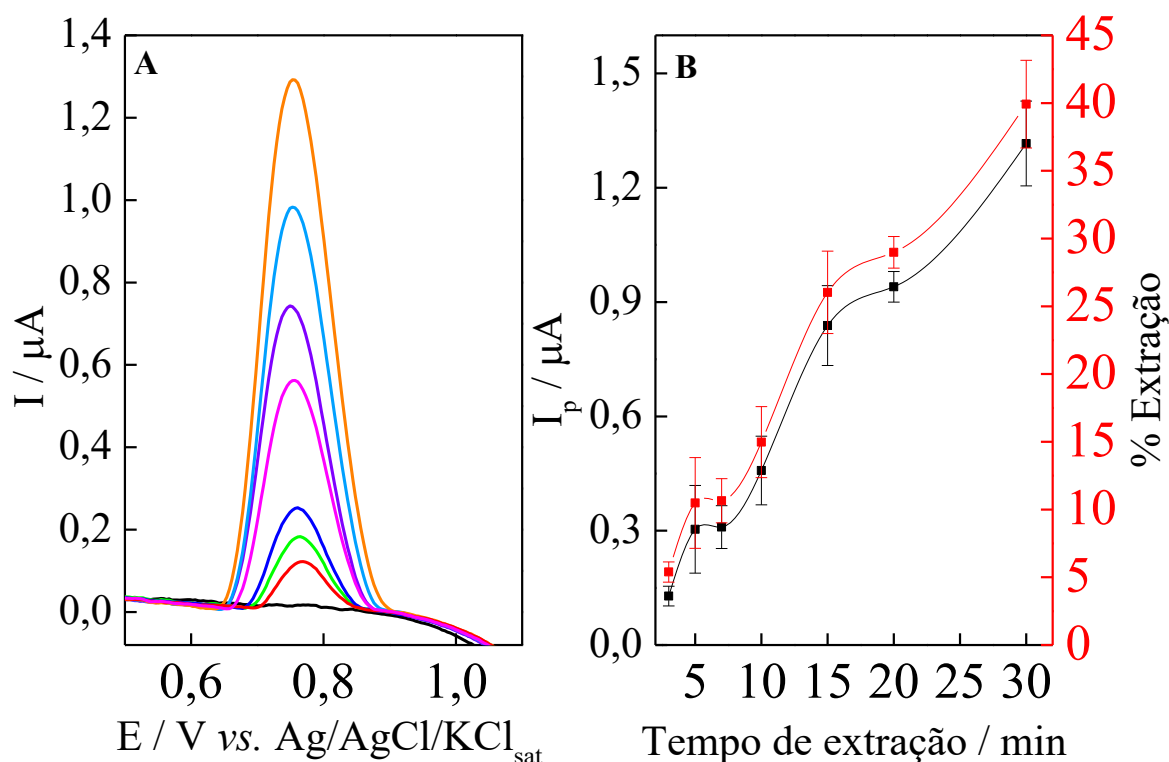


Como pode ser observado na Figura 25, as intensidades de correntes obtidas para as análises realizadas em 5 e 10 mL de amostra foram muito próximas. Este resultado está relacionado ao fato de que devido ao alto coeficiente de partição do analito, ou seja, muito solúvel na fase aquosa, uma fração significativa ainda permanecerá na matriz aquosa e, somente uma pequena quantidade do analito será extraída da amostra. Desta forma, o aumento do volume da fase aquosa não tem um efeito pronunciado na extração (BORGES, *et al.*, 2015), justificando a resposta das intensidades de corrente terem sido próximas. No entanto, um aumento no volume para 15 mL diminuiu ligeiramente a intensidade de corrente observada, resultado contrário ao previsto na literatura. Este resultado pode ser explicado em razão da agitação a uma taxa fixa em um volume consideravelmente maior, produzir uma convecção não tão eficiente e, por consequência, uma menor difusão das moléculas para o headspace, sendo observada uma menor intensidade de corrente. Deste modo, por meio dos resultados obtidos e da discussão apresentada, optou-se por permanecer com os 10 mL de amostra já utilizados.

O tempo de extração é um parâmetro chave nesta modalidade de extração, pois o processo de transferência de massa é relativamente complexo e envolve três fases: amostra aquosa (fase doadora), headspace e fase receptora. Assim, a seleção do melhor tempo de extração requer um estudo minucioso e o tempo ideal para as análises deve ser o menor entre todos estudados que garantam medidas repetitivas (BORGES, *et al.*, 2015), uma alta intensidade de corrente e que não comprometa a frequência analítica.

Para o estudo do tempo de extração, as medidas foram realizadas nas mesmas condições experimentais variando-se apenas o tempo de extração. Além disso, para acelerar os experimentos, foram empregados dois sistemas de extração concomitantes (Figura 3) montados separadamente. Para avaliar a precisão, as extrações foram realizadas em triplicata sendo empregadas 3 superfícies eletródicas diferentes. A Figura 26 apresenta os resultados obtidos, sendo avaliados os tempos de 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 30 minutos.

Figura 26 – A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ avaliando diferentes tempos de extração. (—) Branco (—) 3 (—) 5 (—) 7 (—) 10 (—) 15 (—) 20 (—) 30 min. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Curva de extração para nitrito. Condições experimentais – Solução doadora: 10 mL de amostra acidificada (3 mol L^{-1} de HCl) contendo $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito. Solução receptora: $500 \text{ } \mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. **B)** Curva de I_p e %Extração em função do tempo.



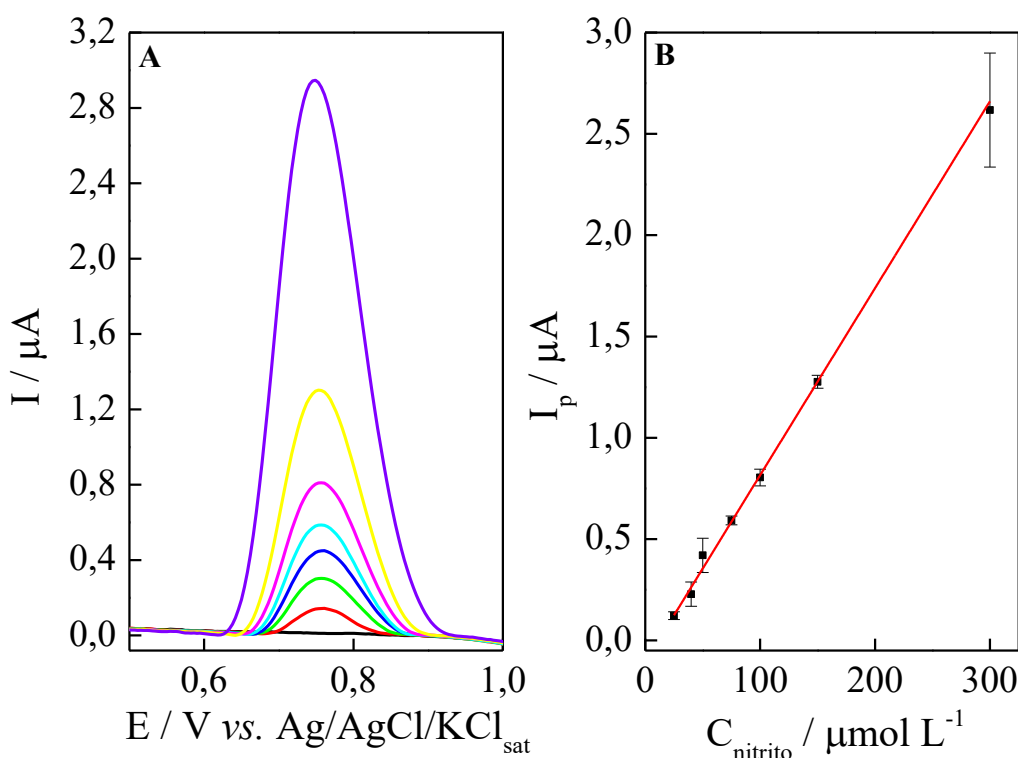
Como pode ser verificado por meio da Figura 26, nos tempos iniciais podem ser observadas baixas intensidades de corrente, indicando que uma pequena quantidade de HNO_2 conseguiu atingir a solução receptora. Comparando as intensidades de corrente para 10 e 15 minutos, há um ganho bastante significativo de intensidade e, além disso, os desvios padrões são próximos. A extração mantém-se praticamente constante de 15 para 20 minutos e, novamente, há um aumento bastante intenso em 30 minutos, no entanto, a frequência analítica pode ser prejudicada, sendo esta a razão pela qual tempos superiores não foram estudados.

Ainda observando os resultados apresentados na Figura 26, parece que nesta extração em particular, provavelmente haveria a necessidade de tempos maiores para atingir o equilíbrio, no entanto, neste caso, a extração pode ser realizada em condições de não equilíbrio desde que o tempo de extração seja cuidadosamente controlado (BORGES, *et al.*, 2015). Desde que as análises ocorram em um sistema bastante repetitivo, uma boa precisão pode ser alcançada mesmo não atingindo o equilíbrio do analito nos estados existentes. Desta forma, levando em

consideração todos estes fatores, o tempo de 15 minutos foi escolhido. Este tempo de extração combina uma precisão satisfatória e aceitável com um ganho em intensidade de corrente significativo comparado com a intensidade de corrente obtida para 10 minutos de extração

Desta forma, realizadas todas as otimizações necessárias para aprimorar o sistema de extração, o próximo estudo consistiu em avaliar o desempenho do dispositivo eletroquímico miniaturizado combinado à microextração em gota única por headspace por meio da construção de uma curva analítica na presença de diferentes concentrações de nitrito. As condições experimentais otimizadas foram: 10 mL de amostra acidificada (3 mol L^{-1} de HCl), tempo de extração de 15 minutos, distância da gota formada até a amostra de 0,3 cm e 500 μL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida registrados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após 15 minutos de extração para diferentes concentrações de nitrito. (—) Branco (—) 25 (—) 40 (—) 50 (—) 75 (—) 100 (—) 150 (—) 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições voltamétricas: $f = 50 \text{ Hz}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$. **B)** Curva analítica para nitrito. Barras de erro indicam o desvio padrão para I_p para 3 superfícies eletródicas diferentes.



Pode-se observar, por meio da Figura 27, que houve um aumento proporcional da intensidade de corrente com o aumento da concentração de nitrito no intervalo de 25 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Um intervalo de concentração maior foi avaliado (25 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$), no

entanto, foi observado que a linearidade ficou comprometida. Uma suposição é a de que maiores concentrações podem fazer parte de outro intervalo linear. Por isso, a faixa de trabalho, neste caso, foi limitada de 25 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A curva analítica apresentou uma relação linear de acordo com a equação da reta: $I_p (\mu\text{A}) = -0,10670 + 0,00923 \cdot C_{\text{nitrito}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, $R^2 = 0,9988$. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de maneira semelhante ao estudo anteriormente realizado, levando em consideração o desvio padrão do intercepto (sd_b) e o coeficiente angular da curva analítica, sendo obtido os valores de 3,4 e 11,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. É válido ressaltar que as curvas analíticas foram construídas em dias diferentes e, portanto, superfícies eletródicas diferentes, evidenciando uma boa precisão do método ao combinar o dispositivo miniaturizado à uma etapa de microextração. A vantagem desta associação pode ser mais bem verificada na Tabela 3 ao serem comparados os parâmetros analíticos obtidos ao ser construída a curva analítica com e sem a combinação com a etapa de extração e pré-concentração.

Tabela 3 – Parâmetros analíticos obtidos ao ser construída a curva analítica com e sem a etapa de extração e pré-concentração.

Metodologia	Intervalo linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LD e LQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidade / $\mu\text{A } \mu\text{mol L}^{-1}$	R^2
Dispositivo eletroquímico	50 – 1100	5,7 e 19,0	0,00172	0,9985
Dispositivo eletroquímico combinado com a etapa de extração	25 – 300	3,4 e 11,3	0,00923	0,9988

Por meio da Tabela 3, ao serem comparados os parâmetros analíticos observa-se que menores valores de LD e LQ foram obtidos e, além disso, a sensibilidade foi significativamente melhorada, com um aumento de aproximadamente 81%. De posse dos resultados, fica evidente que o ganho em sensibilidade e detectabilidade está relacionado à pré-concentração obtida por meio da diminuição do volume da solução doadora (amostra) para a receptora (eletrólito de suporte), indicando que a combinação do dispositivo eletroquímico miniaturizado à uma etapa de microextração é vantajosa para o método.

4.3.1 Aplicabilidade do método para amostras de salsicha e água

Após toda a otimização do método proposto, a aplicabilidade para a quantificação de nitrito em amostras reais foi avaliada. Como foi dito inicialmente, o emprego do nitrito em amostras de alimentos processados é bastante comum, sendo responsáveis principalmente pela conservação destes alimentos. Desta forma, foram avaliadas amostras de salsicha tipo hot-dog, a qual continha no rótulo a informação sobre a presença de nitrito como conservante. Para o procedimento inicialmente empregado **1** não foi possível observar nenhum sinal voltamétrico relativo à oxidação do nitrito. Desta forma, outros procedimentos para o preparo da amostra foram avaliados (Tabela 4).

Tabela 4 – Procedimentos experimentais avaliados para determinação de nitrito em amostras de salsicha tipo *hot-dog*.

Metodologia	Procedimentos experimentais realizados
1	30 g de pequenos pedaços + 70 mL de água aquecida a 50 °C mantida em agitação durante 20 minutos
2	30 g de salsicha triturada em um mixer + 70 mL de água aquecida a 50 °C mantida em agitação durante 20 minutos
3	10 g de pedaços pequenos + 70 mL de água na presença de um banho termostatizado a 50 °C mantida em agitação durante 20 minutos
4	10 g de salsicha triturada em um mixer + 70 mL de água na presença de um banho termostatizado a 50 °C mantida em agitação durante 20 minutos
5	30 g de salsicha triturada em um mixer + 70 mL de água na presença de um banho termostatizado a 70 °C mantida em agitação durante 20 minutos

Como mostra a Tabela 4, a diferença do pré-tratamento empregado da metodologia **1** para a **2** está no emprego de um mixer para triturar a amostra de salsicha como uma forma de aumentar a área de contato a qual foi, posteriormente, submetida à agitação com a água aquecida. Em ambos os casos, foi observado que a solução apresentava um aspecto turvo e bastante gorduroso devido à presença de outros componentes. Alíquotas foram submetidas à metodologia desenvolvida e embora a utilização do mixer tenha aumentado a área de contato, ainda assim não foi possível observar a presença de um sinal voltamétrico para nitrito. Outra possibilidade pode ter relação com a presença dos outros compostos, os quais poderiam mascarar o nitrito, não sendo possível identificá-lo. Pensando nisto, as metodologias **3** e **4**

consistiram em tentar reduzir a interferências dos outros componentes diminuindo a quantidade de amostra (em pedaços e/ou triturada) submetida ao pré-tratamento e, além disso, manter a mistura em contato com um banho termostatizado ao invés de somente manter contato com a água aquecida. Por fim, na metodologia 5, foi utilizada a quantidade de amostra inicialmente proposta (30 g), triturada, aumentando a temperatura do banho termostatizado para 70 °C. No entanto, para todos os procedimentos avaliados não foi possível identificar o sinal voltamétrico para nitrito. Estudos de adição e recuperação também foram realizados, porém, mesmo as amostras enriquecidas com nitrito não forneceram qualquer sinal voltamétrico relativo a este ânion, indicando que o método proposto não é aplicável para estas amostras utilizando os pré-tratamentos descritos na Tabela 4. Talvez, o uso de solventes orgânicos como éter de petróleo para a remoção de gordura previamente ao aquecimento das amostras em água pudesse ser uma alternativa para viabilizar as análises.

Outras amostras mais simples foram empregadas para avaliar a aplicabilidade do método proposto; foram estudadas então, diferentes amostras de água, de torneira, mineral e de aquário. A acidificação das amostras foi feita previamente às análises. Em todas as amostras avaliadas, não foi observado o sinal voltamétrico referente à oxidação do nitrito, indicando que, nestes casos, ou a espécie em questão está ausente na amostra ou está presente em concentrações abaixo da detectável pelo método proposto. Desta forma, para avaliar a exatidão do método, foram realizados estudos de adição e recuperação em 4 níveis de concentração de nitrito, 30, 60, 90 e 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para o cálculo das concentrações de nitrito encontradas, foi utilizada a equação da reta da curva analítica apresentada na Figura 27. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados do estudo de adição e recuperação de nitrito para diferentes amostras de água.

Amostra	Adicionado / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Encontrado* / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação**	$t_{\text{calculado}}$
Água de torneira	30	$31,2 \pm 1,6$	104 ± 4	1,30
	60	$57,5 \pm 2,2$	96 ± 4	1,96
	90	$85,8 \pm 2,9$	95 ± 3	2,51
	120	$126,0 \pm 3,2$	105 ± 4	3,25
Água mineral	30	$29,5 \pm 2,3$	98 ± 8	0,37
	60	$56,2 \pm 3,6$	94 ± 6	1,83
	90	$90,6 \pm 1,8$	101 ± 2	0,58
	120	$117,5 \pm 2,3$	98 ± 3	1,88
Água de aquário	30	$28,6 \pm 1,3$	95 ± 4	1,86
	60	$60,4 \pm 2,5$	101 ± 4	0,28
	90	$89,6 \pm 1,8$	99 ± 2	0,38
	120	$124,7 \pm 4,4$	104 ± 4	1,85

* Valores expressos como média $\pm$ SD

** Recuperação = $(C_{\text{nitrito encontrada}} / C_{\text{nitrito adicionada}}) \times 100\%$

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5, as porcentagens de recuperação foram próximas a 100%, variando de 94 a 105% e, além disso, apresentaram baixos valores de desvio padrão. Estes resultados evidenciam que o método é capaz de fornecer tanto uma exatidão quanto precisão satisfatórios para a determinação de nitrito em amostras de água enriquecidas nos níveis de concentração e nas amostras avaliadas. Além disso, é evidente que estes resultados obtidos indicam que não há efeito de matriz que interfira significativamente na determinação de nitrito nas amostras avaliadas. Ademais, os valores de $t_{\text{calculado}}$ para todos os níveis de enriquecimento foram menores do que o t_{tabelado} (4,30 – 95%) (SKOOG, *et al.*, 2006, p. 136), indicando que não há evidência de diferença estatística entre a quantidade adicionada e a encontrada. Portanto, este conjunto de resultados sugere que o método proposto possa ser aplicado com êxito para a quantificação de nitrito em amostras de água.

5 CONCLUSÕES

A miniaturização e o desenvolvimento de metodologias de preparo de amostra mais ambientalmente amigáveis tem sido umas das grandes apostas da química analítica. Neste contexto, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de um método eletroanalítico para determinação de nitrito empregando um dispositivo miniaturizado, confeccionado a partir de materiais alternativos, ponteiros de micropipeta e fios metálicos reutilizados e, portanto, de baixo custo, o qual foi combinado com uma etapa de preparo de amostra em que o mecanismo de extração se dá por meio da difusão gasosa. Os estudos eletroquímicos indicaram que a miniaturização não afetou a resposta voltamétrica do nitrito, apresentando um perfil bastante similar se comparado aos sistemas de três eletrodos convencionais. Além disso, a grande vantagem em relação aos outros métodos de determinação de nitrito relatados na literatura está na capacidade de realizar as análises em microvolumes sem que haja perda do desempenho analítico do dispositivo, apresentando limites de detecção e intervalos lineares próximos aos obtidos para outros sistemas sem a necessidade da modificação da superfície do eletrodo.

Como dito, a estratégia inicial do trabalho foi combinar o dispositivo miniaturizado com as vantagens de uma técnica de extração também miniaturizada. Os resultados obtidos confirmaram que esta combinação resultou em uma melhora no desempenho analítico do dispositivo miniaturizado, diminuindo o limite de detecção e aumentando a sensibilidade. Estes efeitos foram observados devido à pré-concentração alcançada ao diminuir o volume da amostra para o volume da solução de análise (500 μ L). Ademais, diferentemente da técnica original, não foi necessária a utilização de um solvente orgânico como solução extratora e, além disso, por ser empregado um dispositivo miniaturizado para detecção, acarretou a diminuição da quantidade de reagentes e resíduos gerados. Por fim, a aplicabilidade do método desenvolvido foi avaliada para a quantificação de nitrito em amostras reais de água. O enriquecimento foi realizado em quatro níveis de concentração e para todas as análises, realizadas em triplicata, as porcentagens de recuperação foram próximas a 100%, sugerindo que o método proposto apresenta uma exatidão satisfatória.

Portanto, conforme os resultados apresentados, a combinação proposta é bastante promissora para ser aplicada na determinação de nitrito, como também abre perspectivas para a determinação de outras espécies voláteis garantindo seletividade e detectabilidade. Outras estratégias também podem ser avaliadas como, alterações no sistema de extração para que seja possível a integração com o dispositivo miniaturizado, permitindo que as análises sejam

realizadas *in situ*. Por fim, a possibilidade do emprego de outras técnicas de detecção expande ainda mais o panorama de aplicações deste sistema.

REFERÊNCIAS

- ANNALAKSHMI, M.; BALASUBRAMANIAN, P.; CHEN, S.; CHEN, T. Amperometric sensing of nitrite at nanomolar concentrations by using carboxylated multiwalled carbon nanotubes modified with titanium nitride nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 186, p. 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3136-4>
- ARAÚJO, D. A. G.; OLIVEIRA, A. C. M.; PRADELA-FILHO, L. A.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; A novel miniaturized electroanalytical device integrated with gas extraction for the voltammetric determination of sulfite in beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 1185, p. 339067, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339067>
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BARRAGAN, J. T. C.; KUBOTA, L. T. Minipotentiostat controlled by smartphone on a micropipette: a versatile, portable, agile and accurate tool for electroanalysis. **Electrochimica Acta**, v. 341, p. 136048, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136048>
- BORGES, K. B.; de FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C.; **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2015.
- CHEN, D.; JIANG, J.; DU, X. Electrocatalytic oxidation of nitrite using metal-free nitrogen-doped reduced graphene oxide nanosheets for sensitive detection. **Talanta**, v. 155, p. 329-335, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.003>
- CINTI, S.; MAZZARACCHIO, V.; ÖZTÜRK, G.; MOSCONE, D.; ARDUINI, F. A lab-on-a-chip approach to make electroanalysis user-friendly and decentralized: detection of copper ions in river water. **Analytica Chimica Acta**, v. 1029, p. 1-7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.065>
- DAI, J.; DENG, D.; YUAN, Y.; ZHANG J.; DENG, F.; HE, S. Amperometric nitrite sensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and poly(toluidine blue). **Microchimica Acta**, v. 183, p. 1153-1561, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1773-z>
- FERNANDES, K. H. A. A.; SANTOS, J. P. T. S.; COLLE, V. D.; SOUZA-GARCIA, J.; ANGELUCCI, C. A.; Considerações técnicas quanto ao uso da voltametria de varredura escalonada em processos adsorptivos. **Química Nova**, 38, 431-435, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140317>
- FONSECA, W. T.; CASTRO, K. R.; de OLIVEIRA, T. R.; FARIA, R. C.; Disposable and flexible electrochemical paper-based analytical devices using low-cost conductive ink. **Electroanalysis**, v.33, p. 1520-1527, 2021. <https://doi.org/10.1002/elan.202060564>
- GONZÁLEZ-LÓPEZ, A.; COSTA-RAMA, E.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; Electrochemical micropipette-tip for low-cost environmental applications: determination of anionic surfactants through their interaction with methylene blue. **Talanta**, v. 224, p. 121732, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121732>

JEMMELI, D.; MARCOCCIO, E.; MOSCONE, D.; DRIDI, C.; ARDUINI, F.; Highly sensitive paper-based electrochemical sensor for reagent free detection of bisphenol A. **Talanta**, v. 216, p. 120924, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120924>

HALDORAI, Y.; KIM, J. Y.; VILIAN, A. T. E.; HEO, N. S.; HUH, Y. S.; HAN, Y. An enzyme-free electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/Co₃O₄ nanospindle composite for sensitive detection of nitrite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 227, p. 92-99, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.032>

HUGHES, G.; PEMBERTON, R. M.; NICHOLAS, P.; HART, J. P. Fabrication of miniaturised screen-printed glucose biosensors, using a water-based ink, and the evaluation of their electrochemical behaviour. **Electroanalysis**, v. 30, p. 1616-1620, 2018. <https://doi.org/10.1002/elan.201800104>

JAIN, A.; VERMA, K. K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, p. 37-65, 2011. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aca.2011.08.022>

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 235-239, 1996. <https://doi.org/10.1021/ac960042z>

JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. Single drop microextraction – Development, applications and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2326-2336, 2010. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.chroma.2009.10.089>

KAILASA, S. K.; KODURU, J. R.; PARK, T. J.; SINGHAL, R. K.; WU, H. Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 29, p. 00113, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00113>

LIN, A.; WEN, Y.; CHANG, L.; LU, B.; LI, Y.; JIAO, Y.; YANG, H. Layer-by-layer construction of multi-walled carbon nanotubes, zinc oxide, and gold nanoparticles integrated composite electrode for nitrite detection. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 1030-1036, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.10.058>

LIU, H.; DASGUPTA, P. K. Liquid Droplet. A renewable gas sampling. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 2042-2049, 1995. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1021/ac00109a023>

LIU, H.; DASGUPTA, P. K. Analytical chemistry in a drop. Solvent microextraction in a drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1817-1821, 1996. <https://doi.org/10.1021/ac960145h>

MANIKANDAN, V. S.; DURAIRAJ, S.; BOATENG, E.; SIDHUREDDY, B.; CHEN, A. Electrochemical detection of nitrite based on Co₃O₄-Au nanocomposites for food quality control. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 168, p. 107505, 2021. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac2c14>

MARTINS, A. B.; LOBATO, A.; TASIĆ, N.; PEREZ-SANZ, F. J.; VIDINHA, P.; PAIXÃO, T. R. L. C.; GONÇALVES, L. M.; Laser-pyrolyzed electrochemical paper-based analytical

sensor for sulfite analysis. **Electrochemistry Communications**, v. 107, p. 106541, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.106541>

MATERON, E. M.; WONG, W.; GOMES, L. M.; IBÁÑEZ-REDÍN, G.; JOSHI, N.; OLIVEIRA Jr, O. N.; FARIA, R. C. Combining 3D printing and screen-printing in miniaturized, disposable sensors with carbon paste electrodes. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 9, p. 5633-5642, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1TC01557E>

MAXIMIANO, E. M.; GONÇALVES, D. A.; MARTINS, C. A.; AGNES, L.; GOMES, R. S.; TRINDADE, M. A. G.; Simultaneous separation and electroanalysis in a single polydimethylsiloxane-based platform. **Talanta**, v. 233, p. 122514, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122514>

MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G.; Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 5, p. 785-803, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00323-X)

MORA-GRANADOS, M.; CREVILLEN, A. G.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D.; GALLEGOPICÓ, A. Disposable electrochemical sensor combined with molecular imprinted solid-phase extraction for catabolites detection of flavan-3-ol in urine samples. **Talanta**, v. 235, p. 122734, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122734>

NITHYAYINI, K. N.; HARISH, M. N. K.; NAGASHREE, K. L.; Electrochemical detection of nitrite at NiFe₂O₄ nanoparticles synthesised by solvent deficient method. **Electrochimica Acta**, v. 317, p. 701-710, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.06.026>

OLIVEIRA, A. C. M.; ARAÚJO, D. A. G.; PRADELA-FILHO, L. A.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; A robust and versatile micropipette tip based miniaturized electrochemical cell for determination of carbendazim. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 327, p. 128880-9, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128880>

PACHECO, J. G.; VALENTE, I. M.; GOLNÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Gas-diffusion microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 3207-3212, 2010. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000351>

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 516-537, 2013. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>

PATRI, S. B.; ADARAKATTI, P. S.; MALINGAPPA, P. Silver nanoparticles-chitosan composite embedded graphite screen-printed electrode as a novel electrochemical platform in the measurement of trace level nitrite: application to milk powder samples. **Current Analytical Chemistry**, v. 15, p. 56-65, 2019. <https://doi.org/10.2174/1573411014666180703142146>

PENA-PEREIRA, F.; MATESANZ, Ó.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. A paper-based gas sensor for simultaneous noninstrumental colorimetric detection of nitrite and sulfide in Waters. **Journal of Separation Science**, v. 43, p. 1908-1914, 2020. <https://doi.org/10.1002/jssc.201901339>

PHANSI, P.; SUMANTAKUL, S.; WONGPAKDEE, T.; FUKANA, N.; RATANAWIMARNWONG, N.; SITANURAK, J.; NACAPRICHA, D. Membraneless gas-separation microfluidic paper-based analytical devices for direct quantification of volatile and nonvolatile compounds. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 8749-8756, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02103>

PINTO, I. P.; PEDROSO, M. P. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 183-198, 2015.

<http://dx.doi.org/10.4322/sc.2016.003>

PRADELA-FILHO, L. A.; ARAÚJO D. A. G.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L. Nail polish and carbon powder: an attractive mixture to prepare paper-based electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 258, p. 786-792, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.11.127>

PRADELA-FILHO, L. A.; NOVIANA, E. ARAÚJO, D. A. G.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; HENRY, C. S. Rapid Analysis in continuous-flow electrochemical paper-based analytical devices. **ACS Sensors**, v. 5, p. 274-281, 2020.

<https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02298>

PRADELA-FILHO, L.A.; OLIVEIRA, B. C.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; A Prussian blue-carbon paste electrode for selective cathodic amperometric determination of nitrite using a flow-injection analysis system with carrier recycling. **Electrochimica Acta**, v. 180, p. 939-946, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.09.030>

PRASERTYING, P.; NINLAPATH, T.; JANTAWONG, N.; WONGPAKDEE, T.; SONSA-ARD, T.; URAISIN, K.; SAETEAR, P. W.; NACAPRICHA, D. Disposable microchamber with a microfluidic paper-based lid for Generation and membrane separation of SO₂ gas employing na in situ electrochemical gas sensor for quantifying sulfite in wine. **Analytical Chemistry**, v. 94, p. 7892-7900, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00496>

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G.; Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, p. 1114-1120, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500037>

ROSA, T. M.; ROVEDA, A. C.; GODINHO, W. P. S.; MARTINS, C. A.; OLIVEIRA, P. R.; TRINDADE, M. A. G.; Electrochemical cell designed for *in situ* integrate microextraction and electroanalysis: trace-level determination of norfloxacin in aqueous samples. **Talanta**, v. 196, p. 39-46, 2019.

<https://doi.org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.talanta.2018.12.028>

SANTOS, W. J. R.; LIMA, R. P.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N.; KUBOTA, L. T. Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1206-1211, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.009>

SENRA-FERREIRO, S.; PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA I.; BENDICHO, C. Griess micro-assay for the determination of nitrite by combining fibre optics-based cuvetteless UV-Vis micro-spectrophotometry with liquid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 195-200, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.038>

SHARIATI-FEIZABADI, S.; YAMINI, Y.; BAHRAMIFAR, N. Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water sample. **Analytica Chimica Acta**, v. 489, p. 21-31, 2003. [https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0003-2670\(03\)00709-8](https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0003-2670(03)00709-8)

SILVA, R. A. B.; RABELO, A. C.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Three-electrode-integrated sensor into a micropipette tip. **Electroanalysis**, v. 22, p. 2167-2171, 2010. <https://doi.org/10.1002/elan.201000244>

SILVA, W. P.; OLIVEIRA, L. H.; SANTOS, A. L.; FERREIRA, V. S.; TRINDADE, M. A. G. Sample preparation combined with electroanalysis to improve simultaneous determination of antibiotics in animal derived food samples. **Food Chemistry**, v. 250, p. 7-13, 2018. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.foodchem.2018.01.041>

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**. 5^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^a ed. São Paulo: Editora: Thomson, 2006.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 23, p. 81-89, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>

SRIPROM, J.; SIM, W. C.; KHUNKAEWLA, P.; SUGINTA, W.; SCHULTE, A. Simple and economical analytical voltammetry in 15 μ L volumes: paracetamol voltammetry in blood sérum as a working example. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 10105-10110, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01135>

SU, C.; SUN, C.; LIAO, Y. Printed combinatorial sensors for simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid, dopamine, and nitrite. **ACS Omega**, v. 2, p. 4245-4252, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00681>

SUMA, B. P.; ADARAKATTI, P. S.; KEMPAHANUMAKKAGARI, S. K.; MALINGAPPA, P. A new polyoxometalate/rGO/Pani composite modified electrode for electrochemical sensing of nitrite and its application to food and environmental samples. **Material Chemistry and Physics**, v. 229, p. 269-278, 2019. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.matchemphys.2019.02.087>

SUMA, B. P.; PANDURANGAPPA, M. Graphene oxide/copper terephthalate composite as a sensing platform for nitrite quantification and its application to environmental samples. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, p. 69-79, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10008-019-04454-8>

TANG, S.; QI, T.; ANSAH, P. D.; FOUEMINA, J. C. N.; SHEN, W.; BASHEER, C.; LEE, H. K. Single-drop microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 306-313, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.016>

TURDEAN, G.; SZABO, G. Nitrite detection in meat products samples by square-wave voltammetry at a new single walled carbon nanotubes – myoglobin modified electrode. **Food Chemistry**, v. 179, p. 325-330, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.106>

WANG, P.; WANG, M.; ZHOU, F.; YANG, G.; QU, L.; MIAO, X. Development of a paper-based, inexpensive, and disposable electrochemical sensing platform for nitrite detection. **Electrochemistry Communications**, v. 81, p. 74-78, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.06.006>

WANG, Q.; YU, L.; LIU, Y.; LIN, L.; LU, R.; ZHU, J.; HE, L.; LU, Z.; Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review. **Talanta**, v. 165, p. 709-720, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.044>

WANG, X.; ZHANG, Z.; WU, G.; XU, C.; WU, J.; ZHANG, X.; LIU, J. Applications of electrochemical biosensors based on functional antibody-modified screen-printed electrodes: a review. **Analytical Methods**, v. 14, p. 7-16, 2021. <https://doi.org/10.1039/D1AY01570B>

WANG, Y.; LABORDA, E.; COMPTON, R. G.; Electrochemical oxidation of nitrite: kinetic, mechanistic and analytical study by square wave voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 670, p. 56-61, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.02.016>

ZHANG, F.; YUAN, Y.; ZHENG, Y.; WANG, H.; LIU, T.; HOU, S. A glassy carbon electrode modified with gold nanoparticle-encapsulated graphene oxide hollow microspheres for voltammetric sensing of nitrite. **Microchimica Acta**, v. 184, p. 1565-1572, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2264-6>

ZHANG, W.; YUAN, R.; CHAI, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, S. A simple strategy based on lanthanum – multiwalled carbon nanotube nanocomposites for simultaneous determination of acid ascorbic, dopamine, uric acid and nitrite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 166-167, p. 601-607, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.018>

ZHAO, Z.; XIA, Z.; LIU, C.; HUANG, H.; YE, W. Green synthesis of Pd/Fe₃O₄ composite based on polyDOPA functionalized reduced graphene oxide for electrochemical detection of nitrite in cured food. **Electrochimica Acta**, v. 156, p. 146-154, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.09.185>