

Melissa dos Santos Raymundo

**AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE NITRITOS E ANTIOXIDANTES EM
ALIMENTOS POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS**

Florianópolis, janeiro de 2007.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE NITRITOS E ANTIOXIDANTES EM
ALIMENTOS POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

**Orientador Profa. Dra. Roseane Fett
Co-orientador: Prof. Dr. César V. Franco**

Melissa dos Santos Raymundo

Florianópolis, janeiro de 2007.

Raymundo, Melissa dos Santos, Avaliação da quantificação de nitritos e antioxidantes em alimentos por técnicas voltamétricas/ Melissa dos Santos Raymundo. – Florianópolis, SC: [s.n.], 2007.

Orientador: Roseane Fett

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

1. análise de alimentos. 2. técnicas voltamétricas. 3. antioxidantes. 4. nitritos. I. Fett, Roseane. II Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE NITRITOS E ANTIOXIDANTES EM ALIMENTOS POR TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

Por

Melissa dos Santos Raymundo

Tese aprovada como requisito final para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada por:

Presidente: _____

Profa. Dra. Roseane Fett - UFSC

Relator: _____

Prof. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória – UFMG (Ciência dos Alimentos)

Membro: _____

Dr. Jorge Mancini Filho – USP (Ciência dos Alimentos)

Membro: _____

Profa. Dra. Daniela Becker – IST (Ciência dos Materiais- polímeros)

Membro: _____

Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi – UFSC (Ciência dos Alimentos)

Membro: _____

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz – UFSC (Ciência dos Alimentos)

Florianópolis, janeiro de 2007.

*Ao meu noivo, André.
A minha psicóloga, Vera Lúcia Néis.
E a minha família.*

Agradecimentos

A CAPES e ao CNPq pela bolsa de doutorado com a qual pude dedicar-me integralmente a realização desse trabalho e suprir minhas necessidades básicas durante os últimos três anos.

A UNESCO pelo apoio financeiro.

A professora Dra. Roseane Fett, pela oportunidade de fazer o doutorado, pela bolsa de doutorado, pela confiança e pela amizade, nos últimos sete anos.

A Deus que ilumina todos os dias de nossas vidas.

A Érika Taciana Ribeiro, bolsista do laboratório de Química de Alimentos, pelo trabalho, responsabilidade, por toda ajuda direta e indireta na realização deste trabalho.

Ao Maykon Cristiano Passos, bolsista do Laboratório de Síntese de Complexos Multifuncionais – LASICOM da UNESCO, pela amizade e ajuda.

Ao Danon Cledes Cardoso, bolsista também do LASICOM, UNESCO, pela amizade, ajuda e bom humor.

A Vera Lúcia Néis, pelo profissionalismo e atenção, tão importantes nos momentos mais difíceis, por ter sido mais que uma orientadora, ter sido uma amiga e conselheira nesta caminhada. Pelos ensinamentos e pelo otimismo.

Ao meu maior amor, André Paz Rosa, motivo de tudo, centro do meu universo. Por todo carinho, paciência, apoio nos momentos mais difíceis. Por sua força e persistência, por sua inteligência, por não me deixar desistir tantas vezes, por acreditar na minha capacidade, por fortalecer o meu trabalho, pelas revisões, pelos transportes e, principalmente pelos abraços.

RAYMUNDO, M.S. **Avaliação da quantificação de nitritos e antioxidantes em alimentos por técnicas voltamétricas**. 2007, 215f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Neste estudo são apresentadas, no primeiro capítulo, aplicações de técnicas voltamétricas, na determinação quantitativa de nitrito em eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-{trans[RuCl₂(vpy)₄]}. Para isso foram usadas as técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (DPV). O método voltamétrico proposto foi usado na determinação quantitativa de nitrito em amostras comerciais de patês, e os resultados foram comparados aos obtidos pelo método espectrofotométrico da reação de Griess. Os resultados demonstraram um bom desempenho do eletrodo modificado na determinação de nitritos em amostras de patê. No segundo capítulo, são apresentados os resultados de aplicações das técnicas voltamétricas VC, DPV, voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de varredura linear (LSV), em eletrodos de platina (Pt) e carbono vítreo (GC) na determinação quantitativa simultânea de antioxidantes sintéticos. Além disso, hidroxibutilanisol (BHA), hidroxibutiltolueno (BHT) e tert-butilhidroquinona (TBHQ) foram determinados usando SWV em amostras comerciais de maionese. A utilização do método de Adição Padrão na quantificação em amostra real reforçou a eficiência da técnica para aplicação em alimentos. No capítulo três, os comportamentos eletroquímicos de extratos etanólicos de diferentes bagaços oriundos da produção de vinho branco é apresentado como alternativa para avaliação rápida do potencial antioxidante de extratos brutos. Os perfis eletroquímicos obtidos, usando técnicas voltamétricas de DPV e SWV, foram correlacionados com os resultados obtidos pelos métodos de radical ABTS*, radical DPPH e sistema β caroteno/ácido linoléico. Os resultados indicaram uma correlação positiva entre o perfil eletroquímico e as atividades antioxidantes pelos outros métodos.

Palavras-chave: nitrito, técnicas voltamétricas, análise alimentos, antioxidantes.

RAYMUNDO, M.S. **Avaliação de quantificação de nitrito e antioxidante em alimentos usando técnicas voltamétricas**. 2007, 215f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

ABSTRACT

In this study are presented, in the first chapter, applications of voltammetric techniques. It describes the optimized involved parameters in the quantitative determination of nitrite in modified glass carbon electrode with poly- {trans [RuCl₂ (vpy)₄]} using the techniques of cyclic voltammetry (VC) and differential pulse voltammetry (DPV). The voltammetric method using modified electrode optimized was used in the quantitative determination of nitrite in available *patê* samples in the local market. The confronted results had been also gotten by the spectrophotometric method of Griess-Ylosvay (official method, AOAC). The results suggest a good performance of the modified electrode in the determination of nitrites in *meat spread* samples. In second chapter, applications of same voltammetric techniques (VC and DPV) and another square wave voltammetry (SWV) and linear sweep voltammetry (LSV), for simultaneous quantitative determination of synthetic antioxidants substances. The butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butylhydroquinone (TBHQ) were determined in work electrodes of platinum (Pt) and glass carbon (GC) and different support electrolytes.. The use of the method of Addition Standard in the quantification in real sample strengthened the efficiency of the technique for application in foods. In chapter three the electrochemical behavior of five ethanolic extracts of different type of byproduct of the production of white wine are presented as alternative for evaluation of the antioxidant activity of ruder extracts. The electrochemical behavior, using the voltammetric techniques: DPV and SWV, had been correlated with the results gotten through the antioxidant activity evaluation of the ethanolic extracts, for the methods of radical ABTS*, radical DPPH and system β -carotene/acid linoleic. The results suggest good positive correlation between the total phenolic compounds of extracts, the electrochemical behaviour and the antioxidant activity evaluated by the other methods.

Keywords: nitrite, voltammetric techniques, food analysis, antioxidants.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1 NITRITOS E NITRATOS.....	26
2.2 UTILIZAÇÃO DE NITRITOS E NITRATOS EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL	28
2.3 TOXICIDADE DE NITRITOS E NITRATOS.....	31
2.4 LIMITES DE UTILIZAÇÃO DE NITRITOS E NITRATOS SEGUNDO A LEGISLAÇÃO	33
2.5 VEGETAIS HIDROPÔNICOS	36
2.6 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITOS E NITRATOS	38
2.7 ELETROQUÍMICA	40
2.7.1.1 Voltametria de Varredura Linear	48
2.7.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)	49
2.7.1.3 Voltametria de ondas quadradas (SWV).....	52
2.7.1.4 Voltametria cíclica.....	54
2.8 CÉLULAS ELETROQUÍMICAS	56
2.9 COMPLEXOS DE RUTÊNIO	63
2.10 ELETROQUÍMICA DE NITRITOS E NITRATOS	64
CONCEITOS ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS (CAPÍTULO 2).....	66
2.11 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	66
2.12 UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	67
2.13 TOXICIDADE DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS.....	69
2.14 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	71
2.15 ELETROQUÍMICA DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	72
CONCEITOS ANTIOXIDANTES NATURAIS (CAPÍTULO 3).....	73
2.16 TOXICIDADE DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO	73
2.17 RADICAIS LIVRES	74
2.18 Antioxidantes naturais	76
2.19 ANTIOXIDANTES EM UVAS E VINHOS	76
2.19.1 Polifenóis	80
2.19.2 Ácidos fenólicos	80
2.19.3 Flavonóides.....	81
2.20 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS	84
2.21 ELETROQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES	88
CAPÍTULO 1	90

DETERMINAÇÃO DE NITRITOS EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM POLI -{TRANS-[RUCL₂(VPY)₄]}	90
1. INTRODUÇÃO.....	91
2. OBJETIVOS.....	92
2.1 OBJETIVO GERAL.....	92
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	92
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
3.1 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	93
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	93
3.3 ELETRÓLITOS E SOLVENTES.....	93
3.4 CÉLULA ELETROQUÍMICA.....	94
3.5 INSTRUMENTOS.....	95
3.6 SÍNTESE DO COMPLEXO POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄]}	95
3.7 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS MONOCAMADA.....	96
3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS MONOCAMADA.....	96
3.9 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS BICAMADA.....	97
3.10 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS BICAMADA COM FERROCIANETO.....	97
3.11 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS BICAMADA INCORPORADOS COM FERROCIANETO DE POTÁSSIO.....	97
3.12 INFLUÊNCIA DO PH SOBRE OS VOLTAMOGRAMAS DE OXIDAÇÃO DOS ÍONS NITRITO EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	97
3.13 AVALIAÇÃO DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA SOBRE A SENSIBILIDADE NA DETECÇÃO DE ÍONS NITRITO EM SOLUÇÃO AQUOSA (VOLTAMETRIA CÍCLICA VERSUS VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL).....	98
3.14 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS ÍONS NITRITO EM AMOSTRA DE ALIMENTO USANDO A REAÇÃO DE GRIESS SEGUNDO AOAC.....	99
3.15 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS ÍONS NITRITO EM AMOSTRA DE ALIMENTO USANDO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄]}	99
DPV.....	99
3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	100
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
4.1 SÍNTESE DO COMPLEXO TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄].....	101
4.2 POMERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄]}	101
SOBRE OS ELETRODOS DE TRABALHO.....	101
4.3 CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS MONOCAMADA MODIFICADOS.....	104
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS BICAMADA.....	107

4.5 ELETROINCORPORAÇÃO DE FERROCIANETO NO ELETRODO BICAMADA	109
4.6 DETERMINAÇÃO DE NO ₂ EM ELETRODO NU	110
4.7 DETERMINAÇÃO DE NO ₂ EM ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄]}	
(MONOCAMADA).....	115
4.8 DETERMINAÇÃO DE NO ₂ EM ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄] +	
4-VINILPIRIDINA (BICAMADA).....	118
4.9 DETERMINAÇÃO DE NO ₂ EM ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄] +	
4-VINILPIRIDINA (BICAMADA) INCORPORADO COM FE(CN) ₆ ³⁺	123
4.10 INFLUÊNCIA DO PH NA DETERMINAÇÃO DE NO ₂ EM ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI-	
{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄] (MONOCAMADA).....	125
4.11 INFLUÊNCIA DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DE NO ₂ EM ELETRODOS	
MODIFICADOS COM POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄] (MONOCAMADA)	132
4.12 DETERMINAÇÃO DE NO ₂ EM ELETRODOS MODIFICADOS COM POLI-{TRANS-[RUCL ₂ (VPY) ₄]}	
(MONOCAMADA) EM AMOSTRAS DE PATÊ FRENTE A REAÇÃO DE GRIESS(AOAC-1996).....	135
CAPÍTULO 2	138
DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS EM ELETRODOS DE CARBONO E	
PLATINA	138
1. INTRODUÇÃO	139
2. OBJETIVOS	141
2.1 OBJETIVO GERAL	141
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	141
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	142
3.1 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	142
3.2 ELETRÓLITOS, SOLVENTES E ANALITOS.....	142
3.3 CÉLULA ELETROQUÍMICA.....	142
3.4 INSTRUMENTOS	143
3.5 AMOSTRAS	143
3.6 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS	143
3.7 CURVA DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	143
3.8 LIMPEZA DOS ELETRODOS.....	144
3.9 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS EM AMOSTRA DE ALIMENTO	
.....	144
3.10 DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES NA QUANTIFICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	
.....	144
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	145

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	146
4.1 INFLUÊNCIA DAS TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS NA DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	146
4.2 INFLUÊNCIA DO ELETRODO DE TRABALHO	148
4.3 INFLUÊNCIA DO PH E DO ELETRÓLITO SUPORTE.....	150
4.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO ANTIOXIDANTE.....	152
4.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MAIONESE.....	154
4.6 INTERFERENTES	155
5 CONCLUSÕES	156
CAPÍTULO 3 -	158
PERFIL ELETROQUÍMICO DE EXTRATOS CONTENDO ANTIOXIDANTES NATURAIS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	158
1. INTRODUÇÃO	159
2. OBJETIVOS.....	160
2.1 OBJETIVO GERAL	160
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	160
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	161
3.1 REAGENTES	161
3.2 AMOSTRAS E PADRÕES.....	161
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS	161
3.4 ELETRÓLITOS SUPORTE	162
3.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	162
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH	162
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS PELO MÉTODO DO RADICAL ABTS	163
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICOS PELO SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINÓLEICO	163
3.9 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS USANDO TÉCNICAS AMPEROMÉTRICAS	164
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	164
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	165
4.1 INFLUÊNCIA DA TÉCNICA VOLTAMÉTRICA.....	165
4.2 INFLUÊNCIA DO ELETRÓLITO SUPORTE.....	167
5 CONCLUSÕES	177

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
CONSIDERAÇÕES FINAIS	210
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	213
PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA Á TESE	214

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

1. Vias de ingestão de nitrato e nitrito e seus possíveis efeitos tóxicos26
2. Variação da corrente em função do tempo em voltametria.43
3. Forma de aplicação do potencial (E) para cada tipo de voltametria e corrente resultante (i).....49
4. Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial (DPV).50
5. Representação esquemática da voltametria de onda quadrada (SWV).....52
6. Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada.57
7. Esquema de célula de dois eletrodos ligada ao polarógrafo.57
8. Representação esquemática mostrando os eletrodos no recipiente eletroquímico59
9. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático.59
10. Ilustração dos eletrodos.....94
11. Ilustração da disposição do potenciostato e da célula eletroquímica.....94
12. Estrutura do complexo metálico trans-[RuCl₂(vpy)₄].....101
13. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos observados durante o processo de polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo trans-[RuCl₂(vpy)₄] sobre eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE).....102
14. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos observados durante o processo de polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo trans-[RuCl₂(vpy)₄] sobre eletrodo de platina (Pt/PINE),103
15. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos observados durante o processo de polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo trans-[RuCl₂(vpy)₄] sobre eletrodo de carbono vítreo (Vt/PAR).....104
16. Voltamograma do perfil eletroquímico do eletrodo modificado com poli-trans-[RuCl₂(vpy)₄]. $\tau_{app} = 2,60 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ 105
17. Voltamograma do perfil eletroquímico do eletrodo modificado com poli-trans-[RuCl₂(vpy)₄]. $\tau_{app} = 7,74 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$106
18. Voltamograma do perfil eletroquímico do eletrodo modificado com poli-trans-[RuCl₂(vpy)₄]. $\tau_{app} = 3,25 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$107
19. Voltamogramas do perfil eletroquímico do eletrodo bicamada, eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE), área de 0,950 cm² após dois processos de eletrodeposição.108
20. Voltamogramas do perfil eletroquímico do eletrodo bicamada, eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE), área de 0,950 cm² após três processos de eletrodeposição.....109

21. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de carbono vítreo (GC/PINE) área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (—) 8 ppm, (····)16 ppm, (----) 20 ppm, (—) 40 ppm, (----) 80 ppm e (····)160 ppm; 50 mV/s , técnica DPV.111
22. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de platina (Pt/PINE) área de $0,502 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (□□□) 6 ppm, (AAA) 8 ppm, (aaa) 12 ppm, (111) 40 ppm, (III) 80 ppm, (---) 100 ppm, (XXX) 120 ppm, (***) 200 ppm e (+++) 1000 ppm; 50 mV s^{-1} , técnica DPV.112
23. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de carbono vítreo (GC/PINE) área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (····) 10 ppm, (—) 25 ppm, (IIII) 100 ppm e (-----) 250 ppm; $\tau_{\text{app}} = 2,25 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, 50 mV/s , técnica VC.113
24. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de platina (Pt/PINE) área de $0,502 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (····) 10 ppm, (—)50 ppm e (IIII)100 ppm; 50 mV s^{-1} , $\tau_{\text{app}} = 7,74 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, técnica VC.114
25. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, para concentrações de (····) 30 ppm, (IIII) 50 ppm, (—)70 ppm, (°°°°) 100 ppm e (----)150 ppm, 50 mV s^{-1} , $\tau_{\text{app}} = 1,96 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, 50 mV s^{-1} , técnica VC.116
26. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo platina (Pt) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,520 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (····) 30 ppm, (IIII) 50 ppm, (—)70 ppm, (°°°°) 100 ppm e (----)150 ppm; 50 mV s^{-1} , $\tau_{\text{app}} = 2,69 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, 50 mV s^{-1} , técnica VC.117
27. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina (bicamada), área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (—) 50 ppm e (—) 100 ppm; 50 mV s^{-1} , 50 mV s^{-1} , técnica VC.119
28. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo GC PINE modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina (bicamada), área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70,

- para as concentrações: (—) 50 ppm e (—) 100 ppm; 50 mV s⁻¹, 50 mV s⁻¹, técnica DPV.
.....120
29. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodo carbono vítreo Vt PAR modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} + 4-vinilpiridina (bicamada), área de 0,152 cm², em solução acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ /perclorato de lítio 0,2 mol L⁻¹, pH 7,70, para as concentrações: (—) 50 ppm e (—) 100 ppm; 50 mV s⁻¹, 50 mV s⁻¹, técnica VC.
.....121
30. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodos de carbono vítreo GC PINE e eletrodo de carbono vítreo Vt PAR modificados com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} + 4-vinilpiridina (bicamada), áreas de 0,950 cm² e 0,152 cm², respectivamente; em solução acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ /perclorato de lítio 0,2 mol L⁻¹, pH 7,70, para a concentração de (—) 50 ppm/GC e (---) 05 ppm/Vt; 50 mV s⁻¹, 50 mV s⁻¹, técnica VC.
.....122
31. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodos de carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} + 4-vinilpiridina + ferrocianeto (bicamada incorporado de ferrocianeto), área de 0,950 cm², respectivamente; em solução acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ /perclorato de lítio 0,2 mol L⁻¹, pH 7,70, para a concentração: (—) 30 ppm, (----)60 ppm, (***)100 ppm e (ooo)150 ppm; (189,9 μC.cm⁻²), 50 mV s⁻¹, técnica VC.123
32. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodos de carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} + 4-vinilpiridina + ferrocianeto (bicamada incorporado de ferrocianeto), área de 0,950 cm², respectivamente; em solução acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ /perclorato de lítio 0,2 mol L⁻¹, pH 7,70, para a concentração: (—) 30 ppm, (----)60 ppm, (***)100 ppm e (ooo)150 ppm; 50 mV s⁻¹, técnica VC.124
33. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, área de 0,342 cm², em solução tampão KCl/HCl, pH 2,0, para concentração de 2,3 x 10³ ppm, τ_{app} = 6,62 x 10⁻⁹ mol cm⁻². ...126
34. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, área de 0,342 cm², em solução tampão citrato/fosfato, (—) pH 3,0 e (----) pH 4,0, para concentração de 2,3 x 10³ ppm, τ_{app} = 6,62 x 10⁻⁹ mol cm⁻².127
35. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) PAR modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, área de 0,342 cm², em solução tampão citrato/fosfato, (----) pH 5,0 e (—) pH 6,0, para concentração de 2,3 x 10³ ppm, τ_{app} = 6,62 x 10⁻⁹ mol cm⁻².128

36. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,342 \text{ cm}^2$, em solução tampão citrato/fosfato, (----) pH 7,0 e (—) pH 8,0, para concentração de $2,3 \times 10^3 \text{ ppm}$, $\tau_{\text{app}} = 6,62 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$129
37. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,342 \text{ cm}^2$, em solução tampão citrato/fosfato, (—) pH 9,0, para concentração de $2,3 \times 10^3 \text{ ppm}$, $\tau_{\text{app}} = 6,62 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$130
38. Voltamogramas da solução tampão fosfato, (—) pH 7,70 em eletrodo carbono vítreo (Vt) PAR modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,342 \text{ cm}^2$, em solução tampão fosfato, sem adição de nitrito.131
39. Voltamogramas cíclicos para oxidação do NaNO_2 no eletrodo carbono Vt/PAR modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}. Sol. LiClO_4 1,0 M e CH_3COONa 0,1 M, pH 7,70, eletrodo de referência calomelano, contra-eletrodo platina, eletrodo de trabalho132
40. Voltamogramas de pulso diferencial para oxidação do NaNO_2 no eletrodo carbono vítreo modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}. Sol. LiClO_4 1,0 M e CH_3COONa 0,1 M, pH 7,70, eletrodo de referência calomelano, contra-eletrodo platina.133
41. Curva de calibração para determinação de nitritos obtida pelo método A.O.A.C. , reação colorimétrica de Griess.135

Capítulo 2

1. Estruturas do butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroquinona (TBHQ).6949
2. Voltamogramas obtidos por (—) Voltametria de onda quadrada SWV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $f = 60 \text{ Hz}$); (—) Voltametria cíclica CV ($u_b = 50 \text{ mVs}^{-1}$); (· · ·) Voltametria de pulso diferencial DPV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $u_b = 50 \text{ mV s}^{-1}$) e (----) Voltametria de varredura linear SLV ($u_b = 50 \text{ mVs}^{-1}$) em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo metanol 20 mL L^{-1} para 50 mg L^{-1} BHA, BHT e TBHQ, pH 2,0, $n = 5$ em eletrodo de GC. .1460
3. Voltamogramas obtidos por (—) Voltametria de onda quadrada SWV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $f = 60 \text{ Hz}$); (—) Voltametria cíclica CV ($u_b = 50 \text{ mVs}^{-1}$); (· · ·) Voltametria de pulso diferencial DPV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $u_b = 50 \text{ mV s}^{-1}$) e (----) Voltametria de varredura linear SLV ($u_b = 50 \text{ mVs}^{-1}$) em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo metanol 20 mL L^{-1} para 50 mg L^{-1} BHA, BHT e TBHQ, pH 2,0, $n = 5$ em eletrodo de Pt.147
4. Voltamogramas obtidos por Voltametria de onda quadrada ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $f = 60 \text{ Hz}$), em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo metanol 20 mL L^{-1} para

50 mg L⁻¹ BHA, BHT e TBHQ, pH 2,0, n = 5 em eletrodo de GC (· · ·) e eletrodo de Pt (-).....1494

Capítulo 3

1. Voltamograma do extrato de bagaço Gewurztraminer usando a técnica de voltametria de onda quadradas SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 30$ Hz) em eletrodo de carbono vítreo, GC, e eletrólito suporte tampão HCl/KCl pH 3,32, na proporção 1,5: 25 (v/v) extrato etanólico:tampão, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).....165
2. Voltamograma do extrato de bagaço Gewurztraminer usando a técnica de voltametria de pulso diferencial DPV ($\Delta E = 25$ mV; $u_b = 20$ mV s⁻¹) em eletrodo de carbono vítreo e eletrólito suporte tampão KCl/HCl, pH 3,32, na proporção 1,5: 25 (v/v) extrato etanólico:tampão, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).....1667
3. Voltamograma dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos (●●● Gewürztraminer, III Riesling Itálico, +++ Moscato Embrapa , □□□ Courdec 13; --- Chardonnay) usando a técnica amperométrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 30$ Hz) em eletrólito suporte tampão acetato de sódio ,pH 3,64, na proporção 1,5: 25 (v/v) extrato etanólico:tampão, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).167
4. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos (▽▽▽ - Gewurztraminer; ■■■ Chadornay; +++ - Couderc 13; --- Moscato Embrapa e — Riesling Itálico) usando a técnica voltamétrica DPV ($\Delta E = 25$ mV; $u_b = 20$ mV s⁻¹) em eletrólito suporte tampão acetato de sódio, pH 3,64, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).169
5. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos (▽▽▽ - Gewurztraminer; ■■■ Chadornay; +++ - Couderc 13; --- Moscato Embrapa e — Riesling Itálico) usando a técnica voltamétrica DPV ($\Delta E = 25$ mV; $u_b = 20$ mV s⁻¹) em eletrólito suporte tampão HCl/KCl, pH 3,32, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).....171
6. Voltamogramas do extrato de Gewürztraminer para diferentes concentrações (■■■ 3,63 mg mL⁻¹; *** 4,54 mg mL⁻¹ ; ΔΔΔ 13, 53 mg mL⁻¹) usando a técnica DPV ($\Delta E = 25$ mV; $u_b = 20$ mV s⁻¹) e eletrólito suporte tampão KCl/HCl pH 3,32, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).173

LISTA DE TABELAS

1. Setores industriais e a geração de resíduos contendo nitrato no ano de 1997 conforme Inventário TRI.....	28
2. Alimentos que podem ser adicionados de antioxidantes sintéticos segundo resolução n. 4 de 24 de novembro de 1988 MS/ANVISA	71

Capítulo 1

1. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica $j_{pa}(\mu A cm^{-2})$ e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodo nu de carbono vítreo (GC/PINE), $0,950 cm^2$ por DPV.....	110
2. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica $j_{pa}(\mu A cm^{-2})$ e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodo nu de platina (Pt/PINE), $0,502 cm^2$ por DPV.....	112
3. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica $j_{pa}(\mu A cm^{-2})$ e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodos nu de carbono vítreo (GC/PINE) por VC	114
4. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica $j_{pa}(\mu A cm^{-2})$ e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodos nu de platina (Pt/PINE) por VC	115
5. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica $j_{pa}(\mu A cm^{-2})$ e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodos modificados de carbono vítreo (GC/PINE) e platina (Pt/PINE) por VC.....	118
6. Valores médios \pm desvio padrão para E (mV) e J ($\mu A.cm^{-2}$) em eletrodos de carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[RuCl ₂ (vpy) ₄]} + 4-vinilpiridina + ferrocianeto (bicamada incorporado de ferrocianeto) por VC	125
7. Valores médios \pm desvio padrão para E (mV) e J ($\mu A.cm^{-2}$) para determinação oxidativa de nitrito em eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[RuCl ₂ (vpy) ₄]} por VC em diferentes valores de pH.....	131

8. Valores médios \pm desvio padrão para E (mV) e J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) para determinação oxidativa de nitrito em eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}. usando as técnicas de VC e DPV..... 134
9. Valores médios para absorbância a 540 nm e respectivas concentrações de nitrito no método espectrofotométrico, reação de Griess..... 136
10. Valores médios \pm desvio padrão para quantidade de nitritos encontradas nas amostras de patê ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) obtidas pelos métodos voltamétrico utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado e espectrofotométrico..... 136

Capítulo 2

2. Valores médios de E_{pa} (mV) and J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) para mistura de antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ em diferentes eletrólitos suporte, A e B, e diferentes eletrodos de trabalho, Pt e GC, $n = 5$ em pH 2,0, usando a técnica de voltametria de onda quadrada ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz)..... 151
3. Correlações lineares e limites de detecção obtidos para mistura dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em eletrodo de GC usando a técnica amperométrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz), eletrólitos suporte A e B, pH 2,0 152
4. Correlações lineares e limites de detecção obtidos para mistura dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em eletrodo de Pt usando a técnica amperométrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz), eletrólitos suporte A e B, pH 2,0 153
5. Determinação dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em amostras de maionese comercial usando a técnica voltamétrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz) em eletrólito suporte solução aquosa HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0 para dois eletrodos de trabalho, GC e Pt 155

Capítulo 3

1. Valores médios \pm desvio padrão do potencial de corrente anódica máxima ($E_{pa \text{ máx.}}$) expressos em mV, corrente máxima ($J_{\text{máx.}}$) expressa em $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, e o volume de extratos (mL) usados na voltametria de pulso diferencial 172
2. Conteúdo de fenólicos totais (método de Folin Ciocateu) e atividade antioxidante total dos extratos etanólicos utilizando-se diferentes métodos: sistema beta-caroteno/ácido linoléico, radical cátion ABTS, radical DDPH e voltametria de pulso diferencial (DPV). 174

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	Radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
A.O.A.C	Association of Official Analytical Chemistry
BHA	hidroxibutilanisol
BHT	hidroxibutiltolueno
CH ₃ [·]	Radical metila
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DMPH	2,2-azobis-2-aminopropano dicloreto
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EGA	Equivalente ácido gálico
DPPH	1,1 difenil-2-picrilhidrazil
DPV ou VPD	Voltametria de pulso diferencial
ECS ou SCE	Eletrodo de referência de calomelano saturado
EDTA	Etileno diamino tricloro acético
E	Potencial em volts
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico anódico
E ⁰	Potencial padrão do sistema de óxido redução
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
E _{1/2}	Potencial de meia onda, onde $i = i_d/2$
ET ou WE	Eletrodo de trabalho
EC	Contra eletrodo ou eletrodo auxiliar
ER	Eletrodo de referência
FAO	Food Agriculture Organization
FRAP	Poder antioxidante em redução férrica
GC	Eletrodo de carbono vítreo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HO*	Radical hidroxila
i	Corrente dada em amperes
i _f	Corrente faradaica
i _c	Corrente capacitiva
IDA	Ingestão diária aceitável
J _{pa}	Densidade de corrente (A.cm ²) de pico anódico

J_{pc}	Densidade de corrente ($A.cm^2$) de pico catódico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOO^{\cdot}	Radical peroxila
OH^{\cdot}	Radical hidroxila
O_2^{\cdot}	Radical superóxido
ORAC	Capacidade de absorvência do radical oxigênio, método
OMS	Organização Mundial para Saúde
SWV ou VOQ	Voltametria de onda quadrada, técnica
TBHQ	Tert-butilhidroquinona
VC ou CV	Voltametria cíclica, técnica
trans-[$RuCl_2(vpy)_4$]	Trans dicloro tetraquis 4-vinilpiridina rutênio
trans-[$RuCl_2(nic)_4$]	Trans dicloro tetraquis ácido nicotínico rutênio
trans-[$RuCl_2(i-nic)_4$]	Trans dicloro tetraquis ácido nicotínico rutênio
Poli-{trans- [$RuCl_2(vpy)_4$]}	Polímero eletrodepositado em eletrodo
Pt	Eletrodo de platina
ppm	Partes por milhão
RH	Molécula de ácido graxo
ROH	Molécula antioxidante
r.p.m	Rotações por minuto
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalente Trolox
TRAP	Capacidade redutora total do plasma
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilclomano-2-ácido carboxílico, antioxidante sintético
Vt	Eletrodo de carbono vítreo
λ_{max}	comprimento de onda de máxima absorvência
τ_{app}	Recobrimento superficial aparente, dado em $mol\ cm^{-2}$
FAO	Organização para Agricultura e Alimentação
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ΔE	Diferença de potencial
UV-visível	Região de comprimentos de ondas

INTRODUÇÃO GERAL

As técnicas eletroquímicas de análise (com exceção da potenciometria) têm sido muito pouco exploradas como métodos analíticos de rotina. Estas técnicas apresentam baixo custo quando comparadas as técnicas espectrofotométricas (normalmente utilizadas) e, em alguns casos apresentam melhores resultados (RODRIGUES, 1996).

A dificuldade na popularização das técnicas eletroquímicas entre os químicos analíticos, está, nas limitações devido ao eletrodo normalmente utilizado. Para popularizar a eletroquímica como técnica analítica, tornou-se necessário a preparação de novos eletrodos de trabalho, denominados eletrodos quimicamente modificados (EQM), que apresentam na sua composição uma substância pré-concentradora ou eletroativa (RODRIGUES, 1996). Além disso, os avanços na área da eletrônica permitiram o aprimoramento das técnicas eletroquímicas pelo desenvolvimento de aparelhos mais sensíveis.

Aditivos são muito utilizados na indústria de alimentos. Estes desempenham inúmeras funções como conservantes, antioxidantes, flavorizantes, emulsificantes, estabilizantes etc. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados em alimentos lipídicos encontram-se o butilhidroxianisol (BHA), o butilhidroxitolueno (BHT) e o tert-butilhidroquinona (TBHQ) e dentre os conservantes mais utilizados em produtos cárneos encontra-se o nitrito. Quando usados em baixas concentrações, tanto nitritos quanto antioxidantes sintéticos, desempenham suas atividades com segurança, entretanto, se utilizados em concentrações inadequadas podem representar grande risco à saúde dos consumidores.

Sendo o uso de aditivos limitado por legislação específica, é de extrema importância a determinação da quantidade desses nos alimentos (YÁNEZ-SEDEÑO; PINGARRÓN; POLO DÍEZ, 1991).

Existem diversos métodos para determinar íons nitrito, tais como: cromatografia gasosa (TSIKAS et al., 1994; KAGE, KUDO & IKEDA, 2000); cromatografia líquida (KAWASHIMAA et al., 2004; CONNOLLY & PAULL, 2001); espectrofotometria (AZANZA & RUSTIA, 2004; KAZEMZADEHA & ENSAFI, 2001; YUE, ZHANG & YAN, 2004); fluorimetria (FERNÁNDEZ-ARGÜLLES et al., 2004; BISWAS, CHOWDHURY & RAY, 2004), cromatografia de troca iônica (KAPINUS et

al., 2004); quimiluminescência (MIKUSKA & VECERA, 2003; LUA et al., 2004), entre outros (GAPPERA et al., 2004). Desses métodos, nenhum é considerado totalmente satisfatório, visto que são muito caros, demorados, ou ainda envolvem grandes quantidades de reagentes, muitas vezes altamente tóxicos. Igualmente para antioxidantes sintéticos é possível citar diferentes métodos analíticos. Inicialmente surgiram os métodos colorimétricos e espectrofotométricos para determinação de antioxidantes sintéticos em alimentos, posteriormente foram surgindo métodos baseados em variações dos métodos tradicionais (CAPITÀN-VALLEY; VALENCIA; NICOLÁS, 2004; CRUCES-BLANCO et al., 1999). Além desses, também surgem os métodos cromatográficos (YÁÑEZ-SEDEÑO et al., 1991; KAROVICOVÁ & SIMKO, 2000; PERRIN & MEYER, 2002;).

O desenvolvimento tecnológico em química analítica leva ao desenvolvimento de metodologias de baixo custo (em termos de consumo de amostras e reagentes, e despesas com manutenção), confiáveis e, se possível, requerendo equipamentos portáteis. Isso contribui na melhoria das análises mais complexas. Na prática, por exemplo, é mais efetivo o uso de uma mistura de dois ou mais antioxidantes sintéticos ao invés de um único composto, e desde que essas substâncias são quimicamente similares, são difíceis de analisar em níveis traço sem uma prévia separação. A eletroquímica pode oferecer alternativas para análises simultâneas de misturas contendo diferentes aditivos.

Este trabalho teve como objetivo a utilização de um eletrodo revestido com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} na quantificação eletroquímica de íons nitrito em alimentos. O eletrodo revestido com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} foi estudado juntamente com técnica amperométricas reconhecidas e desenvolvido conjuntamente com uma aplicação direta da tecnologia de polímeros condutores. Além disso, a otimização de parâmetros na quantificação dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ, usando técnicas voltamétricas, para aplicação em análise de alimentos.

Sabe-se que compostos fenólicos, tocoferóis, carotenóides e ácido ascórbico agem no organismo humano sequestrando o oxigênio ativo (NAMIKI, 1990). Inúmeras pesquisas visando avaliar a possível contribuição dessas substâncias, encontradas principalmente em plantas terrestres e aquáticas, comprovam suas potencialidades (IMEH & KHOKHAR, 2002). A avaliação de novas fontes de antioxidantes naturais exige métodos confiáveis para avaliação desse potencial. Neste estudo são apresentados resultados sobre a aplicação de técnicas

voltamétricas otimizadas na avaliação do potencial antioxidante de extratos brutos etanólicos de resíduo da produção de vinho branco.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nitritos e Nitratos

Nitritos e nitratos são compostos iônicos que se encontram na natureza, fazendo parte do ciclo do nitrogênio. O nitrato (NO_3^-) é a forma estável das estruturas oxidadas do nitrogênio, e apesar de sua baixa reatividade química pode ser reduzido por ação microbiológica. O nitrito (NO_2^-), é oxidado com facilidade por processos químicos ou biológicos a nitrato, ou reduzido originando diversos compostos (KHATOUNIAN, 2001).

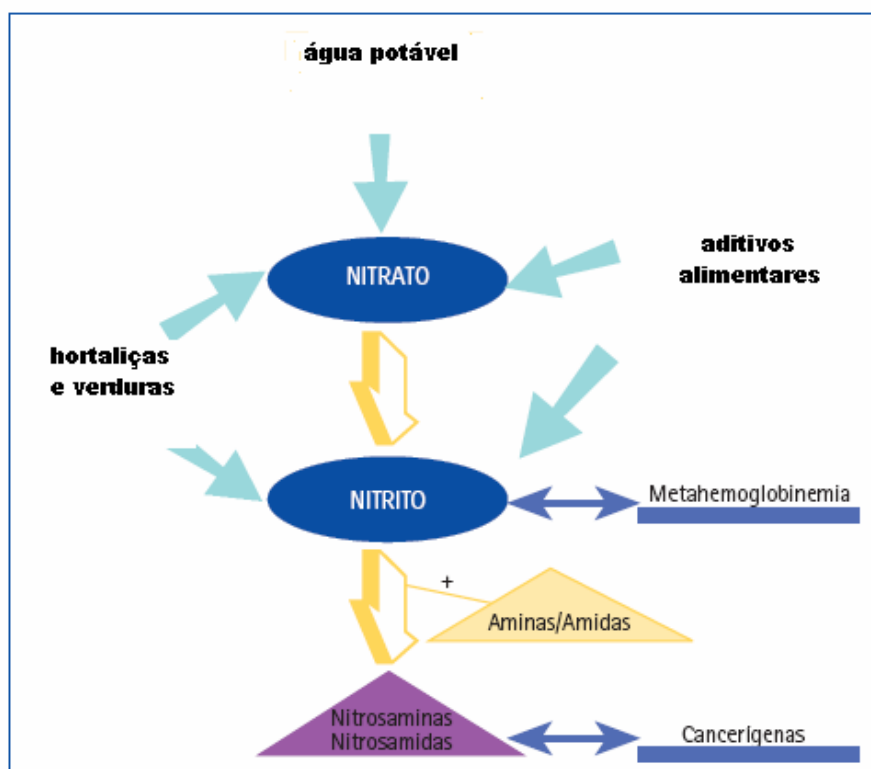


Figura 1. Vias de ingestão de nitrato e nitrito e seus possíveis efeitos tóxicos

Fonte: Antón e Lizaso (2003).

Na figura 1 observamos as principais fontes de nitrito e nitrato na ingestão humana. A primeira fonte é a água potável, visto que tanto nitrito quanto nitrato fazem parte do ciclo do nitrogênio. Depois tem-se verduras e hortaliças. Nos solos, os fertilizantes e vestígios residuais contendo nitrogênio são decompostos formando

primariamente o íon amônio (NH_4^+), que posteriormente é oxidado a nitrito e a nitrato. Parte deste nitrato é absorvida pelas plantas, que o emprega na síntese de proteínas vegetais, podendo o resto passar para águas subterrâneas. O nitrato encontra-se naturalmente presente nos vegetais, visto que a planta o absorve como fonte de nitrogênio para seu crescimento, sendo que o seu teor pode ser influenciado tanto por fatores relacionados com a planta como ao meio ambiente (WALKER, 1975; MAYNARD et al., 1976; GENT, 2003).

Os nitratos aparecem entre os 126 poluentes prioritários na lista *Clean Water Act's* (promovida pela Clean Water Network, uma aliança entre mais de 1.000 organizações públicas dos Estados Unidos visando executar a política federal de limpeza das águas) publicada no regulamento 40CFR 122 do programa nacional de sistemas de poluentes dos Estados Unidos. Os nitratos também aparecem no Toxic Release Inventory (TRI) da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos, na 18ª. posição com primeiros poluentes. Os resíduos industriais de nitratos gerados estão sujeitos a regulamentações pela redução ou eliminação das descaragas no meio ambiente (LEWIS, 1997).

A geração de resíduos contendo nitratos por várias indústrias é amplo e significativo. De acordo com o inventário da EPA, a produção total relacionada a resíduos de nitratos foi de 354 milhões de kg no ano de 1997. A maioria das indústrias gera resíduos contendo nitratos. Uma relação dos maiores geradores industriais é apresentada na Tabela 1.

Os inventário do inventário apresentada na Tabela 1 mostram claramente a maior participação na geração de resíduos contendo nitratos das indústrias químicas. As indústrias de química orgânica, química inorgânica e fertilizantes nitrogenados respondem por mais de 50% do volume de resíduos gerados.

Nitratos e nitritos estão naturalmente presentes nos alimentos de origem vegetal, decorrentes do uso de fertilizantes na agricultura, produtos de origem animal, através da adição intencional ou mesmo como contaminantes, a exemplo do leite. Os nitratos podem passar do solo para o pasto usado na alimentação bovina, e, após a absorção, podem ser excretados no leite. No leite, os teores de nitrato e de nitrito dependem do local e origem da amostra e estação do ano. E finalmente, os nitratos e nitritos estão presentes na água, também em decorrência do uso de fertilizantes na agricultura (ZBIKOWSKI, ZBIKOWSKA & BARANOWSKA, 2000).

Tabela 1. Setores industriais e a geração de resíduos contendo nitrato no ano de 1997 conforme Inventário TRI.

<i>Indústrias</i>	<i>Setor e produtos</i>	<i>Qde milhões de kg</i>
Química e produtos relacionados	Indústrias de química orgânica Fertilizantes nitrogenados Indústria de química inorgânica Fibras orgânicas Materiais plásticos e resinas	430
Primária de metais	Alto fornos e siderurgia	134
Alimentos e produtos relacionados		72
Equipamentos elétricos e eletrônicos		45
Produtos do petróleo e do carvão		*
Produtos do papel e relacionados		*
Equipamentos de transporte		*
Instrumentos e produtos relacionados		*
Indústria de máquinas e equipamentos		*
Produtos de argila e vidro		*

* valores menores. Fonte: Lewis (1997).

2.2 Utilização de nitritos e nitratos em produtos de origem animal

O nitrito é empregado como aditivo alimentar (nitrito de potássio ou nitrito de sódio), especialmente em carnes curadas. O nitrato é empregado principalmente na indústria de fertilizantes, como agente oxidante em explosivos e como sal potássico purificado na fabricação de cristais. Entretanto, o nitrato também pode ser utilizado juntamente com o nitrito na indústria de alimentos, atuando como agente conservante. Nesse caso, o nitrato atua como reserva para o nitrito, transformando-se lentamente em nitrito pela ação de bactérias nitrato-redutoras (FARIA et al., 2001).

Dentre os métodos de conservação da carne fresca, a salga é um dos mais antigos. Este consiste na incorporação de cloreto de sódio a diversos ingredientes ou aditivos, e geralmente está acompanhada de um ou vários outros tratamentos, como a fermentação, a secagem, a cocção, a defumação etc (GOUTEFONGEA, 1991). Dentre os principais aditivos usados juntamente com o cloreto de sódio estão os nitratos e nitritos.

O nitrato de potássio era conhecido e utilizado na salga de produtos cárneos desde a idade Média. Em 1981, Polenski demonstrou que o nitrato era reduzido a nitrito por ação de bactérias e em 1899 Lehman estabeleceu que a cor dos produtos cárneos salgados se devia ao íon nitrito (GOUTEFONGEA, 1991). O poder inibidor de bactérias foi descoberto em 1929 por Grindley, e finalmente em 1940, Brooks realizou o primeiro trabalho que mostrava a existência de um sabor característico associado ao nitrito em produtos salgados. Desde então, são essas as principais funções dos íons nitritos em produtos salgados: cor, sabor e proteção contra o crescimento microbiano, dentre outras (GOUTEFONGEA, 1991).

Em relação à cor, sabe-se, que a carne fresca conservada unicamente por adição de cloreto de sódio adquire uma coloração pardo-esverdeada atribuída à conversão da hemoglobina em metahemoglobina. A adição de pequenas quantidades de nitrito ou nitrato promove a manutenção da coloração vermelha da carne. O nitrito reage com a molécula de hemoglobina formando nitrosohemoglobina ou nitrosohemocromógeno, de coloração vermelha-escura (GOUTEFONGEA, 1991; PRÄNDL et al., 1994; VARNAM & SUTHERLAND, 1995).

O efeito antimicrobiano que os íons nitrito exercem sobre produtos cárneos curados depende da sua concentração. Esta dependência aplica-se tanto a inibição do crescimento de esporos de bactérias putrefativas e patogênicas como ao desenvolvimento do *Clostridium botulinum*. Seus efeitos antimicrobianos são dependentes do pH, aumentando dez vezes para cada unidade de pH reduzida. A quantidade de nitrito necessário para inibir o crescimento do *C. botulinum* difere de produto para produto. Com boa higiene, APPCC e curtos tempos de estocagem, sob um bom controle de temperatura, alguns produtos cárneos podem ser produzidos sem a utilização de nitritos, embora esses não sejam estritamente “produtos cárneos curados”. As boas práticas de fabricação são essenciais para que os níveis de nitrito possam ser reduzidos (GOUTEFONGEA, 1991; PRÄNDL et al., 1994; VARNAM & SUTHERLAND, 1995).

As concentrações de nitrito de sódio em salmouras utilizadas no preparo de produtos cárneos variam de 0,04% a 10,0%, dependendo do tratamento posterior do produto e do tipo de carne. Produtos que contém baixo conteúdo de sal e uma vida-de-prateleira prolongada, uma adição entre 50 e 150 mg kg⁻¹ de nitrito é necessária para inibir o crescimento do *C. botulinum*. (VARNAM & SUTHERLAND, 1995).

Os nitratos não têm atividade direta frente ao *C.botulinum*. Em particular nos produtos tradicionais (ex. presunto curado), nitratos atuam como reservatórios de nitritos, gerados pela atividade microbiana. Muitas publicações confirmam a eficácia do nitrito de sódio na inibição do crescimento e produção de toxina pelo *C.botulinum* em carnes curadas perecíveis como toucinho defumado, presunto enlatado etc (Scientific Panel on Biological Harzards, 2003).

No Brasil os produtos cárneos que, segundo legislação específica estabelecida pela Agência de Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), podem ser adicionados de nitritos e nitratos, nas formas de nitrito de potássio ou nitrito de sódio e nitrato de potássio ou nitrato de sódio, são: produtos cárneos frescos embutidos ou não (almondegas, kibes, lingüiças, empanados, carne bovina, suína, ovina, de aves temperadas, carne e miúdos temperados e/ou recheados, hambúrgueres, dentre outros); produtos cárneos secos, curados e/ou maturados embutidos ou não (lingüiças, carnes desidratadas, peles desidratadas, presunto cru, presunto tipo Parma, salames, copas, speck, brezaola, cortes maturados/curados, jerked beef, charque, pepperoni, paio tipo português dentre outros); produtos cárneos cozidos embutidos ou não (mortadela, salsicha, pastas, salsichões, morcelas, chouriços, presunto cozido, pão de carne, fiambres, galantinas, lanches de carne, lingüiças, cortes de carne, lombo tipo canadense, lombo de suínos, paios, lingüiça defumada, almôndegas, pratos prontos, barriga defumada (bacon), codeguino, empanados, apresuntados dentre outros); produtos cárneos salgados crus (cortes de carne, miúdos, carne de sol dentre outros); produtos salgados cozidos (mortadela, salsicha, pastas, salsichões, morcelas, chouriços, presunto cozido, pão de carne, fiambres, galantinas, lanches de carne, lingüiças, cortes de carne, lombo tipo canadense, lombo de suínos, paios, lingüiça defumada, almôndegas, pratos prontos, zampone, barriga defumada (bacon), codeguino, empanados, apresuntados dentre outros); conservas cárneas, mistas e semiconservas cárneas (mortadela, salsicha, apresuntado, carne em conserva, picadinho de carne, pastas, almôndegas, feijoada, dobradinha, molhos de carne, carnes com vegetais, língua de bovino enlatada, paio em banha, extratos de carnes, fiambres dentre outros (BRASIL, 1998).

Outra indústria de produtos de origem animal que pode fazer uso dos benefícios tecnológicos do nitrito é a indústria de laticínios. Nos laticínios, o nitrito atua como agente conservador, especialmente em queijos curados, como prevenção

ao chamado estufamento tardio, causado, geralmente, por *Clostridium tyrobutiricum* (LEVALLOIS & PHANEUF, 1994).

2.3 Toxicidade de nitritos e nitratos

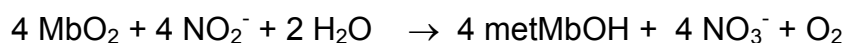
A principal preocupação decorrente da presença de nitratos nos alimentos ou na água potável tem dois motivos principais: os efeitos tóxicos produzidos por um excesso de nitratos na dieta; e podem causar a formação de N-nitrosocompostos, alguns deles com efeitos cancerígenos (como as nitrosaminas). Os nitratos não podem ser considerados compostos de alto risco em provocar intoxicações, apesar de existirem evidências de que podem interferir no metabolismo da vitamina A e nas funções da glândula tireóide. Assim a ingestão de nitratos em altas concentrações no alimento ou em baixas, mas com frequência considerável, pode tornar-se um risco de intoxicações por ser a presença do íon, o ponto de partida para a cadeia de reações que o converte em substâncias tóxicas, de grande importância em Saúde Pública, principalmente a população infantil (DUARTE & MÍDIO, 1996; RODRIGUES, 2001).

Alguns compostos N-nitrosos são agentes teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos, altamente perigosos para a saúde humana. Originam-se, como consequência da reação das aminas secundárias (aromáticas e alifáticas) com o ácido nitroso HONO (VEJA & BONTUOX, 1997).

Forma-se uma grande variedade destes compostos, sendo os mais significativos do ponto de vista da toxicologia alimentar as dialquilnitrosaminas (dimetilnitrosamina, dietilnitrosamina), as nitrosaminas de estrutura cíclica (N-nitrosopiperidina, N-nitrosopirrolidina) e acilalquil-nitrosaminas ou nitrosamidas (nitrosoguanidina). A reação de formação das nitrosaminas pode ocorrer nos alimentos e *in vivo* (YORDANOV, NOVAKOVA & LUBENOVA, 2001).

Em 1956 foi descoberto o efeito carcinogênico das nitrosaminas. Depois disso, um grande número de trabalhos tem sido desenvolvidos para aperfeiçoar as técnicas de dosagem das nitrosaminas; e definir suas condições de formação nos produtos cárneos (RODRIGUES, 2001). Em 1973, foi proposto um mecanismo explicativo para interação entre a molécula de hemoglobina e o íon nitrito. Esse mecanismo baseia-se no processo de oxidação da oximioglobina em

metamioglobina pelo íon nitrito acompanhado pela produção simultânea autocatalítica do íon nitrato. Esse mecanismo proposto, seria representado pela seguinte equação:



Apesar de todos os riscos relacionados à toxicidade dos íons nitritos, os especialistas têm mantido a utilização dos nitritos e nitratos na quase totalidade dos produtos cárneos, e a razão desta prática tecnológica, é a presença da bactéria patogênica *C. botulinum*, agente causadora do botulismo. O risco devido ao botulismo, é mais evidente e visível do que o risco de formação de nitrosaminas (RODRIGUES, 2001).

Em adultos sadios, os nitratos e nitritos são absorvidos no trato gastrointestinal, sendo que o nitrato é rapidamente excretado pela urina. Os nitritos, por sua vez, combinam-se com a hemoglobina, transformando-a em metemoglobina, por processo de oxidação do íon férrico no complexo porfirínico. A metemoglobina é incapaz de transportar oxigênio, mas a enzima NADH-metemoglobina redutase (NADH-diaforase) presente nos eritrócitos converte-a novamente em hemoglobina. A NADH-metemoglobina redutase mantém a metemoglobina em uma concentração na qual em condições fisiológicas normais não supera 2,0% dos pigmentos hemoglobínicos totais. Quando há um aumento da ingestão de nitratos e nitritos, essa concentração pode ser alterada, podendo ocorrer distúrbios graves. Com 10,0% pode aparecer cianose assintomática; entre 20,0% e 30,0% há aparecimento de cianose, com sinais de hipoxia, astenia, dispnéia de esforço, cefaléia, taquicardia e inconsciência. Concentrações superiores a 50% podem ser fatais (RODRIGUES, 2001; ROCHA, 2001).

Crianças com menos de três meses de idade, por apresentarem deficiência fisiológica transitória de metemoglobina redutase ou de seu co-fator NADH podem até morrer com a ingestão de doses inadequadas de nitratos e nitritos (OHSE et al., 2002).

2.4 Limites de utilização de nitritos e nitratos segundo a legislação

Nitritos e nitratos têm sido usados por séculos na cura da carne. Os limites máximos permitidos não estão bem definidos e são muito divergentes entre diversos autores e países. A Organização para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde vêm estabelecendo e modificando os valores para esses limites ao longo dos anos. Os valores de ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida pelo Comitê FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) para nitrato e nitrito são de 0-3,7 mg de íon nitrato kg^{-1} de peso corpóreo e de 0-0,07 mg de íon nitrito kg^{-1} de peso corpóreo, respectivamente (WHO, 2003). Estudos mostram que a IDA de nitratos, fixada pelo Comitê Conjunto de Experts da FAO/OMS em 1995, pode ser atingido apenas com uma dieta rica em verduras. Além disso, os especialistas da FAO não estabeleceram limites para as verduras, alguns Estados membros a princípio, e posteriormente a Comissão Européia, fixaram níveis máximos de nitratos para determinadas verduras. É difícil estimar um valor médio de ingestão de nitratos porque este depende da dieta individual e do conteúdo de nitratos da água potável, que também varia entre regiões, e inclusive entre estas, devido as estações do ano (VEGA; BONTUOX, 1997).

Para alguns vegetais, autores reportam esses limites de nitrato variando (em massa fresca) de 1000 mg kg^{-1} na Itália, 2000 mg kg^{-1} na Alemanha, entre 2500 mg kg^{-1} a 4500 mg kg^{-1} para alface e 2000 mg kg^{-1} a 3000 mg kg^{-1} para espinafre na França. Já na Iugoslávia, foi estabelecido o valor máximo de 50 mg kg^{-1} de nitrato de potássio para alimentos infantis preparados com vegetais (AFSSA, 2003). Entretanto, há que ser considerado na Ingestão Diária Aceitável (IDA) o tipo, a quantidade e os sistemas de cultivo do alimento ingerido, além da idade do consumidor, entre outros fatores (OHSE, 2000; AFSSA, 2003).

A comunidade européia estabeleceu como limite máximo permitido para alface produzida em estufa, teores de nitrato de 3500 mg kg^{-1} para o período de verão, 4500 mg kg^{-1} para o período de inverno e 2500 mg kg^{-1} o limite máximo permitido para alface produzida em campo aberto (McCALL; WILLUMSEN, 1998). Na Alemanha o limite é de 2000 mg kg^{-1} , na Áustria é de 1500 mg kg^{-1} e na Suíça é 875 mg kg^{-1} . As variações encontradas, não só se devem aos efeitos dos diversos fatores que regulam o acúmulo de nitrato nas plantas, mas também à variação dos métodos utilizados para análise de nitrato (OSHE, 2002).

A ingestão total estimada de nitratos dos alimentos varia entre 50 e 150 mg/pessoa/dia. Os vegetarianos apresentam uma ingestão maior, da ordem de 200 mg dia⁻¹, mas esta estimativa pode variar dependendo do tipo de verdura consumida (VEGA; BONTOUX, 1997)

Estabeleceu-se sobre a base do NNOEA (Nível de Não Observação de Efeitos Adversos) a quantidade de 370 mg de íons nitrato kg⁻¹ por peso corporal/dia obtido em um estudo à longo prazo com ratos e um fator de segurança de 10. Estabeleceu-se também sobre a base do NNOEA (Nível de Não Observação de Efeitos Adversos) a quantidade de 5,4 mg de íons nitrito kg⁻¹ de peso corporal/ dia obtido em estudos de toxicidade de 90 dias em ratos, nos quais observou-se hipertrofia da zona glomerulosa adrenal; e 6,7 mg de íons nitrito kg⁻¹ de peso corporal em um estudo de toxicidade de dois anos em ratos em que se observaram efeitos tóxicos no coração e pulmões, utilizando um fator de segurança de 100. Esse último valor de IDA aplica-se as crianças menores de três meses (RODRIGUES, 2001).

Os Padrões Nacionais da Filipina (1993) estabelecem um limite residual máximo para nitrito em produtos cárneos curados de 125 mg kg⁻¹ e uma taxa de incorporação máxima de 200 mg NO₂ kg⁻¹. Relatos locais de envenenamento por NO₂ devido a carnes curadas, incluem, a intoxicação de crianças que se alimentaram de toucinho contendo níveis entre 400 e 1000 mg NO₂⁻¹ kg de toucinho. Outro relato de envenenamento por NO₂ envolveu 32 casos incluindo o consumo de molho de carne contendo 9885 mg NO₂ kg⁻¹ e até 2285 mg NO₃ kg⁻¹ (AZANZA; RUSTIA, 2004)

No Brasil são encontrados limites máximos de nitrito de sódio residual e final em produtos curados e cozidos de 150 mg kg⁻¹ e limites máximos para adição de nitrato durante a preparação de 300 mg kg⁻¹ segundo a Portaria n.º 1004 de 11 de dezembro de 1998 – MS –SVS (BRASIL, 1998). Os sais de utilização permitidos são: nitrito de potássio, nitrito de sódio, nitrato de potássio e nitrato de sódio.

Um estudo envolvendo amostras de salsicha, que é um dos embutidos cárneos mais vendidos no Brasil, foi conduzido por Melo Filho e Bisvontini (2002). Os autores avaliaram os teores de nitrito residual e nitrato em amostras de salsichas comercializadas na região metropolitana de Recife. Os resultados mostraram que 67,0% das salsichas de feiras livres (18,0% do total geral pesquisado) estavam acima do limite máximo permitido para nitritos; e os teores médios de nitrato, foram

também superiores ao valor máximo permitido em 17,0% das amostras do grupo de indústrias da região sul do país, 67,0% das amostras do grupo de salsichas produzidas em indústrias da região nordeste e 83,0% das amostras no grupo de salsichas cuja produção era desconhecida (feiras livres). Os autores concluíram que os níveis de nitrato e nitrito encontrados significam um risco à saúde da população e que a produção e comercialização desses embutidos não são submetidas a uma inspeção e fiscalização rígidas para garantir a qualidade do produto e segurança do consumidor.

Embora o controle de nitritos e nitratos esteja até o momento principalmente voltado para os produtos cárneos curados, as principais fontes de ingestão de nitrato pelo homem são os vegetais, chegando a 90,0% do total ingerido. Laitinen et al. (1993) mostraram que 86% da ingestão de nitrato pelos finlandeses advêm dos vegetais, com um consumo diário médio de 54 mg de NO_3^- por pessoa. Enquanto que Dich et al. (1996) revelaram que 92% da ingestão diária de NO_3^- na dieta dos finlandeses é oriunda dos alimentos vegetais, sendo o consumo médio diário por pessoa de 78 mg de NO_3^- . Borawska, Marikiewicz, Witkowska (1998) encontraram valor médio de ingestão diária por pessoa de 85 mg de NO_3^- . Petersen e Stolze (1999) estimaram a média de ingestão diária de nitratos oriundos somente de produtos hortícolas como 40 mg dia^{-1} e para nitrito, 0,09 mg kg^{-1} , com um total estimado de 61,0 mg kg^{-1} e 0,50 mg dia^{-1} , respectivamente para NO_3^- e NO_2^- . Tais valores variam de acordo com os hábitos alimentares de cada região ou devido ao aumento do consumo de vegetais ou ainda, pelo uso excessivo de adubos nitrogenados (OHSE, 2002).

No Brasil, ainda não existe uma legislação específica que regulamente os Limites Máximos Permitidos ou IDA para nitritos e nitratos em alimentos de origem vegetal, apenas para produtos cárneos e águas minerais ou naturais. Para as águas minerais e naturais, assim como para águas envasadas e gelo os limites são de 50 mg L^{-1} de nitrato (calculado como nitrato) e 0,02 mg L^{-1} de nitrito (calculado como nitrito) (BRASIL, 1998; 1999; 2005).

2.5 Vegetais hidropônicos

O nitrato está naturalmente presente nos vegetais como fonte de nitrogênio para seu crescimento, sendo que seu teor depende de fatores genéticos, da disponibilidade desse nutriente para a planta e de fatores ambientais. Estima-se que mais de 70,0% do nitrato ingerido diariamente pelo homem são fornecidos pelos vegetais (GUADAGNIN, 2004).

O teor de nitrato nos tecidos vegetais é determinado por vários fatores, com destaque para: luminosidade, disponibilidade de nitrato e molibdênio, interação de nutrientes, tipos e fontes de adubos nitrogenados. A concentração de nitrato depende da temperatura, umidade relativa do ar, do horário da colheita, do sistema de cultivo, do estágio de maturação, da parte e espécie da planta (AMR & HADIDI, 2001; GENT, 2003). Embora a toxicidade do íon nitrato seja considerada baixa, sua fácil conversão a nitrito, faz com que este represente alto risco à saúde. A presença de nitrato em vegetais deve-se, em grande parte, ao nitrato adicionado ou formado no meio nutriente, sendo que o suprimento de nitrogênio é o mais importante fator nutricional que afeta o acúmulo de nitrato em vegetais. Via de regra, aumentando-se o nível da nutrição nitrogenada aumenta-se a concentração de nitrato nos vegetais (MAYNARD et al., 1976).

A concentração de nitrato nos vegetais varia dentro de uma extensa faixa. Vegetais verdes folhosos tais como espinafre e alface, e raízes como rabanete e beterraba, destacam-se por acumularem elevados teores de nitrato, geralmente superiores a $1000,0 \text{ mg kg}^{-1}$ do produto seco, enquanto, batata, cebola e tomate, geralmente contém menos que $200,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (MAFF, 1987). Em vegetais danificados, ou durante o armazenamento em condições inadequadas (temperatura elevada e períodos prolongados) há uma tendência de redução do teor de nitrato, enquanto a concentração de nitrito aumenta. Essa conversão do nitrato a nitrito pode decorrer da ação de redutases endógenas ou da presença de redutases exógenas (provenientes de bactérias nitrato-redutoras). A refrigeração é capaz de retardar o processo redox mas não de impedi-lo totalmente (FLETCHER et al., 1987).

Em geral, a concentração de nitritos em vegetais frescos é baixa, menor do que $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ do produto. Alguns produtos vegetais, como vegetais fermentados ou *picles*, podem conter teores bem maiores de nitrito ($400,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e também de nitratos ($500,0 \text{ mg kg}^{-1}$) (HOTCHKISS et al., 1992).

Tanto no sistema convencional quanto no hidropônico, é permitido o uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos altamente solúveis, o que pode alterar a composição e qualidade dos alimentos. A utilização destes produtos pode promover a contaminação do meio ambiente e a intoxicação do produtor e do consumidor (CARMO JR., 2002). O sistema de cultivo orgânico está baseado nos princípios do desenvolvimento sustentável: ecologicamente correto, economicamente viável e socialmente justo. O maior benefício do alimento obtido pelo sistema de cultivo orgânico está baseado em práticas culturais que melhoram o solo e têm o mínimo impacto ambiental (BOURN & PRESCOTT, 2002).

Guadagnin (2004) avaliou o teor de nitrato em hortaliças folhosas (agrião, alface e rúcula) produzidas por diferentes sistemas de cultivo (convencional, orgânico e hidropônico) e estimou a ingestão diária de nitrato, proveniente do consumo desses vegetais, pela população da região de Campinas, estado de São Paulo. O autor encontrou a seguinte ordem para os teores médios de nitrato na alface e na rúcula: sistema orgânico < cultivo convencional < sistema hidropônico. Para o agrião não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os cultivos orgânico e hidropônico que foram, superiores ao do cultivo convencional. O autor concluiu que dentre as hortaliças estudadas, as cultivadas por hidroponia são as responsáveis pela maior contribuição na ingestão de nitrato (8,6% do valor de IDA estabelecida para este íon (3,7 mg de íon nitrato kg⁻¹ de peso corporal por dia).

Stertz (2004) avaliou os teores de nitrito e nitrato de hortaliças cultivadas por diferentes sistemas e comercializadas na região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná. A concentração de nitritos e nitratos nas culturas analisadas, apresentaram a seguinte relação: alface, tomate cereja e tomate salada na ordem: orgânico < convencional < hidropônico; espinafre, morango e batata na ordem: orgânico < convencional; agrião na ordem: convencional < hidropônico < orgânico; couve-flor, cenoura e pepino na ordem: convencional < orgânico. As culturas que apresentaram as maiores concentrações de nitritos e nitratos foram: agrião (498,37 mg kg⁻¹ convencional, 3259,59 mg kg⁻¹ orgânico e 2623,60 mg kg⁻¹ hidropônico); alface (798, 86 mg kg⁻¹ convencional, 459,98 mg kg⁻¹ orgânico e 1778,64 mg kg⁻¹ hidropônico); espinafre (1376,53 mg kg⁻¹ convencional e 877,73 mg kg⁻¹ orgânico); e a cenoura (710,35 mg kg⁻¹ convencional e 1026,68 mg kg⁻¹ orgânico).

Miyazawa et al. (2001) avaliaram 101 amostras de alface obtidas através de três diferentes sistemas de cultivos. O teor de nitratos nas folhas de alface variaram

de 250,0 a 11600,0 mg kg⁻¹ (matéria seca) e acompanhou a ordem de concentração conforme o sistema de cultivo: orgânico < convencional < hidropônico. Segundo os autores, a crescente tecnificação da agricultura gerou distúrbios nas plantas, que não são adaptadas a intensas adubações para o aumento da produtividade principalmente, em hortaliças folhosas (espinafre, brócolis, couve, alface, agrião).

2.6 Métodos para determinação de nitritos e nitratos

Muitos métodos espectrofotométricos têm sido relatados na literatura para quantificação de nitritos e nitratos. Dentre os métodos espectrofotométricos reportados está a reação de Griess como método oficial da Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Nessa determinação ocorre uma reação de diazotação dos nitritos com o ácido sulfanílico e acopamento com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540 nm (AOAC, 1984; BRASIL, 1999;). Este método requer um controle cuidadoso da acidez para cada etapa do processo e resulta em produtos carcinogênicos (SREEKUMAR et al., 2003). Em geral, esta técnica oferece um método simples e efetivo de detecção de nitritos em uma variedade de matrizes, menos complexas do que determinados alimentos. Antioxidantes (particularmente, ascorbato e sulfidril tióis) podem efetivamente destruir o ácido nitroso antes do tempo necessário para a reação com a amina aromática indicadora, levando a redução na recuperação do nitrito (MOORCROFT, DAVIS & COMPTON, 2001).

A determinação de nitritos é dificultada pelo fato desse íon ser instável sob uma variedade de condições. Além disso, as amostras de interesse são geralmente complexas (extratos de carnes processadas, por exemplo). Um método analítico direto é sempre útil para trabalhos de rotina, e seria conseqüentemente desejável (COX & KULESZA, 1984).

Vários métodos para determinação de nitritos baseiam-se nas variações de procedimento da diazotação de Griess, na qual uma coloração azo é produzida pela ligação de um sal diazônio com uma amina aromática ou fenol. Fatores como pH, temperatura natureza e concentração dos reagentes afetam a intensidade da cor final (NIKONOROV; MOSKVIN, 1995).

Um dos mais usados métodos para determinação de nitrato envolve primeiramente a redução à nitrito, seguido pela determinação do nitrito. O nitrito gerado é normalmente detectado usando espectrofotometria convencional mediante a reação de diazotização. Embora sejam populares, as técnicas espectrofotométricas para determinação de nitrito possuem um grande número de desvantagens, incluindo escala de concentração linear limitada, limites pobres de detecção (LOD) e protocolos experimentais complicados (NIKONOROV; MOSKVIN, 1995; DOHERTY et al., 1996).

Uma revisão crítica às metodologias para determinação de nitratos e nitritos, não muito recente, mas muito interessante, com ênfase em produtos cárneos foi publicada por Usher e Telling (1975). O desempenho de agentes clarificantes alternativos para etapa de desproteínização da amostra e erros devido à presença de outros aditivos como o ascorbato, fosfato e sulfito são discutidos nesse trabalho. Os autores concluíram que o nitrito pode ser prontamente e corretamente determinado na maioria dos alimentos, mas que a quantificação de nitrato está sujeita a grandes variações e erros.

Por outro lado, as técnicas eletroquímicas até o momento utilizadas na determinação de nitratos e/ou nitritos estão baseadas principalmente na redução catódica direta desses anions em eletrodos de cobre e cádmio; na oxidação anódica do nitrito em eletrodos de carbono e platina; na medição da corrente catalítica observada para redução polarográfica dos íons de metais de transição, como o Mo (VI), na presença de nitrito ou nitrato; na eletroatividade do nitrito/nitrato em eletrodos quimicamente modificados; e finalmente, na reação química entre o analito e o reagente selecionado até que um produto da reação seja monitorado facilmente com um eletrodo (BERTOTTI & PLETCHER, 1997).

A detecção eletroquímica de nitratos e nitritos pode ser dividida em duas categorias. Essas podem ser amplamente agrupadas em voltamétrica e potenciométrica. Técnicas voltamétricas têm sido empregadas desde o início dos anos 1900, por meio do uso de eletrodos de cobre para reduzir íons nitrato eletroquimicamente. Uma ampla variedade de substratos de eletrodos vem sendo investigada e inclui: níquel, ligas cobre-níquel, cádmio, platina, carbono vítreo, ouro, chumbo, prata e mais recentemente, diamante dopado com boro. A redução direta de nitrato tem sido caracterizada pela baixa sensibilidade e geralmente marcada

pela irreprodutibilidade através de efeitos de passivação cumulativa do eletrodo (MOORCROFT, DAVIS & COMPTON, 2001).

2.7 Eletroquímica

Eletroquímica é o estudo da resposta química de um sistema à um estímulo elétrico. A ciência decorre das observações de cientistas em relação a perda de elétrons (redução) ou ganho de elétrons (oxidação) que um material sofre durante um estímulo elétrico. Essas reações de redução e oxidação são comumente chamadas de reações redox e podem fornecer informações sobre concentração, cinética, mecanismos de reação, status químico e outros comportamentos da espécie em solução. Informação semelhante também pode ser obtida de acordo como a superfície do eletrodo. O pesquisador que estuda sistemas eletroquímicos dispõe de uma perspectiva diferente daquelas obtidas com a espectroscopia e outras técnicas. Isto porque as técnicas eletroquímicas examinam diferentes fenômenos daqueles estudados com técnicas como a espectroscopia. Essa diferença deve incentivar o pesquisador a aprender e usar eletroquímica, desde que esta possa oferecer solução aos problemas que outras aproximações não podem (RILEY & WATSON, 1987).

Em um experimento eletroquímico podemos medir um ou mais dos quatro parâmetros: potencial (E), corrente (i), carga (Q) e tempo (t). A resposta de um sistema depende de quais parâmetros são usados como sinal de excitação. O potencial (E) é a quantidade de força eletroquímica ou a energia em um sistema. Quando o potencial aumenta, mais força está disponível para fazer uma reação acontecer. A unidade base para potencial é volt (V). A corrente (i) é a magnitude do fluxo de elétrons em um sistema. Sua unidade base é o ampere (A), mas a maioria dos experimentos eletroquímicos mede a corrente em microampere (10^{-6} amperes). A corrente catódica se deve a redução, enquanto a corrente anódica deve-se a oxidação. A carga (Q) é uma medida a número de elétrons usados por equivalente. Sua unidade base é o Coulomb (C). A carga pode ser mensurada diretamente ou calculada pela multiplicação do tempo e da corrente.

O tempo (t) é uma medida de duração. Sua unidade base é o segundo (s). Experimentos eletroquímicos exigem tanto tempos curtos, como são os

microsegundos, quanto tempos longos, como são os dias. A diferente combinação de parâmetros e tipos de eletrodos de trabalho (ET) resulta em uma longa lista de técnicas que incluem: voltametria, polarografia, voltametria cíclica, técnicas de varredura linear, cronoamperometria, cronopotenciometria, técnicas de pulso, e outras técnicas (PLAMBECK, 1982).

Dentre as múltiplas técnicas de análises, as eletroanalíticas destacam-se pela ampla faixa dinâmica de concentração e pela elevada sensibilidade proporcionada. As principais limitações são a baixa seletividade e as interferências de espécies que têm afinidade pela superfície do eletrodo, promovendo, desta forma, o bloqueio do sinal analítico ou o aparecimento de sinais indesejados (BANDEIRA, 2001; ROCHA, 2001).

As técnicas eletroquímicas de análise (com exceção da potenciometria) têm sido muito pouco exploradas como métodos analíticos de rotina. Estas técnicas apresentam baixo custo quando comparadas as técnicas espectrofotométricas (normalmente utilizadas) e, em alguns casos apresentam melhores resultados (COX & KULESZA, 1984; RODRIGUES, 1996; ROCHA et al., 2002).

A dificuldade na popularização das técnicas eletroquímicas entre os químicos analíticos, está, nas limitações devido ao eletrodo normalmente utilizado. Para popularizar a eletroquímica, como técnica analítica, tornou-se necessário a preparação de novos eletrodos de trabalho, assim denominados eletrodos quimicamente modificados (EQM), que apresentam na sua composição uma substância pré-concentradora ou eletroativa (O'SHEA et al., 1992; RODRIGUES, 1996; ROCHA et al., 2002;).

2.7.1 Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial (SKOOG & LEARRY, 1992). Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo

auxiliar (GREEF et al., 1988). O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial, é denominado voltamograma, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxiredução (reação 1), pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente, na célula eletroquímica:



onde O, na reação 1, corresponde a forma oxidada do analito e R a forma reduzida.

Um eletrodo atrai predominantemente espécies carregadas positivamente ou negativamente, que podem ou não reagir na sua superfície. Espécies neutras também interagem com o eletrodo via adsorção. A reação eletródica é composta por uma série de etapas e para se descrever qualquer processo eletródico deve ser considerado primeiro, o transporte das espécies até a superfície do eletrodo e segundo, a reação que ocorre no eletrodo. Assim, a corrente (ou velocidade de reação eletródica) é governada por processos como a transferência de massa (transferência da espécie do corpo da solução para a interface eletrodo-superfície); a transferência de carga (transferência de elétrons na superfície do eletrodo); as reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de elétrons que podem por sua vez ser homogêneos (protonação, dimerização etc) ou heterogêneos (decomposições catalíticas, adsorção, desorção, cristalização) (WANG, 1985).

O transporte de massa da solução ao eletrodo de trabalho é governado por três fatores: pela difusão (movimento devido à influência da concentração, isto é, da região de alta concentração para região de baixa concentração); pela convecção (movimento físico, devido à agitação, vibração ou gravidade); e, pela Migração (movimento de partículas ao longo de um campo elétrico) (PLAMBECK, 1982).

A corrente observada na interação do analito com o eletrodo (oxiredução) é a faradaica (denominada assim por obedecer a lei de Faraday), e é proporcional à concentração de analito ativo no seio da solução (Figura 2). O outro tipo de corrente, a corrente capacitiva, não é proporcional à concentração do analito e nem obedece à lei de Faraday (não-faradaica), é apenas uma corrente que é gerada devido a presença de um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, aumentando a carga da dupla camada elétrica (corrente transiente causada por mudanças na superfície

do eletrodo e da solução). Muito dos ganhos instrumentais obtidos nos últimos anos tem sido em função da diminuição da contribuição da corrente não-faradaica na corrente total medida (RILEY & WATSON, 1987).

A corrente capacitiva tornou, do ponto de vista analítico, uma técnica de voltametria clássica muito limitada para os dias atuais, pois não permitia que a mesma pudesse determinar espécies com concentrações abaixo de 10^{-4} a 10^{-5} mol L^{-1} . A atual análise de traços exige a determinação de concentrações da ordem de até 10^{-12} mol L^{-1} , ou mesmo menor (WANG, 1985).

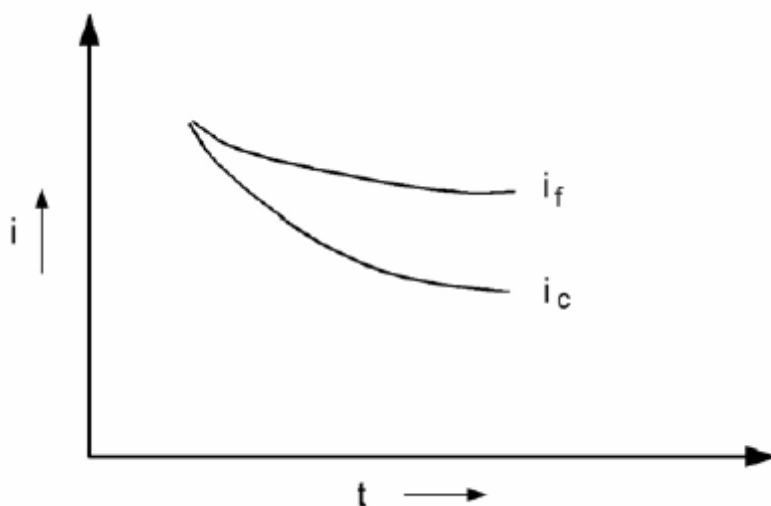


Figura 2. Variação da corrente em função do tempo em voltametria. O valor da corrente faradaica (i_f) diminui mais lentamente que o da corrente capacitiva (i_c) permitindo uma medida discriminatória entre elas.

Portanto, a razão para o baixo limite de detecção da voltametria clássica é porque a corrente faradaica, fica da mesma ordem ou menor do que a corrente capacitiva quando a sua concentração atinge valores da ordem de 10^{-4} a 10^{-5} mol L^{-1} , não sendo mais possível distingui-la da corrente de fundo. Desse modo, conseguindo-se discriminar essas correntes, a sensibilidade da técnica pode ser melhorada (PLAMBECK, 1982).

Para que seja possível determinar um analito por voltametria é necessário que o mesmo seja eletroativo, ou seja, que oxide ou reduza em uma região de potencial aplicado na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinamicamente ou cineticamente, criando-se um fluxo de elétrons (GREEF et al., 1985). Nesse caso, a corrente faradaica deve ser medida em um ambiente de

baixo ruído, que é formado pelas correntes não-faradaicas e por correntes faradaicas resultantes de processos de oxiredução de outras espécies na solução da cela de trabalho (eletrólito de suporte e solvente, componentes da amostra, gases dissolvidos). No primeiro caso, as correntes não-faradaicas podem ser minimizadas pelo uso de eletrodos de pequena área superficial e pelo uso de um modo de aquisição de sinal (corrente) mais apropriados. No caso das correntes faradaicas não-específicas do analito, o uso de eletrodo polarizado garante que nenhuma transferência de carga possa ocorrer entre o eletrodo e a solução de eletrólito suporte em função do potencial aplicado. Muito embora nenhum eletrodo seja idealmente polarizado (transferência de carga na interface eletrodo-eletrólito suporte nula em todo o intervalo de potencial), eletrólitos suporte proporcionam comportamento polarizado para alguns eletrodos num intervalo limitado de potencial (janela de potencial de trabalho) (IVASKA, LEWENSTAM & SARA, 1988). A seletividade do eletrodo em condições experimentais específicas também evita que a corrente faradaica proveniente de substâncias potencialmente interferentes se manifestem.

O potencial aplicado no eletrodo de trabalho atua como a força motriz para a reação eletroquímica. É o potencial controlado que possibilita a espécie presente na solução ser oxidada ou reduzida na superfície do eletrodo. Na medida que o potencial se torna mais negativo, o eletrodo se torna uma fonte de elétrons favorecendo a redução das espécies na interface solução-eletrodo. No caso de um potencial mais positivo a oxidação das espécies será favorecida. Por esta razão, quando se faz uma varredura de potencial no sentido negativo usa-se a denominação de varredura catódica, enquanto que uma varredura de potencial no sentido positivo é a varredura anódica (WANG, 1985).

A corrente elétrica surge quando o potencial aplicado atinge um valor tal que permite a reação de oxiredução do analito. Se essa corrente elétrica for proporcional à quantidade das espécies que reagem, pode-se fazer uso desse fenômeno do ponto de vista analítico quantitativo (PLAMBECK, 1982).

A corrente faradaica, i , proveniente da oxiredução do analito na superfície do eletrodo é, dada por:

$$i = zF \, dn/dt \quad (2)$$

sendo: z um número inteiro de sinal e magnitude da carga iônica da espécie eletroativa

F a constante de Faraday (96.484,6 C)

dn/dt a taxa de variação de mols da espécie eletroativa

Considerando-se a taxa de variação dn/dt como o produto entre o fluxo de espécies eletroativas (J) e a área da seção reta (A), tem-se que a corrente instantânea é:

$$i = zFAJ \quad (3)$$

Ao contrário da polarografia clássica com eletrodo gotejante, na voltametria com eletrodo estático, no qual a área do eletrodo se mantém constante, tem-se que A é independente do tempo (PLAMBECK, 1982).

Na voltametria, as espécies ativas chegam no eletrodo primariamente por difusão, pois outras formas de transporte de massa são propositalmente limitadas. Nesse caso J é dependente do tempo e é descrito pela primeira lei de Fick, que descreve J como o produto entre o coeficiente de difusão, D , multiplicado pela variação de concentração na interface eletrodo-solução (no qual a distância, x , entre a superfície do eletrodo e a solução é zero)

$$J = D \frac{dc^0}{dx} \quad (4)$$

Assim a corrente é limitada por difusão ou está sob controle difusional. As espécies envolvidas no processo são iônicas (fluxo envolvendo transferência de carga) e a corrente pode ser expressa por:

$$i = zFA D \frac{dc^0}{dx} \quad (5)$$

Similarmente, se o fluxo de espécies para o eletrodo não envolve transferência de carga (transferência de cátions ou ânions) mas é adsorptivo, tem-se um processo heterogêneo cineticamente controlado. A adsorção é um processo heterogêneo e o fluxo de espécies eletroativas pode ser descrito como uma etapa

cinética de primeira ordem (Equação 6). Nesse caso tem-se também uma relação em que a corrente é proporcional à concentração da espécie de interesse.

$$i = zFAk_h c^0 \quad (6)$$

sendo: k_h uma constante de velocidade heterogênea

c^0 concentração superficial de espécies na superfície do eletrodo em um dado instante.

Como na camada externa, existe um gradiente de concentração aproximadamente constante (Figura 3), o que dc/dx é igual à diferença entre a concentração de analito na dupla camada e a concentração no seio da solução ($c - c^0$) dividido por dx , que equivale à largura da camada difusa (δ), assim:

$$dc/dx = (c - c^0)/\delta \quad (7)$$

Substituindo (7) em (5), tem-se:

$$i = zFA D (c - c^0)/\delta \quad (8)$$

Quando a corrente é limitada por difusão, o material que chega à superfície do eletrodo é imediatamente reduzido ou oxidado mantendo sua concentração, c^0 , nula. Assim, a Equação 8 pode ser simplificada para:

$$i = -zFA D_{Ox} c_{Ox}^0/\delta \quad (9)$$

no caso do processo anódico, e para:

$$i = zFA D_{Red} c_{Red}^0/\delta \quad (10)$$

no caso de um processo catódico. Desde que δ é limitado por convecção, pode ser considerada constante.

Para sistemas controlados pelas leis da termodinâmica, o potencial do eletrodo (E) pode ser usado para estabelecer a concentração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo, de acordo com a equação de Nernst:

$$E = E^{\circ} + 2,3RT/nF \times \log (c_{Ox}/c_{Red}) \quad (11)$$

sendo:

E° o potencial padrão da reação

R a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T a temperatura absoluta

n o número de mols elétrons transferido na reação, e

c_{Ox} e c_{Red} são as concentrações superficiais das espécies oxidada e reduzida, respectivamente.

A corrente resultante de uma reação de oxiredução é faradaica (a reação de n mols de substância envolve a transferência de $n \times 96.487$ coulombs), e esta reação não é homogênea em toda a solução, pois todo este processo acontece na interface entre a solução e o eletrodo de trabalho. A corrente irá então depender de dois fatores: a velocidade na qual as espécies se movem do seio da solução para a superfície do eletrodo (transporte de massa) e a velocidade na qual os elétrons são transferidos do eletrodo para a espécie em solução e vice-versa (transferência de carga) (RILEY & WATSON, 1987). Sendo a concentração das espécies ativas proporcionais à corrente, tem-se que:

$$E = E^{\circ} + 2,3RT/nF \times \log [(-i_{Ox}\delta/zFAD_{Ox}) / (i_{Red}\delta/zFAD_{Red})] \quad (12)$$

Como D_{Ox} é aproximadamente igual a D_{Red} , tem-se:

$$E = E^{\circ} + 2,3RT/nF \times \log (-i_{Ox}/i_{Red}) \quad (13)$$

Assim, tem-se a relação entre o potencial aplicado e a corrente de difusão ou faradaica que por sua vez pode ser relacionada com a concentração das espécies de interesse (PLAMBECK, 1982).

A forma na qual o potencial é aplicado, e por conseqüência a forma como o sinal analítico (corrente) é adquirido, irá denominar o tipo de técnica voltamétrica em questão. As formas mais comuns de aplicação deste potencial estão sintetizadas na Figura 3, bem como a forma de resposta da corrente resultante. O modo de aquisição repercute na sensibilidade do método principalmente devido à magnitude da corrente capacitiva observada para cada caso e também na seletividade devido ao formato do voltamograma e à largura dos pulsos de resposta medidos. Além do modo de aquisição, os métodos voltamétricos variam de acordo com as etapas utilizadas antes ou durante a medida do sinal, tais como a pré-concentração de analito (proveniente da capacidade do analito em reagir ou adsorver com o material do eletrodo de trabalho) ou direção ou inversão da direção da varredura de potencial. A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa/qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho.

2.7.1.1 Voltametria de Varredura Linear

Na voltametria de varredura linear, também chamada de cronoamperometria de varredura de potencial linear, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia linearmente com o tempo. Esta técnica possibilita a aplicação de velocidades de varredura relativamente altas (até $1000,0 \text{ mV s}^{-1}$), no entanto não é um técnica muito sensível (RILEY & WATSON, 1987).

Na maioria dos experimentos eletroquímicos, as espécies estudadas devem estar em um eletrólito suporte condutor, o qual deve estar livre do oxigênio, e não deve ser agitado. O potencial aplicado é plotado no eixo das abcissas x e a corrente resultante no eixo das coordenadas y. Todos os potenciais são especificados em relação ao eletrodo de referência (WANG, 1985).

A corrente é lida de forma direta, em função do potencial aplicado, desta forma a corrente total lida possui contribuições tanto da corrente faradaica (desejável) quanto da corrente capacitiva (ruído), o que prejudica em muito a

aplicação desta técnica para aplicações quantitativas. Os limites de detecção obtidos por essa técnica, nas estimativas mais otimistas, são da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹ (GREEF et al., 1985).

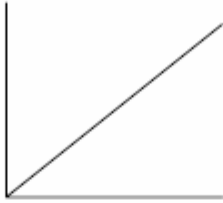

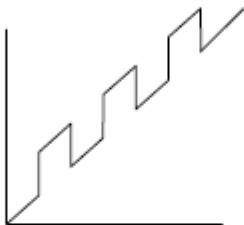
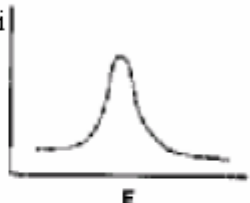
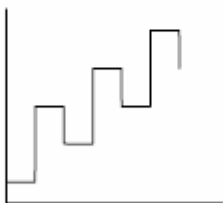
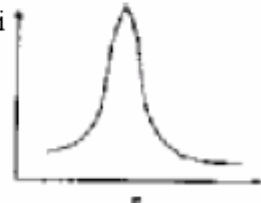
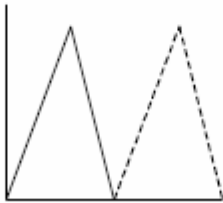
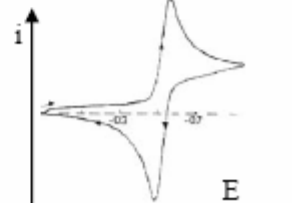
Tipo de voltametria	Sinal de excitação	Corrente resultante
varredura linear		
pulso diferencial		
onda quadrada		
Voltametria cíclica		

Figura 3. Forma de aplicação do potencial (E) para cada tipo de voltametria e corrente resultante (i).

2.7.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação da corrente faradaica da capacitiva viria a ser conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. A instrumentação foi desenvolvida de tal modo

que medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial fossem realizados em intervalos de tempo muito pequenos (RILEY & WATSON, 1987). Na Figura 4 são apresentados os dois sinais de excitação mais comuns para aparelhos comerciais de polarografia. No primeiro tipo (Figura 4A), ocorre a sobreposição de pulsos periódicos sobre uma rampa linear. Esta forma de excitação é utilizada em equipamentos analógicos. O segundo tipo (Figura 4B) é usado em equipamentos digitais, nos quais combina-se um pulso de saída com um sinal em degrau.

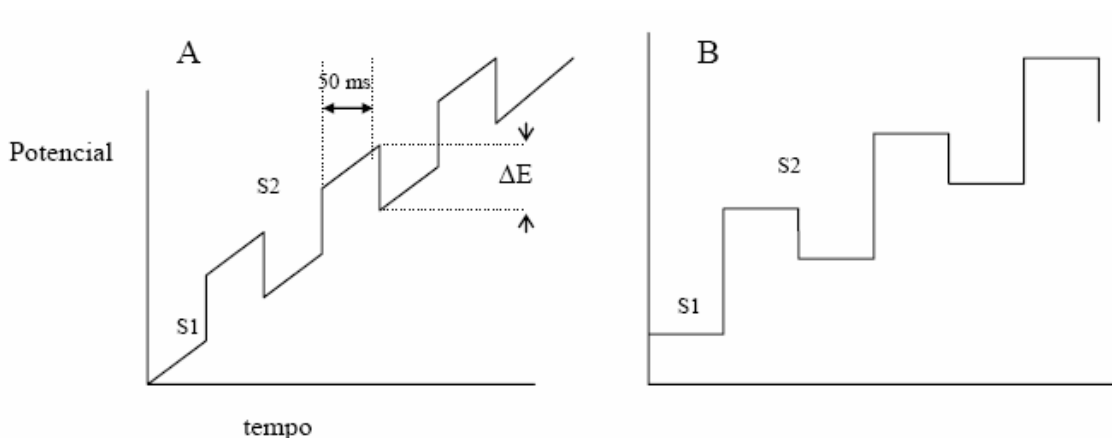


Figura 4. Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial.

A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S1) e outra ao final do pulso (S2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado, o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cuja área é diretamente proporcional à concentração do analito, de acordo com a equação:

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad (14)$$

sendo:

i_p = corrente do pico (μA),

n = número de elétrons envolvidos na reação redox ,

F = constante de Faraday (coulombs),

A = área do eletrodo (cm^2),

t_m = tempo entre o segunda e a primeira leitura de corrente (s),

D = coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$),

C = concentração do analito (mmol L^{-1}),

$\sigma = \exp(nF/RT \Delta E/2)$, e

ΔE = amplitude do pulso.

O pico de potencial (E_p) pode também ser usado para identificar as espécies, uma vez que estes picos aparecem próximos ao potencial de meia-onda da correspondente análise polarográfica:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2 \quad (15)$$

O objetivo de se fazer duas leituras da corrente e se trabalhar com a diferença entre elas é fazer a correção da corrente capacitiva. À medida que se aplica o pulso, ocorre um acréscimo da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradaica. Removendo-se o pulso, a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente. Escolhendo-se um tempo apropriado para se fazer a segunda leitura, faz-se a leitura da corrente total, a um valor de corrente, no qual a contribuição da corrente capacitiva (não-faradaica) pode ser desconsiderada. Desvinculando-se o valor da primeira leitura de corrente da segunda leitura, obtém-se uma minimização da contribuição da corrente de fundo. Esta correção de correntes possibilitada pelo modo de pulso diferencial permite obter limites de detecção da ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (RILEY & WATSON, 1987).

2.7.1.3 Voltametria de ondas quadradas (SWV)

Na voltametria de onda quadrada (do inglês, *square-wave*) uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada (*staircase*) caracterizada pela amplitude ΔE_s , largura a e período τ é aplicada ao eletrodo de trabalho, como representado na Figura 5. A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outro ao final do pulso reverso (que ocorre no meio do “degrau” da onda *staircase*), onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. Assim como na voltametria de pulso diferencial, esta dupla amostragem da corrente garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total lida (WANG, 1985).

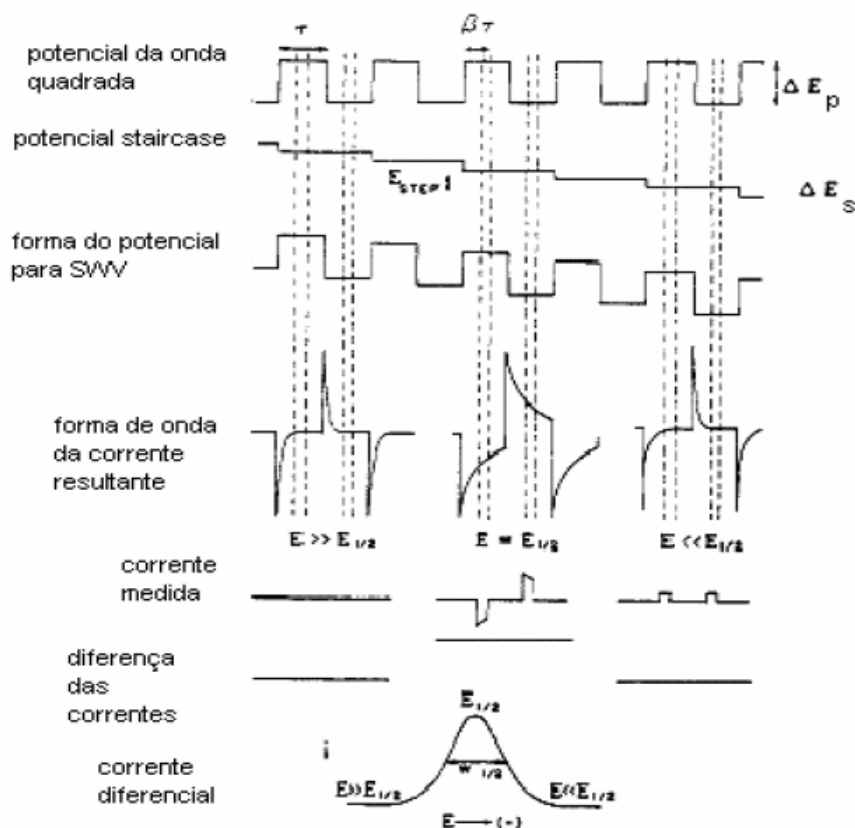


Figura 5. Representação esquemática da voltametria de onda quadrada (SWV).
Fonte: WANG (1985).

O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado. Na Figura 5 está também representado o pico corrente resultante da voltametria de onda quadrada, o pico é caracterizado por um potencial $E_{1/2}$ e largura $W_{1/2}$. A sensibilidade desta técnica é comparável com a proveniente da voltametria de pulso diferencial. A maior vantagem desta técnica é a velocidade de aquisição dos dados. Freqüências de 1 a 100 ciclos de onda quadrada por segundo permitem o uso de velocidades de varredura de potencial extremamente rápidas. Enquanto na voltametria de pulso diferencial a velocidade de varredura varia de 1 a 10 mV s^{-1} , na voltametria de onda quadrada esta velocidade varia de 100 a 1000 mV s^{-1} , o que diminui o tempo de análise de cerca de 3 a 5 minutos para alguns poucos segundos (3 a 10 s) sem haver perda da resolução dos picos (PLAMBECK, 1982).

Embora a voltametria de pulso diferencial seja a técnica mais usada para fins analíticos, devido às vantagens de detectabilidade e da resolução frente as técnicas de corrente contínua, ao lado dela está a técnica de voltametria de onda quadrada. Esta é muito conveniente do ponto de vista analítico e tem sido incorporada em diversos instrumentos comerciais, em especial, a voltametria de onda quadrada de varredura rápida. Ainda que a voltametria de onda quadrada tenha surgido em 1957 devido aos estudos de Baker, a utilização da técnica era limitada pela tecnologia eletrônica. Com os progressos da tecnologia analógica e digital, ela passou a ser incorporada nos polarógrafos a partir dos anos 80, principalmente na sua forma de varredura rápida. Nessa forma ela é também chamada de voltametria de onda quadrada de Osteryoung, atribuída ao nome do pesquisador americano que a desenvolveu (IVASKA, LEWENSTAM & SARA, 1988) .

De modo semelhante à técnica de pulso diferencial, a voltametria de onda quadrada produz picos para processos faradáicos, cuja altura é proporcional à concentração da espécie eletroativa (GREFF et al., 1985).

2.7.1.4 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos (RIPLEY & WATSON, 1987).

Inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre. Com o aumento do potencial para regiões mais negativas (catódicas) tem início a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução é observada, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial. No caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos (WANG, 1985).

Existem dois componentes principais que determinam as reações que ocorrem no eletrodo, existe a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo, e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo, em alguns casos ainda podem ocorrer reações químicas acopladas a algum destes processos. A equação de Butler-Volmer (16), que é básica da cinética eletroquímica, expressa estas relações.

$$\frac{i}{nF} = Ca_{(0,t)}K_s \exp\left[-\frac{\alpha n_a F}{RT}(E_{pc} - E^o)\right] - Cb_{(0,t)}K_s \exp\left[\frac{(1-\alpha)n_a}{RT}(E_{pc} - E^o)\right] \quad (16)$$

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, a equação de Butler-Volmer se reduz na equação de Nernst (11), pois como a cinética da reação de transferência de carga é rápida ($K_s > 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$), apenas a etapa de transferência de massa irá ditar as regras do processo. A corrente do pico (em amperes) neste caso, é dada por:

$$i_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (17)$$

sendo que n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}) (RILEY & WATSON, 1987).

Para uma reação reversível a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. Outros critérios para reversibilidade são a razão da corrente de pico anódico e catódico igual a unidade e independente de v , o potencial de pico não variando com a velocidade de varredura de potencial e a razão $i_p/v^{1/2}$ constante e independente de v . Quando a velocidade de transferência de carga é lenta comparada com a velocidade de varredura ($K_s < 10^{-5} \text{ cm/s}$) as concentrações das espécies oxidadas (O) e reduzidas (R) não serão mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto, um comportamento nerstiano. Neste caso, os termos α (coeficiente de transferência) e K_s (velocidade de transferência de carga) devem ser considerados. Nestas circunstâncias, a equação que descreve a corrente de pico (i_{pc}) é dada por:

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (18)$$

Nestes casos, o voltamograma costuma apresentar apenas pico anódico, que irá deslocar-se como aumento da velocidade de varredura. Além

disso, este pico varia também com α e K_s (PLAMBECK, 1982). Para uma reação eletrodica quase-reversível ($10^{-1} > K_s > 10^{-5}$ cm/s) a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga. A equação de Nernst é apenas aproximadamente satisfeita.

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na Figura 6, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução sem agitação, usando um potencial em forma de triângulo (Figura 6a). Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente versus o potencial aplicado. Em alguns casos, instrumentos digitais não possuem este mesmo padrão de aplicação de potencial. Porém, o potencial é aplicado na forma de escada (*staircase*) como pode ser visto na Figura 6b, com degraus de potenciais pequenos (da ordem de 10 mV) e tempo de duração pequeno (50 ms), onde a corrente é lida apenas no final deste intervalo. Esse método *staircase* substitui a contento a varredura linear. O objetivo desta variação é conseguir uma minimização da contribuição da corrente capacitiva na corrente total. Como as etapas de potencial são pequenas, as equações para as respostas da voltametria cíclica *staircase* são consideradas como idênticas das provenientes da voltametria cíclica de varredura linear (IVASKA, LEWENSTAM & SARA, 1988).

2.8 Células eletroquímicas

As células eletroquímicas utilizadas em voltametria são do tipo eletrolítica e podem ter dois ou três eletrodos. HEYROVSKY utilizou uma célula de dois eletrodos e durante muito tempo usou-se apenas esse tipo de célula. Na célula de dois eletrodos (Figura 7), tem-se um eletrodo de trabalho de superfície pequena. O potencial é aplicado no eletrodo de trabalho frente ao de referência, usualmente um eletrodo de calomelano saturado, de área superficial grande, para que apenas o eletrodo de trabalho polarize (GREEF et al., 1985).

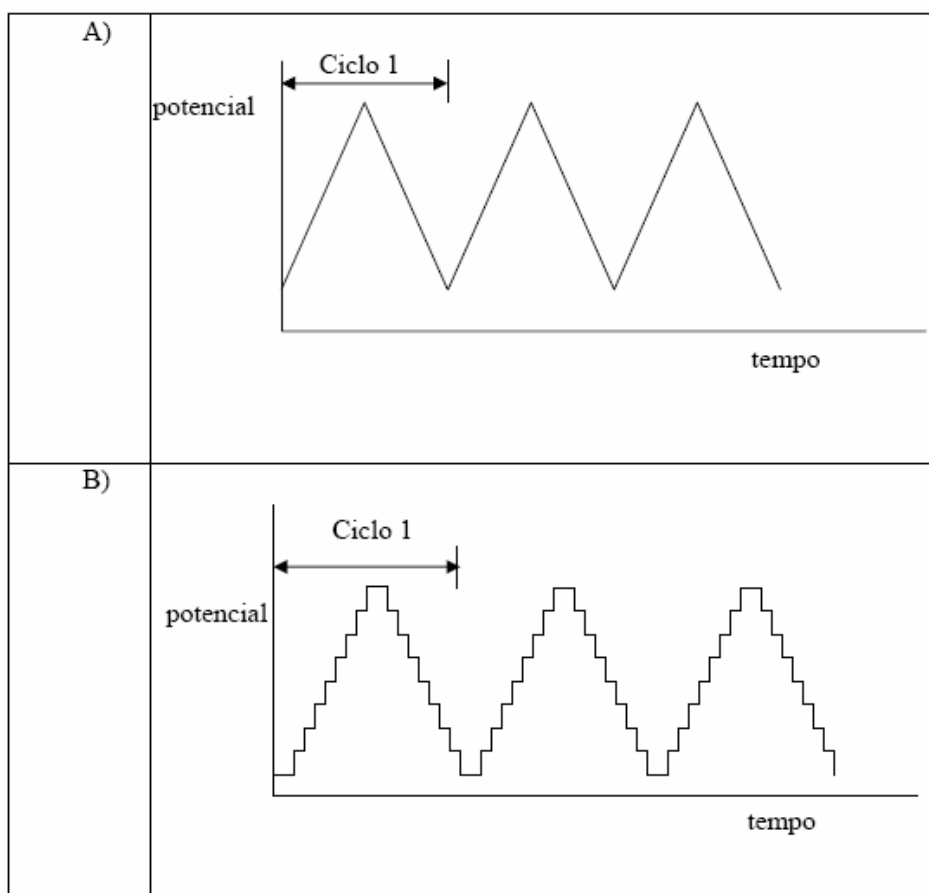


Figura 6. Formas de aplicação do potencial para a voltametria cíclica: a) potencial com varredura linear e b) potencial do tipo escada.

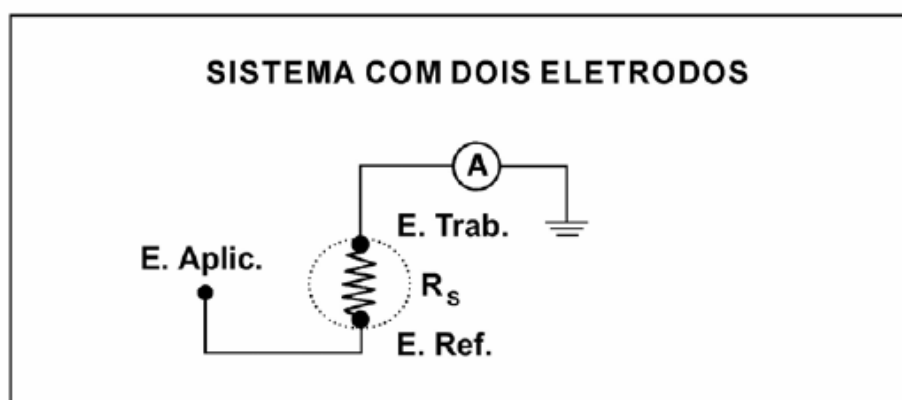
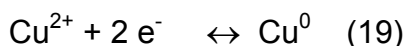
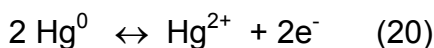


Figura 7. Esquema de célula de dois eletrodos ligada ao polarógrafo.

Essa célula apresenta alguns inconvenientes, pois a corrente resultante da varredura de potencial passa através do eletrodo de referência. Isto obriga a usar-se um eletrodo de calomelano de reservatório grande de KCl, devido a reação que ocorrerá no mesmo. Por exemplo: na determinação polarográfica de cobre, haverá redução de Cu(II) no eletrodo de mercúrio (eletrodo de trabalho), e, conseqüentemente oxidação de Hg na outra meia célula (calomelano saturado) (WANG, 1985). Assim, na meia célula do eletrodo de trabalho:



Na meia célula de calomelano:



Haverá consumo de Hg^0 e Cl^{-} , necessitando usar-se eletrodos de referência grandes, para que mantenham o potencial constante durante a aplicação do potencial (WANG, 1985).

2.8.1 Células de três eletrodos

As células de três eletrodos (Figura 8) foram desenvolvidas para resolver as limitações das células de dois eletrodos.

O terceiro eletrodo é chamado de eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo, podendo ser de platina, ouro, carbono vítreo etc. Este foi introduzido na célula eletroquímica para assegurar o sistema potenciostático. Nesta célula, os três eletrodos são conectados a um amplificador operacional pertencente ao circuito eletrônico do potenciostato (PLAMBECK, 1982). O amplificador operacional atuará quando for aplicada uma diferença de potencial entre o

eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar diminua (Figura 9).

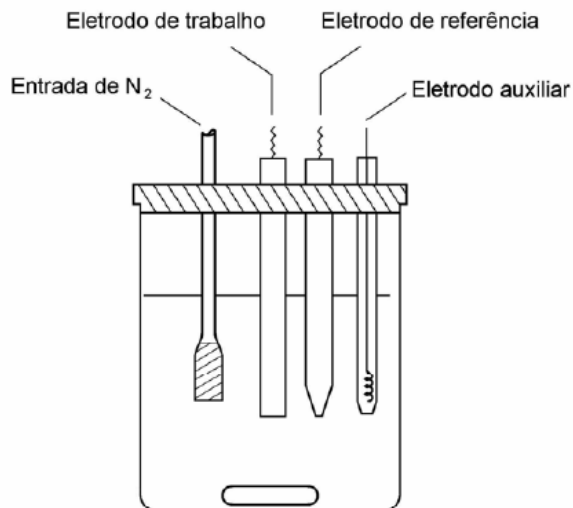


Figura 8. Representação esquemática mostrando os eletrodos no recipiente eletroquímico.

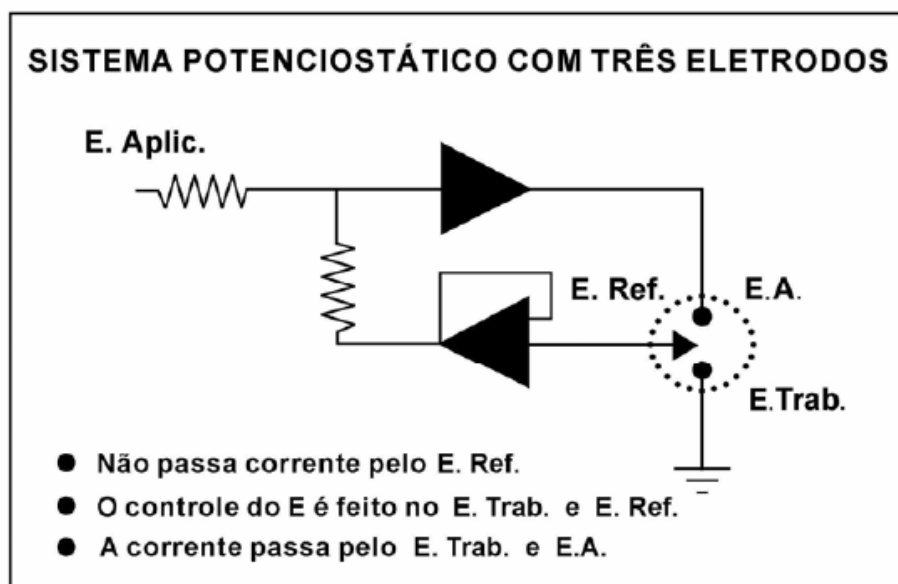


Figura 9. Esquema mostrando a célula conectada a um sistema potenciostático.

Assim a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência. Com este recurso o eletrodo de referência realiza o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas (GREEF et al., 1985). Portanto, pode-se usar além do eletrodo de trabalho e do auxiliar, um eletrodo de referência de dimensões pequenas, o que facilita o uso de recipientes voltamétricos de tamanho reduzido. De um modo geral, a célula de três eletrodos apresenta as vantagens de ser mais adequada para soluções diluídas; pode ser usada para soluções de alta resistência (solventes orgânicos, mistura água mais solvente orgânico); e, pode ser usada com eletrólitos de suporte mais diluídos (IVASKA, LEWENSTAM & SARA, 1988).

2.8.2 Eletrodos de trabalho

O eletrodo de trabalho mais importante usado em voltametria ainda é o de mercúrio. Este pode ser usado tanto no modo gotejante quanto no modo estático. O eletrodo de mercúrio também pode ser usado na forma de filme de mercúrio. Neste caso, o filme é depositado eletroquimicamente em superfícies sólidas, como de platina e carbono vítreo. A atuação do eletrodo de mercúrio é marcadamente na região catódica, em potenciais que podem variar de +0,3 V a -2,3 V versus o eletrodo de calomelano saturado (ECS ou SCE, em inglês), dependendo do meio utilizado (GREEF et al., 1988). Esta é a região de potencial na qual ocorrem as reações eletródicas da maioria dos íons metálicos e de grande número de espécies orgânicas, daí sua importância.

Entre os eletrodos sólidos o de platina (Pt) é um dos mais importantes. Este atua na região de potencial de cerca de +1,1 V a -0,5 V frente ao ECS, dependendo do eletrólito de suporte utilizado. É útil na região anódica, onde o eletrodo de mercúrio não atua. Outro eletrodo sólido útil na região anódica é o de ouro, que pode ser utilizado em intervalos de potencial de +1,5 V a -0,8 V vs. ECS (SCE) (PLAMBECK, 1982).

Muito usados na região anódica são os eletrodos de carbono, principalmente o de carbono vítreo, que atua no intervalo de +1,5 V a -1,1

frente ao ECS (SCE), dependendo do meio utilizado. O eletrodo de trabalho é uma variável crítica em um experimento eletroquímico. O eletrodo de trabalho é o local no qual ocorre as reações de interesse e este é geralmente construído de um material inerte. O potencial do eletrodo de trabalho é mensurado frente ao eletrodo de referência (IVASKA, LEWENSTAM & SARA, 1988).

2.8.3 Eletrodos modificados

A habilidade de manipular as propriedades dos eletrodos pode levar a uma variedade de efeitos atrativos dentre os quais a eletrocatalise, a prevenção de envenenamento da superfície do eletrodo, a seletividade e a pré-concentração. Devido às diversas tecnologias existentes atualmente, a modificação de eletrodos é um campo muito vasto. Para a modificação do eletrodo podem ser utilizados metais eletrodepositados, óxidos, espécies orgânicas que são adsorvidas, metaloporfirinas, enzimas, DNA, filmes poliméricos entre uma infinidade de substâncias (SHANKARAN & NARAYANAN, 1999; PEI & LI, 2000; ROCHA, 2001; MOROZOVA & RESHETILOV, 2002; CIUCU, NEGULESCU & BALDWIN, 2003; DZIEDZIC et al., 2003; PINTO, LIMA & SARAIVA, 2003; ARMIJO, 2004; POURNAGHI-AZAR & DASTANGOO, 2004; SILVA et al., 2004; SKLÁDAL, WEN & KANG, 2004).

Sabe-se que a modificação da superfície de eletrodos tradicionais, é um caminho efetivo de melhoramento da atividade eletrocatalítica. Sendo assim, um tema dominante na pesquisa eletroquímica tem sido a tentativa de regular a composição química e estrutura morfológica da superfície do eletrodo para obter o grau desejado de atividade catalítica, a sensibilidade e a estabilidade eletroquímica. Em geral, a preparação de eletrodos quimicamente modificados envolve uma variedade de modelos para modificação de superfícies nos quais um mediador redox capaz de submeter-se rápido a reações eletroquímicas reversíveis e reprodutíveis é incorporado dentro da superfície do eletrodo de substratos condutores tradicionais não modificados (grafite, metais nobres etc). Muitas camadas de mediadores redox eletroativos, com composição química específica, morfologia, e um bom grau

de adesão entre a superfície do eletrodo e o filme depositado podem ser facilmente obtidas usando-se técnicas eletroquímicas. Assim eletrodos quimicamente modificados preparados pelo processo de deposição eletroquímica de óxidos de metais, filmes metal polinuclear hexacianoferrato ou eletrodeposição de partículas metálicas catalisadoras dentro de matrizes poliméricas apropriadas tem sido caracterizado para oxidação eletrocatalítica de muitas moléculas eletroativas (LOFRANO, QUEIROZ & ROMERO, 2001; LOFRANO et al., 2004; MOURATO et al., 2004; POURNAGHI-AZAR & DASTANGOO, 2004; XU et al., 2004).

Eletrodos com base em carbono, principalmente modificados, são excelentes para a determinação de compostos presentes em fluidos biológicos. Esses eletrodos reduzem o overpotencial requerido tanto para oxidação quanto para a redução de compostos (NALINI & NARAYANAN, 2000).

Eletrocatalistas usados para redução de íons nitrato e nitrito incluem: camada alternadas de μ -meso (tetrapiridil)porfirinato Co(III) tetrakis [bis-(bipiridina)(cloro) Ru(II) e meso-tetra(4-sulfonatefenil)porfirinato Zn(II), filmes de polipirrol dopados com tungstodifosfato anion ($P_2W_{18}O_6^{-62}$), P-Mo-V heteropoli ácido ou ferro substituído heteropolitungstato e eletrodos revestidos com filmes de Nafion e mercúrio incorporados de Yb^{3+} ou UO_2^{+2} . A habilidade para oxidar eletroquimicamente o nitrito também é aplicada em um grande número de eletrodos baseados em íons metálicos (tipicamente Os, Ru ou Ir) coordenados (a)/(ou) eletrostaticamente inseridos, além de suportes de polivil piridinas, que também estão relatados. Para o processo de redução do íon nitrito, pode-se citar uma técnica que utiliza a redução do íon nitrito a NO (óxido nítrico), este último podendo então ser detectado amperometricamente em eletrodos de ouro modificados com filmes de PTFE (MOORCROFT, DAVIS & COMPTON, 2001).

Eletrodos modificados com polímeros receberam grande interesse nas últimas duas décadas e ocupam ainda posição de destaque. Em geral esses eletrodos são compostos por centros ativos redox confinados em filmes poliméricos e podem ser classificados em duas categorias. Polímeros de sítios redox fixos são a primeira categoria e contém sítios redox ativos covalentemente ligados a uma matrix polimérica inativa. A transferência de

carga nesse caso ocorre via “saltos” dos elétrons entre as vizinhanças dos sítios redox ativos. Na segunda categoria estão os polímeros de troca iônica nos quais os grupos redox ativos estão eletrostaticamente ligados a matriz polimérica. Nessas espécies redox ativas são móveis dentro do filme polimérico, a transferência de carga através da matriz polimérica pode ocorrer via difusão física das espécies redox ativas ou via a combinação de uma curta e o “salto” de elétrons das espécies redox ativas incorporadas (TANTAVICHET, PRITZKER & BURNS, 2001).

2.9 Complexos de Rutênio

Dos vários complexos metálicos polipiridínicos, até o momento sintetizados, os complexos pertencentes ao grupo VIII da Tabela Periódica são os mais extensivamente estudados. Isso porque, os íons metálicos, tais como Ru^{2+} , Os^{2+} , Fe^{2+} formam complexos octaédricos com ligantes de campo forte. Esta propriedade é muito útil na química de coordenação. A síntese de compostos de coordenação consiste basicamente de três etapas: a primeira consiste da reação de formação do complexo propriamente dito; a segunda diz respeito ao isolamento do composto e finalmente, a terceira etapa consiste na purificação do mesmo (PAULA, 1999).

Uma variedade de compostos de rutênio como os óxidos, compostos valentes misturados e complexos possuem propriedades eletrocatalíticas as quais têm sido usadas para modificação de eletrodos para eletroanálises (BANDEIRA, FRANCO & MARTINI, 1999; BANDEIRA et al., 2004). Alguns exemplos são as eletroanálises de ácido ascórbico (NALINI & NARAYANAN, 2000), sulfitos (ARAKI et al., 1995), oxalatos (HOGAN & FORSTER, 1999), nitritos (O'SHEA et al., 1992), entre outros. Além das propriedades aplicáveis na eletroanálise, muitas propriedades são atribuídas aos complexos de rutênio, como antitumor e atenuação do prejuízo causado pela reperfusão no infarto (doenças cardíacas).

PAULA et al. (2005) demonstraram os efeitos preventivos sobre danos induzidos ao DNA celular e prevenção a peroxidação de células hepáticas, para o complexo $trans-[RuCl_2(nic)_4]$ em concentrações de 0,1 μM a 10 μM . Em outro estudo, CRECZYNSKI-PASA et al. (2001) avaliaram a ação de dois

novos complexos de rutênio, o complexo *trans*-RuCl₂(nic)₄] e o complexo *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] como sequestradores de radicais livres. Os autores concluíram que os compostos possuem potencial terapêutico frente a espécies reativas do oxigênio.

Polímeros redox, contendo sítios ativos de rutênio têm sido extensivamente estudados nos últimos anos. Estes estudos mostram que vários metalopolímeros de rutênio atuam como catalisadores redox, para uma variedade de substratos (SAMUELS, MEYER, 1981). A mediação pela dupla redox Ru(II/III) tem mostrado melhorar a sensibilidade dos processos de oxidação (O'SHEA et al., 1992; STETER et al., 2006; PAIXÃO & BERTOTTI, 2006; GENESTE & MOINET, 2006).

2.10 Eletroquímica de nitritos e nitratos

Métodos eletroquímicos geralmente são alternativas úteis visto que são rápidos, limpos e seguros. A aproximação mais conveniente envolve a oxidação anódica direta do analito no eletrodo polarizado. Sendo assim, sabe-se que o nitrito é oxidado em eletrodos de platina, carbono vítreo, ouro, diamante e óxidos de metais de transição. Entretanto, a aplicação destes sensores é limitada devido as muitas espécies presentes. Conseqüentemente, a modificação da superfície de eletrodos promove uma significativa extensão da escala dinâmica em determinações analíticas, particularmente se for acoplada com procedimentos de injeção em fluxo. As duas principais vantagens são: alguns problemas relacionados à estabilidade da superfície do eletrodo são minimizados e a cinética das reações do eletrodo é acelerada, desse modo aumentando a sensibilidade nas determinações (GREEF et al., 1988).

Do ponto de vista eletroquímico, os íons nitrito oferecem mais opções do que os íons nitrato, pelo fato de seus íons poderem ser tanto reduzidos quanto oxidados em eletrodos de carbono vítreo. Entretanto, nem o processo de redução nem o processo de oxidação são opções favoráveis, em termos de eletroanálise direta, conduzindo aos problemas similares que afetam as análises de nitratos. Um considerável número de caminhos tem sido propostos na tentativa de conter esses problemas, dos quais a modificação de

eletrodos parece oferecer mais benefícios, em termos de sensibilidade e seletividade (MOORCROFT, DAVIS & COMPTON, 2001).

A oxidação de íons nitrito em eletrodos modificados tem sido largamente descrita (COX & KULESZA, 1984; DOHERTY et al., 1996; XI & DONG, 1996; JU, IKEDA & LEI, 2004; ZHAO et al., 2003; POURNAGHI-AZAR & DASTANGOO, 2004) e incluem o uso de filmes delgados de valência-mista, heteropolianions silicotungsticos, enzimas, polímeros de ósmio, porfirinas de rutênio e poli-(4-vinilpiridina) contendo IrCl_6 entre outros.

A redução do nitrito também está reportada em diferentes estudos (CASELLA; GATTA, 2004; DOHERTY; VOS, 1992; LIU; HU, 2004; RUHLMANN; GENET, 2004; SUN et al., 1999^a; SUN et al., 1999^b; TIAN et al., 2004; ZHAO et al., 2003) que incluem eletrodos modificados com $[\text{Os}(\text{vpy})_2(\text{PVP})_{10}\text{Cl}]\text{Cl}$, modificados com Eastman-AQ-Os(bpy)₂p 3 -PVP, eletrodos de cobre-tálio, modificados com complexo $\{\text{K}_{28}\text{H}_8[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{Ti}_3\text{O}_{60}]_4\}$ modificados com polipirrol, e até mesmo com microeletrodos de nanotubos de carbono.

Os sensores para nitrato em geral, baseiam-se no processo de redução catalítica do analito em diferentes superfícies, como, eletrodos de Cu e Ni modificados com poly-tetraaminofenilporfirina, eletrodos de metais de transição, eletrodos de Cu-tálio, eletrodos com catalistas como a platina e o paládio e eletrodos contendo várias metalofitocianinas como catalistas (SUN et al., 1999^a; DIMA, VOOYS & KOPER, 2003; SHIBATA & FURUYA, 2003; GAUTHARD, EPRON & BARBIER, 2003; ARMIJO et al., 2004; CASELLA & GATTA, 2004; GROOT & KOPER, 2004)

BANDEIRA et al. (2001) em estudos envolvendo a oxidação de íons nitrito em eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} observaram que o eletrodo modificado tem maior sensibilidade na detecção de íons nitrito, sendo o k'_{ME} para o eletrodo modificado cerca de 60% superior ao observado para o eletrodo sem filme. Os autores concluíram que a determinação oxidativa de íons nitrito em carbono vítreo modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} é uma alternativa simples e viável para determinação direta de íons nitrito em solução em concentração de até 10^{-4} mol L⁻¹. Posteriormente, BANDEIRA (2005) coordenou o trabalho de CUNHA et al. (2005) em que avaliaram a estabilidade e sensibilidade de eletrodo de

carbono vítreo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} / náfion para a determinação do nitrito. Os autores concluíram que o eletrodo teve desempenho satisfatório na determinação de nitritos em salsicha quando comparado ao método oficial.

CONCEITOS ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS (capítulo 2)

2.11 Antioxidantes sintéticos

A proteção contra a oxidação, de gorduras, de óleos e dos alimentos contendo lipídios, é freqüentemente necessária. De fato, a degradação oxidativa dos constituintes de natureza essencialmente lipídica dos alimentos apresenta inconvenientes sensoriais, nutricionais e higiênicos (PASCAL, 1988).

A degradação oxidativa, fenômeno químico complexo, conduz a chamada “rancificação” cujas repercussões econômicas podem ser importantes visto que termina com a perda de alimentos que tornam impróprios para consumo devido a suas propriedades organolépticas (PASCAL, 1988; SHAHIDI, 2000).

Em relação a segurança alimentar, os produtos resultantes de uma simples oxidação de lipídios (produtos voláteis, peróxidos, oxiácidos) ou da oxidação juntamente com a degradação térmica durante o aquecimento (monômeros cíclicos, polímeros) não estão desprovidos de toxicidade (PASCAL, 1988; SHAHIDI, 2000).

A rancidez oxidativa está diretamente relacionada com ácidos graxos insaturados. Trata-se da reação do oxigênio atmosférico com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados. A reatividade aumenta com o aumento do número de insaturações na cadeia lipídica. A reação de oxidação produz peróxidos e hidroperóxidos (produtos primários inertes). Estes compostos por uma série de reações paralelas produzem so compostos voláteis, aldeídos e cetonas que dão o odor de ranço ao alimento (produtos secundários) (MORETTO & FETT, 1998).

As rotas de formação dos peróxidos, hidroperóxidos e carbonilas (aldeídos e cetona) podem ocorrer por: radicais livres, fotoxidação e enzimas. Dentre os

processos que podem aumentar a estabilidade de óleos e gorduras estão: a adição de antioxidantes; a hidrogenação; o fracionamento, o *blending* e a modificação genética da composição dos ácidos graxos (MORETTO & FETT, 1998).

2.12 Utilização de antioxidantes sintéticos

A utilização de antioxidantes é uma prática muito antiga para a conservação de alimentos: carnes e pescados eram impregnadas de compostos fenólicos da defumação (PASCAL, 1988). Posteriormente os químicos perceberam que a adição de pequenas quantidades de certos compostos poderia retardar a deterioração ao ar VIGERON (1956) e PAQUOT (1967) relataram as principais etapas que marcaram o descobrimento dos antioxidantes e seus mecanismos de ação. DESCHAMPSs, um farmacêutico de Avallon, demonstrou o efeito antioxidante do *Styrax tonkinensis* e as gemas do *Populus alba L.*; CHEVREUIL apresentou evidências da ação da madeira de carvalho; os irmãos LUMIERE e SEYEWETZ que descobriram o papel antioxidante da hidroquinona e dos compostos análogos e por último de MOREU e DUFRAISSE que publicaram o trabalho intitulado: *Catalyse et autoxidation: activité antioxygène et prooxygène*. (PASCAL, 1988).

Os antioxidantes inibem a reação de autooxidação como um “catalisador negativo”. Entre as moléculas dotadas de propriedades antioxidantes, encontram-se um grande número de compostos com estrutura fenólica. As substâncias fenólicas funcionam com aceptores de radicais livres, dando lugar a radicais livres estáveis e bloqueando assim a oxidação na fase de iniciação. Tal mecanismo demonstra que a ação de um antioxidante está, portanto, limitada pelo tempo. Ocorre uma deterioração da molécula como consequência da formação de combinações estáveis (CHENG et al., 2002). É possível prolongar a ação dos antioxidantes utilizando-se substâncias denominadas “sinérgicas”, de caráter ácido, que regeneram parcialmente criando um potencial de óxido-redução favorável (MORETO & FETT 1998).

Dentre os vários métodos para prevenir a peroxidação, a adição de antioxidantes é preferencialmente considerada. Os antioxidantes sintéticos mais comumente usados são o t-butil-4-hidroxianisol (BHA), o 2,6-di-t-butil-p-

hidroxitolueno (BHT) e o t-butil hidroquinona (TBHQ) devido a sua estabilidade química, baixo custo e disponibilidade (YANG, LIN & CHOONG, 2002).

Antioxidantes sintéticos de alimentos, incluindo o BHA, o BHT e TBHQ são amplamente usados em alimentos, produtos farmacêuticos e outros produtos comerciais para prevenir a rancidez oxidativa (N, WANG & KOKOT, 2000).

Na prática, é mais efetivo o uso de uma mistura de dois ou mais antioxidantes ao invés de um único composto, e desde que essas substâncias são quimicamente similares, são difíceis de analisar em níveis traço sem uma prévia separação.

O hidroxibutilanisol, BHA e o hidroxibutiltolueno BHT, apresentam na indústria problemas de difícil dissolução (SHIBAMOTO & BJELDANES, 1996). BHA e BHT são extremamente solúveis em gorduras e óleos e tem praticamente nenhuma solubilidade em água. Isto é completamente desejável quando esses dois antioxidantes são adicionados diretamente a gorduras ou óleos; todavia, quando eles são adicionados a alimentos formados por um sistema mais complexo contendo umidade, isto pode causar a necessidade de desenvolvimento de emulsões ou outro tipo de solução antioxidante. A alta porcentagem de problemas encontrados no dia-a-dia referentes ao uso comercial de antioxidantes pode ser atribuída a baixa solubilidade ou dispersão dos mesmos (SHERWIN, 1972). As estruturas podem ser observadas na Figura 10.

O BHA resiste bem ao calor, é efetivo em assados e produtos de confeitaria submetidos ao cozimento. Produtos típicos nos quais o BHA aparece são cookies, doces, uvas passas, tortas de frutas, margarinas, alimentos prontos etc (FUENTE, 1999).

Os antioxidantes sintéticos diferem em seus graus de potencialidade. Essas diferenças podem ser atribuídas a características em suas estruturas moleculares. Por exemplo, o galato de propila é extremamente efetivo do ponto de vista da habilidade para melhorar a vida de prateleira de óleos vegetais, enquanto que o BHA e o BHT não são particularmente efetivos neste tipo de aplicação. Tanto BHA quanto BHT possuem um único grupo hidroxila em suas moléculas, e eles são estericamente impedidos com grupos *orto* posicionados aos grupos hidroxila. O BHT é impedido um tanto mais do que o BHA, e isso sem dúvida, responde por algumas

diferenças na potencia entre esses dois antioxidantes. Existem evidências consideráveis de que antioxidantes como BHA e o BHT, atuam sinergicamente quando usados em conjunto (SHERWIN, 1972).

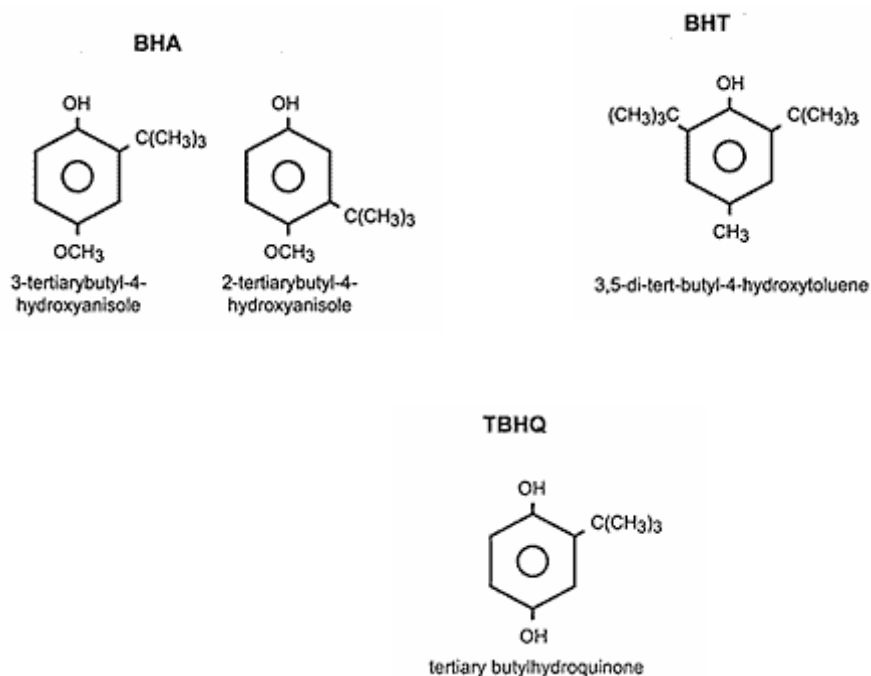


Figura 10. Estruturas do butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroquinona (TBHQ).

2.13 Toxicidade de antioxidantes sintéticos

Estudos sugerem que antioxidantes fenólicos artificiais podem causar prejuízo ao estado nutricional saudável, produzindo efeitos tóxicos. Em muitos países, o uso desses antioxidantes é controlado, e conseqüentemente é importante determinar as quantidades dessas substâncias nos produtos relacionados (NI, WANG & KOKOT, 2000).

Outros estudos disponíveis na literatura (CLAYSON et al., 1986; MADHAVI et al., 1996) geralmente fazem referência ao efeito carcinogênico desenvolvido em ratos devido a presença de BHA e BHT em concentrações extremamente altas. Dentre os seguintes antioxidantes sintéticos: BHA, BHT, propil, octil e dodecil galatos (PG, OG, DG), ácido nordihidroguaiaretico (NDG)

e TBHQ, apenas os cinco primeiros, são autorizados na comunidade europeia (EC). Em Portugal, o uso dos dois últimos antioxidantes, NDG e TBHQ, em alimentos foi banido, devido a razões toxicológicas (PINHO et al., 2000).

Em relação a toxicidade do BHA há grande discrepância entre os investigadores, alguns classificam-no como carcinogênico e outros como não carcinogênico (FUENTE et al., 1999).

Estudos examinados pelo Comitê Mixto FAO/ OMS mostram que para o cachorro e o homem, o TBHQ é amplamente absorvido e excretado com rapidez depois da ingestão. Numerosos estudos *in vitro* demonstram que o TBHQ induz a atividade das enzimas da fase II, incluindo a glicironsiltransferase e a glutationa-transferase, por um mecanismo de receptor *Ah*. Estudos de carcinogenicidade em ratos, mostraram que o TBHQ aumentou a incidência de hiperplasia das células foliculares da tireóide em todas as doses testadas (OMS, 1999).

Certas ações destas substâncias são inquietantes, mas parece impossível, no estado atual de conhecimento, extrapolar ao homem os dados obtidos em animais, sem correr riscos importantes. De fato, hoje, parece estabelecido que as manifestações tóxicas consequentes da ingestão de BHT, por exemplo, são devidas a formação, em nível de certos órgãos, e em certas espécies, de metabólitos intermediários particularmente reativos. Isso explica as diferenças de sensibilidade registradas entre espécies animais. Nestas condições como saber se a toxicidade do BHT para o pulmão do rato, sem dúvida devida a presença de um metabólito particular em nível deste órgão, pode manifestar-se igualmente no homem? (PASCAL, 1988).

A quantidade desses aditivos encontrados em determinados alimentos é limitada por legislação na maioria dos países. No Canadá e nos Estados Unidos, por exemplo, antioxidantes, sozinhos ou em combinação, são permitidos em níveis que não excedam 200 mg kg^{-1} em gorduras, óleos e gomas de mascar e em níveis que não excedam 50 mg kg^{-1} em cereais matinais e produtos desidratados do tomate (YÁNEZ-SEDEÑO, PINGARRÓN & POLO DÍEZ, 1991).

No Brasil a resolução n. 4 de 24 de novembro de 1988 estabelece os limites máximos para alguns produtos conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2. Alimentos que podem ser adicionados de antioxidantes sintéticos segundo resolução n. 4 de 24 de novembro de 1988 MS/ANVISA

Antioxidante	Produtos	Quantidade permitida g/100 g sobre o teor de lipídios
BHA	Alimentos procesados a base de cereais	
	Coco ralado	0,02
	Creme vegetal	0,01
	Gomas de mascar	0,02
	Leite de coco	0,01
	Margarinas	0,01
	Óleos e gorduras	0,02
	Produtos de cacau	0,02
BHT	Alimentos procesados a base de cereais	
	Coco ralado	0,01
	Gomas de mascar	0,01
	Leite de coco	0,05
	Margarinas	0,01
	Óleos e gorduras	0,02
	Produtos de cacau	0,01
		0,02
TBHQ	Alimentos procesados a base de cereais	
	Farinhas, extratos e flocos derivados da soja integral	0,02
	Gomas de mascar	0,02
	Óleos e gorduras	0,02
		0,02

Além dessa resolução, os antioxidantes sintéticos também aparecem nas resoluções nº 382, de 05 de agosto de 1999^a para molhos e condimentos (0,02 g/100 g para BHA, 0,01 g/100 g para o BHT e 0,02 g/100 g para o TBHQ); Resolução nº 388, de 05 de agosto: para sobremesas (0,02 g/100 g para BHA, 0,01 g/100 g para o BHT e 0,02 g/100 g para o TBHQ); e finalmente, a Resolução RDC nº 33, de 09 de março de 2001 para sopas e caldos (0,02 g/100g para BHA, 0,01 g/100 g para o BHT e 0,02 g/100 g para o TBHQ).

2.14 Métodos para determinação de antioxidantes sintéticos

A análise de antioxidantes fenólicos em óleos e gorduras foi conduzida pelos métodos de fotometria UV-visível (SATO & KAWAMURA, 1972;

KOMAITIS & KAPEL, 1985) cromatografia em papel e em camada delgada (SAHASRABUDHE, 1964), cromatografia gasosa (STODDARD, 1972; ICENHOUR & VAN DOLAH, 1991;) e cromatografia líquida (FAZIO, 1998; GONZALEZ, GALLEGO & VALCARCEL, 1999). Tais métodos requerem consumo de tempo para extração da amostra e /ou derivatização.

Geralmente métodos cromatográficos são usados para análise desses compostos, mas, necessitam por vezes purificação das amostras, o que resulta procedimentos razoavelmente demorados (NI, WANG & KOKOT, 2000).

2.15 Eletroquímica de antioxidantes sintéticos

Métodos polarográficos e voltamétricos, como polarografia de pulso diferencial, voltametria stripping, voltametria adsortiva e voltametria de varredura linear, geralmente tem alta sensibilidade, e são amplamente usados em muitas áreas da química analítica. Entretanto, sua aplicabilidade para determinação de vários componentes em misturas é antes limitada quando o voltamograma ou polarograma resultante exibe *overlapping* significativo. Diversos métodos quimiométricos, como regressão linear múltipla (MLR), Kalman filter, regressão parcial de mínimos quadrados (PLS) e regressão por componente principal (PCR), e análise iterativa de transformação do fator alvo (ITTF), tem contornado esta limitação com sucesso, e resolve o *overlapping* das bandas (NI, WANG & KOKOT, 2000).

Métodos para determinação de BHA e BHT têm sido estudados com base em seus processos de oxidação por técnicas de injeção de fluxo em eletrodo de carbono (YANEZ-SEDENO, PINGARRON & POLO DIEZ, 1991); estudos voltamétricos têm sido conduzidos além do processo de oxidação do BHA para determinação deste antioxidante em gomas (GONZALEZ CORTES, YANEZ-SEDENO & PINGARRON, 1994); bem como, BHA e BHT foram determinados simultaneamente em amostras de flocos de tomate desidratado por voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) em microeletrodos cilíndricos de fibra de carbono com uma diferença entre seus picos de potencial de cerca de 300 mV (AGUI et al., 1995).

A determinação voltamétrica-catalítica de BHA e BHT em eletrodo de pasta de carbono modificado com níquel fitalocianina também foi relatado (RUIZ, CALVO & PINGARRON, 1994; RUIZ, YANEZ-SEDENO & PINGARRON, 1994). Além disso, MARTIN et al. (1995) aplicaram a regressão PLS em voltamogramas de pulso diferencial para a determinação simultânea de BHA e PG (MARTIN et al., 1995), Galeano Diaz et al.(1998) usaram a calibração PLS para determinação voltamétrica de BHA, BHT e PG em meio acetoneitrila/água acidificado (GALEANO DIAZ et al., 1998).

YÁNEZ-SEDEÑO, PINGARRÓN e POLO DÍEZ (1991) usando eletrólito suporte ácido perclórico 0,1 M em voltamogramas hidrodinâmicos (DPV), (FIA – sistema de injeção em fluxo) em eletrodo de carbono vítreo obteve gráficos de calibração lineares para concentração nas faixas 1,0 – 10,0, 0,1 – 1,0 e 0,01 – 0,1 mg L⁻¹ para o BHA e 1,0 – 8,0, 0,1 – 1,0 e 0,02 – 0,1 mg L⁻¹ para o BHT.

FUENTE et al. (1999) estudaram a determinação de BHA e TBHQ em eletrodo modificado com níquel polipirrol contendo fitalocianina. Os limites de detecção obtidos foram de 2,1 ppm para BHA e BHT usando voltametria cíclica, e 18,7 ppm para o BHA e 1,23 ppm para o TBHQ usando voltametria de pulso diferencial.

Outro relato de utilização da voltametria de pulso diferencial foi dado em eletrodo estacionário e rotatório, bem como a preconcentração em eletrodo de pasta de carbono estão relatados (RIFKIN & EVANS, 1976; BRIESKORN & MAHLMEISTER, 1980; WANG & FREIHA, 1983).

CONCEITOS ANTIOXIDANTES NATURAIS (capítulo 3)

2.16 Toxicidade de espécies reativas do oxigênio

O oxigênio atmosférico foi reconhecido a mais de 100 anos como o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos expostos ao ar, a respeito da oxidação de metais. A função paralela do oxigênio, uma molécula essencial para muitas formas de vida, como um agente nocivo para tecidos vivos, foi descoberta muito mais recentemente (LARSON, 1988).

A toxicidade do oxigênio foi inicialmente explicada pelo efeito de inibição de enzimas celulares, impedindo a síntese de compostos essenciais do metabolismo de organismos anaeróbicos ou mesmo dos aeróbios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD) enfatizou o superóxido como o principal fator da toxicidade do O_2 , sendo a atividade enzimática essencial para a proteção da célula contra o dano causado por esse radical de oxigênio (Mc CORD & FRIDOVICH, 1969; FRIDOVICH, 1986).

O oxigênio e suas espécies reativas, como o oxigênio *singlete* e radicais livres ativos (O_2^- , OH^- e o radical lipídico peroxila LOO^-), nos últimos anos vêm recebendo destaque em investigações enfocando sistemas biológicos (RICE-EVANS & HOCHSTEIN, 1981; GIROTTI, 1990;). Os resultados têm mostrado que reações com radicais são prejudiciais à saúde, estando envolvidas no processo de envelhecimento bem como na patogênese de várias doenças humanas, como arterosclerose, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, alguns distúrbios neurológicos e possivelmente câncer (DIPLOCK, 1991; MASCIO; MURPHY; SIES, 1991).

2.17 Radicais livres

Radical pode ser compreendido sob o ponto de vista químico, como grupos de átomos que se comportam como uma unidade (radical metil : CH_3^- , por exemplo) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Debates sobre a possibilidade da existência de radicais livres, ou seja, de partes de moléculas que poderiam ter existência independente, dividiram a opinião dos químicos durante os séculos passados. Apenas no período entre 1900 e 1930, a existência dos radicais livres foi definitivamente estabelecida nos trabalhos pioneiros de pesquisadores como Gomberg em 1900 (PRYOR, 1994).

Radical livre refere-se a qualquer espécie química capaz de existir independentemente de outras espécies, e que possui um ou mais elétrons não pareados. Na estrutura de átomos e moléculas os elétrons estão associados aos pares, movimentando-se em rotações opostas (ou seja, possuem *spins* opostos ou pareados) em torno de seus orbitais atômicos ou

moleculares (o espaço definido ao redor do núcleo do átomo ou das moléculas), segundo o princípio de Pauli (VOGEL, 1981).

Átomos ou moléculas orgânicas, além do O_2 , podem conter elétrons não pareados, como metais (enxofre e fósforo) e moléculas, contendo carbono, mas há prevalência do O_2 em sistemas biológicos. Alguns radicais encontrados em sistemas biológicos serão descritos a seguir:

Oxigênio singlete. Embora a exata função do oxigênio singlete não esteja bem clara, sabe-se que possui uma alta reatividade, sendo um poderoso agente oxidante. O oxigênio *singlete* é simbolizado por 1O_2 .

Radical superóxido. A adição de um elétron à molécula de O_2 em seu estado fundamental ocorrerá em um dos seus orbitais π , formando o radical superóxido com apenas um elétron não pareado (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1989) representado por O_2^- . Quanto à reatividade, sabe-se que é maior em meio lipídico, no qual o O_2^- pode agir como oxidante ou como forte agente redutor (VALENTINE et al., 1984). Sua importância biológica reside especialmente na capacidade de gerar outras espécies de maior reatividade.

Peróxido de hidrogênio. O íon peróxido é o produto da redução com dois elétrons do O_2 (O_2^-) (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1989), sendo que, em sistemas biológicos, o produto dessa redução é o peróxido de hidrogênio. O H_2O_2 não apresenta característica de radical livre, pois em seus orbitais os elétrons estão pareados (SPATZ, 1992). Na presença de metais de transição, como Fe e Cu, o H_2O_2 pode produzir o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) altamente reativo.

Radical hidroxila. O radical hidroxila pode ser gerado através de mecanismos diversos a partir do peroxinitrito, do peróxido de hidrogênio ou superóxido e na presença ou não da ação catalítica de metais de transição (BECKMAN et al., 1990; HOOG et al., 1992), podendo também ser gerado pela radiação ionizante. A quebra homolítica de água produzirá radical $^{\bullet}H$ e $^{\bullet}OH$, sendo os efeitos da radiação em sistemas biológicos são atribuídos à formação do $^{\bullet}OH$ (HALIWELL, 1994). Esse radical é o de maior reatividade entre as espécies de oxigênio, e reage rapidamente com inúmeras biomoléculas, danificando o alvo mais próximo do local onde foi gerado e

formando outras espécies de reatividade variada (DIPLOCK, 1991; SPATZ, 1992).

2.18 Antioxidantes naturais

Em decorrência da eficiência parcial do sistema antioxidante endógeno do organismo humano, torna-se necessária a contribuição de antioxidantes exógenos, obtido através da dieta.

Muitas enzimas e compostos secundários de plantas superiores vêm demonstrando em experimentos *in vitro*, efeito protetor contra os danos oxidativos através da inibição ou sequestro de radicais livres e espécies reativas do oxigênio. O papel de muitos outros compostos como antioxidantes potenciais pode ser deduzido através de suas similaridades estruturais com moléculas reconhecidamente reativas (LARSON, 1988).

2.19 Antioxidantes em uvas e vinhos

A produção de uvas no Brasil está localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se uma atividade consolidada, com importância sócio-econômica, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, os quais respondem por 97,0% da produção nacional de vinhos (CAMPOS, 2005).

Os países produtores mais importantes são Itália, França, Espanha e Estados Unidos. Aproximadamente, 8,00% da colheita é utilizada na produção de vinhos. Sabendo-se que 20,0% do peso das uvas processadas resultam em resíduo, anualmente são gerados cerca de 10 milhões de toneladas de bagaço. A composição deste subproduto, bem como, o teor de umidade, dependem da variedade da uva e da tecnologia de vinificação (KAMMERER et al., 2004).

A videira pertence ao gênero *Vitis*, família das ampelídeas ou vitáceas, onde estão incluídas todas as variedades européias, americanas e asiáticas, sejam elas destinadas a sucos, a vinhos ou à mesa. Neste gênero há em

torno de quarenta espécies, sendo a de maior importância a *Vitis vinifera*, pela qualidade de seus vinhos (CAMPOS, 2005).

A uva européia, ou uva em cacho, *Vitis vinifera*, cresce amplamente devido a alta qualidade do fruto e sua capacidade para crescer em uma ampla variedade de condições climáticas. Entretanto, as uvas européias são susceptíveis a doenças causadas por fungos e insetos, especialmente quando crescem no frio, climas úmidos (ALLEWELDT; POSSINGHAM, 1988).

Existe uma grande quantidade de variedades de uvas cultivadas pelo mundo. Na Alemanha têm destaque as variedades: Riesling, Silvaner, Mueller-Thurgau, Moriot-Muskat, Traminer, Grauburgunder, Ehrenfelser, Nobling, Scheurebe, Muslateller, Muskat-Otonel, Gewürztraminer, André e Lemberger entre outras. Na Espanha destacam-se as variedades Graciano, Tempranillo, Grenache, Carignan, Merlot, Ruby Cabernet e Cabernet Sauvignon (ARZARENA et al., 2000). No Brasil, em especial na região de Bento Gonçalves recebem destaque as variedades: Cabernet Franc, Merlot, Petit Sirah, Gamay Beaujolais, Pinot, Malvasia, Trebbiano, Sylvaner e Riesling Renana (BEVILAQUIA, 1995).

Além da grande quantidade de variedades de uvas disponível, existem programas espalhados pelo mundo de desenvolvimento de espécies híbridas entre espécies americanas e européias da *Vitis* com o objetivo de obter maior resistência à doenças (ARZARENA et al., 2000).

As variedades utilizadas neste estudado serão brevemente descritas, como segue:

Gewürztraminer. Variedade rosada, originária na Alemanha Ocidental e, depois introduzida na França. Suas folhas são alongadas, seus cachos pequenos e troncônicos, de grãos pequenos e casca grossa. A planta tem grande vigor e brota precocemente. Origina vinhos brancos de aroma pronunciado e sabor afrutado.

Riesling Itálico. Dá finíssimo vinho branco. Planta de mediano vigor e de regular produtividade. Cachos compactos, de tamanho pequeno a médio.

Grãos pequenos, de polpa suculenta e doce. Tem regular resistência às moléstias.

Couderc 13. É uma variedade híbrida de maturação tardia, de boa produção e rústica. Apresenta baixo potencial de produção de açúcar. Origina vinho branco de ótimo aspecto, de pouco aroma e de baixa acidez, sua principal característica. A *Couderc 13* origina um vinho neutro que pode apresentar bons aromas de fermentação.

Moscato. É uma planta de vigor médio e grande produtividade. Seus cachos são grandes e compactos, com grãos de película fina, forma ovóide, polpa doce e carnuda, susceptíveis ao apodrecimento, antes de atingir a maturação plena. Variedade trazida pelos primeiros imigrantes italianos produz o apreciado vinho *asti*, de aroma intenso e delicado frescor.

Chardonnay. Também conhecida como *pinot chardonnay*, essa variedade oriunda da Borgonha, França, produz os vinhos brancos *chablis*, de intenso aroma e gosto persistente. Seus cachos são pequenos, cilíndricos, compactos e alados, e seus grãos são esféricos e pequenos.

Uvas, vinhos e subprodutos de uva contém grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, em altas concentrações de 1000 – 1800 mg/mL. Grande parte dos fenólicos em uvas, vinhos e subprodutos podem atuar como antioxidantes. Alguns desses compostos podem atuar seletivamente em concentrações muito baixas para inibir *ex vivo* a oxidação do LDL *in vitro* (KANNER et al., 1994).

Doze regiões vinícolas brasileiras, são responsáveis pela produção de vinhos, sucos de uva e derivados(SAUTTER et al., 2005).

Os vinhos possuem uma maior atividade seqüestradora de radicais do oxigênio do que os sucos de uva (SANCHEZ-MORENO et al, 1999). Entretanto existe uma variação dessa atividade entre os diferentes tipos de vinhos (SANCHEZ-MORENO et al, 2000). Os vinhos tintos possuem maior quantidade de ácidos fenólicos que os vinhos brancos. Entretanto, este fato não está totalmente esclarecido, pois os ácidos fenólicos dos vinhos brancos

poderiam existir na forma de derivados glicídicos. Os maiores conteúdos correspondem ao ácidos siríngico e p-cumárico (30 mg/L). (HEREDIA MIRA; GUZMAN CHOZAS, 1993).

Os sub-produtos da produção de vinho, tal como o extrato da semente da uva, o extrato da pele da uva e o bagaço da uva, têm o potencial grande como aditivos de alimentos, além disso, o bagaço na forma de suplementos dietéticos no detalhe parece ser promissor como uma fonte nova de antioxidantes (SHRIKHANDE, 2000; SAURA-CALIXTO, 1998).

O bagaço da uva é composto pela semente, casca e engaço. Sabe-se que a casca da uva é uma fonte de antocianidinas e antocianinas, que são corantes naturais e possuem propriedades antioxidantes, são inibidores da lipoperoxidação e também apresentam atividades antimutagênicas. A semente é composta aproximadamente de: 40,0% fibra, 16,0% óleo, 11,0% proteínas, 7,0% compostos fenólicos complexos (taninos), açúcares, sais minerais etc. O engaço por sua vez é rico em compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico (MURGA et al., 2000). Estudos sobre os efeitos do contato da casca com o suco na produção de vinhos brancos (DARIAS-MARTIN et al., 2000) mostraram que o maior tempo de contato resulta em significativos aumentos na concentração de compostos fenólicos na bebida, com destaque para o resveratrol e seus isômeros glicosídicos, compostos com ação profilática já reconhecida. Durante a produção de vinhos brancos, grande quantidade de flavonóides permanece no resíduo, já que apenas algumas vinícolas deixam o suco em contato com a casca por algum tempo com o objetivo de obter um leve tom amarelado no produto final. Essa característica do processo produtivo de vinhos brancos, sugere que o resíduo (bagaço) constitua uma fonte rica em compostos de interesse às indústrias de fitoterápicos e de complementos alimentares, e que ainda não é racionalmente aproveitada.

Os compostos antioxidantes presentes na uva, produtos e subprodutos são basicamente: polifenóis, ácidos fenólicos e flavonóides.

2.19.1 Polifenóis

Os polifenóis constituem um dos mais numerosos e representativos grupo de metabólitos secundários das plantas. Esses atuam na fisiologia e metabolismo celular influenciando o crescimento e a reprodução. Essas moléculas apresentam intensa atividade biológica, e atuam na defesa contra pragas e predadores e processos germinativos, entre outros (BRAVO,1998; KACHKONEN et al., 1999). Alguns destes compostos atuam na inibição da germinação de espécies potencialmente competidoras. Os mecanismos moleculares que explicam a propriedade dos fenólicos como agentes antioxidantes, são a capacidade doadora de hidrogênio, potencial redutor e atividade quelante (RICE-EVANS, 1995). Polifenóis possuem estrutura química ideal para a captura de radicais livres, apresentando-se mais efetivos, como antioxidantes *in vitro*, do que as vitaminas C e E, em base molar (RICE-EVANS, 1995).

2.19.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos se caracterizam pela presença de apenas um anel benzênico, o que exclui a grande família dos polifenóis. Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos. O primeiro, denominado de ácidos benzóicos (ácido p-hidroxibenzóico, ácido salicílico, ácido protocatéuico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido gentísico), e que são derivados do ácido p-hidroxibenzóico. O segundo grupo formado pelos ácidos cinâmicos (ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido clorogênico), considerados derivados do ácido p-cumárico ou ácido p-oxicinâmico, incluindo a série dos clorogênicos. Os ácidos protocatéuicos e gálico provêm de raspões e pepitas, e especialmente o gálico está escassamente representado nos vinhos. O ácido p-cumárico está envolvido na acilação das antocianinas. O ácido gentísico, provavelmente se forma durante a fermentação alcoólica. Estes ácidos apresentam interesse devido ao seu comportamento de retardo da atividade microbiana no vinho, por isso os vinhos tintos resistem melhor ao ataque microbiano do que os vinhos brancos. Os ácidos fenólicos que tem dois grupos hidroxila na posição orto

(por exemplo, o ácido caféico) são facilmente oxidáveis a quinonas (HEREDIA MIRA & GUZMAN CHOZAS, 1993).

2.19.3 Flavonóides

Os flavonóides atuam em plantas vasculares como antioxidantes, antimicrobianos, fotoreceptores, repelentes entre outras funções. Muitos estudos sugerem que os flavonóides exibem atividades biológicas, incluindo antialérgica, antiviral, antiinflamatória e ações vasodilatadoras. Entretanto o principal interesse está direcionado para a atividade antioxidante dos flavonóides, que são capazes de reduzir a formação de radicais livres e capturá-los, quando já formados (PIETTA, 2000). Oligômeros de proantocianidinas são antioxidantes que ocorrem naturalmente em frutas, vegetais, grãos, nozes, flores e caules, com amplo espectro de atividades biológicas, farmacológicas e terapêuticas contra radicais livres e estresse oxidativo (BAGCHI et al., 2000). Os flavonóides mais importantes no vinho tinto são o kemferol, a quercetina, a miricetina e a quercetrina. Esses, estão presentes também no vinho branco mas, em concentrações tão pequenas que não influenciam na cor, como acontece nos vinhos tintos, que contém cerca de 15-20 mg/L. Na uva estão presentes os glicosídeos que se hidrolizam durante a elaboração do vinho, e as agliconas correspondentes aparecem no vinho tinto após alguns meses de vinificação. A cor característica destes compostos é amarela, encoberta pela coloração vermelho violácea das antoxianinas (HEREDIA MIRA & GUZMAN CHOZAS, 1993; SOLEAS, DIAMANDIS & GOLDBERG, 1997).

Os efeitos antioxidantes do vinho tinto e de seus polifenóis principais foram demonstrados em muitos sistemas experimentais *in vitro* (lipoproteína de baixa densidade humana, lipossomos, macrófagos, células cultivadas) para investigações referentes a saúde humanas. Muitos destes compostos (notavelmente a catequina, a quercetina, e o resveratrol) promovem a produção do óxido nítrico pelo endotélio vascular; inibem a síntese do tromboxano nas plaquetas e do leucotrieno nos neutrófilos, a síntese modular e a secreção das lipoproteínas em animais e em culturas celulares, e impede o crescimento de tumores bem como inibem a carcinogênese em diferentes

modelos experimentais (SOLEAS, DIAMANDIS & GOLDBERG, 1997; (GERMAN & WALZEM, 2000; DAS et al., 1999).

São diversos os estudos reportados em literatura sobre a habilidade antioxidante de diferentes compostos fenólicos utilizando métodos diversos. Pode-se citar o estudo de CUVÉLIER et al. (1992) que encontraram que a habilidade de compostos fenólicos em inibir a autoxidação do metil linoleato descreveu na seguinte ordem: ácido caféico > ácido gálico > BHA > ácido ferúlico. WANG GOODMAN (1999) reportaram um efeito decrescente de polifenóis na inibição da peroxidação do LDL na ordem: quercetina > ácido caféico > rutina > ácido gálico > ácido ferúlico. SANCHEZ-MORENO, LARRAURI e SUARA-CALIXTO (1998) usando o método DPPH* para estimar o poder antirradical dos compostos, encontrou a seguinte ordem de eficiência: ácido gálico > ácido tânico > ácido ascórbico > quercetina > BHA > rutina > ácido ferúlico > DL- α -tocoferol > resveratrol.

Simonetti, Pieta, Testolin (1997) avaliaram o conteúdo de polifenóis de vinhos italianos selecionados. Os autores concluíram que apenas os vinhos tintos continham quantidades apreciáveis de flavonóides (cerca de 15,3 mg/L), sendo a quercetina e a rutina os mais abundantes, seguidos pela mirocetina, kaempferol e isorametina. Nos vinhos brancos a quantidade de flavonóides foi muito baixa, sendo este resultado esperado devido ao fato desses compostos encontrarem-se na casca.

SILVA et al. (2005) identificou glicosídeos de flavonóides em subprodutos da vinificação por HPLC encontrando quercetina e kaempferol, obtidos das variedades de uva Arinto e Moscatel.

FLESH, SCHWARTZ e BÖHN (1998) estudaram o efeito da ingestão de vinhos tintos e brancos na vasodilatação da aorta de ratos e artérias coronarianas de humanos *in vitro*. Os autores concluíram que os efeitos divergentes dos vinhos indicam uma visão geral dos efeitos de vinhos e bebidas alcoólicas não é garantido.

DURAK et al. (1999) realizaram uma comparação entre o potencial antioxidante do vinho tinto, do vinho branco, do suco de uvas e do álcool etílico. O efeito dessas bebidas no potencial antioxidante sérico *in vitro* foi elevado tanto para o vinho tinto, quanto para o vinho branco e também para o suco, todos em níveis semelhantes (sem diferenças estatisticamente

significativas ao nível de 0,05). Apenas o etanol não apresentou potencial antioxidante. Os autores concluíram que o vinho tinto, o vinho branco e o suco de uvas possuem elevado potencial antioxidante para proteger estruturas celulares frente às reações de peroxidação porque são ricos em compostos fenólicos.

MICHAEL e FUHRMAN (2002) demonstraram que o consumo de vinho tinto por voluntários saudáveis, resultou em enriquecimento do plasma sanguíneo com LDL através da ingestão de flavonóides antioxidantes, como a quercetina, um potente seqüestrador de radicais livres. A influência do vinho branco (baixo teor de flavonóides) pode ser melhorada pelo contato com a casca durante 18 horas em presença de álcool, o qual extrai os flavonóides da casca da uva.

É fato, descrito em literatura, que as uvas contém uma variedade de compostos antioxidantes, incluindo o resveratrol, a catequina, a epicatequina e as proantocianidinas. Desses, o resveratrol está presente principalmente na casca da uva, enquanto que, as proantocianidinas encontram-se nas sementes. São muitas e distintas as funções do resveratrol, estudos estão sendo realizados, com o objetivo de reunir mais informações, um exemplo da multifuncionalidade desta molécula é o trabalho de GEHM et al. (1997) que verificaram a atividade estrogênica do resveratrol (DAS et al., 1999).

SAUTTER et al., (2005) demonstraram em seu estudo que também existe resveratrol nas formas *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol nos sucos comerciais produzidos no Brasil, comercializados em Santa Maria. Há diferenças na concentração dos polifenóis totais e resveratrol entre os sucos comerciais, o que demonstra os diferentes processamentos empregados para a formulação dos sucos. Os autores ressaltam que o suco de uva é uma fonte alternativa de resveratrol para os abstêmios, pois a concentração de *trans*-resveratrol nos sucos de uva elaborados no Brasil variou de 0,19 a 0,90 mg.L⁻¹ de suco de uva.

SAUTTER et al. (2005) também relatam que os vinhos da região *Mikulovská* na República Tcheca apresentam altas concentrações de resveratrol, que variam entre 0,16 mg L⁻¹ a 10,53 mg L⁻¹ de *trans*-resveratrol e 0,06 a 4,87mg.L⁻¹ de *cis*-resveratrol dependendo da cultivar da uva utilizada.

Segundo SOUTO et al. (2001), os vinhos tintos no Brasil apresentam cerca de 0,82 a 5,75 mg.L⁻¹ de trans-resveratrol, com um valor médio de 2,57mg.L⁻¹.

2.20 Métodos para determinação de antioxidantes naturais

Diversas pesquisas sugerem que o consumo de alimentos ricos em polifenóis pode reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças. Entretanto, a grande diversidade química existente torna estes compostos com atividade antioxidante difíceis de separar, bem como quantificar individualmente, o que levou ao aparecimento de vários ensaios para avaliação da atividade antioxidante em diferentes tipos de amostras biológicas *in vitro*, particularmente em matrizes complexas como vinhos e vegetais. São ensaios que envolvem diferentes mecanismos do sistema de defesa antioxidante, desde a quelação de íons metálicos até a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas (GIADA & MANCINI FILHO, 2004).

Estes ensaios podem ser divididos em dois grandes grupos: os baseados na varredura de radicais livres e os que empregam lípidios como substrato. Contudo, não existem hoje métodos aprovados ou padronizados. Todos apresentam vantagens e desvantagens. Existe ainda a necessidade de metodologias mais específicas e protocolos de ensaio mais válidos quanto a substratos, condições de análise, concentrações e cálculos, para uma melhor padronização e correlação de diferentes estudos (GIADA & MANCINI FILHO, 2004).

Os esforços dos pesquisadores caminham nesse sentido. No primeiro Congresso Internacional de Métodos antioxidantes, realizado em 2004 em Orlando na Flórida, com base em dados de literatura, foi proposta a padronização e aplicação de três métodos: o método de Capacidade de absorvência do radical oxigênio (ORAC), o método de Folin-Ciocalteu e possivelmente, o método da capacidade antioxidante em equivalente Trolox (TEAC) (PRIOR, WU & SCHAICH, 2005).

O primeiro Congresso Internacional em Métodos Antioxidantes, teve como propósito tratar das edições analíticas referentes a avaliação da capacidade antioxidante (ACO) em alimentos, vegetais, nutracêuticos, e em

outros suplementos dietéticos e propôr um ou mais métodos analíticos que poderiam ser padronizados para aplicação na avaliação rotineira de capacidade antioxidante (PRIOR, WU & SCHAICH, 2005).

É possível determinar a atividade antioxidante do plasma como um índice do estado antioxidante *in vivo*. Estes métodos focalizam mecanismos diferentes do sistema antioxidante de defesa, isto é, avaliam a captura do oxigênio e radicais hidroxilas, redução de radicais peroxila, inibição da peroxidação lipídica, ou quelagem de íons metálicos. Deste modo, alguns métodos determinam a habilidade dos antioxidantes para capturar radicais gerados em meios de reação, entre eles, o TEAC (Capacidade antioxidante em equivalente Trolox; MILLER et al., 1993), ORAC (Capacidade de absorvância do radical oxigênio, CAO et al., 1995), ou TRAP (Habilidade redutora total do plasma, GHISELLI et al., 1995).

Alguns métodos, semelhante ao DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, BRAND-WILLIAMS et al., 1995) ou o DMPD* (FLOGLIANO et al., 1990) medem a captura de espécies de radicais estáveis por antioxidantes. A metodologia da xantina/xantina oxidase determina a eficiência de antioxidantes em quelar oxigênio *singlete* gerado por sistema enzimático (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988).

Existem ainda os métodos que avaliam a inibição da peroxidação lipídica por antioxidantes, quantificando produtos como os dienos conjugados (ESTERBAUER *et al.*, 1989), peróxidos lipídicos (KIKUZAKI & NAKATAMI, 1993), ou hidroperóxidos (NOUROOZ-ZADEH et al., 1994). A avaliação pode ser em relação aos produtos resultantes da decomposição de peróxidos lipídicos como os malondialdeídos determinados pelos métodos TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico; PLUMB *et al.*, 1996).

Alguns métodos fornecem informações sobre estágios particulares do processo autoxidativo, e alguns são mais aplicáveis a um sistema lipídico do que outros. Assim recomenda-se que dois ou mais métodos sejam utilizados para entendimento completo da oxidação lipídica (NIELSEN, 1994).

A escolha do método depende de uma série de fatores, incluindo natureza da amostra oxidada, o tipo de informação requerida, o tempo disponível para análise e as condições do teste (GRAY, 1978). Um fator que proporciona uma mudança distinta na avaliação da capacidade antioxidante é

o tipo de sistema biológico, há pelo menos quatro fontes gerais dos antioxidantes: enzimas, por exemplo, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, e a catalase; moléculas grandes (albumina, ceruloplasmina, ferritina, e outras proteínas; moléculas pequenas [ácido ascórbico, glutathione, o ácido úrico, o tocoferol, os carotenóides e os (poli)fenóis]; e finalmente, alguns hormônios (estrogênio, angiotensina, melatonina etc.). Do outro lado, existem múltiplos radicais livres e fontes oxidantes [por exemplo, O_2 , 1O_2 , HO^\cdot , NO^\cdot , $ONOO^\cdot$, $HOCl$, $RO(O)^\cdot$, $LO(O)^\cdot$], e ambos, antioxidantes e oxidantes possuem diferentes características físico-químicas. Antioxidantes individuais podem, em alguns casos, atuar por múltiplos mecanismos em um único sistema ou por um mecanismo único diferente dependendo da reação do sistema (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

De acordo com WAGNER et al. (1947), o íon ferroso pode ser utilizado como agente redutor, para determinação de peróxidos orgânicos. Os métodos que utilizam o íon ferroso baseiam-se na redução da amostra em solução acidificada de tiocianato ferroso em metanol, seguido por medidas da intensidade da cor do tiocianato férrico produzido. O método colorimétrico é recomendado para análises rotineiras de amostras que contenham pequenas quantidades de peróxidos.

No método utilizado por Kikuzaki e Nakatani (1993), o cloreto ferroso em HCl 3,5% é quem doa o íon ferroso para que a reação aconteça. Nesta solução acidificada, a amostra é reduzida e, juntamente com a solução de tiocianato de amônio 30,0%, forma tiocianato férrico, medindo-se posteriormente a intensidade de cor do produto formado.

O ferro (III) reage com o tiocianato, fornecendo compostos intensamente coloridos, que permanecem em solução verdadeira; o ferro (II) não reage. Dependendo da concentração do tiocianato, podem ser obtidos complexos; estes são vermelhos e podem ser formulados como $[Fe(SCN)_n]^{3-n}$, em que $n = 1...6$. (BASSET et al., 1981).

Na técnica para avaliação do poder sequestrante, determina-se a capacidade dos extratos em sequestrar peróxido de hidrogênio de uma maneira dependente da concentração. O peróxido de hidrogênio é o agente oxidante na reação (RUCH, CHENG & KLAUNING, 1989). O teste do poder redutor verifica se os extratos são doadores de elétrons e se podem reagir

com radicais livres para convertê-los a produtos mais estáveis e terminar com a reação em cadeia (YEN & CHEN, 1995). No método, o ferrocianeto é reduzido a ferrocianato. O ferrocianeto pode, então reagir com íons férrico para produzir “Azul da Prússia”, o qual pode ter sua concentração determinada espectrofotometricamente em 700 nm. A cor azul resultante é estável, e a reação obedece à lei de Beer (NIELSEN, 1994).

O método de Folin-Ciocalteu está baseado na transferência de elétrons e fornece, portanto, a capacidade redutora, a qual é normalmente expressa como conteúdo de fenólicos totais (PRIOR, WU & SCHAICH, 2005).

Além dos métodos mais comuns (aplicados na grande parte dos trabalhos científicos) existem também alguns estudos que propõem metodologias mais rápidas (NISHIDA, 1996), como é o caso das técnicas eletroquímicas. Dentre esses trabalhos, pode-se citar o de BURATTI et al. (2001) que apresentaram um método eletroquímico rápido para avaliação do poder antioxidante de alguns extratos de alimentos lipídicos. No método foram avaliados os poderes antioxidantes de compostos presentes em vegetais: carotenóides, clorofilas, tocoferóis e capsaicina. O método baseava-se em FIA (sistema de injeção em fluxo) acoplado a um detector eletroquímico equipado com um eletrodo de carbono vítreo (WE) operando amperometricamente em potencial de 500 mV (vs. Ag/AgCl). Os resultados obtidos mostraram um poder antioxidante na ordem: licopeno > β -caroteno > zeaxantina > α -caroteno > β -criptoxantina > luteína > α -tocoferol > capsaicina > clorofila a > clorofila b > astaxantina > cantaxantina. Essa ordem obteve boa correlação com os resultados obtidos pelo método do radical ABTS. O método eletroquímico apresentou-se direto, rápido e adequado para avaliação do poder antioxidante de extratos lipofílicos de alimentos.

CHEVION et al. (1997) avaliaram a capacidade antioxidante dos compostos de baixo peso molecular do plasma usando voltametria cíclica. O método eletroquímico baseia-se nas propriedades redutoras das moléculas estudadas. Os valores de $E_{1/2}$ (potencial de meia-onda) indicam os componentes específicos do plasma e suas habilidades em doar elétrons; enquanto os valores de corrente I_{pa} indicam a concentração do componente no plasma. Foram identificados dois picos anódicos no plasma humano, em $E_{1/2} = 420,0 \pm 25,0$ mV e $E_{1/2} = 920,0 \pm 25,0$ mV. Ascorbato e ureato foram

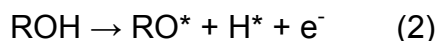
confirmados por HPLC com detecção eletroquímica como principais componentes do plasma e responsáveis pelos picos anódicos.

2.21 Eletroquímica de compostos fenólicos antioxidantes

Os potenciais redox de flavonóides determinados por voltametria cíclica são considerados boas medidas de suas capacidades antioxidantes. Em geral acredita-se que na reação de varredura de radicais livres, compostos fenólicos antioxidantes atuam como doadores de átomos de hidrogênio de acordo com a equação (FIRUZI et al, 2005):



Embora o potencial anódico (E_{pa}) seja uma medida da oxidabilidade de acordo com a equação 2, dados eletroquímicos fornecem informação útil sobre a capacidade de varredura de radicais livres de vários compostos devido a similaridade dessas duas reações (FIRUZI et al, 2005):



A transferência de elétrons entre o oxidante e o redutor, e a conseqüente reação redox, ocorre facilmente quando o potencial catódico (E_{pc}) do oxidante é maior do que o potencial anódico (E_{pa}) do redutor. Todavia a reação pode ocorrer quando E_{pc} (oxidante) é menor do que E_{pa} (redutante) mas a diferença não deve ser maior do que 0,4 V (FIRUZI et al., 2005).

AMO e ME (2003) estudaram a oxidação eletroquímica da quercetina em eletrodo de carbono vítreo usando voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada em diferentes valores de pH. O processo de oxidação mostrou-se dependente do pH, relacionado com dois grupos catecol hidroxil e outros três grupos hidroxil responsáveis pela eletroatividade da molécula da quercetina.

IGNATOVIC et al. (2002) avaliaram o comportamento voltamétrico e o processo redox da molécula da antocianina malvina com o objetivo de definir suas propriedades antioxidantes. O potencial de oxidação da antocianina malvina mostrou-se dependente do valor de pH. Os autores compararam a atividade voltamétrica da malvina com a atividade voltamétrica de BHA e da quercetina. O sistema eletroquímico era formado por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo de referência de Ag/AgCl (3,0 M KCl) e um eletrodo auxiliar de platina. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos a 20 mV/s num intervalo de -200 mV a 1300 mV. A malvina apresentou processo de oxidação irreversível. Avaliando a influência do pH sobre o processo de oxidação da malvina os autores encontraram valores de I_{pa} máximo para pH 3,65 com E_{pa} 676 mV. No intervalo de valores de pH estudados pelos autores (2,00 a 11,00) apenas o pico de oxidação (anódico) esteve presente, indicando a irreversibilidade do processo redox. Os autores apontam que a oxidação da malvina constitui um processo de dois elétrons, seguindo o mecanismo eHHe estabelecido para hidroquinonas.

YANG, ARAI e KUSU (2001) estudaram o comportamento eletroquímico de dois flavonóides, a quercetina e o kaempferol, em uma solução de tampão metanólico neutro, usando voltametria cíclica e um método espectroeletroquímico. Os autores relataram um método simples para estimar a atividade antioxidante de flavonóides. O método teve como base a medida do potencial de meia onda ($E_{1/2}$) da primeira oxidação do flavonóide usando um fluxo através de uma coluna de eletrólise. O eletrodo de trabalho era de fibra de carbono, o eletrodo de referência era um Ag/AgCl, a solução suporte consistia de uma mistura de metanol: 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,5) (1:1, v/v). Os autores encontraram valores de $E_{1/2}$ de : - 30 mV para a miricetina, 20 mV para a quercetina, 80 mV para o kaempferol, 180 mV para a rutina, 92 mV para catequina. Os autores apontam alguns princípios que governariam os valores de $E_{1/2}$ dos flavonóides: o grupo pirogaloil; o grupo catecol; a coexistência de ligações duplas 2,3 conjugadas com um grupo 4-oxo e um grupo 3-hidroxil; e o último princípio, substituintes adicionais com ressonância efetiva. Os valores de $E_{1/2}$ dependem grandemente da estrutura do flavonóide.

CAPÍTULO 1

Determinação de nitritos em eletrodo de carbono vítreo modificado com poli -{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}

1. INTRODUÇÃO

A exposição contínua a nitratos e nitritos é relevante sob o ponto de vista toxicológico, devido à possibilidade de formação de compostos N-nitrosos (nitrosaminas), indutores de câncer (DUARTE & MÍDIO, 1996). O nitrato pode ser convertido em nitrito no trato gastrointestinal pela ação de bactérias redutoras e este pode ser transformado em nitrosaminas no estômago (LEVALLOIS & PHANEUF, 1994). Esta reação de redução de nitratos a nitritos também pode ocorrer no próprio alimento dependendo das condições que o mesmo oferece.

Apesar de existirem diversos métodos para determinar íons nitrito, tais como: cromatografia gasosa (TSIKAS et al., 1994; KAGE; KUDO & IKEDA, 2000); cromatografia líquida (CONNOLLY & PAULL, 2001; KAWASHIMAA et al., 2004); espectrofotometria (KAZEMZADEHA & ENSAFI, 2001; AZANZA & RUSTIA, 2004; YUE, ZHANG & YAN, 2004); fluorimetria (FERNÁNDEZ-ARGÜLLES et al, 2004; BISWAS; CHOWDHURY; RAY, 2004); cromatografia de troca iônica (KAPINUS et al., 2004); quimiluminescência (MIKUSKA; VECERA, 2003; LUA et al., 2004), entre outros (GAPPERA et al., 2004).

O desenvolvimento tecnológico em química analítica promove naturalmente o desenvolvimento de metodologias de baixo custo (em termos de consumo de amostras e reagentes, e despesas com manutenção), confiáveis e, se possível, requerendo equipamentos portáteis.

Este trabalho pretende oferecer informações para estudos posteriores visando a utilização de um eletrodo revestido com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} na quantificação eletroquímica de íons nitrito em alimentos. O eletrodo revestido com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} foi estudado juntamente com técnica amperométricas reconhecidas e desenvolvido conjuntamente com uma aplicação direta da tecnologia de polímeros condutores.

O eletrodo revestido com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} poderá ser um instrumento vantajoso na determinação quantitativa de nitritos em alimentos quando em comparação com o método oficial, utilizado como análise de rotina. As técnicas eletroquímicas, em geral, apresentam maior rapidez, sensibilidade, eliminação de etapas de purificação da amostra, além de dispensar o uso de reagentes tóxicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do trabalho é a aplicação e otimização de uma técnica alternativa para quantificação de nitritos em alimentos. A técnica voltamétrica está baseada em um sensor formado por um eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} em uma célula eletroquímica contendo um sistema de três eletrodos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o complexo trans-[RuCl₂(vpy)₄] (trans-dicloro tetraquis 4-vinilpiridina rutênio) e depositar através de eletrodeposição o filme polimérico poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} contendo centros redox de rutênio sobre eletrodo de carbono vítreo;
- Utilização do eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} na análise de nitritos em alimentos (patês);
- Determinação dos parâmetros voltaméticos envolvidos na aplicação do eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} em análise de alimentos (patês);
- Otimização da técnica utilizando o eletrodo modificado de poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} ;
- Comparação dos resultados obtidos com a técnica otimizada e os resultados obtidos com o método espectrofotométrico oficial (AOAC), Reação de Griess.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados, nos Departamentos de Química e de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 Reagentes e soluções

4-vinilpiridina (Sigma-Aldrich) foi purificada por destilação a $(70,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ sob vácuo para remoção do inibidor (usado para prevenir a polimerização das moléculas de vinilpiridina sob armazenamento) . Ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (Vetec), $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), NaNO_2 (MERCK) os demais reagentes utilizados nos experimentos eletroquímicos, bem como nos processos de limpeza (eletroquímica e química) e nas sínteses do monômero trans- $[\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4]$, apresentaram grau analítico.

3.3 Eletrólitos e Solventes

Os eletrólitos suporte utilizados para permitir a condutividade iônica ao meio foram: HTBA, LiClO_4 (perclorato de lítio), NaAc (acetato de sódio), KCl (cloreto de potássio). Os solventes empregados: $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (4:1) (acetonitrila:diclorometano), H_2O destilada e deionizada, metanol, etanol apresentaram grau de pureza analítico.

O sistema eletrólito/solvente utilizado nas eletrodeposições do monômero trans- $[\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4]$ foi mantido constante durante todo o trabalho, e era composto por $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ de HTBA como eletrólito e uma mistura de solventes: $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ na proporção de 4:1 (v/v), de modo a facilitar a dissolução do complexo metálico. Utilizou-se em todos os casos, um volume de 20 mL.

3.4 Célula eletroquímica

As copolimerizações foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de um compartimento, contendo três eletrodos sendo: eletrodo de trabalho, Et; contra-eletrodo, Ec, eletrodo de referência, Er e entrada e saída para gás, conforme Figuras 10 e 11.

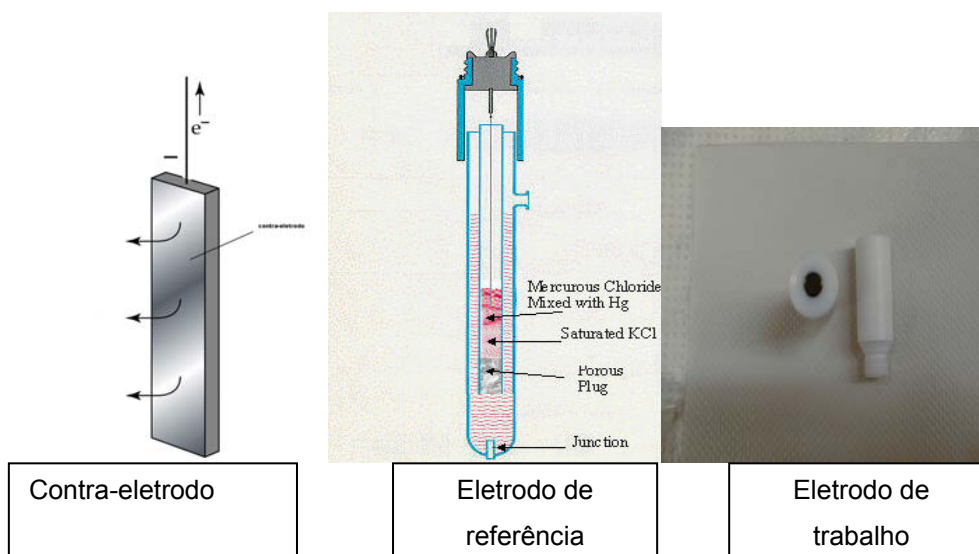


Figura 10. Ilustração dos eletrodos utilizados nos experimentos eletroquímicos.

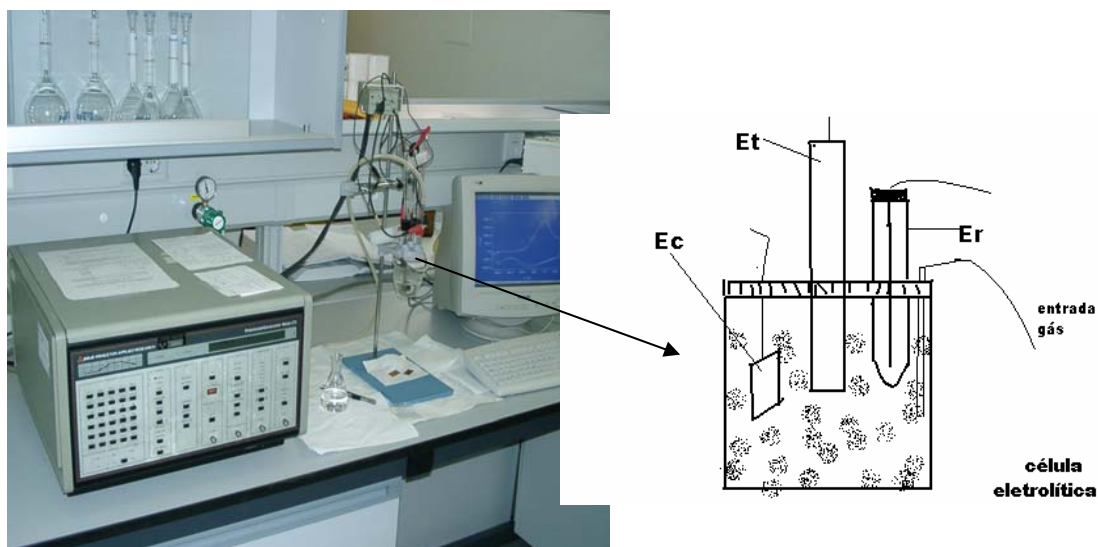


Figura 11. Ilustração da disposição do potenciostato e da célula eletroquímica.

Foram utilizados um eletrodo de platina (Pt), com área superficial de $0,502 \text{ cm}^2$ da PINE, e dois eletrodos de carbono vítreo de fornecedores distintos, um com área superficial de $0,950 \text{ cm}^2$ da PINE e o outro com área de $0,342 \text{ cm}^2$ da PAR como eletrodos de trabalho, para investigar a influência dos diferentes substratos no filme produzido. Como contra-eletrodo foram utilizadas placas de platina amarradas a um fio também de platina, totalizando uma área de $3,0 \text{ cm}^2$. O eletrodo de referência utilizado para as deposições foi Ag/Ag^+ , que consistia em um fio de prata mergulhado em um recipiente de vidro com uma placa porosa e solução $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ de AgNO_3 em acetonitrila. Para os demais procedimentos nos quais o solvente do sistema não era orgânico e consistia de H_2O destilada/deionizada, o eletrodo de referência utilizado foi o de calomelano saturado $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{(\text{sat.})}$ (SCE).

3.5 Instrumentos

Na metodologia clássica para determinação de nitritos, reação de Griess, foi utilizado um espectrofotômetro HP8452-A com interface para microcomputador e na detecção oxidativa um Potenciostato/Galvanostato da E.G & G.PAR 273A, também com interface, via cartão de interface GPIB da National Instruments Co.

3.6 Síntese do Complexo poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}

A síntese do complexo de rutênio foi realizada via azul de rutênio segundo Paula et al. (1998). Para esta, 260 mg (0,1 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em metanol (10 mL) foram mantidos sob aquecimento em manta aquecedora, abrigo da luz e fluxo de gás argônio constante, durante 4 horas. Após esse tempo houve o desenvolvimento da coloração azul na solução que recebeu 1,0 mL de 4-vinilpiridina (9,5 mmol) e 100 mg de hidroquinona. O sistema foi novamente protegido da luz e mantido sob fluxo constante de gás argônio durante mais 40 minutos. O volume da solução obtida foi reduzido sob vácuo. O produto foi extraído a partir da reação com clorofórmio. A fase orgânica foi repetidamente lavada com água destilada em um funil de separação para

remover algum resíduo que pudesse estar presente. O produto final foi obtido pela evaporação do clorofórmio e se caracterizou como um pó vermelho amorfo.

3.7 Preparação dos eletrodos modificados monocamada

Os eletrodos foram preparados por polimerização eletroquímica em célula convencional de um compartimento, contendo o eletrodo de trabalho, contra-eletrodo de platina e eletrodo de referência (Ag/Ag⁺ em acetonitrila), em uma mistura de acetonitrila e diclorometano na proporção de 4:1 (v/v). Utilizou-se 4,8 mmol L⁻¹ do composto RuCl₂(vpy)₄ sintetizado como descrito anteriormente, juntamente com 0,50 mmol L⁻¹ de HTBA. A mistura foi então desaerada por 10 minutos usando-se gás argônio. Posteriormente, foi utilizada a técnica de voltametria cíclica aplicando-se ciclos consecutivos de varredura (25 a 50 ciclos) na faixa de potencial de 0,2 V a 2,75 V em velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹. Terminados os ciclos, os eletrodos modificados eram removidos da solução e secos ao ar atmosférico.

3.8 Caracterização dos eletrodos modificados monocamada

Após secagem, o eletrodo de trabalho modificado foi caracterizado em célula eletroquímica convencional de três eletrodos: Et, Ec e Er (Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE)) em uma solução aquosa de 1,0 mol L⁻¹ de perclorato de lítio. Utilizou-se a técnica de Voltametria Cíclica (VC) aplicando-se dois ciclos consecutivos de varredura de potencial entre -0,3 V e 0,5 V a uma velocidade de 100 mV s⁻¹. O recobrimento da superfície do eletrodo foi estimado pela integração da carga (Q) sob uma taxa de varredura lenta (10 mV s⁻¹) usando a relação $Q = nF\tau$, sendo τ_{app} o recobrimento superficial dado em mol cm⁻², F a constante de Faraday e n o número de elétrons (DOHERTY et al., 1996).

3.9 Preparação dos eletrodos modificados bicamada

Após o preparo do eletrodo modificado monocamada, esse foi submetido a uma nova polimerização eletroquímica em célula convencional, contendo um contra-eletrodo de platina e um eletrodo de referência de Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE), calomeano saturado, em uma mistura de metanol e água na proporção de 1:4 (v/v), 0,5 mol L⁻¹ de perclorato de lítio e 0,25 mol L⁻¹ de 4-vinilpiridina. Na voltametria cíclica foram aplicados 3 ciclos para a faixa de potencial de -0,7 V a -0,25 V a uma velocidade de 30 mV s⁻¹.

3.10 Preparação dos eletrodos modificados bicamada com ferrocianeto

A incorporação do ferrocianeto foi realizada em célula eletroquímica contendo 0,002 mol L⁻¹ de ferrocianeto de potássio K₃Fe(CN)₆, 0,5 mol L⁻¹ de cloreto de potássio KCl em solução aquosa com pH 3,0 (ajustado com HCl concentrado), eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE) e contra-eletrodo de platina. A técnica de voltametria cíclica (VC) foi aplicada durante 30 minutos a 50 mV s⁻¹ na faixa de potencial de 0,5 V a -0,2 V.

3.11 Caracterização dos eletrodos bicamada incorporados com ferrocianeto de potássio

Após secagem, o eletrodo de trabalho modificado foi caracterizado em célula eletroquímica convencional de três eletrodos: ET, EC e ER (Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.)), em uma solução aquosa de 0,5 mol L⁻¹ de KCl pH 3,0. Utilizou-se a técnica VC aplicando-se dois (02) ciclos consecutivos de varredura de potencial entre 0,5 V e -0,2 V a uma velocidade de 50 mV/s.

3.12 Influência do pH sobre os voltamogramas de oxidação dos íons nitrito em solução aquosa

Com o objetivo de avaliar a influência do pH sobre as densidades de corrente referentes a oxidação do íon nitrito, foram preparadas soluções tampões nos valores de pH de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0. A

concentração selecionada para o teste foi de $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Para o pH 2,0 utilizou-se tampão ácido clorídrico-cloreto de potássio (50 mL de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com 10,6 mL de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl diluídos a 200 mL); para pHs 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 o tampão citrato-fosfato (solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cítrico com uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato de sódio dibásico em proporções específicas para cada valor de pH); para pHs 7,0 e 8,0 o tampão fosfato (solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato monobásico de sódio com solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato de sódio dibásico em proporções específicas para cada valor de pH) e para pH 9,0 o tampão Tris (50 mL de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de tris-hidroximetil-aminometano com 5 mL de uma solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl diluídas para 200 mL). Para cada solução tampão foram realizadas cinco leituras consecutivas da corrente anódica para o nitrito na concentração de $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ usando-se a técnica de voltametria cíclica, a 50 mV/s com variação de potencial entre 0,3 e 2,2 mV.

3.13 Avaliação da técnica voltamétrica sobre a sensibilidade na detecção de íons nitrito em solução aquosa (Voltametria Cíclica versus Voltametria de Pulso Diferencial)

Os íons nitrito foram detectados utilizando célula eletroquímica composta por um contra-eletródo de platina, um eletródo referência $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{(\text{sat.})}$ (SCE) (calomelano saturado) e um eletródo de trabalho de carbono vítreo modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} ($\tau_{\text{app}} = 1,14 \times 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$). As concentrações de NO_2 variaram entre $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Foram realizadas leituras consecutivas ($n = 5$) para cada uma das técnicas voltamétricas: VC e DPV.

3.14 Determinação quantitativa dos íons nitrito em amostra de alimento usando a reação de Griess segundo AOAC

Pesou-se entre 10,0 e 20,0 g em balança analítica de amostras de patê comerciais. Acrescentou-se 30 mL de água destilada quente ($100,0 \pm 1,0$)°C quantitativamente para frasco Erlenmeyer de 100 mL. Após, os frascos fechados (filme) foram lavados à banho-maria ($70,0 \pm 1,0$)°C durante duas horas. Após o tempo de extração, adicionou-se 70,0 mL de água destilada quente às amostras e resfriou-as em banho de gelo. Adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 15% (p/v) e agitou-se. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de uma solução de sulfato de zinco 30,0% e agitou-se. Transferiu-se para um balão volumétrico de 250 mL, filtrando-se em papel filtro. O volume foi completado. Pipetou-se 1 mL desse balão e transferiu-se para um balão de 50 mL juntamente com 5 mL de uma solução de ácido sulfanílico (0,083 g de ácido sulfanílico em 50 mL de uma solução aquosa de ácido acético 25,0% (v/v)). Após 5 minutos, adicionou-se o reagente NED (0,066 g de N-(1-naftil)etilenodiamina em 50 mL de uma solução aquosa de ácido acético 15,0% (v/v)). Após 15 minutos de desenvolvimento da cor, foi realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

A curva analítica, foi construída, a partir de uma solução estoque (0,5 g de NaNO_2 em 1000 mL de água destilada). Alíquotas de 5 mL da solução de trabalho foram misturadas aos reagentes anteriormente mencionados (reação de Griess) e lidas em espectrofotômetro a 540 nm.

3.15 Determinação quantitativa dos íons nitrito em amostra de alimento usando eletrodo de carbono vítreo modificado com poli- $\{\text{trans-}\{\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4\}\}$ e DPV

Pesou-se entre 10,0 e 20,0 g em balança analítica de amostras de patê comerciais. Acrescentou-se 30 mL de água destilada quente quantitativamente para frasco Erlenmeyer de 100 mL. Após, os frascos fechados (filme) foram lavados à banho-maria ($70,0 \pm 1,0$)°C durante duas horas. Após o tempo de extração, adicionou-se 70 mL de água destilada

quente às amostras e resfriou-as em banho de gelo. Transferiu-se para um balão volumétrico de 250 mL, filtrando-se em papel Watman n. 40. O volume foi completado com eletrólito suporte acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹/perclorato de lítio 0,2 mol L⁻¹. Pipetou-se 5 mL desse balão e transferiu-se para um balão de 25 mL, completando-se com eletrólito. Uma alíquota de 10,0 mL de cada extrato de amostra foi analisado por DPV em Potenciostato/Galvanostato, em célula eletroquímica contendo um eletrodo de trabalho de carbono vítreo Vt/PAR modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, um contra-eletrodo de platina, um eletrodo referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl (sat.) (SCE) e aplicando-se o método da Adição Padrão. As concentrações usadas foram de 10, 30 e 50 ppm e os volumes das alíquotas foram de 50 µL da solução padrão contendo nitrito.

3.16 Análise Estatística

Os valores médios foram obtidos a partir de leituras consecutivas (n=5) e foram avaliados por análise de variância ANOVA, e quando era o caso, o teste de Tukey para verificar diferenças significativas era aplicada a um nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do complexo *trans*-[RuCl₂(vpy)₄]

Inicialmente o complexo *trans*-[RuCl₂(vpy)₄] foi sintetizado e purificado. A estrutura do complexo metálico pode ser observada na Figura 12. O complexo pertencente a família *trans*-[RuCl₂(L)₄] possui sítios eletropolimerizáveis redutivamente formado por quatro unidades de vinilpiridina.

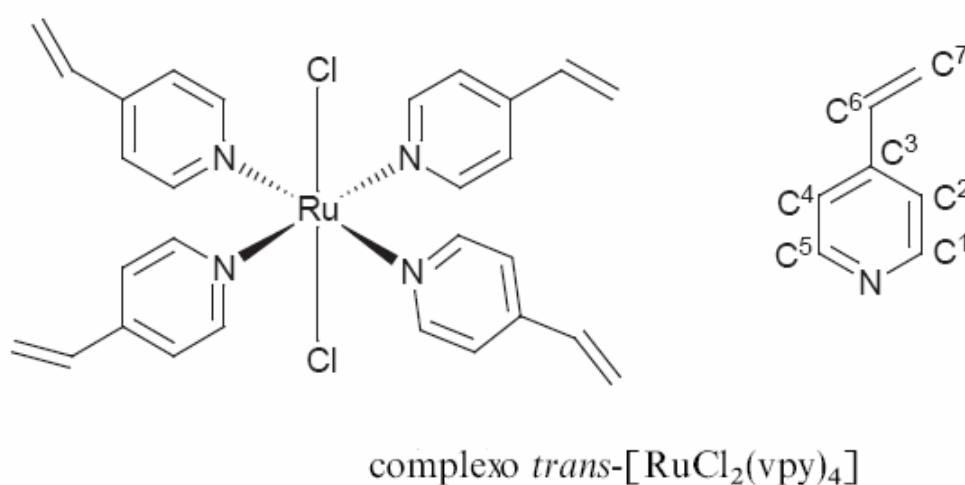


Figura 12. Estrutura do complexo metálico *trans*-[RuCl₂(vpy)₄].

Os centros metálicos de rutênio no centro do complexo, quando imobilizados na matriz polimérica sobre a superfície do eletrodo podem atuar como mediadores para reações e promover tanto a oxidação quanto a redução catalítica de espécies eletroativas na solução.

4.2 Pomerização Eletroquímica do poli-{*trans*-[RuCl₂(vpy)₄]} sobre os eletrodos de trabalho

Nas Figuras 13, 14 e 15 é possível observar os perfis eletroquímicos obtidos durante o processo de polimerização eletroquímica, usando voltametria cíclica, para os eletrodos de trabalho, GC/PINE, Pt/PINE e

Vt/PAR, respectivamente. O filme polimérico foi gerado por processo eletrorredutivo na região de proteção catódica do substrato, o que conferiu alta estabilidade ao metal durante o processo de eletropolimerização. É possível observar em todos os três voltamogramas cíclicos além das ondas correspondentes ao par redox $\text{Ru}^{3/2}$ e $\text{Ru}^{2/3}$ entre 100 mV e 200 mV, as ondas referentes a redução dos grupos vinil entre -1500 mV e -2750 mV, juntamente com uma onda de adsorção próxima a 800 mV.

As características dos filmes são pronunciadamente dependentes de parâmetros tais como solvente, concentração das espécies eletroativas, potencial aplicado, tempo e densidade de corrente (BANDEIRA, 2001).

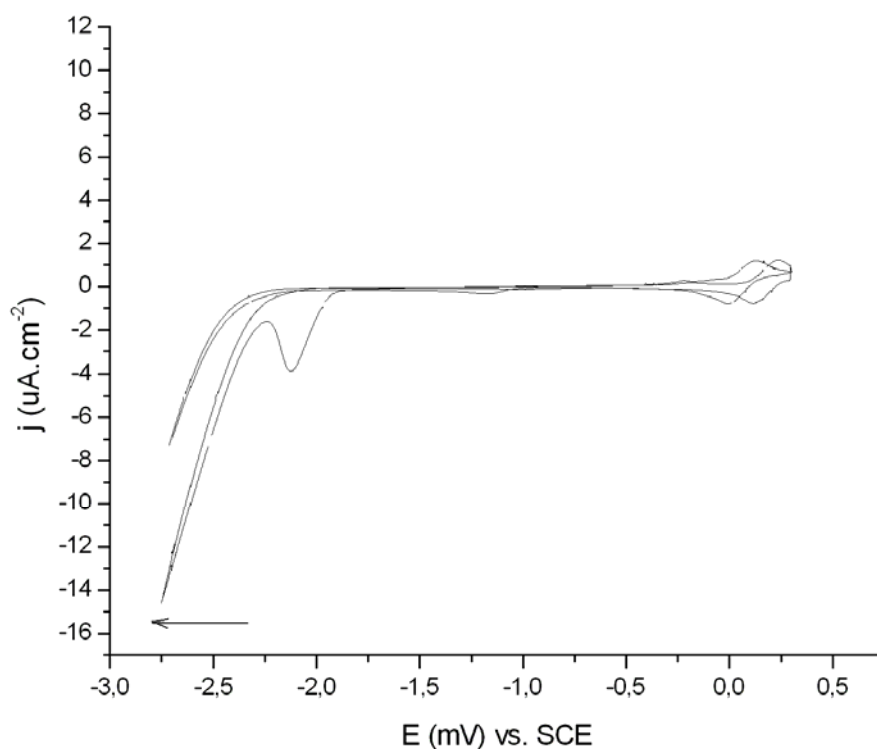


Figura 13. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos observados durante o processo de polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo $\text{trans-[RuCl}_2(\text{vpy})_4]$ sobre eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE), área de $0,950 \text{ cm}^2$ em solução de acetonitrila:diclorometano na proporção 4:1 (v/v) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HTBA, usando voltametria cíclica, 30 mV s^{-1} .

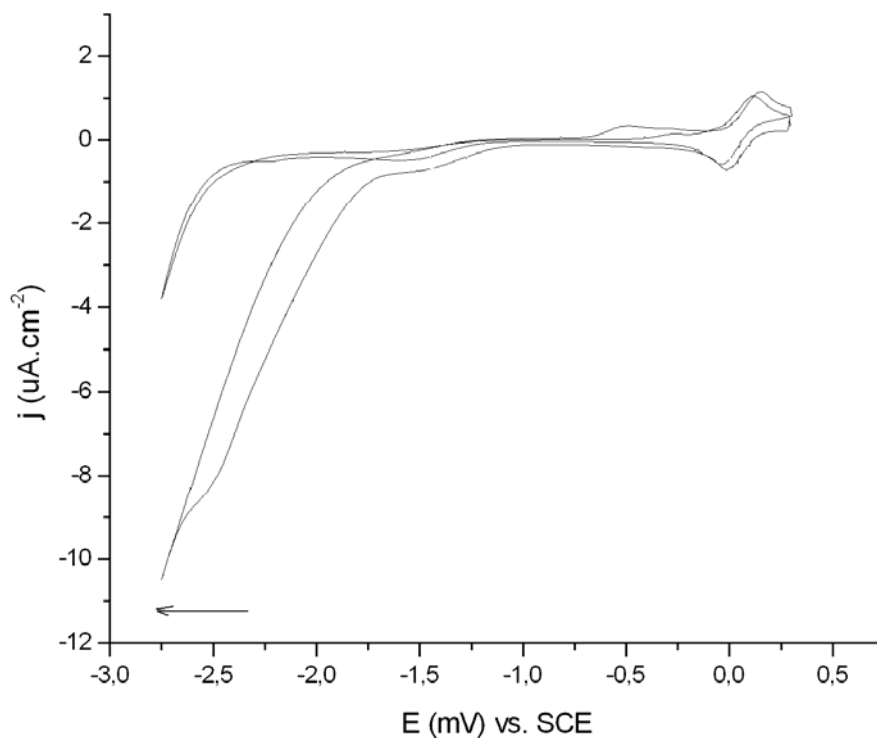


Figura 14. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos observados durante o processo de polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo trans-[RuCl₂(vpy)₄] sobre eletrodo de platina (Pt/PINE), área de 0,502 cm², em solução de acetonitrila:diclorometano na proporção 4:1 (v/v) contendo 0,1 mol L⁻¹ HTBA, usando voltametria cíclica, 30 mV s⁻¹.

Pode-se observar nas Figuras 13, 14 e 15 que durante o processo de eletrodeposição não existem diferenças entre os perfis dos eletrodos. Essa característica é óbvia, visto que os voltamogramas descrevem o processo redox apenas do complexo. O complexo é único (o trans-[RuCl₂(vpy)₄]) e foi igualmente depositado sobre os diferentes eletrodos sob as mesmas condições. As interações, entre a superfície do eletrodo e o filme polimérico é que determinarão as possíveis diferenças. Essas interações eletrodo/filme podem ser avaliadas durante a utilização do eletrodo modificado na quantificação de nitritos.

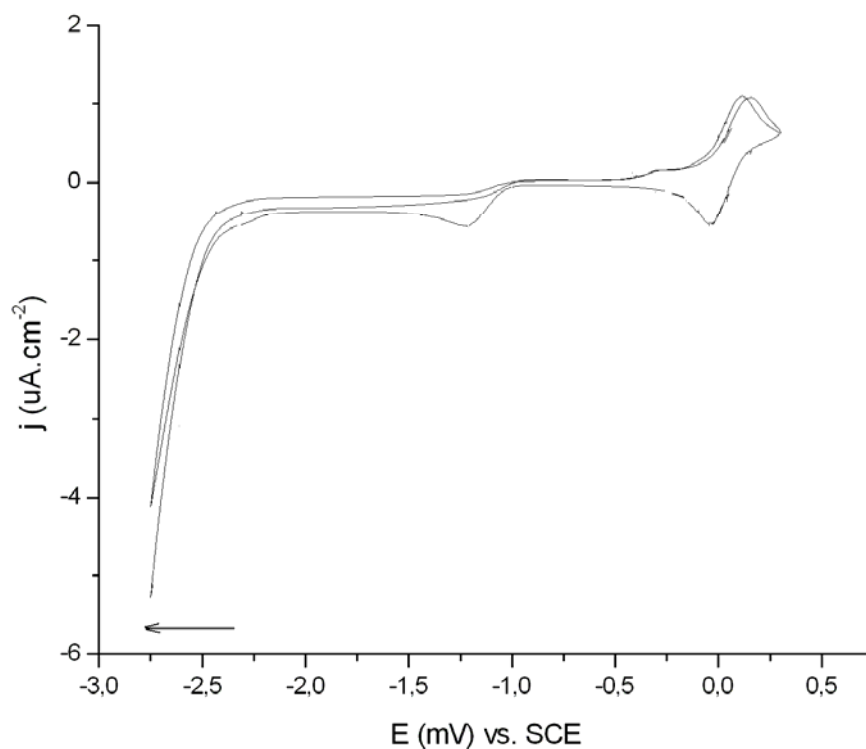


Figura 15. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos observados durante o processo de polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo $\text{trans-[RuCl}_2(\text{vpy})_4]$ sobre eletrodo de carbono vítreo (Vt/PAR), área de $0,342 \text{ cm}^2$ em solução de acetonitrila:diclorometano na proporção 4:1 (v/v) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HTBA, usando voltametria cíclica, 30 mV s^{-1} .

4.3 Caracterização de eletrodos monocamada modificados

Após eletropolimerização do poli- $\{\text{trans-[RuCl}_2(\text{vpy})_4]\}$ os eletrodos modificados foram caracterizados por voltametria cíclica em solução eletrólito suporte de perclorato de lítio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Nas Figuras 16, 17 e 18 é possível observar os perfis eletroquímicos para os eletrodos modificados GC/PINE, Pt/PINE e Vt/PAR, respectivamente.

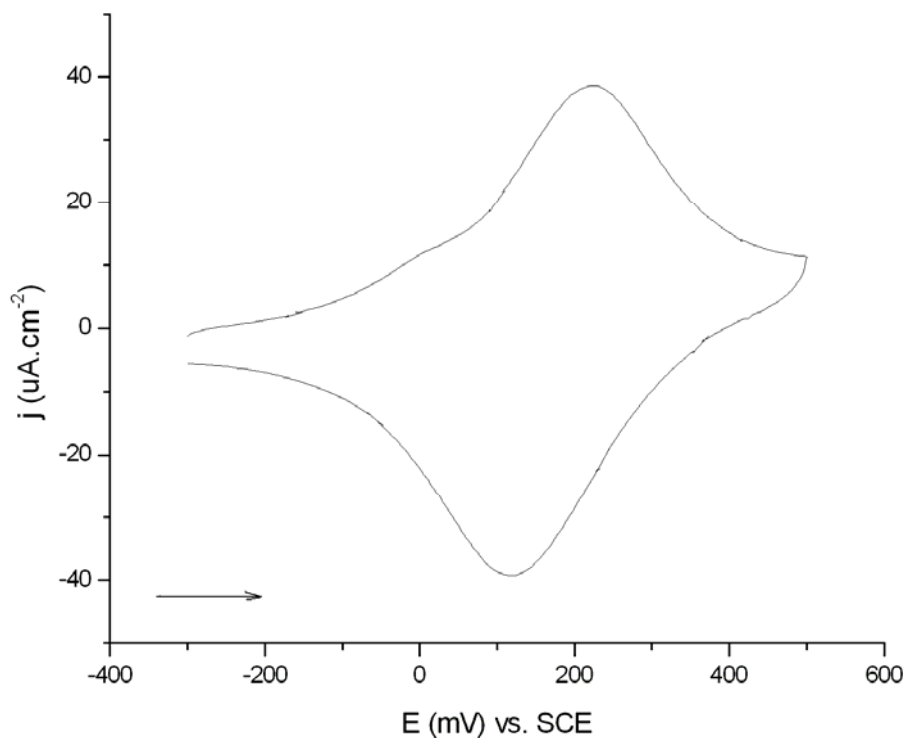


Figura 16. Voltamograma do perfil eletroquímico do eletrodo modificado com poli-trans-[RuCl₂(vpy)₄]. Eletrodo de disco de carbono vítreo sólido (GC/PAR) área de 0,950 cm² em solução aquosa contendo 1,0 mol L⁻¹ de LiPO₄, usando voltametria cíclica, 50 mV/s para variação de potencial de -0,3 V a 0,5 V. $\tau_{app} = 2,60 \times 10^{-9}$ mol cm⁻².

Uma varredura de potencial iniciada em -300 mV em direção anódica promove o aparecimento de um par de ondas intensas e reversíveis, atribuídas ao par redox Ru^{3/2} que pode ser observado em $E^0 = 172,5$ mV, $E^0 = 157,5$ mV e $E^0 = 177,5$ mV, para os eletrodos GC/PINE, Pt/PINE e Vt/PAR, respectivamente.

Em geral, a polimerização é maior na platina do que no carbono vítreo $\tau_{app} = 2,60 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² para o eletrodo GC/PAR, $\tau_{app} = 7,74 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² para o eletrodo Pt/PINE e $\tau_{app} = 3,25 \times 10^{-9}$ mol cm⁻² para o eletrodo Vt/PAR. Esses valores para recobrimento aparente foram calculados conforme descrito na seção 4.8. Essa dependência do substrato pode estar associada a parâmetros de diferentes taxas heterogêneas, comportamentos de adsorção

ou nucleação ou propriedades de adesão do material que constitui a superfície do eletrodo (BANDEIRA, 1998).

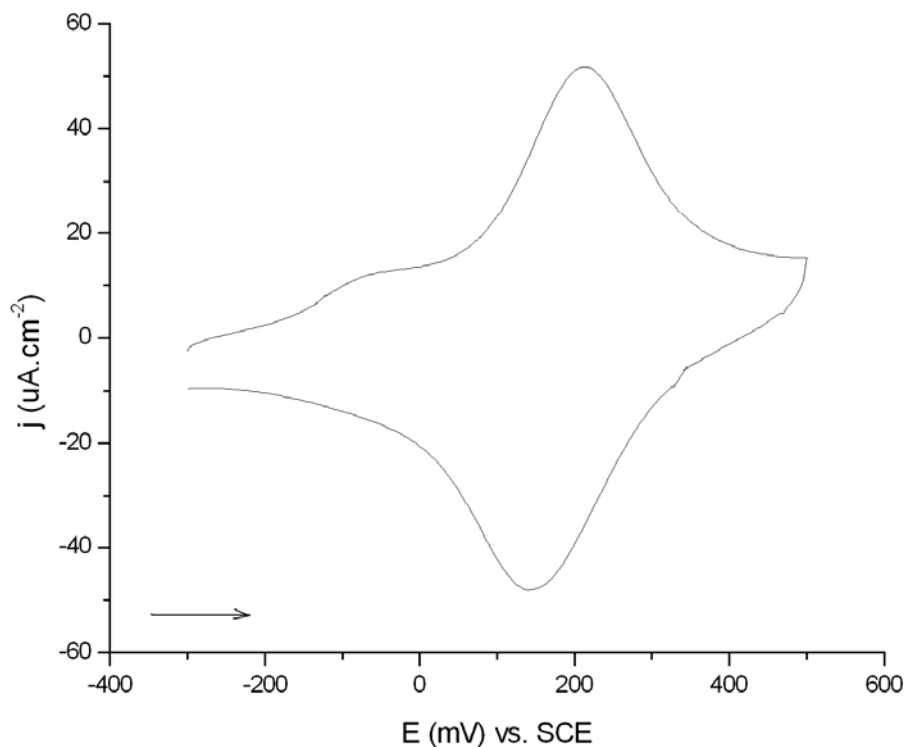


Figura 17. Voltamograma do perfil eletroquímico do eletrodo modificado com poli-trans-[RuCl₂(vpy)₄]. Eletrodo de disco de platina sólido (Pt) área de 0,502 cm² em solução aquosa contendo 1,0 mol L⁻¹ de LiPO₄, usando voltametria cíclica, 50 mV/s para variação de potencial de -0,3 V a 0,5 V. $\tau_{app} = 7,74 \times 10^{-9}$ mol cm⁻².

Além disso, BANDEIRA (2001) sugere que o processo catalítico não está relacionado com uma mediação promovida pelos centros de rutênio, mas provavelmente ao não envenenamento da superfície do eletrodo e também ao possível efeito pré-concentrador do filme polimérico, o qual apresentou-se positivamente carregado no potencial de oxidação do analito. BANDEIRA (2001) obteve a partir do gráfico de Levich, para a oxidação de 0,2 mmol L⁻¹ de Na₂NO₂ em eletrodo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, um coeficiente de difusão do íon nitrito em solução de $5,53 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹.

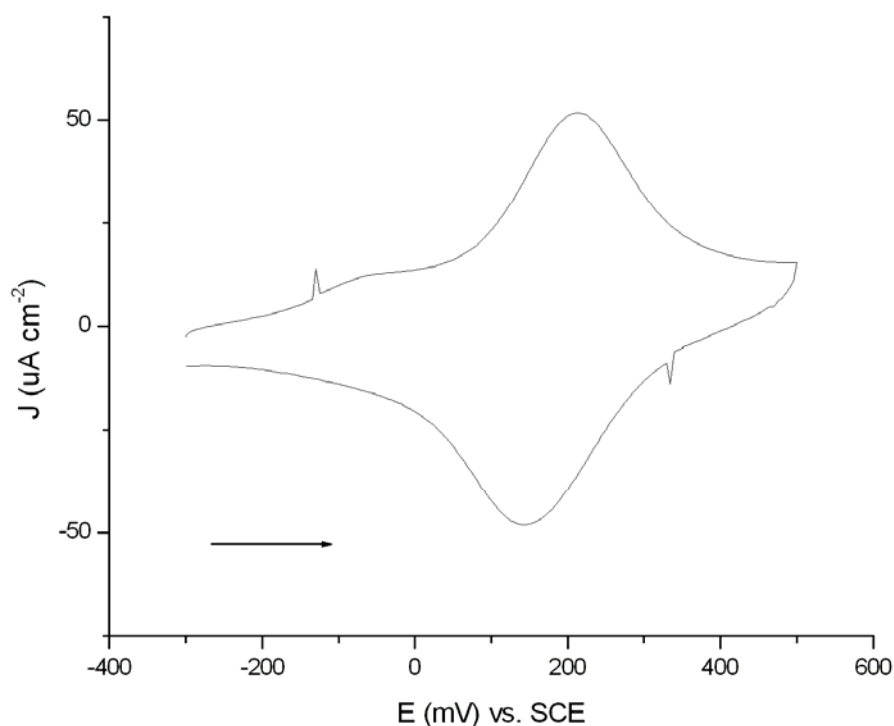


Figura 18. Voltamograma do perfil eletroquímico do eletrodo modificado com poli-trans-[RuCl₂(vpy)₄]. Eletrodo de disco de carbono vítreo (Vt/PAR) área de 0,342 cm² em solução aquosa contendo 1,0 mol L⁻¹ de LiPO₄, usando voltametria cíclica, 50 mV/s para variação de potencial de -0,3 V a 0,5 V. $\tau_{app} = 3,25 \times 10^{-9}$ mol cm⁻².

4.4 Caracterização dos eletrodos bicamada

Revestimentos formados por eletropolimerização da poli(4-vinilpiridina) podem proporcionar propriedades vantajosas como excelente adesão, dureza, estabilidade química e resistência à corrosão. Polímero de troca iônica (TANTAVICHET, PRITZKER & BURNS, 2001). Na tentativa de aumentar a estabilidade do eletrodo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄] } bem como melhorar as propriedades concentradoras e anti-envenamento da superfície do eletrodo, sobre o polímero redox contendo rutênio foi eletropolimerizada uma matriz de vinilpiridina. Os resultados obtidos durante a caracterização dos eletrodos bicamada são apresentados na Figura 19. Ao contrário do esperado, observa-se uma redução nos picos de corrente anódica e catódica

(valores máximos entre 10 mV e 15 mV). A onda característica do par redox $\text{Ru}^{2+/3+}$ perdeu sua definição, sugerindo um menor transporte de elétrons entre a solução e o par redox. Um deslocamento catódico do pico catódico também pode ser observado com um $\Delta E = 125$ mV. Os voltamogramas obtidos para os eletrodos, Pt/PINE e Vt/PAR apresentaram as mesmas características, por isso não são apresentados. Estes eletrodos foram testados na detecção de íons nitrito.

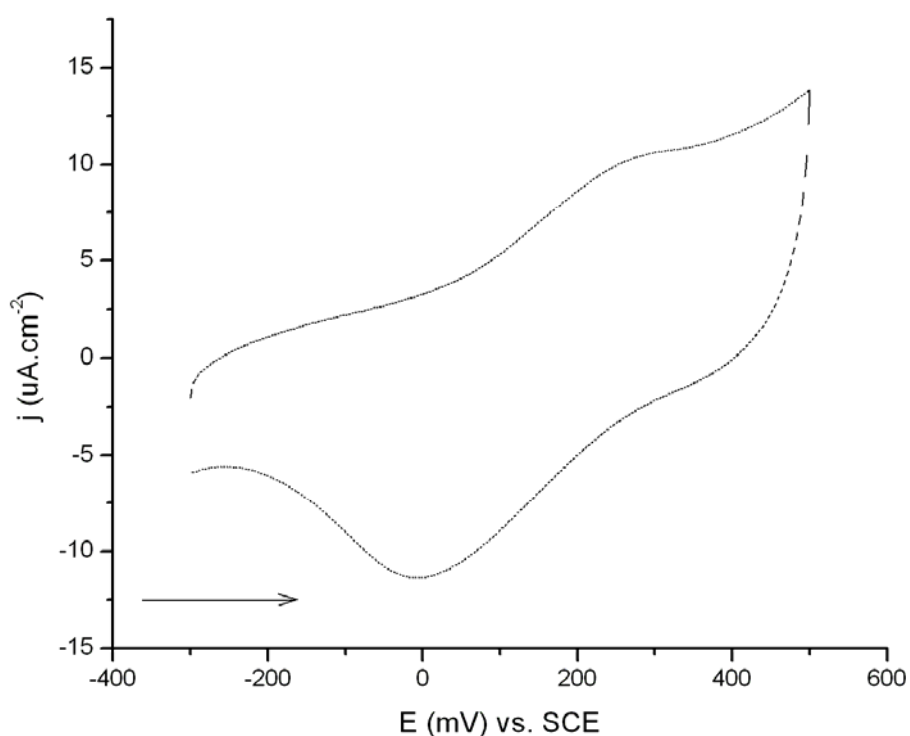


Figura 19. Voltamogramas do perfil eletroquímico do eletrodo bicamada, eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE), área de $0,950 \text{ cm}^2$ após dois processos de eletrodeposição. Primeiro processo: polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo $\text{trans-}[\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4]$ em solução de acetonitrila:diclorometano na proporção 4:1 (v/v) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HTBA, usando voltametria cíclica, 30 mV s^{-1} . Segundo processo eletrodeposição da 4-vinilpiridina a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ em uma mistura de metanol:água na proporção de 1:4 (v/v) e de perclorato de lítio a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, usando VC, 30 mV s^{-1} , 3 ciclos.

4.5 Eletroincorporação de ferrocianeto no eletrodo bicamada

A incorporação eletrostática de espécies redox, como é o caso do $\text{Fe}[(\text{CN})^{-3}]_6$, dentro de um filme eletropolimerizado (como é o caso do poli(4-vinilpiridina) produz um eletrodo modificado com polímero de troca iônica (TANTAVICHET, PRITZKER & BURNS, 2001). Sendo assim, na tentativa melhorar as propriedades do eletrodo modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, após o processo de eletropolimerização de grupos vinilpiridina foram incorporadas, na matriz polimérica resultante, as espécies redox $\text{Fé}[(\text{CN})^{-3}]_6$. O resultado desse processo pode ser observado na Figura 20.

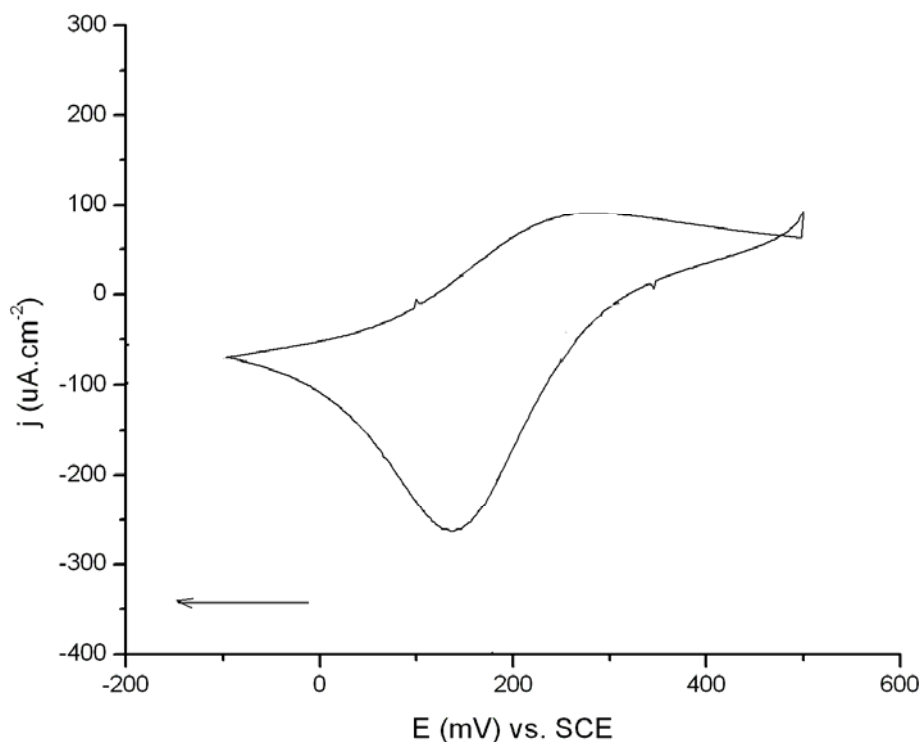


Figura 20. Voltamograma do perfil eletroquímico do eletrodo bicamada, (GC/PINE), $0,950 \text{ cm}^2$ após três processos de eletrodeposição. Primeiro: polimerização oxidativa e deposição eletroquímica do complexo trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]. Segundo: eletrodeposição da 4-vinilpiridina. Terceiro: incorporação de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (pH 3,0), usando VC, durante 30 minutos, a 50 mV s^{-1} .

Percebe-se um significativo valor para o pico de corrente catódica $E_{pc} = 145,0$ mV e $J_{pc} = 262,3 \mu\text{A cm}^{-2}$, assimétrico ao pico obtido para corrente anódica de $J_{pa} = 95,8 \mu\text{A cm}^{-2}$ em $E_{pa} = 250$ mV. Os valores de potencial anódico e catódico permaneceram os mesmos daqueles obtidos com eletrodo modificado monocamada, sugerindo a permanência dos sítios de rutênio na primeira camada polimérica. Entretanto, um maior valor para corrente catódica, sugere a incorporação mais eficiente das espécies redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ na região de potencial catódico do eletrodo. Estes eletrodos foram testados na detecção de íons nitrito.

4.6 Determinação de NO_2 em eletrodo nu

Sensores amperométricos para nitritos geralmente operam em potenciais próximos a 1,0 V em eletrodos nus. Entretanto o processo anódico é antecipado quando a superfície do eletrodo é recoberta com polímeros rutenados (ROCHA et al., 2002). Esse comportamento pode ser observado neste estudo, mas apenas para os eletrodos de carbono vítreo. Na Figura 21 tem-se a oxidação dos íons nitrito, usando DPV, em eletrodo nu GC/PINE para diferentes concentrações, e o potencial de pico anódico médio esteve entre 865,0 mV e 915,0 mV conforme Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica $j_{pa}(\mu\text{A cm}^{-2})$ e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodo nu de carbono vítreo (GC/PINE), $0,950 \text{ cm}^2$ por DPV

Conc. NO_2 (ppm)	Conc. NO_2 (mmol L^{-1})	E_{pa} (mV)	J_{pa} ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)
8,0	0,174	910,00 \pm 0,00	6,59 \pm 0,21
16,0	0,347	910,00 \pm 2,75	8,93 \pm 0,22
20,0	0,434	915,00 \pm 0,00	9,04 \pm 0,74
40,0	0,869	915,00 \pm 2,23	15,98 \pm 0,86
80,0	1,739	865,00 \pm 10,00	32,12 \pm 1,19
160,0	3,478	885,00 \pm 2,34	59,19 \pm 0,73

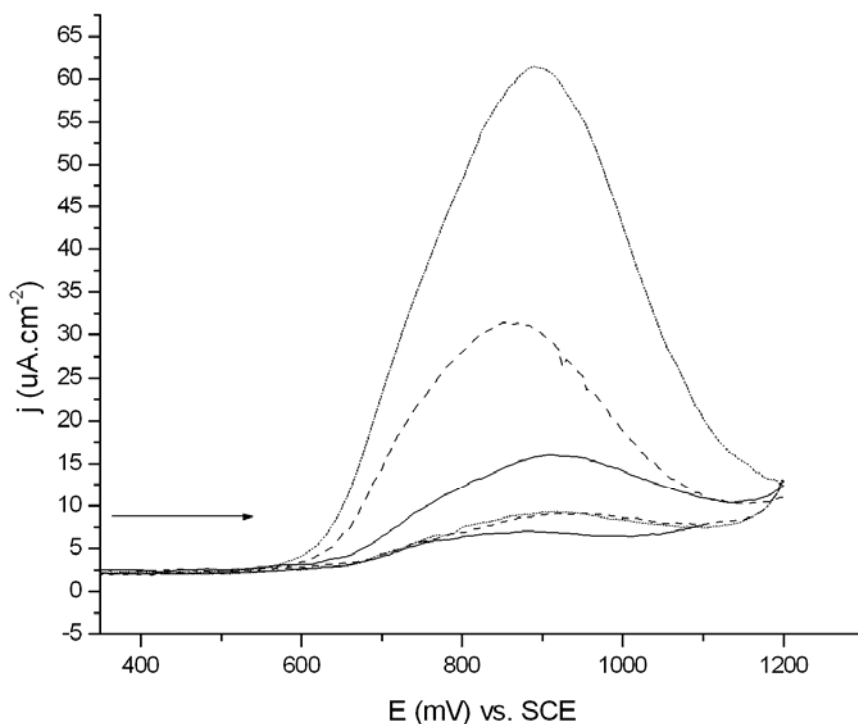


Figura 21. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de carbono vítreo (GC/PINE) área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (—) 8 ppm, (·····)16 ppm, (----) 20 ppm, (— · —) 40 ppm, (— · — · —) 80 ppm e (· · · ·)160 ppm; 50 mV/s , técnica DPV.

Para o eletrodo de platina Pt/PINE, também usando DPV, Figura 22 e Tabela 2, os valores para potencial de oxidação (E_{pa}) permaneceram entre $850,0 \text{ mV}$ e $915,0 \text{ mV}$.

Para o eletrodo nu GC/PINE, a curva de calibração (concentração de íons nitrito x corrente de pico anódico) é dada pela reta $y = 0,3528 x + 2,926$ $r^2 = 0,9982$. As concentrações mínimas e máximas detectadas foram de 8 ppm e 160 ppm, respectivamente (Tabela 1). Enquanto que para o eletrodo nu Pt/PINE a curva é descrita pela reta $y = 0,5355 x$, $r^2 = 0,9900$. As concentrações mínimas e máximas detectadas foram de 20 ppm e 200 ppm na faixa linear. As concentrações de 6,0 ppm, 8,0 ppm, 12,0 ppm e 1000,0 ppm não estavam nesta faixa de linearidade (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica j_{pa} ($\mu\text{A cm}^{-2}$) e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodo nu de platina (Pt/PINE), $0,502 \text{ cm}^2$ por DPV.

Conc. NO_2 (ppm)	Conc. NO_2 (mmol L^{-1})	E_{pa} (mV)	J_{pa} ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)
6,0	0,130	$850,00 \pm 10,11$	$10,12 \pm 0,66$
8,0	0,174	$850,00 \pm 8,16$	$9,73 \pm 1,45$
12,0	0,260	$860,00 \pm 11,16$	$11,90 \pm 0,85$
20,0	0,435	$860,00 \pm 9,43$	$12,46 \pm 0,56$
40,0	0,869	$905,00 \pm 7,43$	$21,42 \pm 1,38$
80,0	1,740	$900,00 \pm 9,76$	$37,03 \pm 1,57$
100,0	2,174	$880,00 \pm 20,14$	$55,25 \pm 1,16$
120,0	2,608	$915,00 \pm 15,21$	$60,89 \pm 1,41$
200,0	4,347	$840,00 \pm 9,87$	$110,41 \pm 1,91$
1000,0	21,739	$915,00 \pm 12,45$	$138,90 \pm 1,09$

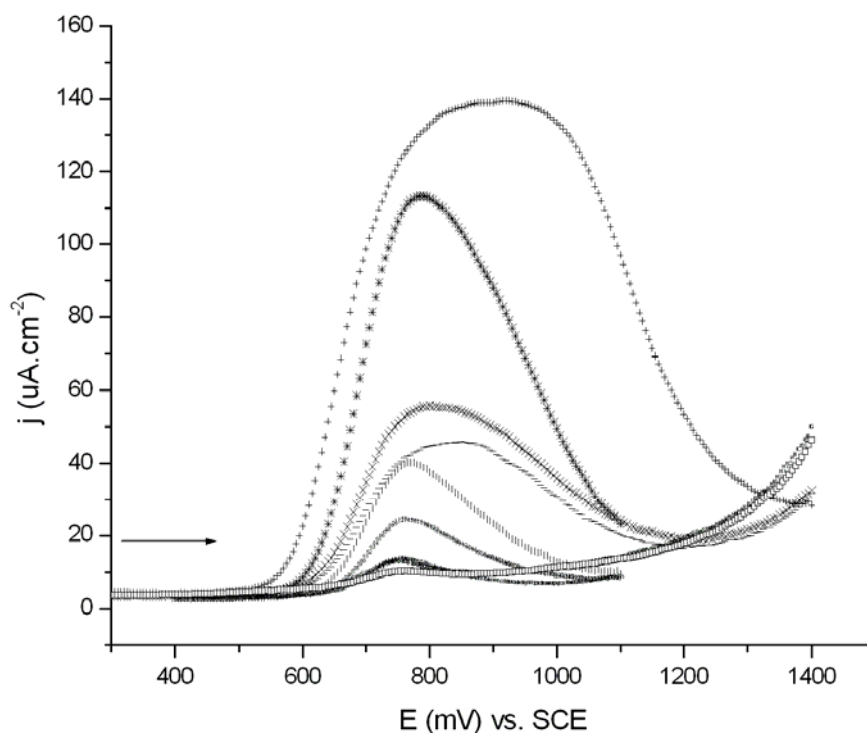


Figura 22. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de platina (Pt/PINE) área de $0,502 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: ($\square\square\square$) 6 ppm, (AAA) 8 ppm, (aaa) 12 ppm, (111) 40 ppm, (III) 80 ppm, (---) 100 ppm, (XXX) 120 ppm, (***) 200 ppm e (++++) 1000 ppm; 50 mV s^{-1} , técnica DPV.

Quando a técnica voltamétrica utilizada era a voltametria cíclica (VC), os resultados obtidos foram: para o eletrodo nu GC/PINE, a curva de calibração é dada pela reta $y = 1,5253x + 18,602$, $r^2 = 0,9882$ (Figura 23 e Tabela 3). Enquanto que para o eletrodo nu Pt/PINE a curva é descrita pela reta $y = 9,44x - 87,324$, $r^2 = 0,9543$ (Figura 24 e Tabela 4).

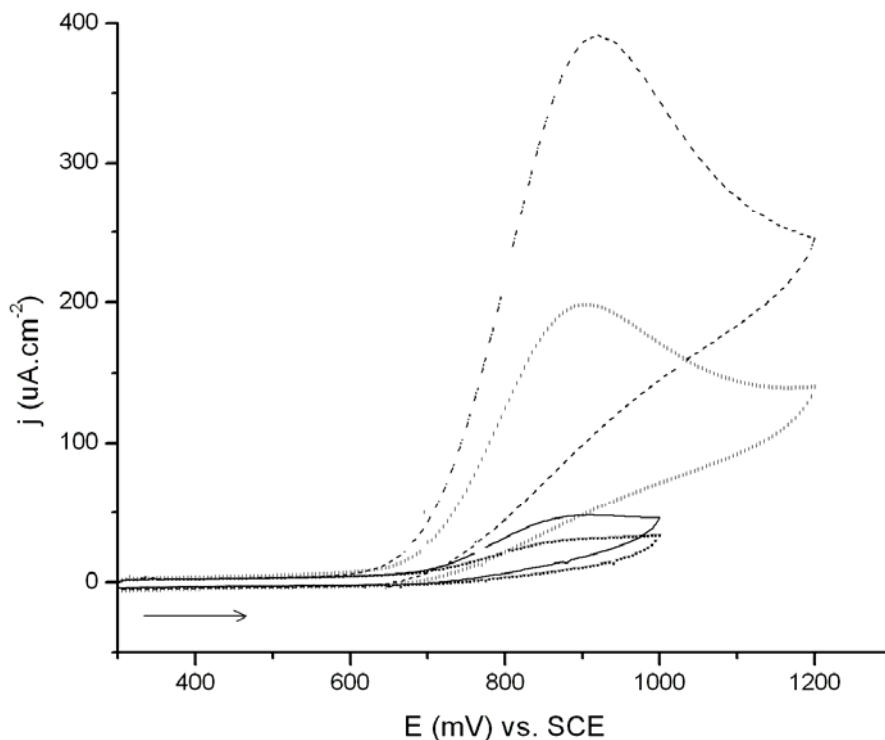


Figura 23. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de carbono vítreo (GC/PINE) área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (····) 10 ppm, (—) 25 ppm, (----) 100 ppm e (-·-·-·) 250 ppm; $\tau_{\text{app}} = 2,25 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, 50 mV/s, técnica VC.

Tabela 3. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica j_{pa} ($\mu\text{A cm}^{-2}$) e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodos nu de carbono vítreo (GC/PINE) por VC

Conc. NO_2 (ppm)	Conc. NO_2 (mmol L^{-1})	E_{pa} (mV)	J_{pa} ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)
10,0	0,217	$850,00 \pm 10,11$	$27,89 \pm 3,25$
25,0	0,543	$860,00 \pm 9,21$	$45,05 \pm 5,17$
100,0	2,174	$900,00 \pm 12,16$	$198,20 \pm 10,32$
250,0	5,434	$915,00 \pm 10,52$	$390,50 \pm 15,98$

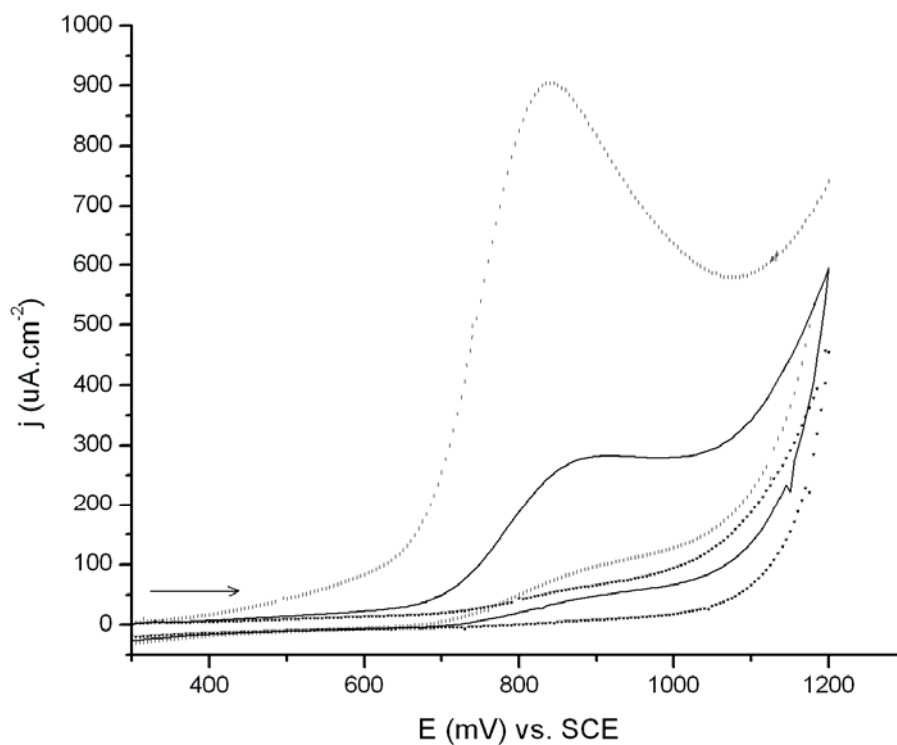


Figura 24. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo nu de platina (Pt/PINE) área de $0,502 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (····) 10 ppm, (—) 50 ppm e (|||) 100 ppm; 50 mV s^{-1} , $\tau_{app} = 7,74 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, técnica VC.

Tabela 4. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica j_{pa} ($\mu\text{A cm}^{-2}$) e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodos nu de platina (Pt/PINE) por VC

Conc. NO_2 (ppm)	Conc. NO_2 (mmol L^{-1})	E_{pa} (mV)	J_{pa} ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)
5,0	0,108	-	-
10,0	0,217	905,00 \pm 7,45	66,73 \pm 12,11
50,0	1,087	880,00 \pm 13,54	277,30 \pm 16,57
100,0	2,174	840,00 \pm 9,26	904,40 \pm 44,65

4.7 Determinação de NO_2 em eletrodos modificados com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} (monocamada)

Na Figura 21, o eletrodo nu GC/PINE apresentou um potencial de pico anódico médio entre 865,0 mV e 915,0 mV, o deslocamento catódico, proporcionado pela matriz polimérica é observado na Figura 25, onde são apresentadas a oxidação de diferentes concentrações de nitrito em eletrodo modificado GC/PINE, usando VC. No eletrodo modificado os valores médios para pico de potencial anódico permaneceram entre 845,0 mV e 875,0 mV (Tabela 4). O eletrodo modificado proporciona um deslocamento catódico da reação de oxidação do íon nitrito, favorecendo a determinação deste íon devido a eliminação de interferências provenientes de reações secundárias, como por exemplo, a decomposição do solvente. Bandeira (1999) sugeriu duas hipóteses para justificar a catálise promovida pelo eletrodo modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} na oxidação do íon nitrito. A primeira fundamenta-se na natureza do eletrodo, a energia livre desta superfície; a modificação do eletrodo impede o envenenamento da superfície melhorando suas propriedades de detecção. A segunda hipótese considera a possibilidade do filme polimérico atuar como um pré-concentrador de íons nitrito, melhorando assim a detecção destas espécies eletroativas.

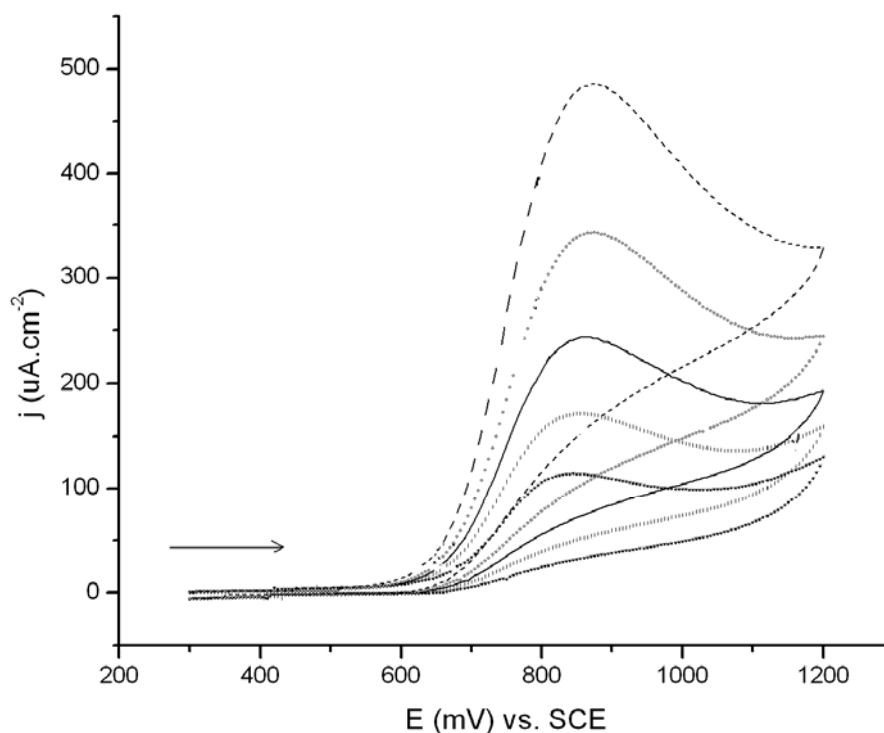


Figura 25. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, para concentrações de (····) 30 ppm, (|||) 50 ppm, (—) 70 ppm, (○○○○) 100 ppm e (---) 150 ppm, 50 mV s^{-1} , $\tau_{\text{app}} = 1,96 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, 50 mV s^{-1} , técnica VC.

O deslocamento catódico pode ser observado, entretanto, esse deslocamento é pequeno, $\Delta E = -40,0 \text{ mV}$, provavelmente, devido ao fato de o sítio redox de rutênio não atuar como um mediador, sendo as propriedades catalíticas atribuídas a matriz polimérica segundo Bandeira (1999). O aumento da sensibilidade do eletrodo modificado, refletido no valor de corrente, em relação ao eletrodo nu de carbono vítreo variou entre 42,25 % e 52,62%. Para o eletrodo de platina Pt/PINE modificado, Figura 26 e Tabela 5, não foi possível detectar os íons nitrito no eletrodo modificado. Esse comportamento provavelmente deve-se a maior polimerização do complexo trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$] sobre a platina. A maior polimerização resulta no aumento da espessura do filme e conseqüentemente dificulta o processo de difusão dos íons nitrito na matriz polimérica. Além disso, a platina é menos adsortiva do

que o carbono vítreo, o que resulta em diferentes interações interfaciais entre a superfície do eletrodo e o filme polimérico.

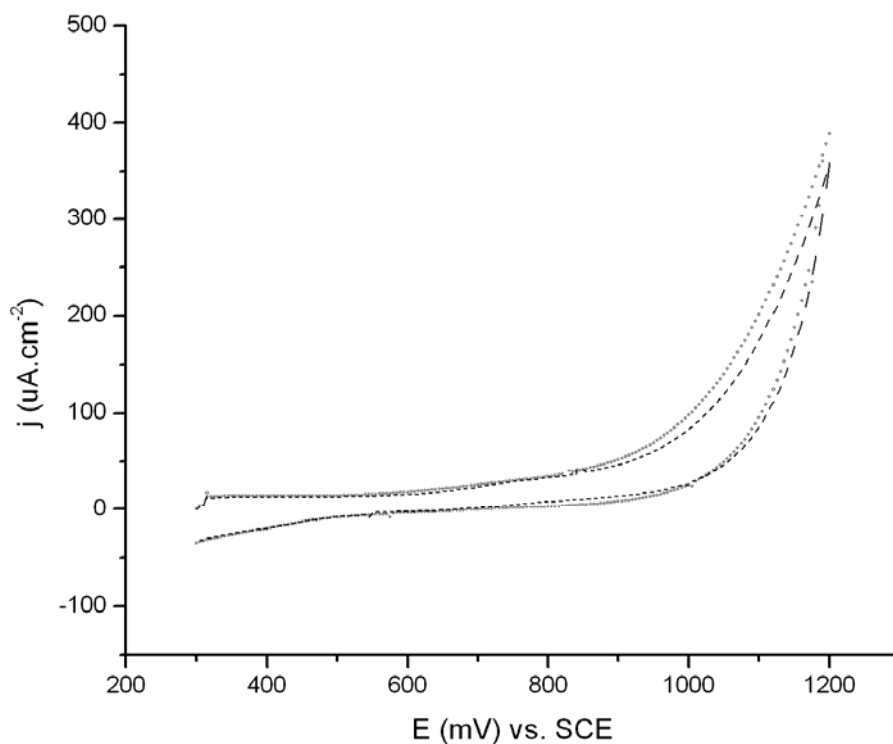


Figura 26. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo platina (Pt) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,520 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (····) 30 ppm, (|||) 50 ppm, (—) 70 ppm, (○○○○) 100 ppm e (----)150 ppm; 50 mV s^{-1} , $\tau_{\text{app}} = 2,69 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$, 50 mV s^{-1} , técnica VC.

Correlações lineares entre os picos de corrente e a taxa de varredura foram encontrados para todos os eletrodos (dados não apresentados).

Tabela 5. Valores médios \pm desvio padrão para picos de corrente anódica j_{pa} ($\mu\text{A cm}^{-2}$) e potencial de pico anódico E_{pa} (mV) para processo de oxidação de íons nitrito em eletrodos modificados de carbono vítreo (GC/PINE) e platina (Pt/PINE) por VC

<i>Eletrodo</i>	<i>Conc. NO₂ (ppm)</i>	<i>Conc. NO₂ (mmol L⁻¹)</i>	<i>E (mV)</i>	<i>J ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)</i>
GC	30,0	0,652	845,00 \pm 10,11	114,10 \pm 9,11
Pt	30,0	0,652	885,00 \pm 7,16	43,03 \pm 4,53
GC	50,0	1,087	850,00 \pm 9,25	171,10 \pm 18,21
Pt	50,0	1,087	885,00 \pm 12,11	47,21 \pm 5,34
GC	70,0	1,521	860,00 \pm 13,21	243,20 \pm 12,61
Pt	70,0	1,521	880,00 \pm 9,43	47,30 \pm 4,32
GC	100,0	2,174	875,00 \pm 8,45	343,20 \pm 15,87
Pt	100,0	2,174	840,00 \pm 12,43	44,40 \pm 6,33
GC	150,0	3,260	875,00 \pm 15,21	485,30 \pm 30,45

4.8 Determinação de NO₂ em eletrodos modificados com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} + 4-vinilpiridina (bicamada)

O processo de eletropolimerização da 4-vinilpiridina não proporcionou aumento na sensibilidade do eletrodo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, ao contrário, bloqueou o transporte de elétrons entre a espécie eletroativa, íons nitrito, e a superfície do eletrodo (Figura 26). Nenhum pico de corrente anódica referente ao processo de oxidação dos íons nitrito foi detectado sobre o eletrodo bicamada. Esse comportamento foi independente da técnica voltamétrica utilizada como pode ser observado na Figura 27 (VC) e na Figura 28 (DPV).

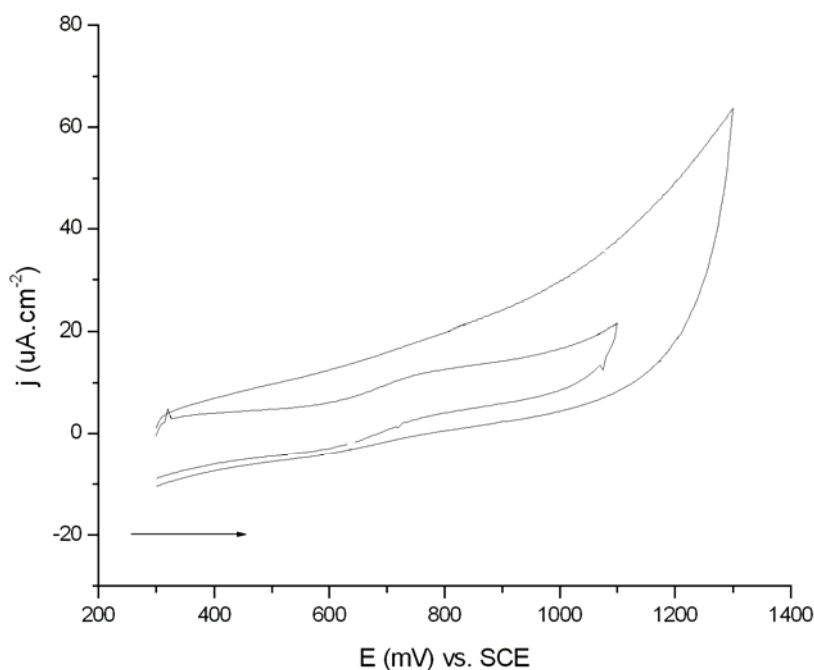


Figura 27. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina (bicamada), área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (—) 50 ppm e (---) 100 ppm; 50 mV s^{-1} , 50 mV s^{-1} , técnica VC.

Apenas o eletrodo Vt/PAR modificado bicamada (Figura 29) apresentou possíveis ondas relacionadas ao processo de oxidação próximo a valores de potencial entre 800 mV e 1000 mV, entretanto não significativos. Isso sugere uma perda do efeito de deslocamento catódico, decorrente do processo de catálise proporcionado pelo filme de poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}. Aparentemente, a matrix polimérica de 4-vinilpiridina proporcionou uma barreira física ao transporte de carga dos íons nitrito, tornando o processo de eletropolimerização bicamada inadequado para aplicação conjunta como a modificação pelo poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} na detecção de íons nitrito.

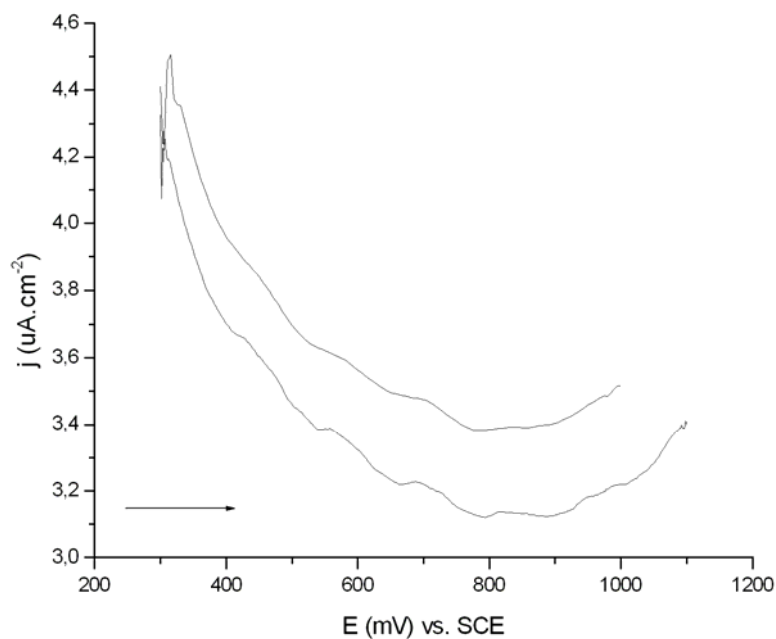


Figura 28. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo GC PINE modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina (bicamada), área de $0,950 \text{ cm}^2$, em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para as concentrações: (—) 50 ppm e (---) 100 ppm; 50 mV s^{-1} , técnica DPV.

Uma comparação entre os dois eletrodos, GC/PINE modificado bicamada e Vt/PAR modificado bicamada pode se observada na Figura 30. Mesmo para o eletrodo Vt/PAR o valor referente a corrente anódica em $850,0 \text{ mV}$ foi de aproximadamente $125,0 \mu\text{A cm}^2$, inferior aquele obtido em eletrodo monocamada no mesmo potencial.

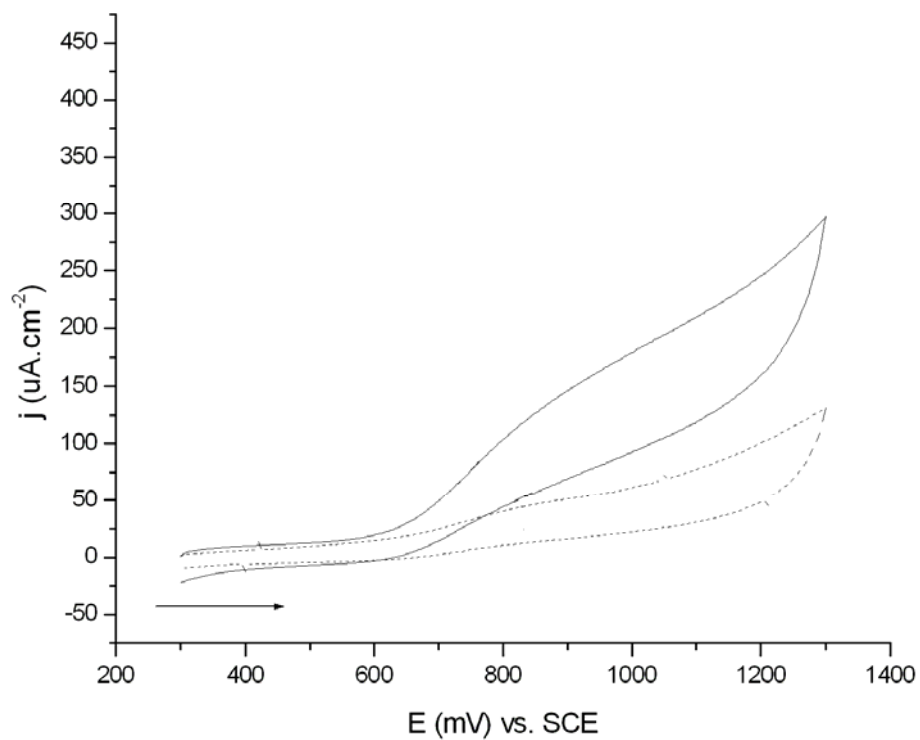


Figura 29. Voltamogramas da oxidação dos íons NO₂ em eletrodo carbono vítreo Vt PAR modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} + 4-vinilpiridina (bicamada), área de 0,152 cm², em solução acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹ /perclorato de lítio 0,2 mol L⁻¹, pH 7,70, para as concentrações: (—) 50 ppm e (---) 100 ppm; 50 mV s⁻¹, técnica VC.

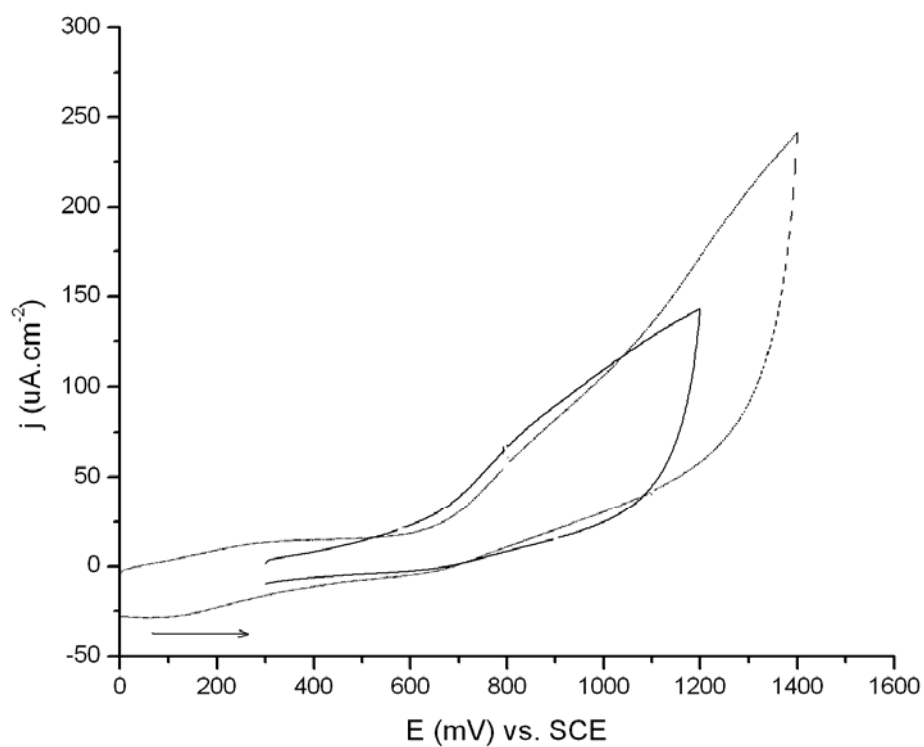


Figura 30. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodos de carbono vítreo GC PINE e eletrodo de carbono vítreo Vt PAR modificados com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina (bicamada), áreas de $0,950 \text{ cm}^2$ e $0,152 \text{ cm}^2$, respectivamente; em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para a concentração de (—) 50 ppm/GC e (---) 05 ppm/Vt; 50 mV s^{-1} , técnica VC.

4.9 Determinação de NO_2 em eletrodos modificados com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina (bicamada) incorporado com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+}$

O par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em um polímero de troca iônica poderia melhorar o transporte de carga dentro da matrix polimérica, entretanto, esse efeito não pode ser observado nas condições de realização deste estudo. Na Figura 31 estão os voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de nitrito em eletrodo GC/PINE bicamada incorporado de ferrocianeto, usando VC, e na Figura 32 os resultados para o eletrodo Vt/PAR

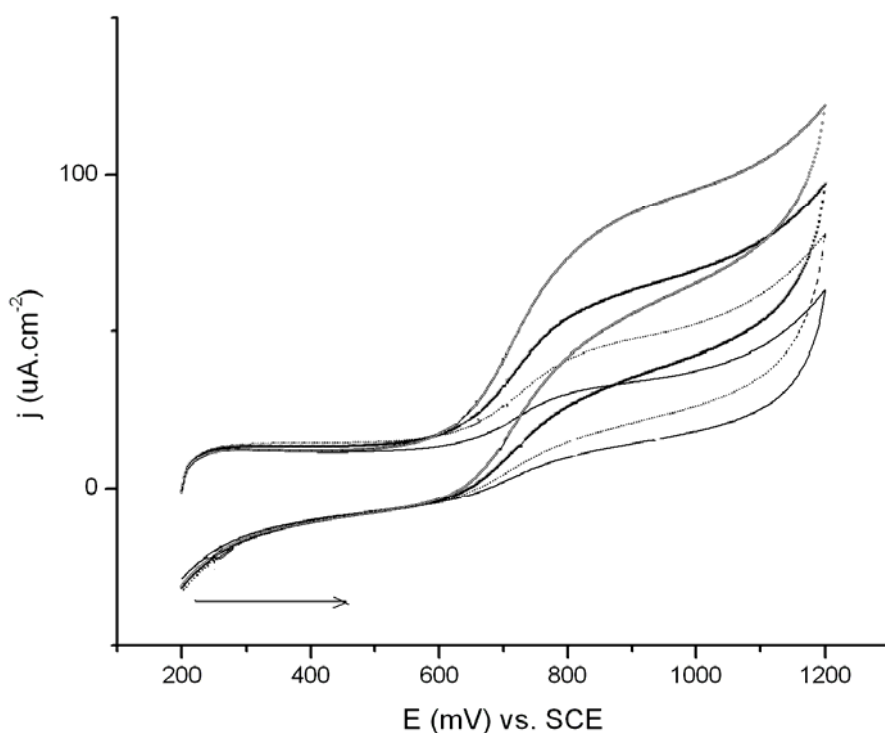


Figura 31. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodos de carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina + ferrocianeto (bicamada incorporado de ferrocianeto), área de $0,950 \text{ cm}^2$, respectivamente; em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para a concentração: (—) 30 ppm, (- - -) 60 ppm, (***) 100 ppm e (°°°) 150 ppm; ($189,9 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$), 50 mV s^{-1} , técnica VC.

bicamada incorporado de ferrocianeto. Embora seja possível observar os picos anódicos do nitrito em valores de potencial entre 895,0 mV e 935,0 mV, os valores de corrente J_{pa} são inferiores aqueles obtidos para o eletrodo modificado monocamada (Tabela 6).

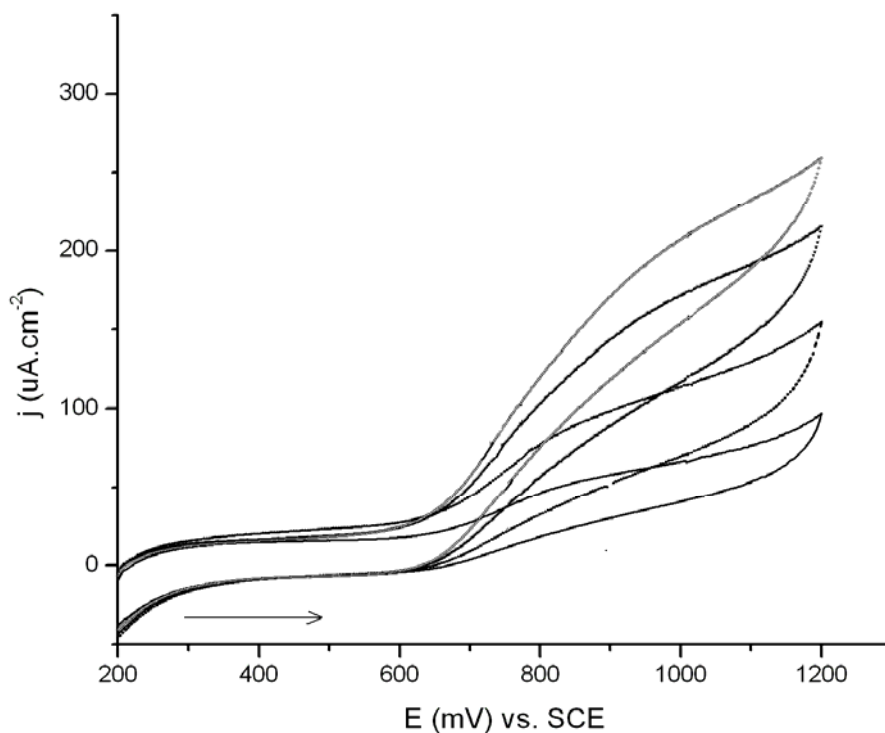


Figura 32. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodos de carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} + 4-vinilpiridina + ferrocianeto (bicamada incorporado de ferrocianeto), área de $0,950 \text{ cm}^2$, respectivamente; em solução acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,70, para a concentração: (—) 30 ppm, (---) 60 ppm, (***) 100 ppm e (°°°) 150 ppm; 50 mV s^{-1} , técnica VC.

Tabela 6. Valores médios \pm desvio padrão para E (mV) e J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) em eletrodos de carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} + 4-vinilpiridina + ferrocianeto (bicamada incorporado de ferrocianeto) por VC

<i>Eletrodo</i>	<i>Conc. NO₂</i> <i>(ppm)</i>	<i>Conc. NO₂</i> <i>(mmol L⁻¹)</i>	<i>E (mV)</i>	<i>J (μA.cm⁻²)</i>
GC	30,0	0,652	895,00 \pm 5,25	33,54 \pm 5,16
Vt	30,0	0,652	925,00 \pm 9,11	61,10 \pm 8,43
GC	60,0	1,304	895,00 \pm 8,16	46,60 \pm 8,56
Vt	60,0	1,304	935,00 \pm 10,24	104,49 \pm 9,11
GC	100,0	2,174	895,00 \pm 7,54	62,53 \pm 8,32
Vt	100,0	2,174	935,00 \pm 11,98	155,21 \pm 12,55
GC	150,0	3,260	895,00 \pm 10,25	86,37 \pm 10,78
Pt	150,0	3,260	935,00 \pm 9,33	185,63 \pm 15,43

4.10 Influência do pH na determinação de NO₂ em eletrodos modificados com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} (monocamada)

Embora Bandeira (2001) houvesse reportado seus resultados para detecção de íons nitrito em eletrodo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄} em solução de ácido sulfúrico 0,05 mol L⁻¹ contendo sulfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 1,0, a necessidade de melhorar a sensibilidade da detecção conduziu a uma avaliação sobre a influência do pH sobre os valores de corrente anódica. Para tanto, foram realizadas determinações de uma mesma quantidade de nitrito em diferentes tampões. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras: 33 (pH 2,0), 34 (pHs 3,0 e 4,0), 35 (pHs 5,0 e 6,0), 36 (pHs 7,0 e 8,0) e 37 (pH 9,0). Finalmente, na Figura 37 o voltamograma da solução tampão fosfato pH 7,0, sem adição de nitrito.

Para uma melhor análise, discussão, e possivelmente, uma conclusão, dos resultados, é necessário um parêntese para inserirmos uma revisão breve dentro dessa discussão. Para o processo de redução (pico corrente catódico), tem-se DOHERTY e VOS (1992) que efetuou a detecção de íons nitrito em de ácido sulfúrico 0,05 mol L⁻¹ contendo 0,1 mol L⁻¹ de sulfato de sódio, idêntico ao estudo de BANDEIRA (2001); SUN et al. (1999) usando eletrodo modificado e eletrólito suporte a pH 4,0; e finalmente, DAVIS e COMPTON (2000) usaram uma solução de pH 3,0 (30 mmol L⁻¹ de floroglucinol, 0,2 mol L⁻¹ de cloreto de potássio e HCl para ajuste do pH).

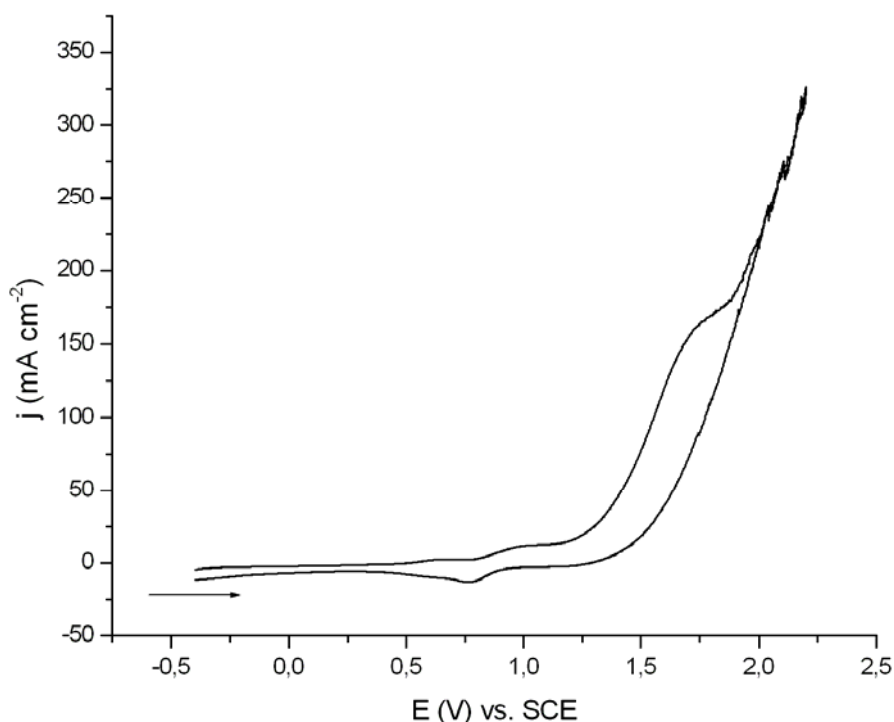


Figura 33. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,342 \text{ cm}^2$, em solução tampão KCl/HCl, pH 2,0, para concentração de $2,3 \times 10^3 \text{ ppm}$, $\tau_{\text{app}} = 6,62 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.

Para o processo de oxidação (pico de corrente anódica), tem-se os estudos iniciais de COX e KULUSZA (1984), que usaram um eletrodo de platina modificado e solução aquosa de nitrato de sódio, pH 4,6; seguido por CARO, BEDIUI e ZAGAL (2002), eletrodo modificado em tampão fosfato, pH 7,3; ROCHA et al. (2002) que detectaram amperometricamente nitritos e nitratos em eletrodo modificado em eletrólito suporte contendo acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ juntamente com perclorato de lítio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,00; WINNISCHOFER et al. (2003) em filme polimérico de porfirina tetrarutenada usaram tampão acetato pH 4,5.

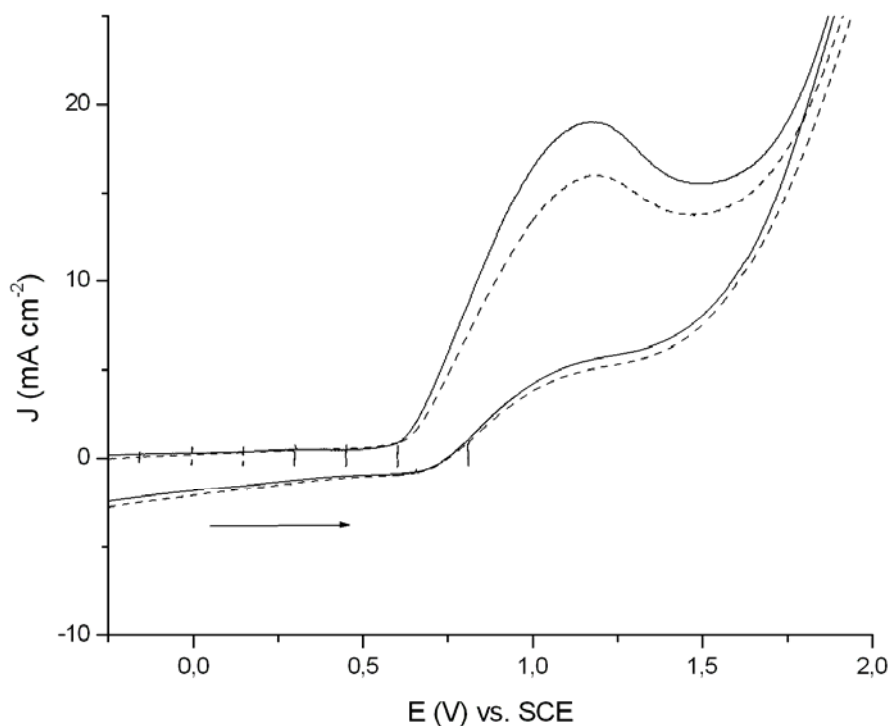
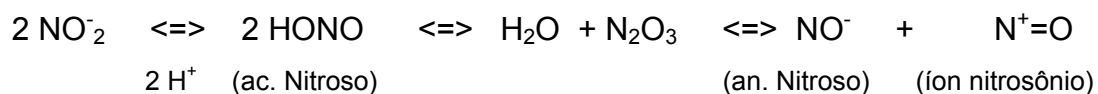


Figura 34. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,342 \text{ cm}^2$, em solução tampão citrato/fosfato, (—) pH 3,0 e (----) pH 4,0, para concentração de $2,3 \times 10^3 \text{ ppm}$, $\tau_{\text{app}} = 6,62 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.

Portanto, as detecções que envolvem o processo anódico são realizadas em valores de pH sempre maiores do que 4,5, enquanto que para o processo catódico, os valores de pH relatados variam entre 1,0 e 4,0. Provavelmente a explicação para isso, seja a instabilidade dos íons nitrito que em solução ácida tendem a formar ácido nitroso. Esse último, para se estabilizar em meio aquoso, converte-se finalmente em íon nitrosônio, conforme a reação:



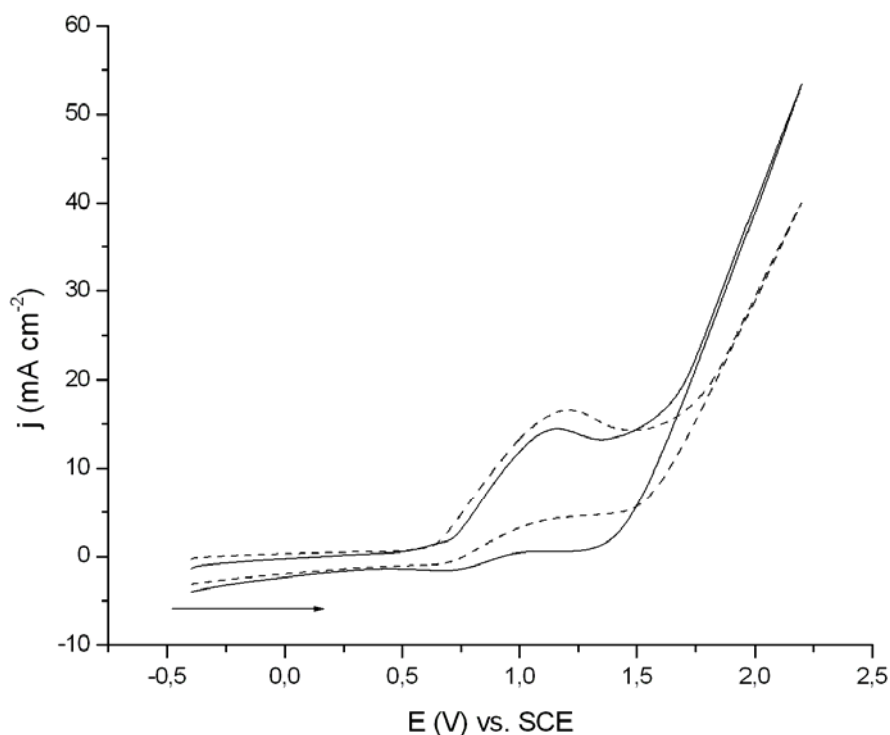


Figura 35. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) PAR modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, área de 0,342 cm², em solução tampão citrato/fosfato, (----) pH 5,0 e (—) pH 6,0, para concentração de $2,3 \times 10^3$ ppm, $\tau_{\text{app}} = 6,62 \times 10^{-9}$ mol cm⁻².

O óxido nítrico é um dos produtos da redução do nitrito, e seu potencial de oxidação é praticamente o mesmo do íon nitrito. Este fato faz com que o nitrito seja considerado interferente nas determinações oxidativas do óxido nítrico (MASKUS et al., 1996). Em meio ácido, o nitrito pode ser convertido até óxido, e, em uma posterior detecção eletroquímica seria difícil separar os picos anódicos característicos de cada molécula, NO_2^- e NO .

Surpreendentemente, os resultados obtidos neste estudo, sugerem um aumento da corrente anódica com o aumento do pH. Quando os valores de pH são baixos meios ácidos, entre 2,0 – 4,0, os valores de corrente J_{pa} , para uma mesma concentração de nitrito, são os menores obtidos (Tabela 7). Os valores obtidos para corrente nos potenciais anódicos máximos sugerem as diferenças decorrentes do pH do sistema, entretanto, são as correntes

anódicas correspondentes ao valor de potencial de 826,0 mV que confirmam essas diferenças. O valor de 826,0 mV foi estabelecido para padronizar as comparações, visto que a mudança de eletrólito e pH promovem pequenos deslocamentos no valor de E_{pa} máximo. O maior valor de J_{pa} foi obtido no pH 9,0 (básico). Entretanto, a curva não apresentou a melhor definição (forma), o que sugere serem os valores de pH 7,00 e 8,00 os mais adequados qualitativa e quantitativamente (Figura 36). Além disso, em pH 9,00 ocorreu o maior deslocamento anódico do potencial de oxidação (1,53 V) quanto mais positivo o potencial de oxidação, maior o número de possíveis interferentes. Este fato, contraria os ganhos catalíticos proporcionados pelo filme polimérico sobre a superfície do eletrodo, no que refere-se exatamente ao deslocamento catódico do potencial de oxidação.

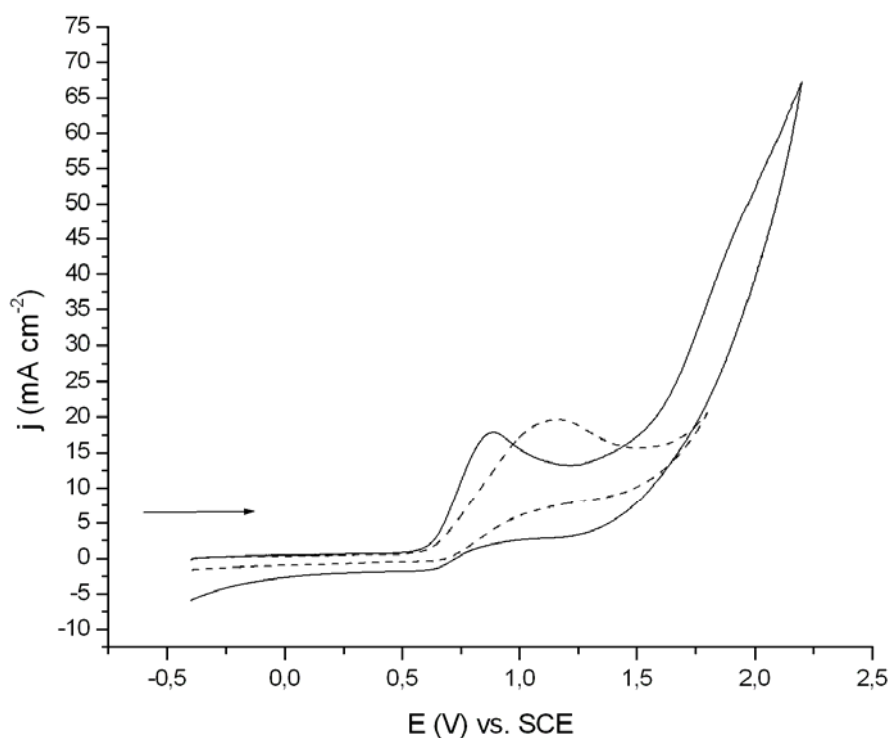


Figura 36. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}, área de $0,342 \text{ cm}^2$, em solução tampão citrato/fosfato, (----) pH 7,0 e (—) pH 8,0, para concentração de $2,3 \times 10^3 \text{ ppm}$, $\tau_{app} = 6,62 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.

Entre os estudos analisados sobre determinação eletroquímica de nitrito, apenas dois apresentam detecção oxidativa de nitritos em eletrodo modificado em pH inferior a 4,5, mais especificamente em solução tampão $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ pH 2,0 (BANDEIRA, 2001; CUNHA et al., 2005).

Portanto, as detecções de nitrito em eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} não devem ser realizadas em sistemas com valores extremos de pH, sendo os levemente básicos, os melhores.

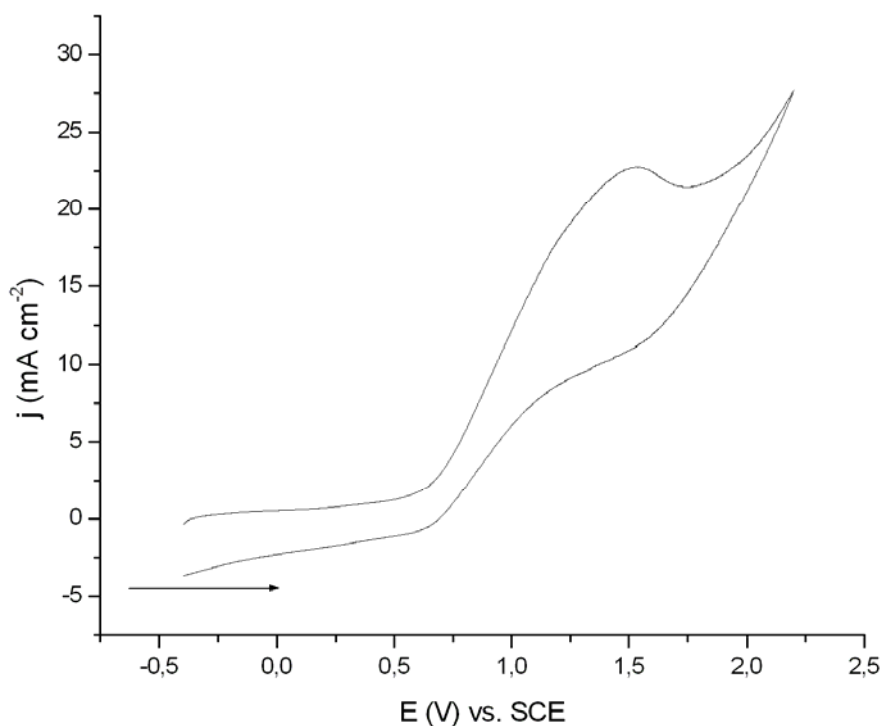


Figura 37. Voltamogramas da oxidação dos íons NO_2 em eletrodo carbono vítreo (Vt/PAR) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, área de $0,342 \text{ cm}^2$, em solução tampão citrato/fosfato, (—) pH 9,0, para concentração de $2,3 \times 10^3 \text{ ppm}$, $\tau_{\text{app}} = 6,62 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.

Tabela 7. Valores médios \pm desvio padrão para E (mV) e J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) para determinação oxidativa de nitrito em eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} por VC em diferentes valores de pH.

ET	Conc. NO ₂ (x10 ³ ppm)	Conc. NO ₂ (mmol L ⁻¹)	pH	Tampão	J _{pa} (mA cm ²) em Epa 826	J (mA.cm ⁻²) em Epa máx.
GC	2,3	50	2,00	KCl/HCl	-	-
GC	2,3	50	3,00	Citrato/fosfato	3,62 \pm 0,15 ^a	14,45 \pm 1,12 ^A
GC	2,3	50	4,00	Citrato/fosfato	5,81 \pm 0,12 ^b	16,58 \pm 1,51 ^B
GC	2,3	50	5,00	Citrato/fosfato	7,55 \pm 0,36 ^c	15,29 \pm 2,14 ^{AB}
GC	2,3	50	6,00	Citrato/fosfato	7,61 \pm 0,21 ^c	18,95 \pm 1,77 ^C
GC	2,3	50	7,00	fosfato	9,49 \pm 0,23 ^d	19,61 \pm 1,61 ^C
GC	2,3	50	8,00	fosfato	9,57 \pm 0,10 ^d	18,83 \pm 2,16 ^C
GC	2,3	50	9,00	TRIS/HCl	16,25 \pm 0,18 ^e	22,76 \pm 3,32 ^D
GC	0	0	7,00	fosfato	0,80 \pm 0,14 ^f	1,24 \pm 2,11

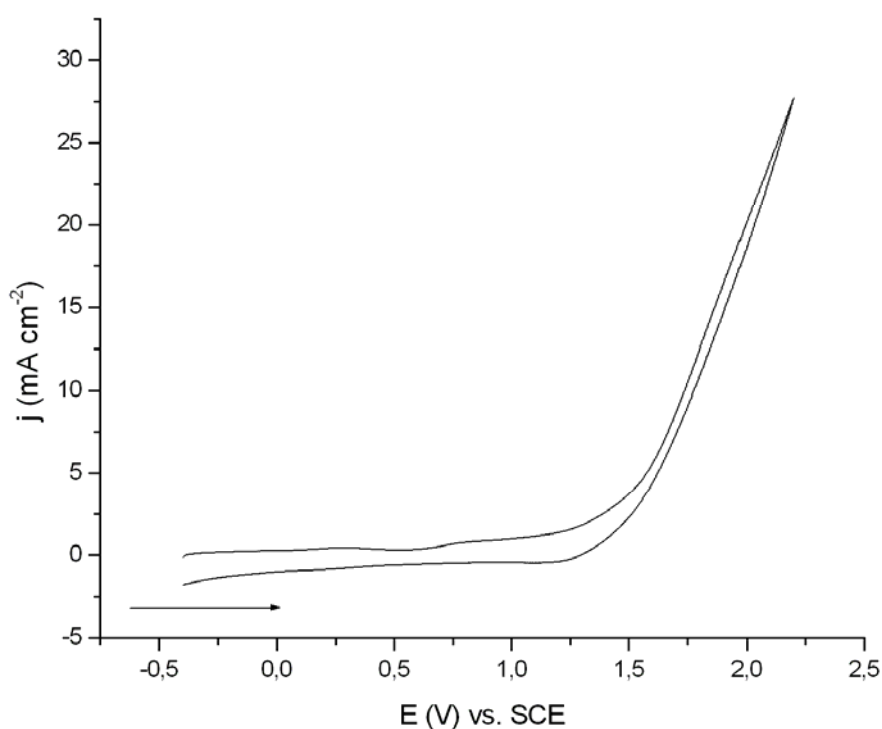


Figura 38. Voltamogramas da solução tampão fosfato, (—) pH 7,70 em eletrodo carbono vítreo (Vt) PAR modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, área de 0,342 cm², em solução tampão fosfato, sem adição de nitrito.

4.11 Influência da técnica voltamétrica na determinação de NO_2 em eletrodos modificados com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]} (monocamada)

Em relação a influência da técnica voltamétrica na determinação de nitrito foram avaliadas duas técnicas: VC e DPV. Na Figura 39 são apresentados os resultados obtidos em eletrodo Vt/PAR modificado usando VC para diferentes concentrações de nitrito.

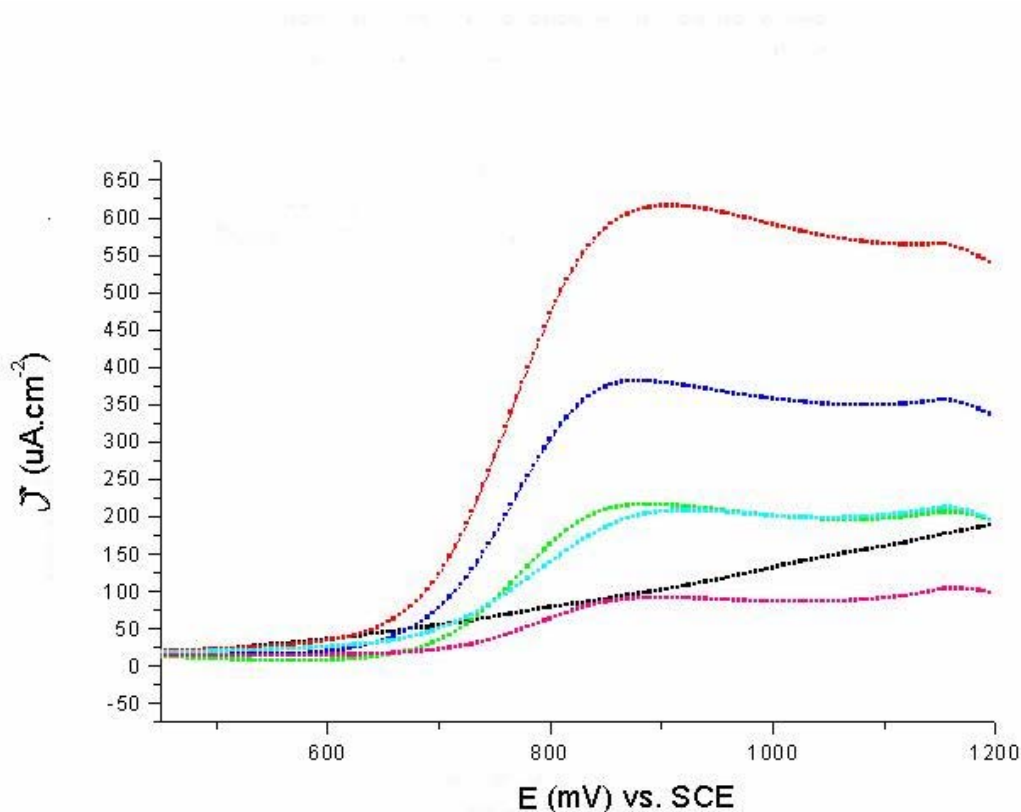


Figura 39. Voltamogramas cíclicos para oxidação do NaNO_2 no eletrodo carbono Vt/PAR modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}. Sol. LiClO_4 1,0 M e CH_3COONa 0,1 M, pH 7,70.

Pode-se observar, que nas concentrações testadas não houveram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os valores médios para 9,2 ppm e 18,4 ppm de nitrito em solução (Tabela 8). Também não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 18,4 ppm e 46,0 ppm de nitrito. Os valores para J_{pa} ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) nas concentrações de 18,4 ppm e 46,0 ppm são bastante próximos ($166,06 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $198,40 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente). Embora isso não ocorra na concentração de 9,2 ppm

($101,86 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), o desvio padrão nas leituras realizadas para 18,4 ppm foi maior. A magnitude dos desvios padrões poderia explicar a menor sensibilidade nas concentrações mais baixas.

Na Figura 40 são apresentados os resultados obtidos aplicando a técnica DPV para as mesmas condições e concentrações de nitrito. Nesta técnica, os maiores valores para desvio padrão permaneceram nos dois extremos da faixa de concentração (92,0 ppm e 9,2 ppm). A técnica DPV mostrou-se mais sensível em relação a técnica VC, visto que apenas não detectou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de 9,2 ppm e 18,4 ppm. Os picos correspondentes à curva apresentam-se mais definidos nesta técnica.

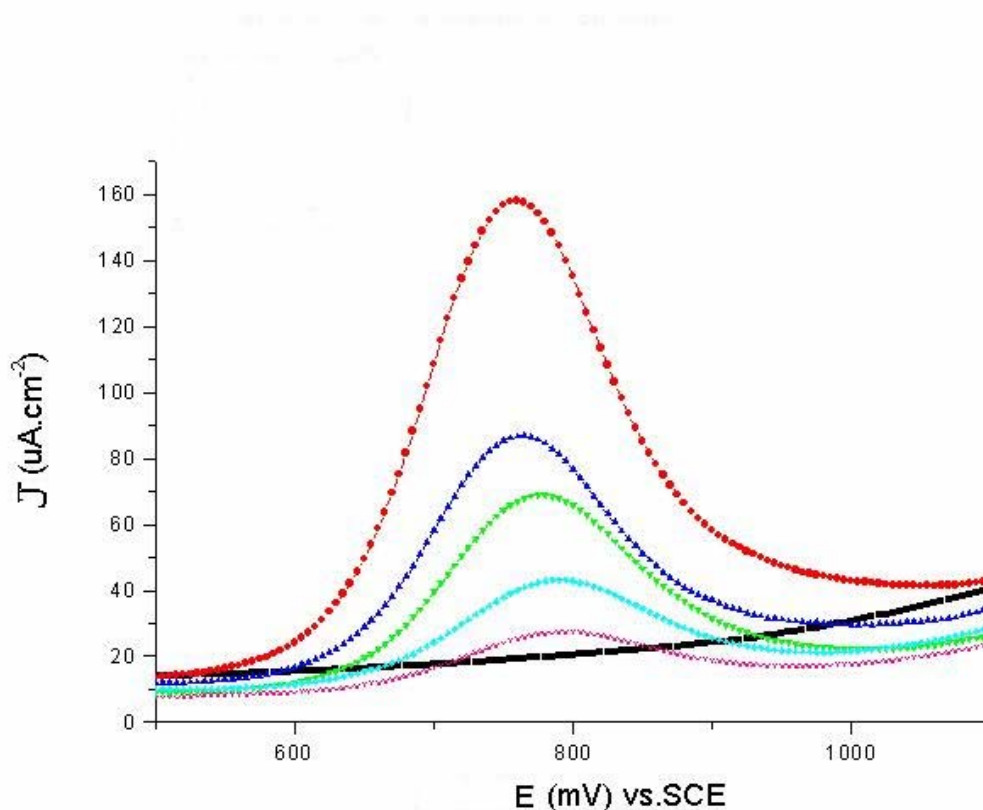


Figura 40. Voltamogramas de pulso diferencial para oxidação do NaNO_2 no eletrodo carbono vítreo modificado com poli-{trans-[$\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4$]}. Sol. LiClO_4 1,0 M e CH_3COONa 0,1 M, pH 7,70, eletrodo de referência calomelano, contra-eletrodo platina.

Tabela 8. Valores médios \pm desvio padrão para E (mV) e J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) para determinação oxidativa de nitrito em eletrodo de carbono vítreo (GC/PINE) modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}. usando as técnicas de VC e DPV

técnica	Conc. NO ₂ (ppm)	Conc. NO ₂ (mmol L ⁻¹)	J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Área (μcm^{-2})
VC	9,2	0,2	101,86 \pm 10,63 ^a	0,39 \pm 0,08 ^a
	18,4	0,4	166,06 \pm 40,42 ^{ab}	0,81 \pm 0,22 ^b
	46,0	1,0	198,4 \pm 17,70 ^b	0,99 \pm 0,04 ^b
	92,0	2,0	343,36 \pm 40,00 ^d	1,75 \pm 0,18 ^c
	184	4,0	613,40 \pm 6,14 ^c	3,06 \pm 0,04 ^d
DPV	9,2	0,2	43,37 \pm 6,87 ^a	153,70 \pm 8,04 ^a
	18,4	0,4	44,04 \pm 2,80 ^a	220,50 \pm 16,86 ^b
	46,0	1,0	65,65 \pm 3,47 ^b	313,70 \pm 15,50 ^c
	92,0	2,0	85,15 \pm 1,88 ^c	408,80 \pm 9,75 ^d
	184,0	4,0	151,73 \pm 5,79 ^d	700,46 \pm 8,942 ^e

^{a,b}Para uma mesma técnica valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente entre si em decorrência da concentração ($p < 0,05$).

A técnica de DPV mostrou-se mais sensível do que a técnica de VC. Entretanto, em ambas as técnicas não foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações menores de 9,2 ppm e 18,4 ppm de nitrito em solução nas condições experimentais estudadas. Com o objetivo de reduzir a influência dos desvios padrões, e dessa forma melhorar a sensibilidade entre as concentrações, foram calculadas as áreas sob as curvas correspondentes aos picos anódicos para a oxidação do nitrito nas diferentes concentrações testadas. A mesma análise ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre médias foi utilizado. Os resultados podem ser observados também na Tabela 8.

Os valores obtidos para as áreas sob o pico anódico apresentaram valores menores para o desvio padrão das medições e conseqüentemente influenciaram na sensibilidade global das técnicas. Para a técnica VC, permaneceu igualdade entre as concentrações de 9,2 ppm e 18,4 ppm. Entretanto, para a técnica DPV observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) para os desvios padrões, o que conseqüentemente aumentou a sensibilidade da técnica. Todavia, é coerente afirmar que na faixa das concentrações de 9,2 ppm e 18,4 ppm a sensibilidade de detecção do sistema, apresentado neste estudo, para íons nitrito é muito reduzida. Nota-se a proximidade dos valores em relação à linha base (ausência de íons nitrito).

4.12 Determinação de NO₂ em eletrodos modificados com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} (monocamada) em amostras de patê frente a reação de Griess(AOAC-1996)

Os maiores interferentes para o nitrito no eletrodo modificado de poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} são anions capazes de oxidar no potencial de trabalho, e isto, inclui brometos e iodetos. Entretanto, estas substâncias não fazem parte da composição dos patês testados. Além disso, o nitrato e o oxigênio são não eletroativos sob as condições de determinação deste estudo, ambas espécies não causam interferência na análise do íon nitrito. Para avaliar a utilidade prática do eletrodo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, as quantidades de nitritos foram determinadas em amostras de patês, e os resultados obtidos foram comparados aqueles usando-se o método espectrofotométrico da AOAC, reação de Griess.

Na Figura 41 tem-se a curva de calibração construída para o método espectrofotométrico, reação de Griess para determinação de nitritos em alimentos. Na Tabela 10 estão os valores usados na construção da curva espectrofotométrica.

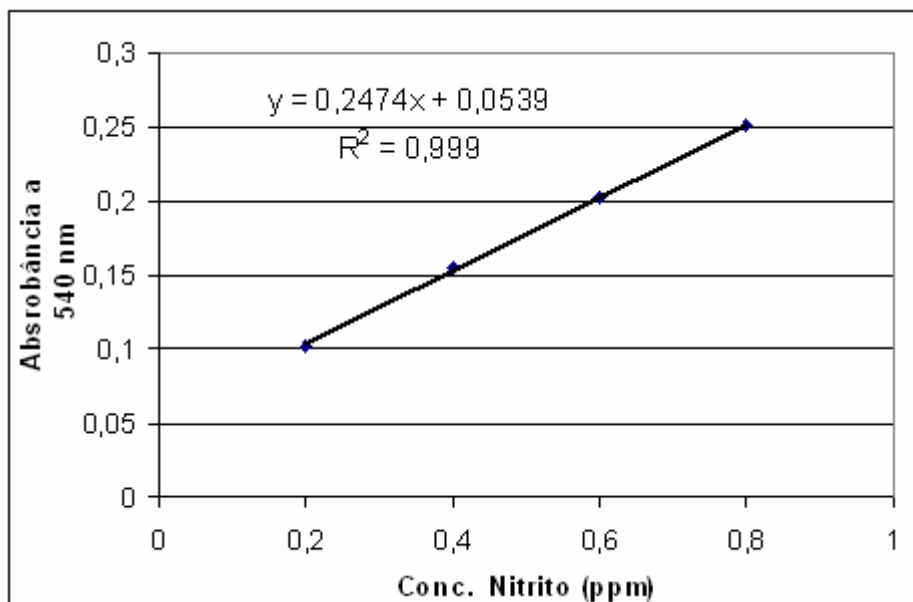


Figura 41. Curva de calibração para determinação de nitritos obtida pelo método AOAC, reação de Griess.

Tabela 9. Valores médios para absorvância a 540 nm e respectivas concentrações de nitrito no método espectrofotométrico, reação de Griess

Conc.analito NO₂ (ppm)	Conc.analito NO₂ (μmol L⁻¹)	Absorbância
0,2	4,34	0,101 ± 0,024
0,4	8,69	0,155 ± 0,017
0,6	13,04	0,201 ± 0,064
0,8	17,39	0,251 ± 0,025

No procedimento experimental para determinação nas amostras de patê utilizou-se o método de Adição Padrão. Uma das vantagens deste método é a redução dos efeitos devidos a composição da matriz de alimentos complexos, como é o caso do patê. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores médios ± desvio padrão para quantidade de nitritos encontradas nas amostras de patê (mg 100g⁻¹) obtidas pelos métodos voltamétrico utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado e espectrofotométrico.

Amostra (patê)*	Conc. NO₂ (mg por 100 g) DPV	Conc. NO₂ (mg por 100 g) Griess
A	9,33 ± 1,21 ^a	9,01 ± 1,33 ^a
B	8,55 ± 0,76 ^b	8,24 ± 1,09 ^b
C	9,16 ± 0,64 ^c	8,98 ± 0,92 ^c

*onde as letras A,B e C correspondem apenas a sabores diferentes entre os patês de mesma marca e diferentes lotes.

^{a,b,c} Para uma mesma amostras, valores seguidos de letras iguais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas decorrentes do método analítico (p<0,05).

Conforme pode ser observado na Tabela 10, houve coerência nos valores obtidos para os dois métodos. De outro lado, a detecção voltamétrica em eletrodo modificado com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, dispensa o uso de reagentes além dos contidos no eletrólito suporte (acetato de sódio e perclorato de lítio), dispensando também a eliminação das proteínas, desproteinização da amostras com ferrocianeto e sulfato.

Conclusões

Os eletrodos de carbono vítreo modificados com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} apresentaram maior sensibilidade na detecção de íons nitrito em solução do que os mesmos eletrodos nus (não revestidos). O potencial de oxidação do íon nitrito foi ligeiramente deslocado catódicamente diminuindo assim as interferências provenientes da degradação do solvente.

A técnica de Voltametria de Pulso Diferencial mostrou ser mais sensível na detecção de baixas concentrações de nitrito. Isso porque a técnica DPV constitui um instrumental considerável na discriminação da corrente faradáica da capacitiva, conseqüentemente a sensibilidade da técnica de pulso diferencial (DPV) ultrapassa significativamente à da Voltametria Cíclica, atingindo-se limites de detecção da ordem de 10⁻⁷ a 10⁻⁸ mol L⁻¹.

Dentre os valores de pH testados para a determinação de nitrito no eletrodo de carbono revestido com poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}, os valores de pH 7,0 e 8,0 apresentaram maiores vantagens qualitativas e quantitativas.

Ambas as tentativas de melhorar a sensibilidade de detecção do eletrodo modificado usando a eletropolimerização da 4-vinilpiridina e a incorporação das espécies redox Fe(CN)₆³⁺ não obtiveram êxito. Ao contrário, ou reduziram a definição do pico anódico ou reduziram o valor da corrente anódica.

A quantificação de nitritos em amostras de patê utilizando a técnica voltamétrica apresentada neste estudo mostrou-se similar aos valores obtidos para as mesmas amostras usando o método espectrofotométrico, reação de Griess.

Todos os resultados obtidos neste estudo sugerem a necessidade de mais estudos investigativos sobre a técnica proposta, incluindo estudos de validação e incertezas de medição.

CAPÍTULO 2

Determinação de antioxidantes sintéticos em eletrodos de carbono e platina

1. INTRODUÇÃO

Compostos antioxidantes desempenham um importante papel em muitos processos biológicos onde estão presentes radicais livres (BASAGA, 1990). Os antioxidantes primários como tert-butilhidroxianisol (BHA), tert-butilhidroxitolueno (BHT) e tert-butilhidroquinona (TBHQ) atuam bloqueando os radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis através de reações redox (ANTOLOVICH et al., 2002). Tais antioxidantes são comumente usados sozinhos ou em conjunto em misturas comerciais como aditivos para óleos ou gorduras com o objetivo de prevenir a rancidez oxidativa. Dentre os alimentos que mais contém esses aditivos está a maionese. A maionese consiste na combinação de suco de limão ou vinagre com ovos e óleo e com um ou mais antioxidantes sintéticos em sua formulação (JACOBSEN et al., 1999).

Métodos colorimétricos e espectrofotométricos foram usados inicialmente para determinação desses aditivos em diferentes amostras de alimentos e hoje é possível encontrar diferentes variações para esses métodos (CAPITÀN-VALLEY; VALENCIA; NICOLÁS, 2004; CRUCES-BLANCO et al., 1999). Posteriormente vieram os métodos cromatográficos (KAROVICOVÁ; SIMKO, 2000; PERRIN; MEYER, 2002; YÁÑEZ-SEDEÑO; PINGARRÓN; PÓLO DIEZ, 1991). Métodos eletroquímicos, por exemplo, técnicas polarográficas e voltamétricas (voltametria de pulso diferencial, voltametria adsortiva, voltametria de varredura linear etc). Tais métodos, em geral possuem alta sensibilidade e são amplamente utilizados na química analítica. Estudos sobre o comportamento eletroquímico desses antioxidantes usando técnicas amperométricas têm sido reportados e testados em eletrodos nus e eletrodos revestidos (GONZÁLEZ et al., 1994; FUENTE et al., 1999; RIBER et al., 2000; NI, WANG & KOKOT, 2000).

Além desses métodos, há aqueles que empregam cromatografia com detectores eletroquímicos (BIANCHI et al., 1997). Em relação aos métodos eletroquímicos, quando uma mistura apresenta dois ou mais substâncias antioxidantes, as ondas voltamétricas desses antioxidantes podem apresentar-se sobrepostas (*overlapped*) e neste caso, é difícil analisá-los individualmente (NI, WANG & KOKOT, 2000). Alguns autores têm aplicado aproximações quimiométricas para contornar esse problema, como regressão

de componente principal (PCR) e regressão parcial por mínimos quadrados (PLSR) (GALEANO DIAZ et al., 1998; NI, WANG & KOKOT, 2000).

Sendo o uso de antioxidantes sintéticos, limitado por legislação competente, é de extrema importância a determinação da quantidade desses aditivos nos alimentos (YÁNEZ-SEDEÑO, PINGARRÓN & POLO DÍEZ, 1991). Sendo assim, neste estudo são apresentados os resultados da análise quantitativa de três antioxidantes sintéticos (BHA, BHT e TBHQ) em diferentes condições para o uso da técnica voltamétrica otimizada na determinação desses antioxidantes sintéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do trabalho é a otimização na determinação eletroquímica dos antioxidantes sintéticos, BHA, BHT e TBHQ, em mistura, em amostras de alimentos. A técnica otimizada deve ser sensível e discriminar as ondas anódicas de cada antioxidante sem a utilização de tratamentos quimiométricos dos dados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilização de eletrodos nus comerciais de carbono vítreo e platina na determinação dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ, em alimentos;
- Comparar a influência do substrato do eletrodo de trabalho na determinação quantitativa dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ, para promover alternativas economicamente mais atrativas;
- Determinação dos parâmetros voltamétricos envolvidos na aplicação dos eletrodos na determinação dos antioxidantes sintéticos em soluções padrões;
- Determinação dos parâmetros voltamétricos envolvidos na aplicação dos eletrodos na determinação dos antioxidantes sintéticos em amostras de alimentos, no caso deste estudo, em maioneses;
- Apresentar um sistema eletroquímico livre de *overlapping* e da aplicação de métodos quimiométricos para tratamento de dados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados, nos Departamentos de Química e de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 Eletrólitos, solventes e analitos

Tert-butilhidroxianisol (BHA) da Merk; tert-butilhidroquinona (TBHQ) e 2,6-di-t-butil-p-hidrocitolueno (BHT) da Sigma. Ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico, acetato de sódio, perclorato de sódio, metanol e os demais reagentes possuíam grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia. Água destilada e deionizada foi utilizada. As soluções padrões (mistura e isolados) foram preparadas em metanol na concentração única de 500 mg L⁻¹. Para ajuste do pH dos eletrólitos suporte, usou-se soluções a 2 mol L⁻¹ de NaOH.

Foram utilizados inicialmente três eletrólitos suporte: tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ (A) pH 2,80, solução HCl 0,1 mol L⁻¹ (B) pH 2,30 e solução acetato de sódio 0,1M e perclorato de sódio 0,2M (pH 7,00), todos contendo 20 mL L⁻¹ de metanol. O objetivo era avaliar o melhor eletrólito suporte correlacionando sua influência sobre o *overlapping* das ondas voltamétricas.

3.3 Célula eletroquímica

As medições voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional de um compartimento, contendo três eletrodos sendo: eletrodo de trabalho, Et; contra-eletrodo, Ec, eletrodo de referência, Er e entrada e saída para gás. Foram utilizados, eletrodo de platina (Pt), com área superficial de 0,520 cm² da PINE, e eletrodo de carbono vítreo com área

superficial de 0,950 cm² da Pine como eletrodos de trabalho, para investigar a influência dos diferentes substratos na troca de elétrons. Como contra-eletrodo foi utilizada placa de Pt amarrada a um fio também de Pt, totalizando uma área de 3,00 cm². O eletrodo de referência utilizado foi o de calomelano saturado Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).

3.4 Instrumentos

Na detecção oxidativa dos antioxidantes sintéticos utilizou-se um Potenciostato/Galvanostato da E.G & G.PAR 273A, com interface, via cartão de interface GPIB da National Instruments Co.

3.5 Amostras

Amostras de maionese foram adquiridas no mercado local, num total de quatro diferentes marcas aleatoriamente. Para cada marca de maionese foram coletados amostras de três lotes distintos (n=3).

3.6 Técnicas voltamétricas

A atividade eletroquímica dos antioxidantes sintéticos (BHA, BHT e TBHQ), foi avaliada utilizando-se diferentes técnicas voltamétricas: voltametria cíclica (VC) ($u_b = 50 \text{ mVs}^{-1}$), voltametria de pulso diferencial (VPD) ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $u_b = 50 \text{ mV s}^{-1}$) e voltametria de onda quadrada (VOQ) ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $f = 60 \text{ Hz}$). O comportamento eletroquímico dos antioxidantes sintéticos foi investigado individualmente e em mistura sob as mesmas condições experimentais com o objetivo de obter mais informações sobre o *overlapping* das ondas anódicas.

3.7 Curva de antioxidantes sintéticos

Construiu-se curva de calibração em eletrodo de carbono vítreo para a mistura dos três antioxidantes e para cada antioxidante isoladamente. Da mesma forma, usando-se o eletrodo de platina construiu-se as mesmas oito

curvas (dois eletrólitos suporte). Estudou-se um intervalo de concentração de 1 ppm a 200 ppm com $n = 5$.

3.8 Limpeza dos eletrodos

Cada medida realizada era sucedida por uma limpeza da superfície do eletrodo: polimento com alumina, seguido de lavagem com água destilada/deionizada, limpeza sob agitação com metanol durante 30 segundos e aplicação de potencial no intervalo de 1,3 mV até 0 mV a uma velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} usando voltametria linear como técnica voltamétrica.

3.9 Determinação quantitativa dos antioxidantes sintéticos em amostra de alimento

Pesou-se entre 10,0 e 20,0 g em balança analítica (Metler Toledo) ($\pm 0.0001 \text{ g}$) de amostras de maionese comerciais. Acrescentou-se 5 mL de etanol p.a. e transferiu-se quantitativamente para frasco Erlenmeyer de 100 mL. Após, agitação de 5 minutos em agitador magnético (Dist), a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido em frasco âmbar. O mesmo processo de extração foi repetido mais duas vezes e todos os sobrenadantes foram coletados e então diluídos em metanol. Uma alíquota de 10,0 mL de cada extrato de amostra foi analisado por SWV ou VOQ em Potenciostato/Galvanostato como descrito anteriormente utilizando-se o método da Adição Padrão. A técnica voltamétrica SWV/VOQ foi escolhida porque apresentou os melhores resultados nos testes preliminares.

3.10 Determinação de interferentes na quantificação de antioxidantes sintéticos

Ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, EDTA, sorbato de potássio foram avaliados como possíveis interferentes nas proporções: 1:1, 1:2, 1:5,

1:10 e 1:20 (faixa de concentração de 25 a 500 ppm). Estes compostos foram selecionados por pertencerem a formulação típica da maionese comercial.

3.11 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão. Os resultados foram estatisticamente analisados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Duncan. O nível de significância foi de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência das técnicas voltamétricas na determinação de antioxidantes sintéticos

Nas determinações voltamétricas dos antioxidantes, verificou-se uma relação proporcional entre os picos de corrente e as concentrações das espécies eletroativas. O sistema aqui estudado caracteriza-se pela troca de apenas um elétron (CHENG et al., 2002). Embora seja de conhecimento comum que técnicas voltamétricas de pulso diferencial sejam mais sensíveis do que técnicas de voltametria clássica, neste trabalho foram realizadas determinações com diferentes técnicas voltamétricas, apresentadas nas Figura 2 e 3.

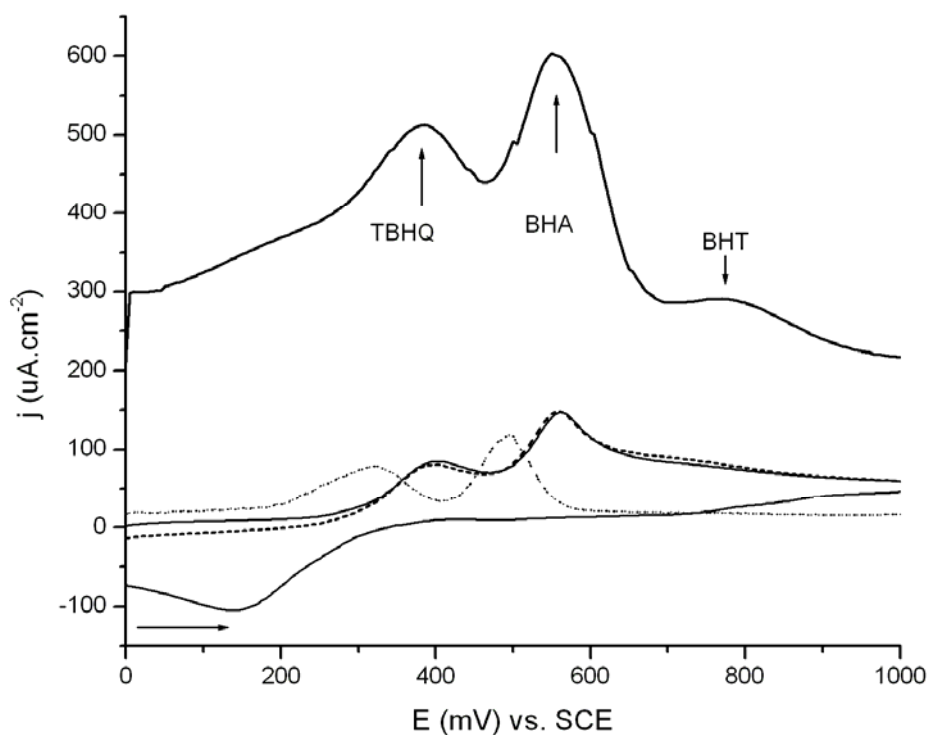


Figura 2. Voltamogramas obtidos por (—) SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz); (---) CV ($u_b = 50$ mVs $^{-1}$); (····) DPV ($\Delta E = 25$ mV; $u_b = 50$ mV s $^{-1}$) e (— · —) SLV ($u_b = 50$ mVs $^{-1}$) em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson 0,1 mol L $^{-1}$ contendo metanol 20 mL L $^{-1}$ para 50 mg L $^{-1}$ BHA, BHT e TBHQ, pH 2,0, $n = 5$ em eletrodo de GC.

A técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) apresentou-se mais rápida do que a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) e mais sensível. No voltamograma obtido por SWV em GC é possível a distinção dos três picos característicos para TBHQ, BHA e BHT, $E_p = 385$ mV, 555 mV e 736 mV, respectivamente. A técnica DPV em eletrodo de trabalho de GC (Fig. 1) foi melhor do que a mesma técnica em eletrodo de Pt (Fig. 2). Isso porque no eletrodo de Pt o pico correspondente ao TBHQ, $E_p = 358$ mV apresenta a forma de um “ombro” do pico correspondente ao BHA em $E_p = 500$ mV).

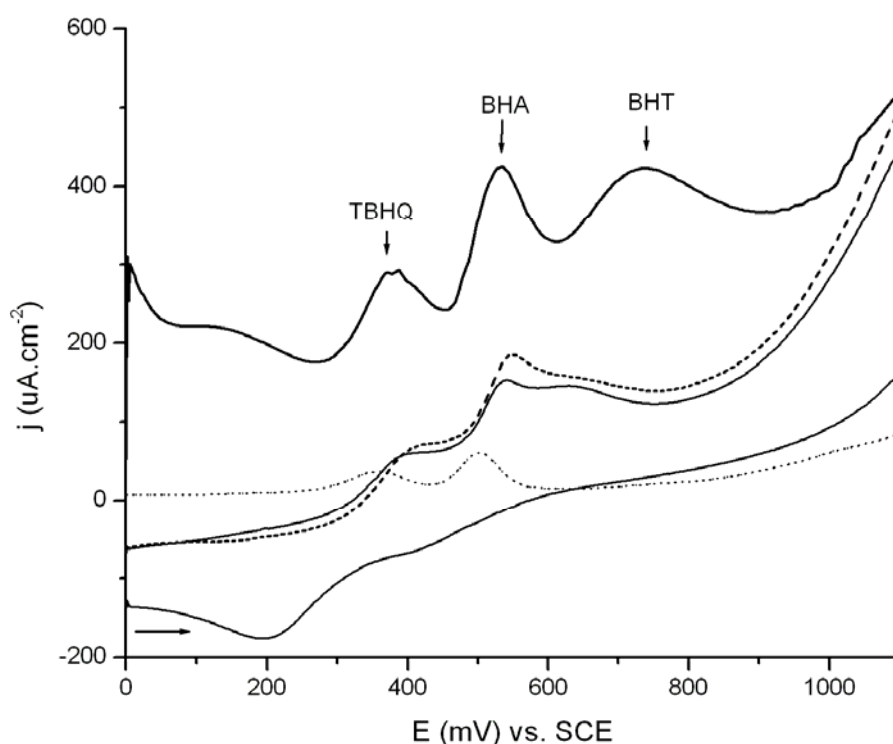


Figura 3. Voltamogramas obtidos por (—) SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz); (---) CV ($u_b = 50$ mVs $^{-1}$); (····) DPV ($\Delta E = 25$ mV; $u_b = 50$ mV s $^{-1}$) e (-·-·-) SLV ($u_b = 50$ mVs $^{-1}$) em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson 0,1 mol L $^{-1}$ contendo metanol 20 mL L $^{-1}$ para 50 mg L $^{-1}$ BHA, BHT e TBHQ, pH 2,0, $n = 5$ em eletrodo de Pt.

Existe uma menor resolução dos picos de corrente. As técnicas de LSV e VC apresentam resultados semelhantes, porque seus parâmetros são iguais, $E_p = 394$ mV para o TBHQ e $E_p = 562$ mV para o BHA. Entretanto a técnica de VC fornece-nos a informação atribuída ao pico catódico de

redução dos antioxidantes oxidados, em $E_p = 147$ mV, e que encontravam-se sobre a superfície do eletrodo durante a varredura em sentido contrário. Tal informação descreve a reversibilidade do processo de oxido-redução.

As Figuras 2 e 3 também mostram que as técnicas de voltametria cíclica VC e voltametria linear LSV foram menos adequadas, pois apresentaram apenas dois picos de corrente anódica referentes ao TBHQ e ao BHA. Esse comportamento também foi observado para o eletrodo de Pt, com valores de $E_p = 405$ mV e $E_p = 550$ mV para TBHQ e BHA, respectivamente, para as técnicas de VC e LSV.

A técnica de VC é muita vantajosa para investigações sobre comportamento eletroquímico de analitos, todavia, é pouco útil para análises quantitativas (GONZÁLEZ et al., 1994), objetivo principal deste estudo. A técnica de SWV foi a única a apresentar três picos de corrente anódica em ondas bem definidas para ambos eletrodos de trabalho, Pt : $E_p = 385$ mV, $E_p = 555$ mV e $E_p = 790$ mV para o TBHQ, BHA e BHT, respectivamente; e GC: $E_p = 382$ mV, $E_p = 540$ mV e $E_p = 736$ mV para TBHQ, BHA e BHT, respectivamente.

4.2 Influência do eletrodo de trabalho

As determinações foram realizadas tanto para misturas contendo os três antioxidantes quanto para cada antioxidante isoladamente. Na Figura 4 são apresentados dois voltamogramas para a mistura de antioxidantes no eletrólito suporte A em pH 2,0, usando voltametria de onda quadrada ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz), uma para o eletrodo de Pt e a outra para o eletrodo de GC. O eletrodo de trabalho de GC apresentou-se mais vantajoso para determinação de BHA e TBHQ em relação ao BHT. Isso porque os valores médios de pico de corrente anódica em eletrodo de GC para o BHA e TBHQ foram estatisticamente superiores mesmos valores de pico obtidos em Pt.

Entretanto, esse comportamento não foi observado em relação ao pico de corrente anódica do BHT. O pico de corrente anódica do BHT foi superior no eletrodo de Pt. Esse comportamento pode dever-se ao fato de a superfície do eletrodo de Pt ser menos adsortiva e, portanto, menos susceptível a

contaminação por espécies eletroativas. De modo geral, ambos os eletrodos de trabalho, Pt e GC, mostraram-se adequados para determinação simultânea dos três antioxidantes sintéticos na faixa de concentração de interesse para análises de alimentos. Os valores de potencial anódico dependem do eletrodo de referência utilizado, pH, eletrólito etc.

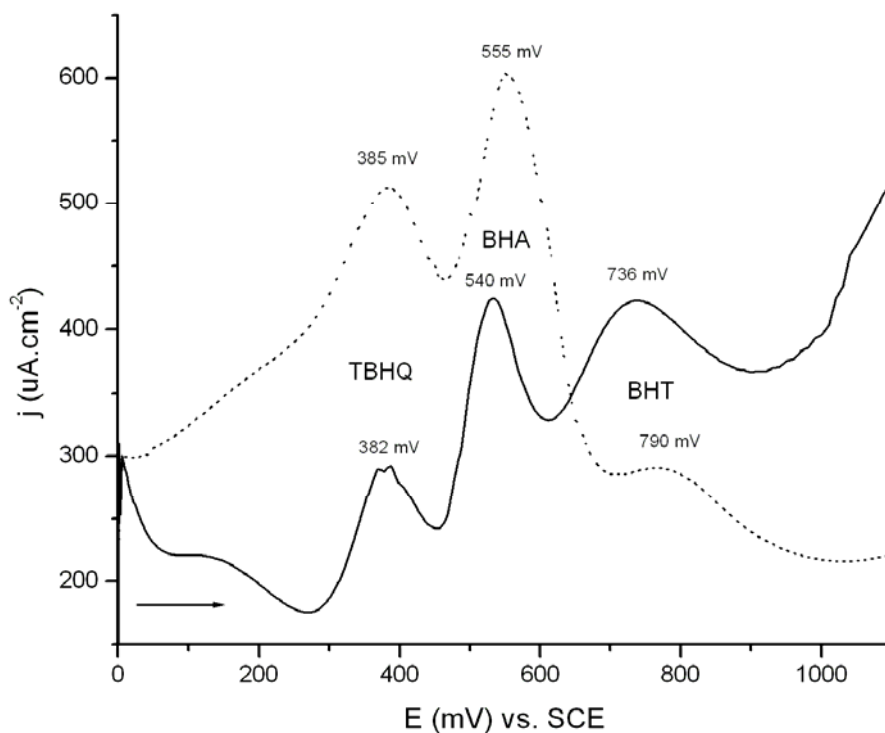


Figura 4. Voltamogramas obtidos por SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz), em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo metanol 20 mL L^{-1} para 50 mg L^{-1} BHA, BHT e TBHQ, pH 2,0, $n = 5$ em eletrodo de GC ($\cdots \cdots$) e eletrodo de Pt (—).

Apesar disso, os valores encontrados neste trabalho para os potenciais de oxidação das espécies estudadas, podem ser bem relacionados, apesar das grandes diferenças, ao estudo de FUENTE et al. (1994) que encontrou valores de $E_p = 634$ mV para o BHA e $E_p = 485$ mV para o TBHQ, em pH 1,10, voltametria cíclica e eletrodo de trabalho de Pt modificado tendo como eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{sat})}$. YÁNEZ-SEDEÑO, PINGARRÓN e POLO DÍEZ (1991) usando eletrólito suporte ácido perclórico $0,1 \text{ M}$ em voltamogramas hidrodinâmicos (DPV), eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ M}$

KCl, obtiveram os maiores valores de corrente anódica em $E_{pa} = 800$ mV para o BHA e $E_{pa} = 1050$ mV para BHT. BRIESKRN e MAHLMEISTER (1980), usaram DPV em eletrodo de carbono vítreo rotatório tendo como eletrólito suporte ácido sulfúrico 0,1 M em etanol e obtiveram valores de $E_{pa} = 780$ mV para BHA e $E_{pa} = 1040$ mV para BHT.

4.3 Influência do pH e do eletrólito suporte

A influência do pH (2,0; 4,0; 6,0 e 8,0) sobre o sinal de oxidação da mistura de antioxidantes sintéticos foi avaliada pela técnica de SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz) usando inicialmente três eletrólitos suporte A e B. Os valores médios de I_{pa} ($\mu A\ cm^{-2}$) decresceram linearmente com o aumento do valor de pH para todos os antioxidantes sintéticos em ambos eletrodos de trabalho (Pt e GC) e para ambos eletrólitos suporte (A e B). Esse comportamento é condizente com relatos na literatura, por exemplo, FUENTE et al. (1994) estudando a determinação de BHA e TBHQ em eletrodo de Pt modificado e VC, obtiveram um crescimento dos valores de corrente até o valor de pH de 4,5, para valores maiores de pH, a intensidade do pico descreceu consideravelmente.

O sistema contendo valor de pH 2,0 foi o único a apresentar pico de oxidação para os três antioxidantes sintéticos simultaneamente. A oxidação da substância TBHQ não pode ser detectada para valores de pH 6,0 e 8,0 (no caso do eletrólito suporte A) e para o valor de pH 8,0 (no caso do eletrólito suporte B). A oxidação da substância BHT não pode ser detectada para os valores de pHs 6,0 e 8,0 (no caso do eletrólito suporte B). Em relação ao desempenho e influência do eletrólito suporte, todos foram satisfatórios e similares. A oxidação do BHA em eletrodo de GC mostrou os seguintes comportamentos: $y = 317,26 - 22,83x$, $r^2 = 0,99$ para o eletrólito A; $y = 389,02 - 37,36x$, $r^2 = 0,93$ para o eletrólito B. A oxidação do mesmo BHA em eletrodo de Pt apresentou: $y = 640,8 - 34,797x$, $r^2 = 0,99$ para o eletrólito A; $y = 247,76 - 12,248x$, $r^2 = 0,77$ para o eletrólito B. Para os outros dois antioxidantes TBHQ e BHT os comportamentos foram similares (dados não apresentados). A Tabela 2 apresenta os valores médios para potencial de pico

anódico E_p (mV) e para a densidade de corrente j_p ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) para os eletrodos de GC e de Pt em pH 2,0 para misturas dos antioxidantes na concentração de 25 mg L^{-1} .

Tabela 2. Valores médios de E_p (mV) and J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) para mistura de antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ em diferentes eletrólitos suporte, A e B, e diferentes eletrodos de trabalho, Pt e GC, $n = 5$ em pH 2,0, usando a técnica de voltametria de onda quadrada ($\Delta E = 25\text{ mV}$; $f = 60\text{ Hz}$).

<i>Antioxidante</i>	<i>Eletrodo de trabalho</i>	<i>Eletrólito suporte</i>	E_p (mV)	j_p ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)
TBHQ	GC	A	$440,00 \pm 10,23$	$122,28 \pm 4,34^a$
	GC	B	$350,00 \pm 12,56$	$189,02 \pm 4,39^c$
	Pt	A	$430,00 \pm 8,34$	$211,00 \pm 14,56^b$
	Pt	B	$415,00 \pm 10,98$	$80,80 \pm 2,72^d$
BHA	GC	A	$575,00 \pm 9,03$	$274,06 \pm 5,25^A$
	GC	B	$530,00 \pm 12,13$	$292,34 \pm 6,96^C$
	Pt	A	$575,00 \pm 10,44$	$433,06 \pm 40,06^B$
	Pt	B	$540,00 \pm 14,43$	$155,28 \pm 9,79^D$
BHT	GC	A	$835,00 \pm 7,45$	$72,77 \pm 3,12^f$
	GC	B	$825,0 \pm 11,67$	$141,82 \pm 3,21^g$
	Pt	A	$840,0 \pm 7,78$	$149,42 \pm 7,29^h$
	Pt	B	$650,0 \pm 5,21$	$121,86 \pm 10,96^i$

* E_p e j_p representam o pico de potencial anódico (mV) e pico de densidade de corrente anódico (μA), respectivamente

A – Britton-Robson $0,1\text{ mol L}^{-1}$ tampão

B – Solution ácido clorídrico $0,1\text{ mol L}^{-1}$

Houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os eletrólitos suporte para um mesmo eletrodo, para o TBHQ, o BHA e o BHT. Da mesma forma, também houve diferenças estatisticamente significativas entre os eletrodos de trabalho (em um mesmo eletrólito), tanto para o carbono como para platina, em ambos eletrólitos, A e B. Portanto, o sistema formado, pelo eletrodo de trabalho de Pt em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,1\text{ M}$ (pH 2,0) foi significativamente mais sensível para determinação quantitativa simultânea de TBHQ, BHA e BHT em mistura.

4.4 Influência da concentração do antioxidante

As correlações entre os valores de J_{pa} pico de corrente anódica e a concentração dos antioxidantes em um sistema com pH 2,0, foram avaliadas usando a técnica voltamétrica de SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz) para a mistura de antioxidantes e também para cada antioxidante isoladamente. Para tanto, diferentes sistemas foram preparados para os dois eletrólitos suporte, A e B e para ambos eletrodos de trabalho, GC e Pt. As faixas lineares de concentração para determinação dos antioxidantes, os valores para os coeficientes angulares e os valores para os coeficientes lineares são apresentadas na Tabela 3 para o eletrodo de trabalho de GC e apresentados na Tabela 4 para o eletrodo de trabalho de Pt.

Tabela 3. Correlações lineares e limites de detecção obtidos para mistura dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em eletrodo de GC usando a técnica amperométrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz), eletrólitos suporte A e B, pH 2,0

		Faixa (mg L ⁻¹)	R ²	Coef. Angular ($\mu\text{A L mg}^{-1}$)	Coef. Linear (μA)	E_{pa} (mV)
Eletrólito suporte A						
BHA	S	2,0 – 80,0	0,97	7,81 ± 2,11	259,08 ± 14,51	440,00 ± 8,11
TBHQ	S	4,0 – 80,0	0,91	3,32 ± 1,28	152,97 ± 12,59	570,00 ± 9,04
BHT	S	4,0 – 30,0	0,99	4,37 ± 0,94	73,53 ± 5,80	830,00 ± 7,65
BHA	M	2,0 -100,0	0,92	4,90 ± 0,71	178,68 ± 11,16	570,00 ± 4,61
TBHQ	M	4,0 – 100,0	0,95	2,65 ± 0,52	166,31 ± 9,43	440,00 ± 4,72
BHT	M	2,0 – 40,0	0,95	1,61 ± 0,27	107,05 ± 9,21	830,00 ± 9,52
Eletrólito suporte B						
BHA	S	2,0 – 100,0	0,98	6,23 ± 1,59	154,67 ± 10,43	535,00 ± 8,21
TBHQ	S	1,0 – 80,0	0,78	3,49 ± 6,34	110,78 ± 10,32	350,00 ± 5,25
BHT	S	8,0 – 20,0	0,97	7,21 ± 1,07	49,20 ± 5,24	825,00 ± 7,32
BHA	M	2,0 – 100,0	0,98	5,08 ± 0,79	167,83 ± 11,04	520,00 ± 3,32
TBHQ	M	4,0 – 100,0	0,96	3,60 ± 0,83	77,22 ± 9,23	330,00 ± 5,67
BHT	M	2,0 – 20,0	0,72	2,86 ± 0,66	111,77 ± 17,19	820,00 ± 5,83

S – antioxidante isolado; M – mistura contendo BHA, BHT e TBHQ (1:1:1 p/v).

Os resultados demonstram uma boa correlação positiva entre as faixas de concentração para a mistura e as faixas de concentração para cada

antioxidante isoladamente. As faixas de concentração linear encontradas são adequadas para aplicação da técnica na determinação quantitativa de TBHQ, BHA e BHT em amostras de alimentos através do método de adição padrão.

Tabela 4. Correlações lineares e limites de detecção obtidos para mistura dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em eletrodo de Pt usando a técnica amperométrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz), eletrólitos suporte A e B, pH 2,0

		Faixa (mg L ⁻¹)	R ²	Coef. angular ($\mu\text{A L mg}^{-1}$)	Coef. linear (μA)	<i>Epa</i> (mV)
Eletrólito suporte A						
BHA	S	1,0 – 80,0	0,99	6,78 ± 1,02	120,54 ± 11,80	580,00 ± 5,17
TBHQ	S	8,0 – 40,0	0,88	8,02 ± 2,11	0	410,00 ± 3,28
BHT	S	10,0 – 30,0	0,92	5,65 ± 0,98	354,59 ± 15,86	750,00 ± 6,11
BHA	M	10,0 – 60,0	0,99	5,61 ± 1,16	122,92 ± 17,38	600,00 ± 5,63
TBHQ	M	12,0 – 30,0	0,99	3,81 ± 0,20	66,71 ± 9,77	450,00 ± 6,81
BHT	M	10,0 – 40,0	0,90	3,22 ± 0,59	243,63 ± 25,85	770,00 ± 5,63
Eletrólito suporte B						
BHA	S	4,0 – 80,0	0,96	3,20 ± 1,25	212,15 ± 11,74	540,00 ± 8,23
TBHQ	S	12,0 – 120,0	0,99	5,09 ± 4,23	112,74 ± 9,53	415,00 ± 7,55
BHT	S	12,0 – 40,0	0,98	3,39 ± 0,76	177,65 ± 7,15	630,00 ± 7,21
BHA	M	8,0 – 120,0	0,99	6,09 ± 1,84	92,10 ± 7,34	530,00 ± 7,27
TBHQ	M	10,0 – 130,0	0,98	4,39 ± 0,81	123,52 ± 9,23	420,00 ± 7,75
BHT	M	4,0 – 30,0	0,96	5,28 ± 0,95	103,01 ± 10,03	650,00 ± 10,23

As amplitudes dos intervalos lineares de concentração para o eletrodo de Pt e o eletrodo de GC foram muito semelhantes. A linearidade do intervalo para um mesmo eletrólito suporte parece estar correlacionada com a solubilidade relativa de cada antioxidante. Por exemplo, o BHT possui uma solubilidade menor devido a sua estrutura molecular. Pode-se observar que os intervalos referentes ao BHT foram os menores em relação ao BHA e ao TBHQ.

4.5 Análise de amostras de maionese

O procedimento experimental para determinação está descrito na seção 4.10. Utilizou-se o método de Adição Padrão para determinar os antioxidantes nas amostras de maionese. Uma das vantagens deste método é a redução dos efeitos devidos a composição da matriz de alimentos complexos, como é o caso da maionese. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5. Os valores médios obtidos para BHA, BHT e TBHQ estão de acordo com níveis de concentração esperados para esse tipo de amostra (0,02 g/100 g sobre o teor de lipídios para o BHA e TBHQ, e 0,01 g/100 g sobre o teor de lipídios para o BHT) segundo a Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005 (BRASIL, 2005). A técnica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz), mostrou-se adequada para detecção dos antioxidantes sintéticos em mistura. Todavia, o antioxidante BHT, provavelmente devido a sua baixa solubilidade (menor do que a do BHA, conforme estrutura molecular) em ambos os eletrólitos suporte, A e B, não pode ser detectado com precisão quando em mistura. Após uma primeira determinação (BHA e TBHQ) a concentração da amostra foi ajustada para a faixa de linearidade do BHT, dessa forma o mesmo pode ser determinado em uma amostra mais diluída. Durante todo o curso deste estudo, os compostos BHA e TBHQ apresentaram melhores solubilidade e conseqüentemente maiores intervalos lineares de concentração.

Tabela 5. Determinação dos antioxidantes BHA, BHT e TBHQ em amostras de maionese comercial usando a técnica voltamétrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 60$ Hz) em eletrólito suporte solução aquosa HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0 para dois eletrodos de trabalho, GC e Pt

<i>Valores expressos em mg /100 g \pm SD mais (R^2)</i>							
Maionese		<i>Eletrodo de Pt</i>			<i>Eletrodo de GC</i>		
S	L	TBHQ	BHA	BHT	TBHQ	BHA	BHT
B	1	-	$3,47 \pm 0,81$	-	-	$2,78 \pm 0,29$	$2,11 \pm 0,12$
B	2	-	$4,36 \pm 0,53$	-	-	$3,19 \pm 0,76$	$2,45 \pm 0,21$
B	3	-	$4,32 \pm 0,45$	-	-	$3,05 \pm 0,51$	$2,67 \pm 0,18$
C	1	-	$4,24 \pm 0,69$	$2,32 \pm 0,32$	-	$3,11 \pm 0,54$	$2,34 \pm 0,22$
C	2	-	$3,78 \pm 0,41$	$1,97 \pm 0,54$	-	$2,69 \pm 0,32$	$2,55 \pm 0,16$
C	3	-	$5,81 \pm 0,79$	$1,76 \pm 0,42$	-	$2,13 \pm 0,67$	$2,64 \pm 0,25$
D	1	$5,89 \pm 0,62$	-	-	$5,67 \pm 0,44$	-	-
D	2	$6,11 \pm 0,74$	-	-	$5,88 \pm 0,65$	-	-
D	3	$7,38 \pm 0,56$	-	-	$7,01 \pm 0,68$	-	-
E	1	-	$2,84 \pm 0,38$	$2,13 \pm 0,28$	-	$3,65 \pm 0,45$	$2,43 \pm 0,25$
E	2	-	$3,36 \pm 0,31$	$2,18 \pm 0,26$	-	$4,95 \pm 0,23$	$2,56 \pm 0,19$
E	3	-	$3,15 \pm 0,55$	$2,02 \pm 0,41$	-	$3,25 \pm 0,17$	$2,23 \pm 0,43$

4.6 Interferentes

Possíveis interferentes que pudessem ser encontrados na formulação da maionese foram testados sobre a mistura contendo BHA, BHT e TBHQ. Foram realizados testes de interferência sobre o sinal de corrente anódica com o ácido láctico, ácido cítrico, ácido ascórbico, EDTA e sorbato de potássio. A escolha dos interferentes teve como base a formulação típica de maioneses comerciais. Os diferentes níveis de concentração testados foram: 1:1 (p/p), 1:2 (p/p), 1:5 (p/p), 1:10 (p/p) and 1:20 (p/p) ou uma faixa de 25 mg L^{-1} – 500 mg L^{-1} para cada interferente. Para o ácido cítrico em concentrações acima de 125 mg L^{-1} foi observado, especialmente em relação ao BHT, uma mudança no valor do pico de potencial anódico (deslocamento do potencial) e

decréscimo do valor de pico de corrente J_{pa} até completa extinção do pico em concentrações de 500 mg L^{-1} de ácido cítrico.

. Para o ácido láctico todos os valores de J_p foram pouco afetados para as concentrações testadas. Para o ácido láctico, cada um dos valores de J_{pa} foram muito pouco afetados em concentrações até 125 mg L^{-1} . Para concentrações maiores foi possível observar overlapping (sobreposição) dos picos. Para o sorbato de potássio o overlapping pode ser observado apenas na concentração máxima de 500 mg L^{-1} e nenhum tipo de interferência foi observada para as diferentes concentrações de EDTA. É interessante observar que todos os *overlapping* ocasionados por interferentes ocorreu em concentrações maiores de 125 mg L^{-1} (ratio 1:5 (p/p)) e esta razão ou proporção é impraticável em amostras reais de alimentos.

YANÉZ-SEDEÑO, PINGARRÓN e PÓLO DÍEZ (1991) também avaliaram a possível interferência do ácido cítrico na determinação do BHT e do BHA na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Os autores não observaram interferências no intervalo testado de $0,5\text{-}50,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido cítrico. Os mesmos autores (1991) também estudaram a influência do BHT sobre a determinação amperométrica do BHA. Os autores não observaram interferências experimentais na determinação de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BHA na presença de BHT em níveis de $0,5$ a $0,8 \text{ mg L}^{-1}$.

GONZÁLEZ et al. (1994) também estudaram os efeitos do ácido cítrico na determinação eletroquímica do BHA em eletrodo de trabalho de GC em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0. Os autores não observaram interferências significativas para relação 1:200 (p/p).

5 Conclusões

A determinação voltamétrica de misturas contendo os antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ em eletrodo de Pt tendo como eletrólito suporte uma solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0, foi a que mais mostrou-se vantajosa analiticamente e economicamente. Isso porque embora os resultados entre os eletrodos tenham sido muito parecidos, os intervalos lineares de concentração do eletrodo de Pt apresentaram-se maiores. Além disso, a superfície menos

adsorção do eletrodo de Pt tornou as medidas voltamétricas mais rápidas (menor tempo de limpeza) e mais precisas. Os antioxidantes sintéticos testados neste estudo, apresentaram limites de detecção distintos. O BHT mostrou a menor solubilidade e conseqüentemente o menor intervalo linear de concentração, o que tornou inviável a determinação simultânea dos três antioxidantes sintéticos em amostras de alimentos. A ampliação do intervalo de concentração para determinação do BHT usando diferentes eletrólitos suporte é uma possibilidade que deve ser considerada, embora seja difícil encontrar um solvente universal para substâncias com estruturas moleculares diferentes. No caso deste trabalho, optou-se pela avaliação separada do BHT mediante diluição prévia da amostra. Este problema de baixa solubilidade não anula as vantagens de rapidez da técnica otimizada aqui proposta que, mostrou-se suficientemente eficiente. A escolha do eletrodo de trabalho e do eletrólito suporte reflete no decréscimo dos custos da análise. Todos os sistemas testados neste trabalho apresentaram boa performance e possuem habilidade para aplicação em amostras de alimentos reais. O estudo sobre a detecção de misturas antioxidantes usando a técnica voltamétrica de voltametria de onda quadrada (SWV) e valores de pH adequados mostrou resultados suficientes para detecção de tais antioxidantes sintéticos sem a necessidade de usar aproximações quimiométricas para contornar os problemas de *overlapping* de potencial sobre os picos de oxidação característicos de cada substância.

CAPÍTULO 3 -

Perfil eletroquímico de extratos contendo antioxidantes naturais para avaliação da atividade antioxidante

1. INTRODUÇÃO

Os estudos sobre autooxidação relacionada a oxidação de ácidos graxos insaturados vêm sendo estudada desde 1940 (YAMAMOTO, NIKI & KAMIYA, 1982). Autooxidação é uma reação autocatalítica de radicais livres, de grande interesse para a indústria de alimentos, devido ao papel que desempenha na oxidação de lipídios. Contudo, apenas recentemente, a função dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio em várias doenças, incluindo o câncer, a arterioesclerose, a artrite reumática e as doenças inflamatórias, têm tornando-se conhecida (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; BASAGA, 1989).

Há evidências de que a oxidação pode induzir obstruções fisiológicas, causando o envelhecimento das células (GUTTERIDGE, 1993). Conseqüentemente, o organismo necessitará de antioxidantes para eliminar ou evitar a formação do superóxido e outros compostos reativos de oxigênio. A preocupação com os efeitos deletérios das espécies derivadas de oxigênio, naturalmente, é seguida pelo interesse em compostos com atividade antioxidante (IMEH & KHOKHAR, 2002). Isto tem levado ao desenvolvimento de pesquisas sobre a possível contribuição que os antioxidantes presentes na dieta podem ter na prevenção de doenças, uma vez que estas substâncias são capazes de remover ou prevenir a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (KINSELLA et al., 1993; GORDON, 1996).

Sabe-se que compostos fenólicos, tocoferóis, carotenóides e ácido ascórbico agem no organismo humano para destruir o oxigênio ativo (NAMIKI, 1990). Inúmeras pesquisas visando avaliar a possível contribuição dessas substâncias, encontradas principalmente em plantas terrestres e aquáticas, comprovam suas potencialidades (IMEH & KHOKHAR, 2002). A avaliação de novas fontes de antioxidantes naturais exige métodos confiáveis para avaliação desse potencial. Neste estudo são apresentados resultados sobre a aplicação de técnicas voltamétricas otimizadas na avaliação do potencial antioxidante de extratos brutos etanólicos de resíduo da produção de vinho branco.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do trabalho é a aplicação de técnica voltamétrica na avaliação da atividade antioxidante de extratos brutos contendo compostos antioxidantes obtidos do resíduo de vinícolas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilização de eletrodos nus comerciais de carbono vítreo na avaliação do potencial antioxidante de extratos brutos, especificamente, extratos etanólicos de bagaço de uva;
- Comparar a influência da aplicação do potencial, técnica voltamétrica, sobre a sensibilidade de decrição do perfil eletroquímico dos extratos etanólicos de bagaço de uva;
- Determinação dos parâmetros voltaméticos envolvidos na aplicação do eletrodo de carbono vítreo na avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de uva;
- Correlacionar os resultados obtidos com a técnica voltamétrica com os resultados obtidos com testes de avaliação da atividade antioxidante como radical DPPH, radical ABTS, sistema beta-caroteno/ácido linolérico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os solventes orgânicos álcool etílico, éter etílico (VETEC). Ácido linoléico (Fluka), β -caroteno (Fluka), Tween 40 (Sigma), BHT (Sigma), Trolox (Merk), apresentaram grau de pureza de aproximadamente 99,0%. O Folin-Ciocalteu foi adquirido da Fluka e ABTS [(2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)] da Merck. Todos os outros reagentes estavam disponíveis comercialmente e possuíam graus analíticos de pureza, sendo utilizados sem purificação prévia.

3.2 Amostras e Padrões

Cinco bagaços de diferentes cultivares de uvas usados na produção de vinho branco foram cedidos pela EPAGRI (Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária) unidade experimental de Videira/SC no ano de 2003, sendo eles: Gewürztraminer, Chardonnay, Couderc 13, Moscato Embrapa e Riesling Itália. As amostras de bagaço foram armazenadas a $(-18,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. Os bagaços foram primeiramente secos em estufa com circulação de ar forçada a $(40,0 \pm 1,5)^{\circ}\text{C}$ até secagem completa e, posteriormente, trituradas (granulometria entre 0,25-2,36 mm).

3.3 Obtenção dos extratos etanólicos

Para obtenção dos extratos etanólicos, pesou-se 4,00 g da biomassa seca em balança analítica e iniciou-se extração seqüencial sob agitação durante duas horas (MOREIRA; MANCINI FILHO, 2003). O primeiro solvente foi éter etílico, 50 mL e após duas horas sob agitação o bagaço foi seco em temperatura ambiente e misturado com o segundo solvente, álcool etílico, 50 mL e nova extração realizada. A determinação do peso seco dos extratos foi realizada por gravimetria (AOAC, 1996). Estudos preliminares foram realizados inicialmente com três diferentes solventes: éter etílico, álcool etílico

e água, devido aos diferentes valores de polaridade desses solventes. Devido a baixa atividade antioxidante apresentada, os resultados obtidos com extratos em éter etílico e água, neste trabalho são apresentados apenas os resultados observados usando extratos etanólicos.

3.4 Eletrólitos suporte

Para os extratos etanólicos dos bagaços de uva, inicialmente testou-se soluções de diferentes tampões contendo 20,0% (v/v) de etanol: tampão HCl/KCl, tampão citrato e tampão fosfato, em pHs: 1,0, 4,5, 6,0, 7,0 e 8,0. Após a seleção do melhor valor de pH (entre 3,0 e 4,0) seguiram-se testes com os tampões HCl/KCl pH 3,32 e acetato de sódio, pH 3,65.

3.5 Determinação de compostos fenólicos totais

Os fenólicos totais foram avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (BUDINI, 1980), usando ácido gálico como padrão e os resultados expressos com equivalentes em ácido gálico (EAG), $r^2 = 0,9987$.

3.6 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos pelo método do radical DPPH

A metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995) foi utilizada. Para cada extrato, diferentes concentrações foram testadas (5,0 – 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O decréscimo nos valores de absorvância resultantes da reação para estabilização do radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}) foi monitorada em espectrofotômetro HP 8452A no comprimento de onda de 517 nm após 30 minutos de reação.

3.7 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos pelo método do radical ABTS

A atividade antioxidante total (AAT ou CAO) foi avaliada pelo método do radical ABTS segundo RICE-EVANS e MILLER (1994). As habilidades relativas dos antioxidantes para sequestrar o radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), radical catiónico (ABTS^{*+}) foram avaliadas em relação a habilidade antioxidante de diferentes quantidades do padrão Trolox. O radical cátion ABTS^{*+} na concentração de 7,0 mmol L⁻¹ foi gerado pela reação com 2,5 mmol L⁻¹ de persulfato durante 12 horas em repouso. A reação entre 980 µL da solução contendo o radical ABTS e 20 µL do extrato etanólico foi monitorada em espectrofotômetro HP8452A no comprimento de onda de 754 nm durante 4 minutos, a cada minuto.

3.8 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico

A avaliação da habilidade dos extratos em retardar a peroxidação do β-caroteno em sistema de emulsão contendo ácido linoléico seguiu o protocolo de Marco 1968. O sistema emulsão contendo 40,0 mg mL⁻¹ de ácido linoléico, 0,85 mL de tween 40 e 3,34 mg mL⁻¹ de β-caroteno em água foi mantido em banho termostatizado a (50,0 ± 2,0)°C. A reação de peroxidação do β-caroteno foi monitorada em espectrofotômetro HP 8452 no comprimento de onda de 470 nm a cada 15 minutos durante duas horas. O percentual de inibição da oxidação em relação ao controle (100,0% de oxidação) foi obtido pela relação das absorbâncias no tempo final e inicial para uma concentração de 100 ppm de extrato. O antioxidante sintético BHT foi utilizado também a 100 ppm como controle positivo.

3.9 Determinação do potencial antioxidante dos extratos etanólicos usando técnicas amperométricas

Utilizou-se um sistema de célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos: um eletrodo de trabalho (ET) de carbono vítreo (GC, 0,950 cm², PINE); um eletrodo de referência (ER) Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE) e um contra-eletrodo de platina. As técnicas amperométricas testadas foram voltametria cíclica (VC ou CV) ($u_b = 50 \text{ mVs}^{-1}$), voltametria de pulso diferencial (DPV ou VPD) ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $u_b = 20 \text{ mV s}^{-1}$) e voltametria de onda quadrada (SWV ou VOQ) ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $f = 30 \text{ Hz}$) em um potenciostato EG&G PARC (modelo 273A, USA). Todos os experimentos foram realizados a temperatura constante ($20,0 \pm 0,05$)°C.

3.10 Análise estatística

Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão. Os resultados foram estatisticamente analisados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 0,05.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Influência da técnica voltamétrica

Para avaliar a influência do tipo de aplicação do potencial sobre a sensibilidade da resposta foram testadas diferentes técnicas voltamétricas. Inicialmente testou-se as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de varredura linear (LSV), voltametria de ondas quadradas (SWV) voltametria de pulso diferencial (DPV) (nem todos resultados são apresentados). As técnicas DPV e SWV apresentaram os melhores resultados, os quais estão apresentados nos voltamogramas das Figuras 1 e 2. Na Figura 1 tem-se o voltamograma do extrato de Gewurztraminer em tampão HCl/KCl pH 3,32 usando a técnica voltamétrica SWV. É possível observar neste voltamograma apenas dois picos anódicos em $E_{pa1} = (240,00 \pm 3,54)\text{mV}$ e $E_{pa2} = (540,00 \pm 6,21)\text{mV}$, pouco definidos.

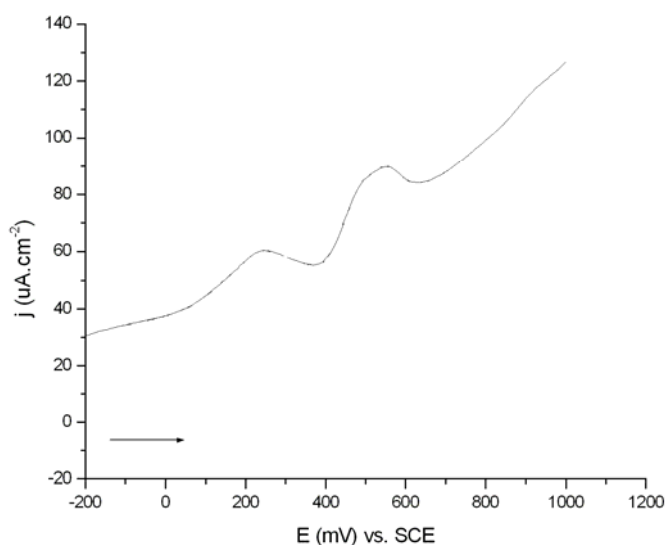


Figura 1. Voltamograma do extrato de bagaço Gewurztraminer usando a técnica de voltametria de onda quadradas SWV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $f = 30 \text{ Hz}$) em eletrodo de carbono vítreo, GC, e eletrólito suporte tampão HCl/KCl pH 3,32, na proporção 1,5: 25 (v/v) extrato etanólico:tampão, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).

Na Figura 2 tem-se o mesmo extrato no mesmo eletrólito suporte usando a técnica voltamétrica de DPV. Neste voltamograma é possível observar até três picos anódicos em $E_{pa1} = (465,00 \pm 2,33)\text{mV}$, $E_{pa2} = (705,00 \pm 4,25)\text{mV}$ e $E_{pa3} = (855,00 \pm 4,11)\text{mV}$. O primeiro pico anódico é bem definido e encontra-se na faixa de potencial de compostos como a catequina, a rutina e o quemferol. O segundo pico encontra-se na faixa de potencial de oxidação de compostos como a galangina, a hesperetina e a flavona 3-OH e o terceiro pico encontra-se na faixa de potencial de compostos como a genisteína, a naringenina, a flavona 5-OH, a flavona 7-OH, que apresentam a menor pelo método FRAP segundo FIRUZI et al. (2005). Para um mesmo eletrólito suporte, no caso, o tampão KCl/HCl pH, 3,32, técnica DPV apresentou-se mais sensível e adequada, possibilitando a distinção entre três picos anódicos bem definidos, sem a sobreposição de ondas observados nos voltamogramas obtidos por SWV nas mesmas condições.

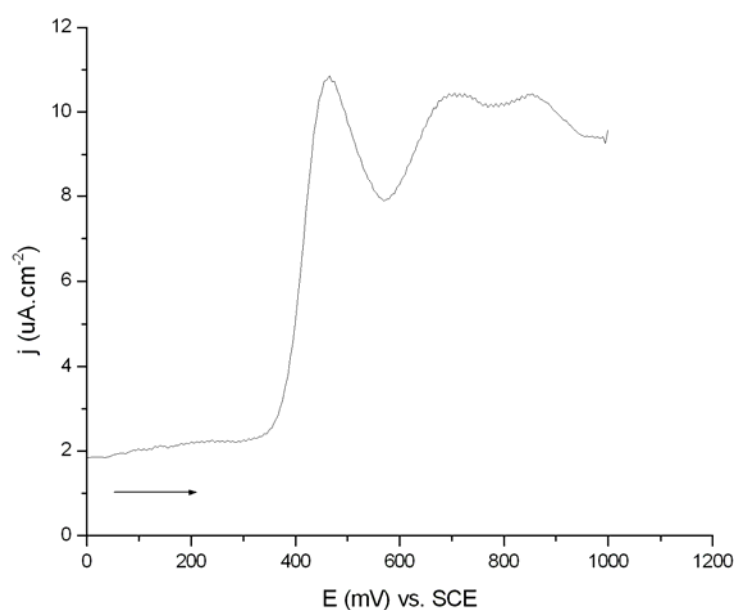


Figura 2. Voltamograma do extrato de bagaço Gewurztraminer usando a técnica de voltametria de pulso diferencial DPV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $u_b = 20 \text{ mV s}^{-1}$) em eletrodo de carbono vítreo e eletrólito suporte tampão KCl/HCl, pH 3,32, na proporção 1,5: 25 (v/v) extrato etanólico:tampão, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).

4.2 Influência do eletrólito suporte

Para avaliar a influência do eletrólito suporte sobre as reações de oxidação, inicialmente foram testados diferentes tampões, em diferentes pHs (resultados não apresentados). Após a seleção do melhor valor de pH (entre 3,0 e 4,0), os dois melhores eletrólitos suporte foram testados, sendo eles os tampões KCl/HCl pH 3,32, e o tampão acetato de sódio pH 3,64. Usando-se a técnica voltamétrica SWV para o primeiro eletrólito suporte obteve-se o voltamograma apresentado na Figura 3, enquanto que o voltamograma obtido com o segundo eletrólito é apresentado na Figura 4.

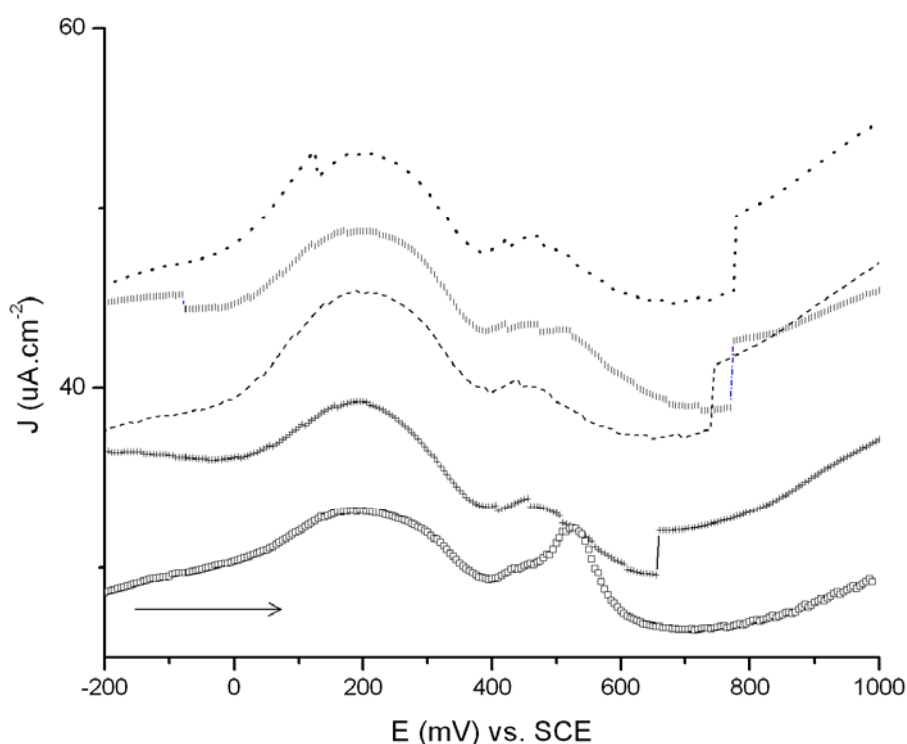


Figura 3. Voltamograma dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos (●●● Gewürztraminer, IIII Riesling Itálico, +++ Moscato Embrapa, □□□ Courdec 13; --- Chardonnay) usando a técnica amperométrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 30$ Hz) em eletrólito suporte tampão acetato de sódio, pH 3,64, na proporção 1,5: 25 (v/v) extrato etanólico:tampão, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).

Na Figura 3 pode-se observar os voltamogramas para cada extrato etanólico testado (Gewürztraminer, Chardonnay, Riesling Itálico, Moscato

Embrapa e Couderc 13). Para todos os extratos são observados apenas dois picos de oxidação pouco definidos. Neste sistema não foi possível diferenciar as características eletroquímicas entre os diferentes extratos etanólicos, todos obtiveram seu primeiro pico, com maior valor de corrente, J ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), num mesmo intervalo de potencial anódico. Portanto, o sistema apresentou-se pouco sensível e limitado. Diante desse resultado, um segundo sistema foi montado, substituindo-se, apenas o eletrólito suporte (Figura 4).

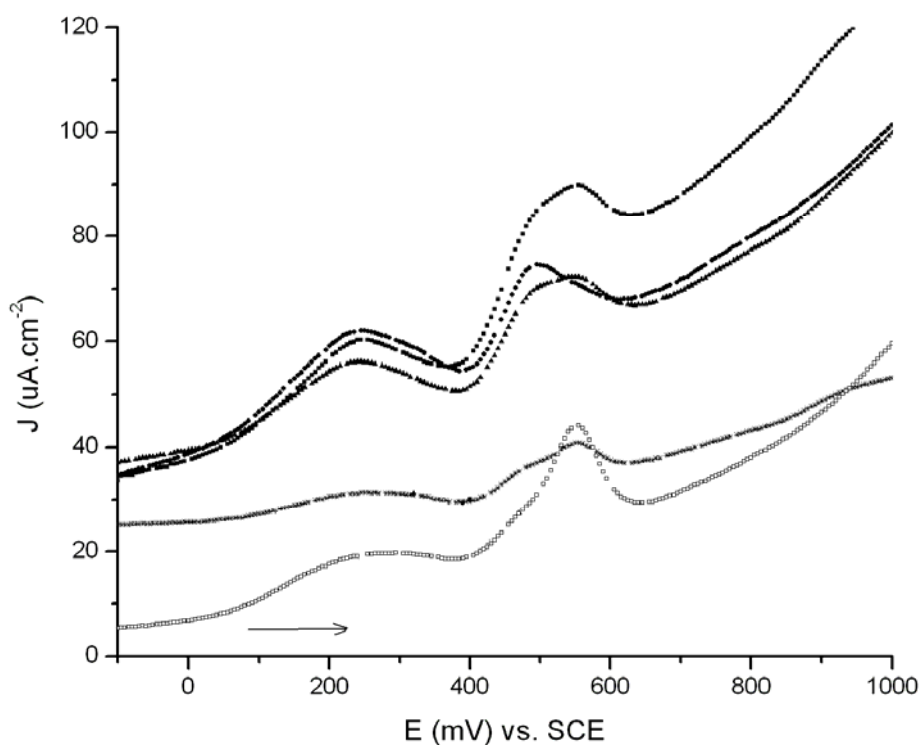


Figura 4. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos (■■■ Gewurztraminer; ▲▲▲ Riesling itálico; ●●● Chardonnay; *** Moscato e □□□ Couderc 13) usando a técnica amperométrica SWV ($\Delta E = 25$ mV; $f = 30$ Hz) em eletrólito suporte tampão KCl/HCl pH 3,32, na proporção 1,5: 25 (v/v) extrato etanólico:tampão, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl (sat.) (SCE).

Apenas a troca do eletrólito suporte não proporcionou uma melhora suficiente na sensibilidade do sistema, resultado este que sugere limitação relacionada à técnica voltamétrica, no caso a SWV. A mudança do eletrólito suporte proporcionou uma maior definição dos picos anódicos e conseqüentemente uma melhor caracterização de cada extrato etanólico.

Essa afirmação fica especialmente evidente para o extrato etanólico do bagaço de Couderc 13, com pico anódico máximo em $E_{pa} = (555,00 \pm 10,98)\text{mV}$ e $J = (43,72 \pm 2,33)\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Os potenciais de oxidação obtidos para os extratos de Gewüetraminer, Chardonnay, Riesling Itálico e Moscato Embrapa foram respectivamente, $E_{pa_{\max}} = (555,00 \pm 7,12)\text{mV}$, $E_{pa_{\max}} = (495,00 \pm 9,25)\text{mV}$, $E_{pa_{\max}} = (545,00 \pm 13,23)\text{mV}$ e $E_{pa_{\max}} = (555,00 \pm 5,41)\text{mV}$, respectivamente.

O processo de otimização dos parâmetros analíticos prosseguiu com a substituição da técnica voltamétrica. Dois sistemas utilizando-se as técnica voltamétrica de DPV também foram avaliados para os eletrólitos suporte tampão KCl/HCl pH 3,32 e tampão acetato de sódio, pH 3,64. Os voltamogramas obtidos no primeiro sistema são apresentados na Figura 5.

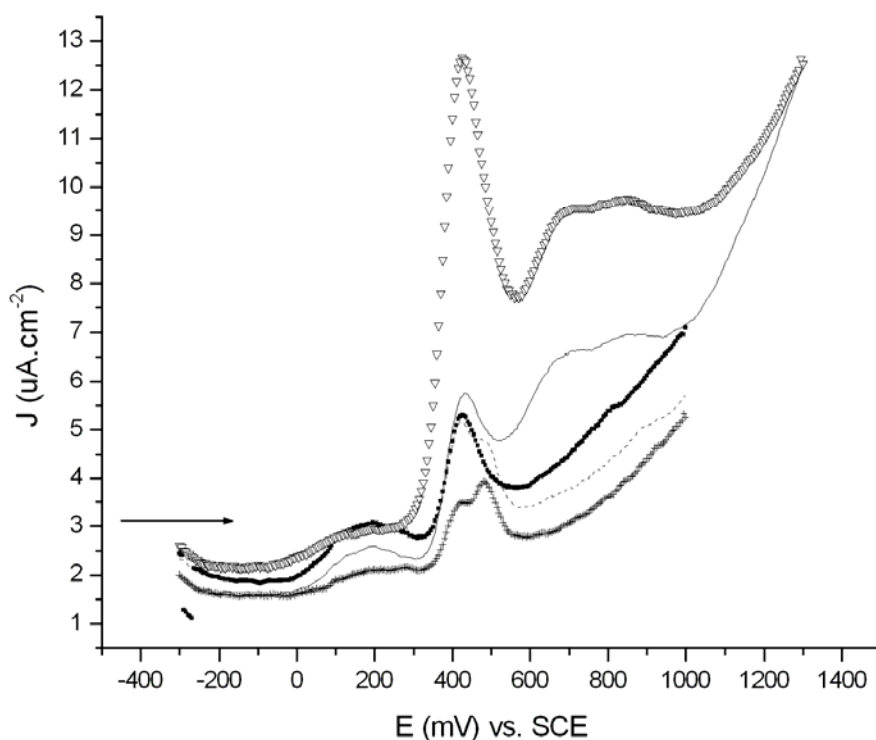


Figura 5. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos (▽▽▽ - Gewurztraminer; ■■■ Chadornay; +++ - Couderc 13; --- Moscato Embrapa e — Riesling Itálico) usando a técnica voltamétrica DPV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $u_b = 20 \text{ mV s}^{-1}$) em eletrólito suporte tampão acetato de sódio, pH 3,64, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).

A mudança da técnica voltamétrica permitiu a redução do *overlapping* (sobreposição) das ondas. Extratos, como os das uvas Gewürztraminer e Riesling Itálico apresentaram até três picos anódicos, em $E_{pa1} = (425,00 \pm 2,50)\text{mV}$, $E_{pa2} = (670,00 \pm 5,23)\text{mV}$ e $E_{pa3} = (855,00 \pm 3,42)\text{mV}$, e $E_{pa1} = (425,00 \pm 4,21)\text{mV}$, $E_{pa2} = (680,00 \pm 1,23)\text{mV}$ e $E_{pa3} = (860,00 \pm 4,16)\text{mV}$, respectivamente. Para os extratos etanólicos dos bagaços Moscato Embrapa e Couderc 13, foram obtidos até dois picos anódicos em $E_{pa1} = (440,00 \pm 4,08)\text{mV}$ e $E_{pa2} = (480,00 \pm 0,20)\text{mV}$, e $E_{pa1} = (465,00 \pm 8,66)\text{mV}$ e $E_{pa2} = (500,00 \pm 1,45)\text{mV}$, respectivamente. Apenas o extrato referente ao bagaço de Chardonnay apresentou apenas um pico de oxidação em $E_{pa} = (425,00 \pm 7,50)\text{mV}$. Apesar de apresentar apenas um pico anódico, o extrato etanólico da Chardonnay obteve um valor de corrente estatisticamente igual aos dos extratos de Riesling e Moscato, $J = (5,013 \pm 0,740)\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, e estatisticamente inferior apenas à corrente anódica do primeiro pico do extrato da Gewürztraminer de $J = (9,845 \pm 1,167)\mu\cdot\text{cm}^{-2}$. Sendo o valor de corrente anódica diretamente proporcional à concentração da substância doadora de elétrons, embora o extrato de Chardonnay apresente apenas um grupo de composto antioxidante, esse, encontra-se em quantidade equivalente quando comparado aos demais extratos testados nas mesmas condições experimentais. Além disso, o valor de potencial de oxidação de $E_{pa} = (425,00 \pm 7,50)\text{mV}$ para tais compostos sugere atividade antioxidante relativamente alta (FIRUZI et al., 2005).

Quando a técnica de DPV foi acoplada ao eletrólito suporte tampão HCl/KCl pH 3,32, a maior sensibilidade e conseqüentemente a melhor caracterização dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos foram alcançados (Figura 6).

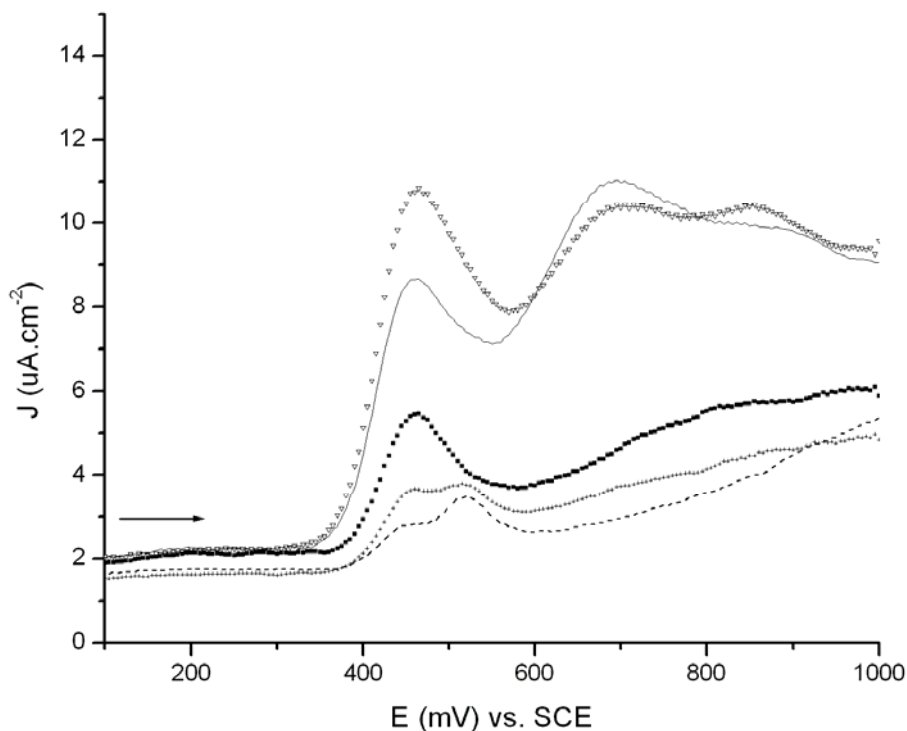


Figura 6. Voltamogramas dos perfis eletroquímicos dos extratos etanólicos (∇∇∇ - Gewurztraminer; ■■■ Chadornay; +++ - Couderc 13; --- Moscato Embrapa e — Riesling Itálico) usando a técnica voltamétrica DPV ($\Delta E = 25 \text{ mV}$; $u_b = 20 \text{ mV s}^{-1}$) em eletrólito suporte tampão HCl/KCl, pH 3,32, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).

Na Figura 6 observa-se os voltamogramas que melhor descrevem os perfis eletroquímicos dos extratos estudados. Essa afirmação é feita com base nas correlações positivas obtidas entre esses voltamogramas e as capacidades antioxidantes dos extratos etanólicos, obtidas por outras técnicas de avaliação antioxidante (correlações estas que são apresentadas posteriormente). Utilizando-se a técnica voltamétrica mais sensível juntamente com o eletrólito suporte mais adequado obteve-se três picos anódicos para o extrato de Gewurztraminer em $E_{pa_{max}} = (710,00 \pm 8,66)$, $E_{pa1} = (465,00 \pm 5,77)$ mV e $E_{pa3} = (855,00 \pm 10,11)$ mV. Dois picos anódicos para os extratos de Riesling Itálico, Moscato Embrapa e Couderc 13, $E_{pa_{max}} = (690,00 \pm 5,77)$ e $E_{pa1} = (460,00 \pm 12,16)$ mV; e $E_{pa_{max}} = (460,00 \pm 2,50)$ mV e $E_{pa2} = (515,00 \pm$

8,23)mV; e $E_{pa_{max}} = (520,00 \pm 0,00)mV$ e $E_{pa1} = (450,00 \pm 7,45)mV$, respectivamente. Observou-se um comportamento similar entre os extratos de Moscato Embrapa e Couderc 13, picos de oxidação em potenciais muito próximos, o que resultou em um suave *overlapping* no intervalo de potencial entre 460,0 mV e 520,0 mV, $\Delta E = 55,0$ mV para a Moscato Embrapa e entre 450,0 mV e 520,0 mV, $\Delta E = 70$ mV. Para o eletrólito suporte tampão HCl/KCl, valores próximos para o ΔE também foram obtidos, 55,0 mV para a Moscato Embrapa e e 75,0 mV para a Couderc 13. Na Tabela 1 estão relacionados todos os valores médios para o potencial de máxima oxidação $E_{pa \text{ máx.}}$ (potencial de oxidação para o valor de máxima corrente $J_{\text{máx.}}$).

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão do potencial de corrente anódica máxima ($E_{pa \text{ máx.}}$) expressos em mV, corrente máxima ($J_{\text{máx.}}$) expressa em $\mu A.cm^{-2}$, e o volume de extratos (mL) usados na voltametria de pulso diferencial

<i>Extrato</i>	<i>Eletrólito suporte</i>	<i>E_{pa} (mV) máximo</i>	<i>J ($\mu A cm^{-2}$) máximo</i>	<i>Volume do extrato (mL)</i>
Chardonnay	acetato	425,00 \pm 7,50 ^a	5,013 \pm 0,740 ^a	1,5
Chardonnay	HCl/KCl	460,00 \pm 2,50 ^b	6,013 \pm 0,959 ^a	1,5
Couderc 13	acetato	465,00 \pm 8,66 ^C	4,417 \pm 0,706 ^B	1,5
Couderc 13	HCl/KCl	520,00 \pm 0,00 ^D	3,509 \pm 0,334 ^B	1,5
Gewurztraminer	acetato	426,00 \pm 2,50 ^a	9,845 \pm 1,167 ^a	1,5
Gewurztraminer	HCl/KCl	710,00 \pm 8,66 ^b	10,497 \pm 1,268 ^a	1,5
Riesliing itálico	acetato	440,00 \pm 7,50 ^C	5,901 \pm 0,455 ^B	1,5
Riesliing itálico	HCl/KCl	690,00 \pm 5,77 ^D	9,074 \pm 0,588 ^C	1,5
Moscato Embrapa	acetato	440,00 \pm 4,08 ^a	5,233 \pm 0,515 ^a	1,5
Moscato Embrapa	HCl/KCl	460,00 \pm 2,50 ^b	3,009 \pm 0,447 ^b	1,5

^{a,b,A,B,C,D} Para um mesmo extrato e técnicas distintas seguidas por letras iguais não houveram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para verificar a correlação linear entre a concentração dos compostos antioxidantes e os valores de corrente anódica J ($\mu A.cm^{-2}$) voltamogramas foram obtidos a partir de diferentes concentrações (3,63 mg mL⁻¹, 4,54 mg mL⁻¹ e 13, 53 mg mL⁻¹) e são apresentados na Figura 7. A correlação entre os valores de concentração (mg mL⁻¹) e os valores de corrente j ($\mu A cm^{-2}$) é dada pela reta $y = 0,5315x + 5,3694$ com um coeficiente de ajuste de $r^2 = 0,9861$.

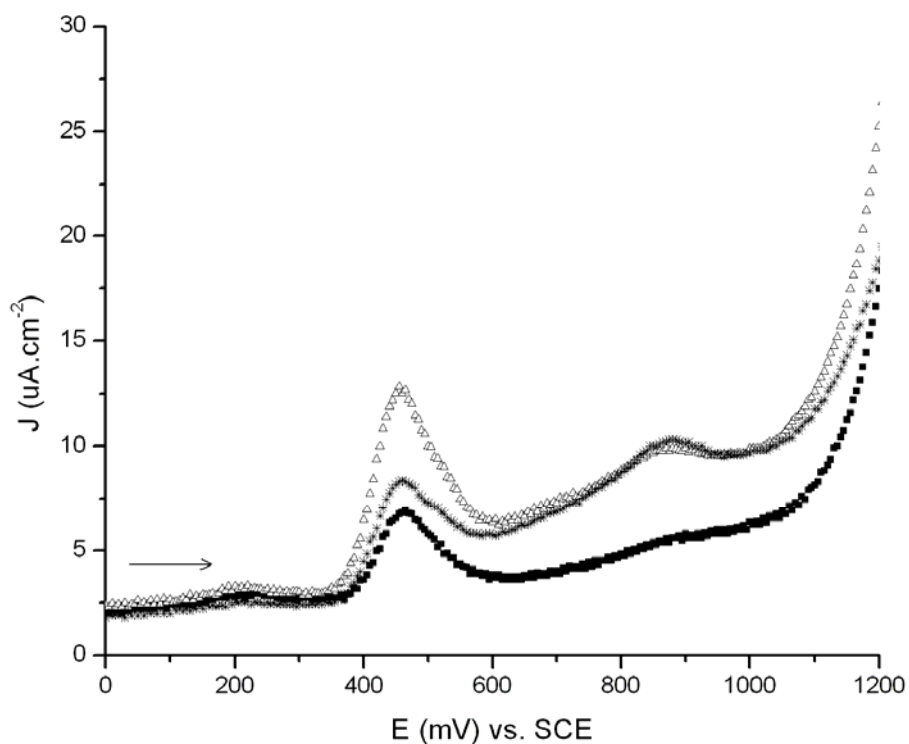


Figura 7. Voltamogramas do extrato de Gewürztraminer para diferentes concentrações (■■■ 3,63 mg mL⁻¹; *** 4,54 mg mL⁻¹; ΔΔΔ 13,53 mg mL⁻¹) usando a técnica DPV ($\Delta E = 25$ mV; $u_b = 20$ mV s⁻¹) e eletrólito suporte tampão KCl/HCl pH 3,32, eletrodo de referência Hg/Hg₂Cl₂/KCl_(sat.) (SCE).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados para determinação de fenólicos totais (método de Folin Ciocateau) e a atividade antioxidante total dos extratos etanólicos utilizando-se diferentes métodos: sistema beta-caroteno/ácido linoléico, radical cátion ABTS, radical DDPH e voltametria de pulso diferencial (DPV).

Table 2. Conteúdo de fenólicos totais (método de Folin Ciocateau) e atividade antioxidante total dos extratos etanólicos utilizando-se diferentes métodos: sistema beta-caroteno/ácido linoléico, radical cátion ABTS, radical DDPH e voltametria de pulso diferencial (DPV).

Análise <i>In vitro</i>	Gewürztrami -ner	Riasling Itálico	Chardonnay	Couderc 13	Moscato Embrapa
TEAC mM/g (ABTS)	29,27 ± 0,88 ^a	6,17 ± 0,41 ^b	8,74 ± 0,12 ^c	2,65 ± 0,05 ^d	6,61 ± 0,11 ^b
GAE (mg/mL)	4,34 ± 1,07 ^a	5,20 ± 0,34 ^a	1,40 ± 0,64 ^b	0,45 ± 0,12 ^b	0,85 ± 0,01 ^b
DPPH (%AA for 250µg/mL)	46,14 ± 3,12 ^a	59,50 ± 2,59 ^b	32,96 ± 0,49 ^c	5,33 ± 1,76 ^d	15,02 ± 4,24 ^e
Sistema β- caroteno/ácido linoléico (% inibição) em 100 mg/L	67,66 ± 0,98	78,13 ± 6,24	22,60 ± 6,01	16,74 ± 0,91	69,00 ± 5,42
Voltametria de pulso diferencial (I _{pa} µA cm ⁻² em E _{pa} = 462 mV)	10,78 ± 1,22 ^a	8,63 ± 0,71 ^a	5,39 ± 0,13 ^b	2,84 ± 0,41 ^c	3,65 ± 0,38 ^c

^a Médias para um mesmo método (linhas) entre colunas seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Os extratos etanólicos dos bagaços das variedades Gewürztraminer, Moscato, Courdec 13 e Chardonnay apresentaram correlações positivas entre as diferentes técnicas utilizadas para avaliar o potencial antioxidante dos mesmos. Apenas um extrato etanólico, referente a variedade Riesling Itálico apresentou comportamento distinto e sua discussão será então apresentada separadamente daquela dos demais extratos. Portanto, com exceção do extrato etanólico da variedade Riesling Itálico, os demais quatro extratos apresentaram correlações linearmente positivas entre seus resultados.

Os valores médios para compostos fenólicos totais expressos em EAG/GAE (mg mL⁻¹) e os valores médios obtidos para os picos de corrente anódica máximos (uA.cm⁻²) estão diretamente correlacionados pela reta $y = 2,0412x + 1,8174$, $r^2 = 0,9967$. Este resultado é coerente devido ao fato de I_{pa} (j) corresponder ao número de elétrons doados pelo composto antioxidante e

seu valor é diretamente proporcional à quantidade de antioxidantes (concentração). Quanto maior a concentração de antioxidantes no extrato maior o valor da corrente I_{pa} (ou no caso a densidade de corrente j). Da mesma forma, outra correlação foi obtida para os extratos das variedades Gewürztraminer, Moscato Embrapa, Chardonnay e Couderc 13, entre os valores médios de I_{pa} (em $E_{pa} = 462,0$ mV) e valores médios do teste com radical ABTS, expressos em TEAC (mM/g), descrita na reta $y = 0,2975x + 2,1492$, $R^2 = 0,9832$).

A capacidade antioxidante dos extratos foram atribuídas aos compostos fenólicos presentes e está relatada na literatura sobre uvas e seus derivados (HEREDITA MIRA & GUZMAN CHOSAZ, 1993; SOLEAS, DIAMANDIS & GOLBERG, 1997; SAURA-CALIXTO, 1998). Uvas, vinhos e subprodutos de uva contém grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, em altas concentrações de 1000 – 1800 mg/mL (KANNER et al., 1994).

A elevada concentração de compostos fenólicos resulta em elevada atividade antioxidante e isto pode ser confirmado pelos valores médios obtidos com o método do radical DPPH e sua correlação linear com os resultados da voltametria ($y = 10,1464x + 5,8924$, $r^2 = 0,9477$), e de forma semelhante, a correlação dos últimos os resultados dosistema β -carotene/ácido linoléico ($y = 0,1422x + 1,2663$, $r^2 = 0,9547$).

O potencial antioxidante depende do número e do arranjo espacial dos grupos, e do tamanho da conjugação, bem como, da presença de grupos doadores de elétrons e receptores de elétrons substituintes na estrutura do anel (MILLER; RICE-EVANS, 1997). O extrato etanólico do bagaço da variedade Riesling Itália apresentou-se como um “ponto fora da curva” devido ao seu comportamento não linear. Este extrato etanólico apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais ($5,20 \pm 0,34$) mg/mL) determinados pelo método de Folin Ciocateau e os maiores valores para habilidade em seqüestrar radicais DPPH e inibir a peroxidação do β -caroteno [($59,50 \pm 2,59$)%AA em 250 μ g/mL e ($78,13 \pm 6,24$)% inibição em 100 mg/L], respectivamente. Entretanto, seu desempenho frente ao radical ABTS não foi proporcional ao seu elevado conteúdo de compostos fenólicos totais.

As informações que podem ser obtidas pelas técnicas voltamétricas ajudam na compreensão desses resultados. Na Figura 6, pode-se observar o voltamograma obtido para o extrato etanólico da variedade Riesling Itálico. Esse, apresentou um pico de oxidação em $E_{pa\ max} = (690,00 \pm 5,77)\text{mV}$ com uma densidade de corrente de $J_{\ max} = (9,074 \pm 0,588)\mu\text{A cm}^{-2}$, que foi estatisticamente igual ao pico máximo variedade Gewürztraminer em $E_{pa\ Max} = (710,00 \pm 8,66)\text{mV}$ e $J_{\ max} = (10,497 \pm 1,268)\mu\text{A.cm}^{-2}$. Além desse pico máximo, com o maior valor de corrente, o extrato de Riesling Itálico apresentou outro pico em valores de potencial ainda mais elevados, $E_{pa3} = (885,00 \pm 12,13)\text{mV}$ e corrente correspondente de $J_{pa3} = (9,34 \pm 1,34)\mu\text{A cm}^{-2}$. Isso sugere que a maior parte dos compostos fenólicos do extrato etanólico de Riesling Itálico oxidam na região de potencial entre 680,0 mV e 890,0 mV. Segundo FIRUZI et al., compostos como a flavona 3-OH possuem potencial de oxidação entre +590,0 mV e 710,0 mV e apresentam uma fraca atividade. Portanto, apesar de o extrato etanólico de Riesling Itálico conter o maior teor de compostos fenólicos, esses possuem uma fraca atividade antioxidante.

A transferência de elétrons entre um agente oxidante e um agente redutor, e a conseqüente reação redox, ocorre facilmente quando o potencial catódico (E_{pc}) do oxidante é maior que o potencial anódico do redutor (E_{pa}). Então, quanto menor o potencial anódico de um composto fenólico maior será sua capacidade antioxidante. Neste caso, novamente analisando a Figura 6, o extrato de Gewürztraminer possui o maior valor de corrente, $J_{\ máx}$, para seu pico de oxidação no menor valor de potencial.

Os valores de potencial anódico obtidos neste estudo podem envolver uma série de compostos fenólicos. Por exemplo, Firuzi et al (2005) avaliaram a capacidade antioxidante de flavonóides usando voltametria cíclica e posteriormente correlacionando os resultados com valores obtidos pelo método FRAP. O sistema era formado por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo de referência de calomelano saturado (+0,242 V vs. NHE), tendo como eletrólito suporte tampão acetato 300 mM, pH 3,60 contendo HCl 20 mM numa proporção de 10:2 (v/v). Os autores obtiveram os seguintes valores de E_{pa} : 440,0 mV para o kaempferol, 460,0 mV para a rutina, 390,0 mV para quercetina, 300,0 mV para miricetina, 450,0 mV para a catequina, 555,0 mV para o resveratrol.

Apenas uma identificação usando padrões pode especificar os compostos fenólicos presentes nos extratos. Entretanto, a proposta deste estudo é apenas de um método rápido e seguro para avaliar uma possível capacidade antioxidante de extratos brutos, de naturezas diferentes. Visto que, procedimentos de identificação de compostos são laboriosos e honerosos, sendo realizados apenas em amostras purificadas, uma avaliação rápida da amostra, pode economizar tempo e reduzir custos.

5 Conclusões

O procedimento eletroquímico usando um eletrodo de carbono vítreo obteve resultados (potencial antioxidante) que apresentaram-se positivamente correlacionados aos resultados dos demais testes. Todas as metodologias usadas nesse estudo para avaliação da atividade antioxidante dos extratos, a maioria *in vitro* (radical ABTS, radical DPPH, sistema modelo ácido linoléico/beta-caroteno e o procedimento de voltametria de pulso diferencial apresentado); além da técnica *in vivo* (TBARS) indicaram potencial antioxidante para os bagaços residuais a produção de vinho branco. Dentre as cultivares apresentadas neste estudo os bagaços das uvas Gewürztraminer, Chardonnay e Riesling Itálico apresentaram os maiores níveis de compostos fenólicos totais e conseqüentemente as maiores atividades antioxidantes. Resíduos da indústria de alimentos são um problema global, e em especial, os resíduos ricos em compostos antioxidantes, necessitam de estudos para uma utilização racional e melhor exploração dessas possíveis fontes naturais de substâncias antioxidantes. A técnica voltamétrica utilizando os parâmetros otimizados e apresentados neste estudo, é um instrumento útil para uma seleção prévia e rápida de amostras com potencial antioxidante e pode ser

usada como ferramenta de seleção nas etapas iniciais de estudos envolvendo atividade antioxidante de extratos brutos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSSA – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique. Disponível em: http://www.afssa.fr/dossiers/index.asp?id_dossier=4267.htm Acesso em dez 2003.

AGUI, M.L.; REVIEJO, A.J.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J.M. Analytical Applications of Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes. Simultaneous Voltammetric Determination of Phenolic Antioxidants in Food, *Analytical Chemistry*, v.67, n.13, p.2195-2200, 1995.

ALLEWELDT, G.; POSSINGHAM, J.V. Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, v.75, n.5, p.669-673, 1988.

AMO, B.; ME, G. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis*, v.15, n.22, p.1745-1750, 2003.

AMR, A.; HADIDI, N. Effect of cultivar and harvest date on nitrate (NO₃) and nitrite (NO₂) content of selected vegetables grown under field and greenhouse conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.14, p.59-67, 2001.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v.127, p.183-198, 2002.

ANTÓN, A.; LIZASO, J. II Seminario Internacional FUNDISA: Seguridad alimentaria de la carne y los productos cárnicos. Nitritos, Nitratos y Nitrosaminas. Disponível em: < <http://www.fundisa.org/articulos/fnitratos.pdf> > Acesso em: 20 de novembro de 2003.

AOAC - Official methods of analysis (16 ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists. 1997.

ARAKI, K.; ANGNES, L.; AZEVEDO, C.M.N.; TOMA, H.E. Electrochemistry of a tetraruthenated cobalt porphyrin and its use in modified electrodes as sensors of reducing analytes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.397, p.205-210, 1995.

ARMIJO, F.; ISAACS, M.; RAMÍREZ, G.; TROLLUND, E.; CANALES, J.; AGUIRRE, M. Electrocatalytic reduction of nitrate ion on Cu and Ni poly-tetraaminophenylporphyrin-modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.566, p.315–322, 2004.

ARAZARENA, I.; CASP, A.; MARÍN, R.; NAVARRO, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, n.13, p.1909-1919, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6028: resumos. Rio de Janeiro, 2003. 3 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry, 16th ed., v.2, Gaithersburg, Maryland, 1997.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.957, p.146-161, 2002.

AZANZA, M.P.V.; RUSTIA, A.S. Residual nitrite levels in Philippine sweet bacon. *Food Control*, v.14, p.385-389, 2004.

BAGCHI, D., et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and diseases prevention. *Toxicology*, v.148, p.187-197, 2000.

BANDEIRA, M.C.E. Produção de filmes copoliméricos poli-{pirrol-trans-[RuCl₂(pmp)₄]} e caracterização das propriedades físico-químicas. 100f. 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais. Departamento de Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Santa Catarina.

BANDEIRA, M.C.E. Aplicação do complexo trans-[RuCl₂(vpy)₄] como revestimento catalítico e anticorrosivo e estudo do mecanismo de eletropolimerização. 100f. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Departamento de Engenharia de Materiais - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Santa Catarina.

BANDEIRA, M.C.E.; FRANCO, C.V.; MARTINI, E. Electrochemical impedance spectroscopy of poly{pyrrole-trans-[(RuCl₂(pmp)₄]} copolymer films deposited on platinum electrodes, *Journal of Solid State Electrochemistry*, v.3, n.4, 1999.

BANDEIRA, M. C. E., PROCHNOW, F.D., NODA, L.K., GONÇALVES, N.S., COSTA, I., MELO, H.G., CRAYSTON, J.A., FRANCO, C.V. Electroreductive polymerization of *trans*-[RuCl₂(vpy)₄] on Nd-Fe-B magnets: electrochemical impedance spectroscopy interpretation, Raman spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and scanning electron microscopy analysis. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 8, n.4, p.244-251, 2004.

BASAGA, H.S. Biochemical aspects of free radicals. *Biochemical Cellular Biology*, v.68, p.989-998, 1990.

BASSET, J., et al. *Análise inorgânica quantitativa*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Dois, 1981. 690p.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.; FREEMAN, B. Apparent hydroxyl radical production by peroxyxynitrite implications for endotelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Science*, v.87, p.1620-1624, 1990.

BERTOTTI, M.; PLETCHER, D. Amperometric determination of nitrite via reaction with iodide using microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, v.337, p.49-55, 1997.

BEVILAQUIA, G.A.P. Avaliações físico-químicas durante a maturação de videiras cultivadas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociências*, v.1, n.3, p.151-153, 1995.

BIANCHI, L.; COLIVICCHI, M.A.; DELLA CORTE L.; VALOTI, M.; SGARAGLI, G.P.; BECHI, P. Measurement of synthetic phenolic antioxidants in human tissues by high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography B Biomedicine Science Applied*, v.694, n.2, p.359-365, 1997.

BISWAS, S.; CHOWDHURY, B.; RAY, B.C. A novel spectrofluorimetric method for the ultra trace analysis of nitrite and nitrate in aqueous medium and its application to air, water, soil and forensic samples. *Talanta*, v.64, n.2, p.308-312, 2004.

BOURN, N.B.; PRESCOTT, J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.42, n.1, p.1-34, 2002.

BORAWSKA, M.; MARKIEWICZ, R.; WITKOWSKA, A. Nitrate and nitrite content in daily hospital diets during the winter season – comparison of analytical and calculation methods. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.52, p.489-493, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. – Wiss. Technol.*, v.24, p.225-250, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento técnico para atribuição da função de aditivos, aditivos e seus

limites máximos de uso para a categoria 8 – carnes e produtos cárneos. Portaria 1.004 de 11 de dezembro de 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o Regulamento Técnico referente a Padrões de Identidade e Qualidade para água mineral e água natural. Resolução nº 310, de 16 de julho de 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Agropecuária. Instrução Normativa n.20, de 21 de julho de 1999. Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes. Publicada no Diário Oficial da União de 27 de julho de 1999, seção 1, página 10.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento Técnico para águas envasadas e gelo. Resolução nº 274, de 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Resolução nº 382, de 05 de agosto de 1999^a: Aprova o "Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo sua funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 13- molhos e condimentos".

BRASIL. Resolução nº 388, de 05 de agosto de: Aprova o "Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 19 - Sobremesas".

BRASIL. Resolução RDC nº 33, de 09 de março de 2001: Aprova o "Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a Categoria de Alimentos 12: Sopas e Caldos"

BRASIL. Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005: Aprova "Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares,

estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos vegetais e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas".

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v.56, p.317-333, 1998.

BRIESKORN, C.H.; MAHLMEISTER, K. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, v.171 p.348, 1980.

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.28, p.1236-1238, 1980.

BURATTI, S.; PELLEGRINI, N.; BRENNER, O. V.; MANNINO, S. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.5136-5141, 2001.

CAMPOS, L. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): Parâmetros de processo e modelagem matemática. Florianópolis, 2005. Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.

CAO, G.; VERDON, C.P.; WU, A.H.B.; WANG, H.; PRIOR, R.L. Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COABS FARA II. *Clinical Chemistry*, v.41, p.1738-1744, 1995.

CAPITÁN-VALLVEY, L.F.; VALENCIA, M.C.; NICOLAS, E.A. Solid-phase ultraviolet absorbance spectrophotometric multisensor for the simultaneous determination of butylated hydroxytoluene and co-existing antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, v.503, n.2, p.179-186, 2004.

CARMO JR., R.R. O que é hidroponia? Disponível em: <http://www.hidroponica.cjb.net>. Acesso em novembro 2002.

CARO, C.A.; BEDIQUI, F.; ZAGAL, J.H. Electroanalytic oxidation of nitrite on a vitreous carbon electrode modified with cobalt phthalocyanine. *Electrochimica Acta*, v.47, p.1489-1494, 2002.

CASELLA, I.G.; GATTA, M. Electrochemical reduction of NO₃ and NO₂ on a composite copper thallium electrode in alkaline solutions, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.568, p.183–188, 2004.

CHENG, Z.; REN, J. LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Phenolic antioxidants: electrochemical behavior and the mechanistic elements underlying their anodic oxidation reaction. *Redox Report*, v.7, n.6, p.395-402, 2002.

CHEVION, S.; BERRY, E.M.; KITROSSKY, N.; KOHEN, R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry, *Free Radical Biology & Medicine*, v.22, n.3, p.411- 421, 1997.

CIUCU, A.A.; NEGULESCU, C.; BALDWIN, R.P. Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferrophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosensors and Bioelectronics*, v.18, p.303-310, 2003.

CLAYSON, D.B.; IVERSON, F.; NERA, E.; LOK, E.; ROGERS, C.; RODRIGUES, C. Histopathological and radioautographical studies on the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole and related chemicals. *Food and chemical toxicology*, v.24, n.10-11, p.1171-1182, 1986.

CONNOLLY, D.; PAULL, B. Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion-interaction liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, v.441, p.53–62, 2001.

COX, J.A.; KULESZA, P.J. A selective electrolytic sensor for nitrite based on a modified platinum electrode. *Analytica Chimica Acta*, v.158, p.335-341, 1984.

CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; BEIRITH, A.; CKLESS, K.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M.M.S.; FRANCO, C.V.; WILHELM FILHO, D.; CALIXTO, J.B. Complexes *trans*-[RuCl₂(nic)₄] and *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] as free radical scavengers, *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.86, n.2-3, p.587-594, 2001.

CRUCES-BLANCO, C.; SEGURA CARRETERO, A.; MERINO BOYLE, E.; FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs. *Talanta*, v.50, n.5, p.1099-1108, 1999.

CUNHA, P.A.; FERREIRA, V.S.; FRANCO, C.V.; BANDEIRA, M.C.E. Determinação de íons nitrito em eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-{*trans*-[RuCl₂(vpy)₄]} / náfion. In: XV SIBEE- Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina. XV SIBEE, 2005. p. 483-485.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.56, p.324-325, 1992.

DARIAS-MARTÍN, J.J.; RODRIGUES, O.; DÍAZ, E.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in White wine. *Food Chemistry*, v.71, n.4, p.483-487, 2000.

DAS, D.K.; SATO, M.; RAY, P.S.; MAULIK, G.; ENGELMAN, R.M.; BERTELLI, A.A.; BERTELLI, A. Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants, *Drugs Exp Clinical Research*, v. 25, n.2-3, p.115-20, 1995.

DAVIS, J.; COMPTON, R.G. Sonoelectrochemically enhanced nitrite detection. *Analytica Chimica Acta*, v.404, p.241-247, 2000.

DICH, J.; JÄRVINEN, R.; KNEKT, P.; PENTTILÄ, P.L. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish mobile clinic health examination survey. *Food Additives and Contaminants*, v.13, n.13, p.541-552, 1996.

DIMA, G.E.; DE VOOYS, A.C.A.; KOPER, M.T.M. Electrocatalytic reduction of nitrate at low concentration on coinage and transition-metal electrodes in acid solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.554-555, p.15-23, 2003.

DIPLOCK, A.T. Antioxidants nutrients and diseases prevention: an overview. *American Journal Clinical and Nutrition.*, v.53, suppl.n.1, p.1895-1935, 1991.

DOHERTY, A. P.; STANLEY, M.A.; LEECH, D.; VOS, J.G. Oxidative detection of nitrite at an electrocatalytic [Ru(bpy)₂poly-(4-vinylpyridine)₁₀Cl] electrochemical sensor applied for the flow injection determination of nitrate using a Cu/Cd reductor column. *Analytica Chimica Acta*, v.319, p.111-120, 1996.

DOHERTY, A.P.; VOS, J.G. Electrocatalytic reduction of nitrite at an [Os(vpy)₂(PVP)₁₀Cl]Cl-modified electrode. *Journal of Chemistry Society Faraday Trans.*, v.88, p.2903-2907, 1992.

DUARTE, M.; MÍDIO, A.F. Nitratos e nitritos em alimentos. *Cadernos de Nutrição*, v.12, p.19-30, 1996.

DURAK, I.; AVCI, A.; KACMAZ, M.; BUYUKKOCAK, S.; CIMEN, M.Y.; ELGUN, S.; OZTURK, H. S. Comparison of antioxidant potentials of red wine, white wine, grape juice and alcohol. *Current Medical Research and Opinion*, v.15, n.4, p.316-20, 1999.

DZIEDZIC, B.; MAZANOWSKA-GAJDOWICZ, J.; WALCZEWSKA, A.; SARNIAK, A.; NOWAK, D. Comparison of cadmium and enzyme-catalyzed nitrate reduction for determination of NO₂ /NO₃ in breath condensate. *Clinica Chimica Acta*, v. 335, p.65–74, 2003.

ESTERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H.; ROTHENEDER, M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low-density lipoprotein. *Free Radical Research Communications*, v.6, p.67-75, 1989.

FARIA, J.A.F.; FELÍCIO, P.E.; NEVES, M.A.; ROMANO, M.A. Formação e estabilidade de produtos cárneos curados. *Revista Tecnologia de carnes*, v.3, n.1, p.1-9, 2001.

FAZIO, T. Food additives: direct. In P. Cunniff (Ed.), *Official methods of analysis of AOAC international* (16th ed.) 1998. (pp. 2-5). Gaithersburg: AOAC International.

FERNÁNDEZ-ARGÜLLES, M.T.; CANÑABATE, B.; COSTA-FERNÁNDEZ, J.M.; PEREIRO, R.; SANZ-MEDEL, A. Flow injection determination of nitrite by fluorescence quenching. *Talanta*, v.62, p.991-995, 2004.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1721, 174-184, 2005.

FLESCH, M.; SCHWARZ, A.; BÖHM, M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *American Journal of Physiology of Heart and Circ Physiol*, v.275, p.1183-1190, 1998.

FLETCHER, J.R.; LAW, S.J.; WALTERS, A.H. Effect of cooking on the nitrate levels in vegetable. *Nutrition and Health*, v.5, p.61-63, 1987.

FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.1035-1040, 1999.

FRIDOVICH, I. Biological effects of superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.127, n.1, p.1-11, 1986.

FUENTE, C. de la; BATANERO, P.S.; TASCÓN, M.L.; VÁSQUEZ, M.D.; ACUNÁ, J.A. Voltammetric determination of the phenolic antioxidants 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone at a polypyrrole electrode modified with a nickel phthalocyanine complex. *Talanta*, v.49, p.441-452, 1999.

GALEANO DIAZ, T.; GUIBERTEAU CABANILLAS, A.; ALEXANDRE FRANCO, M.F.; SALINAS, F.; VIRE, J.C. Voltammetric Behavior and Simultaneous Determination of the Antioxidants Propyl Gallate, Butylated Hydroxyanisole, and Butylated Hydroxytoluene in Acidic Acetonitrile-Water Medium Using PLS Calibration. *Electroanalysis*, v.10, n.7, p.497–505, 1998.

GAPPERA, L.W.; FONGA, B.Y.; OTTERA, D.E.; INDYKB, H.E.; WOOLLARD, D.C. Determination of nitrite and nitrate in dairy products by ion exchange LC with spectrophotometric detection. *International Dairy Journal*, v.14, p.881-887, 2004.

GAUTHARD, F.; EPRON, F.; BARBIER, J. Palladium and platinum-based catalysts in the catalytic reduction of nitrate in water: effect of copper, silver, or gold addition. *Journal of Catalysis*, v. 220, p.182–191, 2003.

GEHM, B.D.; McANDREWS, J.M.; CHIEN, P.; JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor, *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 94, p.14138-14143, 1997.

GENESTE, F.; MOINET, C. Electrocatalytic oxidation of alcohols by a $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{phen})(\text{OH}_2)]^{2+}$ -modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 594, n. 2, p.105-110, 2006.

GENT, M.P.N. Solution electrical conductivity and ratio of nitrate to other nutrients affect accumulation of nitrate in hydroponic lettuce. *Hortscience*, v.38, p.222-227, 2003.

GERMAN, J.B.; WALZEM, R.L. The health benefits of wine, *Annual Review of Nutrition*, v.20, p. 561-593, 2000.

GIADA, M. L. R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos, *Nutrire – Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Journal of Brazilian Society of Food and Nutrition*, v.28, n.1, p.91-107, 2004.

GIROTTI, A.W. Photodynamic peroxidation in biological system. *Photochemistry and Photobiology*, v.51, p.497-509, 1990.

GHISELLI, A. ; SERAFINI, M. ; MAIANI, G. ; AZZINI, E.; FERRO-LUZZI A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology & Medicine*, v.18, p.29-36, 1995.

GONZÁLEZ, A.; RUIZ, M.A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M.. Voltammetric determination of tert-butylhydroxyanisole in micellar and emulsified media. *Analytica Chimica Acta*, v.285, p.63-71, 1994.

GONZALEZ, M.; GALLEGRO, M.; VALCARCEL, M. Gás chromatographic flow method for the preconcentration and simultaneous determination of antioxidant and preservative additives in fatty foods. *Journal of Chromatography A*, v.848, p.529-536, 1999.

GORDON, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Products Reports*, p.265-272, 1996.

GOUTEFONGEA, R. La salazon. In: *Tecnología de la carne y los productos cárnicos*. GIRARD, J.P. (ed.). Editorial Acribia S.A., Zaragoza, 1991, 300p.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.55, p.539-546, 1978.

GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L.M.; FLETCHER, D.; ROBINSON, J., Instrumental Methods in Electrochemistry, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1985.

GROOT, M.T.; KOPER, M.T.M. The influence of nitrate concentration and acidity on the electrocatalytic reduction of nitrate on platinum. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.562, p.81–94, 2004.

GUADAGNIN, S.G. Avaliação do teor de nitrato em hortaliças folhosas produzidas por diferentes sistemas de cultivo. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas. 2004. 76p.

GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in diseases processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radicals Research Communications.*, v.19, n.3, p.114-158, 1993.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, v.52, n.8, p.2523-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J.M.C. *Free radical in medicine and biology*. London: Clarendon Press, 543p., 1989.

HAMERSCHIMIDT, I. Hidroponia ao alcance de todos. EMATER-PR. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (apostila p/ curso técnico), Curitiba, 1997, 27p.

HEREDIA MIRA, F.J.; GUZMAN CHOZAS, M. Compuestos fenólicos em vinos tintos (I) Caraterísticas y propiedades, Alimentacion equipos y tecnologia., 1993.

HOGAN, C.F.; FORSTER, R.J. Mediated electron transfer for electroanalysis: transport and kinetics in tin films of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PVP}_{10}](\text{ClO}_4)_2$. *Analytica Chimica Acta*, v.396, p.13-21, 1999.

HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V. M.; WILSON, M.T.; MONCADA, S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *The Biochemical Journal*, London, v.281, p.419-424, 1992.

HOTCHKISS, J.H.; HELSER, M.A.; MARAGOS, C.M.; WENG, Y.M. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds, Food Safety and Biological Implications. ASC Symposium Series, Washington, DC, American Chemical Society, 1992.

ICENHOUR, T.P.; VAN DOLAH, F.M. A rapid method for analysis of tert-butyl hydroquinone (TBHQ) in ethyl esters of fish oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.68, p.659-661, 1991.

IGNATOVIC, L.M.; DIMITRIC MARROVIC, J.M.; MARROVIC, D.A.; BARANAC, J.M. The spectroabsorptiometric and voltammetric behavior of malvina in buffered solutions and its antioxidant properties, *Journal Serb. Chem. Soc.*, v.67, n.1, p.53-60, 2002.

IMEH, U.; KHOKHAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.6301-6306, 2002.

IVASKA, A.; LEWENSTAM, A.; SARA, R. Contemporary Electroanalytical Chemistry, Plenum Press, New York, 1988.

JACOBSEN, C.; SCHWARZ, K.; STÖCKMANN, H.; MEYER, A.S.; ADLER-NISSEN, J. Partitioning of Selected Antioxidants in Mayonnaise. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.3601-3610, 1999.

JU, H.; IKEDA, O.; LEI, J. Catalytic oxidation of nitric oxide and nitrite mediated by water-soluble high-valent iron porphyrins at an ITO electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.567, p.331–338, 2004.

KAGE, S.; KUDO, K.; IKEDA, N. Determination of nitrate in blood by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Biomedical Science Applied*, v.742, n.2, p.363-368, 2000.

KÄHKÖNEN M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p. 3954-3962, 1999.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Characterization and quantification of polyphenolics from grape pomace by HPLC-DAD-MS/MS. In: Total Food Proceedings. Ed. Keith Waldrom, Craig Faulds, Andrew Smith. Total Food Exploiting co-products-minimizing waste, p.80-85, 2004.

KANNER, J.; FRANKEL, E.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E. Natural antioxidants in grape and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, p.64-69, 1994.

KAPINUS, E.N.; REVELSKY, I.A.; ULOGOV, V.O.; LYALIKOV, Y.A. Simultaneous determination of fluoride, chloride, nitrite, bromide, nitrate, phosphate and sulfate in aqueous solutions at 10.9 to 10.8% level by ion chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.800, p.321–323, 2004.

KAROVICOVA, J.; SIMKO, P. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.882, n.1-2, p.271-81, 2000.

KAWASHIMAA, H.; INAGEA, H.; OGIHARAA, M.; KASHIWAGIA, Y.; TAKEKUMAA, K.; HOSHIKAA, A.; MORIB, T.; WATANABE, Y. Serum and cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in patients with rotavirus gastroenteritis induced convulsion, *Life Sciences*, v. 74, p.1397–1405, 2004.

KAZEMZADEHA, A.; ENSAFI, A.A. Sequential flow injection spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in various samples. *Analytica Chimica Acta*, v.442, p.319–326, 2001.

KHATOUNIAN, C.A. A reconstrução ecológica da agricultura. Botucatu: Agroecológica, 2001, 348p.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science.*, v.58, p.1407-1410, 1993.

KINSELLA, J. E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology.*, v.47, n.4, p.85-89, 1993.

KOHEN, R.; BEIT-YANNAI, E.; BERRY, E.M.; TIROSH, O. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Methods in Enzymology.*, v.300, p.285-296, 1999.

KOMAITIS, M.E.; KAPEL, M. Spectrophotometric determination of BHA in edible fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.62, p.1371-1372, 1985.

LAITINEN, S.; VIRTANEN, S.M.; RÄSÄNEN, L.; PENTTILÄ, P.L. Calculated dietary intakes of nitrate and nitrite by young finns. Finland. *Food Additives and Contaminants*, v.10, n.4, p.469-477, 1993.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, v.27, n.4, p.969-978, 1988.

LEVALLOIS, P.; PHANEUF, D. Contamination of drinking water by nitrates: analysis of health risks. *Canadian Journal of Public Health*, v.85, n.3, p.192-196, 1994.

LEWIS, C.R.C. *Nitrates in Groundwater*, New York, 1997; pp 15-17.

LIU, P.; HU, J. Nitrite reduction in acidic solution at a GC/Eastman-AQ-Os(bpy)₃⁺²-PVP composite modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 566, p. 423–432, 2004.

LOFRANO, R.C.Z.; MADURRO, J.M.; ABRANTES, L.M.; ROMERO, J.R. Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly-[allyl ether *p*-(2-aminoethyl) phenol] co-polymerized with allyl phenyl ether. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 218, p.73–79, 2004.

LOFRANO, R.C.Z.; QUEIROZ, J.V.; ROMERO, J.R. Preparation and properties of an electrode with platinum microcrystals dispersed in films of poly(allyl ether *p*-benzeneammonium derivatives) Electrocatalytic hydrogenation of organic substrates. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.174, p.231–238, 2001.

LUA, C.; LIN, J.; HUIE, C.W.; YAMADAC, M. Chemiluminescence study of carbonate and peroxyxynitrous acid and its application to the direct determination of nitrite based on solid surface enhancement. *Analytica Chimica Acta*, v. 510, p.29–34, 2004.

MADHAVI, D.L.; DESPANDE, S.S; SALUNKHE, D.K. Toxicological aspects of food antioxidants, In :Food antioxidants, 1996. (pp. 267-311). New York: Marcel Dekker.

MAFF. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Nitrate, Nitrite and *n*-Nitroso Compounds in Food. Food Surveillance Paper n.20. London: H.H. Stationery Office, 1987.

MARCO, G.I. Rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemistry Society*, v.45, p.1407-1410, 1968.

MASCIO, P.Di.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.53, n.1, suppl, p. 94S-200S, 1991.

MASKUS, M.; PARIENTE, Q.; TOFFANIN, A.; SHAPLEIGH, J.P.; ABRUÑA, H.D. Electrocatalytic reduction of nitric oxide at electrodes modified with electropolymerized films of $[\text{Cr}(\text{v-tpy})_2]^{3+}$ and their application to cellular NO determinations. *Analytical Chemistry*, v.68, p.3128-3134, 1996.

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, v.28, p.71-118, 1976.

McCALL, D.; WILLUMSEN, J. Effects of nitrate, ammonium and chloride application on the yield and nitrate content of soil-grown lettuce. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v.73, n.5, p.698-703, 1998.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, v.244, p.6059-6055, 1969.

MELO FILHO, A.B.; BISCONTINI, T.M.B.; ANDRADE, S.A.C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, n.3, 2004.

MIKUSKA, P.; VECERA, Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water by chemiluminescent flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 495, p.225-232, 2003.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILLER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, v.84, p.407-412, 1993.

MIYAZAWA, M.; KHATOUNIAN, C.A.; ODENATH-PENHA, L.A. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. *Revista Agroecologia Hoje*, p.23, 2001.

MOORCROFT, M.J.; DAVIS, J.; COMPTON, R.G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta*, v.54, p.785-803, 2001.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistema aquoso e lipídico. *Nutrire – Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: Journal of Brazilian Society of Food and Nutrition*, v. 25, p.31-46, 2003.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. Editora Varela, 1998, 150 páginas.

MOURATO, A.; VIANA, A.S.; CORREIA, J.P.; SIEGENTHALER, H.; ABRANTES, L.M. Polyaniline films containing electrolessly precipitated palladium. *Electrochimica Acta*, v.49, p.2249–2257, 2004.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.8, p.3408-3412, 2000.

NALINI, B., NARAYANAN, S.S. Amperometric determination of ascorbic acid based on electrocatalytic oxidation using a ruthenium (III) diphenyldithiocarbamate-modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*, v.405, p.93-97, 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. CRC – *Criticals Reviews in Food Science and Nutrition*, v.29, p.273-300, 1990.

NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S. Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated chemometric approaches. *Analytica Chimica Acta*, v.412, p.185-193, 2000.

NIELSEN, S.S. *Introduction to the chemical analysis of foods*. London: Jones and Bartlett Publishers, 1994, 530p.

NIKONOROV, V.V.; MOSKVIN, L.N. Spectrophotometric determination of nitrite with 4-iodo-N,N-dimethylaniline. *Analytica Chimica Acta*, v.306, p.357-360, 1995.

NISHIDA, T.; MATSUKAWA, R.; MASAKI, K.; DUBINSKY, Z.; KARUBE, I. A method for screening potential antioxidant activity. *Journal of Biotechnology*, v.51, p.149-155, 1996.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Analytical Biochemistry*, v.220, p.403-409, 1994.

OHSE, S.; DORADO-NETO, D.; MARODIN, V.S.; MANFRON, P.A.; DUARTE, E.C. Composição centesimal, teor de vitamina C e nitrato em seis cultivares de alface produzidas em quatro soluções hidropônicas. *Insula*, n.31, p.59-79, 2002.

O.M.S. Organización Mundial de la Salud. Série de Informes Técnicos 884. Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Ginebra. 1999.

O'SHEA, T.J.; LEECH, D.; SMYTH, M.R.; VOS, J.G. Determination of nitrite based on mediated oxidation at a carbon paste electrode modified with a ruthenium polymer. *Talanta*, v.39, n.4, p.443-447, 1992.

PAULA, M.; MORAES JR., V.N.; MOCELLIN, F.; FRANCO, C.V. Electroreductive deposition of a polymer coating having Ru (II) redox centers on Pt, Pd, and sintered Fe-(5-10)%Ni electrodes. *Journal of Materials Chemistry*, v. 8, n. 9, p.2049-2054, 1998.

PAULA, M.M.S. Preparação e caracterização físico-química de eletrodos inertes e sinterizados, modificados por polímeros redox, empregando técnicas eletroquímicas. 1999. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia de Materiais.

PAULA, M.M.S.; PICH, C.T.; PETRONILHO, F.; DREI, L.B.; RUDINICKI, M.; OLIVEIRA, M.R.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, J.A.P.; FRANCO, C.V.; PIZZOL, F.D. Antioxidant activity of new ruthenium compounds. *Redox Report*, v.10, n.3, p.139-143, 2005.

PAIXÃO, T.R.L.C.; BERTOTTI, M. Electrocatalytic oxidation of deoxyguanosine on a glassy carbon electrode modified with a ruthenium oxide hexacyanoferrate film. *Electrochimica Acta*, *In Press, Corrected Proof*, Available online 20 September 2006.

PASCAL, G. Aditivos antioxidantes. In: Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. MULTON, J.L. (Ed.). Editorial Acribia S.A.. Espanha, 1988.

PEI, J.; LI, X. Electrochemical study and flow-injection amperometric detection of trace NO₂ at CuPtCl₆ chemically modified electrode. *Talanta*, v.51, p.1107–1115, 2000.

PERRIN, C.; MEYER, L. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. *Food Chemistry*, v. 77, n.1, 93-100, 2002.

PETERSEN, A.; STOLTZE, S. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. *Food Additives of Contaminants*, v.16, p.291-299, 1999.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1035-1042, 2000.

PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver patês. *Food Chemistry*, v.68, p.353-357, 2000.

PINTO, P.C.A.G.; LIMA, J. L.F.C.; SARAIVA, M. L.M.F.S. Sequential injection analysis of nitrites and nitrates in human serum using nitrate reductase. *Clinica Chimica Acta*, v. 337, p.69–76, 2003.

PLAMBECK, J.A., *Electroanalytical Chemistry: Basic Principles and Applications*, John Willey & Sons, New York, 1982.

PLUMB, G.W.; LAMBERT, N.; CHAMBERS, S.J.; WANIGATUNGA, S.; HEANEY, R,K.; PLUMB, J.A.; ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; MILLER, N.J.; WILLIAMSON, G. Are extracts of purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidant? *Free Radical Research*, v.25, p.75-86, 1996.

PRÄNDL, O.; FISHER, A.; SCHMIDHOFER, T.; SINELL, H. *Tecnología e Higiene de la carne*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, Spain, 1994, 854p.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

PRYOR, W. Free radicals and lipid peroxidation: what they are how they got that way. In: FREI, B. (Ed.) *Natural antioxidants in human health and disease*. San Francisco: Academic Press, p.1-19, 1994.

POURNAGHI-AZAR, M.H.; DASTANGO, H. Electrocatalytic oxidation of nitrite at an aluminum electrode modified by a chemically deposited palladium

pentacyanonitrosylferrate film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.567, p.211–218, 2004.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J.B.; The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, v.22, p.375-383, 1995.

RICE-EVANS, D.; HOCHSTEIN, P. Alterations in erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine-induced peroxidation of lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.100, p.1537-1542, 1981.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*, v.234, p.279-293, 1994.

RIFKIN, S.C.; EVANS, D.H. Analytical evaluation of differential pulse voltammetry at stationary electrodes using computer-based instrumentation. *Analytical Chemistry*, v.48, n.14, p.2174-2179, 1996.

RILEY, T.; WATSON, A. *Polarographic and other Voltammetric Methods*", John Willey & Sons, 1987, London.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, v.37, p.837-841, 1988.

ROCHA, J.R.C. Estudos eletroquímicos envolvendo eletrodos modificados por metaloporfirinas e aplicação na determinação de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-). 2001. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROCHA, J.R.C.; AGNES, L.; BERTOTTI, M.; ARAKI, K.; TOMA, H.E. Amperometric detection of nitrite and nitrate at tetraruthenated porphyrin-modified electrodes in a continuous-flow assembly. *Analytica Chimica Acta*, v.452, p.23-28, 2002.

RODRIGUES 1996

RODRIGUES, S.H.S.M. Microencapsulação de nitrito de sódio para uso em mortadela. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos – Área Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo.

RUCH, R.J.; CHENG, S.J.; KLAUNING, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. *Carcinogenesis*, v.10, p.1003-1008, 1989.

RUHLMANN, L.; GENET, G. Wells–Dawson-derived tetrameric complexes $\{K_{28}H_8[P_2W_{15}Ti_3O_{60}:5]_4\}$ electrochemical behaviour and electrocatalytic reduction of nitrite and of nitric oxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 568, p.315–321, 2004.

RIBER, J.; FUENTE, de la C.; VAZQUEZ, M.D.; TASCÓN, M.L.; SÁNCHEZ BATANERO, P. Electrochemical study of antioxidants at a polypyrrole electrode modified by a nickel phthalocyanine complex. Application to their HPLC separation and to their FIA system detections. *Talanta*, v.52, n.21, p.241-252, 2000.

RUIZ, M.A.; CALVO, M.P.; PINGARRON, J.M. Catalytic-voltammetric determination of the antioxidant tert-butylhydroxyanisole (BHA) at a nickel phthalocyanine modified carbon paste electrode, *Talanta*, v.41, n.2, p.289-2994, 1994.

RUIZ, M.A.; YÁNEZ-SEDEÑO, P.; PINGÁRRON, P. Voltammetric determination of the antioxidant tert-butylhydroxytoluene (BHT) at a carbon paste electrode modified with nickel phthalocyanine, *Eletroanalysis*, v.6, n.5-6, p. 475-479, 1994.

SAFFRON, L. 1997. Agriculture, food and câncer risk. Disponível em: <http://www.uwe.ac.uk/fas/uae/cancer1.pdf>. Acesso em 15 abril 2003.

SAMUELS, G.J.; MEYER, T.J. An electrode-supported oxidation catalyst based on ruthenium (IV). pH "encapsulation" in a polymer film. *Journal of American Chemistry Society*, v.103, p.307-312, 1981.

SPBH Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards (SPBH) on a request from the Commission related to the effects of Nitrite/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. *The EFSA Journal*, v.14, p.1-34, 2003.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science and Food Agricultural*, v.76, 270-276, 1998.

SANCHEZ-MORENO, C. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape puree and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, v.32, p.407-12, 1999.

SAHASRABUDHE, M.R. Food additives: application of thin layer chromatography to the quantitative estimation of antioxidants BHA, BHT, PG and NDGA. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.47, p.888-893, 1964.

SANCHEZ-MORENO, C. Antioxidative activity of selected Spanish wines in corn oil emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.5581-5587, 2000.

SAPTZ, L. Introdução. In: SPATZ, L., BLOOM, A.D. (Eds) *Biological consequences of oxidative stress: implications for cardiovascular disease and carcinogenesis*. Oxford University Press, New York, 1992.

SATO, Y.; KAWAMURA, T. Antioxidants in foods II: colorimetric determination of dibutylhydroxytoluene and butylhydroxyanisole. *Journal of the Food Hygiene Society of Japan*, v.13, p.53-56, 1972.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil, Determination of resveratrol in grape juice produced in Brazil, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.3, 2005.

SAURA-CALIXTO. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.4303-4306, 1998.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung/Food*, v.44, n.3, p.158-163, 2000.

SHANKARAN, D.R.; NARAYANAN, S.S. Chemically modified sensor for amperometric determination of sulphur dioxide. *Sensors and Actuators B*, v.55, p.191–194, 1999.

SHERWIN, E.R. Antioxidants for food fats and oils. *Journal of the American oil chemists'society*, v.49, p.468-472, 1972.

SHIBATA, M.; FURUYA, N. Simultaneous reduction of carbon dioxide and nitrate ions at gas diffusion electrodes with various metallophthalocyanine catalysts. *Electrochimica Acta*, v. 48, p.3953-3958, 2003.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L.F. *Introducción a la toxicología de los alimentos*. Editorila Acribia S.A. Zaragoza, Espanha, 1996.

SHRIKHANDE, A.J. Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 2000; v.33:469-74.

SILVA, S.; MATIAS, A.A.; NUNES, A.; DUARTE C.; COELHO, A.V.; BRONZE, M.R. BRONZE. Identificação de glicosídeos de flavonóis em subprodutos da vinificação por HPLC com diferentes detectores e hifenado com espectrometria de massa, *Ciência Téc. Vitiv.* v.20, n.1, Dois Portos, 2005.

SIMONETTI, P.; PIETTA, P.; TESTOLIN, G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, 1152-1155, 1997.

SILVA, S.Da; COSNIER, S.;ALMEIDA, M.G.; MOURA, J.J.G. An efficient poly(pyrrole–viologen)-nitrite reductase biosensor for the mediated detection of nitrite. *Electrochemistry Communications*, v.6, p.404–408, 2004.

SKLÁDAL, P.; MOROZOVA, N.O.; RESHETILOV, A.N. Amperometric biosensors for detection of phenol using chemically modified electrodes containing immobilized bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, v.17, p.867-873, 2002.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. Principles of Instrumental Analysis, 4th ed., Saunders College Publishing, 1992, Philadelphia.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDENBERG, D.M. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v.11, n.5, p.287-313, 1997.

SOUTO, A.; CARNEIRO, M.C.; SEFERIN, M.; SENNA, M.J.H.; CONZ, A.; GOBBI, R. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *Journal of Food composition and analysis*, v.14, p.441-445, 2001.

SREEKUMAR, N.V.; NARAYANA, B.; HEGDE, P.; MANJUNATHA, B.R.; SAROJINI, B.K. Determination of nitrite by simple diazotization method. *Microchemical Journal*, v.74, p.27-32, 2003.

STERTZ, S.C. Qualidade de hortícolas convencionais, orgânicas e hidropônicas produzidas e/ou comercializadas na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2004. 321p.

STETER, J.R.; PONTÓLIO, J.O.S.; COSTA, M.I.C.F.; ROMERO, J.R. A new polyphenol modified electrode containing an anchored ruthenium complex and its use in electrocatalytic oxidation of organic substrates. *Polyhedron, In Press, Accepted Manuscript, Available online 28 September 2006.*

STODDARD, E.E. Flame ionization gas-liquid chromatographic determination of antioxidants in vegetable oil. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.55, p.1081-1084, 1972.

SUN, W.; ZHANG, S.; LIN, X.; JIN, L.; JIN, S.; DENG, J.; KONG, J. Electrocatalytic reduction of nitrite at a carbon fiber microelectrode chemically modified by palladium(II)-substituted Dawson type heptadecatungstodiphosphate. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.469, p.63-71, 1999^a.

SUN, W.; ZHANG, S.; LIU, H.; JIN, L.; KONG, J. Electrocatalytic reduction of nitrite at a glassy carbon electrode surface modified with palladium(II)-substituted Keggin type heteropolytungstate. *Analytica Chimica Acta*, v.388, p.103-110, 1999^b.

TANTAVICHET, N.; PRITZKER, M.D.; BURNS, C.M. Electropolymerized poly(2-vinylpyridine) coatings as ion-exchange polymer modified electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry*, v.31, p.281-291, 2001.

TIAN, Y.; WANG, J.; WANG, Z.; WANG, S. Electroreduction of nitrite at an electrode modified with polypyrrole nanowires. *Synthetic Metals*, v.143, p.309–313, 2004.

TSIKAS, D.; BÖGER, R.H.; BODE-BÖGER, S.M.; GUTZKI, F.M.; FRÖLICH, J.C. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their ¹⁵N-labelled analogs. *Journal of Chromatography B Biomedical Applied*, v.661, n.2, p.185–191, 1994.

USHER, C.D.; TELLING, G.M. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.26, p.1793-1805, 1975.

VALENTINE, J.S.; MIKSZTAL, A.R.; SAWYER, D.T. Methods for study of peroxide chemistry in non aqueous solutions. *Methods in Enzymology*, New York, v.105, p.71-81, 1984.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Meat and meat products. Technology, chemistry and microbiology. Chapman & Hall, 1995, 430p.

VOGEL. Análise Inorgânica Quantitativa, 4a. Ed. Editora Guanabara Dois S.A., 1981, Rio de Janeiro.

VEGA, M.; BONTOUX, L. Los nitratos em los alimentos: una cuestión de sanidad alimentaria. Institute for Prospective Technological Studies Reports, v.19, 1997. Disponível em: <http://www.jrc.es/home/report/> Acesso em: abril de 2004.

WAGNER, C.D.; CLEVER, H.L.; PETER, E.D. Evaluation of the ferrous thiocyanate colorimetric method. *Analytical Chemistry*, v.19, p.980-982, 1947.

WALKER, R. Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.26, p.1735-1742, 1975.

WANG, J., Stripping Analysis - Principles, Instrumentation and Applications, VCH Publishers, Deerfield Beach, 1985.

WANG, D.; FREIHA, B.H. Preconcentration and differential pulse voltammetry of butylated hydroxyanisole at a carbon paste electrode, *Analytica Chimica Acta*, v.154, p.87-94, 1983.

WANG, W.; GOODMAN, M.T. Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation ex vivo model: interaction of protein binding activity. *Nutrition Research*, v.19, p.191-202, 1999.

WEN, Z.; KANG, T. Determination of nitrite using sensors based on nickel phthalocyanine polymer modified electrodes. *Talanta*, v.62, p.351–355, 2004.

WHO. World Health Organization. Food Additives Series No 50. Safety Evaluation of Certain Food Additives. Fifty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 2003.

WINNISCHOFER, H.; LIMA, S.S.; ARAKI, K.; TOMA, H.E. Electrocatalytic activity of a new nanostructured polymeric tetra-ruthenated porphyrin film for nitrite detection. *Analytica Chimica Acta*, v.480, p.97-107, 2003.

XI, X.; DONG, S. Electrochemical reduction of nitrite using Dawson-type tungstodisphosphate anions in aqueous solutions adsorbed on a glassy carbon electrode and doped in polypyrrole film. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.114, p.257-265, 1996.

XU, C.; WU, G.; LIU, Z.; WU, D.; MEEK, T.T.; HAN, Q. Preparation of copper nanoparticles on carbon nanotubes by electroless plating method. *Materials Research Bulletin*, v.39, n.10, p.1499-1505, 2004.

YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KAMIYA, Y. Oxidation of lipids. I. Quantitative determination of the oxidation of methyl linoleate and methyl linolenate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v.55, p.1548-1550, 1982.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J.M.; PÓLO DÍEZ, L.M. Determination of tert-butylhydroxyanisole and tert-butylhydroxytoluene by flow injection with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*, v.252, p.153-159, 1991.

YANG, B.; KOTANI, A.; ARAI, K.; KUSU, F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *Analytical Sciences*, v.17, p.599-604, 2001.

YANG, B.; ARAI, K.; KUSU, F. Electrochemical behavior of quercetin and kaempferol in neutral buffer solution, *Analytical Sciences*, v.17, p.987-989, 2001.

YANG, M.; LIN, H.; CHOONG, Y. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Research International*, v.35, p.627-633, 2002.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.27-32, 1995.

YUE et al 2004.

YORDANOV, N.D.; NOVAKOVA, E.; LUBENOVA, S. Consecutive estimation of nitrate and nitrite ions in vegetables and fruits by electron paramagnetic resonance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.437, p.131-138, 2001.

YUE, X.; ZHANG, Z.; YAN, H. Flow injection catalytic spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate, *Talanta*, v.62, p.97-101, 2004.

ZBIKOWSKI, Z.; ZBIKOWSKA, A.; BARANOWSKA, M. Content of nitrates and nitrites in raw milk different regions of the country. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, v.51, n.1, p.19-35, 2000.

ZHAO, Y.; ZHANG, W.; LUO, Q.; LI, S.F.W. The oxidation and reduction behavior of nitrite at carbon nanotube powder microelectrodes. *Microchemical Journal*, v. 75, p.189-198, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nitritos e nitratos são relevantes não apenas sob o aspecto nutricional mas também em relação ao meio ambiente. Todo e qualquer estudo visando a proteção da saúde humana e do meio ambiente, devido a toxicidade de nitritos e nitratos são relevantes.

A crescente busca por métodos rápidos, seguros e mais rápidos envolve estudos de base, aplicação prática e validação de metodologias. Estudos envolvendo a validação de metodologia são complexos e exigem tempo, além do envolvimento de vários grupos de pesquisa, sem mencionar das entidades responsáveis pela fiscalização das práticas laboratoriais.

As técnicas eletroquímicas de análise têm sido muito pouco exploradas como métodos analíticos de rotina, diante de toda sua potencialidade e perspectivas. Essas técnicas apresentam baixo custo quando comparadas as técnicas espectrofotométricas (normalmente utilizadas), entretanto embora sejam análises de grande simplicidade exigem um maior nível de conhecimento do analista. Equipamentos de eletroquímica, a exemplo de potenciostatos, exigem usuários especializados, pois são extremamente sensíveis e estão sujeitos a diferentes tipos de interferências externas.

Os hábitos de consumo, de modo geral, têm se alterado em todo o mundo. Aspectos antes pouco valorizados, como segurança, higiene, qualidade e confiabilidade, especialmente no setor de alimentos, são cada vez mais importantes na decisão de compra. Existe a busca por alimentos orgânicos que podem ou não trazer benefícios, dependendo do ponto de vista. A percepção de que produtos orgânicos são mais saudáveis que seus similares convencionais está presente na maioria dos consumidores desses produtos, entretanto alguns países já proibiram propagandas que enfatizam essa característica, devido à falta de comprovação científica. Algumas informações registradas neste estudo apontam a presença de nitritos também em vegetais orgânicos. Portanto, as investigações devem ser realizadas por diferentes grupos de pesquisa para que o maior número de informações possa ser adquirida e revertida em benefício coletivo.

Os conteúdos de íons nitrato e nitrito em alimentos são de significativa importância para a saúde humana. O nitrato encontra-se naturalmente presente nos vegetais, visto que a planta o absorve como fonte de nitrogênio para seu crescimento, sendo que o seu teor pode ser influenciado tanto por fatores relacionados com a planta como ao meio ambiente. No caso desse último, o avanço industrial seguido pelo enorme volume de resíduos poluentes atirados na atmosfera, fará com que altos teores de nitratos, estejam cada vez mais presente no solo, e conseqüentemente nos vegetais e mais a frente no leite. Estima-se que mais de 80,0% do nitrato ingerido pelo homem são fornecidos pelos vegetais. O nitrito fundamentalmente é empregado como aditivo alimentar em carnes curadas, mas pode se originar da redução do nitrato durante armazenamento de vegetais. Os efeitos tóxicos mais relevantes decorrentes da ingestão de nitrato/nitritos são a metaemoglobinemia e a formação in vivo de N-nitrosaminas, de efeito cancerígeno.

Aditivos, a exemplo dos antioxidantes sintéticos, são muito utilizados na indústria de alimentos moderna. Eles desempenham inúmeras funções como conservantes, antioxidantes, flavorizantes, emulsificantes, estabilizantes etc. Se utilizados de maneira inadequada podem trazer grande prejuízo a saúde humana. E essa tão perseguida saúde leva a busca dos alimentos nutracêuticos, dos antioxidantes naturais. Encontram-se vários estudos com

diferentes metodologias e pode-se perceber que ainda não existem metodologias validadas para estudos de atividade antioxidante. Não existem métodos padrões reconhecidos e isso acarreta resultados muito distintos e até mesmo pouco confiáveis. Portanto, existe a necessidade da padronização e validação das metodologias que realmente forem sensíveis e confiáveis. Os estudos sobre metodologias serão sempre bem vindos para o aperfeiçoamento da ciência e para o estado da arte.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com relação ao capítulo 1, a continuidade do processo investigatório em relação aos parâmetros envolvidos na detecção de íons nitrito usando eletrodo de carbono vítreo modificado com poli-{trans[RuCl₂(vpy)₄]} se faz necessária visto que apesar dos esforços, este estudo constitui ainda apenas uma base que sugere um potencial do método.

Avaliações sobre perda de sensibilidade ao longo do tempo do eletrodo modificado, a copolimerização e a elaboração de bicamada, processos de eletroless e dopagem podem oferecer maior sensibilidade de durabilidade ao eletrodo modificado.

Testes envolvendo outras amostras de alimentos de diferentes categorias: animais, vegetais, gordurosos, pratos prontos etc. também devem ser efetuados.

Com relação ao capítulo 2, a avaliação do teor dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT e TBHQ pode ser efetuada em amostras de maionese usando-se o método oficial da AOAC (1997) e posteriormente compará-los aos resultados obtidos usando-se a técnica voltamétrica no sistema proposto. Este tipo de estudo conduz a uma possível validação de metodologia e pode ter como produtos finais resultados para incertezas de medições de ambas as técnicas

Em relação aos resultados obtidos no capítulo 3, o potencial antioxidante de extratos contendo diferentes polaridades (solventes) e obtidos a partir de diferentes amostras, que conseqüentemente podem conter distintos compostos com atividade antioxidante, como clorofilas e carotenóides, são trabalhos científicos válidos. Embora existam estudos dessa natureza disponíveis em literatura, é sempre possível e aconselhável a busca por métodos de análise que ofereçam maior rapidez, maior sensibilidade e menor custo de análise.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À TESE

Projetos aprovados: 2

Síntese e caracterização de complexos polifuncionais de rutênio: I - Detecção de nitritos em alimentos processados II - Testes biológicos visando aplicação em farmacologia

Marcos Marques da Silva Paula - Coordenador.
Finaciador(es): Universidade do Extremo Sul Catarinense - Auxílio financeiro.

Preparação de Eletrodos Bicamada Empregando Filmes de poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]} / Pvpv para Detecção de Nitritos/Nitratos

Marcos Marques da Silva Paula - Coordenador.
Finaciador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Universidade do Extremo Sul Catarinense - Auxílio financeiro.

Resumos em Simpósios: 1

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE HIDROXIBUTILANISOL (BHA) EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO -Melissa dos Santos Raymundo; Marcos Marques da Silva Paula; César Vitório Franco; Roseane Fett¹

Simpocal 2005

Artigos científicos publicados: 1

Quantitative determination of the phenolic antioxidants using voltammetric techniques • ARTICLE

In Press, Corrected Proof, Available online 23 August 2006 – LWT Technology
Melissa dos Santos Raymundo, Marcos Marques da Silva Paula, César Franco and Roseane Fett

Artigos científicos submetidos à publicação: 2

Voltammetric determination of nitrite using modified electrode with poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}

Antioxidant behaviour of different by-product of white wine production *in vitro* and *in vivo*

Palestras: 1

Sensores contendo complexos de rutênio para aplicação na indústria de alimentos

I Workshop do grupo interdisciplinar em materiais: “Complexos polifuncionais de rutênio: perspectivas para aplicação em eletrodos modificados em farmacologia”

26 e 27 de setembro de 2005 – Auditório Rui Hülse – UNESC – Criciúma/SC