

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO
SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PESQUISA**

**ESTUDO DA REDUÇÃO ELETROQUÍMICA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO
EM MEIO MICELAR E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS
PARA SUA DETERMINAÇÃO ATRAVÉS DE TÉCNICAS
VOLTAMÉTRICAS**

Tatiane Alfonso de Araújo

Dissertação apresentada no Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química (área Físico-Química).

Orientador: Prof. Dr. Valdir Souza Ferreira

CAMPO GRANDE-MS
2006

Dedico especialmente esse trabalho aos meus pais

Norma e Ronaldo,

*que me propiciaram chegar até onde cheguei,
graças ao sua árdua luta, ao seu amor e carinho!*

*Aos meus irmãos Thayane e Thiago por toda
compreensão e carinho!*

Agradecimentos

- Ao Professor Doutor Valdir Souza Ferreira pela orientação, paciência e incentivo na realização deste trabalho!
 - Ao “Café Cacique” que cedeu gentilmente amostras para realização desta pesquisa.
 - Ao Professor Doutor Almir pelo reagente gentilmente cedido.
 - À UFMS, em especial aos professores do DQI pela minha formação.
 - Aos professores Silvio, Gilberto e Onofre pela companhia de laboratório, e pelas discussões e sugestões nos mais diversos campos da química e da vida.
 - À Professora Merlin por ter sido uma grande incentivadora e motivadora deste trabalho, assim como uma grande amiga que encontrei nesses dois últimos anos para as horas agradáveis e para as difíceis.
 - Ao Juliano, meu parceiro diário de equipamento, bancada, e orientador; obrigada por toda a ajuda nesta pesquisa.
 - À Patrícia e as Simone, amigas sempre prontas a ajudar e a ouvir, mesmo nas horas em que estive insuportável.
 - À Michele e ao João, os quais sempre me ajudaram em meu trabalho, e os quais tentei auxiliar em suas pesquisas, sempre que possível.
 - Ao Hebert por ter sido uma grande colaborador e amigo de todas as horas.
 - À Bruna, Sebastian, Edgar, Patrícia Alessandra, Diego, Márcio, Dante, Jorge, Emérsen pela convivência diária.
 - A todos meus companheiros de graduação que estiveram presentes no mestrado (Aline, Mariza, Fernanda), e mesmo aqueles que nunca mais os vi (Fabiano, André), obrigada pelos quatro anos de convivência integral, esses anos estarão sempre guardados em minhas doces memórias.
 - Aos meus amigos Luciano e Kelen, que mesmo longe, sempre me apoiaram nessa trajetória.
 - Ao Paulo Vitor (PV), pela agradável convivência e pela continuidade dessa pesquisa, e a todos aqueles que um dia seguirem esse trabalho.
 - Aos meus amigos, Magno e João Batista pelo respeito, amizade e pelos artigos científicos cedidos.
-

-
- Ao Marcão pelo seu exemplo de força, vontade e entusiasmo!
 - Especialmente a minha família (Papai, Mamãe, Thay e Thi), que é o alicerce desse trabalho, obrigada pela minha formação, pelo companheirismo, ajuda, carinho e amor a mim dedicados.
 - Ao Junior, que surgiu em minha vida no meio desta caminhada, e se tornou um grande parceiros de todas as horas, sempre pronto a ajudar e amenizar os momentos mais difíceis ao meu lado com seu amor, e por todo o material cedido para concretização dessa dissertação.
 - À CAPES/PROPP-UFMS pelo apoio financeiro.
 - A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, o meu mais sincero OBRIGADA!
-

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos gerais dos compostos polifenólicos.....	01
1.2. Classificação dos compostos polifenólicos.....	01
1.2.1. Ácidos Hidroxicinâmicos.....	02
1.3. Propriedades dos polifenólicos.....	05
1.4. Distribuição de Ácidos Clorogênicos em alimentos.....	06
1.5. Métodos de Análise dos Ácidos Clorogênicos.....	07
1.5.1. Gravimetria e Volumetria.....	08
1.5.2. Espectrofotometria.....	08
1.5.3. Cromatografia Gasosa.....	09
1.5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	10
1.5.5. Quimiluminescência.....	12
1.5.6. Eletroforese Capilar.....	12
1.5.7. Técnicas Voltamétricas.....	13
1.6. Surfactantes.....	14
1.6.1. Classificação dos surfactantes.....	16
1.6.2. Uso de surfactantes em estudos eletroquímicos.....	17
1.7. Objetivos.....	18
2. PARTE EXPERIMENTAL	19
2.1. Reagentes e soluções.....	19

2.2. Equipamentos.....	20
2.3. Procedimento para medidas eletroquímicas.....	20
2.4. Procedimento para tratamento da amostra de café solúvel.....	21
2.5. Procedimento para obtenção da amostra de chá de erva mate.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1. Redução eletroquímica do Ácido Clorogênico.....	22
3.2. Influência de diferentes tipos de surfactantes.....	27
3.3. Influência de surfactantes e sais de amônio quaternário.....	29
3.4. Efeito do pH do eletrólito suporte.....	37
3.5. Estudo da redução eletroquímica do ACLO em presença de BrCTA através da técnica de voltametria cíclica.....	42
3.5.1. Diagnóstico do processo eletrodico.....	43
3.5.2. Proposta de mecanismo de redução de ACLO na presença do surfactante BrCTA.....	63
3.5.3. Comparação entre a redução eletroquímica de ACLO e outros ácidos Hidroxicinâmicos na presença de BrCTA.....	65
3.6. Desenvolvimento de metodologias 1 e 2: Determinação de ACLO através das técnicas de PPD e VOQ.....	69
3.6.1. Influência da concentração do surfactante BrCTA na redução de ACLO.....	70
3.6.2. Influência do tipo e concentração do eletrólito suporte na redução de ACLO.....	75
3.6.3. Influência dos Parâmetros Instrumentais.....	78
3.6.3.1. Metodologia 1: PPD.....	78
3.6.3.2. Metodologia 2: VOQ.....	80
3.6.4. Parâmetros Instrumentais Seleccionados.....	83
3.6.5. Validação do método proposto.....	84
3.6.6. Curvas analíticas para o ACLO.....	86
3.6.7. Aplicação das metodologias eletroanalíticas para determinação de ACLO.....	93
3.6.7.1. Recuperação de ACLO em amostras de café solúvel.....	93
3.6.7.2. Recuperação de ACLO em amostras de chá mate.....	99

3.6.8. Determinação de ACLO em amostras de café solúvel e chá mate.....	104
3.7. Desenvolvimento de metodologia 3: Determinação de ACLO e ACAF simultaneamente através da PPD.....	111
3.7.1. Redução polarográfica simultânea de ACLO e ACAF.....	111
3.7.2. Influência da Concentração de BrCTA na redução de ACLO e ACAF...	112
3.7.3. Influência do pH na redução simultânea de ACLO e ACAF.....	115
3.7.4. Influência do tipo e concentração do eletrólito suporte.....	120
3.7.5. Otimização dos parâmetros instrumentais.....	122
3.7.6. Parâmetros instrumentais selecionados.....	124
3.7.7. Curva Analítica.....	125
4. CONCLUSÃO.....	133
5. ATIVIDADES FUTURAS.....	135
6. REFERÊNCIAS.....	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Geral dos Ácidos Hidroxicinâmicos.....	02
Figura 2: Estrutura dos principais Ácidos Hidroxicinâmicos.....	03
Figura 3: Estrutura geral dos ácidos clorogênicos: Ácido cafeoilquínico (R = OH, isômeros 3-, 4-, 5-), Ácido dicafeoilquínico (R = OH, isômeros 3,4-, 3,5-, 4,5-), Ácido feruloilquínico (R = OCH ₃ , isômeros 3-, 4-, 5-), (a) ácido quínico.....	04
Figura 4: Estruturas de surfactantes: (a) monômeros, (b) micela esférica, (c) micela cilíndrica, (d) micela esférica reversa, (e) micela cilíndrica reversa.....	16
Figura 5: Redução eletroquímica de ACLO (2,14. 10 ⁻⁴ mol. L ⁻¹) através das técnicas de: (a) PPD e (b) VOQ, em presença do eletrólito tampão fosfato pH 6,01 (0,04 mol. L ⁻¹), o qual é mostrado pelo polarograma (c) e pelo voltamograma (d).....	22
Figura 6: Estrutura química do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (BrCTA). 23	
Figura 7: Redução eletroquímica de ACLO (2,14. 10 ⁻⁴ mol. L ⁻¹) através das técnicas de (A) PPD e (B) VOQ, onde: (a) na ausência do surfactante, (b) na presença de BrCTA 2,02. 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ , (c) e eletrólito tampão fosfato pH 6,01 (0,04 mol. L ⁻¹), respectivamente.....	25
Figura 8: Redução eletroquímica de ACLO (1,96. 10 ⁻⁵ mol. L ⁻¹) através das técnicas de (A) PPD e (B) VOQ, onde: (a) na ausência do surfactante, (b) na presença de BrCTA 2,02. 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ , (c) somente BrCTA 2,02. 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ , (d) eletrólito tampão fosfato pH 6,01 (0,04 mol. L ⁻¹), respectivamente.....	26
Figura 9: Estrutura química dos surfactantes: (a) aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) e (b) neutro Triton X-100.....	27

Figura 10: Redução eletroquímica de ACLO ($2,14 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) através das técnicas de (A) PPD e (B) VOQ, onde: (a) na ausência de qualquer surfactante, (b) na presença de SDS, $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) na presença de Triton X-100, $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e (d) eletrólito tampão fosfato pH 6,01 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), respectivamente..... 28

Figura 11: Estrutura química dos sais de amônio quaternário, onde (a) brometo de metiltrimetilamônio, (b) brometo de tetraetil amônio, (c) brometo de tetradeciltrimetil amônio, (d) brometo de cetiltrimetil amônio..... 30

Figura 12: Influência do tamanho da cadeia carbônica (número de carbonos) dos sais de amônio quaternário ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) no deslocamento do potencial de pico (ΔE_p) para redução de ACLO ($2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); em tampão fosfato, pH 6,02 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), sob as técnicas de PPD e VOQ. Onde $\Delta E_p = E_p$ do ACLO na ausência do sal de amônio – E_p de ACLO na presença do sal de amônio..... 32

Figura 13: Influência do sal de amônio quaternário brometo de tetrametilamônio BrTMA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO sem BrTMA, (b) com BrTMA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, PPD (A) e VOQ (B), respectivamente..... 33

Figura 14: Influência do sal de amônio quaternário brometo de tetraetilamônio BrTEA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO sem BrTEA, (b) com BrTEA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, PPD (A) e VOQ (B), respectivamente..... 34

Figura 15: Influência do sal de amônio quaternário brometo de tetradeciltrimetilamônio BrTDTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO sem BrTDTA, (b) com BrTDTA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, PPD (A) e VOQ (B), respectivamente..... 35

Figura 16: Influência do sal de amônio quaternário brometo de cetiltrimetilamônio BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,58 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO

sem BrCTA, (b) com BrCTA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, PPD (A) e VOQ (B), respectivamente..... 36

Figura 17: Influência do pH do eletrólito suporte na I_p (1) e E_p (2) de ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), em presença do surfactante BrCTA ($2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), através das técnicas de PPD (A) e VOQ (B)..... 38

Figura 18: Polarogramas (A) e Voltamogramas (B) para ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em presença de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, para diferentes pHs do eletrólito suporte, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$: (a) pH 4,06; (b) pH 5,09; (c) pH 6,14..... 41

Figura 19: Voltamograma cíclico para: (a) uma solução de $3,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,02 e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), (b) somente o eletrólito suporte..... 43

Figura 20: Voltamogramas Cíclicos obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) para o aumento de v de 10 a 500 mV.s^{-1} 44

Figura 21: Variação E_{pc} com v , para uma solução de ACLO $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02)..... 53

Figura 22: Variação I_p com $v^{1/2}$, para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02)..... 54

Figura 23: Variação da função corrente de pico ($I_p \cdot v^{-1/2}$) do ACLO com a v , para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02)..... 55

-
- Figura 24:** Variação do $\log I_p$ em função do $\log v$, para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02)..... 56
- Figura 25:** Variação do E_p em função do $\log v$, para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02)..... 60
- Figura 26:** Influência do pH no E_{pc} em VC para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), no intervalo de pH de 3,03 a 9,02..... 62
- Figura 27:** Etapas de redução de ACLO em presença do surfactante BrCTA em meio aquoso: (1) adsorção do surfactante BrCTA no eletrodo de Hg, (2) dissociação do ACLO no ânion clorogenato; (3) adsorção do ânion clorogenato ao eletrodo de Hg, através da formação do par iônico com BrCTA; (4) reação de pré-protonação de ACLO (Etapa Química); (5) redução eletroquímica do ACLO (Etapa Eletroquímica). 64
- Figura 28:** Polarogramas de pulso diferencial para redução de: (a). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO, (b). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACIN, (c). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF na presença do surfactante $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02 (e)..... 67
- Figura 29:** Polarogramas de pulso diferencial para redução de: (a). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO, (b). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACIN, (c). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF na presença do surfactante $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, em solução de HCL $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 1,71... 68
- Figura 30:** Redução do ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de BrCTA $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02 sob diferentes técnicas voltamétricas: (a) PPD, (b) VPD e (c) VOQ..... 69
-

Figura 31: Polarogramas de Pulso Diferencial (A) e Voltamogramas de Onda Quadrada (B) para ACLO ($9,90 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) com concentrações crescentes de BrCTA: (b) $2,03 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) $4,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (d) $8,12 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (e) $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (a) em presença do eletrólito tampão fosfato, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02..... 72

Figura 32: Influência da concentração do surfactante BrCTA na resposta de I_p (1) e E_p (2) para $9,90 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,02, através da técnica de PPD, onde : (A) intervalo de $[\text{BrCTA}] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 7,10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e (B) intervalo de $[\text{BrCTA}] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 9,44 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ 73

Figura 33: Influência da concentração do surfactante BrCTA na resposta de I_p (1) e E_p (2) para $9,90 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,02, através da técnica de VOQ onde : (A) intervalo de $[\text{BrCTA}] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 7,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e (B) intervalo de $[\text{BrCTA}] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 9,44 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ 74

Figura 34: Polarogramas de Pulso Diferencial (A) e Voltamogramas de Onda Quadrada (B) para $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO na presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ BrCTA em diferentes eletrólitos: (a) tampão BR $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,08), (b) tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (c) LiCl $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ 76

Figura 35: Polarogramas de Pulso Diferencial (A) e Voltamogramas de Onda Quadrada (B) para ACLO ($1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em presença de BrCTA $2,41 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ para diferentes concentrações de tampão fosfato: (a) $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (b) $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (c) $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (d) $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02..... 77

Figura 36: Dependência da I_p com a variação da amplitude de pulso para ACLO $1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em presença de BrCTA $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02..... 78

Figura 37: Dependência da I_p com a velocidade de varredura para ACLO $1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em presença de BrCTA $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02..... 79

Figura 38: Voltamogramas de Onda Quadrada (A) para influência da variação da frequência (f) na redução de ACLO $1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,01 em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. $E_s = 2 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 50 \text{ mV}$. (B) Inserção: Influência f na I_p do ACLO..... 80

Figura 39: Influência da variação da amplitude (E_{sw}) na resposta da I_p em VOQ para uma solução $1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,01, em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. $E_s = 2 \text{ mV}$ e $f = 150 \text{ Hz}$ 81

Figura 40: Influência do incremento de varredura (E_s) na resposta da I_p em VOQ para uma solução $1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,01, em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ e $f = 150 \text{ Hz}$ 82

Figura 41: A. Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO onde: (c) $9,87 \cdot 10^{-6}$; (d) $2,43 \cdot 10^{-5}$; (e) $3,83 \cdot 10^{-5}$; (f) $5,20 \cdot 10^{-5}$; (g) $6,53 \cdot 10^{-5}$; (h) $7,84 \cdot 10^{-5}$; (i) $9,11 \cdot 10^{-5}$; (j) $1,04 \cdot 10^{-4}$ e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (b) $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA;. Parâmetros $a = 50 \text{ mV}$, $t_g = 0,6 \text{ s}$, $v = 8,25 \text{ mV.s}^{-1}$. B. Dependência da I_p em função da concentração de ACLO..... 87

Figura 42: A. Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO, onde: (c) $9,87 \cdot 10^{-7}$; (d) $2,43 \cdot 10^{-6}$; (e) $3,83 \cdot 10^{-6}$; (f) $5,20 \cdot 10^{-6}$; (g) $6,53 \cdot 10^{-6}$; (h) $7,84 \cdot 10^{-6}$; (i) $9,11 \cdot 10^{-6}$; (j) $1,04 \cdot 10^{-5}$, e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (b) $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA;. Parâmetros $a = 50 \text{ mV}$, $t_g = 0,6 \text{ s}$, $v = 8,25 \text{ mV.s}^{-1}$. B. Dependência da I_p em função da concentração de ACLO..... 88

Figura 43: A. Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO, onde: (c) $1,23 \cdot 10^{-6}$; (d) $2,46 \cdot 10^{-6}$; (e) $3,68 \cdot 10^{-6}$; (f)

4,89.10⁻⁶; (g) 6,10.10⁻⁶; (h) 7,30.10⁻⁶; (i) 8,69.10⁻⁶ e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (b) 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA. Parâmetros: $f = 150$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV e $\Delta E_s = 6$ mV. **B.** Dependência da I_p em função da concentração de ACLO..... 91

Figura 44: **A.** Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO, onde: (c) 1,85.10⁻⁷; (d) 3,69.10⁻⁷; (e) 5,53.10⁻⁷; (f) 7,36.10⁻⁷; (g) 9,19.10⁻⁷; (h) 1,10.10⁻⁶; (i) 1,28.10⁻⁶ e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (b) 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA. Parâmetros: $f = 150$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV e $\Delta E_s = 6$ mV. **B.** Dependência da I_p em função da concentração de ACLO..... 92

Figura 45: Polarogramas de Pulso Diferencial obtidos para adição de padrão de ACLO em café solúvel A, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 15 μ L da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 2.4) em presença de 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros $a = 50$ mV, $t_g = 0,6$ s, $v = 8,25$ mV.s⁻¹. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando P₁ = 0 mol.L⁻¹ (a ser determinada pelas adições posteriores), P₂ = 1,96.10⁻⁶ mol.L⁻¹, P₃ = 3,91.10⁻⁶ mol.L⁻¹, P₄ = 5,82.10⁻⁶ mol.L⁻¹ de ACLO..... 95

Figura 46: Voltamogramas de Onda Quadrada obtidos para adição de padrão de ACLO em amostra de café solúvel B, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 15 μ L da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 5.4) em presença de 2,420.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: $f = 150$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV e $\Delta E_s = 6$ mV. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando P₁ = 0 mol.L⁻¹ (a ser determinada pelas adições posteriores), P₂ = 1,84.10⁻⁷ mol.L⁻¹, P₃ = 3,68.10⁻⁷ mol.L⁻¹, P₄ = 5,52.10⁻⁷ mol.L⁻¹ de ACLO..... 96

Figura 47: Polarogramas de Pulso Diferencial obtidos para adição de padrão de ACLO na presença da amostra de chá A, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02,

0,04 mol.L⁻¹); (a) 50μL da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros a = 50 mV, t_g = 0,6 s, v = 8,25 mV.s⁻¹. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando P₁ = 0 mol.L⁻¹ (a ser determinada pelas adições posteriores), P₂ = 1,95.10⁻⁶ mol.L⁻¹, P₃ = 3,89.10⁻⁶ mol.L⁻¹, P₄ = 5,81.10⁻⁶ mol.L⁻¹ de ACLO..... 100

Figura 48: Voltamogramas de Onda Quadrada obtidos para adição de padrão de ACLO na presença da amostra de chá B, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 50μL da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: f = 150 Hz, E_{sw} = 50 mV e ΔE_s = 6 mV. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando P₁ = 0 mol.L⁻¹ (a ser determinada pelas adições posteriores), P₂ = 1,84.10⁻⁷ mol.L⁻¹, P₃ = 3,68.10⁻⁷ mol.L⁻¹, P₄ = 5,51.10⁻⁷ mol.L⁻¹ de ACLO..... 101

Figura 49: Polarogramas de Pulso Diferencial, obtidos para determinação de ACLO na amostra de café solúvel C, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 15μL da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 2.4) em presença de 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros a = 50 mV, t_g = 0,6 s, v = 8,25 mV.s⁻¹. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de café solúvel C..... 105

Figura 50: Voltamogramas de Onda Quadrada, obtidos para determinação de ACLO na amostra de café solúvel D, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 15μL da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 2.4) em presença de 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: f = 150 Hz, E_{sw} = 50 mV e ΔE_s = 6 mV. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de café solúvel D..... 106

Figura 51: Polarogramas de Pulso Diferencial, obtidos para determinação de ACLO na amostra de chá mate C, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 50μL da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros a =

50 mV, $t_g = 0,6$ s, $v = 8,25$ mV.s⁻¹. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de chá mate C..... 108

Figura 52: Voltamogramas de Onda Quadrada, obtidos para determinação de ACLO na amostra de chá mate D, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 50µL da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de $2,420 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: $f = 150$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV e $\Delta E_s = 6$ mV. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de chá mate D..... 109

Figura 53: Influência de diferentes tipos de surfactante na redução de: (a) eletrólito tampão fosfato 0,04 mol.L⁻¹, pH 6,06 (b) ACLO ($2,95 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹) e ACAF ($2,89 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹) na ausência de surfactante, (c) ácidos na presença de surfactante catiônico BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, (d) ácidos na presença de surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) $2,02 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, (e) ácidos na presença de surfactante neutro Triton X-100, $2,02 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹..... 112

Figura 54: Polarogramas de Pulso Diferencial para $1,96 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de ACLO e $1,97 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de ACAF em eletrólito tampão fosfato 0,04 mol.L⁻¹ pH 6,14, na presença de concentrações crescentes de BrCTA: (a) $4,07 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, (b) $1,22 \cdot 10^{-4}$ (c) $2,42 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹..... 113

Figura 55: Dependência de: (A) Influência do aumento da concentração de BrCTA nos E_{ps} de $1,964 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de ACLO e de ACAF $1,966 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ e (B) diferença entre os E_{ps} de ACLO e ACAF..... 114

Figura 56: Dependência das I_{ps} de $1,96 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de ACLO e $1,97 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de ACAF com a concentração do surfactante BrCTA..... 115

Figura 57 a: Polarogramas de Pulso Diferencial em diferentes de pHs do eletrólito suporte onde: (a) ACLO $1,96 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, (b) $1,97 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF e (c) $1,96 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACLO e $1,97 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF, todos na presença de $2,02 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA..... 117

-
- Figura 57 b:** Polarogramas de Pulso Diferencial em diferentes de pHs do eletrólito suporte onde: (a) ACLO $1,96.10^{-5}$ mol.L⁻¹, (b) $1,97.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF e (c) $1,96.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACLO e $1,97.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF, todos na presença de $2,02.10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA..... 118
- Figura 58:** (A) Influência do pH do eletrólito suporte $0,04$ mol.L⁻¹, nos E_ps de ACLO $1,96.10^{-5}$ mol.L⁻¹ e $1,97.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF na presença de $2,02.10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA, através da técnica de PPD, e (B) Separação dos E_ps de ACLO e ACAF....119
- Figura 59:** Influência do pH do eletrólito suporte $0,04$ mol.L⁻¹, na resposta de I_p para ACLO $1,96.10^{-5}$ mol.L⁻¹ e $1,97.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF na presença de $2,02.10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA, através da técnica de PPD.....120
- Figura 60:** Polarogramas de Pulso Diferencial de $1,95.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACLO e $1,96.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF em presença de $2,02.10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA em diferentes eletrólitos suporte na concentração de $0,04$ mol.L⁻¹: (a) tampão fosfato pH 6,06, (b) tampão BR pH 6,04 e (c) LiCl pH 6,01.....121
- Figura 61:** Polarogramas de Pulso Diferencial de $1,95.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACLO e $1,96.10^{-5}$ mol.L⁻¹ ACAF em presença de $2,02.10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA em diferentes concentrações do eletrólitos suporte tampão fosfato: (a) 0,02, (b) 0,04 (c) 0,08 e (d) 0,1 mol.L⁻¹122
- Figura 62:** Dependência da I_p com a variação da amplitude de pulso para redução de ACLO $2,00.10^{-5}$ mol.L⁻¹ e ACAF $2,00.10^{-5}$ mol.L⁻¹, em presença de BrCTA $2,02.10^{-4}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato $0,02$ mol.L⁻¹, pH 6,02.....123
- Figura 63:** Dependência da I_p com a velocidade de varredura para ACLO $2,00.10^{-5}$ mol.L⁻¹ e ACAF $2,00.10^{-5}$ mol.L⁻¹, em presença de BrCTA $2,02.10^{-4}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato $0,02$ mol.L⁻¹, pH 6,02..... 124
- Figura 64:** Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações dos padrões de ACLO e ACAF, respectivamente: (a) $1,14.10^{-6}$ e $1,50.10^{-6}$ mol.L⁻¹; (b)
-

2,28.10⁻⁶ e 2,99.10⁻⁶ mol.L⁻¹; (c) 3,41.10⁻⁶ e 4,47.10⁻⁶ mol.L⁻¹; (d) 4,54.10⁻⁶ e 5,94.10⁻⁶ mol.L⁻¹; (e) 5,66.10⁻⁶ e 7,41.10⁻⁶ mol.L⁻¹; (f) 6,77.10⁻⁶ e 8,87.10⁻⁶ mol.L⁻¹; (g) 7,88.10⁻⁶ e 1,03.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (h) 8,99.10⁻⁶ e 1,18.10⁻⁵ mol.L⁻¹, na presença de tampão fosfato pH 6,02, 0,02 mol.L⁻¹ e 2,02.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA. Parâmetros a = 25 mV, t_g = 0,6 s, v = 8,25 mV.s⁻¹ 127

Figura 65: Dependência da I_p em função da concentração de: **(A)** ACLO (1,14.10⁻⁶ a 8,99.10⁻⁶ mol.L⁻¹) e **(B)** ACAF (1,50.10⁻⁶ a 1,18.10⁻⁵ mol.L⁻¹) 128

Figura 66: Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações dos padrões de ACLO e ACAF, respectivamente: (a) 5,71.10⁻⁶ e 7,48.10⁻⁶ mol.L⁻¹; (b) 1,71.10⁻⁵ e 2,23.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (c) 2,83.10⁻⁵ e 3,71.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (d) 3,95.10⁻⁵ e 5,16.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (e) 5,04.10⁻⁵ e 6,61.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (f) 6,13.10⁻⁵ e 8,07.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (g) 7,21.10⁻⁵ e 9,45.10⁻⁵ mol.L⁻¹; (h) 8,28.10⁻⁵ e 1,08.10⁻⁴ mol.L⁻¹, na presença de tampão fosfato pH 6,02, 0,02 mol.L⁻¹ e 2,02.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA. Parâmetros a = 25 mV, t_g = 0,6 s, v = 8,25 mV.s⁻¹ 130

Figura 67: Dependência da I_p em função da concentração de: **(A)** ACLO (5,71.10⁻⁶ a 8,28.10⁻⁵ mol.L⁻¹) e **(B)** ACAF (7,48.10⁻⁶ a 1,08.10⁻⁴ mol.L⁻¹) 131

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Principais classes de fenólicos em função do peso molecular¹..... 2
- Tabela 2:** Influência de sais de amônio quaternário ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) no potencial de pico para redução de ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH 6,02 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), sob as técnicas de PPD e VOQ..... 31
- Tabela 3:** Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH no E_p para redução de ACLO, sob as técnicas de PPD e VOQ..... 39
- Tabela 4:** Valores de pK_a do ACLO, experimentais e abordados na literatura ($2,420 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)..... 42
- Tabela 5:** Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão acetato pH 3,03 e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)..... 46
- Tabela 6:** Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão acetato pH 4,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)..... 47
- Tabela 7:** Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão acetato pH 5,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)..... 48
- Tabela 8:** Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 6,07, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)..... 49
- Tabela 9:** Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 7,02, e
-

em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).....	50
Tabela 10: Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 8,03, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).....	51
Tabela 11: Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 9,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).....	52
Tabela 12: Valores da inclinação obtidos para variação do $\log I_p$ em função do $\log v$ nos voltamogramas cíclicos de redução do ACLO.....	57
Tabela 13: Valores médios obtido de $ E_{pc} - E_{pc/2} $ para todas as velocidades de 10 a 500 mV.s^{-1} , nos diferentes pHs analisados.....	58
Tabela 14: Cálculo teórico de αn e do número de elétrons n , envolvidos na redução de ACLO, a partir da relação para uma transferência eletrônica irreversível $ E_{pc} - E_{pc/2} = 47,7/\alpha n$ (mV a 25°C) (Equação 2).....	59
Tabela 15: Cálculo teórico de αn e do número de elétrons n , envolvidos na redução de ACLO, a partir da influência do $\log v$ versus E_{pc} nos voltamogramas cíclicos de ACLO.....	61
Tabela 16: Parâmetros instrumentais para análise de ACLO através da técnica de PPD.....	83
Tabela 17: Parâmetros instrumentais para análise de ACLO através da técnica de VOQ.....	84
Tabela 18: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de PPD para determinação de ACLO.....	89

Tabela 19: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de VOQ para determinação de ACLO.....	93
Tabela 20: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de Café Solúvel através da metodologia de PPD.....	97
Tabela 21: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de Café Solúvel através da metodologia de VOQ.....	98
Tabela 22: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de chá mate, através da metodologia de PPD.....	102
Tabela 23: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de chá mate, através da metodologia de VOQ.....	103
Tabela 24: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de ACLO em amostras de café solúvel através das metodologias de PPD e VOQ.....	107
Tabela 25: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de ACLO em amostras de chá mate, através das metodologias de PPD e VOQ.....	110
Tabela 26: Parâmetros instrumentais para redução polarográfica de ACLO e ACAF.	125
Tabela 27: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de PPD para determinação de ACLO e ACAF.....	129
Tabela 28: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de PPD para determinação de ACLO e ACAF.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α = coeficiente de transferência eletrônica

v = velocidade de varredura

nA = nanoampere

μL = microlitro

$\Delta E_{p/2}$ = largura da meia altura em voltametria cíclica

ΔE_s = incremento de varredura de potencial para onda quadrada

ΔE_p = variação do potencial de pico

[] = concentração

a = amplitude de pulso para polarografia de pulso diferencial

a = coeficiente linear

Ag = prata

AgCl = cloreto de prata

ACAF = ácido cafêico

ACIN = ácido cinâmico

ACLO = ácido clorogênico

b = coeficiente angular

BR = Britton-Robinson

BrCTA = brometo de cetiltrimetilamônio

BrETA = brometo de tetraetilamônio

BrMTA = brometo de tetrametilamônio

BrTDTA = brometo de tetradeciltrimetilamônio

CMC = concentração micelar crítica

DP = desvio padrão

DP_a = desvio padrão do intercepto

DPR = desvio padrão relativo

E_p = potencial de pico

E_{pc} = potencial de pico catódico

E_r = erro relativo

E_{sw} = amplitude de pulso para voltametria de onda quadrada

f = frequência de aplicação de pulsos

g = grama

Hg = eletrodo de mercúrio

Hz = hertz

I = corrente

I_p = corrente de pico

I_{pc} = corrente de pico catódica

$I_{pc} \cdot v^{-1/2}$ = função corrente

LOD = limite observável de detecção

log = logaritmo

LOQ = limite observável de quantificação

mol.L^{-1} = concentração molar

mV = milivolt

n = número de elétrons

PPD = polarografia de pulso diferencial

r = coeficiente de correlação

rpm = rotação por minuto

s = segundo

SDS = dodecil sulfato de sódio

t_g = tempo de gotejamento

V = volt

VC = voltametria cíclica

VOQ = voltametria de onda quadrada

VPD = voltametria de pulso diferencial

vs. = versus

Z = número de prótons

RESUMO

O Ácido Clorogênico (ACLO) representa um dos principais antioxidantes naturais amplamente distribuído em dietas de origem vegetal. Neste trabalho a redução eletroquímica desta substância foi estudada em meio aquoso utilizando-se as técnicas de Polarografia de Pulso Diferencial (PPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ). Os polarogramas e voltamogramas mostraram um pico de redução do ACLO em potenciais bastante negativos, pouco definido e muito próximo a descarga do eletrólito. Vários tipos de surfactantes (aniônico, neutro, catiônico) foram estudados na redução eletroquímica do ACLO, mas somente o surfactante catiônico brometo de cetiltrimetil amônio (BrCTA) proporcionou o deslocamento dos potenciais de pico do ACLO para valores menos negativos, aumento da definição e corrente de pico. Utilizando este surfactante e otimizando outros parâmetros desenvolveu-se duas metodologias para determinação de ACLO. Nas melhores condições, valores de LOQ de $2,15 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $2,74 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ foram obtidos para metodologias de PPD e VOQ, respectivamente. Bons valores de recuperação foram encontrados para análise do padrão de ACLO na presença das amostras de café e chá, os quais variaram entre 96,53 e 106,79%. Os métodos propostos apresentaram bons valores de precisão e exatidão, de modo que podem ser excelentes alternativas para determinação de ACLO em amostras de café e chá. Além disso, o uso de surfactante proporcionou a redução polarográfica do ACLO e ácido cafêico (ACAF) em diferentes potenciais de picos. Assim uma metodologia para determinação simultânea destes ácidos também foi desenvolvida.

Palavras-Chave: Ácido Clorogênico, antioxidantes, café, chá, determinação eletroanalítica;

ABSTRACT

The Chlorogenic acid represents one of the main natural antioxidants widely distributed in vegetal diets. In this work the electrochemical reduction of these substances was studied in aqueous medium by Pulse Differential Polarography and (PDP) e Square Wave Voltammetry (SWV) techniques. The polarograms and voltamograms showed an ACLO reduction peak in at very negative potentials, not well defined and very close to the electrolyte discharge. Several types of surfactants (anionic, nonionic, cationic) were studied in the ACLO electrochemical reduction. However, only the cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide (CTABr), shifted the ACLO peak potentials to values less negative, increased the definition and peak current. Using this surfactant and optimizing others parameters, two methodologies for ACLO determination were developed. In the best conditions, values of LOQ $2.15 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ e $2.74 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ were obtained for PPD e VOQ methodologies, respectively. Good values of recovery were found for analysis of ACLO standard in presence of the coffee and tea samples, which varied between 96.53 e 106.79%. The proposed methods showed good values of precision and accuracy therefore they can be an alternative for ACLO determination in coffee and tea samples. Besides, the surfactant allowed the polarographic reduction of ACLO and caffeic acid (ACAF) at different peak potentials. Therefore a methodology for simultaneous determination of those acids was also developed.

Keywords: Chlorogenic acid, antioxidants, coffee, tea, electroanalytical determination;

1. INTRODUÇÃO

O ácido 5-cafeoilquínico também denominado genericamente por Ácido Clorogênico é um composto polifenólico, reconhecido como um popular antioxidante natural, o qual está amplamente distribuído no Reino Vegetal, principalmente na forma de um bioproduto gerado a partir do metabolismo de plantas. Sendo, portanto encontrado facilmente e em grande quantidade em dietas de origem vegetal como frutas, legumes, grãos e bebidas como chá, café, vinho e sucos de fruta.^[1-6]

1.1. Aspectos gerais dos compostos polifenólicos

Do ponto de vista químico, os compostos polifenólicos podem ser definidos como espécies de ocorrência natural, que possuem no mínimo um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados, no entanto estes grupos podem ser substituídos por ésteres, metil ésteres, glicosídeos, etc.^[1,7]

A natureza química destes compostos é muito heterogênea e incorpora uma ampla variedade de estruturas ou famílias, que podem variar a partir de estruturas livres a conjugadas (polifenólicos ligados a outros compostos pertencentes a outras classes, não relacionadas a estas estruturas, como por exemplo, os glicosídeos).^[1]

1.2. Classificação dos compostos polifenólicos

Os compostos polifenólicos constituem uma miscelânea de grupos de estruturas orgânicas, e por isto várias propostas para a classificação deste compostos têm sido apresentadas, no entanto uma bastante simples e útil, pode ser feita através do peso molecular^[1] destes (T a b e l a 1).

Através desta classificação, pode-se observar que os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos estão incluídos entre o grupo de polifenólicos de baixo peso molecular; os flavonóides estão entre os representantes dos compostos de peso molecular intermediário, enquanto que os taninos são um exemplo de compostos de alto peso molecular.

Tabela 1: Principais classes dos compostos polifenólicos em função do peso molecular.

<i>Peso Molecular</i>	<i>Estrutura</i>	<i>Classe Fenólica</i>
<i>Baixo</i>	C ₆ -C ₁	Ácidos Hidroxibenzoicos
	C ₆ -C ₃	Ácidos Hidroxicinâmicos
<i>Intermediário</i>	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides
<i>Alto</i>	(C ₆ -C ₁) _n	Taninos Hidrolizáveis
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos Condensados

Onde C₆ = anel aromático

1.2.1. Ácidos Hidroxicinâmicos

Os Ácidos Hidroxicinâmicos constituem o mais amplo grupo de compostos conhecidos como fenilpropanóides encontrados abundantemente em dietas de origem vegetal.^[1]

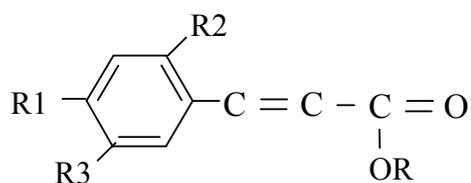
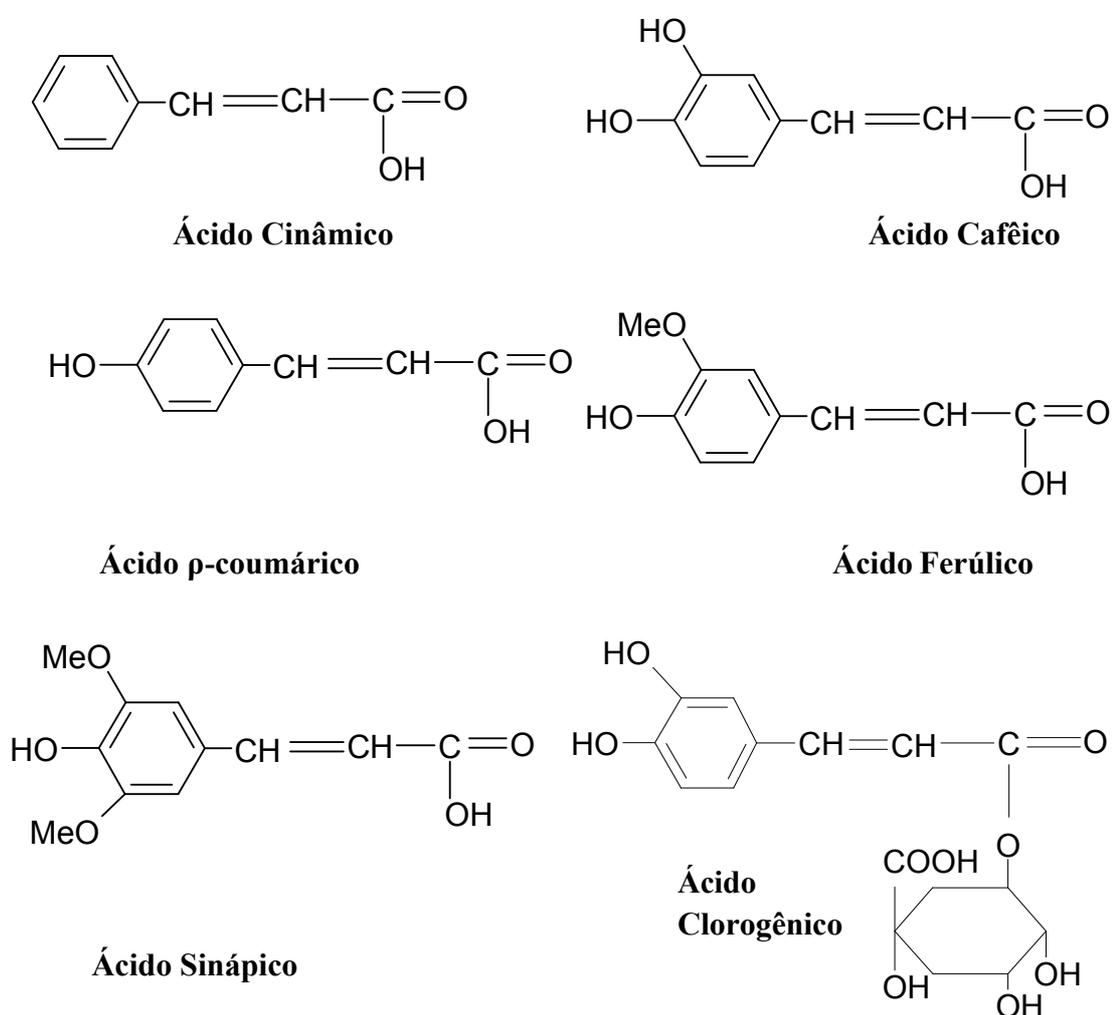


Figura 1: Estrutura Geral dos Ácidos Hidroxicinâmicos

O maior representante dos ácidos hidroxicinâmicos é o éster do Ácido Cafêico [1,8,9], o qual é chamado de Ácido Clorogênico. Dentre outros representantes importantes desta classe destacam-se: os ácidos cinâmico, cafêico, ferúlico, p-coumárico e sinápico (**Figura 2**). Além destes, existem outros ácidos hidroxicinâmicos, os quais são constituídos destes principais ácidos, quimicamente associados a outros tipos de compostos, como o ácido quínico.^[1,2,10]

Figura 2: Estrutura dos principais Ácidos Hidroxicinâmicos.



O ácido clorogênico foi isolado pela primeira vez em 1907, na forma de um complexo cristalino, a partir do qual preparou-se o ácido puro. A estrutura química deste composto foi estabelecida por Fischer como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente denominado de ácido 5-cafeoilquínico, de acordo com a IUPAC).^[4]

No entanto, atualmente o termo ácido clorogênico (ACG) é utilizado para designar a família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido *trans*-cinâmico, com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH),3,4,5-tetra-hidroxíciclohexanóico)^[4,11-12]. Os isômeros *cis* dos derivados do ácido cinâmico já foram detectados em produtos processados, porém não tem sido detectados naqueles *in natura*.^[4]

Os principais grupos de ACGs são:

1. Ácidos cafeoilquínicos - (ACQ): éster do ácido cafêico com ácido quínico (isômeros 3-; 4-; 5-);

2. Ácido dicafeoilquínico - (diACQ): éster de dois resíduos de ácido cafêico com um ácido quínico (isômeros 3,4-; 3,5-; 4,5-);

3. Ácido feruloilquínico (AFQ): éster do ácido ferúlico com ácido quínico (isômeros 3-; 4-; 5-)

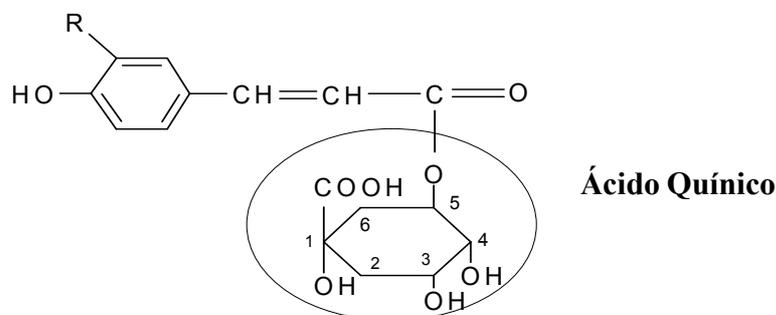


Figura 3: Estrutura geral dos ácidos clorogênicos: Ácido cafeoilquínico (R = OH, isômeros 3-, 4-, 5-), Ácido dicafeoilquínico (R = OH, isômeros 3,4-, 3,5-, 4,5-), Ácido feruloilquínico (R = OCH₃, isômeros 3-, 4-, 5-).

Na natureza o grupo mais abundante dos ACGs é o ACQ, e dentre o representante majoritário desta classe encontra-se o ácido 5-cafeoilquínico, por esta razão, este grupo é o que tem sido mais amplamente estudado.

Além disso, como destaca De Maria e Moreira^[4], outros grupos de famílias de ACGs também foram propostas, tais como ácidos sinapoilquínicos, cumaroilquínicos, e os conjugados do ácido caféico com diácidos alifáticos (exemplo ácido oxálico e succínico), e ácidos cafeoilferuloilquínico^[11]. No entanto, ao contrário dos ACQs, estes grupos tem representação bastante restrita e desta forma têm sido muito pouco estudados.

1.3. Propriedades dos polifenólicos

Os compostos polifenólicos exibem múltiplos efeitos biológicos, propriedades farmacológicas, além de efeitos fisiológicos e propriedades relacionadas à qualidade dos alimentos.

Estes compostos são muito importantes para o ciclo de vida das plantas, pois participam diretamente do seu metabolismo, sendo sintetizados durante desenvolvimento normal, contribuindo para o seu crescimento. Além disso, são gerados também, em resposta a infecções e ferimentos causados por microorganismos, além de atuarem como agentes protetores contra radiações UV, dentre outros.^[1, 6,13]

A presença dos polifenólicos nos alimentos de origem vegetal pode contribuir para certas propriedades tais como: amargura, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos.^[1, 6,14-16]

Quanto às propriedades fisiológicas, é necessário enfatizar que a presença dos grupos hidroxila permite a estes compostos a associação a proteínas e carboidratos, desta forma reduzindo a disponibilidade destes macro-nutrientes. No entanto, é a solubilidade destes, que determina conclusivamente seus efeitos fisiológicos. Os compostos polifenólicos solúveis são absorvidos e metabolizados no trato gastrointestinal, enquanto que os insolúveis são simplesmente excretados através das fezes.^[1]

Os polifenólicos são amplamente conhecidos pela sua atividade e seu poder antioxidante. Sendo esta habilidade antioxidante intimamente relacionada às propriedades de captura de radicais livres e espécies altamente reativas de oxigênio, bem como de quelação com íons metálicos (como os metais de transição ferro e o

cobre), os quais são conhecidos por catalisar muitas reações de formação de espécies reativas de oxigênio. [17-25]

Além disso, a presença dos polifenólicos na dieta humana pode exercer uma série de efeitos benéficos a saúde, pois estes exibem múltiplos efeitos biológicos e propriedades farmacológicas tais como: antiinflamatória, antialérgica, antimutagênica e anticarcinogênica. [1-3, 14, 25-35]

Monteiro [11] descreve que nas últimas décadas, muitos estudos *in vitro* e *in vivo* tem levado os pesquisadores a atribuir diferentes propriedades farmacológicas aos ACGs, tais como: atividade inibitória sobre as integrases que participam da replicação do vírus HIV; indução da diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, por meio da inibição da glicose-6-fosfatase; ligação com centros opióides do cérebro; características antimutagênicas; dentre outros.

1.4. Distribuição de Ácidos Clorogênicos em alimentos

Como já mencionado, os compostos polifenólicos são característicos de muitas plantas, e são encontrados praticamente em todos os alimentos de origem vegetal, portanto estão presentes consideravelmente na dieta humana. [1]

Os ácidos clorogênicos estão entre os ácidos hidroxicinâmicos mais amplamente distribuídos em frutas [1,2, 36-37], vegetais [1,2, 36], cereais [1-6, 38-39] e bebidas como, sucos de frutas, vinhos [1,2,40], chás de diversas ervas, como a erva mate [1-2,41-42] e café [1-2,4,11, 43-58].

A batata inglesa também é uma importante fonte de ácido clorogênico fornecendo, 50-120 mg por 100g de matéria seca [4]. Como descreve De Maria e Moreira [4] em seu artigo de revisão, a maçã, a casca da jaca, a polpa do marmeleiro e da graviola também apresentam consideráveis quantidades de ACGs. Além disso, este ácido também está presente em frutos de acerola [59], pêra, laranja, amora, ameixa [60], cereja, uva, tomate dentre outros.

A bebida do café [1, 2, 4,11, 44] é uma das principais fontes de ácido clorogênico na dieta humana, isso por que este é facilmente solubilizado em água quente. Uma xícara desta bebida (200mL) pode conter de 20-675 mg, dependendo da espécie de café e das condições de processamento. [1,4]

Os ácidos clorogênicos estão em entre os principais compostos não-voláteis presentes no café. Sendo que seu conteúdo total normalmente varia conforme a espécie e variedade deste grão. [43-44, 52-53]

Durante a torrefação do café os ACGs sofrem degradação, produzindo ácidos fenólicos livres, e por conseguinte ácidos fenólicos voláteis os quais contribuem para a formação do sabor e aroma do café processado. [43-44, 50-51, 54-55]

A presença residual destes ácidos após o processamento do café também pode ser benéfica, tendo em vista a atividade antioxidante destes compostos. [56-58] Entretanto, teores elevados destes compostos podem promover um impacto sensorial negativo, como a adstringência, provocando assim a desvalorização da qualidade deste produto [50-51].

Como mencionado no artigo de Moreira e Trugo^[44], os ácidos cafeoiquínicos estão entre os maiores representantes dos ácidos clorogênicos no café, tanto para o robusta quanto para o arábica. E dentre este grupo, o ácido 5-cafeoilquínico esteve presente predominantemente representando 66% do conteúdo total de ACGs no café arábica e 56% no robusta.

Todos os fatos relacionados acima têm contribuído para realização de inúmeros estudos envolvendo esses compostos, além de justificarem a realização de novos estudos, quer seja para análise destes compostos no café, assim como em outros tipos de matrizes.

1.5. Métodos de Análise dos Ácidos Clorogênicos

Inúmeros trabalhos têm sido reportados na literatura envolvendo os ACGs, isso devido as suas propriedades, bem como a grande diversidade de amostras em que são encontrados. Desta forma, serão apresentados nesta revisão apenas alguns destes estudos, no intuito de demonstrar as várias técnicas quem têm sido utilizadas para análise destes compostos.

Considerando as várias propriedades destes ácidos, assim como as quantidades consideráveis com que estes compostos são encontrados nas dietas alimentares de origem vegetal, vários métodos têm sido propostos para a análise destes compostos em diferentes matrizes e através de diferentes técnicas analíticas.

1.5.1. Gravimetria e Volumetria

Como descreve De Maria^[4], Charaux desenvolveu o primeiro método analítico para quantificação do ácido clorogênico em derivados de plantas. O seu método foi baseado na precipitação seletiva do ácido clorogênico com sal de chumbo neutro, hidrólise ácida do clorogenato de chumbo, saponificação e extração com éter. Após evaporação do éter e o conteúdo de ácido clorogênico foi determinado por gravimetria, este método foi bastante utilizado até o final da década de 30.

Um método volumétrico semi-quantitativo do conteúdo de ácido clorogênico, foi desenvolvido por Slotta e Neisser, como também descreve De Maria^[4]. O método consiste na extração aquosa do café seco e desengordurado, precipitação com acetato de chumbo neutro formando o clorogenato de chumbo, este é posteriormente hidrolisado com ácido sulfúrico, seguido da adição de solução de iodo e a geração de iodato através da adição de hidróxido de sódio, para que a solução possa ser titulada com tiosulfato de sódio. O inconveniente deste método foi a super estimativa do conteúdo de ácido clorogênico em decorrência da reação de outros compostos fenólicos.

1.5.2. Espectrofotometria

Um método espectrofotométrico de baixo custo para análise de ácidos clorogênicos em cafés verde e torrado foi desenvolvido por Moores^[61] e colaboradores, o método desenvolvido é baseado na absorção seletiva destes compostos na região do ultravioleta (UV). Este método consiste em submeter a matriz desengordurada a extração aquosa, e então analisá-la sob o comprimento de onda de 324 nm; em seguida é adicionada ao extrato, uma solução de acetato de chumbo básico, para precipitação do clorogenato de chumbo. Após esse processo o extrato é novamente submetido à análise espectrofotométrica, e o que se observa é o desaparecimento de 98% da absorção, indicando que esta corresponde à presença de

compostos da família de ácido clorogênico na matriz. Conseqüentemente, o conteúdo de ácido clorogênico no café é determinado sob este método pela diferença na absorção no comprimento de onda de 324 nm, antes e depois da precipitação com acetato de chumbo. O inconveniente deste método também é a super estimativa do conteúdo de ACLO, em virtude da reação de outros fenólicos presentes na matriz.

Após algumas pequenas modificações realizadas por Weiss, como descreve De Maria ^[4], o método de Moores foi adotado oficialmente pela "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC).

1.5.3. Cromatografia Gasosa

De Maria e Moreira ^[4] também descrevem que cromatografia gasosa foi utilizada em 1958 pela primeira vez para análises dos isômeros individuais de ACQ e diACQ, onde o extrato de café liofilizado foi submetido a derivatização com trimetil-cloro-silano ou hexametil-disilazano, este foi então injetado em uma coluna recheada de cromatografia gasosa. A análise permitiu uma separação razoável destes dois grupos de ACGs, tendo sido bastante demorada. O detector utilizado foi o de ionização de chama, e a quantificação foi realizada pelo método de padronização externa. Os isômeros foram identificados pelo acoplamento com a espectrometria de massas.

Esses mesmos autores também destacam que o desenvolvimento da coluna capilar de sílica fundida permitiu Hughes e Thorpe uma análise em tempo menor do conteúdo de ACQ no café, com maior resolução dos isômeros através das técnicas

CG/EM	e	CG/DIC
-------	---	--------

1.5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Walter e colaboradores^[62] utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) isolaram compostos fenólicos da batata doce. As análises foram realizadas em uma coluna de fase apolar do tipo C18 fase reversa, com detecção espectrofométrica operando no comprimento de onda de 313nm. A fase móvel utilizada foi 40% de metanol e 60% de tampão fosfato, pH 3,0. Através desta metodologia, foram encontrados os isômeros dos ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico na amostra de batata doce.

Houve um grande avanço na análise dos isômeros das diferentes famílias de ácidos clorogênicos^[4] através da CLAE com o desenvolvimento de fases estacionárias contendo micropartículas.

Trugo e Macrae^[63], por exemplo, obtiveram sucesso nas separações cromatográficas das diferentes famílias de ACG (ACQ, AFQ, diACQ) em amostras de café solúvel, utilizando uma coluna de fase apolar do tipo 5-ODS. O método desenvolvido por eles consiste na extração do café com (metanol/ água 40/60, v/v), e posterior clarificação do extrato com reagente de Carrez (ferrocianeto de potássio + acetato de zinco), este é então submetido a filtração em papel quantitativo, e o filtrado é então submetido a análise cromatográfica. As melhores condições encontradas para eluição foram: um gradiente de metanol em solução 0,01 mol.L⁻¹ de citrato de potássio ajustada para pH 2,5 com solução de ácido clorídrico, aumentando de 20 para 70%.

Esta metodologia foi aplicada recentemente por Nogueira e Trugo^[55] para análises do conteúdo de ACGs em cafés solúveis brasileiros e por Monteiro e Trugo^[11] em cafés torrado brasileiros.

Ky^[64] e colaboradores utilizando a CLAE como método de análise, compararam 5 métodos de extração e de ácidos clorogênicos presentes em café. Dentre os métodos utilizados o proposto por Trugo e Macrae^[63] foi o mais adequado no que se diz respeito a parâmetros de repetibilidade, precisão, rapidez e baixo custo de análise. Eles constaram que o reagente de Carrez foi fundamental para precipitação coloidal, particularmente de proteínas e polissacarídeos que interferem nas análises.

Shahrzad e Bitsch^[10] desenvolveram um método de análise simultânea dos ácidos clorogênico, cafêico, ferúlico, gálico e elágico, através da CLAE com detecção ultravioleta. O método desenvolvido foi baseado em uma eluição isocrática, utilizando uma fase móvel incluindo 95,6% de água. A metodologia apresentou um limite de detecção de 0,1 mg/L e foi aplicada em amostras de sucos de uva e cereja.

Além disso, muitos trabalhos têm utilizado CLAE acoplada a um detector do tipo DAD “diode array detector” para separação, identificação e quantificação de ACGs, como é o caso de Dawes e Keene^[65] que identificaram a presença do ACG além de outros polifenólicos em sucos do fruto kiwi.

Também utilizando a CLAE acoplada a um detector do tipo “diode array detector”, Mattila e Kumpulainen^[66] identificaram e quantificaram o ácido clorogênico (5-ACQ) e outros compostos, em alimentos de origem vegetal (maça, tomate, batata, café dentre outros), com um limite de detecção de 0,02-0,07 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, para os fenólicos estudados; Chang^[67] e colaboradores também utilizaram esta técnica para determinar polifenólicos como o 5-ACQ em amostras de plasma de rato, com um limite de detecção para este ácido de 0,04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Também utilizando a CLAE com detector UV “photodiode array detector” Filip^[41] e colaboradores analisaram os ácidos clorogênico, dicafeoilquínicos e cafêico em amostras de erva mate, com um limite de quantificação de 1 ppm. Amakura^[37] e colaboradores também utilizando esse tipo de detector desenvolveram uma metodologia através da eluição isocrática para determinação dos ácidos clorogênico, cafêico, ferúlico, gálico e elágico em amostras de sucos de uva, ameixa e maçã. Utilizaram como fase móvel uma solução dihidrogenofosfato de potássio e acetoneitrila (82:18). Os limites de detecção encontrados estiveram entre 0,015-0,03 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

A CLAE acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM) também tem sido uma ferramenta bastante útil. Nielsen e Sandström^[68] utilizando esta técnica acoplada uma interface de ionização química a pressão atmosférica e propuseram uma metodologia para análise de ácido clorogênico total, cafêico, hidroxicinamatos e catequinas em amostras urina de seres humanos submetidos a uma dieta rica em frutas. O limite de detecção e quantificação encontrados para o conteúdo de ACGs

foi 3 e 10 ng.mL⁻¹, respectivamente. Carini [69] e colaboradores, também utilizaram essa técnica para identificarem os compostos polifenólicos antioxidantes em plantas do tipo *Helichrysum stoechas*, conhecida por suas propriedades medicinais. Entre os 10 constituintes fenólicos estavam presentes todos os isômeros do grupo ACQ e dois isômeros dos diACQ.

A CLAE-EM com ionização por “eletrospray” foi utilizada por Cremin [70] e colaboradores para desenvolver uma metodologia para determinação de ácido cafêico, ferúlico e 5-ACQ em plasma e urina humana, recolhidos de voluntários que consumiram 100 g de ameixa. O método foi capaz de monitorar os níveis destes ácidos induzidos pela dieta. O limite de detecção encontrado para 5-ACQ foi 12,5 nmol.L⁻¹.

1.5.5. Quimiluminescência

Utilizando a inibição da reação de quimiluminescência do luminol-hexacianoferrato de potássio por ácido clorogênico, He e colaboradores [71] propuseram um novo método para determinação no conteúdo total de ACG em cigarros. O limite de detecção encontrado por eles foi 5,2 ng. mL⁻¹.

1.5.6. Eletroforese Capilar

Sheu [72] e colaboradores desenvolveram dois métodos: um de eletroforese eletrocínética micelar e o outro de eletroforese por zona capilar. Estes foram utilizados para separação de 12 constituintes de uma erva chinesa (*Artemisiae Capillaris Herba*). Contudo, somente a eletroforese por zona capilar apresentou sucesso na análise do 5-ACQ, simultaneamente aos outros 11 constituintes, este método também pode ser utilizado para determinar a concentração de alguns compostos, dentre eles o ácido clorogênico, com um limite de detecção de 0,27-1,24 µg.mL⁻¹ para estes constituintes.

Polimio^[73] e colaboradores utilizaram a cromatografia eletrocínética micelar para determinar simultaneamente xantinas e 5-ACQ, em amostras de erva mate. O detector utilizado foi o do tipo “diode array detector”, cada componente foi recolhido separadamente e então identificado através da espectrometria de massas (EM). O limite de detecção encontrado foi de 10^{-16} - 10^{-17} mol.L⁻¹.

A eletroforese por zona capilar também foi utilizada por Vaher e Koel^[74], para separarem e identificarem compostos polifenólicos antioxidantes de ervas japonesas, cultivadas na Estônia. O 5-ACQ esteve entre os compostos identificados.

1.5.7. Técnicas Voltamétricas

Blasco^[75] e colaboradores utilizaram a voltametria de pulso diferencial em eletrodo de carbono vítreo para caracterização analítica de antioxidantes naturais polifenólicos (ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides). A oxidação eletroquímica dos ácidos cafêico e clorogênico (conteúdo total) foi favorecida em tampão Britton Robinson pH 2. No entanto, este estudo não permitiu a discriminação de cada um destes compostos, pois o potencial de pico foi o mesmo para ambos. Além disso, esta metodologia só pode ser aplicada qualitativamente para identificação destes ácidos, em amostras comerciais de suco de pêra e maçã.

Kilmartin e Hsu^[76] também utilizaram técnicas voltamétricas como a voltametria cíclica para o estudo de alguns polifenólicos, como o 5-ACQ. Eles caracterizaram o comportamento ciclovolamétrico dos compostos estudados em eletrodo de carbono vítreo (tampão fosfato pH 7,0). Através da comparação das respostas voltamétricas dos padrões com as amostras de café e chá, identificaram a presença de algumas destas substâncias nas matrizes analisadas. Como foi o caso de 5-ACQ, o qual foi identificado no café. Uma estimativa do conteúdo de 5-ACQ foi realizada através da comparação da corrente da amostra com a do padrão.

Souza^[77] e colaboradores desenvolveram uma metodologia para determinação do conteúdo total de ácido cafêico e clorogênico em suco de laranja. Este método baseia-se na eletrodeposição destes compostos sob a superfície de um eletrodo de carbono vítreo previamente ativada em bicarbonato de sódio. Embora não seja possível discriminar separadamente estes ácidos, este método oferece a vantagem de ser seletivo, pois através desta ativação, não há a interferência do ácido

ascórbico na análise. O limite de detecção encontrado foi 1.10^{-5} mol.L⁻¹, e o conteúdo de ácido clorogênico/ cafêico nos sucos analisados esteve de acordo com os valores reportados na literatura.

Além destes, vários outros estudos tem sido dedicados ao ACGs^[14-15,18,22,27, 78-81] utilizando técnicas voltamétricas, no entanto, o enfoque dado a estes trabalhos tem sido a investigação do comportamento eletroquímico destes compostos e não a determinação. Sendo estes trabalhos de grande importância na elucidação dos mecanismos de oxidação destes compostos.

Como pode ser observado, vários métodos para determinação dos ácidos clorogênicos têm sido propostos no decorrer dos últimos anos, no entanto, mesmo com uma grande diversidade de técnicas empregadas neste intuito, a participação das técnicas voltamétricas ainda é muito pequena se considerado a sua grande versatilidade.

Além disto, não existem estudos reportados para determinação voltamétrica destes compostos utilizando a sua redução eletroquímica. Somente um único trabalho foi encontrado na literatura^[82] reportando o desenvolvimento de uma metodologia para análise o ácido cinâmico (ACIN), baseada na sua redução. Neste trabalho, analisou-se eletroquimicamente (eletrodo de Hg) este ácido em amostras de urina, com limite de detecção de 0,1 µg.mL⁻¹. O sucesso no desenvolvimento dessa metodologia ocorreu em virtude do uso sais de amônio quaternário, como o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (BrCTA).

1.6. *Surfactantes*

São moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar).^[83]

A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada também chamada de “cauda”, e consiste de uma ou mais cadeias hidrocarbônicas, usualmente com 6-22 átomos de carbono, sendo que essas cadeias podem ser lineares ou ramificadas.^[83-85]

A porção polar, também denominada de “cabeça” a qual pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica e anfótera. [83-85]

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Estas propriedades fazem com que os surfactantes sejam adequados para uma ampla gama de aplicações: nas indústrias como função de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão das fases, flotação mineral, inibição de corrosão e em eletroquímica [83-85], onde têm contribuído consideravelmente nos mais diversos estudos, como é descrito mais a frente.

Quando a concentração de surfactantes solúveis é aumentada em água, propriedades físicas tais como condutividade e tensão superficial apresentam um formato descontínuo, essas descontinuidades indicam a formação de agregados dinâmicos de moléculas de surfactantes, chamadas micelas. Para valores abaixo da Concentração Micelar Crítica (CMC) os surfactantes encontram-se na forma de monômeros. [84]

Valores de CMC para surfactantes comumente utilizados estão na faixa de 10^{-4} a 10^{-2} mol.L⁻¹. A adição de sais a solução normalmente diminuem o valor da CMC.

Acima da CMC, a estrutura micelar é considerada sendo globular ou esférica e cilíndrica, em presença de água. Sua estrutura apresenta-se com parte hidrofóbica voltada para o centro da micela, enquanto a cabeça (porção hidrofílica) é voltada para o solvente, contudo, a estrutura exata das micelas ainda é controversa. [84]

Quando os surfactantes são dissolvidos em solventes apolares formam agregados com a cauda em face com o solvente, são as chamadas micelas reversas.

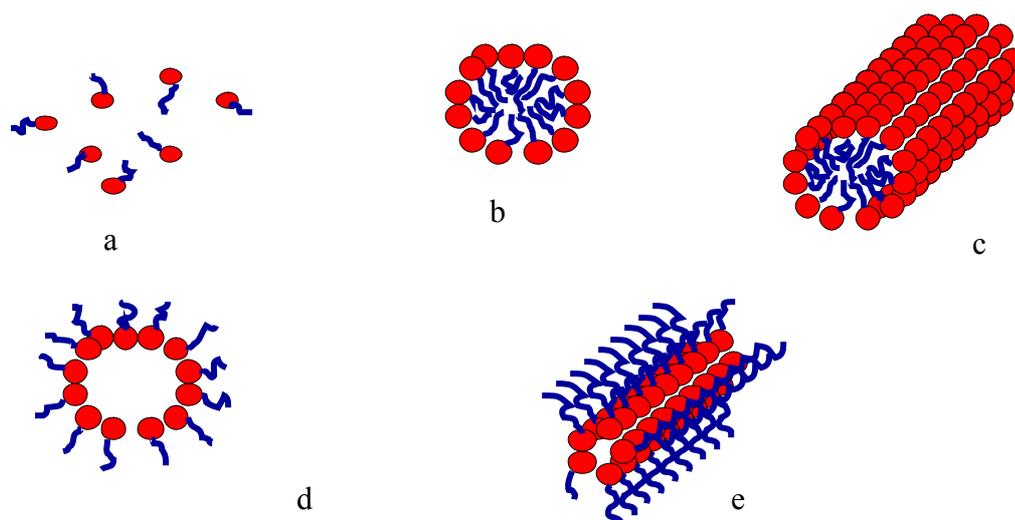


Figura 4: Estruturas de surfactantes: (a) monômeros, (b) micela esférica, (c) micela cilíndrica, (d) micela esférica reversa, (e) micela cilíndrica reversa.

1.6.1. Classificação dos surfactantes

Uma classificação bastante aceita e cientificamente encontrada para os surfactantes é baseada na dissociação destes compostos em água. ^[85]

a) Surfactantes aniônicos: são dissociados em água na forma de um ânion (parte hidrofóbica), e um cátion, o qual geralmente é um metal alcalino (Na^+ , K^+) ou amônio quaternário.

b) Surfactantes não-iônicos: não ionizam em solução aquosa, porque o seu grupo hidrofílico é de um tipo não-dissociável, tal como álcool, fenol, éter, éster, ou amida.

c) Surfactantes catiônicos: são dissociados em água em um cátion e um ânion, normalmente, um halogênio. Uma grande porção dessa classe corresponde a compostos de nitrogênio, tal como amônio quaternário, com uma ou várias cadeias do tipo alquila.

d) Surfactantes anfóteros: São moléculas que se dissociam tanto em cátions, como ânions. É o caso de produtos sintéticos como betaínas ou sulfobetaínas e substâncias naturais tais como aminoácidos e fosfolípidos.

1.6.2. *Uso de surfactantes em estudos eletroquímicos*

As soluções de surfactantes têm encontrado aplicações na eletroquímica há mais de 50 anos.^[84,86]

Em polarografia, surfactantes tais como Triton X-100 tem sido utilizados como agentes supressores de máximos polarográficos. No que diz respeito às aplicações modernas dos surfactantes, estes têm sido incluídos em sínteses eletroquímicas, catálise, decomposição de poluentes, análises e decomposição de filmes, dentre outros.^[84,86]

A presença de surfactantes em reações de transferência eletrônica entre substâncias eletroativas e eletrodo pode ter grande efeito na cinética de transferência eletrônica dessa reação.^[84,86-88]

No entanto, a maior influência dos surfactantes na velocidade de transferência eletrônica esta relacionada ao bloqueamento dos eletrodos por estas moléculas, ou pelas interações eletrostáticas entre solutos e moléculas de surfactantes adsorvidas na superfície eletródica.^[84,86]

A adsorção de surfactantes em eletrodos e solubilização de compostos em agregados micelares pode significar variações no potencial redox, na corrente de pico, variação dos coeficientes de transferência de carga, nos coeficientes de difusão dos processos eletródicos, assim como a estabilização de intermediários eletrogerados.

[8 4 , 8 6 -87]

1.7. OBJETIVOS

Considerando a grande potencialidade das técnicas eletroquímicas no desenvolvimento de metodologias para análises de diversas substâncias eletroativas a baixas concentrações, a carência de estudos eletroquímicos envolvendo a redução do ácido 5-cafeoilquínico (ACLO) (Estrutura Química-Página 4), assim como a grande importância desse antioxidante natural amplamente distribuído em dietas de origem vegetal, este trabalho tem por objetivo:

- Desenvolver metodologias eletroanalíticas para determinação do antioxidante ACLO em matrizes alimentares amplamente consumidas no dia a dia, como café e chá, visando obter um método simples, rápido, de baixo custo e suficientemente sensível para determinar o teor desse antioxidante nessas amostras.
 - Investigar a interação desses antioxidante com diferentes surfactantes, considerando o sucesso do uso destes compostos na redução do ácido cinâmico (ACIN).
 - Investigar o comportamento eletroquímico para redução do ACLO através de técnicas voltamétricas em meio aquoso sobre a superfície do eletrodo de mercúrio, comparando com compostos da mesma classe como o ácido cinâmico (ACIN) e o ácido cafêico (ACAF).
 - Investigar o desenvolvimento de uma metodologia para determinação simultânea dos ACLO com ACAF através da redução destes; considerando o fato de que metodologias para determinação baseadas na oxidação não obtiveram sucesso na distinção do conteúdo desses compostos, quando presentes em uma mesma amostra.
-

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água foi purificada com um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore).

As soluções dos padrões de ACAF E ACLO, ACIN (Sigma Aldrich) foram preparadas separadamente na concentração $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em balão volumétrico de 10 mL, através da pesagem de quantidades apropriadas das substâncias, e dissolução em metanol. As soluções foram estocadas em vidro escuro e mantidas sob refrigeração até a sua utilização.

As soluções de trabalho foram preparadas por diluição da solução estoque em metanol, momentos antes da utilização ou por adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte.

As soluções dos surfactantes, catiônico brometo de cetiltrimetil amônio (Serva), aniônico lauril - dodecil sulfato de sódio (Sigma) e neutro Triton X-100 (Riedel-de-Haën) foram preparadas através da pesagem direta e/ ou dissolução até a concentração pretendida em balão volumétrico com água do sistema MILLI-Q.

As soluções dos tampões usadas como eletrólito suporte foram preparadas da seguinte forma:

Tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ mol. L}^{-1}$: foram misturados, ácido acético $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck), ácido bórico $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck), ácido ortofosfórico $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck). O ajuste do pH desejado foi realizado com hidróxido de sódio $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$ (Merck).

Tampão acetato $0,04 \text{ mol. L}^{-1}$: ácido acético $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck) e NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (Merck) para ajuste de pH.

Tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$: ácido ortofosfórico $0,04 \text{ mol. L}^{-1}$ (Merck) e NaOH $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$ (Merck) para ajuste de pH.

O reagente de Carrez^[89-90] utilizado para tratamento e limpeza da amostra de café solúvel é constituído de duas soluções:

Solução 1: Solução de acetato de zinco (Laboratory Chemicals) 21,9% (p/v), contendo 3 % (v/v) de ácido acético glacial (Merck), solubilizado em água.

Solução 2: solução 10,6% de ferrocianeto de potássio (Q.M.[®] F. Maya S. A. Industria e Comércio) solubilizado em água.

2.2. Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato μ Autolab TYPE II (ECO CHEMIE BV) acoplado a um sistema de multi eletrodos Metrohm 663 VA Stand equipado com um software GPES para aquisição dos dados. O eletrodo de trabalho, o eletrodo de mercúrio foi usado no modo de gota pendente (HMDE) para medidas de Voltametria de Onda Quadrada e no modo gotejante (área: 0,52 mm²) para as medidas de Polarografia de pulso Diferencial, Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de referência e carbono vítreo como eletrodo auxiliar.

As medidas de pH foram realizadas em um titulador automático Titroline alpha (Shott) no modo “MEDIDAS de pH”, o qual é dotado de um agitador magnético TM 125 Shott.

Um ultra-som UNIQUE modelo ultrasonic cleaner foi utilizado para dissolução dos reagentes e para descongelamento das soluções antes das análises.

2.3. Procedimento para medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas geralmente foram realizadas em uma cela eletroquímica, contendo 10 mL do eletrólito suporte, este foi então desaerado por 10 minutos com N₂ para minimizar a presença de oxigênio em solução. Utilizando então o eletrólito desaerado, foram registradas as medidas polarográficas e voltamétricas, no intervalo de potencial de trabalho mais adequado para cada medida.

Após registradas as medidas para o eletrólito suporte, foram então adicionadas soluções padrão na concentração desejada de ACLO e/ ou ACAF, dependendo do estudo

em questão, a solução foi então desaerada novamente, por um tempo de 20 segundos e então novas medidas eletroquímicas foram então registradas.

2.4. Procedimento para tratamento da amostra de café solúvel

Aproximadamente 0,1g da amostra de café solúvel foi dissolvida em aproximadamente 5 mL de uma solução de metanol/água (40% v/v) em um balão volumétrico de 10mL com auxílio de banho ultrassônico por 5 minutos. A esse extrato foi então adicionado 400 µL de cada uma das soluções do reagente de Carrez, após isso, o volume foi então completado com a solução metanol/ água, a solução foi então agitada vigorosamente e deixada em repouso por 10 minutos. Esta solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo (Schleicher & Schüll) de porosidade 90 mm e em seguida foi filtrada em filtro 0,45 µm (Pró-Análise). Para as análises, o filtrado foi adicionado diretamente a cela eletroquímica (já contendo o eletrólito suporte- 10mL) quando possível, e quando necessário para efetuar as determinações (alta concentração do analito), foi diluído com solução metanol/água (40%).

2.5. Procedimento para obtenção da amostra de chá de erva mate.

Aproximadamente 0,3 g do chá foi pesado e em seguida aproximadamente 7 mL de metanol foram adicionados sob essa massa; esse conteúdo foi levado então a um banho ultrassônico por 10 minutos. Após esse processo, o extrato foi então filtrado em papel filtro quantitativo (Schleicher & Schüll) de porosidade 90 mm, sendo o filtrado obtido então transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com metanol. Para as análises, essa solução foi adicionada diretamente a cela eletroquímica (já contendo o eletrólito suporte- 10mL) quando possível, e quando necessário foi então diluída adequadamente com metanol para assim poder efetuar as análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Redução eletroquímica do Ácido Clorogênico

A redução eletroquímica de ACLO foi investigada inicialmente em meio aquoso de tampão fosfato pH 6,01 ($0,04 \text{ mol. L}^{-1}$), através das técnicas de Polarografia de Pulso Diferencial (PPD) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ).

Como pode ser observado na **Figura 5**, após varredura no intervalo de -1,20 a -1,80 V *versus* Ag /AgCl, o ACLO ($2,14 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) apresentou um único pico de redução em ambas as técnicas utilizadas, em aproximadamente -1,64 V para PPD e -1,68 V para VOQ.

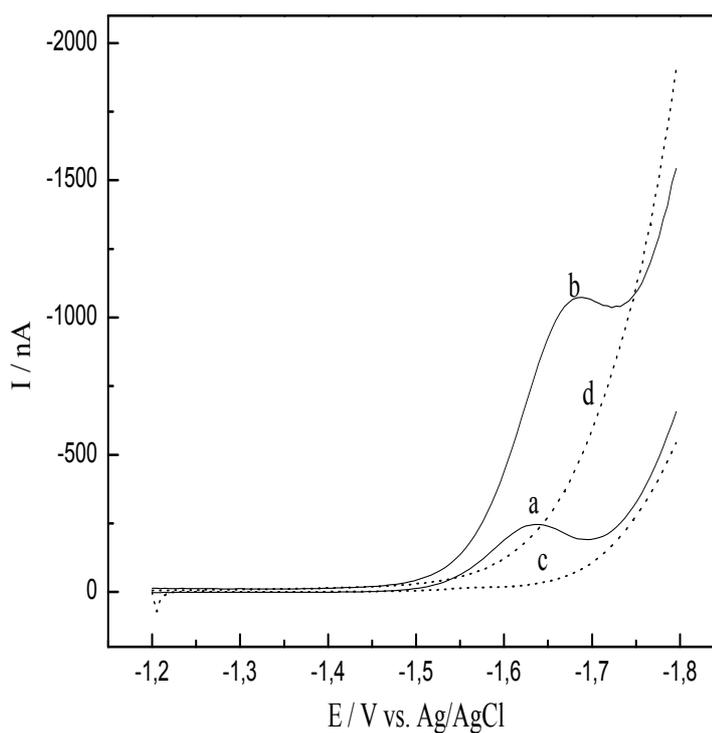


Figura 5: Redução eletroquímica de ACLO ($2,14 \cdot 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$) através das técnicas de: (a) PPD e (b) VOQ, em presença do eletrólito tampão fosfato pH 6,01 ($0,04 \text{ mol. L}^{-1}$), o qual é mostrado pelo polarograma (c) e pelo voltamograma (d).

O potencial altamente negativo e muito próximo à descarga do eletrólito contribuiu para a pouca definição do pico de redução deste composto, sob as condições estudadas. Este comportamento mostrou-se bastante similar ao obtido para redução do Ácido Cinâmico.^[82]

O ACLO, assim como outros derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (**Figura 2**) apresentam sua redução bastante dificultada em virtude do efeito indutivo de elétrons dos grupos hidroxila *orto/para* na dupla ligação, a qual é conjugada ao anel aromático.^[77]

Esse efeito indutivo é responsável pelo aumento da densidade eletrônica na dupla ligação, dificultando a sua redução. Esse comportamento é então refletido em um potencial de pico altamente negativo para redução desses compostos^[77], característica essa que levaria a supressão do sinal analítico, quando fosse aplicado em análises de amostras reais.

Assim, na tentativa de proporcionar condições favoráveis para redução do ACLO, e considerando o sucesso do uso do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio - BrCTA (**Figura 6**) na redução do Ácido Cinâmico^[82], investigouse a influência deste surfactante na redução de ACLO.

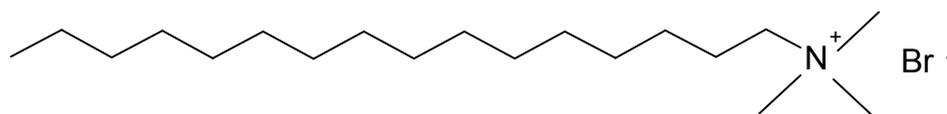


Figura 6: Estrutura química do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (BrCTA).

O estudo da influência do surfactante BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, na redução de ACLO foi realizado em meio aquoso, tampão fosfato pH 6,01 ($0,04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) através das técnicas de PPD e VOQ.

Como observado na **Figura 7**, o surfactante catiônico influenciou marcadamente a redução do ACLO, para ambas as técnicas utilizadas, PPD e VOQ. A presença de BrCTA na redução deste ácido não somente aumentou a corrente de pico

(I_p), como também promoveu um grande deslocamento no potencial de pico (E_p), aproximadamente 219 mV para PPD e 203 mV para VOQ.

Como apresentado na **Figura 8**, em concentrações menores a redução de ACLO não foi observada. Somente quando adicionado o surfactante catiônico foi possível visualizar o pico de redução deste antioxidante, já bastante deslocado da descarga do eletrólito em aproximadamente -1,43 V para PPD e -1,38V em VOQ, em virtude da ação de BrCTA, como demonstrado anteriormente.

Portanto, o uso do surfactante BrCTA para o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de ACLO através da sua redução, mostra-se de fundamental importância, já que não somente promove o deslocamento do E_p para valores menos negativos afastando da descarga do eletrólito suporte, como também favorece a redução deste ácido em concentrações menores, proporcionando condições para sua aplicação em matrizes como café e chá, visto que não há interferência da descarga do eletrólito com o pico de redução do ACLO.

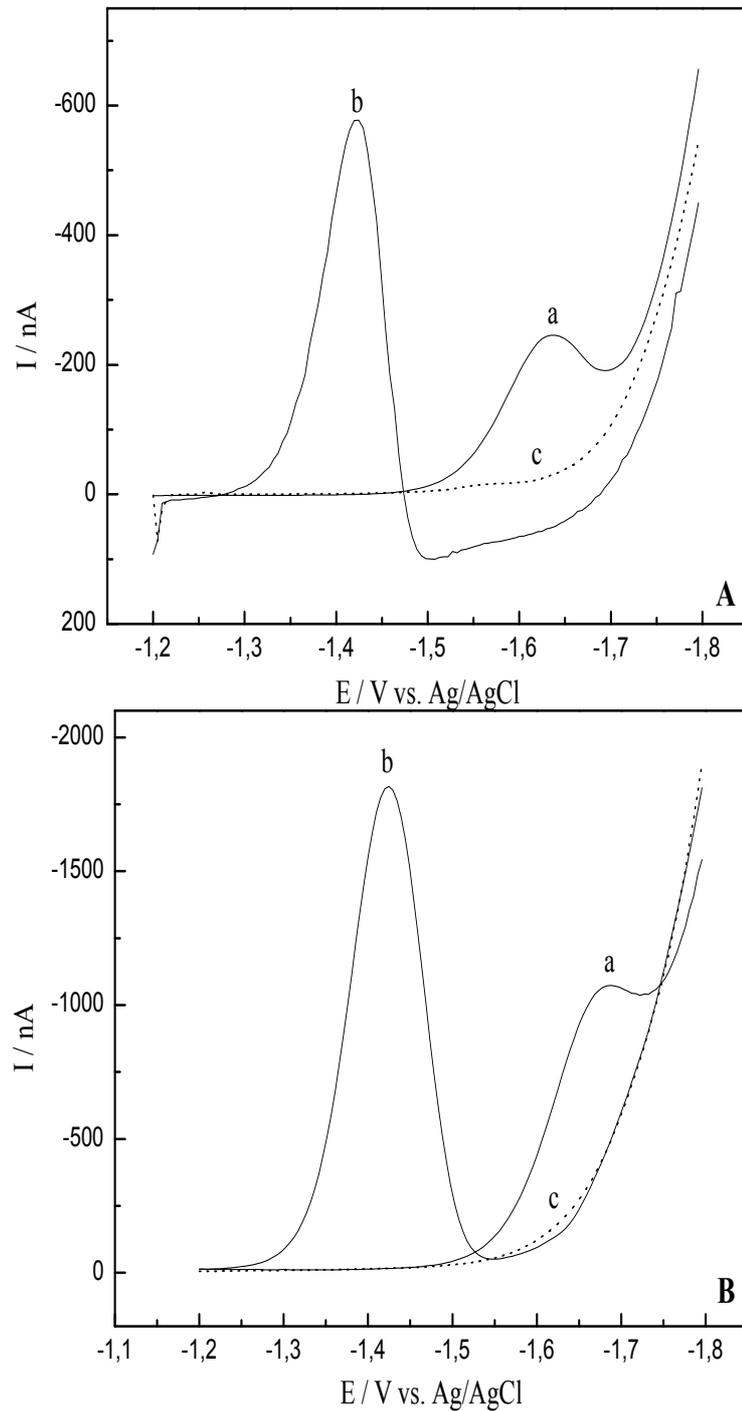


Figura 7: Redução eletroquímica de ACLO ($2,14 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) através das técnicas de (A) PPD e (B) VOQ, onde: (a) na ausência do surfactante, (b) na presença de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) e eletrólito tampão fosfato pH 6,01 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), respectivamente.

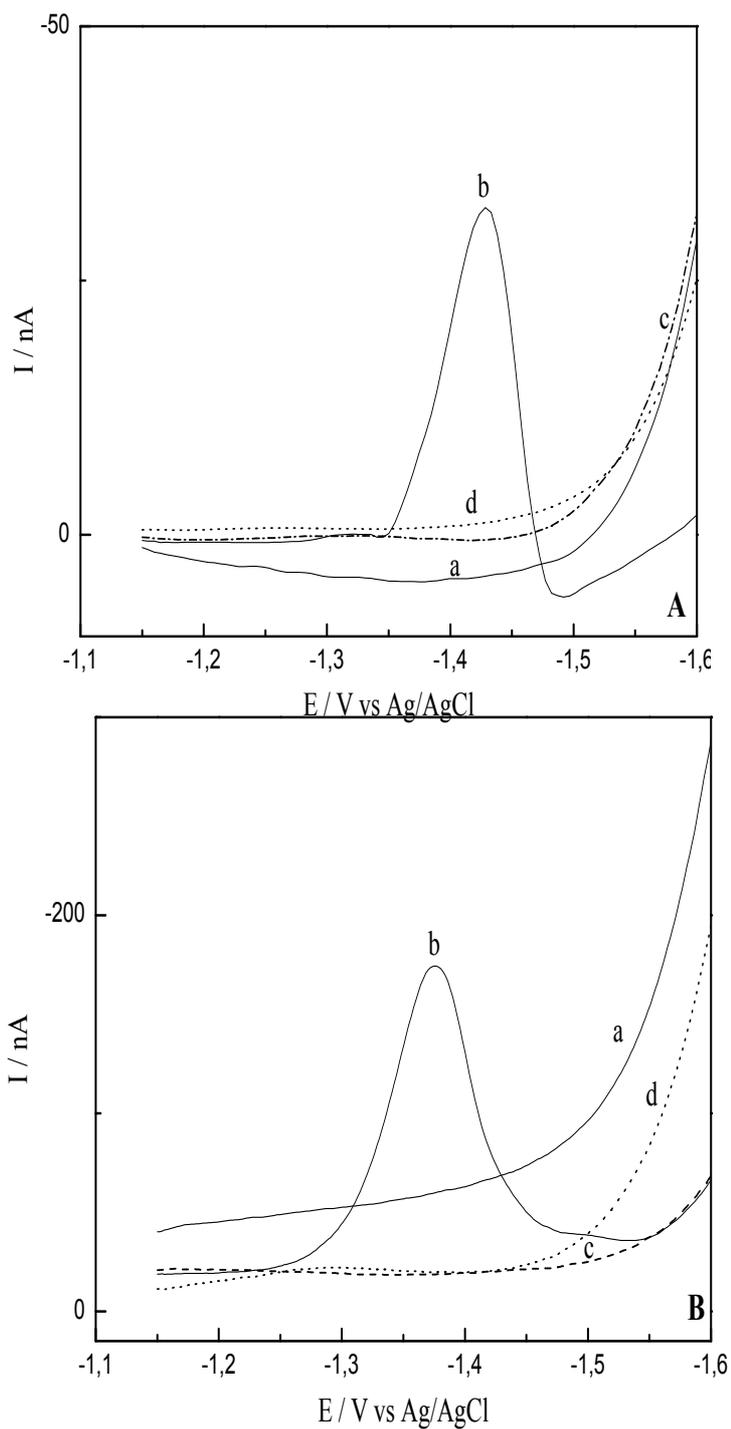


Figura 8: Redução eletroquímica de ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) através das técnicas de (A) PPD e (B) VOQ, onde: (a) na ausência do surfactante, (b) na presença de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) somente BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (d) eletrólito tampão fosfato pH 6,01 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), respectivamente.

3.2. Influência de diferentes tipos de surfactantes

Considerando o sucesso do uso do surfactante catiônico BrCTA na redução de ACLO, avaliou-se também a influência de outros tipos de surfactantes neste processo, para isso foram utilizados os surfactantes aniônico e neutro, dodecil sulfato de sódio (SDS) e o surfactante neutro Triton X-100, respectivamente (**Figura 9**).

No entanto, nenhum destes surfactantes contribuiu satisfatoriamente para o processo de redução de ACLO como pode ser observado na **Figura 10**.

O surfactante SDS não promoveu nenhum deslocamento significativo no E_p , enquanto que, o surfactante Triton X-100 promoveu o deslocamento de E_p para valores ainda mais negativos. Esse comportamento provavelmente ocorre em virtude da adsorção do surfactante Triton X-100 a superfície eletródica, dificultando a redução de ACLO e, portanto deslocando seu E_p para valores mais negativos. No caso do surfactante SDS, o mesmo comportamento não é observado provavelmente em virtude de repulsões eletrostáticas, ou seja, a adsorção do surfactante aniônico é impedida, pois a superfície eletródica já se encontra carregada negativamente.

Desta forma, o uso do surfactante catiônico BrCTA mostrou-se mais adequado na redução eletroquímica do ACLO, do que os surfactantes neutro e aniônico.

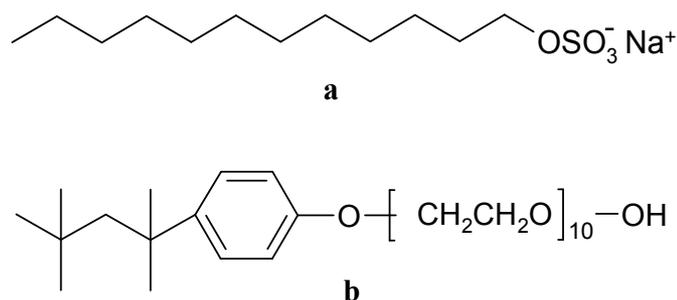


Figura 9: Estrutura química dos surfactantes: (a) Aniônico: dodecil sulfato de sódio (SDS) e (b) Neutro: Triton X100.

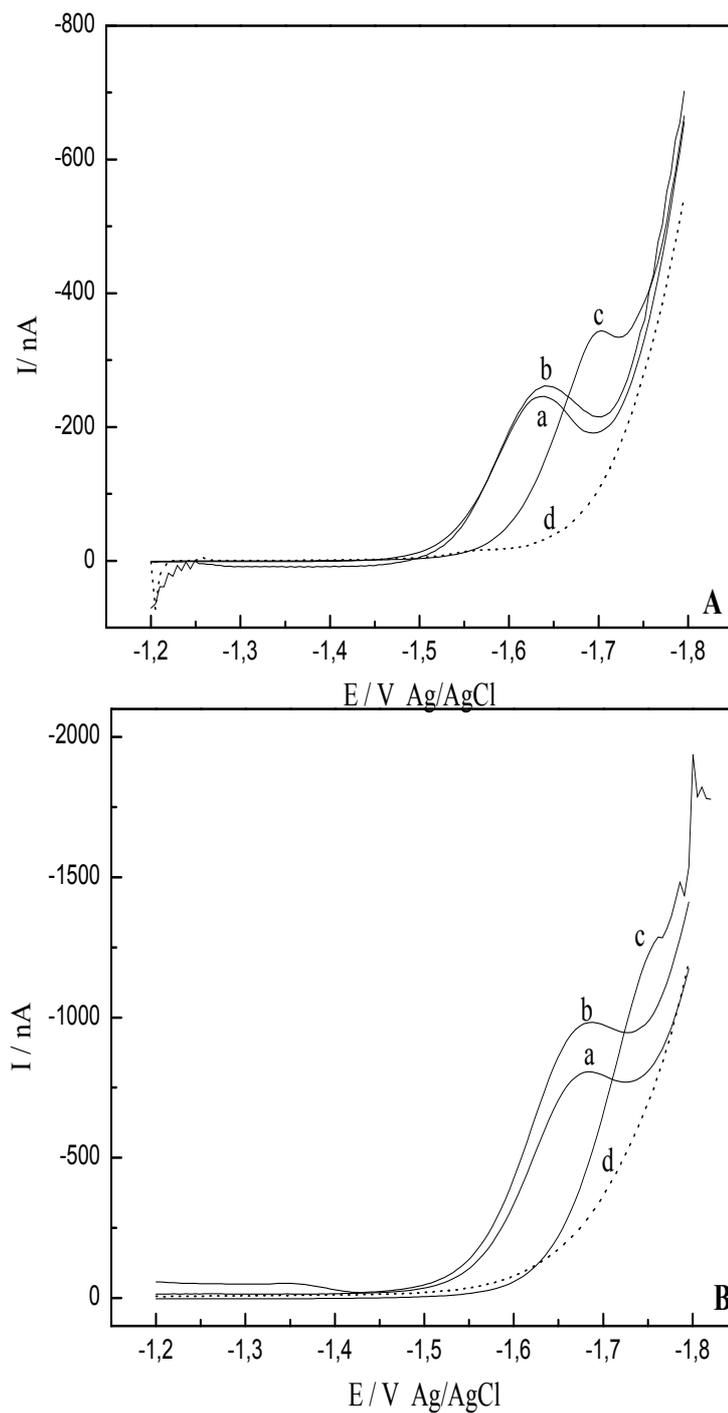


Figura 10: Redução eletroquímica de ACLO ($2,14 \cdot 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$) através das técnicas de (A) PPD e (B) VOQ, onde: (a) na ausência de qualquer surfactante, (b) na presença de SDS, $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) na presença de Triton X-100, $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e (d) eletrólito tampão fosfato pH 6,01 ($0,04 \text{ mol. L}^{-1}$), respectivamente.

3.3. Influência de surfactantes e sais de amônio quaternário.

A influência do tamanho da cadeia carbônica dos íons de amônio quaternário sobre a redução do ACLO ($2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$) foi analisada em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,02, utilizando-se os seguintes compostos: brometo de tetrametilamônio (BrTMA), brometo de tetraetilamônio (BrTEA), brometo de tetradeciltrimetilamônio (BrTDTA) e brometo de cetiltrimetilamônio (BrCTA) (**Figura 11**).

A diferença entre os valores de potencial de pico na ausência e na presença dos respectivos sais de amônio quaternário são apresentados na **Tabela 2 e na Figura 12**. Observou-se a partir desses resultados que, quanto maior o tamanho da cadeia carbônica do sal utilizado, maior é o deslocamento para potencias de pico menos negativos para redução de ACLO.

Como também é possível observar nas **Figuras 12, 13, 14, 15 e 16** os sais de amônio de cadeia carbônica menor, BrTMA e BrTEA favoreceram muito pouco a redução do ACLO, enquanto que os de cadeia maior, BrTDTA e BrCTA, foram responsáveis por um maior efeito sob a redução deste ácido, já que proporcionaram um maior deslocamento dos potenciais de pico para valores menos negativos.

Além disso, os surfactantes BrTDTA e BrCTA também contribuíram para a maior definição do pico de redução e portanto maior corrente de pico do ACLO, sendo que para ambas as técnicas utilizadas, PPD e VOQ, esse processo foi constatado.

Esse comportamento pode ser explicado através da adsorção e formação de filmes condensados de surfactantes catiônicos de amônio quaternário sob a superfície do eletrodo de mercúrio, em regiões de potencial altamente negativo^[91-92]. Nestas condições a parte polar da molécula está orientada para a superfície do eletrodo, enquanto que as cadeias hidrocarbônicas apontam para a solução, ocorrendo assim a interação entre as caudas das moléculas, sendo esta interação de “empilhamento” das cadeias carbônicas, responsável pela estabilização da camada de sais de amônio criada sob a superfície eletródica.^[91]

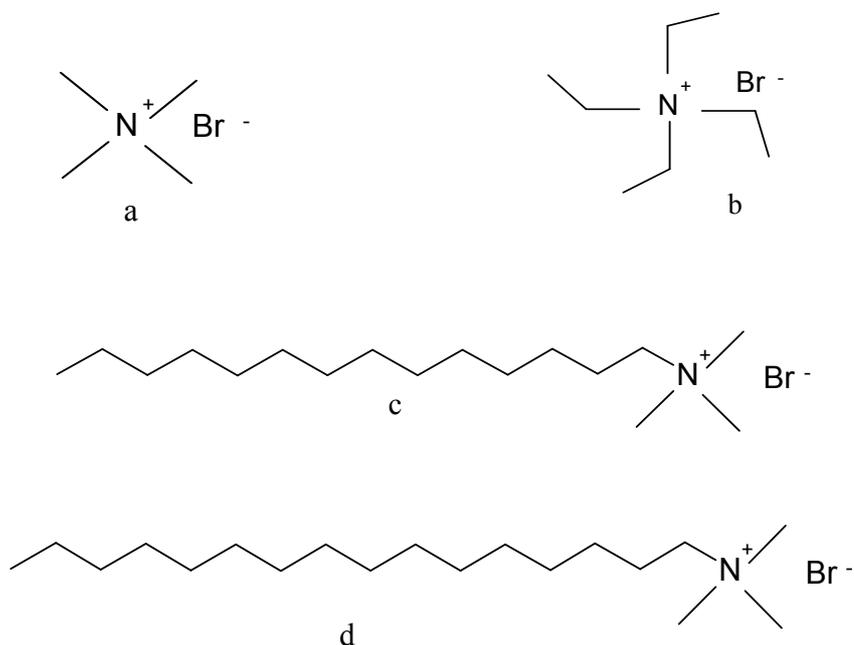


Figura 11: Estrutura química dos sais de amônio quaternário, onde (a) brometo de metiltrimetilamônio, (b) brometo de tetraetil amônio, (c) brometo de tetradeciltrimetil amônio, (d) brometo de cetiltrimetil amônio.

As interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas se sobrepõem as repulsões eletrostáticas entre as cargas dos átomos de nitrogênio na superfície eletródica. Essa repulsão é atenuada devido a presença de grupos metil ligados aos átomos de nitrogênio. [91]

Desta forma, embora os sais de amônio interajam de forma bastante similar com a superfície de Hg (atração eletrostática), eles não apresentam a mesma similaridade nas interações hidrofóbicas, em virtude dos diferentes tamanhos de cadeia carbônica.

Assim, as maiores constantes de adsorção apresentadas para os sais de cadeias carbônicas maiores são resultado de uma maior hidrofobicidade, a qual resulta em uma interação mais favorável entre as cadeias dos íons dos surfactantes adsorvidos ao eletrodo de Hg, levando a uma maior estabilidade do filme formado sob a superfície eletródica. [91]

Esse comportamento é confirmado por PARIÁ [88], que ressalta que quanto maior a cadeia hidrocarbônica, maiores são as forças de agregação entre as moléculas de surfactantes. Além disso, este autor ressalta que em interfaces sólido-aquosa, interações hidrofóbicas podem existir tanto entre os surfactantes e a superfície, quanto lateralmente, entre as próprias moléculas dos surfactantes adsorvidos.

Com base em todas essas informações é possível propor que a redução do ACLO foi mais favorável na presença dos surfactantes BrTDTA e BrCTA, por que esses compostos possuem cadeias carbônicas maiores que BrTMA e BrTEA, sendo assim adsorvidos mais efetivamente no eletrodo de Hg, o que permite a este ácido interagir mais efetivamente com a superfície eletródica (sofrendo pré-concentração), e portanto ser reduzido mais facilmente.

Tabela 2: Influência de sais de amônio quaternário ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) no potencial de pico para redução de ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH 6,02 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), sob as técnicas de PPD e VOQ.

Surfactante	E_p/V (PPD)		$\Delta E_p/V$ (PPD)	E_p/V (VOQ)		$\Delta E_p/V$ (VOQ)
	sem surfactante	com surfactante		sem surfactante	com surfactante	
BrTMA	-1,61	-1,60	0,01	-1,66	-1,64	0,02
BrTEA	-1,61	-1,58	0,03	-1,66	-1,62	0,04
BrTDTA	-1,61	-1,39	0,22	-1,66	-1,45	0,21
BrCTA	-1,61	-1,38	0,23	-1,66	-1,42	0,24

Onde: BrTMA = Brometo de tetrametil amônio; BrTEA = Brometo de tetraetil amônio; BrTDTA = Brometo de tetra deciltrimetil amônio; BrCTA = Brometo de cetiltrimetil amônio.

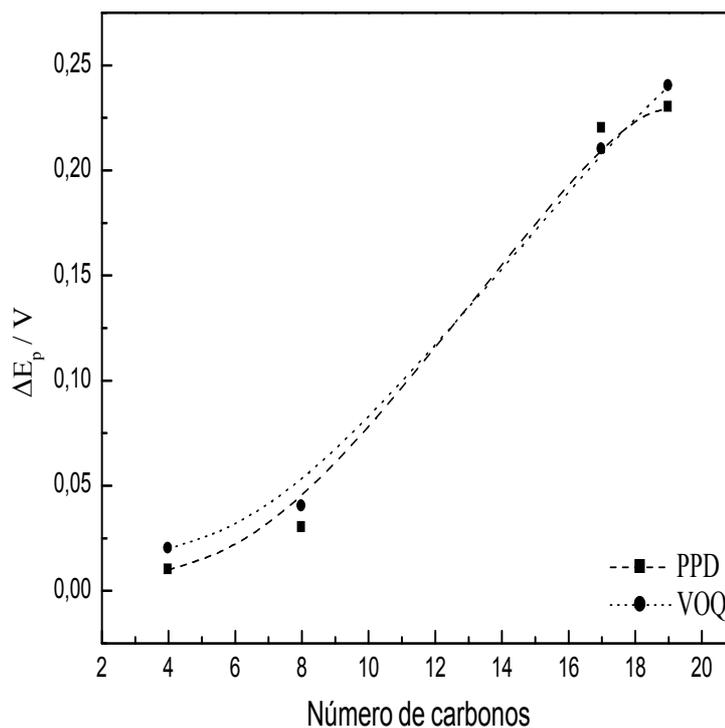


Figura 12: Influência do tamanho da cadeia carbônica (número de carbonos) dos sais de amônio quaternário ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) no deslocamento do potencial de pico (ΔE_p) para redução de ACLO ($2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$); em tampão fosfato, pH 6,02 ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$), sob as técnicas de PPD e VOQ. Onde $\Delta E_p = E_p$ do ACLO na ausência do sal de amônio - E_p de ACLO na presença do sal de amônio.

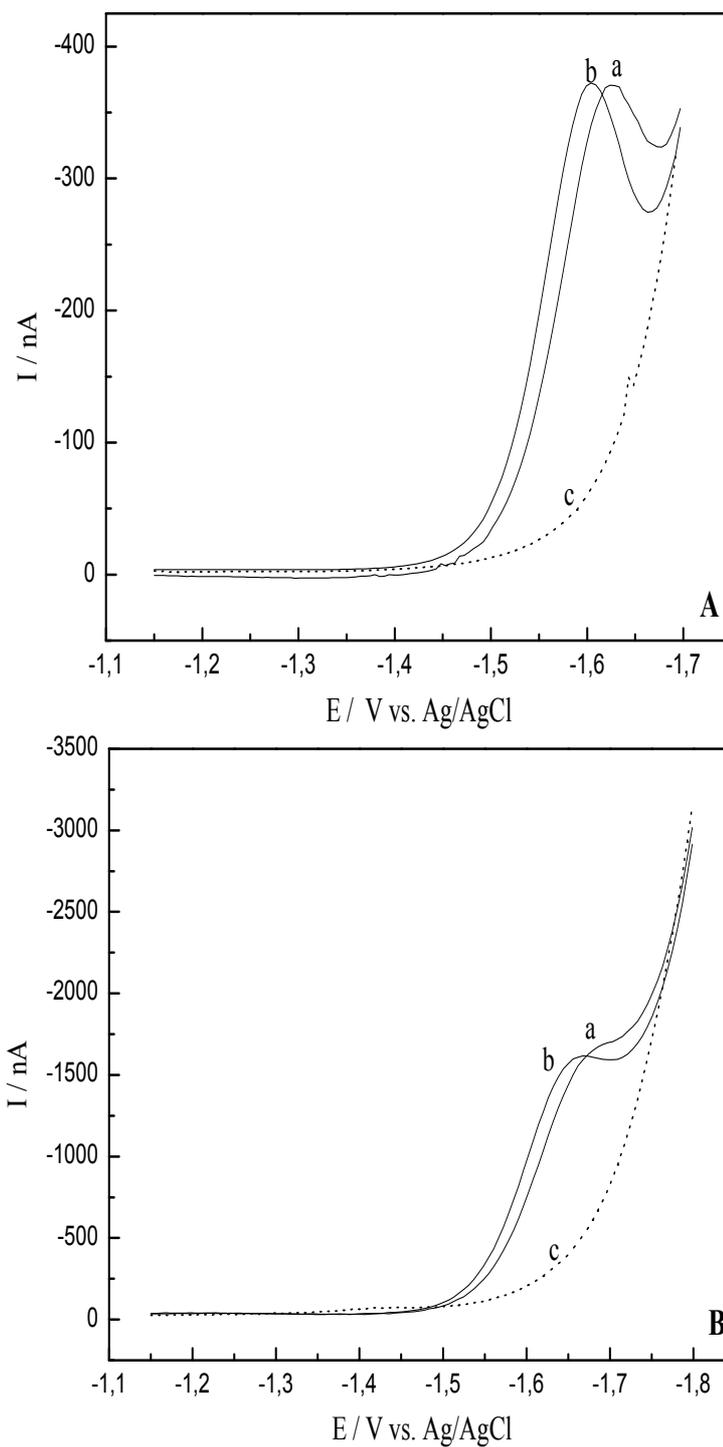


Figura 13: Influência do sal de amônio quaternário brometo de tetrametilamônio BrTMA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO sem BrTMA, (b) com BrTMA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, P P D (A) e VOQ (B), respectivamente.

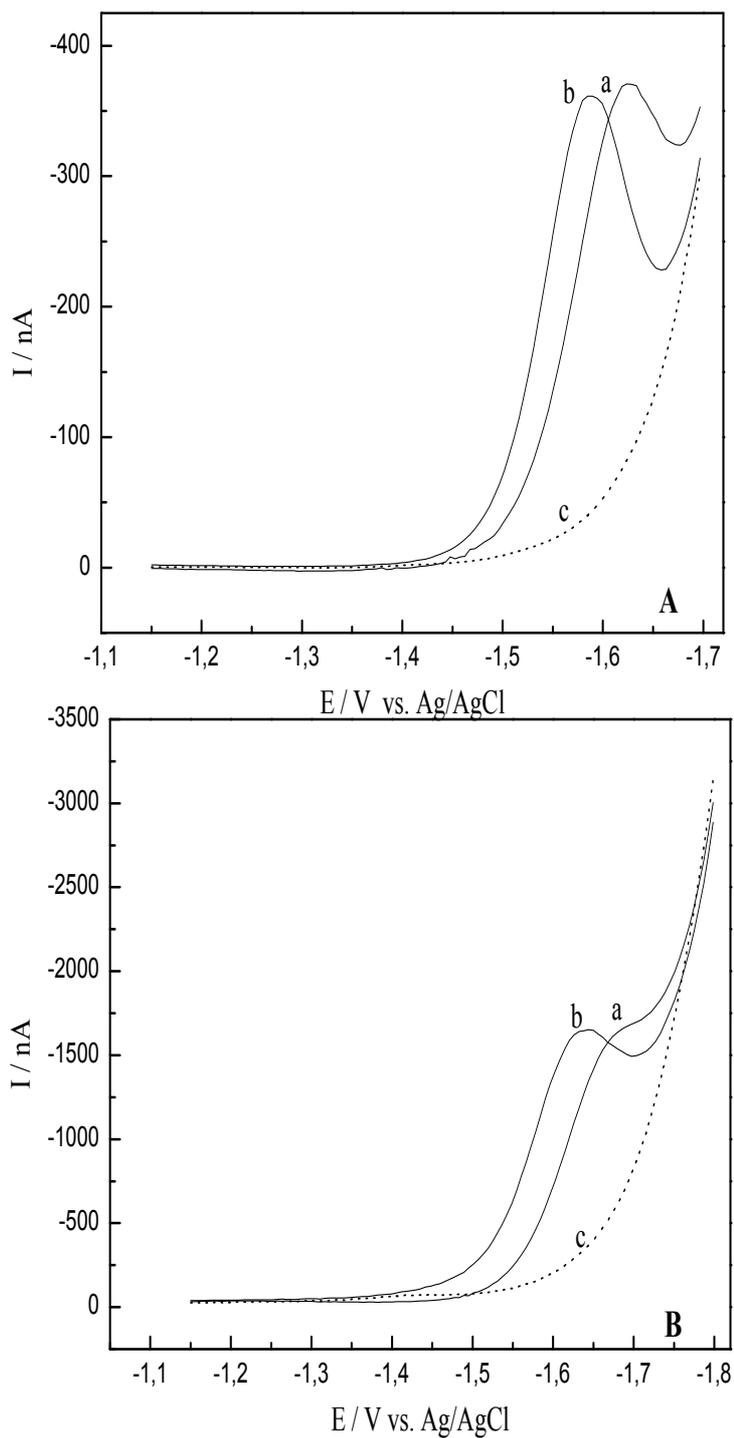


Figura 14: Influência do sal de amônio quaternário brometo de tetraetilamônio BrTEA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO sem BrTEA, (b) com BrTEA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, PPD (A) e VOQ (B), respectivamente.

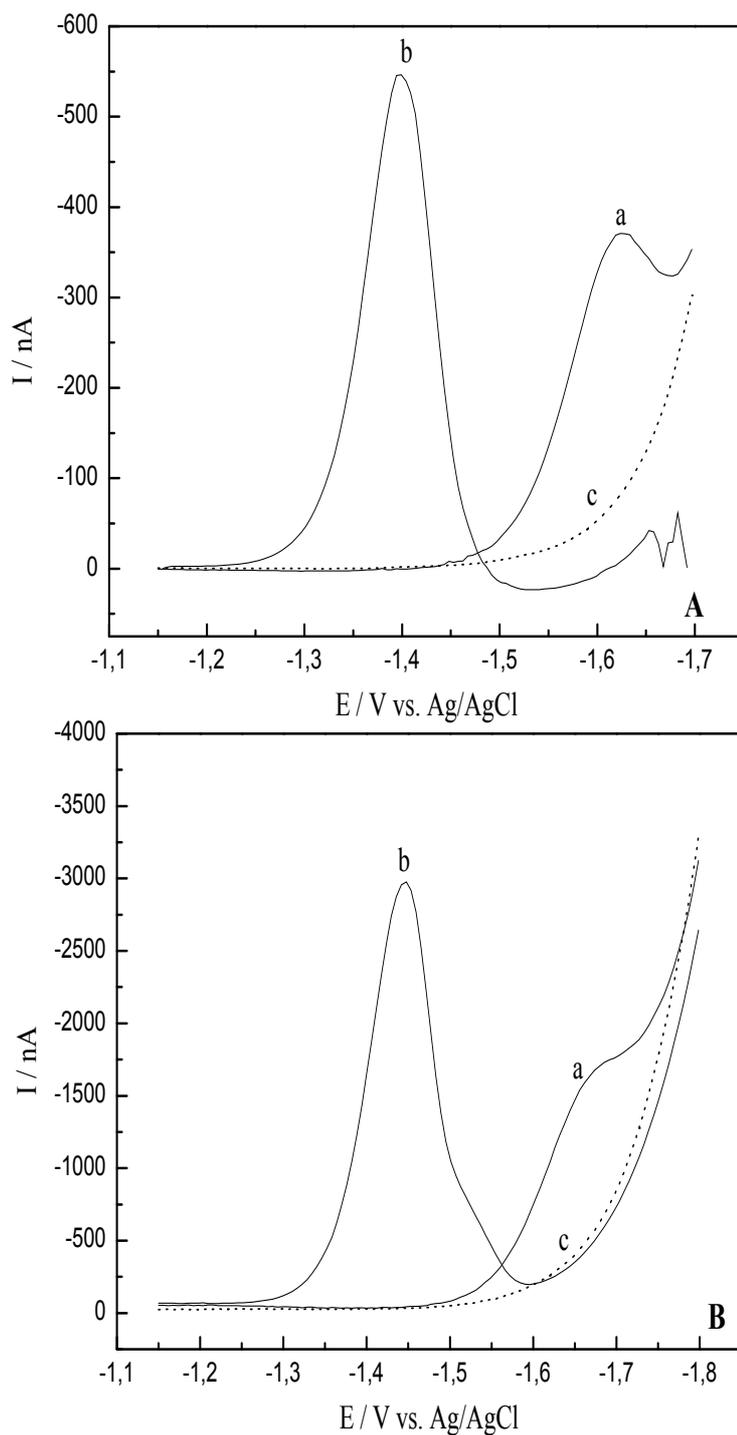


Figura 15: Influência do sal de amônio quaternário brometo de tetradeciltrimetilamônio BrTDTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO sem BrTDTA, (b) com BrTDTA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, PPD (A) e VOQ (B), respectivamente.

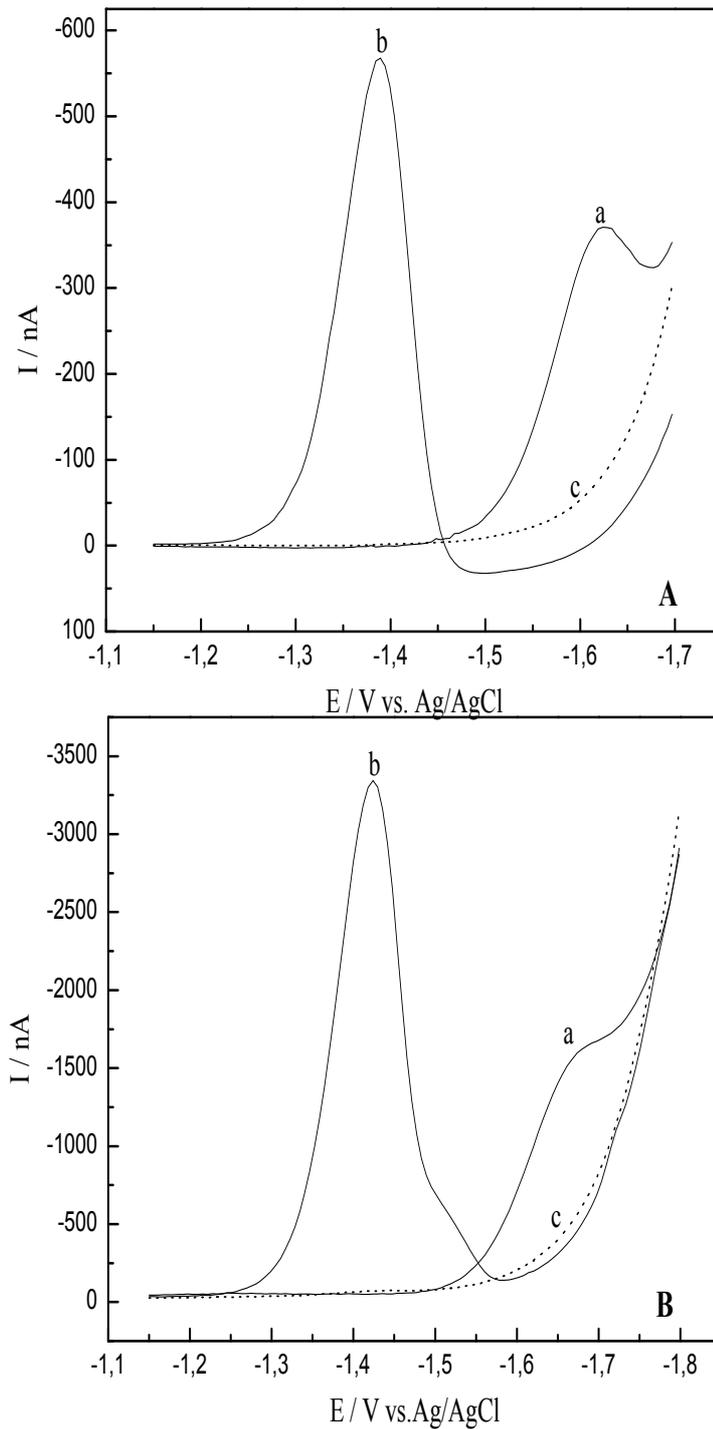


Figura 16: Influência do sal de amônio quaternário brometo de cetiltrimetilamônio BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) na redução do ACLO $2,58 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Onde: (a) ACLO sem BrCTA, (b) com BrCTA, (c) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6,02, em ambas as técnicas estudadas, PPD (A) e VOQ (B), respectivamente.

Portanto, para estudos eletroquímicos e para fins analíticos da redução do ACLO, adotou-se o uso do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio - BrCTA. Considerando que este surfactante catiônico foi responsável pelo maior deslocamento no potencial de pico de ACLO em relação à descarga do eletrólito suporte, em ambas as técnicas voltamétricas utilizadas.

3.4. Efeito do pH do eletrólito suporte.

A redução de ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) foi estudada através das técnicas PPD e VOQ em presença do surfactante BrCTA ($2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), nos pHs de 1,83 e 3,06 em soluções de ácido fosfórico e ácido acético, respectivamente; no intervalo de pH de 4,06 a 5,47, em tampão acetato, de 6,14 a 9,08 em tampão fosfato, e de 10,07 e 11,7 em soluções de ácido fosfórico e NaOH, estando todas as soluções na concentração de $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ aproximadamente.

O comportamento polarográfico e voltamétrico de ACLO é marcadamente influenciado pelo pH do eletrólito suporte, este efeito é ilustrado através dos valores de potencial e corrente de pico apresentados nas **Figuras 17 A e B**.

Como é observado, o aumento do pH do eletrólito suporte proporcionou o deslocamento do potencial de pico para valores mais negativos. Esse comportamento pode ser atribuído à existência de uma reação de pré-protonação acoplada ao processo de transferência eletrônica.^[93]

A análise das **Figuras 17 A e B** mostra que o E_p varia linearmente com o aumento do pH, apresentando três segmentos lineares para ambas as técnicas, evidenciando que íons H^+ estão envolvidos no processo de redução de ACLO.

Além disso, os gráficos de E_p versus pH, apresentam segmentos lineares de diferentes inclinações, onde as abscissas dos pontos de intersecção desses segmentos lineares, são valores de pK_a das formas reduzidas ou oxidadas.^[94]

Os três segmentos lineares encontrados para a influência do pH no potencial de pico de redução de ACLO através de PPD e VOQ são apresentados na **Tabela 3**.

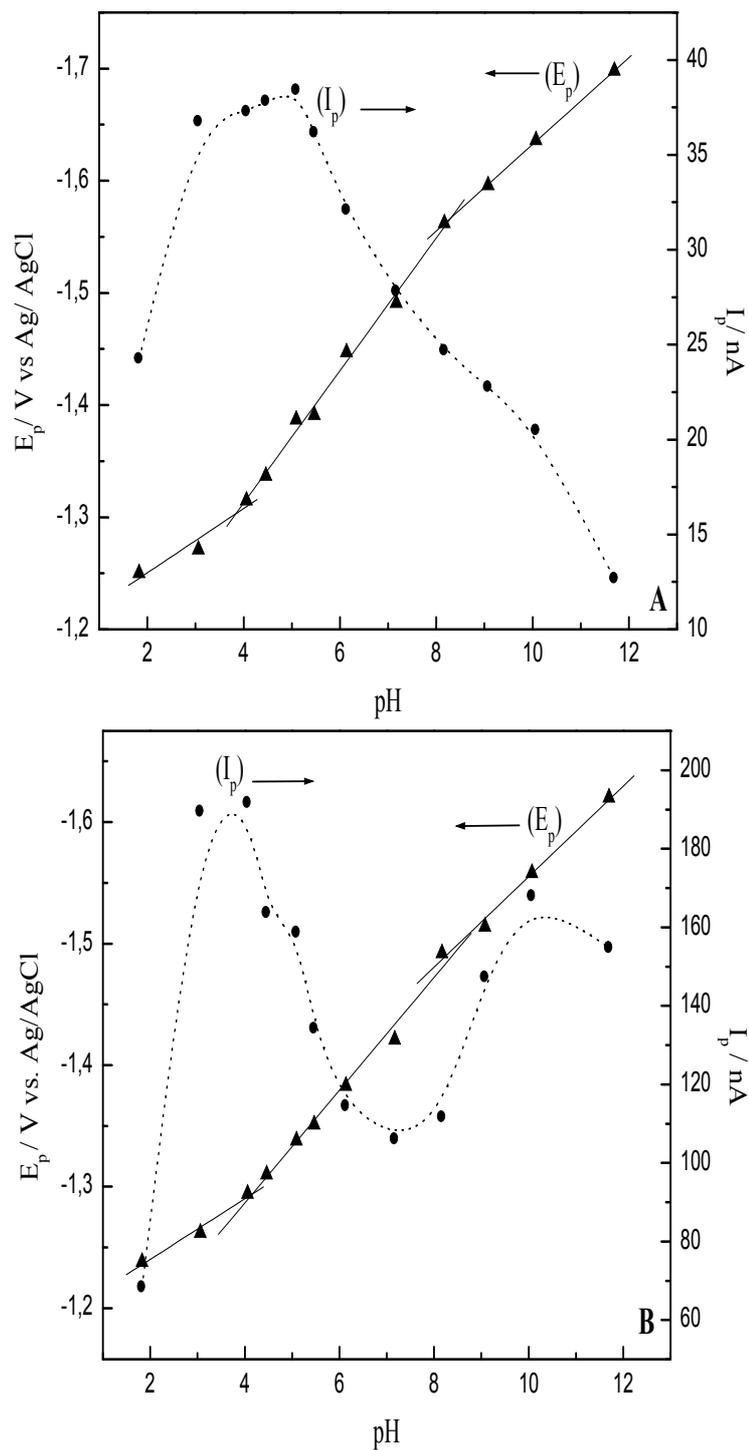


Figura 17: Influência do pH do eletrólito suporte na I_p e E_p de ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), em presença do surfactante BrCTA ($2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), através das técnicas de PPD (A) e VOQ (B).

Tabela 3: Dados obtidos para regressão linear dos três segmentos apresentados no estudo da influência do pH no E_p para redução de ACLO, sob as técnicas de PPD e VOQ.

Intervalo pH	PPD		VOQ	
	$Y = a + bx$ ^(a)	r ^(b)	$Y = a + bx$ ^(a)	r ^(b)
1,83 - 4,06	$1,19 + 0,03 \cdot \text{pH}$	0,966	$1,19 + 0,02 \cdot \text{pH}$	0,989
4,06 - 8,17	$1,08 + 0,05 \cdot \text{pH}$	0,996	$1,10 + 0,05 \cdot \text{pH}$	0,994
8,17 - 11,7	$1,25 + 0,04 \cdot \text{pH}$	0,999	$1,18 + 0,04 \cdot \text{pH}$	0,996

Onde: (a) equação linear; (b) coeficiente de correlação.

No que diz respeito aos pontos de intersecção, como discutido, eles refletem as mudanças de protonação das funções presentes na molécula e, portanto, estão associados aos pK_a s do composto estudado.

Como apresentado na **Tabela 4**, através do estudo da influência do pH no E_p , foi possível obter os primeiros dois valores de pK_a de ACLO, através das técnicas utilizadas, sendo que os valores obtidos através de PPD apresentaram boa concordância com os valores reportados na literatura, já para a técnica VOQ, o primeiro valor de pK_a , apresentou-se em maior discordância com o valor relatado na literatura. Os valores de pK_a correspondem ao grupo carboxílico ($3,35 \pm 0,02$), a hidroxila na posição *para* ($8,2 \pm 0,1$) e a hidroxila na posição *orto* ($12,0 \pm 0,1$) na molécula de ACLO.^[95, 96, 97]

Quanto à influência do pH na resposta da corrente de pico de ACLO, o comportamento entre as duas técnicas apresentou-se um tanto distinto.

Para PPD, observou-se que o gráfico de I_p em função do aumento do pH apresenta três zonas distintas. De pH 2,0 para 3,0 há um ligeiro aumento da I_p , a qual permanece aproximadamente constante até pH 5,5, e a partir do qual sofre um decréscimo gradual.

Na VOQ, a I_p sofre um aumento de pH 2,0 para 3,0, passa por um máximo entre 3,0 e 4,0, e a partir deste valor volta a sofrer um decréscimo gradual até pH 8,0,

onde voltou a crescer. É importante destacar que para valores de pH acima de 8,0, a coloração da solução alterou-se de incolor para amarelada, este comportamento pode estar ligado a oxidação do ACLO (oxidação das hidroxilas).^[95]

Assim, em meio fortemente alcalino, as possíveis diferentes espécies existentes no meio podem ter afetado o comportamento da I_p com aumento de pH, principalmente para técnica de VOQ, a qual é realizada sob uma única gota de Hg (gota estática), diferentemente da PPD, a qual é realizada através do eletrodo gotejante de Hg, propiciando desta forma um comportamento diferente da resposta de I_p com o pH entre as duas técnicas.

Do ponto de vista analítico, a resposta da I_p e do E_p com o pH foi estudada de forma a otimizar um valor definido para o desenvolvimento da metodologia de análise de ACLO. Para isso, vários fatores foram considerados, como a altura de pico e a sua definição.

Na PPD, o pH em que a I_p apresentou-se maior, foi aproximadamente pH 5,0-5,5 enquanto para VOQ esteve pH 4,0, no entanto, embora estes pHs tenham apresentado maiores correntes de pico, sob estes mesmos valores de pH, o pico de ACLO apresentou-se próximo a descarga do eletrólito, como é observado na **Figura 18**. A escolha destes pHs poderia levar a supressão do sinal analítico quando fosse feita a análise de ACLO em amostras reais.

Embora a técnica de VOQ tenha apresentado um aumento da I_p em meio fortemente alcalino, a hipótese de adotar um pH nesta faixa para as análises foi excluída, em virtude do fato da mudança da coloração da solução, e do E_p altamente negativo que foi apresentado neste meio, para a redução de ACLO. Um alto potencial de pico comprometeria a análise do composto na presença da amostra, em virtude do efeito matriz que normalmente antecipa a descarga do eletrólito suporte.

Portanto, o valor de pH adotado para os demais estudos em ambas as técnicas, foi o pH 6,0, que embora não tenha mostrado o maior valor de I_p , apresentou um pico mais simétrico, e mais afastado da descarga do eletrólito se comparado ao meio mais ácido.

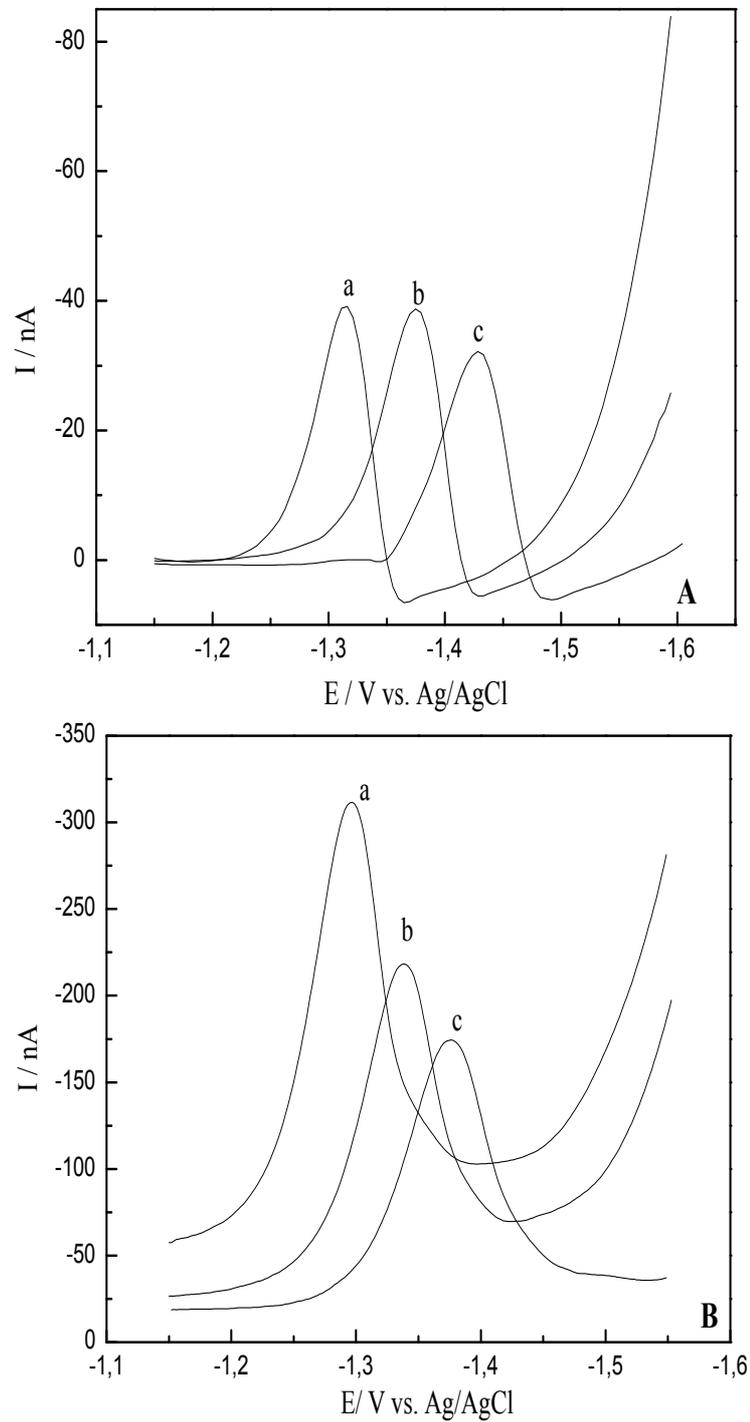


Figura 18: Polarogramas (A) e Voltamogramas (B) para ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em presença de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, para diferentes pHs do eletrólito suporte, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$: (a) pH 4,06; (b) pH 5,09; (c) pH 6,14.

Tabela 4: Valores de pK_a do ACLO, experimentais e abordados na literatura.

Valores de pK_a					
Experimental		Literatura (*)			
PPD	VOQ	Referência 1	Referência 2	Referência 3	Referência 4
3,84	4,29	3,37	3,35	3,35	(-)
8,32	8,57	8,27	8,21	8,30	7,80
(-)	(-)	11,50	12,50	12,06	(-)

Observação: (-) não foi obtido experimentalmente; (*) Referência 1 - (LAMY et al, 1985) [95]; Referência 2 - (KISS et al, 1989) [96]; Referência 3 - (AMÉZIANE et al, 1996) [97]; Estudo 4 - (NAMAZIAN et al, 2005) [78].

3.5. Estudo da redução eletroquímica do ACLO em presença de BrCTA através da técnica de Voltametria Cíclica.

Com objetivo de obter informações sobre o processo eletródico de redução do ACLO em presença do surfactante BrCTA, realizou-se o estudo através da técnica de Voltametria Cíclica (VC), no intervalo de pH de 3,03 a 9,02.

O voltamograma cíclico obtido para uma solução $3,13 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de ACLO em tampão fosfato 0,04 mol.L⁻¹, pH 6,02, no intervalo de -0,10 a -1,75 V vs Ag/AgCl, para varredura no sentido catódico, em eletrodo de Hg e na presença de $2,42 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA, é apresentado na **Figura 19**.

Este voltamograma é caracterizado por um único pico catódico em aproximadamente -1,40 V versus Ag/ AgCl, e pela ausência de picos anódicos na varredura reversa.

A ausência do pico anódico na varredura reversa do ácido ACLO não implica necessariamente que o processo eletródico seja uma transferência eletrônica irreversível [98-100]. Essa característica do voltamograma pode ser decorrente, por exemplo, de uma reação química posterior a transferência eletrônica. Assim sendo, os resultados

ciclovoltamétricos indicam previamente uma transferência eletrônica irreversível ou uma reação química acoplada a transferência de carga.

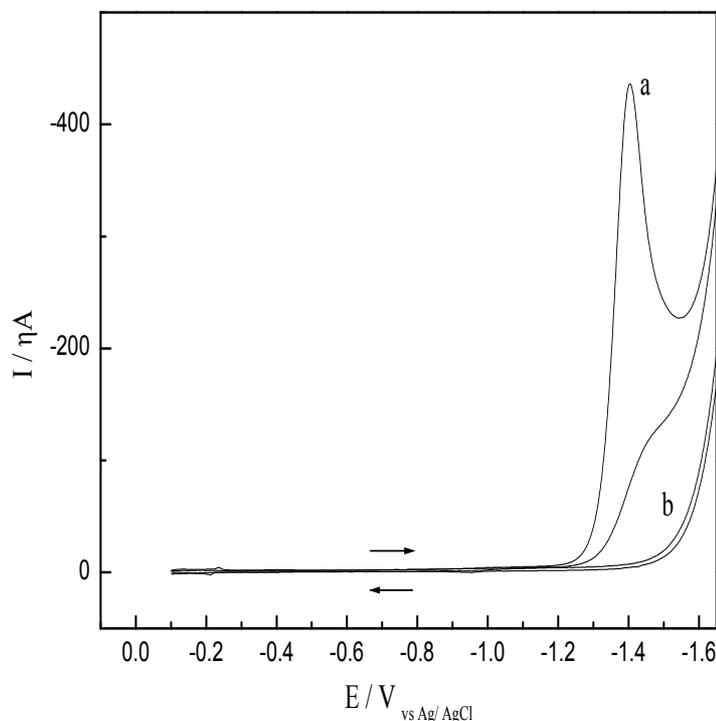


Figura 19: Voltamograma cíclico para: (a) uma solução de $3,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,02 e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), (b) somente o eletrólito suporte.

3.5.1. Diagnóstico do processo eletródico

Um dos parâmetros eletroquímicos utilizados como critério para caracterização do processo eletródico envolvendo desde a reversibilidade das transferências de carga, até a estabilidade de produtos e intermediários eletroativos é a influência da variação da velocidade de varredura de potencial. [98-101]

A natureza do processo eletródico de redução de ACLO foi caracterizada sobre a superfície do eletrodo de mercúrio em presença do surfactante BrCTA, utilizando a

técnica de voltametria cíclica, avaliando-se a influência da velocidade de varredura de potencial.

O estudo do comportamento eletroquímico de ACLO foi realizado avaliando-se a influência da velocidade de varredura de potencial, no intervalo de 10 - 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, no pico de redução de ACLO, em tampão acetato pHs 3,03, 4,02 e 5,02 e nos pHs 6,07, 7,02, 8,03 e 9,02 em tampão fosfato.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução $1,10\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão fosfato, pH 6,07 estão apresentados na **Figura 20**. De acordo com os voltamogramas cíclicos obtidos, verificou-se que a corrente de pico catódica aumentou gradativamente com o aumento de ν , o mesmo comportamento foi observado nos outros valores de pH.

Os parâmetros eletroquímicos utilizados como critérios para a caracterização de processos eletródicos foram extraídos dos voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução $1,10\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ACLO, estão reunidos nas **Tabelas 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11**.

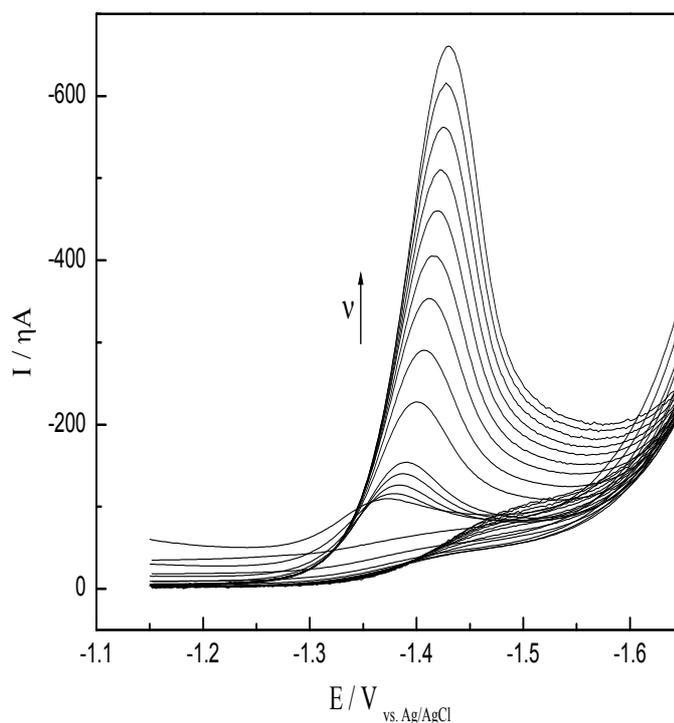


Figura 20: Voltamogramas Cíclicos obtidos para uma solução $1,10\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,02, e em presença de BrCTA ($2,42\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para o aumento de ν de 10 a 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Conforme pode ser constatado pelos dados apresentados (**Tabelas 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11**), um deslocamento dos potenciais de pico catódico (E_{pc}) para valores mais negativos foi observado com aumento da velocidade de varredura de potencial, no entanto esse deslocamento foi mais pronunciado com o aumento do pH do eletrólito suporte (**Figura 21**).

Em sistemas com transferência de carga reversível sem complicações cinéticas, o potencial de pico catódico não apresenta nenhuma variação com o aumento da velocidade de varredura. Entretanto, em sistemas com transferência eletrônica irreversível ou com reações químicas subseqüentes à transferência eletrônica (EC), o potencial de pico desloca-se para valores mais negativos, enquanto que sistemas com reações químicas precedentes à transferência de carga (CE) apresentam um deslocamento de potencial para valores mais positivos.^[98-101]

Tabela 5: Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão acetato pH 3,03 e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

$v / \text{V.s}^{-1}$	I_{pc} / nA	$-E_{pc} / \text{V vs. Ag/AgCl}$	$I_{pc} \cdot v^{-1/2} / \text{nA.V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{V vs. Ag/AgCl}$
0,010	37,23	1,253	11,76	0,030
0,020	65,22	1,263	14,61	0,034
0,030	89,06	1,267	16,21	0,033
0,040	106,20	1,271	16,78	0,033
0,050	122,90	1,275	17,33	0,033
0,100	204,70	1,285	20,47	0,034
0,150	270,80	1,293	22,20	0,035
0,200	336,40	1,299	23,88	0,036
0,250	395,40	1,303	24,91	0,036
0,300	456,90	1,309	26,50	0,039
0,350	509,20	1,311	26,99	0,038
0,400	560,40	1,315	28,02	0,039
0,450	608,00	1,317	28,58	0,038
0,500	665,60	1,321	29,95	0,041

Onde:

v = velocidade de varredura

I_{pc} = corrente de pico catódica

E_{pc} = potencial de pico catódico

$v^{-1/2}$ = inverso da raiz da velocidade de varredura

$E_{pc/2}$ = potencial de pico a meia altura

Tabela 6: Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão acetato pH 4,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

$v / \text{V.s}^{-1}$	I_{pc} / nA	$-E_{pc} / \text{V vs. Ag/AgCl}$	$I_{pc} \cdot v^{-1/2} / \text{nA.V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{V vs. Ag/AgCl}$
0,010	36,14	1,283	11,42	0,034
0,020	61,84	1,293	13,85	0,035
0,030	80,41	1,299	14,63	0,035
0,040	100,70	1,303	15,91	0,035
0,050	114,30	1,307	16,12	0,035
0,100	194,20	1,319	19,42	0,036
0,150	260,00	1,327	21,32	0,037
0,200	324,40	1,331	23,03	0,036
0,250	386,10	1,337	24,32	0,038
0,300	445,40	1,340	25,83	0,038
0,350	508,50	1,342	26,95	0,037
0,400	559,90	1,346	27,99	0,038
0,450	617,90	1,348	29,04	0,038
0,500	675,70	1,352	30,41	0,040

Onde:

v = velocidade de varredura

I_{pc} = corrente de pico catódica

E_{pc} = potencial de pico catódico

$v^{-1/2}$ = inverso da raiz da velocidade de varredura

$E_{pc/2}$ = potencial de pico a meia altura

Tabela 7: Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão acetato pH 5,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

$v / \text{V.s}^{-1}$	I_{pc} / nA	$-E_{pc} / \text{V vs. Ag/AgCl}$	$I_{pc} \cdot v^{-1/2} / \text{nA.V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{V vs. Ag/AgCl}$
0,010	34,24	1,321	10,82	0,036
0,020	57,78	1,331	12,94	0,038
0,030	77,00	1,337	14,01	0,039
0,040	95,51	1,340	15,09	0,038
0,050	111,50	1,344	15,72	0,038
0,100	186,50	1,356	18,65	0,039
0,150	255,50	1,362	20,95	0,039
0,200	317,50	1,368	22,54	0,040
0,250	375,50	1,372	23,66	0,039
0,300	434,90	1,376	25,22	0,039
0,350	493,00	1,378	26,13	0,039
0,400	554,40	1,382	27,72	0,040
0,450	605,90	1,384	28,48	0,040
0,500	667,70	1,384	30,05	0,038

Onde:

v = velocidade de varredura

I_{pc} = corrente de pico catódica

E_{pc} = potencial de pico catódico

$v^{-1/2}$ = inverso da raiz da velocidade de varredura

$E_{pc/2}$ = potencial de pico a meia altura

Tabela 8: Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 6,07, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

$v / \text{V.s}^{-1}$	I_{pc} / nA	$-E_{pc} / \text{V vs. Ag/AgCl}$	$I_{pc} \cdot v^{-1/2} / \text{nA.V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{V vs. Ag/AgCl}$
0,010	39,01	1,370	12,33	0,042
0,020	60,35	1,374	13,52	0,040
0,030	77,36	1,380	14,08	0,041
0,040	93,28	1,384	14,74	0,041
0,050	107,40	1,386	15,14	0,039
0,100	171,60	1,398	17,16	0,041
0,150	225,90	1,404	18,52	0,040
0,200	282,00	1,410	20,02	0,041
0,250	325,40	1,414	20,50	0,040
0,300	374,00	1,418	21,69	0,041
0,350	420,70	1,422	22,30	0,042
0,400	465,80	1,424	23,29	0,041
0,450	513,70	1,428	24,14	0,043
0,500	553,60	1,430	24,91	0,042

Onde:

v = velocidade de varredura

I_{pc} = corrente de pico catódica

E_{pc} = potencial de pico catódico

$v^{-1/2}$ = inverso da raiz da velocidade de varredura

$E_{pc/2}$ = potencial de pico a meia altura

Tabela 9: Influência da v sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 7,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

$v / \text{V.s}^{-1}$	I_{pc} / nA	$-E_{pc} / \text{V vs. Ag/AgCl}$	$I_{pc} \cdot v^{-1/2} / \text{nA.V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{V vs. Ag/AgCl}$
0,010	33,34	1,400	10,53	0,039
0,020	52,68	1,408	11,80	0,040
0,030	68,77	1,414	12,52	0,041
0,040	82,67	1,418	13,06	0,041
0,050	94,72	1,422	13,35	0,041
0,100	154,80	1,432	15,48	0,041
0,150	205,30	1,440	16,83	0,042
0,200	252,20	1,444	17,91	0,041
0,250	297,80	1,450	18,76	0,043
0,300	341,30	1,452	19,79	0,042
0,350	385,80	1,456	20,45	0,043
0,400	424,70	1,460	21,23	0,044
0,450	469,30	1,460	22,06	0,042
0,500	506,20	1,461	22,78	0,042

Onde:

v = velocidade de varredura

I_{pc} = corrente de pico catódica

E_{pc} = potencial de pico catódico

$v^{-1/2}$ = inverso da raiz da velocidade de varredura

$E_{pc/2}$ = potencial de pico a meia altura

Tabela 10: Influência da ν sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 8,03, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

$\nu / \text{V.s}^{-1}$	I_{pc} / nA	$-E_{pc} / \text{V vs. Ag/AgCl}$	$I_{pc} \cdot \nu^{-1/2} / \text{nA.V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{V vs. Ag/AgCl}$
0,010	28,12	1,442	8,89	0,044
0,020	43,30	1,446	9,70	0,041
0,030	56,56	1,450	10,29	0,039
0,040	69,18	1,454	10,93	0,039
0,050	79,87	1,460	11,26	0,042
0,100	131,40	1,471	13,14	0,043
0,150	175,30	1,477	14,37	0,042
0,200	219,20	1,483	15,56	0,043
0,250	259,80	1,487	16,37	0,043
0,300	302,20	1,491	17,53	0,044
0,350	338,90	1,493	17,96	0,043
0,400	374,20	1,499	18,71	0,046
0,450	413,60	1,499	19,44	0,044
0,500	449,50,	1,505	20,23	0,047

Onde:

ν = velocidade de varredura

I_{pc} = corrente de pico catódica

E_{pc} = potencial de pico catódico

$\nu^{-1/2}$ = inverso da raiz da velocidade de varredura

$E_{pc/2}$ = potencial de pico a meia altura

Tabela 11: Influência da ν sobre os parâmetros eletroquímicos do pico catódico obtidos para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato pH 9,02, e em presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

$\nu / \text{V.s}^{-1}$	I_{pc} / nA	$-E_{pc} / \text{V vs. Ag/AgCl}$	$I_{pc} \cdot \nu^{-1/2} / \text{nA.V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{V vs. Ag/AgCl}$
0,010	34,07	1,485	10,77	0,045
0,020	52,53	1,489	11,77	0,045
0,030	68,21	1,495	12,41	0,047
0,040	81,42	1,499	12,86	0,047
0,050	94,87	1,503	13,38	0,048
0,100	150,70	1,515	15,07	0,049
0,150	200,60	1,521	16,45	0,047
0,200	248,50	1,529	17,64	0,050
0,250	292,40	1,533	18,42	0,050
0,300	336,50	1,539	19,52	0,052
0,350	377,50	1,543	20,01	0,053
0,400	416,20	1,547	20,81	0,054
0,450	454,30	1,547	21,35	0,051
0,500	494,70	1,547	22,26	0,049

Onde:

ν = velocidade de varredura

I_{pc} = corrente de pico catódica

E_{pc} = potencial de pico catódico

$\nu^{-1/2}$ = inverso da raiz da velocidade de varredura

$E_{pc/2}$ = potencial de pico a meia altura

Portanto, o deslocamento do potencial de pico em função do aumento da velocidade de varredura indica a ocorrência de uma reação de transferência eletrônica irreversível ou de um processo eletródico com uma reação química subsequente a transferência eletrônica.

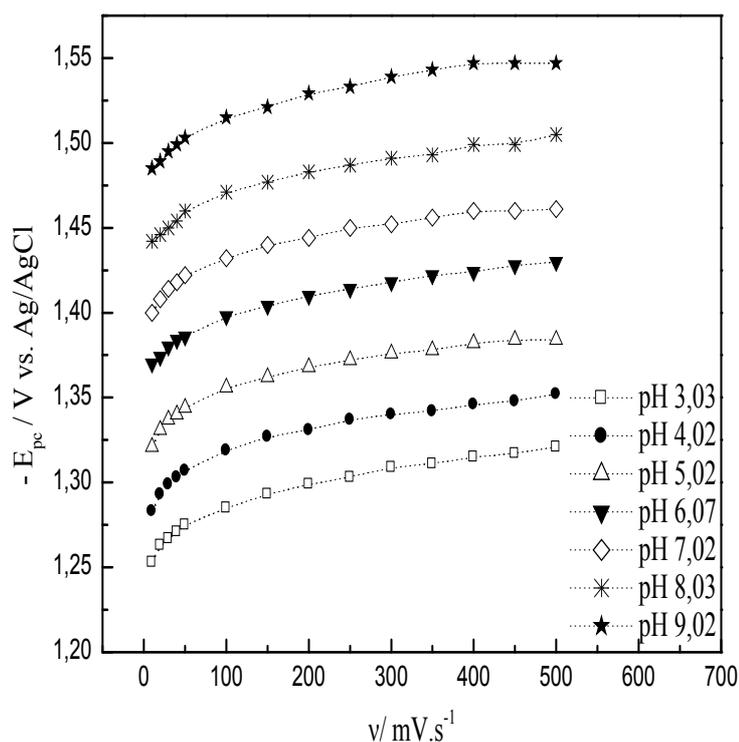


Figura 21: Variação E_{pc} com v , para uma solução de ACLO $1,10 \cdot 10^{-4} mol.L^{-1}$, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} mol.L^{-1}$), em tampão acetato $0,04 mol.L^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 mol.L^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02).

Gráficos onde os valores de corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial apresentam uma relação linear indicam um processo de transporte de massa controlado difusionalmente. Para sistemas reversíveis ou irreversíveis sem complicações cinéticas, a I_p varia linearmente com a raiz da velocidade de varredura passando pela origem dos pontos. No entanto, o gráfico de I_p vs. $v^{1/2}$ pode apresentar desvio da linearidade e um valor diferente de zero para o coeficiente

linear, se no processo eletrodico houver reações químicas anterior ou subsequente a transferência eletrônica, ou etapas de adsorção envolvidas no processo.

Assim, como apresentado pela **Figura 22** pode-se atribuir que o processo de redução de ACLO ocorre com complicações cinéticas ou reações químicas acopladas. Além disso, este comportamento eletroquímico também evidencia que o transporte de massa não ocorre difusionalmente.

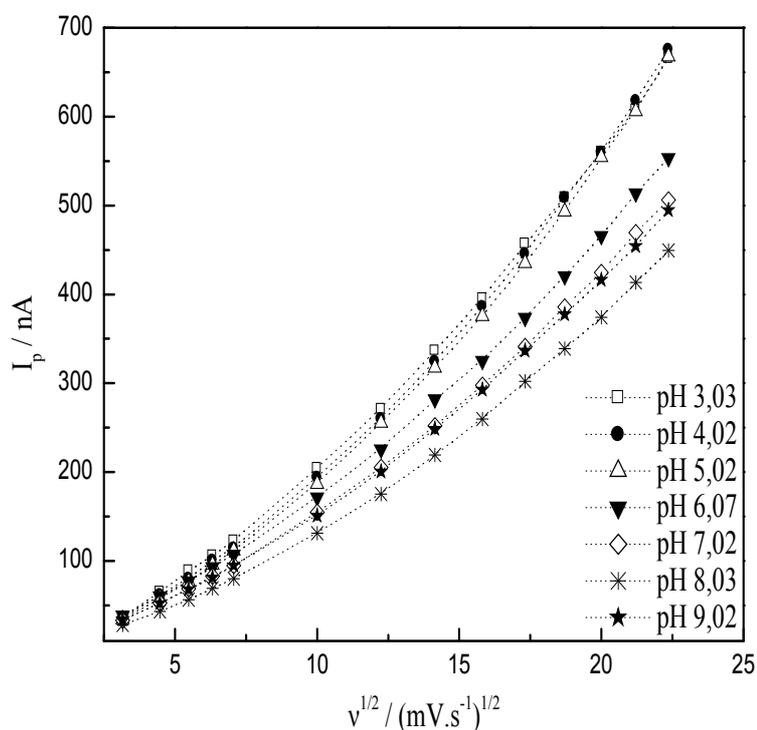


Figura 22: Variação I_p com $v^{1/2}$, para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02).

A função corrente também é um critério bastante utilizado para determinar se a irreversibilidade do processo eletrodica é devida a uma transferência eletrônica lenta ou uma reação química acoplada, isso por que este parâmetro é independente da velocidade de varredura para processos reversíveis e irreversíveis. No entanto, caso a

irreversibilidade seja provocada por reações químicas acopladas a processos de transferência de carga, a variação de $(I_p \cdot v^{-1/2})$ com a velocidade de varredura dependerá da natureza da reação química, podendo ser observada uma diminuição, um aumento ou mesmo nenhuma variação de $(I_p \cdot v^{-1/2})$ com o aumento de v .^[98-101]

Logo, como mostrado na **Figura 23**, o gráfico obtido para $(I_p \cdot v^{-1/2})$ em função da velocidade de varredura sugere a presença de uma reação química acoplada à transferência de carga na redução de ACLO, pois esta função apresentou um aumento gradual com a v de 50 para 500 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

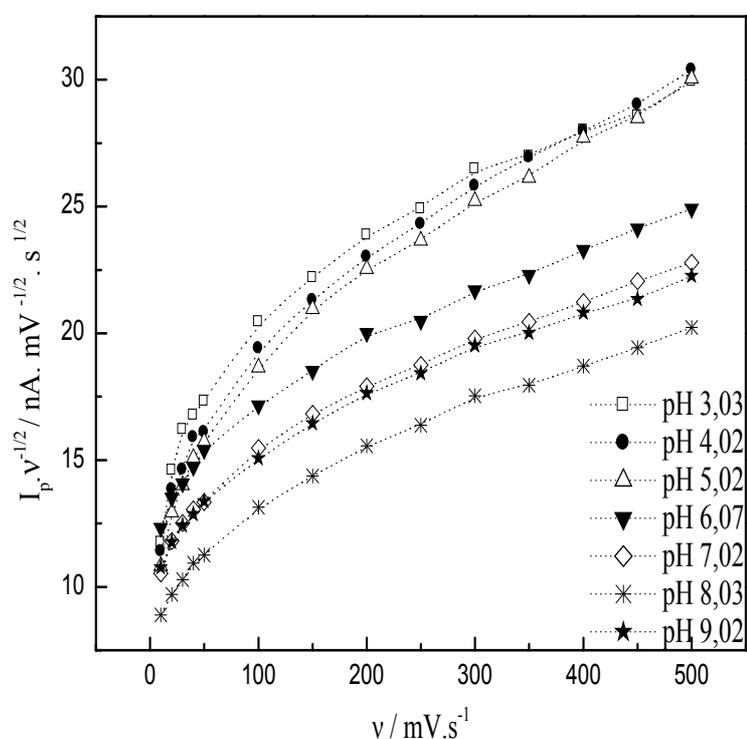


Figura 23: Variação da função corrente de pico $(I_p \cdot v^{-1/2})$ do ACLO com a v , para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02).

O tipo de transporte de massa também pode ser verificado pela variação do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial. A inclinação da curva correspondente a um processo difusional é 0,5, enquanto para um pico de adsorção a inclinação é 1,0. Valores intermediários sugerem picos de controle mistos, isto é adsorção e difusão.^[100-102]

Portanto, conforme pode ser observado os gráficos obtidos para $\log I_p$ em função do $\log v$ (**Figura 24**) nos pHs 3,03, 4,02, 5,02, 6,07, 7,02, 8,03, 9,02 foram lineares com valores de coeficiente angular entre 0,682 e 0,755 (**Tabela 12**). Neste caso estes valores obtidos experimentalmente, menores do que o previsto teoricamente para existência de um transporte de massa controlado por adsorção, sugerem a existência de um controle misto para o transporte de ACLO a superfície eletródica.

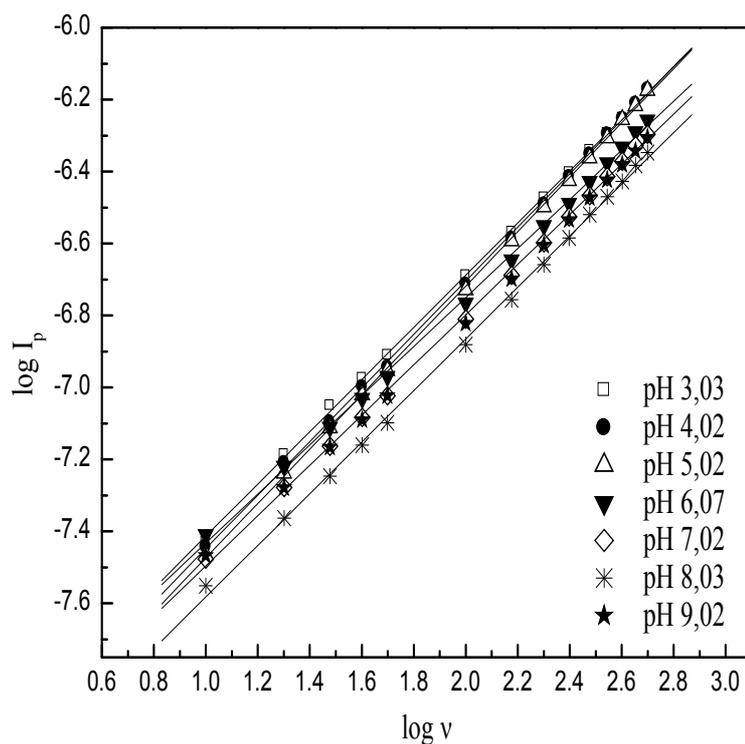


Figura 24: Variação do $\log I_p$ em função do $\log v$, para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02).

Tabela 12: Valores da inclinação obtidos para variação do $\log I_p$ em função do $\log v$ nos voltamogramas cíclicos de redução do ACLO.

pH	Inclinação	r
	$\Delta \log I_p / \Delta \log v$	(n=14)
3,03	0,725	0,999
4,02	0,744	0,999
5,02	0,755	0,999
6,07	0,682	0,999
7,02	0,698	0,999
8,03	0,717	0,999
9,02	0,689	0,999

Onde: r = coeficiente de correlação

A análise da diferença entre o potencial de pico e potencial de pico a meia altura $|E_{pc} - E_{pc/2}|$, para o pico de redução de ACLO nos diferentes pHs utilizados, são apresentados na **Tabelas 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11**, e na Tabela 13 são apresentados os valores médios encontrados de $|E_{pc} - E_{pc/2}|$ para cada pH.

De acordo com Bard & Faulkner^[98], um dos critérios diagnósticos bastante convenientes para diagnosticar uma transferência eletrônica como um processo reversível (Nernstiano) é $|E_{pc} - E_{pc/2}|$ sendo igual a $56,5/n$ (mV a 25°C) (**Equação 1**), enquanto para transferências eletrônicas irreversíveis o valor de $|E_{pc} - E_{pc/2}|$ é igual a $47,7/\alpha n$ (mV a 25°C) (**Equação 2**), onde n para ambos os casos é o número total de elétrons transferidos no processo eletrodico, e α é o coeficiente de transferência eletrônica.

Portanto, os valores encontrados experimentalmente para $|E_{pc} - E_{pc/2}|$ na redução de ACLO na presença de BrCTA, em diferentes pHs, apresentam-se mais

próximos ao esperado teoricamente para uma transferência eletrônica irreversível, do que para um processo reversível.

Tabela 13: Valores médios obtido de $|E_{pc} - E_{pc/2}|$ para todas as velocidades de 10 a 500 mV.s^{-1} , nos diferentes pHs analisados.

	$ E_{pc} - E_{pc/2} / \text{mV}$						
pHs	pH 3,03	pH 4,02	pH 5,02	pH 6,07	pH 7,02	pH 8,03	pH 9,02
<i>Média</i>	35,6	36,6	38,7	41,0	41,6	42,8	49,1

Desta forma, utilizando a relação para um processo de transferência eletrônica irreversível $|E_{pc} - E_{pc/2}| = 47,7/\alpha n$ (mV a 25°C) (Equação 2), considerando $\alpha = 0,5$, valor característico para transferências eletrônicas irreversíveis, e a partir do valor médio de $|E_{pc} - E_{pc/2}|$ para o intervalo de pH, calculou-se o número teórico de elétrons envolvidos na redução eletroquímica para cada pH, esses dados são apresentados na Tabela 14.

De acordo com o apresentado (Tabela 14), o número total de elétrons transferidos na reação eletródica estiveram entre 2,68 e 1,95 (2,0). Estes resultados apresentam-se em concordância com a literatura^[103-104], já que normalmente é estimado a participação de dois elétrons na redução de compostos semelhantes (carbonílicos α,β insaturados), tais como o ácido cinâmico. Portanto, pode-se estimar um número total de dois elétrons para transferência eletrônica de redução de ACLO, no intervalo de pH adotado neste estudo.

Tabela 14: Cálculo teórico de αn e do número de elétrons n , envolvidos na redução de ACLO, a partir da relação para uma transferência eletrônica irreversível $|E_{pc} - E_{pc/2}| = 47,7/\alpha n$ (mV a 25°C) (Equação 2).

pH	$\alpha n =$	n
	$47,7 / E_{pc} - E_{pc/2} $	
3,03	1,34	2,68
4,02	1,30	2,60
5,02	1,23	2,46
6,07	1,16	2,33
7,02	1,15	2,29
8,03	1,11	2,23
9,02	0,97	1,95

Onde: n = número de elétrons para redução de ACLO.

Além disso, o número total de elétrons envolvidos na transferência eletrônica também foram calculados de acordo com a variação do potencial de pico (E_p) em função do logaritmo da velocidade de varredura de potencial ($\log v$), isso porque, para transferências eletrônicas irreversíveis esses parâmetros variam de acordo com a seguinte relação $\Delta E_p / \log v = -29,6 / \alpha n$ (Equação 3) (Tidwell [105]).

Assim, a dependência linear entre E_{pc} e o $\log v$ para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de ACLO em tampão acetato 0,04 mol.L⁻¹ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato 0,04 mol.L⁻¹ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02) é mostrada na **Figura 25**, tal como esperado para uma transferência eletrônica irreversível.

Os valores de inclinação para o gráfico de E_{pc} em função do $\log v$ nos pHs citados apresentaram-se entre 37,21 e 40,90 (**Tabela 15**). A partir dos valores de inclinação e do coeficiente de transferência eletrônica, assumido como 0,5, foi possível estimar o número total de elétrons (n) envolvidos na transferência eletrônica.

O número total de elétrons estimados de acordo com a influência de $\log v$ sob E_p do ACLO, variou entre 1,44 a 1,59 (2,0), sendo portanto, aproximadamente dois, confirmando assim, o número de elétrons estimados a partir da relação de $|E_{pc} - E_{pc/2}|$.

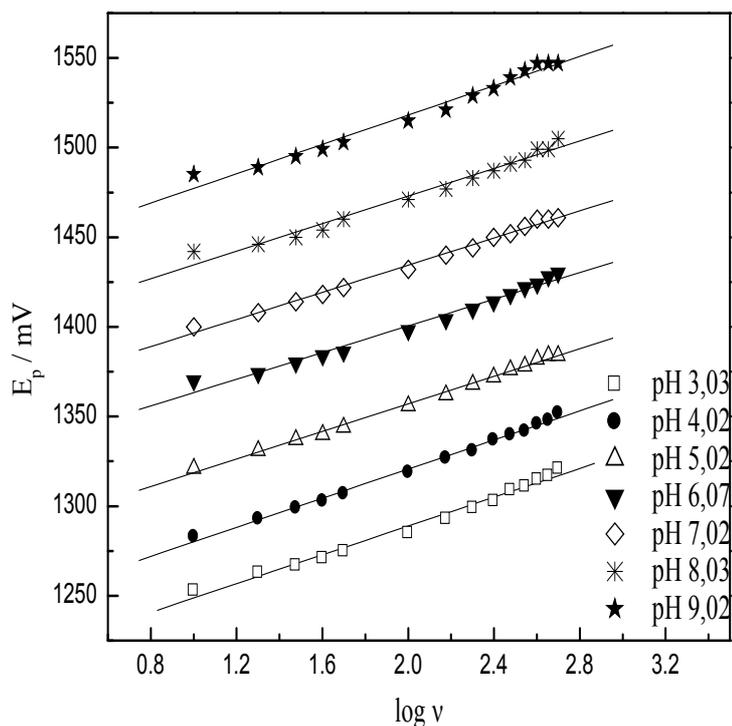


Figura 25: Variação do E_p em função do $\log v$, para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 3,03, 4,02, 5,02) e tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pHs 6,07, 7,02, 8,03, 9,02).

Tabela 15: Cálculo teórico de αn e do número de elétrons n , envolvidos na redução de ACLO, a partir da influência do $\log v$ versus E_{pc} nos voltamogramas cíclicos de ACLO.

pH	Inclinação = $\Delta E_p / \log v$	r (n=14)	$\alpha n =$ -29,6 / ($\Delta E_p / \log v$)	n
3,03	40,14	0,993	0,74	1,48
4,02	40,57	0,998	0,73	1,46
5,02	38,47	0,998	0,77	1,54
6,07	37,21	0,991	0,79	1,59
7,02	37,81	0,997	0,78	1,56
8,03	38,41	0,989	0,78	1,56
9,02	40,90	0,989	0,72	1,44

Onde: n = número de elétrons para redução de ACLO.

Em reações eletroquímicas irreversíveis, os potenciais de pico são determinados pela cinética do processo eletroquímico. Assim, os parâmetros mais importantes no estudo mecanístico de sistemas redox em soluções aquosas ou mistas é a influência do pH sobre o potencial e sobre a corrente de pico catódica.^[98-101]

Em geral, o potencial de pico é independente do pH (inclinação zero) em processos redox reversíveis que não envolvem transferência de prótons ou em processos irreversíveis nos quais nenhuma transferência de prótons precede a etapa de transferência eletrônica.^[98-101]

A **Figura 26** apresenta o comportamento do potencial de pico em função do pH, como pode ser observado o potencial de pico variou consideravelmente com o pH do eletrólito suporte, propiciando um deslocamento para valores mais negativos, este comportamento pode ser atribuído a existência de reações de pré-protonação acoplada a transferência eletrônica. À medida que o pH aumenta, a velocidade de pré-protonação diminui até começar a ocorrer a redução de ACLO, em potenciais mais negativos.

Para determinar o número de prótons (Z) envolvidos na etapa determinante da velocidade de reação, foi utilizada a equação de Nernst (**Equação 4**):

$$\Delta E_p / \Delta \text{pH} = -59(\text{mV}) \cdot Z / \alpha n \quad (\text{Equação 4})$$

Onde $\Delta E_p / \Delta \text{pH}$ é a inclinação do gráfico E_p versus pH, Z o número de prótons envolvidos na etapa determinante da reação e n o número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação. O parâmetro αn foi obtido a partir da relação $|E_{pc} - E_{pc/2}| = 47,7 / \alpha n$.

O parâmetro $|E_{pc} - E_{pc/2}|$ no intervalo de pH de 3,03 a 9,02 possui um valor médio de 40,8 mV, correspondendo portanto a um αn de 1,17, utilizando esse valor de αn , obtém-se um valor de 0,75 (1,0) para Z, neste caso sugere-se que um próton esteja envolvido na etapa de reação de pré-protonação. Esse comportamento é similar ao observado para o ácido cinâmico, que é reduzido na sua forma protonada. A redução de compostos carbonílicos α,β insaturados envolvem a pré-protonação das moléculas [103-104].

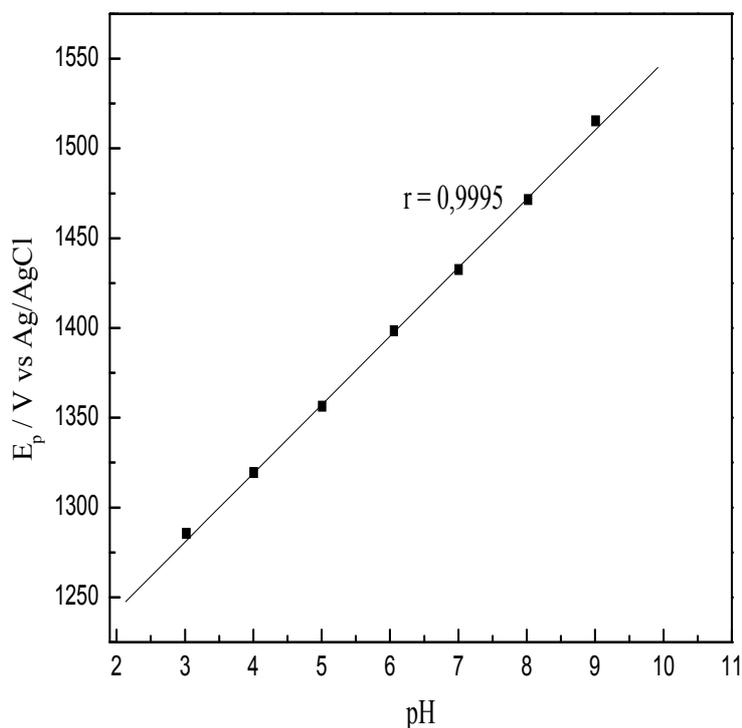


Figura 26: Influência do pH no E_{pc} em VC para uma solução $1,10 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), no intervalo de pH de 3,03 a 9,02.

3.5.2. Proposta de mecanismo de redução de ACLO na presença do surfactante BrCTA

A partir das considerações feitas após avaliação dos critérios de diagnósticos obtidos por VC, ou seja:

- a) a caracterização de uma transferência eletrônica irreversível, evidenciada pelo voltamograma cíclico, o deslocamento do E_{pc} para valores mais negativos com aumento da v (**Figura 21**) diagnosticados pela VC;
- b) a presença de uma reação química acoplada à transferência eletrônica, manifestada no comportamento da função corrente com o aumento da v (**Figura 23**);
- c) a presença de uma reação de pré-protonação, evidenciada no deslocamento do E_{pc} para potenciais mais negativos com aumento do pH (**Figura 26**);
- d) a análise dos critérios de reversibilidade por VC, bem como a análise de $|E_{pc} - E_{pc/2}|$, auxiliada pelas Equações 2, e o uso da Equação 3 que propiciaram estimar o número de elétrons envolvidos no processo eletroquímico;
- e) comparação do perfil de redução do ACLO com a redução do ácido cinâmico, acrescidas das informações encontradas na literatura;

Torna-se possível a elaboração de um esquema mecanístico para a redução de ACLO em tampão fosfato ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$) pH 6,02, e na presença de BrCTA ($2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$), envolvendo as etapas apresentadas na **Figura 27**, em que :

- i) o surfactante BrCTA é adsorvido no eletrodo de Hg (**Figura 27 – Etapa 1**);
- ii) O ânion clorogenato (**Figura 27 - Etapa 2**) após formar um par iônico com o cátion cetiltrimetil amônio (**Figura 27 - Etapa 3**) e assim ter sido adsorvido especificamente sobre o eletrodo de mercúrio é protonado, ou seja a primeira etapa consiste em uma reação de pré-protonação ACLO (**Figura 27 - Etapa 4 - Etapa Química**);
- iii) A segunda etapa corresponde à transferência eletrônica de dois elétrons a dupla ligação conjugada, ocorrendo assim a saturação dessa ligação (**Figura 27 - Etapa 5 - Etapa eletroquímica**);

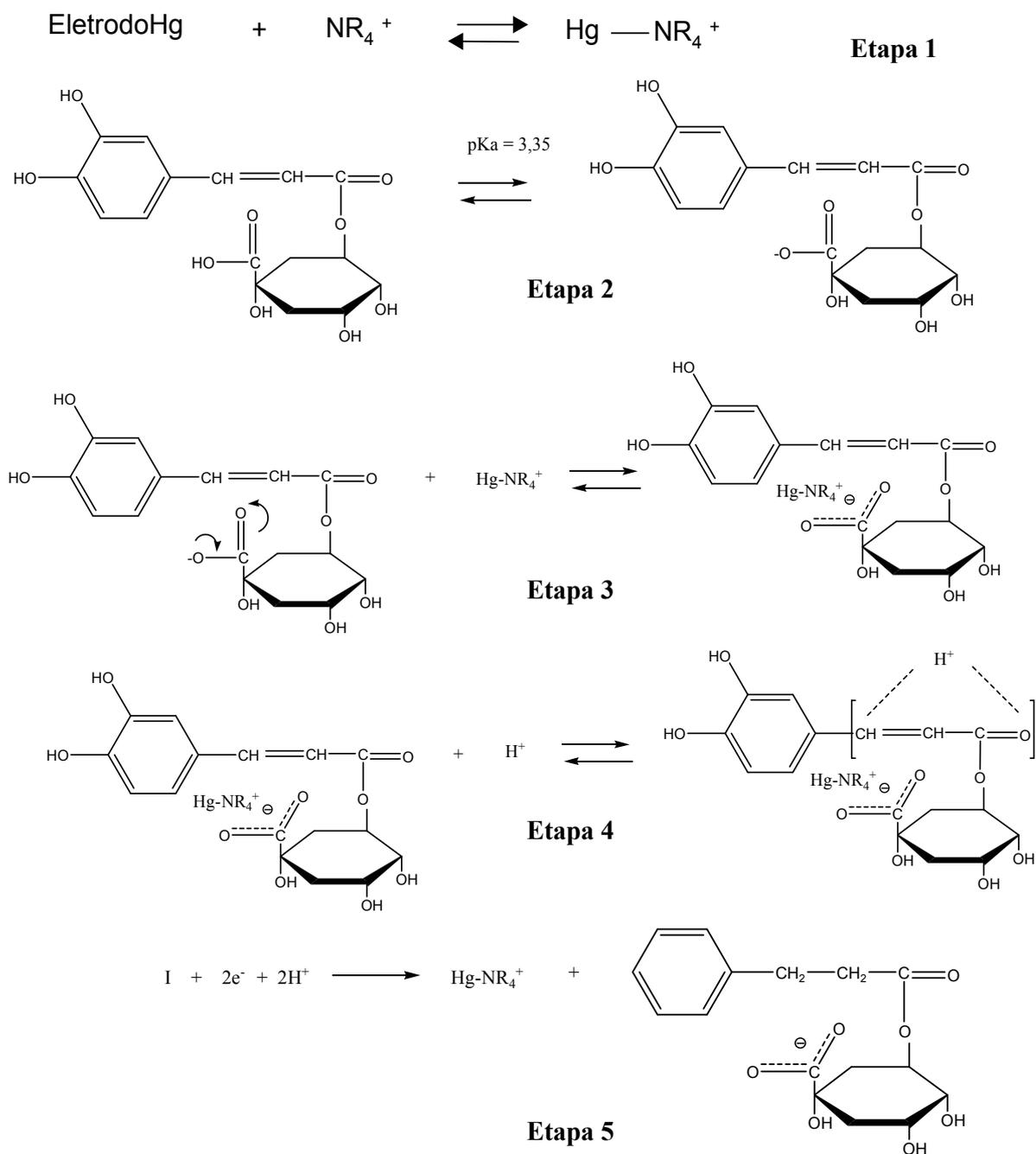


Figura 27: Etapas de redução de ACLO em presença do surfactante BrCTA em meio aquoso: (1) adsorção do surfactante BrCTA no eletrodo de Hg, (2) dissociação do ACLO no ânion clorogenato; (3) adsorção do ânion clorogenato ao eletrodo de Hg, através da formação do par iônico com BrCTA; (4) reação de pré-protonação de ACLO (Etapa Química); (5) redução eletroquímica do ACLO (Etapa Eletroquímica).

3.5.3. Comparação entre a redução eletroquímica de ACLO e outros Ácidos Hidroxicinâmicos na presença de BrCTA

Como mencionado anteriormente, esse esquema de redução foi proposto de acordo com a redução do ácido cinâmico ^[82] e dados da literatura.

De acordo com Ferreira ^[82], a redução do ACIN na ausência de sais de amônio quaternário é bastante dificultada, em virtude do ânion cinamato, o qual está presente predominantemente em meio onde o pH está acima de 4,4. Isto por que este ânion é repelido da superfície eletródica carregada negativamente, devido a densidade de carga negativa sobre o átomo de oxigênio da carbonila; requerendo uma orientação específica da molécula, caracterizando uma adição eletrônica 3,4.

No entanto, a redução do ACIN na presença de cátions do sal de amônio adsorvidos no eletrodo ou após a formação do par-iônico em solução, altera a etapa determinante de velocidade, através da mudança do mecanismo de adição 3,4 para 1,4 através do sistema conjugado envolvendo a interação entre a carboxila e o cátion, negligenciando assim a etapa da orientação da molécula com relação a superfície eletródica, requerida no caso da adição 1,2.

Além disso, KANG ^[106] explica que o eletrodo carregado negativamente, e o ânion cinamato presente predominantemente em solução para faixa de pH 4-8, faz com que a redução de ACIN ocorra em potenciais potencial altamente negativos -1,40/-1,50 V (vs SCE). Isso por que a adsorção e redução no ânion cinamato na superfície do eletrodo de mercúrio é limitada pela repulsão eletrostática.

Contudo, a presença de espécies NR_4^+ com carga positiva são facilmente adsorvidas no eletrodo de mercúrio com carga negativa, o que ocorre para reduzir a quantidade de carga negativa líquida do eletrodo, resultando em um aumento da corrente de pico do ACIN e deslocamento para potenciais de pico mais positivos. Sendo assim, o sal de amônio quaternário é responsável pela adsorção do ânion do ACIN induzidos pelas espécies NR_4^+ adsorvidas na superfície do eletrodo de Hg.

Portanto, o esquema de redução proposto para o ACLO na presença do surfactante catiônico está de acordo com os mecanismos propostos na literatura, o que ocorre através da formação de um par-iônico com o cátion cetiltrimetilamônio.

A formação de um par iônico entre o ACLO e o surfactante é responsável pela adsorção específica da molécula deste ácido a superfície eletródica, e conseqüentemente sua redução mais favorecida.

No intuito de compararmos a redução do ACLO em relação ao ACIN, foram realizadas medidas para redução destes ácidos sob as mesmas condições, tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02 em presença de BrCTA $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Como é possível observar na **Figura 28**, a redução do ACLO mostrou-se mais favorecida que a do ACIN, ocorrendo em um potencial menos negativo. Esse comportamento pode ser explicado com base na formação de diferentes pares iônicos dos ACLO e ACIN com o surfactante BrCTA.

No ACIN a espécie NR_4^+ interage com a carga negativa dispersa na carboxila conjugada a dupla ligação, enquanto que no ACLO a interação ocorre na carga negativa dispersa na carboxila do ácido quínico, não conjugada a dupla ligação. Isto faz com que o surfactante na molécula do ACIN seja responsável não somente pela adsorção específica do ácido ao eletrodo, como também pela delocalização da densidade eletrônica da dupla ligação, favorecendo assim a sua redução. Já na molécula do ACLO, o surfactante interage com a carboxila do ácido quínico, deixando o sistema conjugado da dupla ligação e carbonila do éster, livre para ser protonado por H^+ do meio. Sendo assim, o ACLO além de estar especificamente adsorvido na superfície eletródica em virtude da ação de BrCTA, ainda pode ser protonado pelos H^+ do meio, diferentemente do ACIN.

Essa protonação na molécula do ACLO favorece a sua redução, porque ocorre no sistema conjugado da carbonila e da dupla ligação deste ácido, o que permite uma maior delocalização da densidade eletrônica da dupla ligação do que no ACIN, onde o BrCTA é responsável por esse efeito, ao mesmo tempo em que é responsável pela adsorção específica deste ácido ao eletrodo de Hg. Esse comportamento explica assim o favorecimento da redução do ACLO em relação ao ACIN em pH 6,02, onde ambos estão presentes predominantemente na forma de seus ânions.

Tal explicação pode ser confirmada com base na redução do ácido cafêico (ACAF) (**Figura 28**) que possui uma estrutura bastante similar ao ACIN. Como pode ser observado o ACAF apresenta sob as mesmas condições, a redução em um potencial de pico muito mais próximo ao ACIN, do que do ACLO. Provavelmente porque o ACAF deve formar um par iônico com BrCTA da mesma forma que o ACIN, e a sua redução só ocorre em um E_p mais negativo que o ACIN, em virtude do efeito indutivo das hidroxilas do anel aromático a dupla ligação.

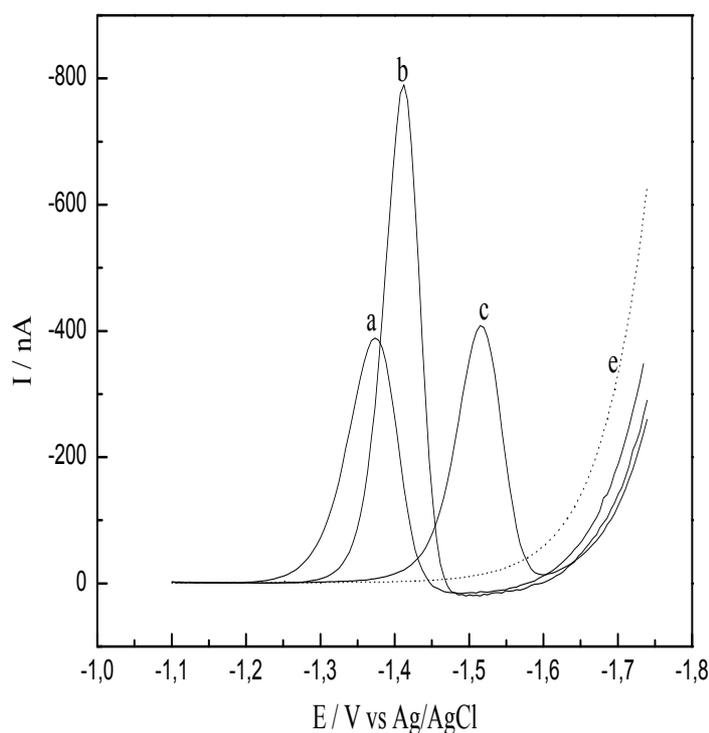


Figura 28: Polarogramas de pulso diferencial para redução de: (a). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO, (b). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACIN, (c). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF na presença do surfactante $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02 (e).

Além disso, em um meio extremamente ácido (pH 1,7), onde o ACLO e o ACIN não se apresentam dissociados, e, portanto a possibilidade da formação de diferentes pares iônicos com BrCTA é reduzida, a redução do ACIN na presença de BrCTA foi mais favorecida do que a do ACLO (**Figura 29**).

Esse comportamento pode ser explicado com base no fato de que ambos os ácidos estão protonados de forma bastante similar, portanto a delocalização da densidade

eletrônica da dupla ligação é promovida de forma parecida. O efeito que faz com que a redução destes ácidos não ocorra num mesmo potencial é a presença dos os substituintes no anel aromático (hidroxilas) do ACLO, promovendo assim um efeito indutivo de elétrons a dupla ligação, o mesmo não ocorre no ACIN, o que faz com que a sua redução seja mais favorecida do que o ACLO.

Novamente a redução do ACAF confirma tal explicação, já que desta vez como pode ser observada na (**Figura 29**), esta ocorre em um potencial quase idêntico ao do ACLO. Isto por que o ACAF também apresenta hidroxilas em seu anel aromático, confirmando, portanto, que em meio extremamente ácido, o efeito que diferencia a redução destes fenólicos é ação dos substituintes do anel aromático à dupla ligação.

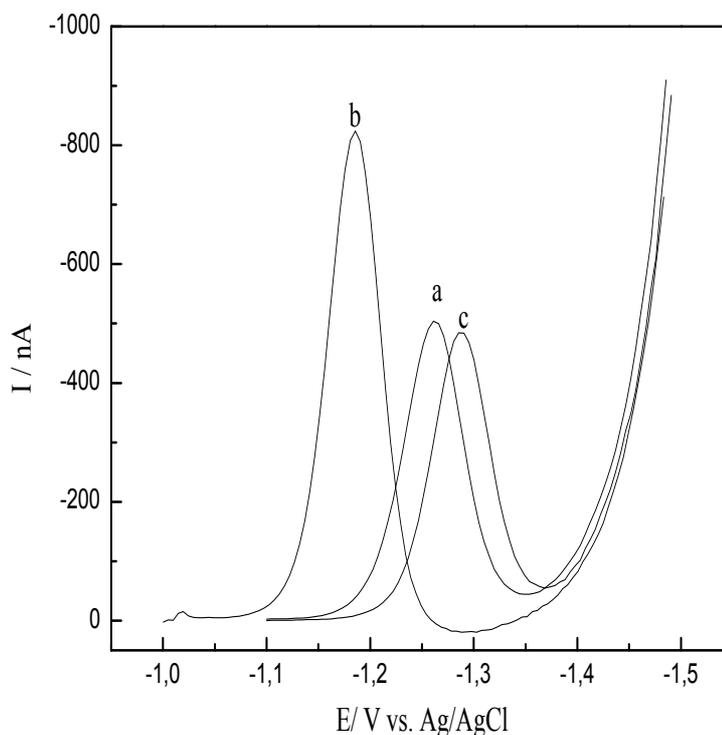


Figura 29: Polarogramas de pulso diferencial para redução de: (a). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO, (b). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACIN, (c). $2,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF na presença do surfactante $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, em solução de HCl $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 1,71.

3.6. Desenvolvimento de metodologias 1 e 2: Determinação de ACLO através das técnicas de PPD e VOQ

Utilizando o pH 6,02, otimizado nos estudos preliminares (Seção 3.4) duas metodologias foram desenvolvidas para determinação de ACLO: uma utilizando a técnica Polarografia de Pulso Diferencial (PPD), e outra baseada na técnica de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ). A técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) não foi adotada em virtude de que não apresentou bons resultados, quando comparada as técnicas PPD e VOQ, como pode ser observado através da **Figura 30**.

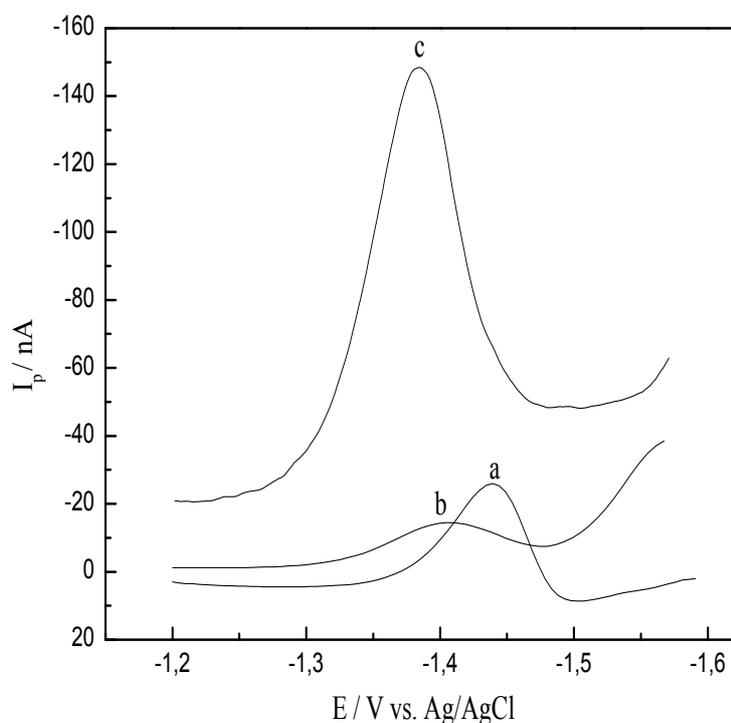


Figura 30: Redução do ACLO ($1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de BrCTA $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02 sob diferentes técnicas voltamétricas: (a) PPD, (b) VPD e (c) VOQ.

Otimização das condições experimentais

Com objetivo de desenvolver metodologias eletroanalíticas adequadas para determinação de ACLO em amostras de café e chá, vários parâmetros foram estudados e otimizados, tais como: pH (descrito na seção 3.4), tipo e concentração do eletrólito suporte, tipo de surfactante (descrito na seção 3.2), concentração do surfactante BrCTA, parâmetros instrumentais de cada técnica, dentre outros.

3.6.1. Influência da concentração do surfactante BrCTA na redução de ACLO.

O estudo da influência da concentração de BrCTA na redução de ACLO ($9,90 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) foi realizado em eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 6,14 sob as técnicas de PPD e VOQ, variando-se a concentração entre $2,04 \cdot 10^{-5}$ a $7,10 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, valores estes estando abaixo e acima da CMC deste surfactante - $9,00 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. [107]

Como já discutido anteriormente, a redução de ACLO em baixas concentrações não foi verificada na ausência de BrCTA, como a utilizada neste estudo. Desta forma, somente a partir de $2,04 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA foi possível observar o pico de redução de ACLO para PPD, o qual se apresentou muito pouco definido e muito próximo à descarga do eletrólito (**Figura 31**, polarograma b). Já para a VOQ, nesta concentração de BrCTA o pico de redução de ACLO apresentou-se um pouco mais definido (**Figura 31**, voltamograma b), em um potencial menos negativo que para técnica de PPD. Provavelmente a baixa concentração do surfactante foi mais efetiva na modificação do eletrodo para VOQ, a qual é realizada sob uma única gota de Hg, do que para a PPD, na qual se emprega um eletrodo gotejante.

O aumento da concentração de BrCTA proporcionou um deslocamento do potencial de pico (E_p) para valores menos negativos em ambas técnicas utilizadas.

Para PPD observou-se um deslocamento de E_p até aproximadamente $4,80 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, alcançando um valor de -1,38V, e permanecendo praticamente

constante até $9,44 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, no entanto a partir desta concentração, o pico de ACLO voltou para valores mais negativos (**Figura 32**).

Para VOQ, o E_p sofreu deslocamento para valores menos negativos até a concentração de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ do surfactante, alcançando o potencial de $-1,37 \text{ V}$, e a partir desta concentração o potencial de pico voltou a deslocar para valores mais negativos (**Figura 33**).

No que diz respeito a corrente de pico, a resposta também foi significativamente influenciada pelo surfactante, aumentando consideravelmente no intervalo de concentração de $2,04 \cdot 10^{-5} - 1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ para PPD. No entanto acima de $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ a I_p decresceu (**Figura 32**); este comportamento foi mais significativo a partir de $4,80 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, sendo que nesta concentração também foi obtido o maior deslocamento do E_p de ACLO sob esta técnica.

Assim como para PPD, a resposta de I_p do ACLO para VOQ também foi influenciada pelo aumento da concentração de BrCTA, observou-se um aumento da I_p até a concentração $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, e a partir da qual passou a decrescer continuamente (**Figura 33**).

Como já discutido, o surfactante catiônico BrCTA adsorve em superfícies eletródicas em potenciais negativos, devido à forças eletrostática. Esse comportamento favorece a interação de ACLO com o eletrodo de Hg, e, portanto a sua redução em determinado intervalo de concentração de surfactante.

Para fins analíticos, a concentração de BrCTA adotada para prosseguir com os demais estudos em ambas as técnicas foi $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Este valor foi adotado para ambas as técnicas, pois contempla condições de E_p constante e altos valores de I_p .

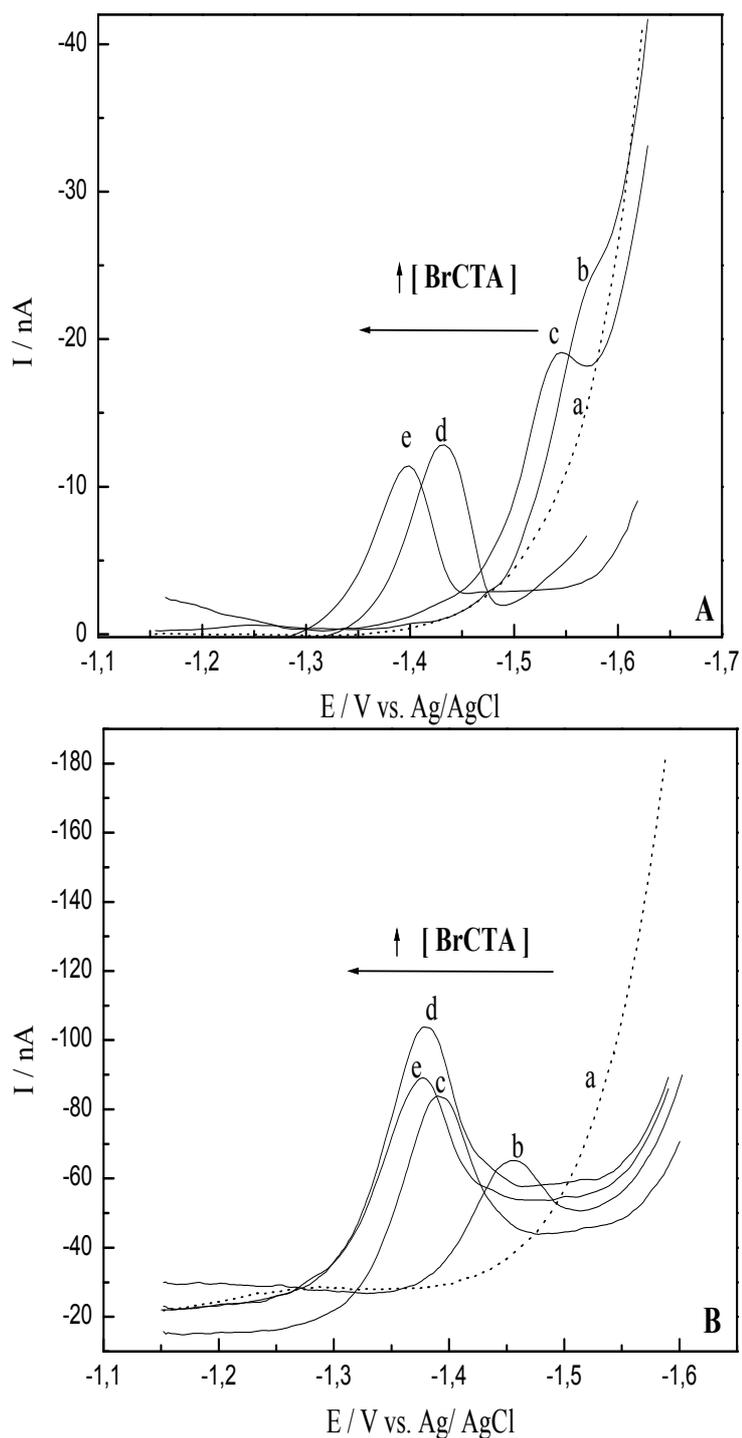


Figura 31: Polarogramas de Pulso Diferencial (A) e Voltamogramas de Onda Quadrada (B) para ACLO ($9,90 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) com concentrações crescentes de BrCTA: (b) $2,03 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) $4,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (d) $8,12 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (e) $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (a) em presença do eletrólito tampão fosfato, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02.

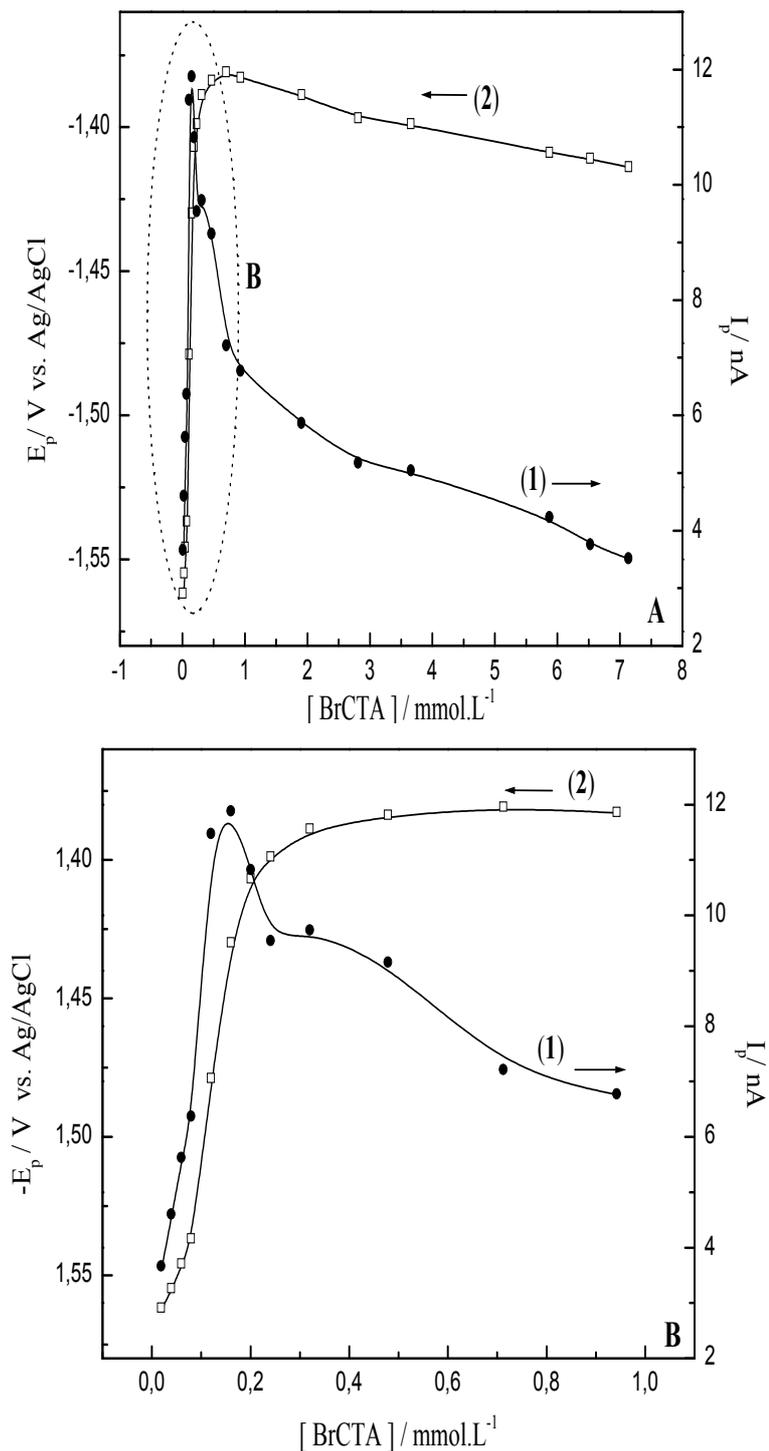


Figura 32: Influência da concentração do surfactante BrCTA na resposta de I_p (1) e E_p (2) para $9,90 \cdot 10^{-6} mol.L^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04 mol.L^{-1}$ pH 6,02, através da técnica de PPD, onde : (A) intervalo de $[BrCTA] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 7,10 \cdot 10^{-3} mol.L^{-1}$ e (B) intervalo de $[BrCTA] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 9,44 \cdot 10^{-4} mol.L^{-1}$.

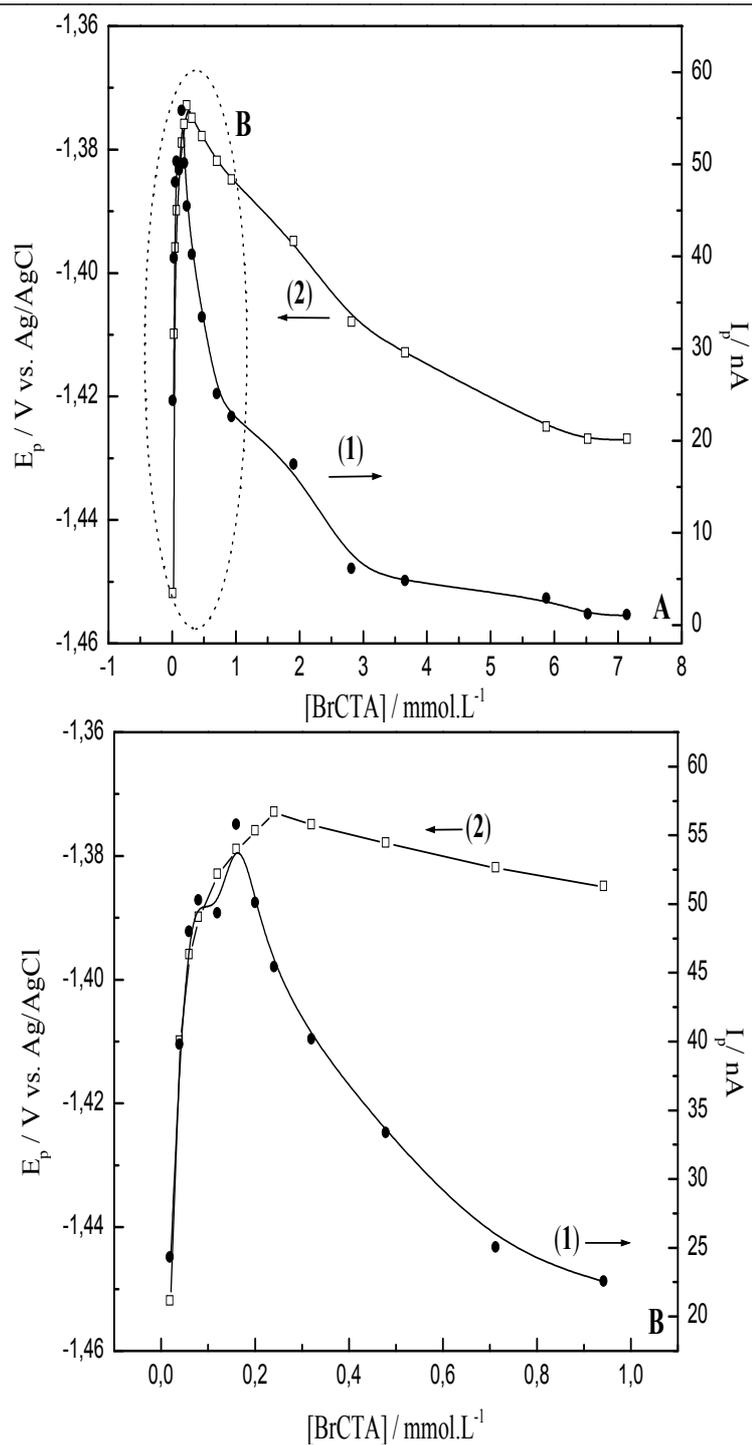


Figura 33: Influência da concentração do surfactante BrCTA na resposta de I_p (1) e E_p (2) para $9,90 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,02, através da técnica de VOQ onde : (A) intervalo de $[BrCTA] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 7,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e (B) intervalo de $[BrCTA] = 2,04 \cdot 10^{-5} - 9,44 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.6.2. Influência do tipo e concentração do eletrólito suporte na redução de ACLO

Após definido o pH 6,02 e a concentração $2,42 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA nos estudos anteriores, como parâmetros mais adequados para a redução de ACLO, a influência de outros eletrólitos neste processo também foi estudada para a PPD e para VOQ. Os eletrólitos utilizados além do tampão fosfato, foram o tampão Britton Robinson (BR) pH 6,08, e solução de LiCl, ambos na concentração de 0,04 mol.L⁻¹.

Como é apresentado na **Figura 34**, o E_p para ACLO apresentou-se em tampão fosfato 24 mV menos negativo que o E_p encontrado em tampão BR, na técnica de PPD e 16 mV para VOQ. Além disso, uma pequena diferença foi encontrada para I_p , a qual apresentou maior valor em tampão fosfato para ambas as técnicas voltamétricas.

Na presença eletrólito LiCl, o pico de ACLO apresentou-se em um E_p mais negativo que em tampão BR, e a I_p também apresentou-se menor que nos tampões utilizados. Considerando a pequena diferença do comportamento deste ácido nestes diferentes tampões e na solução de LiCl, manteve-se o tampão fosfato pH 6,02, como eletrólito suporte para os demais estudos.

Outro parâmetro avaliado para a redução de ACLO foi a concentração do eletrólito suporte, a qual foi estudada em tampão fosfato pH 6,02, nas seguintes concentrações: 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08 mol.L⁻¹.

De acordo com o observado na **Figura 35**, as diferentes concentrações do eletrólito suporte não influenciaram consideravelmente na redução de ACLO, desta forma a concentração de 0,04 mol.L⁻¹ para o tampão fosfato, pH 6,02, foi mantida para os demais estudos sob as duas técnicas voltamétricas utilizadas neste estudo.

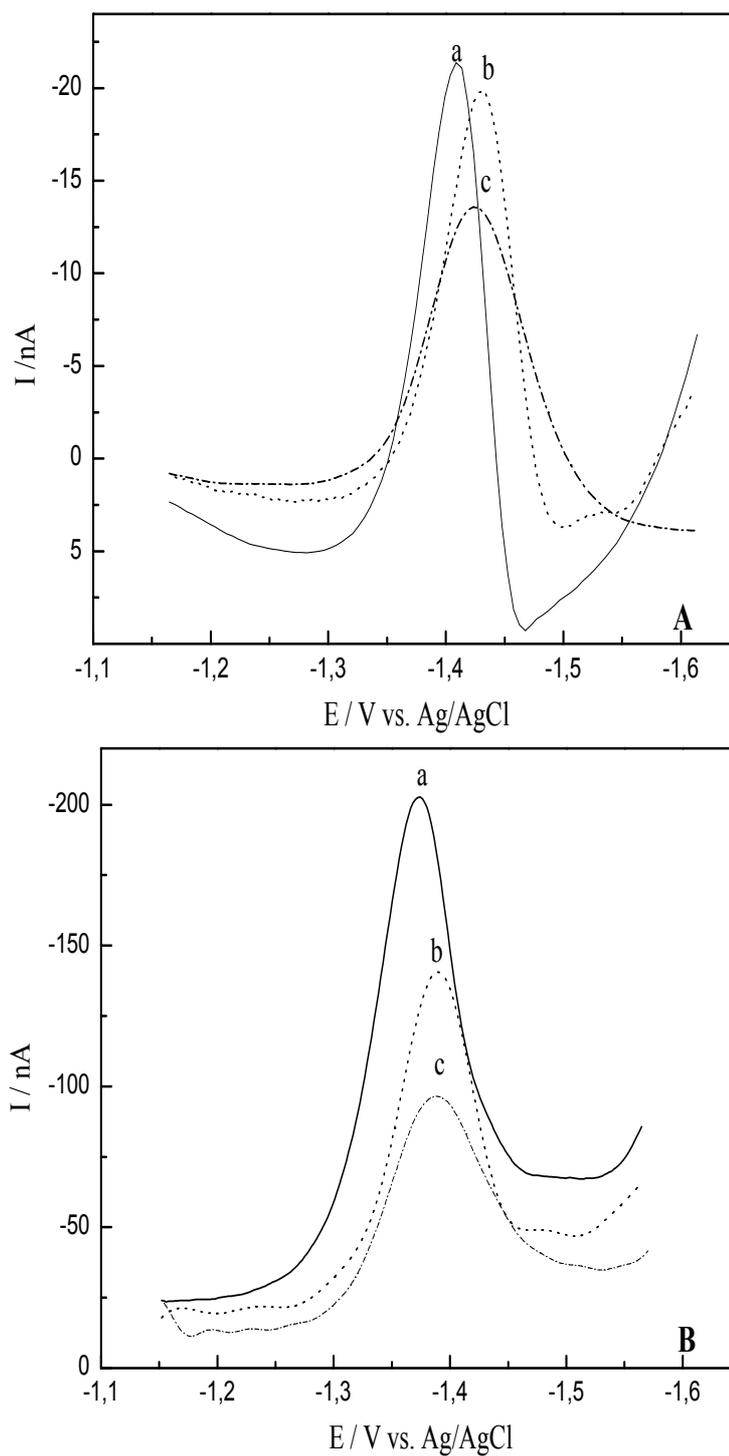
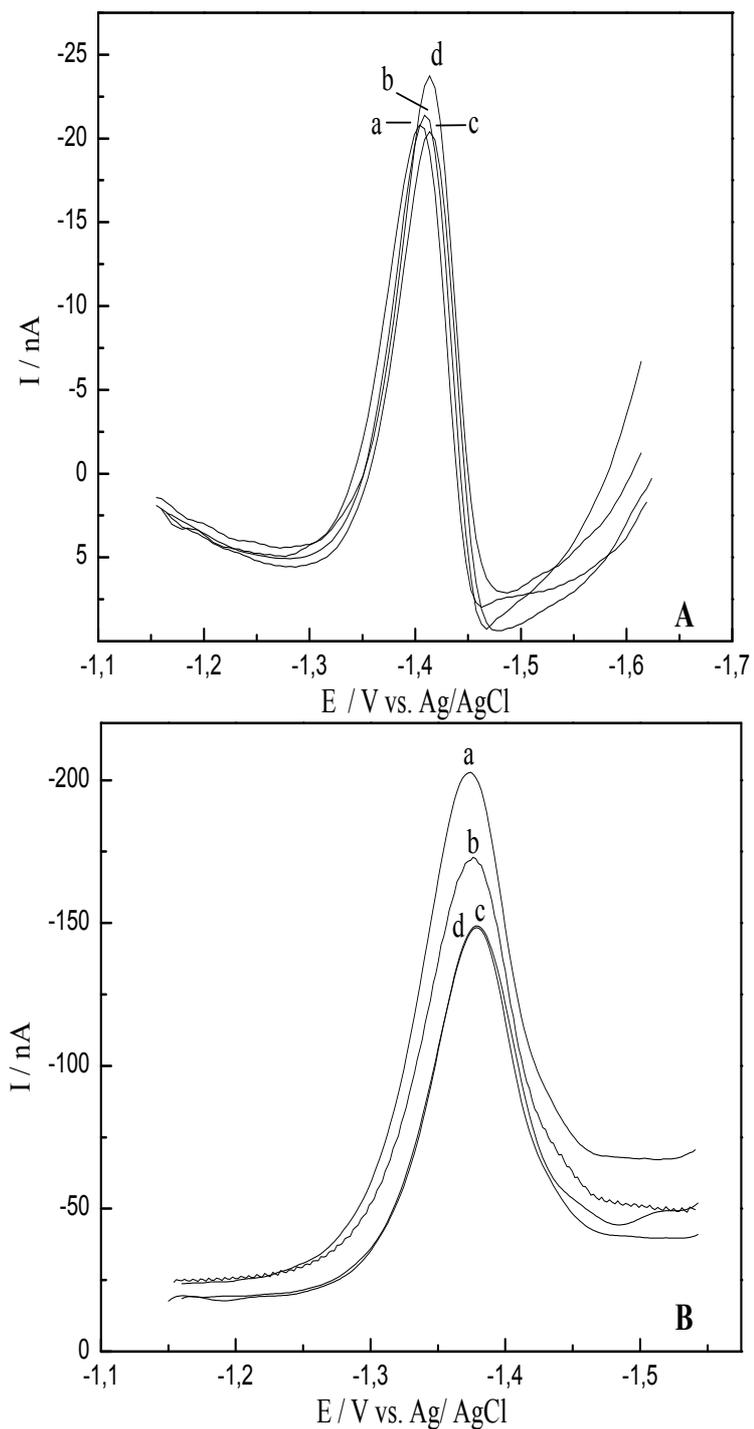


Figura 34: Polarogramas de Pulso Diferencial (A) e Voltamogramas de Onda Quadrada (B) para $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO na presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ BrCTA em diferentes eletrólitos: (a) tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (b) tampão BR $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,08), (c) LiCl $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$.

**Figura 35:**

Polarogramas de Pulso Diferencial (A) e Voltamogramas de Onda Quadrada (B) para ACLO ($1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em presença de BrCTA $2,41 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ para diferentes concentrações de tampão fosfato: (a) $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (b) $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (c) $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02), (d) $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,02).

3.6.3. Influência dos Parâmetros Instrumentais

3.6.3.1. Metodologia 1: Determinação de ACLO através da PPD

A avaliação dos parâmetros instrumentais da Polarografia de Pulso Diferencial também é muito importante para a otimização da definição do sinal analítico. Um deles é a amplitude do pulso (a) a ser utilizado, geralmente a escolha é feita entre os valores de 10 a 100 mV. ^[108] Sendo assim, a influência da amplitude na corrente de pico de ACLO também foi estudada (**Figura 36**), utilizando a velocidade de 8,25 mV.s⁻¹ (tempo de gotejamento- t_g de 0,6 segundos).

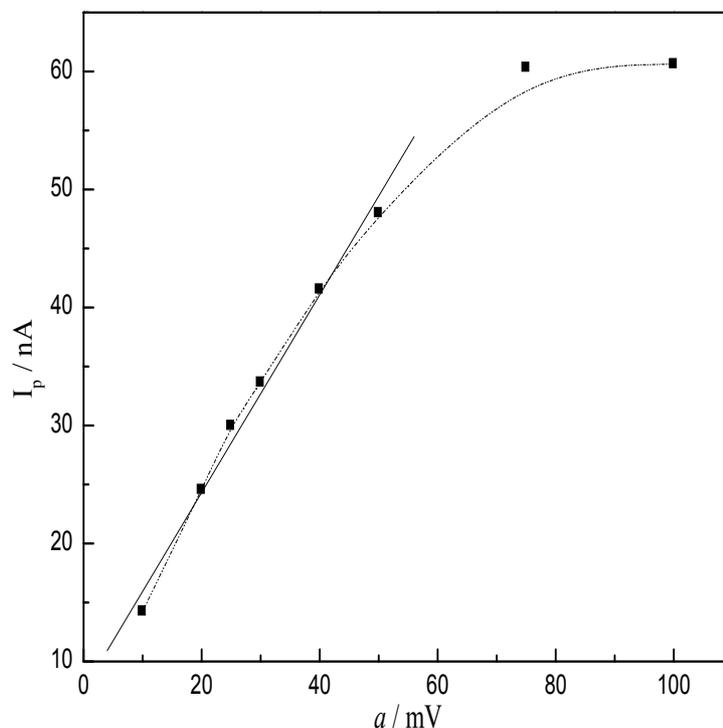


Figura 36: Dependência da I_p com a variação da amplitude de pulso para ACLO $1,94 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em presença de BCTA $2,42 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em tampão fosfato $0,04$ mol.L⁻¹, pH 6,02.

Como observado para valores de amplitude menores que 50 mV, o aumento da intensidade da corrente foi linear, no entanto, amplitudes maiores não atuaram de modo

significativo na sensibilidade do pico para propósitos analíticos. Em função disto, a amplitude de 50 mV foi selecionada para os demais estudos.

Definido o valor de 50 mV como amplitude do pulso, estudou-se a influência de outro parâmetro na corrente de pico de ACLO, a velocidade de varredura, a qual foi estudada na faixa de 1 a 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ para ACLO $1,94\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em presença de BrCTA $2,42\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,02.

Como mostrado na **Figura 37**, a velocidade de varredura não influenciou significativamente na I_p de ACLO, portanto, a velocidade até então utilizada nos experimentos anteriores - $8,25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, foi a velocidade mantida para os demais estudos com tempo de gotejamento de 0,6 segundos.

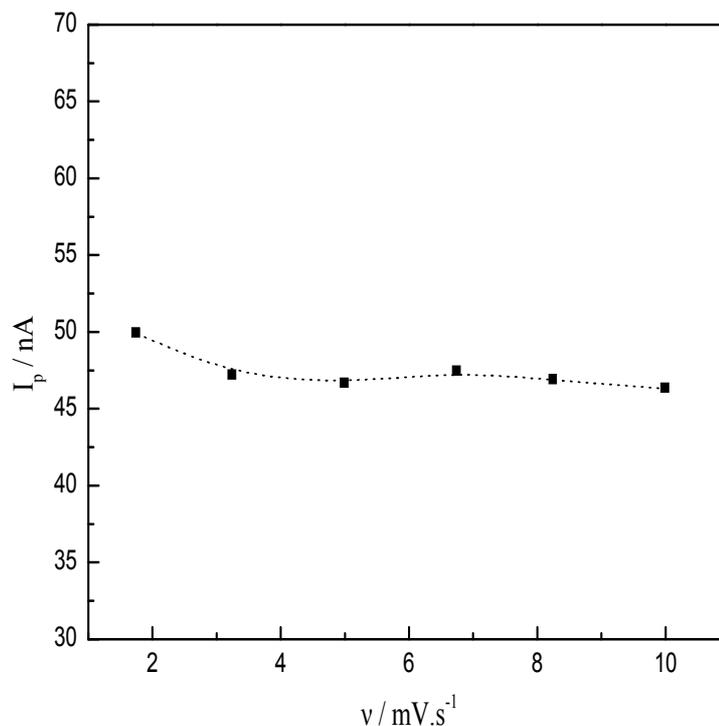


Figura 37: Dependência da I_p com a velocidade de varredura para ACLO $1,94\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em presença de BrCTA $2,42\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,02.

3.6.3.2. Metodologia 2: Determinação de ACLO através da VOQ

A frequência da onda quadrada é um dos parâmetros mais importantes da VOQ, pois é ela que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente a sensibilidade do método. [109-111]

A dependência da I_p em função da variação da frequência de aplicação dos pulsos (f) foi avaliada para uma solução $1,944 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,02, mantendo-se constante os parâmetros de incremento de varredura (E_s) igual a 2 mV e amplitude do pulso (E_{sw}) de 50 mV. A **Figura 38** apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a redução de ACLO, em função da variação da frequência de 30 a 360 Hz, assim como a influência deste parâmetro na I_p .

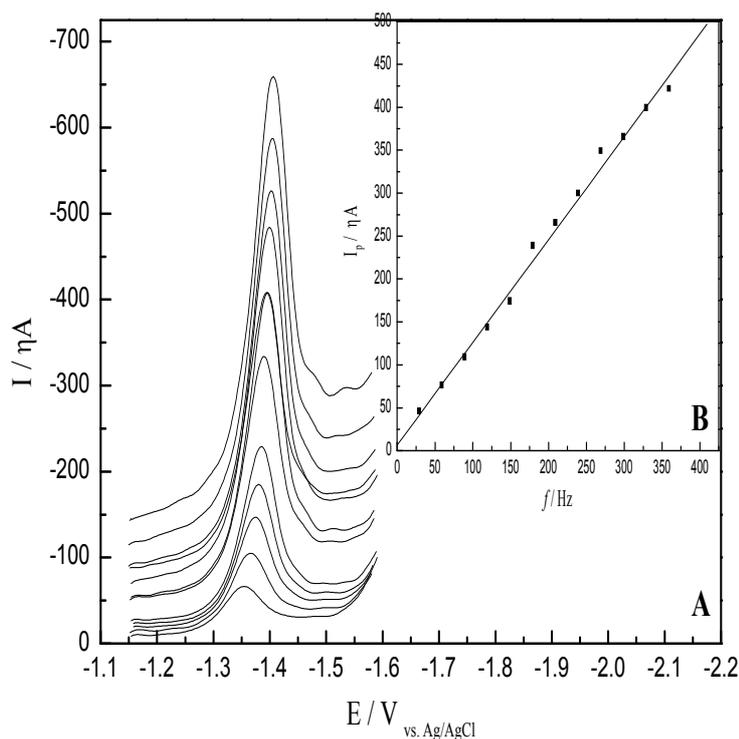


Figura 38: Voltamogramas de Onda Quadrada (A) para influência da variação da frequência (f) na redução de ACLO $1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,01 em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. $E_s = 2 \text{ mV}$ e $E_{sw} = 50 \text{ mV}$. (B) Inserção: Influência f na I_p do ACLO.

Como é possível observar, com o aumento do valor das frequências há um aumento proporcional na intensidade da corrente de pico, assim como o deslocamento dos potenciais de pico para regiões mais negativas. Assim, para fins analíticos, otimizou-se a frequência onde os resultados foram mais repetitivos, este valor foi de 150 Hz.

Para sistemas redox totalmente irreversíveis, a sensibilidade analítica na voltametria de onda quadrada também sofre grande influência com a variação da amplitude da onda (E_{sw}). [109-111]

A **Figura 39** apresenta o efeito da variação de E_{sw} na corrente de pico para o ACLO. Este parâmetro foi estudado mantendo a frequência de pulsos em 150 Hz e o incremento de varredura igual a 2 mV constantes. Como observado, valores de amplitudes maiores que 50 mV pareceram não atuar de modo significativo na sensibilidade da técnica, para propósitos analíticos, pois a partir deste valor a corrente de pico tornou-se praticamente constante. Em função disto, no desenvolvimento da metodologia eletroanalítica para determinação de ACLO através da técnica de VOQ, optou-se por trabalhar com amplitude da onda quadrada de 50 mV.

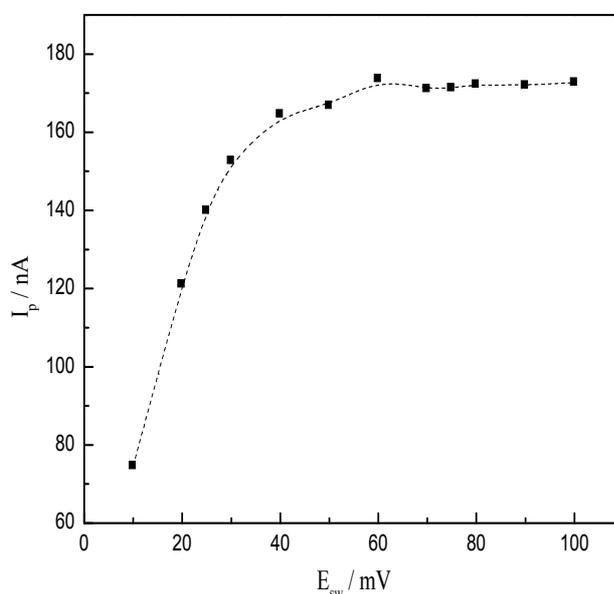


Figura 39: Influência da variação da amplitude (E_{sw}) na resposta da I_p em VOQ para uma solução $1,94 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ de ACLO, em tampão fosfato 0,04 mol.L⁻¹ pH 6,01, em presença de $2,42 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de surfactante BrCTA . $E_s = 2$ mV e $f = 150$ Hz.

Outro parâmetro também muito importante na VOQ é o incremento de varredura E_s , a velocidade efetiva da VOQ é o resultado do produto da frequência pelo incremento de varredura, assim, um E_s maior, pode aumentar o sinal obtido e, assim melhorar a sensibilidade do método. No entanto, é importante ressaltar que valores maiores de incrementos podem levar ao alargamento dos picos e, assim comprometer a resolução dos voltamogramas [110]. Conseqüentemente, este parâmetro também deve ser analisado.

Utilizando os parâmetros otimizados de frequência e amplitude da onda quadrada, 150 Hz e 50 mV, respectivamente, estudou-se a influência do incremento de varredura, E_s , na melhora da sensibilidade analítica da VOQ para redução de ACLO (**Figura 40**).

De acordo com os dados obtidos, a corrente de pico aumenta linearmente com o aumento do incremento de varredura. Entretanto, uma melhor definição da I_p é obtida até 6 mV, a partir deste valor observa-se um alargamento da linha de base e ocorre o deslocamento do potencial de pico para regiões mais negativas, portanto adotou-se este valor de incremento de varredura para os demais estudos.

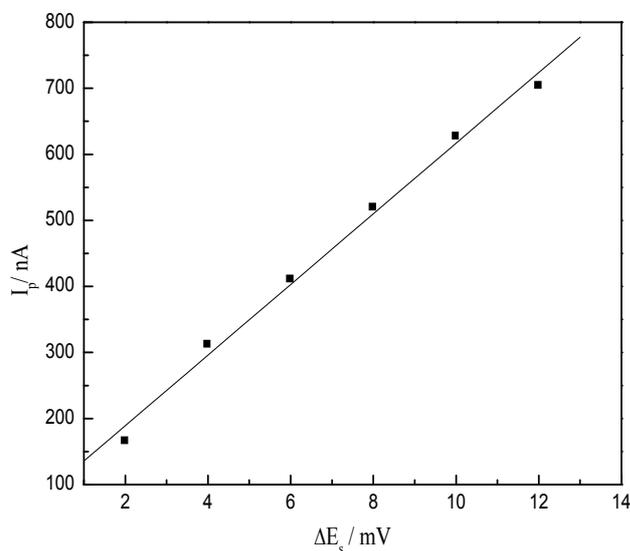


Figura 40: Influência do incremento de varredura (E_s) na resposta da I_p em VOQ para uma solução $1,94 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,01, em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de surfactante BrCTA. $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ e $f = 150 \text{ Hz}$.

3.6.4. Parâmetros Instrumentais Selecionados

Outros parâmetros experimentais os quais influenciam diretamente na resposta da I_p de ACLO, para ambas as técnicas, PPD e VOQ, também foram avaliados, tais como: tamanho da gota de Hg, velocidade de agitação, tempo de equilíbrio.

Desta forma, as melhores condições experimentais encontradas para estes parâmetros, assim como os demais que foram selecionados nos estudos anteriores, são apresentados nas tabelas abaixo (**Tabelas 16 e 17**), como parâmetros otimizados para o desenvolvimento da metodologia para determinação individual de ACLO utilizando as técnicas de PPD e VOQ.

Tabela 16: Parâmetros instrumentais para análise de ACLO através da técnica de PPD

Parâmetros	Parâmetro selecionado
Tipo de eletrólito	Tampão Fosfato
Concentração do eletrólito	0,04 mol.L ⁻¹
pH	6,00
Concentração do surfactante BCTA	2,42.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹
Amplitude do pulso	50 mV
Velocidade de varredura	8,25 mV.s ⁻¹
Tamanho da gota de Hg	0,52 mm ²
Tempo de gotejamento	0,6s
Tempo de equilíbrio	15 s
Velocidade de agitação	1.500 rpm

Tabela 17: Parâmetros instrumentais para análise de ACLO através da técnica de VOQ

Parâmetros	Parâmetro selecionado
Tipo de eletrólito	Tampão Fosfato
Concentração do eletrólito	0,04 mol.L ⁻¹
pH	6,00
Concentração do surfactante BCTA	2,42.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹
Amplitude do pulso	50 mV
Frequência do pulso	150 Hz
Incremento de varredura	6 mV
Tamanho da gota de Hg	0,52 mm ²
Tempo de equilíbrio	15 s
Velocidade de agitação	1.500 rpm

3.6.5. Validação do método proposto

A validação de um método analítico é realizada para garantir a confiabilidade de uma metodologia. Este processo tem como função assegurar a credibilidade das medidas obtidas para um determinado método proposto.^[112]

Além disso, o processo de validação têm se tornado requisito fundamental para publicação de novas metodologias, assim como para os órgãos regulamentadores, os quais exigem que um procedimento analítico seja validado, esta exigência tem por objetivo assegurar que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos, que o método forneça informações confiáveis.^[112]

Embora a validação de metodologias seja um assunto bem conhecido e abordado na literatura, não existe nenhum guia de validação de metodologia específico para métodos eletroanalíticos, assim como existe para as técnicas cromatográficas. Assim a maioria dos autores tem seguido princípios gerais que podem ser aplicados com sucesso para qualquer técnica analítica.^[100]

Dentre os principais parâmetros de validação estão: precisão, exatidão, linearidade, limites de detecção, limites de quantificação e recuperação.

A seguir, um resumo descritivo de alguns desses parâmetros considerados importantes para o desenvolvimento de uma metodologia:

Precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, mas realizados do mesmo modo, para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões [112]. Em geral a precisão é expressa em termos do desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR).

A exatidão descreve o grau de concordância entre resultados individuais encontrados através da metodologia proposta e valores considerados de confiança. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição de padrão [112]. A exatidão geralmente é expressa em termos do erro relativo (E_r) calculado entre os dados obtidos por estes procedimentos e o valor certificado do analito.

Linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A linearidade é expressa em termos de variância em torno da inclinação da linha (calculada através da regressão linear padrão) dos resultados obtidos a partir da análise de amostras contendo concentrações variadas da substância em exame “curva analítica”. [112]

O limite observável de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um procedimento experimental. [112]

O limite observável de quantificação (LOQ) representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. [112].

Geralmente o LOD e LOQ são calculados a partir das seguintes relações:

$$\text{LOD} = 3x \text{ DP}_a / b \quad (\text{Equação 5}), \text{ e } \text{LOQ} = 10x \text{ DP}_a / b \quad (\text{Equação 6})$$

Onde DP_a pode ser o desvio padrão do intercepto ou desvio padrão da média aritmética da corrente do branco, medida no potencial equivalente ao pico da substância em estudo, e b é a média da inclinação da curva de calibração, obtida para a construção de no mínimo três curvas analíticas.

3.6.6. Curvas analíticas para o ACLO

Curvas analíticas foram construídas para o padrão de ACLO sob as duas metodologias em estudo, PPD e VOQ, utilizando as melhores condições de trabalho para cada procedimento proposto.

As curvas analíticas foram construídas em triplicata para cada metodologia estudada. A **Figura 41B** mostra uma das curvas obtidas para ACLO por PPD, dentro do intervalo de concentração de $9,87 \cdot 10^{-6}$ a $1,04 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹. Como pode ser observado, a curva apresentou linearidade em todo intervalo de concentração estudado, com um coeficiente de correlação de 0,999.

Além disso, através da metodologia de PPD foi possível construir curvas analíticas de ACLO no intervalo de concentração de $9,87 \cdot 10^{-7}$ - $1,04 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, como é mostrado na **Figura 42** através da apresentação de uma dessas curvas. Neste intervalo de concentração, também foi possível obter uma excelente linearidade, com um coeficiente de correlação médio de 0,999.

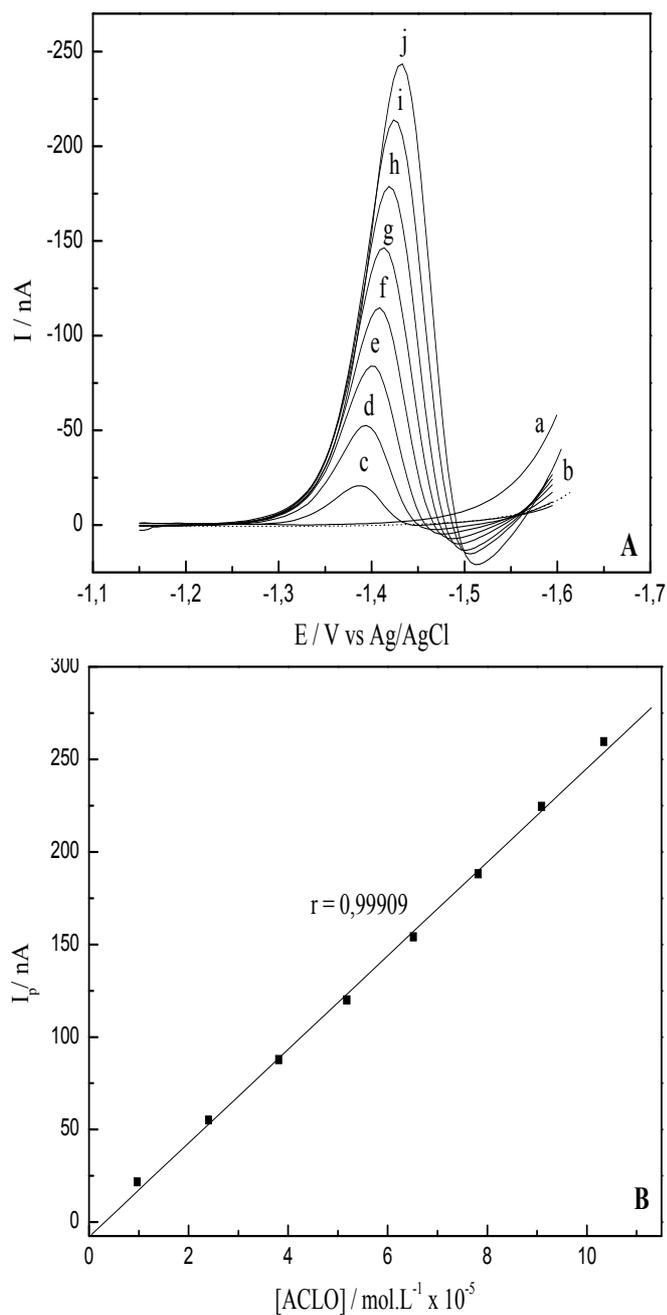


Figura 41: A. Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO onde: (c) $9,87 \cdot 10^{-6}$; (d) $2,43 \cdot 10^{-5}$; (e) $3,83 \cdot 10^{-5}$; (f) $5,20 \cdot 10^{-5}$; (g) $6,53 \cdot 10^{-5}$; (h) $7,84 \cdot 10^{-5}$; (i) $9,11 \cdot 10^{-5}$; (j) $1,04 \cdot 10^{-4}$ e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (b) $2,42 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA;. Parâmetros $a = 50$ mV, $t_g = 0,6$ s, $v = 8,25$ mV.s⁻¹. B. Dependência da I_p em função da concentração de ACLO.

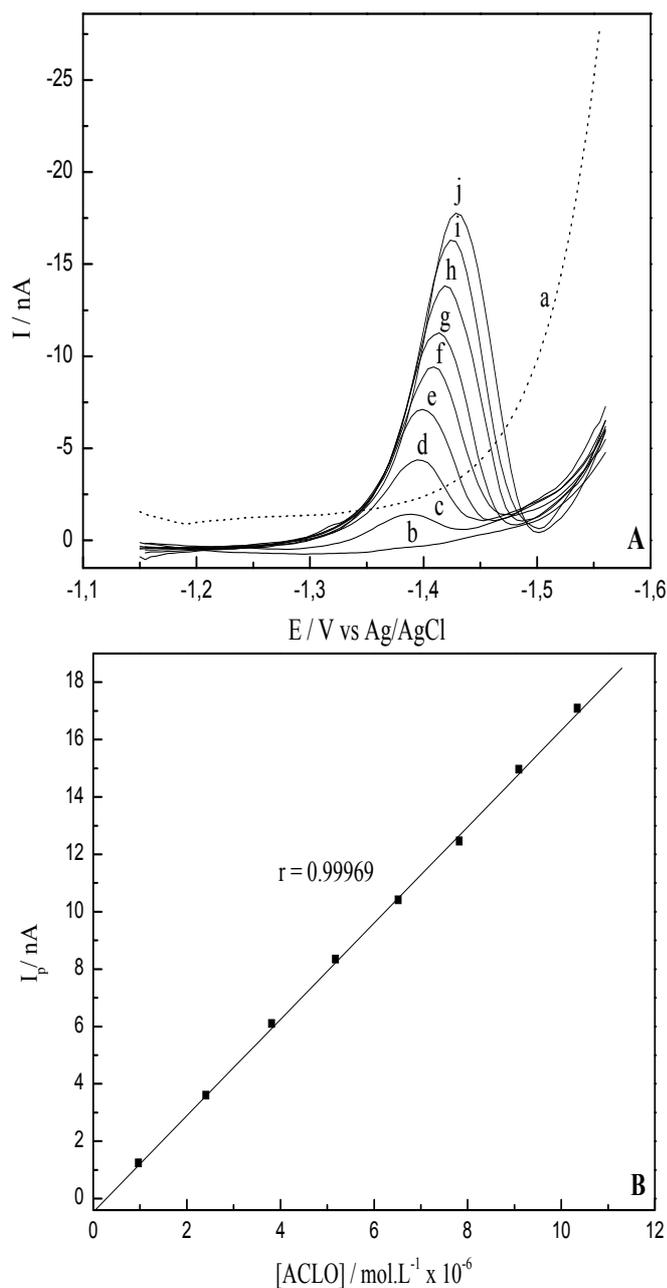


Figura 42: A. Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO, onde: (c) $9,87 \cdot 10^{-7}$; (d) $2,43 \cdot 10^{-6}$; (e) $3,83 \cdot 10^{-6}$; (f) $5,20 \cdot 10^{-6}$; (g) $6,53 \cdot 10^{-6}$; (h) $7,84 \cdot 10^{-6}$; (i) $9,11 \cdot 10^{-6}$; (j) $1,04 \cdot 10^{-5}$, e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (b) $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA;. Parâmetros $a = 50 \text{ mV}$, $t_g = 0,6 \text{ s}$, $v = 8,25 \text{ mV.s}^{-1}$. B. Dependência da I_p em função da concentração de ACLO.

Através da metodologia baseada na técnica de PPD, para análise ACLO, foi possível obter um amplo intervalo de linearidade, e os parâmetros obtidos para as curvas analíticas construídas estão resumidos na **Tabela 18**.

Os dados contidos na **Tabela 18** são resultado da média de cada parâmetro obtido para a triplicata das curvas analíticas de ACLO, para cada intervalo de concentração estudada. De acordo com estes dados foi possível obter os valores de LOD e LOQ (**Equações 5 e 6**), os quais foram calculados através do desvio padrão do intercepto, para três curvas analíticas.

Os valores de LOD e LOQ para o intervalo de concentração de $9,87.10^{-6}$ a $1,04.10^{-4}$ mol.L⁻¹, foram $6,44.10^{-8}$ e $2,15.10^{-7}$ mol.L⁻¹, respectivamente, e para o intervalo de concentração de $9,87.10^{-7}$ - $1,04.10^{-5}$ mol.L⁻¹ foram $2,36.10^{-7}$ e $7,86.10^{-7}$ mol.L⁻¹. Sendo portanto, possível constatar que a metodologia proposta através de PPD exibiu bons limites de detecção e quantificação para análise de ACLO.

Tabela 18: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de PPD para determinação de ACLO.

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Intervalo de concentração (mol.L ⁻¹)	0,099 - $1,04 \times 10^{-4}$	0,099 - $1,04 \times 10^{-5}$
Intercepto (nA) ^a	7,84	0,32
D.P. do intercepto	$5,43.10^{-2}$	0,14
Inclinação ^a (nA.L.mol ⁻¹)	$2,53.10^6$	$1,78.10^6$
D.P. da inclinação	$5,77.10^3$	$1,41.10^5$
Coefficiente de correlação (r) ^a	0,999	0,999
LOD (mol.L ⁻¹)	$6,44.10^{-8}$	$2,36.10^{-7}$
LOQ (mol.L ⁻¹)	$2,15.10^{-7}$	$7,86.10^{-7}$

^a média de três curvas de calibração.

d.p. = desvio padrão.

LOD = limite de detecção.

LOQ = limite de quantificação.

No que diz respeito ao método eletroanalítico baseado na técnica de VOQ, também foram construídas curvas analíticas para o padrão de ACLO. Assim como para PPD, também foi possível construir curvas de calibração em dois intervalos de concentração de ACLO, $1,23 \cdot 10^{-6}$ - $8,50 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ e $1,85 \cdot 10^{-7}$ - $1,28 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹, respectivamente. Como pode ser observado, a técnica de VOQ permitiu uma sensibilidade 10 vezes maior a metodologia proposta através da PPD.

As **Figuras 43 e 44** apresentam as curvas analíticas de ACLO obtidas através da VOQ, para os dois intervalos de concentração estudadas. Conforme mostrado, foram obtidas excelentes linearidades para os dois intervalos de concentração estudados, $1,23 \cdot 10^{-6}$ - $8,50 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ e $1,85 \cdot 10^{-7}$ - $1,28 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹, tendo sido apresentados coeficientes de correlação médios em torno de 0,998 e 0,999, respectivamente.

Assim como para PPD, as curvas analíticas de ACLO sob a técnica de VOQ também foram construídas em triplicata, e através destas foram obtidos valores médios de parâmetros quantitativos e assim calculados os limites de detecção e quantificação, como descrito anteriormente, novamente através da (**Equação 5 e 6**), todos estes dados são apresentados na **Tabela 19**.

Os valores de LOD e LOQ para o intervalo de concentração de $1,23 \cdot 10^{-6}$ - $8,50 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ foram $7,87 \cdot 10^{-9}$ e $2,62 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹ e para o intervalo de concentração de $1,85 \cdot 10^{-7}$ - $1,28 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ foram $1,34 \cdot 10^{-9}$ e $4,48 \cdot 10^{-9}$ mol.L⁻¹, respectivamente. Assim como esperado, a maior sensibilidade exibida pela técnica de VOQ, proporcionou limites de detecção e quantificação para o ACLO, mais baixos que aqueles obtidos para a metodologia baseada na PPD.

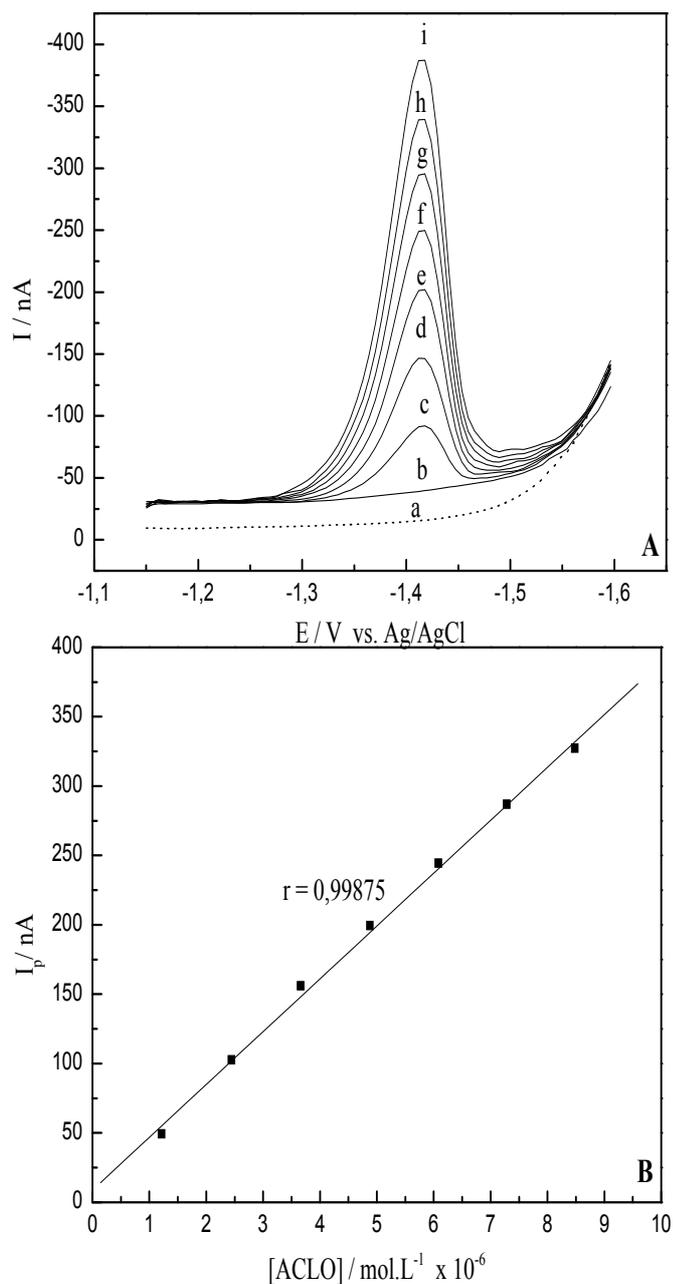


Figura 43: A. Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO, onde: (c) $1,23 \cdot 10^{-6}$; (d) $2,46 \cdot 10^{-6}$; (e) $3,68 \cdot 10^{-6}$; (f) $4,89 \cdot 10^{-6}$; (g) $6,10 \cdot 10^{-6}$; (h) $7,30 \cdot 10^{-6}$; (i) $8,69 \cdot 10^{-6}$ e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (b) $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA. Parâmetros: $f = 150 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. **B.** Dependência da I_p em função da concentração de ACLO.

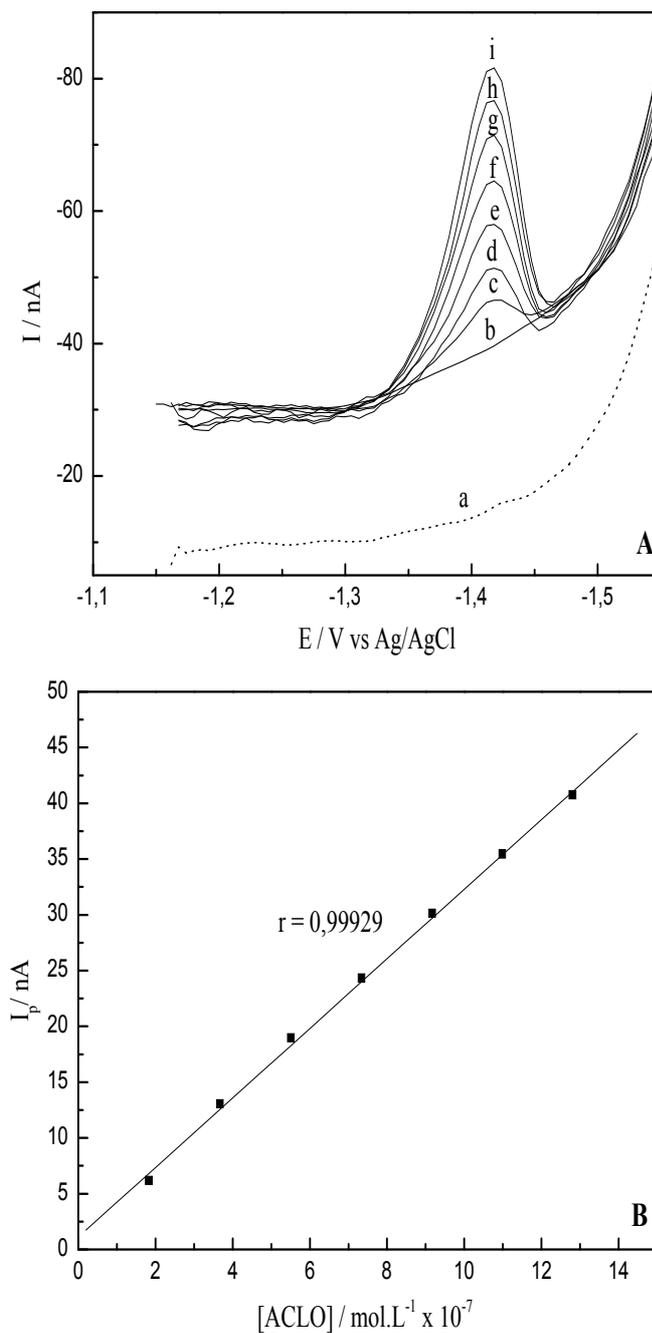


Figura 44: **A.** Voltamogramas de Onda Quadrada para diferentes concentrações molares do padrão de ACLO, onde: (c) $1,85 \cdot 10^{-7}$; (d) $3,69 \cdot 10^{-7}$; (e) $5,53 \cdot 10^{-7}$; (f) $7,36 \cdot 10^{-7}$; (g) $9,19 \cdot 10^{-7}$; (h) $1,10 \cdot 10^{-6}$; (i) $1,28 \cdot 10^{-6}$ e (a) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (b) $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA. Parâmetros: $f = 150 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. **B.** Dependência da I_p em função da concentração de ACLO.

Tabela 19: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de VOQ para determinação de ACLO.

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Intervalo de concentração (mol.L ⁻¹)	1,23 - 8,50 x 10 ⁻⁶	0,18 - 1,28x 10 ⁻⁶
Intercepto (nA) ^a	8,73	1,12
D.P. do intercepto	0,10	1,39.10 ⁻²
Inclinação ^a (nA.L.mol ⁻¹)	3,81.10 ⁷	3,10.10 ⁷
D.P. da inclinação	4,51 .10 ⁴	1,45.10 ⁵
Coefficiente de correlação (r) ^a	0,998	0,999
LOD (mol.L ⁻¹)	7,87.10 ⁻⁹	1,34.10 ⁻⁹
LOQ (mol.L ⁻¹)	2,62.10 ⁻⁸	4,48.10 ⁻⁹

^a média de três curvas de calibração.

d.p. = desvio padrão.

LOD = limite de detecção.

LOQ = limite de quantificação.

3.6.7. Aplicação das metodologias eletroanalíticas para determinação de ACLO.

3.6.7.1. Recuperação de ACLO em amostras de café solúvel

Como já discutido anteriormente, o ACLO é um importante componente de amostras de café, sendo portanto a sua determinação individual neste tipo de matriz de grande importância, como pode ser constatado pelos inúmeros trabalhos publicados na literatura^[43-58].

Assim, as metodologias eletroanalíticas propostas, foram então aplicadas para determinação de ACLO em amostras de café solúvel.

Inicialmente foi realizado o estudo de recuperação dos métodos desenvolvidos utilizando a PPD e a VOQ. Para isso, foram utilizadas amostras de café solúvel, disponíveis no mercado.

O procedimento de recuperação das metodologias de PPD e VOQ foi realizado através da adição de padrão na amostra. A partir deste processo, foram obtidas as respostas de I_p , para a amostra e para a amostra com as adições de padrão. Então, a I_p da amostra foi subtraída de todas as I_p obtidas para as diferentes amostras fortificadas com o padrão de ACLO. A primeira adição de padrão foi considerada como amostra e a sua concentração foi determinada pela adição dos padrões posteriores a este. Desta forma, foi possível calcular a recuperação de cada metodologia estudada, ou seja, para PPD e VOQ.

De acordo com os resultados obtidos a análise direta da amostra sem nenhum tratamento prévio, mostrou-se inadequada, em virtude da supressão do pico de ACLO. Desta forma, foi necessário utilizar um método adequado para tratamento da amostra de café solúvel.

Dentre os diferentes métodos disponíveis na literatura, destacou-se o método que utiliza o reagente de Carrez, o qual é utilizado em muitos trabalhos realizados por Trugo^[63], e portanto foi adotado neste trabalho.

Depois de adotado o método de tratamento das amostras com reagente de Carrez, as análises de recuperação das metodologias puderam então ser realizadas.

As **Figuras 45** e **46** ilustram duas das análises realizadas, através de PPD em presença da amostra de café solúvel A, e através de VOQ em presença da amostra de café solúvel B, respectivamente.

Em ambas as **Figuras 45** e **46** o polarograma (a) e voltamograma (a) foram obtidos para adição de 15 uL da solução da amostra de café solúvel (preparada como descrito na seção 2.4) na célula contendo o tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02 e $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA. Como é constatado, o pico de ACLO presente na amostra de café solúvel, pode ser observado sem nenhum prejuízo de possíveis interferentes da matriz, sob ambas as metodologias, PPD e VOQ.

Os voltamogramas e polarogramas (P_1) representam a adição de padrão de ACLO, no caso de PPD $1,98 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e de VOQ $1,85 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Em ambas as técnicas a adição (P_1) foi tomada como amostra e a sua concentração foi determinada pelas respectivas metodologias desenvolvidas, e assim através da concentração conhecida e da determinada foram calculadas as porcentagens de recuperação dos

métodos propostos, PPD VOQ; em ambos os casos, em triplicata, para cinco diferentes amostras de café solúvel. Os dados obtidos para estas análises são apresentados na Tabelas 20 e 21, respectivamente.

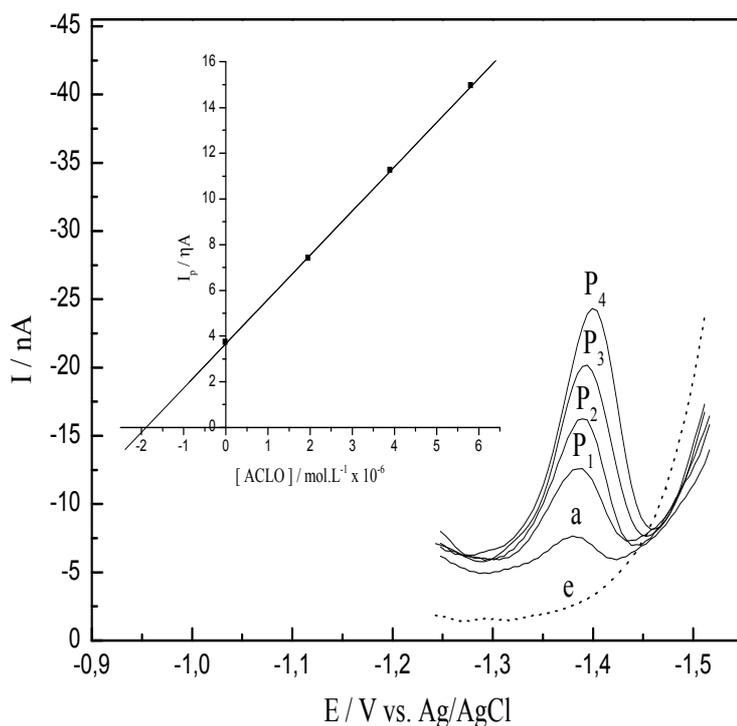


Figura 45: Polarogramas de Pulso Diferencial obtidos para adição de padrão de ACLO em café solúvel A, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 15μL da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 2.4) em presença de 2,42.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros a = 50 mV, t_g = 0,6 s, v = 8,25 mV.s⁻¹. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando P₁ = 0 mol.L⁻¹ (a ser determinada pelas adições posteriores), P₂ = 1,96.10⁻⁶ mol.L⁻¹, P₃ = 3,91.10⁻⁶ mol.L⁻¹, P₄ = 5,82.10⁻⁶ mol.L⁻¹ de ACLO.

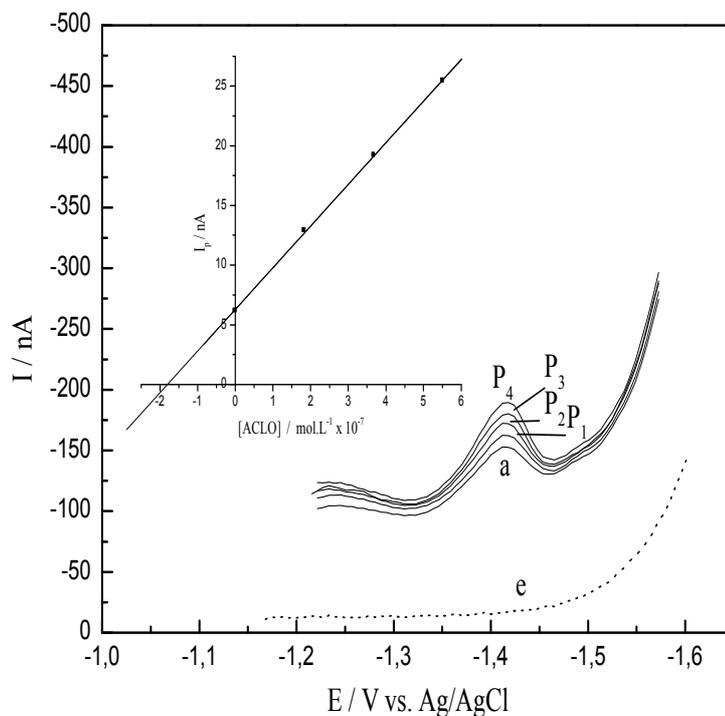


Figura 46: Voltamogramas de Onda Quadrada obtidos para adição de padrão de ACLO em amostra de café solúvel B, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 15 μL da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 5.4) em presença de 2,420.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: $f = 150$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV e $\Delta E_s = 6$ mV. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando $P_1 = 0$ mol.L⁻¹ (a ser determinada pelas adições posteriores), $P_2 = 1,84.10^{-7}$ mol.L⁻¹, $P_3 = 3,68.10^{-7}$ mol.L⁻¹, $P_4 = 5,52.10^{-7}$ mol.L⁻¹ de ACLO.

Tabela 20: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de café solúvel através da metodologia de PPD.

Amostra	A./ mol.L ⁻¹	E./ mol.L ⁻¹	R./ %	R. Média/ %	DP / %	DPR/ %	E.Média/ mol.L ⁻¹	E _r / %
Cafê A	1,98.10 ⁻⁶	1,90.10 ⁻⁶	96,41	97,82	1,42	1,45	1,93.10 ⁻⁶	2,18
		1,93.10 ⁻⁶	97,81					
		1,96.10 ⁻⁶	99,25					
Cafê B	1,98.10 ⁻⁶	2,02.10 ⁻⁶	102,12	100,14	1,93	1,93	1,97.10 ⁻⁶	0,15
		1,97.10 ⁻⁶	100,05					
		1,94.10 ⁻⁶	98,26					
Cafê C	1,98.10 ⁻⁶	2,08.10 ⁻⁶	105,24	105,90	0,70	0,66	2,09.10 ⁻⁶	5,87
		2,09.10 ⁻⁶	105,83					
		2,11.10 ⁻⁶	106,63					
Cafê D	1,97.10 ⁻⁶	1,95.10 ⁻⁶	98,68	99,59	3,64	3,65	1,97.10 ⁻⁶	0,40
		1,90.10 ⁻⁶	96,50					
		2,04.10 ⁻⁶	103,60					
Cafê E	1,96.10 ⁻⁶	2,05.10 ⁻⁶	104,69	101,87	2,90	2,85	2,00.10 ⁻⁶	1,83
		1,94.10 ⁻⁶	98,89					
		2,00.10 ⁻⁶	102,02					

Onde:

A. = Adicionado (Concentração adicionada).

E. = Encontrado (Concentração encontrada pelo método).

R. = Valor da recuperação pelo método proposto.

R. Média = Média da triplicata de análises de recuperação.

DP = Desvio Padrão das recuperações.

DPR = Desvio Padrão Relativo das recuperações.

E. Média = Média da triplicata das concentrações encontradas pelo método proposto.

E_r = Erro relativo entre o valor adicionado e o valor encontrado (concentração de ACLO)

Tabela 21: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de café solúvel através da metodologia de VOQ.

Amostra	A./ mol.L ⁻¹	E./ mol.L ⁻¹	R./ %	R. Média/ %	DP / %	DPR/ %	E.Média/ mol.L ⁻¹	E _r / %
Café A	1,85.10 ⁻⁷	1,88.10 ⁻⁷	101,94	104,36	2,42	2,32	1,93.10 ⁻⁷	4,33
		1,93.10 ⁻⁷	104,34					
		1,97.10 ⁻⁷	106,79					
Café B	1,85.10 ⁻⁷	1,90.10 ⁻⁷	102,98	101,81	3,77	3,70	1,88.10 ⁻⁷	1,79
		1,94.10 ⁻⁷	104,85					
		1,80.10 ⁻⁷	97,59					
Café C	1,85.10 ⁻⁷	1,88.10 ⁻⁷	101,91	100,89	1,06	1,05	1,87.10 ⁻⁷	1,03
		1,84.10 ⁻⁷	99,67					
		1,88.10 ⁻⁷	101,57					
Café D	1,85.10 ⁻⁷	1,92.10 ⁻⁷	103,73	103,32	1,90	1,84	1,91.10 ⁻⁷	3,30
		1,87.10 ⁻⁷	101,24					
		1,94.10 ⁻⁷	104,98					
Café E	1,85.10 ⁻⁷	1,83.10 ⁻⁷	98,89	102,52	3,15	3,07	1,89.10 ⁻⁷	2,49
		1,93.10 ⁻⁷	104,51					
		1,92.10 ⁻⁷	104,17					

Onde:

A. = Adicionado (Concentração adicionada).

E. = Encontrado (Concentração encontrada pelo método).

R. = Valor da recuperação pelo método proposto.

R. Média = Média da triplicata de análises de recuperação.

DP = Desvio Padrão das recuperações.

DPR = Desvio Padrão Relativo das recuperações.

E. Média = Média da triplicata das concentrações encontradas pelo método proposto.

E_r = Erro relativo entre o valor adicionado e o valor encontrado (concentração de ACLO)

Conforme pode ser observado nas **Tabelas 20 e 21** os valores de recuperação foram bastante satisfatórios, eles variaram entre 97,82 e 105,90 % para PPD e para VOQ entre 100,89 e 104,36 %, e portanto indicam a viabilidade da utilização de ambos os métodos propostos para determinação de ACLO em amostras de café solúvel.

Os dados obtidos para as análises do padrão de ACLO, em presença de diferentes amostras de café solúvel, reunidos nas **Tabelas 20 e 21** permitiram avaliar a precisão do método proposto expressa em termos do desvio padrão (D.P.) e desvio padrão relativo (D.P.R.) , assim como a exatidão do método, a partir do erro relativo (E_r). Os resultados obtidos para D.P., D.P.R. e E_r foram bastante satisfatórios, confirmando que as metodologias desenvolvidas podem ser utilizadas com sucesso para determinação de ACLO em amostras de café solúvel.

3.6.7.2. Recuperação de ACLO em amostras de chá mate

Adicionalmente, a recuperação das metodologias eletroanalíticas desenvolvidas, também foi avaliada na presença de amostras de chá mate, bebida esta, importante fonte do antioxidante ACLO. No entanto, como apresentado na seção 2.5 a amostra de chá mate não apresentou necessidade do tratamento com Reagente de Carrez, sendo, portanto analisada diretamente na célula eletroquímica.

Os dados obtidos para as análises do padrão de ACLO em presença de quatro diferentes amostras de chá mate, disponíveis no mercado, são apresentados nas **Tabelas 22 e 23**. Duas dessas análises, são apresentadas nas **Figuras 47 e 48**, para PPD e VOQ.

Conforme pode ser observado, as metodologias desenvolvidas apresentaram boas recuperações também na presença de outro tipo de amostra, neste caso chá mate, tendo variado entre 97,39 a 103,96% para PPD e 97,40 a 103,68% para VOQ. Os valores de DPR e E_r também foram novamente bastante satisfatórios, confirmando, portanto que os métodos propostos são aplicáveis não somente a amostras de café solúvel como também em chá mate.

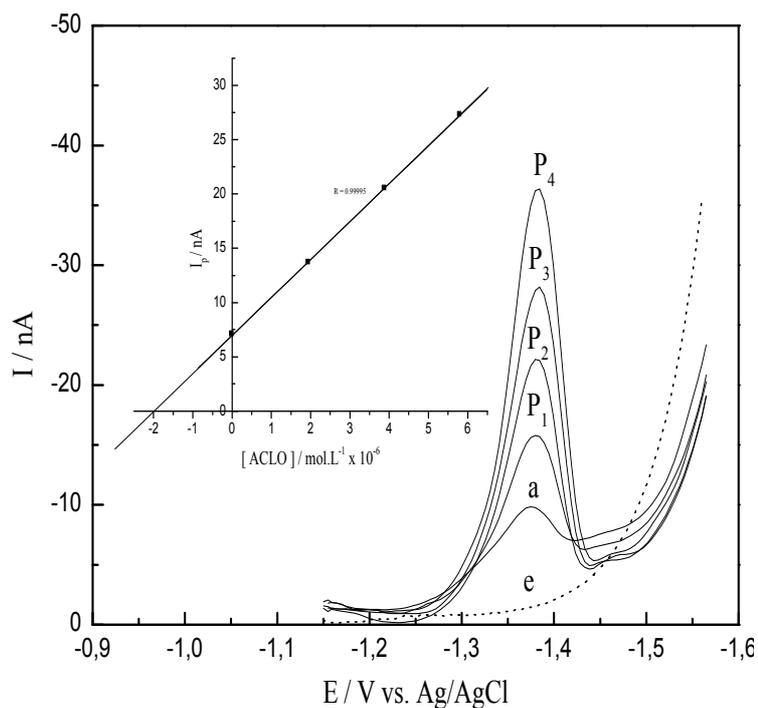


Figura 47: Polarogramas de Pulso Diferencial obtidos para adição de padrão de ACLO na presença da amostra de chá A, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (a) $50 \mu\text{L}$ da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA; e (P_1 - P_4) adições de padrão de ACLO. Parâmetros $a = 50 \text{ mV}$, $t_g = 0,6 \text{ s}$, $v = 8,25 \text{ mV.s}^{-1}$. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando $P_1 = 0 \text{ mol.L}^{-1}$ (a ser determinada pelas adições posteriores), $P_2 = 1,95 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $P_3 = 3,89 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $P_4 = 5,81 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO.

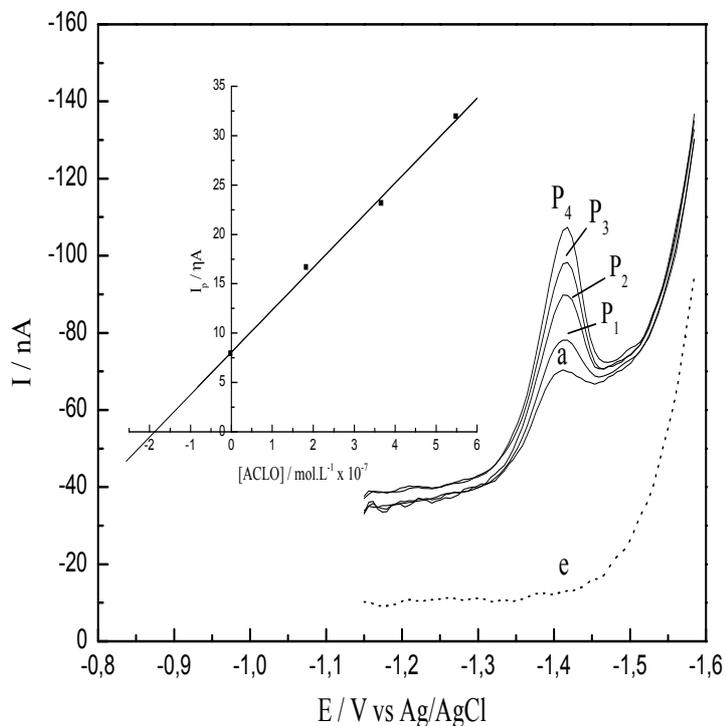


Figura 48: Voltamogramas de Onda Quadrada obtidos para adição de padrão de ACLO na presença da amostra de chá B, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (a) $50 \mu\text{L}$ da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: $f = 150 \text{ Hz}$, $E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração dos padrões de ACLO em presença da amostra de café solúvel, tomando $P_1 = 0 \text{ mol.L}^{-1}$ (a ser determinada pelas adições posteriores), $P_2 = 1,84 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, $P_3 = 3,68 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, $P_4 = 5,51 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO.

Tabela 22: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de chá mate, através da metodologia de PPD.

Amostra	A./ mol.L ⁻¹	E./ mol.L ⁻¹	R./ %	R. Média/ %	DP / %	DPR/ %	E.Média/ mol.L ⁻¹	E _r / %
Chá A	1,96.10 ⁻⁶	2,03.10 ⁻⁶	103,73	103,96	1,81	1,74	2,04.10 ⁻⁶	3,98
		2,07.10 ⁻⁶	105,88					
		2,00.10 ⁻⁶	102,28					
Chá B	1,96.10 ⁻⁶	1,90.10 ⁻⁶	97,19	99,96	2,73	2,73	1,96.10 ⁻⁶	0,05
		2,01.10 ⁻⁶	102,65					
		1,96.10 ⁻⁶	100,05					
Chá C	1,96.10 ⁻⁶	1,89.10 ⁻⁶	96,53	97,39	0,30	0,31	1,90.10 ⁻⁶	2,95
		1,92.10 ⁻⁶	97,60					
		1,90.10 ⁻⁶	97,04					
Chá D	1,96.10 ⁻⁶	2,04.10 ⁻⁶	104,18	103,55	1,30	1,25	2,03.10 ⁻⁶	3,53
		2,00.10 ⁻⁶	102,06					
		2,05.10 ⁻⁶	104,40					

Onde:

A. = Adicionado (Concentração adicionada).

E. = Encontrado (Concentração encontrada pelo método).

R. = Valor da recuperação pelo método proposto.

R. Média = Média da triplicata de análises de recuperação.

DP = Desvio Padrão das recuperações.

DPR = Desvio Padrão Relativo das recuperações.

E. Média = Média da triplicata das concentrações encontradas pelo método proposto.

E_r = Erro relativo entra o valor adicionado e o valor encontrado (concentração de ACLO)

Tabela 23: Resultados das curvas de recuperação obtidas para análise de ACLO nas diferentes amostras de chá mate, através da metodologia de VOQ.

Amostra	D _{VOQ} / mg.g ⁻¹	E./ mol.L ⁻¹	R./ %	R. Média/ %	DP / %	DPR/ %	E.Média/ mol.L ⁻¹	E _r / %
Chá A	1,84.10 ⁻⁷	1,79.10 ⁻⁷	97,31	99,87	3,11	3,12	1,84.10 ⁻⁷	0,11
		1,91.10 ⁻⁷	103,34					
		1,83.10 ⁻⁷	98,97					
Cafê B	1,84.10 ⁻⁷	1,91.10 ⁻⁷	103,57	103,68	1,68	1,62	1,91.10 ⁻⁷	3,69
		1,94.10 ⁻⁷	105,42					
		1,88.10 ⁻⁷	102,06					
Cafê C	1,84.10 ⁻⁷	1,92.10 ⁻⁷	104,23	102,12	2,78	2,72	1,88.10 ⁻⁷	2,11
		1,90.10 ⁻⁷	103,17					
		1,83.10 ⁻⁷	98,97					
Cafê D	1,84.10 ⁻⁷	1,79.10 ⁻⁷	97,29	97,40	0,86	0,88	1,80.10 ⁻⁷	2,60
		1,78.10 ⁻⁷	96,61					
		1,81.10 ⁻⁷	98,31					

Onde:

A. = Adicionado (Concentração adicionada).

E. = Encontrado (Concentração encontrada pelo método).

R. = Valor da recuperação pelo método proposto.

R. Média = Média da triplicata de análises de recuperação.

DP = Desvio Padrão das recuperações.

DPR = Desvio Padrão Relativo das recuperações.

E. Média = Média da triplicata das concentrações encontradas pelo método proposto.

E_r = Erro relativo entre o valor adicionado e o valor encontrado (concentração de ACLO)

3.6.8. Determinação de ACLO em amostras de café solúvel e chá mate.

As metodologias desenvolvidas foram então utilizadas para determinação do conteúdo ACLO, em amostras de café solúvel e chá mate através do método de adição de padrão. Alíquotas adequadas para cada amostra foram adicionadas a célula contendo 10 mL de tampão fosfato, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02 e $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, lembrando que as amostras de café foram tratadas com Reagente de Carrez, enquanto que as amostras de chá mate não necessitaram de nenhum tratamento extra.

As **Figuras 49 e 50** apresentam a análise das amostras de café solúvel C e D através da metodologias de PPD e VOQ, enquanto que as **Figuras 51 e 52** apresentam as análises das amostras de chá mate C e D, sob PPD e VOQ, respectivamente. Novamente os polarogramas e voltamogramas para as respectivas amostras, são simbolizados pela linha (a) e as adições de padrão são as linhas P (P₁-P₄).

Os dados obtidos para as análises dos dois diferentes tipos de amostras, cinco marcas de café solúvel e quatro marcas de chá, sob as duas metodologias desenvolvidas são apresentados nas **Tabelas 24 e 25**. Nessas tabelas são apresentados os valores do conteúdo de ACLO determinados nas respectivas amostras, a média das quantificações e os valores de desvio padrão e desvio padrão relativo das análises.

A comparação entre os valores do conteúdo de ACLO determinados sob ambas as metodologias propostas foram bastante satisfatórios, indicando a viabilidade dos métodos eletroanalíticos PPD e VOQ desenvolvidos, os quais podem ser utilizados com sucesso para determinação de ACLO em amostras de café solúvel e chá mate.

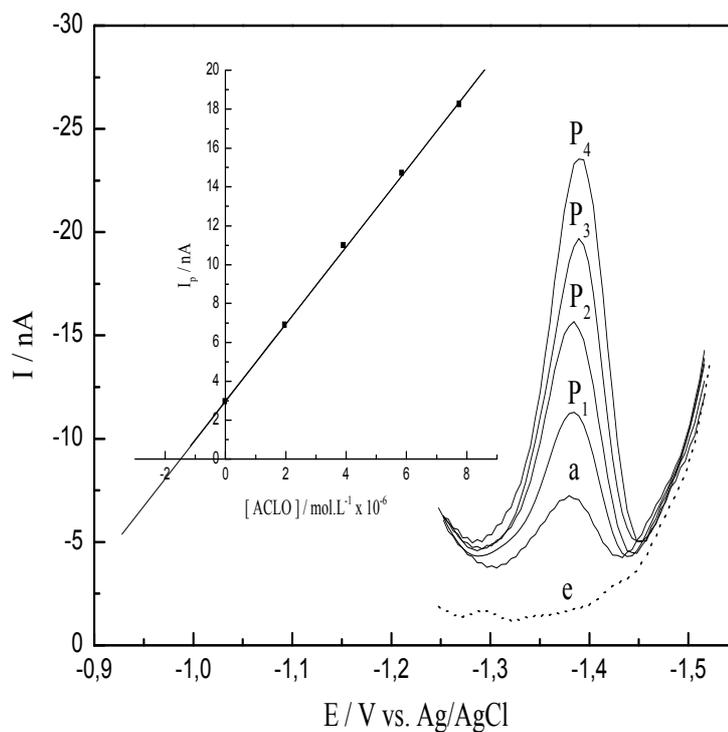


Figura 49: Polarogramas de Pulso Diferencial, obtidos para determinação de ACLO na amostra de café solúvel C, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (a) $15 \mu\text{L}$ da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 2.4) em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros $a = 50 \text{ mV}$, $t_g = 0,6 \text{ s}$, $v = 8,25 \text{ mV.s}^{-1}$. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de café solúvel C.

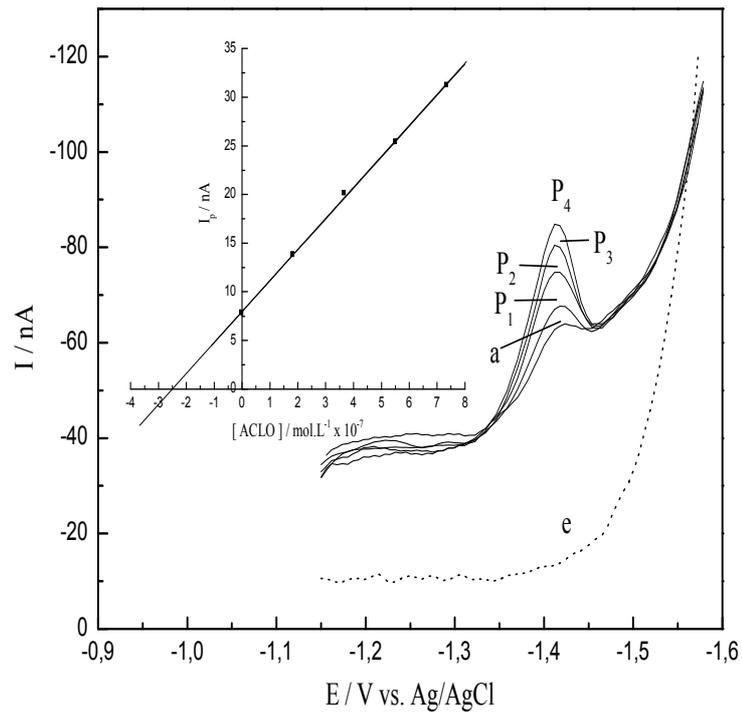


Figura 50: Voltamogramas de Onda Quadrada, obtidos para determinação de ACLO na amostra de café solúvel D, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (a) $15 \mu\text{L}$ da solução de amostra de café solúvel (ver preparo seção 2.4) em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: $f = 150 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 6 \text{ mV}$. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de café solúvel D.

Tabela 24: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de ACLO em amostras de café solúvel através das metodologias de PPD e VOQ.

Amostra	PPD				VOQ			
	D./ mg.g ⁻¹	D _M ./ mg.g ⁻¹	D.P./ %	D.P.R./ %	D./ mg.g ⁻¹	D _M ./ mg.g ⁻¹	D.P./ %	D.P.R./ %
Café A	23,71				24,68			
	24,97	24,05	0,80	3,35	23,99	24,26	0,37	1,51
	23,47				24,12			
Café B	20,63				20,77			
	19,90	19,95	0,66	3,31	21,75	21,20	0,50	2,36
	19,31				21,08			
Café C	33,73				34,27			
	33,18	33,82	0,69	2,04	34,15	34,15	0,12	0,37
	34,55				34,02			
Café D	66,40				66,17			
	65,78	66,20	0,36	0,55	65,18	66,42	1,39	2,09
	66,42				67,92			
Café E	9,77				10,88			
	10,18	10,01	0,21	2,14	11,00	10,91	0,08	0,76
	10,08				10,84			

Onde:

D. = Valor da determinação (Concentração de ACLO na amostra de café solúvel, determinada pelo método).

D_R. = Valor médio da triplicata de determinações (Concentração de ACLO na amostra de café solúvel, determinada pelo método).

DP = Desvio Padrão das determinações.

DPR = Desvio Padrão Relativo das determinações.

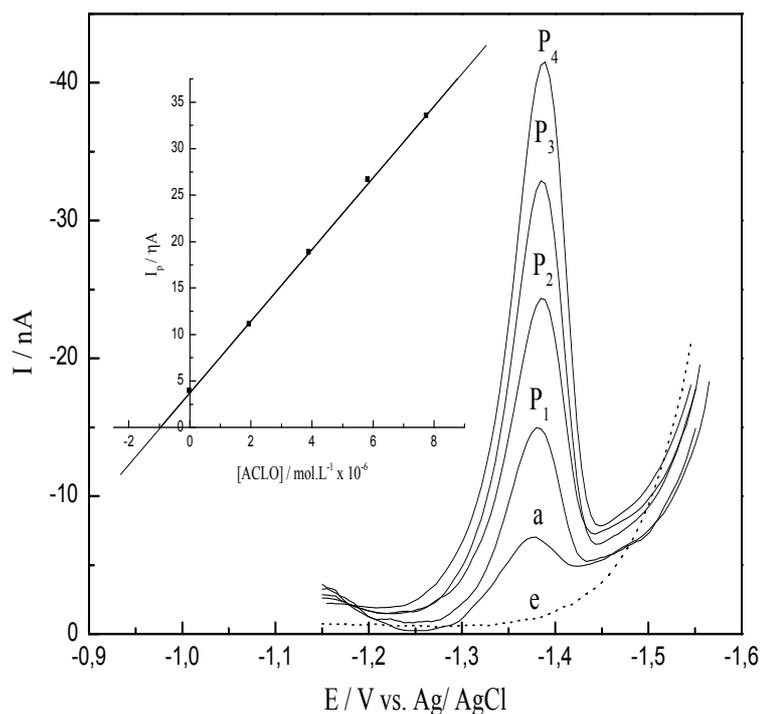


Figura 51: Polarogramas de Pulso Diferencial, obtidos para determinação de ACLO na amostra de chá mate C, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$); (a) $50 \mu\text{L}$ da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros $a = 50 \text{ mV}$, $t_g = 0,6 \text{ s}$, $v = 8,25 \text{ mV.s}^{-1}$. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de chá mate C.

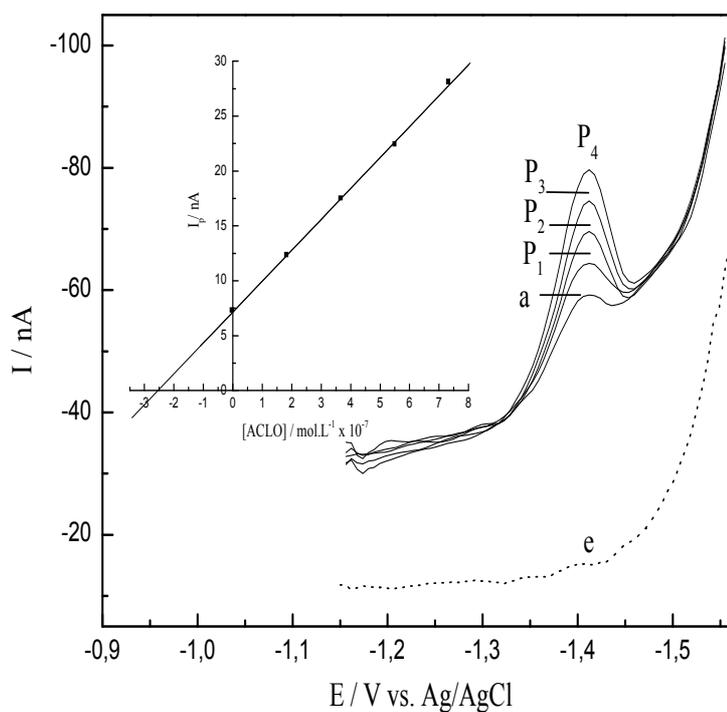


Figura 52: Voltamogramas de Onda Quadrada, obtidos para determinação de ACLO na amostra de chá mate D, onde: (e) branco (tampão fosfato pH 6,02, 0,04 mol.L⁻¹); (a) 50μL da solução de amostra de chá mate (ver preparo seção 2.5) em presença de 2,420.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA; e (P₁-P₄) adições de padrão de ACLO. Parâmetros: $f = 150$ Hz, $E_{sw} = 50$ mV e $\Delta E_s = 6$ mV. Inserção: Dependência da I_p em função da concentração de ACLO para amostra de chá mate D.

Tabela 25: Comparação entre os resultados obtidos para quantificação de ACLO em amostras de chá mate, através das metodologias de PPD e VOQ.

Amostra	PPD				VOQ			
	D./ mg.g ⁻¹	D _M ./ mg.g ⁻¹	D.P./ %	D.P.R./ %	D./ mg.g ⁻¹	D _M ./ mg.g ⁻¹	D.P./ %	D.P.R./ %
Chá A	14,48				13,51			
	13,89	14,14	0,30	2,15	13,64	13,62	0,10	0,75
	14,06				13,71			
Chá B	2,41				2,51			
	2,55	2,45	0,08	3,42	2,38	2,48	0,09	3,74
	2,40				2,56			
Chá C	4,39				4,40			
	4,25	4,32	0,07	1,53	4,51	4,47	0,05	1,21
	4,31				4,49			
Chá D	1,12				1,11			
	1,14	1,13	0,01	0,88	1,13	1,14	0,03	2,46
	1,14				1,17			

Onde:

D. = Valor da determinação (Concentração de ACLO na amostra de café solúvel, determinada pelo método).

D_M. = Valor médio da triplicata de determinações (Concentração de ACLO na amostra de café solúvel, determinada pelo método).

DP = Desvio Padrão das determinações.

DPR = Desvio Padrão Relativo das determinações.

3.7. Desenvolvimento de metodologia 3: Determinação de ACLO e ACAF simultaneamente através da PPD.

Considerando que as metodologias voltamétricas desenvolvidas através da oxidação do ACLO e ACAF abordadas na literatura, não tem obtido sucesso na distinção dos picos dos referidos ácidos, procurou-se desenvolver uma metodologia eletroanalítica baseada na redução destes compostos. A técnica empregada foi a PPD, porque apresentou em estudos preliminares, uma melhor separação dos picos destes ácidos.

3.7.1. Redução polarográfica simultânea de ACLO e ACAF

Como foi demonstrado anteriormente, o ACLO apresentou sua redução favorecida na presença de surfactantes, e em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 6,06), assim o uso de diferentes tipos de surfactantes, na redução simultânea de ACLO e ACAF, também foi testado.

A redução destes ácidos foi investigada na ausência e na presença de diferentes tipos de surfactantes: catiônico brometo de cetiltrimetil amônio - BrCTA, aniônico dodecil sulfato de sódio - SDS e neutro Tritron-X.

Como esperado, devido a grande similaridade dos grupos eletroativos de ACLO e ACAF, a redução simultânea destes ácidos também apresentou melhor definição na presença do surfactante catiônico BrCTA (**Figura 53**).

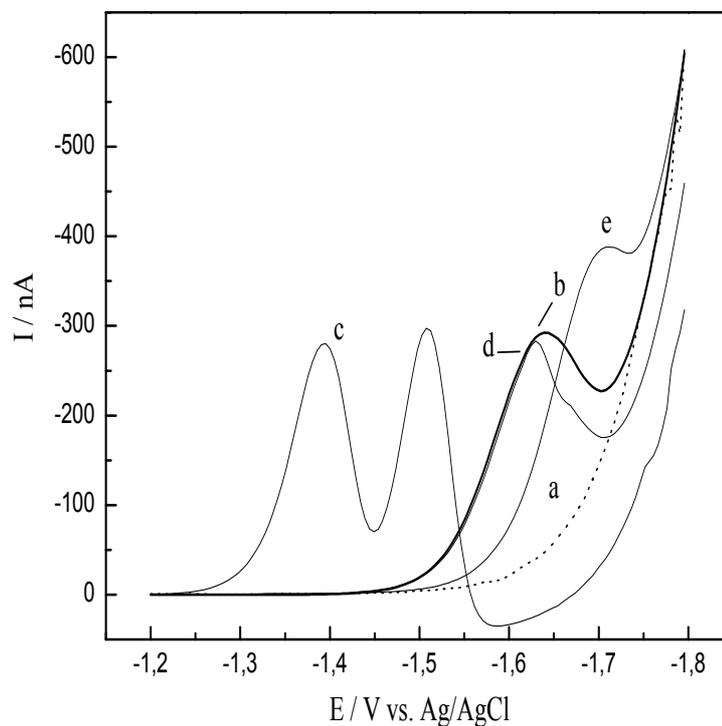


Figura 53: Influência de diferentes tipos de surfactante na redução de: (a) eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,06 (b) ACLO ($2,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e ACAF ($2,89 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) na ausência de surfactante, (c) ácidos na presença de surfactante catiônico BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (d) ácidos na presença de surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, (e) ácidos na presença de surfactante neutro Triton X-100, $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.7.2. Influência da concentração de BrCTA na redução de ACLO e ACAF

Em virtude da extrema importância do surfactante catiônico na redução de ACLO e ACAF como mostrado no estudo anterior, avaliou-se a influência da concentração de BrCTA na redução simultânea destes ácidos.

Na **Figura 54** são apresentados os polarogramas de ACLO e ACAF com o aumento da concentração de BrCTA. Conforme pode ser observado o aumento da

concentração do surfactante proporcionou o aumento da definição dos sinais de redução dos ácidos.

O efeito da concentração de BrCTA nos potenciais de pico de ACLO e ACAF é mostrado na **Figura 55 a**, os potenciais de pico de ACLO e ACAF apresentaram um grande deslocamento para valores menos negativos com aumento da concentração de surfactante catiônico, até aproximadamente $3,22 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, e a partir deste valor, o deslocamento tornou-se menos acentuado, encontrando aproximadamente um valor constante a partir de $4,01 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Na **Figura 55b** é apresentado o efeito da concentração de BrCTA a separação dos potenciais de pico dos referidos ácidos. O que se observa, é que até a concentração de $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA há um aumento desta separação, no entanto a partir deste valor há uma pequena diminuição, até chegar a um valor aproximadamente constante.

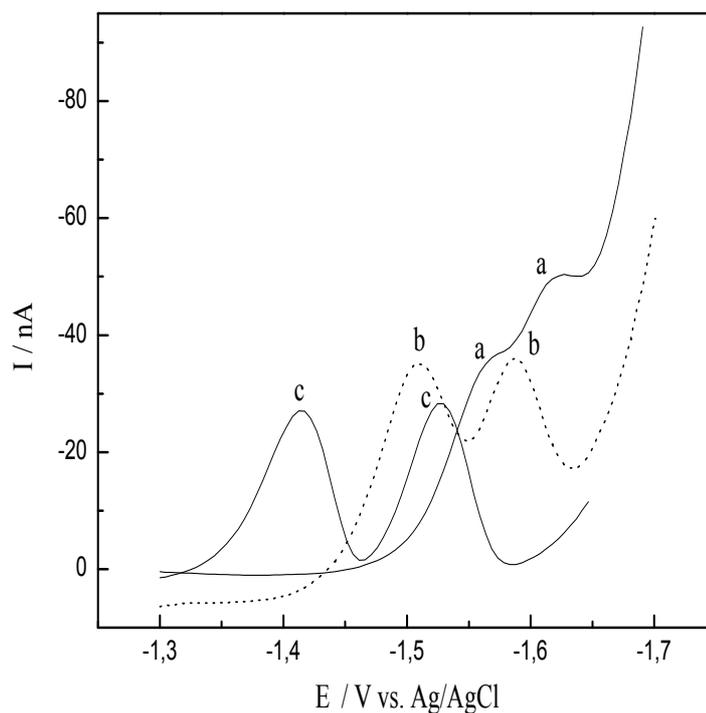


Figura 54: Polarogramas de Pulso Diferencial para $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO e $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACAF em eletrólito tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,14, na presença de concentrações crescentes de BrCTA: (a) $4,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (b) $1,22 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (c) $2,42 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

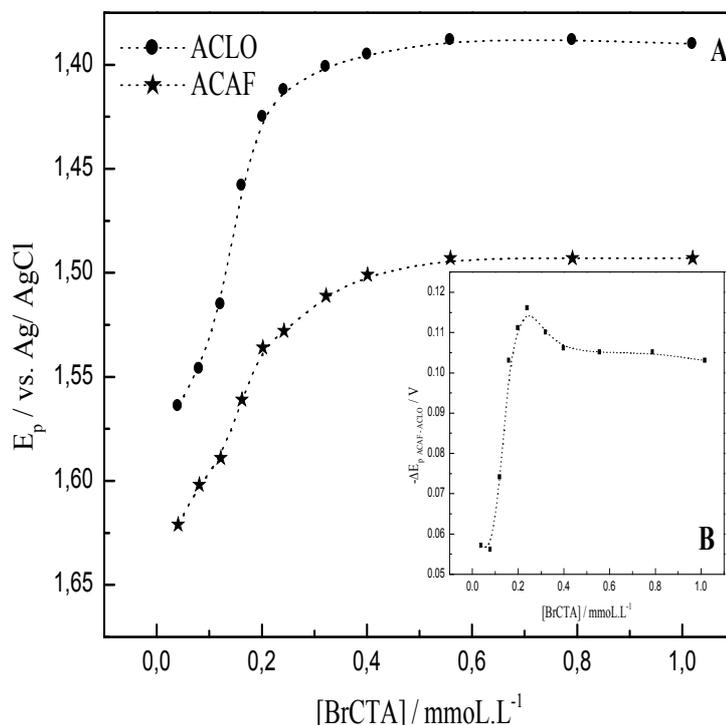


Figura 55: Dependência de: **(A)** Influência do aumento da concentração de BrCTA nos E_p s de $1,964 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO e de ACAF $1,966 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e **(B)** diferença entre os E_p s de ACLO e ACAF.

No que diz respeito as correntes de pico dos ácidos polifenólicos, há um aumento de I_p para ACLO até $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ e para ACAF até $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, a partir destas concentrações de surfactante, observa-se a queda dos valores de I_p (**Figura 56**).

Assim, para fins de desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para determinação destes ácidos simultaneamente, optou-se por adotar uma concentração de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, a qual apresentou uma melhor definição dos sinais dos ácidos.

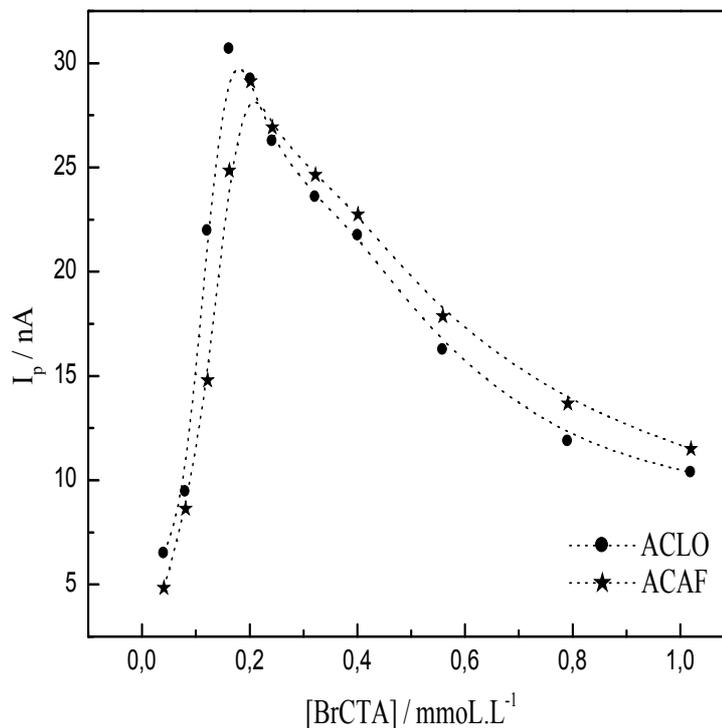


Figura 56: Dependência das I_p s de $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACLO e $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de ACAF com a concentração do surfactante BrCTA.

3.7.3. Influência do pH na redução simultânea de ACLO e ACAF

Outro parâmetro avaliado para redução polarográfica simultânea de ACLO e ACAF foi o pH do eletrólito suporte, este estudo foi realizado em tampão acetato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ no intervalo de pH de 4,06 a 5,47, em tampão fosfato $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ de 6,14 a 11,7, e nos pHs 1,83 e 3,06 em soluções de ácido acético e ácido fosfórico $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente.

Os polarogramas apresentados na **Figura 57** mostram como o pH influencia significativamente na redução de ACLO e ACAF. Em meios muito ácidos somente foi observado um único pico de redução, entretanto o aumento do pH proporcionou o aumento da separação dos picos, definindo assim o sinal de redução de cada ácido. No

entanto, a partir do pH 7,17 a resolução do pico de ACAF passou a ser comprometida pela proximidade à descarga do eletrólito, até que para valores acima de pH 9,08 não foi mais possível observar sua redução.

Como é observado na **Figura 58 a**, os potenciais de pico de ACLO e ACAF variam linearmente com aumento de pH, sendo deslocados para valores mais negativos, com este aumento, isto pode ser atribuído à existência de reações de pré-protonação à transferência eletrônica.^[93]

O comportamento do E_p de ACLO com pH apresentou três segmentos lineares, entre pH 3,06 e 4,46, entre 4,46 e 8,17 e entre 8,17 e 11,7, com pontos de intersecção 3,92 e 7,71 próximos aos valores de pK_a do ACLO, abordados na seção 3.4. Para o ACAF observou-se dois segmentos lineares, entre 3,06 a 4,46 e entre 4,46 a 9,06 com um ponto de intersecção em 4,24, próximo aos valores de pK_a reportados na literatura 4,45^[95], 4,37^[96].

Já o comportamento da corrente de pico para cada ácido em função do pH representada na **Figura 59**, mostra valores máximos em torno de 5,47 para ACLO e 6,17 para ACAF, apresentando uma acentuada queda deste parâmetro para ambos os ácidos, a partir de pH 8,17.

Como o pH influencia significativamente na redução polarográfica de ACLO e ACAF, assim para fins de otimização deste parâmetro para desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica, adotou-se o pH 6,14, para os demais estudos, considerando que este foi o valor onde foi observado: uma maior definição dos picos, em virtude da separação destes sem comprometimento pela proximidade da descarga do eletrólito, assim como foi onde se observou valores máximos da I_p para ambos os ácidos.

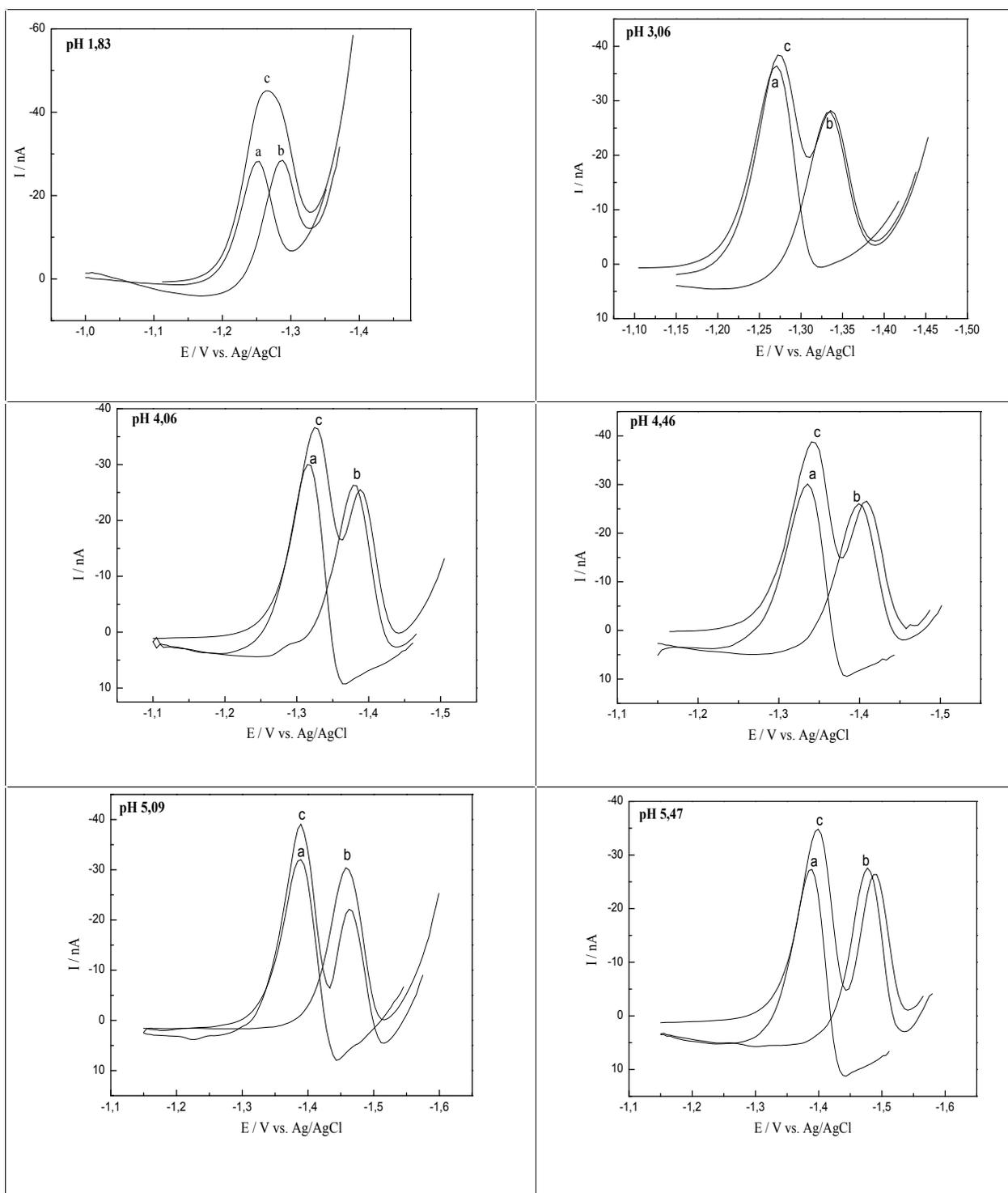


Figura 57 a: Polarogramas de Pulso Diferencial em diferentes de pHs do eletrólito suporte onde: (a) $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO, (b) $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF e (c) $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO e $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF, todos na presença de $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA.

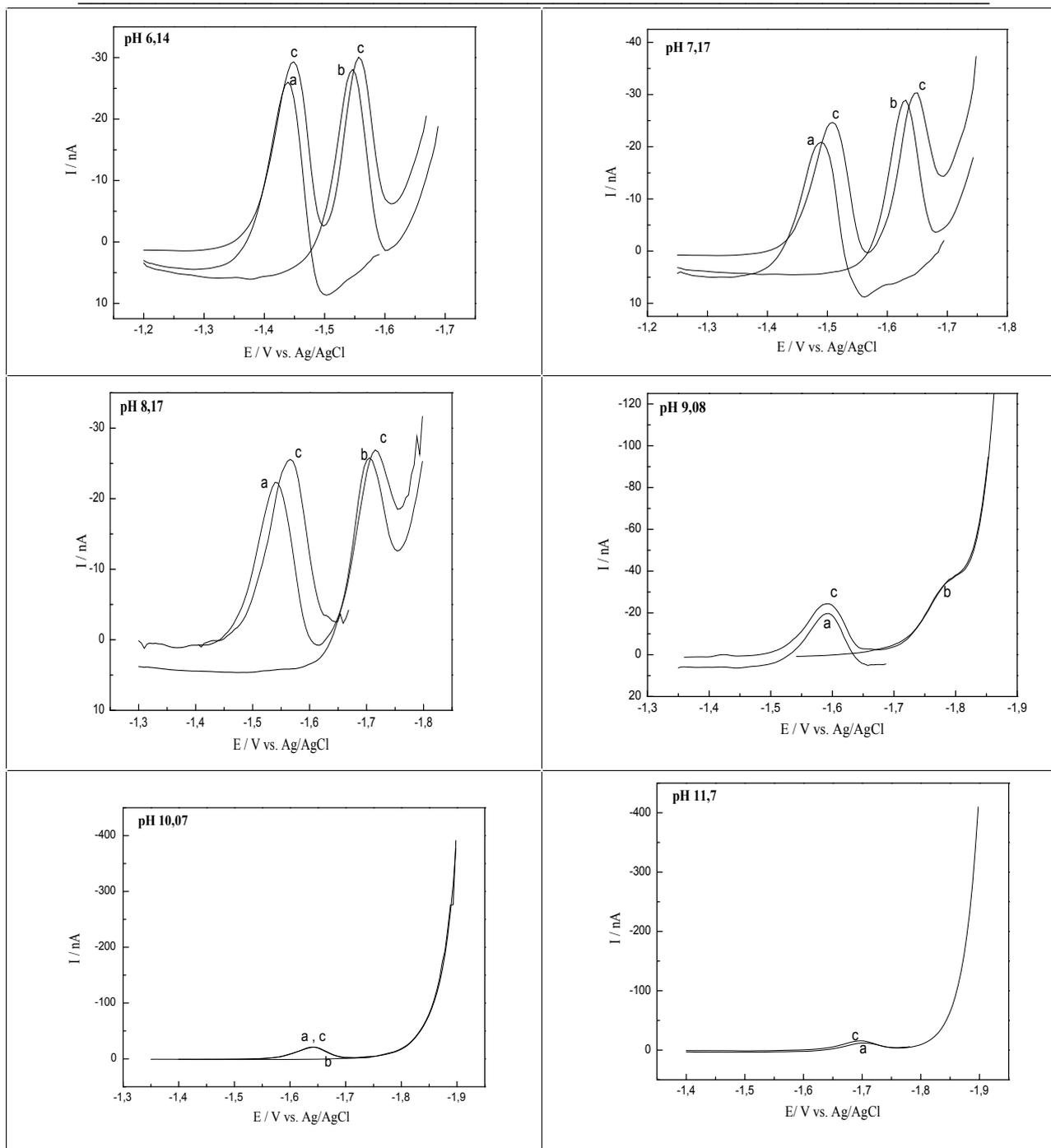


Figura 57 b: Polarogramas de Pulso Diferencial em diferentes de pHs do eletrólito suporte onde: (a) $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO, (b) $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF e (c) $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO e $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF, na presença de $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA .

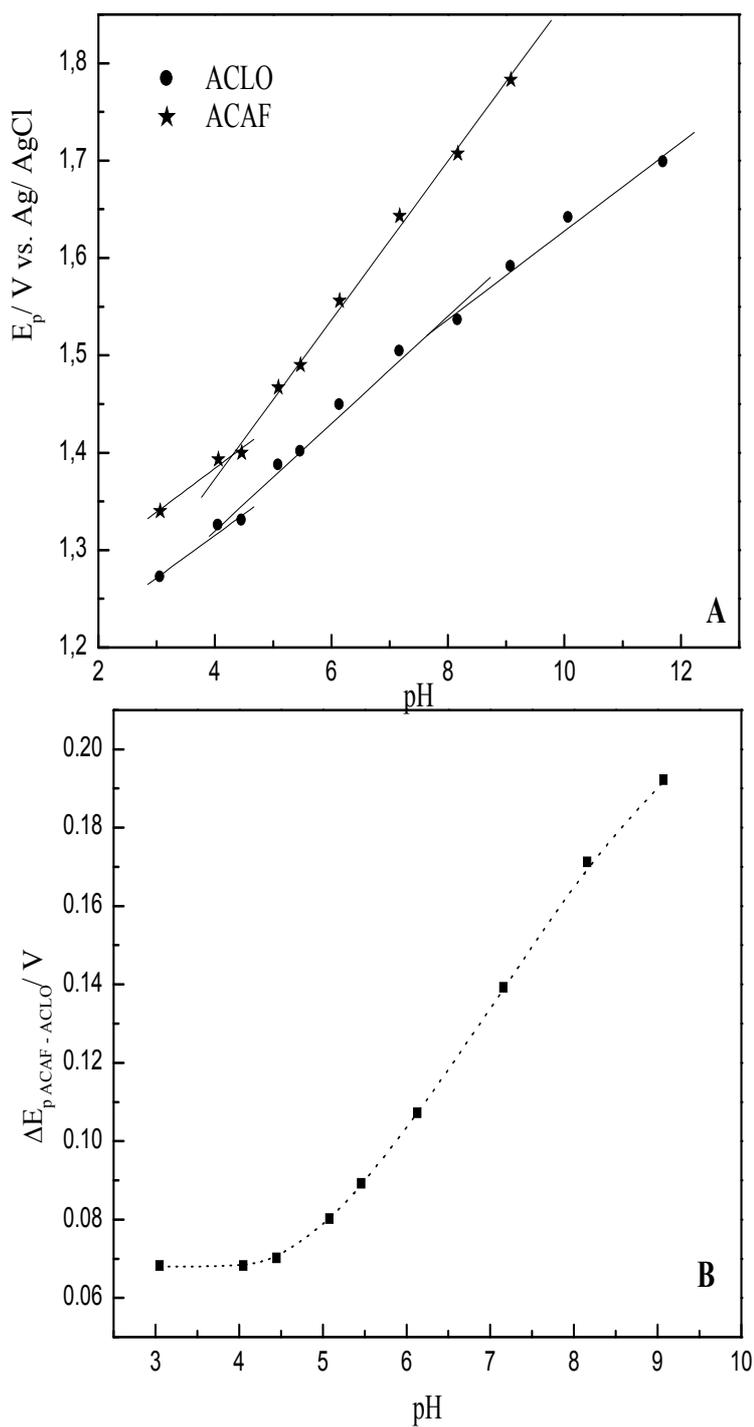


Figura 58: (A) Influência do pH do eletrólito suporte $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, nos E_p s de ACLO $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF na presença de $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA, através da técnica de PPD, e (B) Separação dos E_p s de ACLO e ACAF.

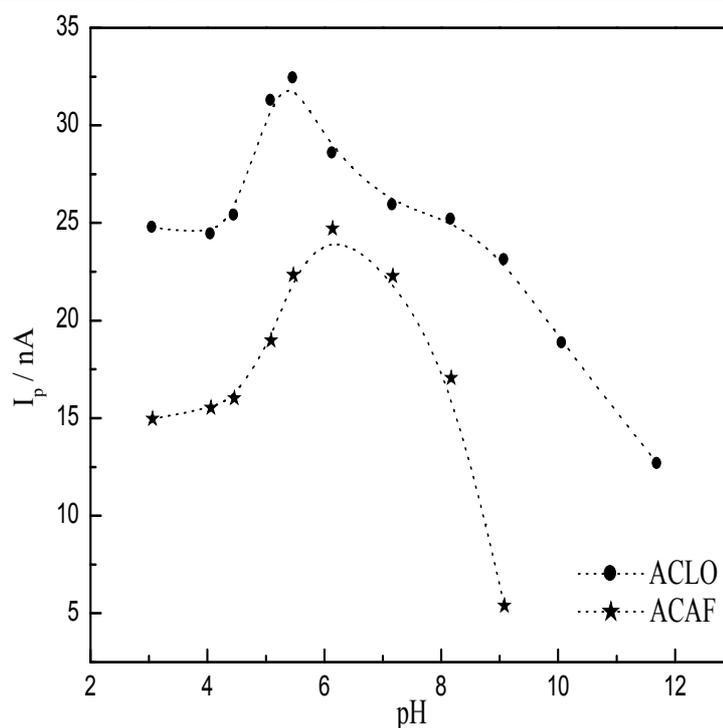


Figura 59: Influência do pH do eletrólito suporte 0,04 mol.L⁻¹, na resposta de I_p para ACLO 1,96.10⁻⁵ mol.L⁻¹ e 1,97.10⁻⁵ mol.L⁻¹ ACAF na presença de 2,02.10⁻⁴ mol.L⁻¹ de BrCTA, através da técnica de PPD.

3.7.4. Influência do tipo e da concentração do eletrólito suporte

Outro parâmetro investigado na redução polarográfica de ACLO e ACAF foi o tipo do eletrólito suporte. Para este estudo foram então adotados tampão Britton-Robinson e uma solução de LiCl sob as mesmas condições até então utilizadas em tampão fosfato.

Como é apresentado na **Figura 60**, a solução de LiCl não apresentou a distinção do sinal de redução de cada ácido, enquanto que para os tampões BR e fosfato foi possível identificar o pico de ACLO e ACAF separadamente, entretanto a resolução do pico de ACAF mostrou-se mais comprometida em tampão BR, pela sua proximidade

a descarga do eletrólito, desta forma o tampão fosfato foi mantido para os demais estudos.

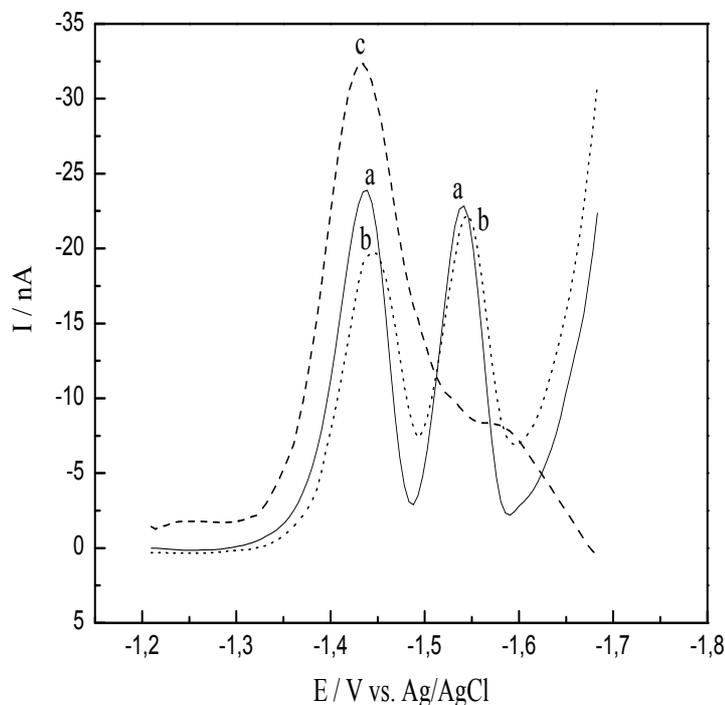


Figura 60: Polarogramas de Pulso Diferencial de $1,95 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO e $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF em presença de $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA em diferentes eletrólitos suporte na concentração de $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$: (a) tampão fosfato pH 6,06, (b) tampão BR pH 6,04 e (c) LiCl pH 6,01.

Além disso, a concentração do eletrólito suporte tampão fosfato também foi investigada, nas concentrações de 0,02, 0,04, 0,08 e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Como é mostrado na **Figura 61**, o aumento da concentração do eletrólito promoveu um pequeno deslocamento dos picos de redução de ACLO e ACAF para potenciais mais negativos, e para as concentrações de 0,08 e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ observou-se o comprometimento do pico de ACAF pela proximidade à descarga do eletrólito, assim adotou-se $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ para os demais estudos como a concentração para o eletrólito suporte.

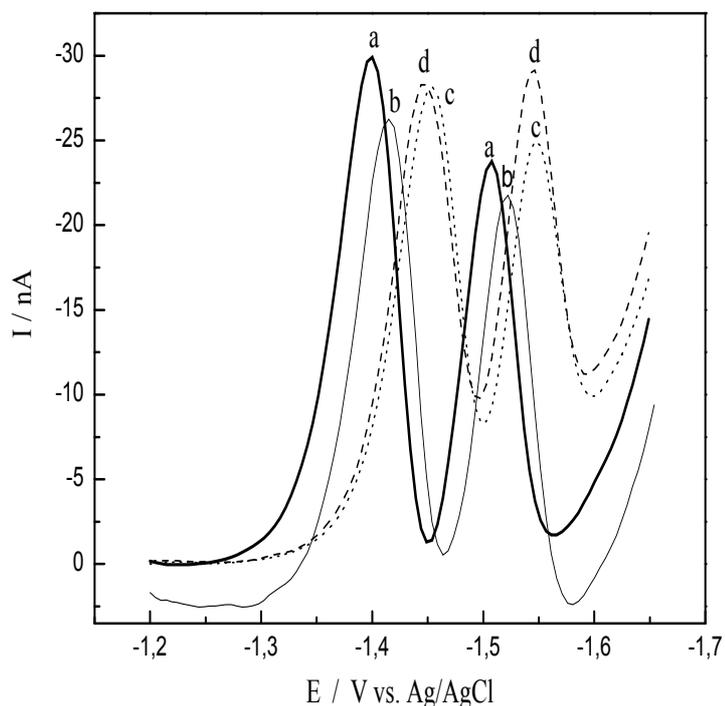


Figura 61: Polarogramas de Pulso Diferencial de $1,95 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACLO e $1,96 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ACAF em presença de $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de BrCTA em diferentes concentrações do eletrólitos suporte tampão fosfato: (a) 0,02 , (b) 0,04 (c) 0,08 e (d) 0,1 mol.L^{-1}

3.7.5. Otimização dos parâmetros instrumentais

Como já mencionado, a avaliação dos parâmetros instrumentais da Polarografia de Pulso Diferencial também é muito importante para a otimização da definição do sinal analítico.

A influência da amplitude na corrente de pico também foi estudada para redução simultânea do ACLO e ACAF (**Figura 62**), utilizando a velocidade de $8,25 \text{ mV.s}^{-1}$, com tempo de gotejamento (t_g) de 0,6 segundos.

Como é possível se observar para valores de amplitude menores que 40 mV, o aumento da intensidade da corrente foi linear, no entanto as amplitudes maiores pareceram não atuar de modo significativo na sensibilidade do pico para propósitos

analíticos. Além disso, o aumento da amplitude proporcionou a diminuição na separação dos picos de redução de ACLO e ACAF, em função disto a amplitude que foi utilizada nos estudos anteriores 25mV, foi também adotada para prosseguir com os demais estudos, considerando que proporcionou uma boa separação para os sinais analíticos.

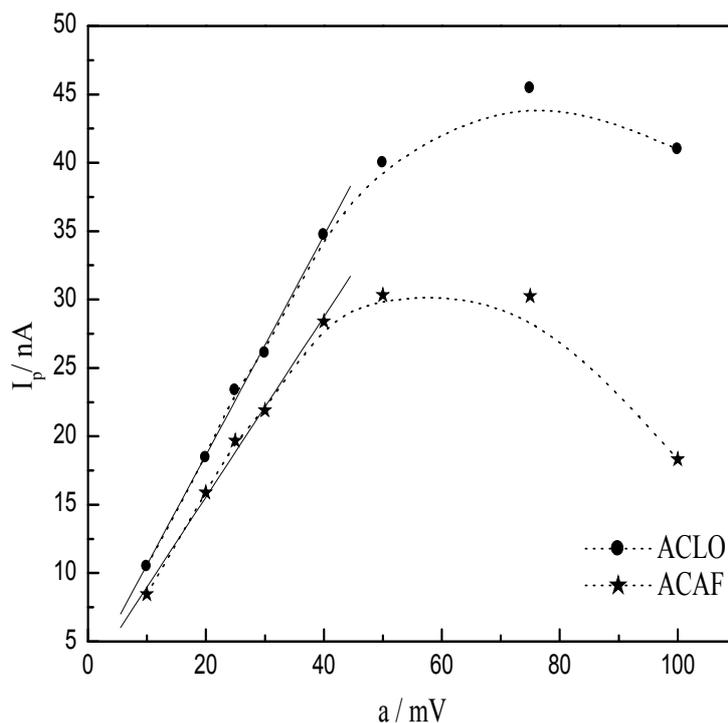


Figura 62: Dependência da I_p com a variação da amplitude de pulso para redução de ACLO $2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e ACAF $2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em presença de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02.

Definido o valor de 25 mV como amplitude do pulso, estudou-se a influência de outro parâmetro na corrente de pico de ACLO, a velocidade de varredura, a qual foi estudada na faixa de 1 a 10 mV.s^{-1} para ACLO $2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e ACAF $2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em presença de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02.

Como mostrado na **Figura 63**, a velocidade de varredura não influenciou significativamente na I_p de ACLO e ACAF, portanto $8,25 \text{ mV.s}^{-1}$, foi a velocidade mantida para os demais estudos com tempo de gotejamento de 0,6 segundos.

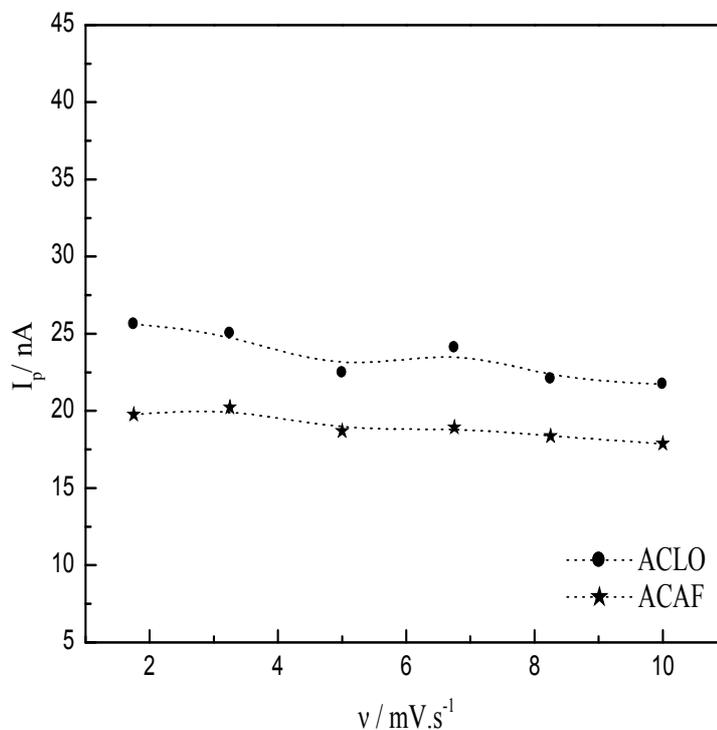


Figura 63: Dependência da I_p com a velocidade de varredura para ACLO $2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e ACAF $2,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em presença de BrCTA $2,02 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,02.

3.7.6. Parâmetros instrumentais selecionados

Os parâmetros até então selecionado, além de outros que também influenciam na redução polarográfica simultânea de ACLO e ACAF são apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26: Parâmetros instrumentais para redução polarográfica de ACLO e ACAF.

Parâmetros	Parâmetro selecionado
Tipo de Eletrólito	Tampão Fosfato
Concentração do Eletrólito	0,02 mol.L ⁻¹
pH	6,00
Concentração do surfactante BCTA	2,02. 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹
Amplitude do Pulso	25 mV
Velocidade de Varredura	8,25 mV.s ⁻¹
Tamanho da gota de Hg	0,52 mm ²
Tempo de Gotejamento	0,6s
Tempo de Equilíbrio	15s
Velocidade de Agitação	1500 rpm

3.7.7. Curva Analítica

Após estabelecidas as melhores condições de trabalho para determinação dos ácidos ACLO e ACAF, simultaneamente, foram construídas curvas analíticas para adição destes na presença de BrCTA, as curvas foram construídas em triplicata.

Os polarogramas obtidos pela variação da concentração de ambos os ácidos estão apresentados na **Figura 64**. Como pode ser observado, a curva analítica para ACLO mostrou linearidade no intervalo de $1,14 \cdot 10^{-6}$ - $8,99 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ com um coeficiente de correlação de 0,999 (**Figura 65 a**). Para ACAF o intervalo foi de $1,50 \cdot 10^{-6}$ - $1,18 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, com coeficiente de correlação de 0,999 (**Figura 65b**).

Além disso, através da metodologia de PPD foi possível construir curvas analíticas de ACLO no intervalo de concentração de $5,71 \cdot 10^{-6}$ - $8,28 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, e para ACAF entre $7,48 \cdot 10^{-6}$ - $1,08 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹, como é mostrado na **Figura 67 a e b**, respectivamente. Em cada respectivo intervalo de concentração de ACLO e ACAF, também foi possível obter excelentes linearidades, com um coeficiente de correlação

médio de 0,999 para ambos os ácidos. Os polarogramas obtidos para construção destas curvas são apresentados na **Figura 66**.

Através da metodologia baseada na técnica de PPD, para análise ACLO e ACAF, foi possível obter um amplo intervalo de linearidade, e os parâmetros obtidos para as curvas analíticas construídas estão resumidos na **Tabela 27 e 28**.

Os dados contidos na **Tabela 27 e 28** são resultado da média de cada parâmetro obtido para a triplicata das curvas de calibração de ACLO e ACAF, para cada intervalo de concentração estudada. De acordo com estes dados foi possível obter os valores de LOD e LOQ (**Equações 5 e 6**) para ambos os ácidos.

Para ACLO o intervalo de concentração de $1,14 \cdot 10^{-6}$ - $8,99 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹ os valores de LOD e LOQ, foram $1,42 \cdot 10^{-7}$ e $4,73 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹, respectivamente, e para o intervalo concentração de $5,71 \cdot 10^{-6}$ - $8,28 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ foram $7,26 \cdot 10^{-7}$ e $2,42 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

Para ACAF no intervalo de concentração estudado $1,50 \cdot 10^{-6}$ - $1,18 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, os valores de LOD e LOQ foram, $1,16 \cdot 10^{-7}$ e $3,84 \cdot 10^{-7}$, respectivamente, e para o intervalo de concentração de $7,48 \cdot 10^{-6}$ - $1,08 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ foram $1,19 \cdot 10^{-6}$ e $3,95 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

Portanto, é possível constatar que a metodologia proposta para análise de ACLO e ACAF através de PPD exibiu limites de detecção e quantificação um pouco mais altos do que para a metodologia proposta para análise de ACLO individual.

Até o presente momento esta metodologia não obteve sucesso para análise simultânea destes ácidos em amostras de café e chá, em virtude dos seus limites de detecção e quantificação altos e da proximidade do pico de ACAF com a descarga, o que complica as análises na presença de amostra reais em virtude do efeito matriz.

Entretanto, o desenvolvimento desta metodologia ainda significa um avanço no que diz respeito à aplicabilidade das técnicas voltamétricas no desenvolvimento de metodologias para análise destes polifenólicos, já que até o momento nenhuma metodologia proposta através dessas técnicas conseguiu separar o sinal analítico destes ácidos.

É óbvio que o desenvolvimento desta metodologia só ganhará maior importância a partir do momento em que for aplicada em amostras reais e de forma satisfatória.

Para que se possa efetuar a aplicação desta metodologia em amostras como café e chá, serão necessários estudos para o tratamento prévio destas amostras.

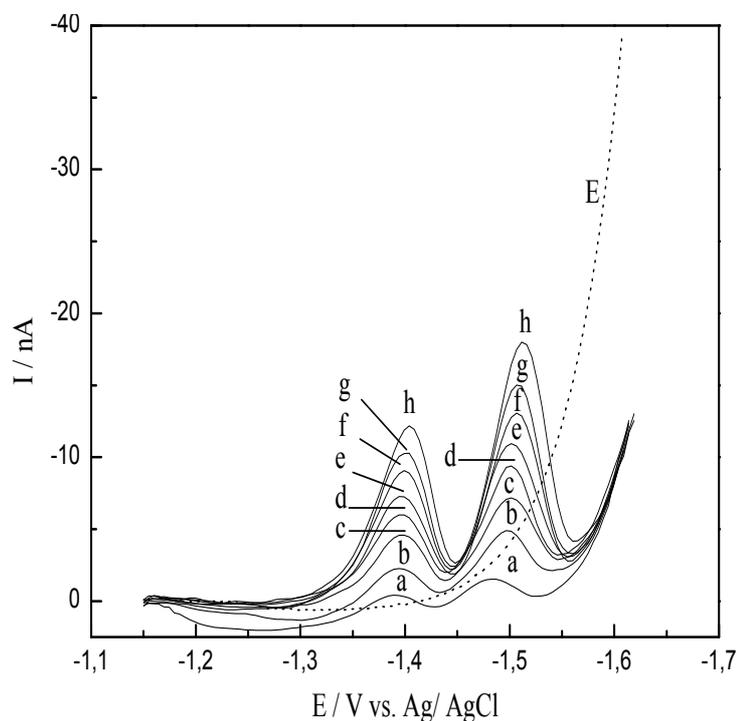


Figura 64: Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações dos padrões de ACLO e ACAF, respectivamente: (a) $1,14 \cdot 10^{-6}$ e $1,50 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹; (b) $2,28 \cdot 10^{-6}$ e $2,99 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹; (c) $3,41 \cdot 10^{-6}$ e $4,47 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹; (d) $4,54 \cdot 10^{-6}$ e $5,94 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹; (e) $5,66 \cdot 10^{-6}$ e $7,41 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹; (f) $6,77 \cdot 10^{-6}$ e $8,87 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹; (g) $7,88 \cdot 10^{-6}$ e $1,03 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹; (h) $8,99 \cdot 10^{-6}$ e $1,18 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, na presença de tampão fosfato pH 6,02 (E), $0,02$ mol.L⁻¹ com $2,02 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de BrCTA. Parâmetros $a = 25$ mV, $t_g = 0,6$ s, $v = 8,25$ mV.s⁻¹.

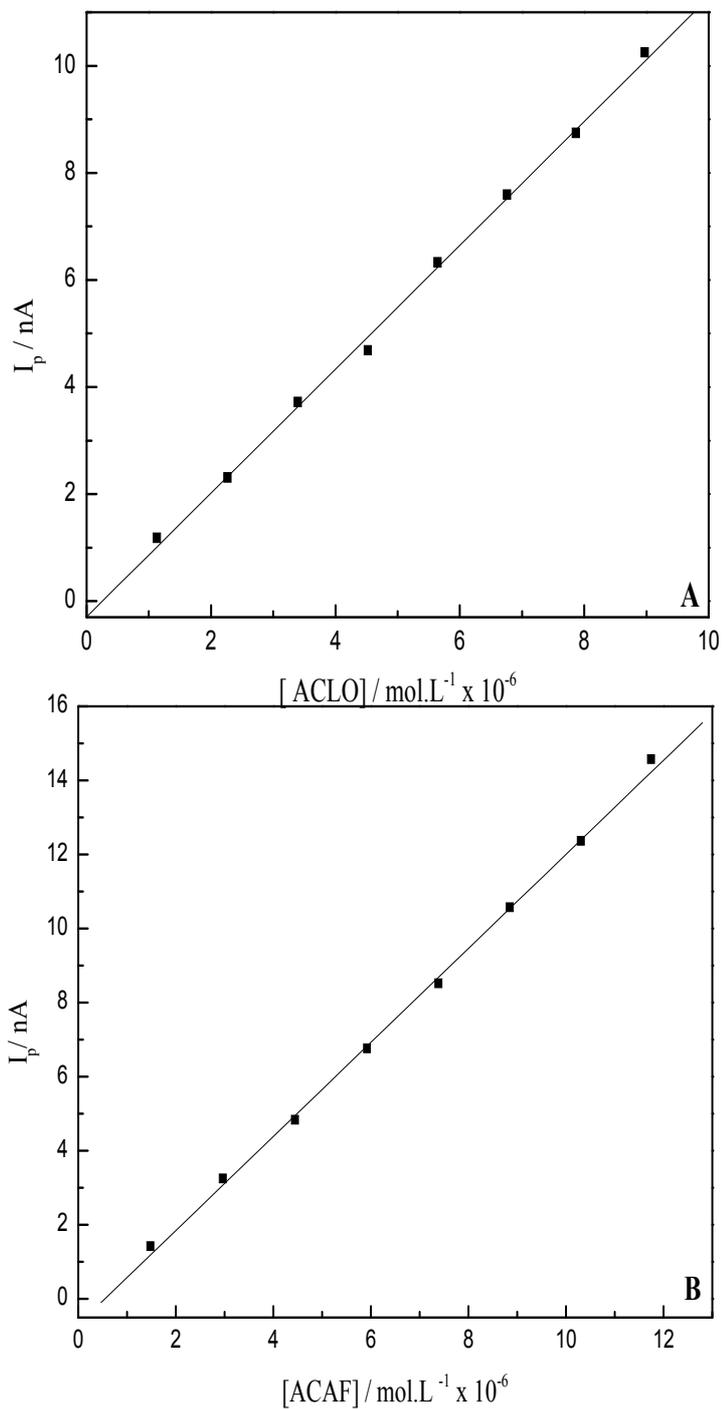


Figura 65: Dependência da I_p em função da concentração de: **(A)** ACLO ($1,14 \cdot 10^{-6}$ a $8,99 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e **(B)** ACAF ($1,50 \cdot 10^{-6}$ a $1,18 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

Tabela 27: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de PPD para determinação de ACLO e ACAF.

Parâmetros	Curva 1(ACLO)	Curva 1 (ACAF)
Intervalo de concentração (mol.L ⁻¹)	1,14 - 8,99 x 10 ⁻⁶	0,12 - 1,18 x 10 ⁻⁵
Intercepto (nA) ^a	0,35	0,64
D.P. do intercepto	5,44.10 ⁻²	4,88.10 ⁻²
Inclinação ^a (nA.L.mol ⁻¹)	1,15.10 ⁶	1,27.10 ⁶
D.P. da inclinação	1,15.10 ⁴	1,53.10 ⁴
Coefficiente de correlação (r) ^a	0,999	0,999
LOD (mol.L ⁻¹)	1,42.10 ⁻⁷	1,15.10 ⁻⁷
LOQ (mol.L ⁻¹)	4,73.10 ⁻⁷	3,84.10 ⁻⁷

^a média de três curvas de calibração.

D.P. = desvio padrão.

LOD = limite de detecção.

LOQ = limite de quantificação.

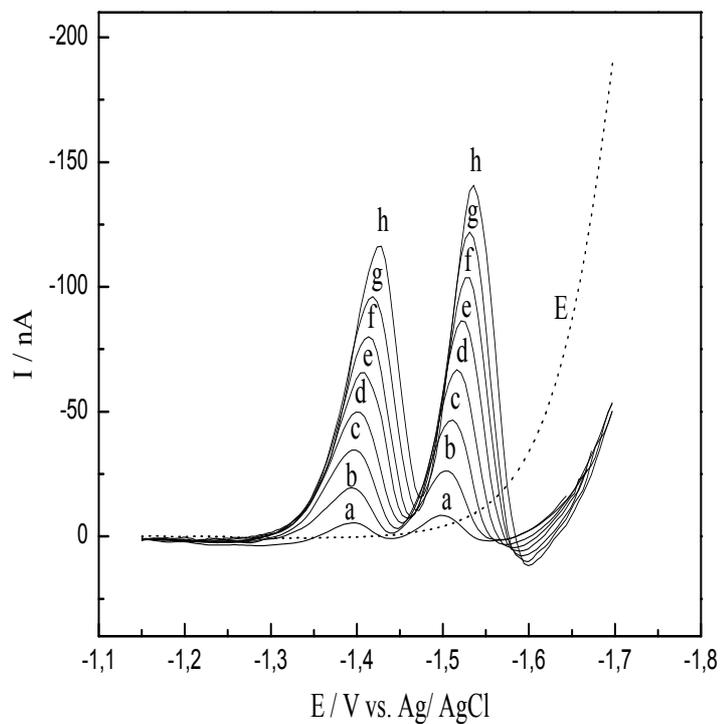


Figura 66: Polarogramas de Pulso Diferencial para diferentes concentrações dos padrões de ACLO e ACAF, respectivamente: (a) $5,71 \cdot 10^{-6}$ e $7,48 \cdot 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$; (b) $1,71 \cdot 10^{-5}$ e $2,23 \cdot 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$; (c) $2,83 \cdot 10^{-5}$ e $3,71 \cdot 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$; (d) $3,95 \cdot 10^{-5}$ e $5,16 \cdot 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$; (e) $5,04 \cdot 10^{-5}$ e $6,61 \cdot 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$; (f) $6,13 \cdot 10^{-5}$ e $8,07 \cdot 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$; (g) $7,21 \cdot 10^{-5}$ e $9,45 \cdot 10^{-5}$ mol.L $^{-1}$; (h) $8,28 \cdot 10^{-5}$ e $1,08 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$, na presença de tampão fosfato pH 6,02, $0,02$ mol.L $^{-1}$ (E) e $2,02 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$ de BrCTA. Parâmetros $a = 25$ mV, $t_g = 0,6$ s, $v = 8,25$ mV.s $^{-1}$.

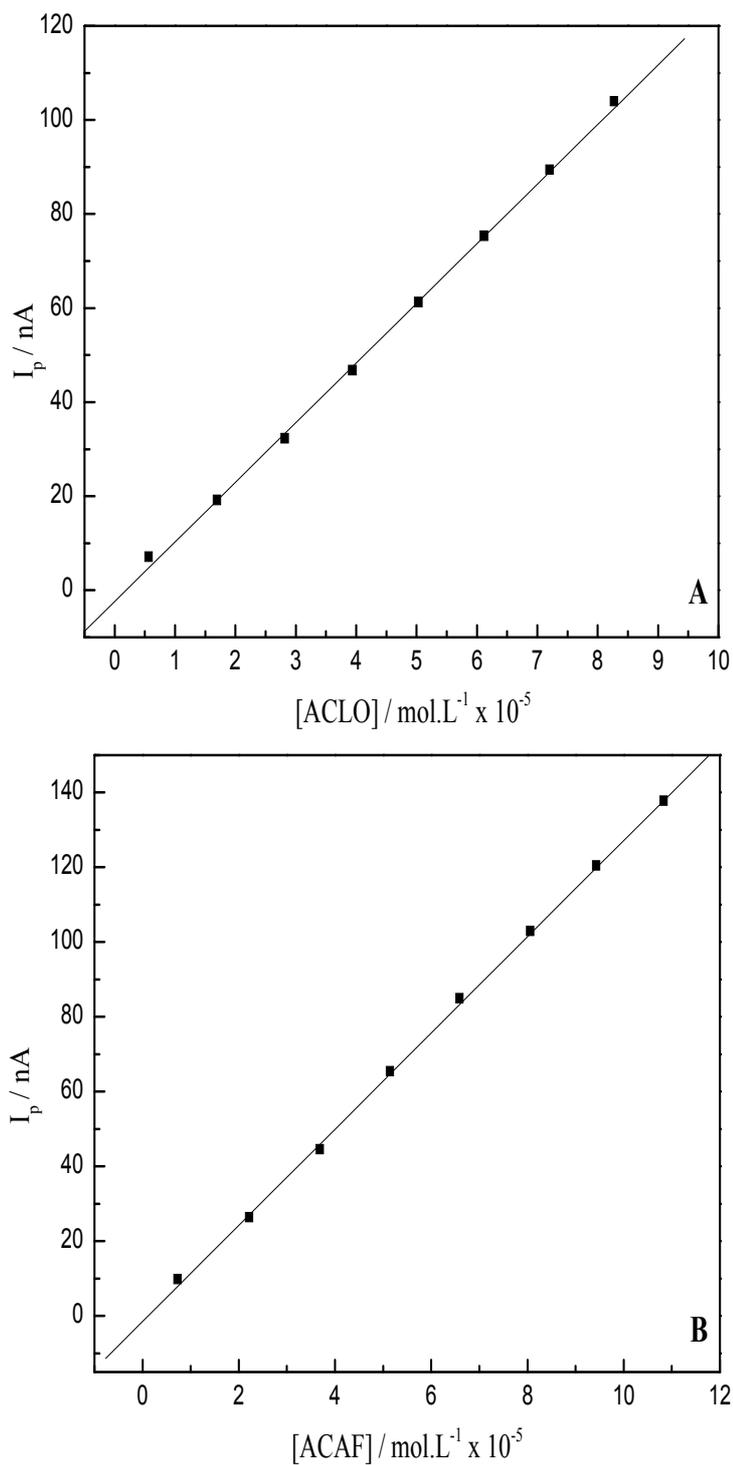


Figura 67: Dependência da I_p em função da concentração de: **(A)** ACLO ($5,71 \cdot 10^{-6}$ a $8,28 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e **(B)** ACAF ($7,48 \cdot 10^{-6}$ a $1,08 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

Tabela 28: Parâmetros quantitativos do método eletroanalítico através da técnica de PPD para determinação de ACLO e ACAF.

Parâmetros	Curva 2(ACLO)	Curva 2 (ACAF)
Faixa de concentração (mol.L ⁻¹)	0,57 - 8,28 x 10 ⁻⁵	0,07 - 1,08 x 10 ⁻⁴
Intercepto (ηA) ^a	2,72	1,72
D.P. do intercepto	0,31	0,51
Inclinação ^a (ηA.L.mol ⁻¹)	1,28.10 ⁶	1,29.10 ⁶
D.P. da inclinação	5,77.10 ³	1,00.10 ⁴
Coefficiente de correlação (r) ^a	0,999	0,999
LOD (mol.L ⁻¹)	7,26.10 ⁻⁷	1,19.10 ⁻⁶
LOQ (mol.L ⁻¹)	2,42.10 ⁻⁶	3,95.10 ⁻⁶

^a média de três curvas de calibração.

D.P. = desvio padrão.

LOD = limite de detecção.

LOQ = limite de quantificação.

4. CONCLUSÕES

A redução do ACLO em tampão fosfato pH 6,02, 0,04mol.L⁻¹ mostrou-se bem pouco favorável sob as condições estudadas, pois apresentou um único pico, pouco definido, em um potencial altamente negativo e muito próximo a descarga do eletrólito suporte.

Buscando condições que proporcionassem o favorecimento dessa redução, estudou-se a influência de diferentes surfactantes neste processo. Mas somente o surfactante catiônico brometo de cetiltrimetil amônio (BrCTA) contribuiu para redução do ACLO, proporcionando o deslocamento dos potenciais de pico para valores menos negativos, afastando da descarga do eletrólito e aumentando a definição e corrente de pico.

Adicionalmente a influência do tamanho das cadeias de sais de amônio também foi avaliada, sendo que os sais de amônio de cadeias carbônicas maiores, favoreceram com mais sucesso a redução do ACLO, dentre eles, principalmente o BrCTA. Desta forma, adotou-se este surfactante para prosseguir com os demais estudos eletroanalíticos e eletroquímicos.

A análise dos critérios de diagnóstico aplicados na caracterização do processo de redução de ACLO nos pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 indicaram que este ácido apresenta um transporte de massa misto, provavelmente influenciado pela presença do surfactante BrCTA no meio.

De acordo com os resultados obtidos para as análises dos critérios que caracterizam o tipo de mecanismo eletródico através da técnica de VC, também foi possível concluir que o processo de redução de ACLO na presença do surfactante BrCTA é aparentemente irreversível com envolvimento de dois elétrons, e uma reação de pré -protonação, envolvendo um próton. Além disso, estes resultados indicaram uma forte evidência de uma etapa química acoplada ao processo de transferência eletrônica. A correlação dos resultados diagnosticados no processo eletródico com aqueles encontrados na literatura para o estudo do comportamento eletroquímico de compostos similares, na presença de surfactantes, confirma essas evidências.

Neste trabalho também se desenvolveu de uma metodologia eletroanalítica para determinação de ACLO em amostras de café e chá mate, a partir da redução deste composto sobre a superfície de mercúrio.

Duas metodologias eletroanalíticas foram desenvolvidas para determinação de ACLO, uma utilizando a técnica de PPD e outra utilizando a VOQ. O surfactante BrCTA foi efetivamente utilizado para aumentar a sensibilidade dos métodos propostos. Além disso, vários parâmetros foram otimizados tais como pH, tipo e concentração do eletrólito suporte, concentração de BrCTA, dentre outros.

Sob as condições otimizadas as metodologias eletroanalíticas puderam ser aplicadas com sensibilidade adequada aos níveis de concentração do analito encontrados nas amostras estudadas. As metodologias desenvolvidas também apresentaram bons níveis de recuperação, valores de precisão e exatidão para as determinações do ACLO nas amostras de café e chá. Portanto, esses resultados aliados a rapidez e custo das análises, confirmam a viabilidade dos métodos analíticos propostos.

O uso do surfactante BrCTA também proporcionou a redução simultânea do ACLO e do ácido cafêico (ACAF) em potenciais de pico distintos, o que representou um avanço das técnicas voltamétricas no desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação destes ácidos. Já que, as metodologias propostas na literatura para este fim não têm obtido sucesso na determinação do conteúdo de diferenciado de cada ácido.

Assim, uma metodologia eletroanalítica para análise desses ácidos, a partir da redução na presença do surfactante BrCTA foi desenvolvida. No entanto, a aplicação desta metodologia ainda está sendo estudada.

5. ATIVIDADES FUTURAS

Os métodos eletroanalíticos propostos para determinação individual do ACLO podem ter seus estudos complementados com experimentos para validação das metodologias, através de todos os parâmetros especificados na literatura, como por exemplo, a comparação com outras metodologias existentes.

Para complementar os estudos de diagnóstico do processo eletródico sobre a superfície do eletrodo de Hg em meio aquoso, podem ser realizados os seguintes experimentos:

- Coulometria a potencial controlado para confirmar o número de elétrons envolvidos no processo de redução de ACLO;
- Eletrólise preparativa que propiciem a geração de produtos e intermediários em quantidade suficiente para serem separados, analisados e identificados através de técnicas espectroscópicas convencionais, tais como: RMN, IV e massas.

Estudos de *clean-up* das amostras podem ser realizados na tentativa de se estabelecer condições favoráveis para aplicação do método de análise simultânea de ACLO e ACAF.

6. REFERÊNCIAS

1. ESCARPA, A. & GONZALES, M. C. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 31(2), 57 - 139, 2001.
 2. KING, A. & YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, 99 (2), 212-217, 1999.
 3. LARANJINHA, J. A. N.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, 48 (3), 487-494, 1994.
 4. De MARIA, C. A. B. & MOREIRA, R. F. A. Métodos para Análise de Ácido Clorogênico. **Química Nova**, 27 (4), 586-592, 2004.
 5. ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, 1000, 657-691, 2003.
 6. NACZK, M. & SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatography A**, 1054, 95-111, 2004.
 7. O'CONNELL, J. E. & FOX, P. F. Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. **International Dairy Journal**, 9, 523-536, 1999.
 8. RAWEL, H. M.; CZAJKA, D.; ROHN, S.; KROLL, J. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 30, 137-150, 2002.
 9. RECHNER, A. R.; SPENCER, J. P. E.; KUHNLE, G.; HAHN, U.; RICE-EVANS C. A. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, 30 (11), 1213-1222, 2001.
-

-
10. SHAHRZAD, S. & BITSCH, I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 741, 223-231, 1996.
11. MONTEIRO, M. C. & TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, 28 (4), 637-641, 2005.
12. De MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C. L.; MIRANDA, L. S. De M. The content of individual caffeoylquinic acids in edible vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, 12, 289-292, 1999.
13. RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; GARCÍA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, 160, 315-321, 2001.
14. MELLO, L. D.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. **Sensors and Actuators B**, 96, 636-645, 2003.
15. HAPIOT, P.; NEUDECK, A.; PINSON, J.; FULCRAND, H.; NETA, P.; ROLANDO, C. Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 405, 169-176, 1996.
16. LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N. J.; GRIMMER, H. R.; WARMINSKI, E. E.; WILLIAMSON, M. P.; LILLEY, T. H.; HASLAN E. Polyphenols, Astringency and Proline-rich proteins. **Phytochemistry**, 37 (2): 357-371, 1994.
17. YOSHINO, M. & MURAKAMI, K. Interaction of Iron with Polyphenolic Compounds Application to Antioxidant Characterization. **Analytical Biochemistry**, 2 5 7 , 4 0 -4 4 , 1 9 9 8 .
-

-
18. HOTTA, H.; UEDA, M.; NAGANO, S.; TSUJINO Y.; KOYAMA, J.; OSAKAI, T.; Mechanistic Study of the Oxidation of Caffeic Acid by Digital Simulation of Cyclic Voltammograms. **Analytical Biochemistry**, 303, 66-72, 2002.
19. KAWABATA, T.; SCHEPKIN, V.; HARAMAMI, N.; PHADKE, R. S.; PACKER, L. Iron Coordination by Catechol Derivative Antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, 51, 1569-1577, 1996.
20. HALLIWELL, B. Antioxidant Characterization. **Biochemical Pharmacology**, 49 (10), 1341-1348, 1995.
21. MOREL, I.; LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; BRISSOT, P.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron loaded rat hepatocyte cultures. **Biochemical Pharmacology**, 45 (1), 13-19, 1993.
22. HOTTA, H.; SAKAMOTO, H.; NAGANO, S.; OSAKAI, T.; TSUJINO Y. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1526, 159-167, 2001.
23. NEST, G. L.; CAILLE, O.; WOULDSTRA, M.; ROCHE, S.; BURLAT, B.; GUIGLIARELLI, B.; LEXA, D. Zn- polyphenol chelation: complexes with quercetin (+)-catechin, and derivatives: II Electrochemical and EPR studies. **Inorgânica Chimica Acta**, 357, 2027-2037, 2004.
24. MAILLARD, M. N. P.; BONNELLY, S.; BERSSET, C. Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. **Talanta**, 51, 709-716, 2000.
-

-
25. ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; WILMS, L. C.; BEETSTRA, S. A. J. N.; HEIJNEN, C. G. M.; VOSS, H. P.; BAST, A. Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 50 (5), 1184-1187, 2002.
26. AFANAS'EV, I. B.; OSTRACHOVITCH, E. A.; ABRAMOVA, N. E.; KORKINA, L. G. Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats. **Biochemical Pharmacology**, 50 (5), 627-635, 1995.
27. HOTTA, H.; NAGANO, S.; UEDA, M.; TSUJINO Y.; KOYAMA, J.; OSAKAI, T.; Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1572, 123-132, 2002.
28. GAO, T.; CI, Y.; JIAN, H.; AN, C. FTIR investigation of the interaction of tumor cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid. **Vibrational Spectroscopy**, 24, 225-231, 2000.
29. OSMAN, H. & LEE, R. N. S. L. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao L.*) leaves and their antioxidation potential. **Food Chemistry**, 86, 41-46, 2004.
30. COTELLE, P. & VEZIN, H. Reaction of caffeic acid derivatives with acidic nitrite. **Tetrahedron Letters**, 42, 3303-3305, 2001.
31. KHOKHAR, S. & MAGNUSDOTTIR, S. G. M. Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 565-570, 2002.
-

-
32. MIN, J.; XIA, X. M.; DONG, Z.; YUAN, L.; YU, L. X.; XING, C. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, 692, 71-80, 2004.
33. KIKUGAWA, K.; HAKAMADA, T.; HASUNUMA, M.; KURECHI, T. Reaction of *p*- Hydroxycinnamic Acid Derivates with Nitrite and Its Relevance to Nitrosamine Formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 31, 780-785, 1983.
34. YUKAWA, G. S.; MUNE, M.; OTANI, H.; TONE, Y.; LIANG, X. M.; IWAHASHI, H.; SAKAMOTO, W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biochemistry**, 69(1), 70-74, 2004.
35. WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic in aromatic herbs by HPLC. **Food Chemistry**, 87, 307-311, 2004.
36. SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 571-581, 2003.
37. AMAKURA, Y.; OKADA, M.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 891, 183-188, 2000.
38. ZHOU, Z.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S.; BLANCHARD, C. The distribution of phenolic acids in rice. **Food Chemistry**, 87, 401-406, 2004.
-

-
39. TIAN, S.; NAKAMURA, K.; CUI, T.; KAYAHARA, H. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. **Journal of Chromatography A**, 1063, 121-128, 2005.
40. MARTÍN, J. D.; GONZALEZ, D. D.; ROMERO, C. D. Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. **Journal of Food Engineering**, 63, 335-340, 2004.
41. FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GILBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, 72, 774-778, 2001.
42. ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food chemistry**, 89, 27-36, 2005.
43. De MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes Voláteis do Café Torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, 22 (2), 209-217, 1999.
44. MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; De MARIA, C. A. B. Componentes Voláteis do Café Torrado. Parte II. Compostos Alifáticos, Alicíclicos e Aromáticos. **Química Nova**, 23 (2), 195-203, 2000.
45. CLIFFORD, M. N. The influence of coffee bean maturity on the content of Chlorogenics Acids, Caffeine and Trigonelline. **Food Chemistry**, 26, 59-69, 1987
46. CLIFFORD, M. N. & KNIGHT, S. The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans. **Food Chemistry**, 87, 457-463, 2004.
-

-
47. http://www.abic.com.br/café_composicao.html, acessado em 10 de agosto de 2004, 14:35h.
48. FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; MENDONÇA, J. C. F.; SILVA, X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, 2004.
49. MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. **Food chemistry**, 64: 547-554, 1999.
50. FERNANDES, S. M.; PINTO, N. A. V. D.; PEREIRA, R. G. F. A.; CARVALHO, V. D. Comparação entre duas cooperativas do sul de Minas Gerais quanto à composição química de cafés com torração comercial. **Ciências Agrotécnicas**, 26 (4), 830-835, 2002.
51. FERNANDES, S. M.; PINTO, N. A. V. D.; THÉ, P. M. P.; PEREIRA, R. G. F. A.; CARVALHO, V. D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, 7(3), 197-199, 2001.
52. ANDRADE, P. B.; LEITÃO, R. ; SEABRA, R. M.; OLIVEIRA, M. B; FERREIRA, M. A. 3,4-Dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. robusta and *Coffea arabica*. **Food Chemistry**, 61(4), 511-514, 1998.
53. ANDUEZA, S.; CID, C.; NICOLI, M. C. Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and “Torrefacto” coffee. **Lebensm. -Wiss. u.-Technol.**, 551(2), 153-166, 2004.
54. De MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. F. A. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples
-

by high performance gel filtration chromatography. **Food Chemistry**, 52, 447-449, 2004.

55. NOGUEIRA, M. & TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23(2), 296-299, 2003.

56. JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Society for Clinical Nutrition**, 78, 728-733, 2003.

57. OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The American Society for Nutritional Sciences**, 131, 66-71, 2001.

58. http://www.ico.org/event_pdfs/scaccini.pdf, acessado em 22 de fevereiro de 2006, 19:55h.

59. VENDRAMINI, A. L. A. & TRUGO, L. C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal Brazilian Chemistry Society**, 15 (5), 664-668, 2004.

60. GORSEL, H. V.; LI, C.; KERBEL, E. L.; SMITS, M.; KADER, A. A. Compositional characterization of prune juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 784-789, 1992.

-
61. MOORES, R. G.; McDERMOTT, D. L.; WOOD T. R. Determination of Chlorogenic Acid in Coffee. **Analytical Chemistry**, 20(7), 620-624, 1948.
62. WALTER, W. M.; J.; PURCELL, A. E.; McCOLLUM G. K. Use of High-Pressure Liquid Chromatography for Analysis of Sweet Potato Phenolics. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 27(5), 938-941, 1979.
63. TRUGO, L. C. & MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, 109, 263-266, 1984.
64. KY, C. L.; NOIROT, M.; HAMON, S. Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in green Coffee Beans (*Coffea sp.*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, 45, 786-790, 1997.
65. DAWES, H. M. & KEENE, J. B. Phenolic composition of kiwifruit juice. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 47, 2398-2403, 1999.
66. MATTILA, P. & KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 50, 3660-3667, 2002.
67. CHANG, Qi, ZHU, M.; ZUO, Z.; CHOW, M.; HO W. K. K. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of hawthorn active components in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, 760, 227-235, 2001.
68. NIELSEN, S. E. & SANDSTRÖM, B. Simultaneous determination of hydroxycinnamates and catechins in human urine samples by column switching liquid
-

chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 787, 369-379, 2003.

69. CARINI, M.; ALDINI, G.; FURLANETTO, S.; STEFANI, R.; FACINO, R. M. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 24, 517-526, 2001.

70. CREMIN, P.; KARAKAS, S. K.; WATERHOUSE, A. L. LC/ES-MS Detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 49, 1747-1750, 2001.

71. HE, C.; CUI, H.; ZHAO, G. The determination of chlorogenic acid in cigarettes by inhibited chemiluminescence analysis. **Analytica Chimica Acta**, 351, 241-246, 1997.

72. SHEU, S. J.; CHIEH, C. L.; WENG, W. C. Capillary electrophoretic determination of the constituents of *Artemisiae Capillaris Herba*. **Journal of Chromatography A**, 911, 285-293, 2001.

73. POLIMIO, A. B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A. A. High-Performance capillary electrophoresis analysis of *mate* infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochemical Analysis**, 13, 235-241, 2002.

74. VAHER, M. & KOEL, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 990, 225-230, 2003.

-
75. BLASCO, A. J.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, 511 (1), 71 - 81, 2004.
76. KILMARTIN, P. A. & HSU, C. F. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, 82, 501-512, 2003.
77. SOUSA, R. W.; ROCHA, C.; CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; ZANONI, M. V. B. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. **Journal Food Composition and Analysis**, 17 (5), 619-633, 2004.
78. NAMAZIAN, M. & ZARE, H. R. Electrochemistry of chlorogenic acid: experimental and theoretical studies. **Electrochimica Acta**, 50, 4350-4355, 2005.
79. TRABELSI, S. K.; TAHAR, N. B.; ABDELHEDI, R.; Electrochemical behavior of caffeic acid. **Electrochimica Acta**, 49,1647-1654, 2004.
80. ZARE, H. R. & GOLABI, S. M. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 464, 14-23, 1999.
81. GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F. S.; SPINELLI A. Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5. **Journal Brazilian Chemistry Society**, 13 (3), 332-338, 2002.
-

-
82. FERREIRA, V. S.; MELIOS, C. B. ; ZANONI, M. V. B.; STRADIOTTO, N. R. Determination of cinnamic acid in human urine by differential-pulse polarography. **Analyst**, 121 (2), 263-267, 1996.
83. NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25 (5), 772-776, 2002.
84. RUSLING, J. F. **Electroanalytical Chemistry**. Vol 18. New York: Marcel Dekker, 1994. 1 - 88p.
85. SALAGER, J. L. **Surfactants Types and Uses**. 2002. 50 f. FIRP BOOKLET # E 300-A. Teaching aid in surfactant science & engineering – Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
86. RUSLING, J. F. Molecular aspects of electron transfer at electrodes in micellar solutions. **Colloids and Surfaces**, 123-124, 81-88, 1997.
87. MEYER, G.; NADJO, L.; SAVEANT, J. M. Electrochemistry in micellar media. Effect of cationic surfactants on the stability of eletrogenerated anion radicals in water. **Journal of Eletroanalytical Chemistry**, 119, 417-419, 1981.
88. PARIA, S. & KHILAR, K. C. A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid-water interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, 110, 75-95, 2004.
89. <http://www.panreac.es/new/ing/catalogo/fichastec/173355IN.HTM>, acessado em 04 de abril de 2005, 12:35h.
-

-
90. <http://www.panreac.es/new/ing/catalogo/fichastec/173356IN.HTM>, acessado em 04 de abril de 2005, 12:40h.
91. AVRANAS, A. & PATSIKATHEODOROU, E. On the adsorption and condensed film formation of binary mixtures of dodecyl-, tetradecyl-, hexadecyl-, and octadecyl-trimethylammonium bromides at the mercury- electrolyte interface. **Colloids and Surfaces A**, 250, 509-518, 2004.
92. SAWAMOTO, H. Reversible and irreversible adsorption of surfactants at a hanging mercury drop electrode. **Analytical Sciences**, 19, 1381-1386, 2003.
93. ZUMAN, P. **Progress in Polarography**. Vol 3. New York: Wiley, 1972. 73p.
94. HEYROVSKÝ, M & VAVRICKA, S.. On the pH-dependence of polarographic half-wave potentials. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 36, 203-221, 1972.
95. LAMY, I.; SEYWERT, M.; CROMER, M.; SCHARFF, J. P. Simple and mixed ligand complexes of copper (II) with polyfunctional phenolic compounds as models of natural substances. **Analytica Chimica Acta**, 176, 201-212, 1985.
96. KISS, T.; NAGY, G.; PÉCSI, M.; KOZLOWSKI, H.; MICERA, G.; ERRE, S. Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives – X. Copper (II) complexes of chlorogenic acid and related compounds. **Polyhedron**, 8 (19), 2345-2349, 1989.
97. AMÉZIANE, J.; APLINCOURT, M.; DUPONT, L.; HEIRMAN, F.; PIERRARD, J. C. Thermodynamic stability of copper (II), manganese (II), zinc (II) and iron (III) complexes with chlorogenic acid. **Bull. Society Chimica Fr.** 133, 243-249, 1996.
-

-
98. BARD, A. J.; & FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods fundamentals and applications**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
99. SILVA, G. M. **Estudo do comportamento eletroquímico de ácidos liquênicos**. 1998. 140f. Tese (Doutorado em ciências, área Físico-Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP.
100. TRINDADE, M. A. G. **Estudo do comportamento eletroquímico e determinação da moxifloxacina através de técnicas voltamétricas**. 2004. 108f. Dissertação (Mestrado em Química, área Físico-Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS.
101. SOLALIENDRES, M. O. **Estudo da redução eletroquímica dos derivados do ácido protocetrárico em meio aprótico**. 2001. 94f. Dissertação (Mestrado em Química, área Físico-Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS.
102. BELTAGI, A. M. Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 31, 1079-1088, 2003.
103. BRAND, M. J. D. & FLEET, B. Polarography in the study of classical organic functional group reactions. I. Polarographic behaviour of *cis*- and *trans*- cinnamic acid and substituted cinnamic acids. **Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 16, 341-650, 1968.
-

-
104. SILVA, A. P.; TRINDADE, M. A. G.; FERREIRA, V. S. Polarographic determination of sunscreen agents in cosmetic products in micellar media. **Talanta**, 68, 679-685, 2006.
105. TIDWELL, T. T. **Advances in Physical Organic Chemistry**. Volume 35. Ontario: Academic Press, 2000. 130p.
106. KANG, X.; GUO, W.; ZHAO, C.; SONG, J. Adsorption-parallel catalytic waves of cinnamic acid in hydrogen peroxide-tetra-n-butylammonium bromide-acetate system. *Science in China*, 43 (3), 275-282, 2000.
107. STADLOBER, M.; KALCHER, K.; RABER, G.; NEUHOLD, C. Anodic stripping voltammetric determination of titanium (IV) using a carbon paste electrode modified with cetyltrimethylammonium bromide. **Talanta**, 43, 1915-1924, 1996.
108. ALEIXO, L. M. **Voltametria: Conceitos e Técnicas**. 2003. 40 f. www.chemkeys.com - Universidade Estadual de Campinas (Instituto de Química), Campinas-SP, Brasil.
109. SOUZA, D. & MACHADO, S. A. S. Estudo eletroanalítico do herbicida Paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, 26 (5), 644-647, 2003.
110. PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. **Química Nova**, 26 (6), 844-849, 2003.
111. SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira parte: Aspectos Teóricos. **Química Nova**, 26 (1), 81-89, 2003.
-

-
112. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27 (5), 771-780, 2004.
-