

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA ANÁLISE DE CARBAMATO DE
ETILA EM CACHAÇAS COMERCIAIS**

SARA DOS SANTOS NASCIMENTO

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

SARA DOS SANTOS NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA ANÁLISE DE
CARBAMATO DE ETILA EM CACHAÇAS COMERCIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino

MACEIÓ – AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

N244d Nascimento, Sara dos Santos.

Desenvolvimento de método eletroquímico para análise de carbamato de etila em cachaças comerciais / Sara dos Santos Nascimento. – 2019.
92 f. : il.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 84-92.

1. Uretana. 2. Hidroquinona. 3. Eletroquímica. 4. Cachaça. 5. Destilação. I. Título.

CDU: 543.552:663.52



PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia

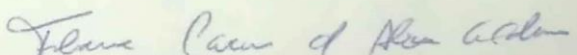


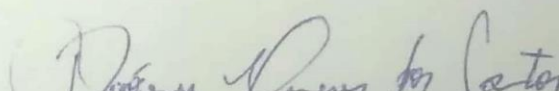
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

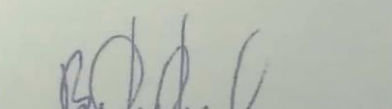
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **SARA DOS SANTOS NASCIMENTO**, intitulada: **“Desenvolvimento de método eletroquímico para análise de carbamato de etila em cachaças comerciais”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 16 de fevereiro de 2019, às 11h, no auditório do severinão do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(PPGQB/IQB/UFAL) – Orientadora


Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos
(PPGQB/UFAL)


Prof. Dr. Bruno Gabriel Lucca
(IQ/UFMS).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por me conceder a graça de chegar até aqui.

Aos meus amados pais Anunciada e Everaldo pelo exemplo de vida, amor, dedicação e alegria com a qual sempre me incentivaram.

À minha orientadora Fabiane Caxico pela persistência neste trabalho, paciência, ensinamentos e compreensão. Mostrou-me que com a resiliência na pesquisa conseguimos resultados inéditos dada as dificuldades envolvidas.

Aos meus tios Aladel e Ceixa pela acolhida, carinho, incentivo e cuidados, conquistei um novo lar aqui em Maceió.

Aos meus irmãos Hélder, Gláucia, Bento e a minha prima Natalha pelo carinho e companheirismo de sempre.

Ao meu primo Rafael por ser o melhor guarda-costas que eu poderia ter, por todos os dias que foi me buscar no ponto de ônibus tarde da noite.

As minhas amigas Adriana, Jaqueline e Talita, pela amizade, confidências e torcida.

Aos meus caros amigos Angladis e Emanuella pela paciência, amizade, pelas discussões e contribuições neste trabalho.

Aos meus bem-humorados irmãos do LEMAN que sempre estiveram dispostos a ajudar, apoiar e incentivar, hoje sei que somos melhores juntos, em especial a Leyllanne, Elvis, João Victor, Guimarães, Samaysa, Caio, Alysson, Ygor e ao nosso melhor agregado Ivis.

Ao técnico Aldir por sempre estar disposto a ajudar.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CnPq e FAPEAL pelo apoio financeiro possibilitando a realização deste trabalho. Bem como a instituição UFAL.

RESUMO

A cachaça é uma bebida alcoólica destilada que apresenta um composto com potencial carcinogênico e mutagênico, o carbamato de etila (CE). No Brasil a quantificação de CE é feita via cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) que tem um alto custo de análise. Neste trabalho é desenvolvido um método eletroquímico de baixo custo capaz de detectar e quantificar de forma eficiente concentrações traços de CE. Este método faz uso de derivatizantes, pois o CE é eletroinativo, para tal função foram usados o 9-xantidrol (XT) e a hidroquinona (HQ) por serem eletroativas e reativos frente ao CE. As técnicas utilizadas no desenvolvimento do método foram voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD). Os sensores avaliados foram; carbono vítreo (CV), CV modificado com: nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento prévio (NTC); tratado com ácido nítrico (NTCTT); NTC carboxilado (NTCCOOH) e aminado (NTCNH₂) todos com uso dos derivatizantes XT e HQ; eletrodo de pasta de carvão ativado com 30% óleo mineral e 10% m/m de XT em suporte de polietileno (PXT1) e em suporte BAS (PXT2). A estabilidade do XT foi avaliada via espectroscopia no UV-Vis em presença e ausência de O₂, luz e CE, mostrando-se estável em todas as condições. A influência da concentração de HCl (0,001 - 0,1 M) na reação de derivatização foi avaliada por espectroscopia de fluorescência, se observou que o uso de HCl 0,01 M proporcionou obtenção de banda de maior intensidade. Foi realizado um estudo mecanístico da interação do XT com CE através de eletrólise, onde os produtos de eletrólise foram avaliados via espectroscopia no infravermelho (FT-IR) e CG-EM para uma elucidação dos possíveis intermediários. Dentre os eletrodos modificados o NTCNH₂ apresentou natureza difusional e linearidade quanto ao monitoramento do sinal referente ao analito por VPD, obtendo-se limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de 3,48 e 11,6 ppb respectivamente, porém não foi repetitivo. O melhor método foi obtido através do uso do eletrodo PXT2, o qual permite a troca de todo elemento ativo após cada análise, este se mostrou linear, repetitivo, com LD e LQ de 0,2623 e 0,8742 ppb, bem abaixo do limite legal, este método possibilitou a análise de uma amostra real, observando-se teor de CE de 21,13 ppb. Quanto as análises com HQ, o NTCTT apresentou pico catódico e anódico alargado na mesma região da HQ inviabilizando sua utilização, os nanotubos funcionalizados não apresentaram linearidade com adições de CE, o uso do NTC apresentou linearidade com LD e LQ de 0,61 e 2,035 ppb respectivamente, demonstrando potencial para o uso desse sistema. Em suma, é notável que o uso de XT se mostrou um método eficiente para quantificação de CE em amostras reais, sendo necessária a validação do método e o desenvolvimento de análises de interferentes para verificação da eficiência dos sistemas propostos.

Palavras chave: Carbamato de etila; xantidrol; hidroquinona; eletroquímica.

ABSTRACT

Cachaça is a distilled alcoholic beverage that presents a compound with potential carcinogenic and mutagenic: ethyl carbamate (EC). In Brazil, the quantification of CE is done through gas chromatography coupled to the mass spectrometer (GC-MS) which has a high cost of analysis. In this paper an electrochemical able to efficiently detect and quantify CE has been developed. This method makes use of derivatizing agents, since EC is non-electrochemical reactive. Thus, 9-xanthrol (XT) and hydroquinone (HQ) were employed due to their electroactive and reactive behavior towards EC. Cyclic Voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were employed in the development of this method. Several sensors were used, including glassy carbon electrode (GC), multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode without pretreatment (MWCNT); multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode treated with nitric acid (MWCNTT); Carboxylated (MWCNTCOOH) and amino acid (MWCNTNH₂) carbon nanotube all with use of derivatizers XT and HQ; activated carbon mass electrode with 30% mineral oil and 10% m / m of XT in polyethylene support (PXT1) and BAS electrode support (PXT2). The stability of XT was evaluated by UV-Vis spectroscopy in presence and absence of O₂, light and CE, showing suitable stability in all conditions. The influence of HCl concentration (0.001 - 0.1 M) in the derivatization reaction was evaluated by fluorescence spectroscopy with the 0.01 M HCl concentration increasing band intensity. A mechanistic study of the interaction of XT with EC through electrolysis, which products were evaluated via infrared spectroscopy (FT-IR) and GC-MS for an elucidation of the possible intermediates. Among the evaluated modified electrodes of MWCNTNH₂ showed diffusional nature and linearity for the monitoring of the analytical signal by DPV, obtaining limit of detection (LD) and quantification (LQ) of 3.48 and 11.6 ppb, but it showed no repeatability. The best method was done through the use of PXT2, which allows the exchange of all elements for each analysis, with linear behavior, with LD and LQ of 0.2623 and 0.8742 ppb, below the legal limit, this method allowed the analysis of a real sample, observing an EC content of 21.13 ppb. Regarding the electrochemical analysis, MWCNTT showed a broad cathode and anodic peak at the same HQ region making it useless, functionalized nanotubes do not show linearity with CE additions, the use of MWCNT showed linearity with LD and LQ of 0.61 and 2.035 ppb, demonstrating a promising system. In short, it is important that the use of XT is an efficient method for the quantification of EC in some real ones, being necessary the validation of the method and development of interference analysis to verify the efficiency of proposed systems.

Keywords: Ethyl carbamate; Xanthrol; Hydroquinone; Electrochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Carbamato de etila ou uretana.	21
Figura 2 – Principais vias de formação de CE em cachaças. Em verde compostos provenientes da ação de leveduras e bactérias e em vermelho composto proveniente de reações enzimáticas e clivagens térmicas.	24
Figura 3 – Formação de CE em amostra modelo de cachaça pela adição de cianato, ureia, cianeto, L-arginina, L-citrulina e carbamifosfato em função do tempo.	25
Figura 4 – Consumo do íon cianato (○) e formação de CE (■) em função do tempo em soluções modelo de cachaças fortificadas.	26
Figura 5 – Fluxogramas do processamento de cachaças utilizando diferentes sistemas de destilação: em vermelho processo contínuo e em verde processo descontínuo.	28
Figura 6 – Distribuição de CE (ppb) por faixas de concentração em amostras de água ardente de cana destiladas em alambique e em coluna.	29
Figura 7 – Curvas de concentração de etanol, carbamato de etila e cobre na fração destilada da segunda destilação durante a produção de uma aguardente de cana-de-açúcar bidestilada.	31
Figura 8 – Representação esquemática de cela eletroquímica de três eletrodos.	42
Figura 9 – Representação esquemática da modificação do eletrodo de carbono vítreo com NTC.	44
Figura 10 – Representação esquemática da elaboração do eletrodo PXT1.	45
Figura 11 – Representação esquemática da elaboração do eletrodo PXT2.	46
Figura 12 – Reação de derivatização de CE por XT em meio ácido.	48

Figura 13 – Voltamogramas obtidos através de varreduras da solução de XT (32,57 μ M) na faixa de oxidação (0 a 1,0 V), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).	49
Figura 14 – Voltamogramas obtidos através de varreduras da solução de XT (32,57 μ M) na faixa de redução (0 a -0,30 V), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M)	50
Figura 15 – Voltamogramas da faixa de oxidação após leitura em redução e após aplicado potencial de -0,2V por 60 s, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).....	51
Figura 16 – a) Coulometria obtida através da eletrólise em potencial controlado (-0,3 V) de XT em HCl 0,1 M e em b) Voltamogramas da faixa de redução antes e após da eletrólise em potencial controlado (-0,3 V), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).	52
Figura 17 – Espectros no infravermelho FTIR de éter etílico, XT e XT após a eletrólise (XT _{red}).....	53
Figura 18 – a) Cromatograma CG-EM do produto obtido pela eletrólise em potencial controlado de XT, b) Espectro de massa do pico obtido no tempo de retenção de 13,172 min e em c) Combinação do espectro de massas obtida pela biblioteca do equipamento (xanteno). 54	
Figura 19 – Proposta de mecanismo a redução de XT em meio ácido.....	55
Figura 20 – Voltamogramas de XT na presença de CE em varreduras na faixa de oxidação (1 $^{\circ}$), redução (2 $^{\circ}$) e redução-oxidação (3 $^{\circ}$), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).	56
Figura 21 – Voltamogramas de XT na presença de CE, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M), em a) varredura na faixa de oxidação após aplicação de potencial em -0,2 V por 60 s e em b) varredura de redução seguida de oxidação após aplicação de potencial em -0,2 V por 60 s.	57
Figura 22 – Espectros no infravermelho FTIR de éter etílico, XT, CE e do produto da eletrólise de XT com CE em meio ácido (HCl 0,1 M).....	58

Figura 23 – a) Cromatograma CG-EM do produto obtido pela eletrólise em potencial controlado de XT com CE, b) Espectro de massa do pico obtido no tempo de retenção de 18,072 min e em c) Combinação do espectro de massas obtida pela biblioteca do equipamento (CEX).	59
Figura 24 – Mecanismo proposto para reação entre XT _{red} e CE em meio ácido.....	60
Figura 25 – Estudo de velocidade em a) Voltamogramas de XT em diferentes velocidades de varredura e em b) comportamento eletroquímico de XT em varreduras sucessivas, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$	61
Figura 26 – Regressão linear de E (V) versus $\ln \nu$	62
Figura 27 – a) Voltamogramas de XT 1 μM , CE (4,45 a 10,69 ppm), em HCl (0,1 M) e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e em b) Curva de calibração para sinal em $-0,15 \text{ V}$ e c) Curva de calibração para sinal em $0,00 \text{ V}$	63
Figura 28 – Voltamogramas de XT ($2,69 \times 10^{-4} \text{ M}$) em solução de HCl (0,1 M), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, utilizando diferentes eletrodos de trabalho em a) CVNTC, b) CVNTCTT, c) NTCCOOH (em c) II amplificação do sinal) e em d) CVNTCNH ₂ (em d) II amplificação do sinal).	64
Figura 29 – a) Estudo de velocidade ($0,020 - 0,175 \text{ V/s}$) da solução de XT utilizando o eletrodo CVNTCNH ₂ , b) regressão linear E (V) versus $\ln \nu$ e em c) regressão linear I_{pc} versus $\nu^{1/2}$	66
Figura 30 – a) Voltamogramas das adições de XT em solução de CE em HCl (0,1 M) e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e em b) Regressão linear da corrente versus concentração de CE.	67
Figura 31 – a) Voltamogramas obtidos a partir do excesso de XT no meio e em b) Regressão linear da corrente de pico versus concentração de XT.	68
Figura 32 – Voltamogramas de HCl (0,1 M) utilizando eletrodo de pasta de carbono, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$	69

Figura 33 – a) Voltamogramas referentes ao sistema XT-CE utilizando eletrodo PXT1, CE (83,74 ppb), em HCl (0,1 M) e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e em b) Ampliação do sinal próximo a 0,1 V.	70
Figura 34 – Voltamogramas relacionados a oxidação da derivatização entre XT-CE, em CE (27,99 ppb) utilizando diferentes tempos de condicionamento (30, 45 e 60 s) no eletrodo PXT2 antes da análise, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	71
Figura 35 – a) Voltamogramas relacionados a oxidação da derivatização entre XT-CE em diferentes concentrações de CE, utilizando eletrodo PXT2 condicionado em -0,2 V por 60 s, em HCl 0,1 M e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e em b) Regressão linear da corrente de pico versus concentração de CE.	72
Figura 36 – Voltamogramas obtidos através da análise da amostra comercial de cachaça e da adição de padrão, utilizando PXT2 condicionado em -0,2 V por 60 s, em HCl 0,1 M e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	73
Figura 37 – Espectros no UV-vis do XT em a) em diferentes tempos de derivatização com CE, em b) na ausência e na presença de O_2 e em c) em diferentes concentrações de CE.	75
Figura 38 – Espectros de fluorescência de XT+CE em diferentes concentrações de HCl, em a) HCl 0,1 M, em b) HCl 0,01 M e em c) HCl 0,001M.	76
Figura 39 – Reação de derivatização de CE por HQ.....	77
Figura 40 – a) Voltamograma obtido utilizando CV e solução de HQ ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato pH = 4,5 e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ b) Reação redox da HQ em meio aquoso...77	
Figura 41 – Voltamogramas da HQ ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato (pH = 4,5), $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ utilizando diferentes eletrodos de trabalho, a) CVNTC, b) CVNTCTT, c) CVNTCCOOH e em d) CVNTCNH ₂	78

Figura 42 – Regressões lineares para HQ-CE utilizando diferentes eletrodos de trabalho a) eletrodo CVNTCCOOH (ΔI_{pa} vs CE), b) eletrodo CVNTCCOOH (ΔI_{pc} vs CE), c) eletrodo CVNTCNH₂ (ΔI_{pa} vs CE) e em d) eletrodo CVNTCNH₂ (ΔI_{pc} vs CE). 80

Figura 43 – a) Voltamogramas de HQ na presença de CE (25,44 – 127,0 ppb) utilizando eletrodo de CVNTC, em tampão acetato pH = 4,5 e $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e em b) Voltamogramas do branco analítico e da solução de HQ ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), em tampão acetato pH = 4,5 e $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e em c) curva de calibração em função de ΔI_{pa} vs CE. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Uso de diferentes métodos de preparo de amostras para a quantificação de CE em matrizes alimentícias e respectivos limites de quantificação e técnicas de quantificação utilizadas.....	33
Tabela 2 – Uso de diferentes métodos para a quantificação de CE em matrizes alimentícias e respectivos limites de detecção e quantificação.	35
Tabela 3 – Reagentes utilizados e seus respectivos fornecedores.	40
Tabela 4 – Eletrodos e siglas utilizadas para eletrodos de trabalho.....	43
Tabela 5 – Uso de diferentes métodos para a quantificação de CE em matrizes alimentícias e respectivos limites de detecção e quantificação.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

v	Velocidade de varredura de potencial
ΔI	Diferença entre a corrente da linha base e da de pico no voltamograma
μA	Microampère
A	Ampère
Ag AgCl Cl (sat.)	Eletrodo de referência de prata cloreto de prata
b	coeficiente angular da curva analítica
CE	Carbamato de etila
CEX	Carbamato de etil xantil
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massa em modo tandem
CLAE-FN-APCI-EM/EM	Cromatografia líquida de fase normal com ionização química a pressão atmosférica acoplado a espectrômetro de massa em modo tandem
CV	Carbono vítreo
CVNTC	Carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas
CVNTCTT	Carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas após tratamento com ácido nítrico
CVNTCCOOH	Carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com grupos COOH
CVNTCNH ₂	Carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com grupos NH ₂
E	Potencial padrão
ELL	Extração líquido-líquido
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
EFS	Extração em fase sólida

E_{p_a}	Potencial de pico anódico
E_{p_c}	Potencial de pico catódico
F	Constante de Faraday (96484 C mol ⁻¹)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
I_{p_a}	Corrente de pico anódica
I_{p_c}	Corrente de pico catódico
I_{res}	Corrente residual
HQ	Hidroquinona
m	massa (g)
M	massa molecular (g mol ⁻¹)
MEFS	Microextração em fase sólida
MEFS-HD	Microextração em fase sólida headspace
n	número de elétrons
NTC	Nanotubo de carbono de paredes múltiplas
NTCTT	Nanotubo de carbono de paredes múltiplas após tratamento com ácido nítrico
NTCCOOH	Nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com grupos COOH
NTCNH ₂	Nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com grupos NH ₂
PXT1	Pasta de carvão mineral (7:3) óleo mineral contendo 10% XT m/m em suporte de polietileno
PXT2	Pasta de carvão mineral (7:3) óleo mineral contendo 10% XT m/m em suporte semelhante a CV
Qliq	Carga líquida
Qres	Carga residual do processo
Sb	Desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas por 10 voltamogramas de brancos em mesmo potencial do pico

UV-vis

Ultravioleta-visível

VC

Voltametria Cíclica

VPD

Voltametria de Pulso Diferencial

XT

9-xantidrol

XTred

9-xantidrol reduzido

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
	1.2 Justificativa do trabalho.....	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA	21
	2.1 Cachaças	21
	2.2 Carbamato de etila (CE)	22
	2.3 Precursores de CE.....	23
	2. 3.1 Formação de CE a partir de cianeto.....	25
	2.4 Fatores que influenciam no teor de CE em cachaças.....	27
	2.4.1 Sistema de destilação	27
	2.4.2. Presença de cobre	30
	2.4.3. Presença de luz durante o armazenamento	31
	2.5 Técnicas de preparo de amostras contendo CE	32
	2.6 Técnicas para quantificação de CE.....	35
	2.7 Sensores eletroquímicos	37
3.	OBJETIVO	39
	3. 1 Objetivos geral.....	39
	3. 2 Objetivos específicos	39
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40

4. 1	Reagentes e soluções	40
4.1.1	Preparo da amostra	41
4. 2	Derivatização	41
4. 3	Estudos de espectroscopia no UV/visível do 9-Xantidrol:	41
4. 4	Estudos de espectroscopia de fluorescência do 9-Xantidrol.....	41
4. 5	Estudos de espectroscopia de infravermelho FTIR	41
4.6	Estudos eletroquímicos	42
4. 6. 1	Tratamento do NTC	43
4. 6. 2	Procedimento de limpeza do eletrodo de carbono vítreo.....	43
4. 6. 3	Modificação do eletrodo de CV com NTC.....	44
4. 6. 4	Eletrodo de pasta de carbono	44
4. 6. 5	Eletrólise	46
4.7	Análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas	46
4.8	Limite de detecção e quantificação.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	O 9-Xantidrol e avaliação eletroquímica.....	48
5. 1. 1	Estudo de mecanismo	48
5. 1. 2	Estudos utilizando eletrodo CV	60
5. 1. 3	Estudo utilizando eletrodo modificado com NTC	63

5. 1. 4 Estudos utilizando eletrodo de PXT	68
5.1.4.1 PXT1.....	68
5.1.4.2 PXT2.....	70
5. 1. 5. Estabilidade no UV-Vis do XT.....	74
5. 1. 6. Monitoramento do CEX em diferentes concentrações de HCl via Fluorescência.....	75
5.2 A Hidroquinona e avaliação eletroquímica	76
6. CONCLUSÃO.....	82
7. PERSPECTIVAS	83
8. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida alcoólica brasileira, obtida da destilação do mosto fermentado da cana-de-açúcar que apresenta características sensoriais peculiares. Durante sua fabricação diversos compostos são formados, no entanto, uma substância formada nessa bebida é motivo de preocupação. Se trata do carbamato de etila, o qual apresenta potencial mutagênico e carcinogênico. Diversos países limitam a quantidade máxima de carbamato de etila em bebidas destiladas como uma medida de proteção à saúde dos consumidores. No Brasil o teor máximo permitido em cachaças é de 210 ppb (BRASIL, 2005, 2014).

Alguns fatores influenciam no teor deste composto na cachaça como o tipo de destilação, a presença de cobre nas instalações e o controle da destilação. Algumas medidas podem ser tomadas visando a redução desta substância, como o uso de bidestilação e a eliminação do cobre das instalações, o que pode promover mudanças nas características sensoriais do produto (GALINARO; FRANCO, 2011). Entretanto, sabe-se que uma medida para total eliminação do carbamato de etila nessa bebida ainda não é conhecida, visto que o mecanismo de formação deste composto é desenvolvido nas etapas de fermentação, destilação e armazenamento (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; ZHAO et al., 2013).

O monitoramento do teor de carbamato de etila em cachaças é essencial para proteção dos consumidores e para viabilizar a exportação deste produto. Diversas metodologias podem ser empregadas para determinação deste composto. A mais utilizada é o uso da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Esta técnica oferece sensibilidade e rapidez, no entanto, exige etapas como o preparo de amostras; que encarece a análise, mão-de-obra qualificada, e não é indicada para análise de um grande número de amostras (GOWD et al., 2018). Sabendo que os métodos eletroquímicos apresentam sensibilidade, baixo custo, possibilidade de automação e análise *in situ*, se verificou que não há relato de método eletroquímico não enzimático na literatura para a determinação de carbamato de etila. A proposta deste trabalho é o desenvolvimento de um método eletroquímico não enzimático que facilite a determinação de carbamato de etila em amostras de cachaças comerciais a partir de agentes derivatizantes, tendo em vista que este analito não é eletroativo.

1.2 Justificativa do trabalho

Tendo em vista que o carbamato de etila é um composto com potencial carcinogênico que está presente em bebidas destiladas como a cachaça e o Brasil é um dos maiores produtores de destilados alcoólicos do mundo, é de grande importância o conhecimento dos níveis de carbamato de etila em seus produtos, pois além dos aspectos ligados à saúde pública, a sua presença em concentrações superiores a 150 ppb constitui também uma barreira para exportações para a Europa e América do Norte. Assim, é de grande interesse da indústria e dos órgãos de fiscalização o desenvolvimento de tecnologia para rastrear este composto de forma rápida e barata. Este trabalho propõe o desenvolvimento de sensor eletroquímico para verificação dos níveis de carbamato de etila em cachaças comerciais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

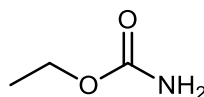
2.1 Cachaças

A cachaça é uma bebida tradicional brasileira que ocupa a segunda posição no ranking de consumo de bebidas alcoólicas no país e é a terceira bebida destilada mais consumida no mundo (MILANI et al., 2017). Em 2016, o Brasil arrecadou cerca de US\$ 13,6 milhões com a exportação de 8,3 milhões de litros para 60 países (IBRAC, 2017).

A cachaça é obtida da destilação do mosto fermentado do caldo da cana-de-açúcar e apresenta teor alcoólico entre 38 e 48 % vol. (BRASIL, 2005). Sua produção é realizada por aproximadamente 30 mil produtores divididos em unidades industriais e artesanais (alambiques) distribuídas em todo o território brasileiro, com geração de 400 mil empregos diretos e indiretos (DANIEL; BARRETO, 2017). Apresenta diversas variações obtidas a partir da adição de açúcar (adoçada) e da duração do armazenamento (envelhecida, premium e extra premium) (IBRAC, 2017).

A qualidade da bebida é tradicionalmente julgada pelas suas características sensoriais (cor, aroma e sabor), as quais dependem da matéria prima, das etapas de produção e do armazenamento (HELENA; SPOTO, 2011). O processo de fabricação promove a formação de compostos responsáveis pelas características sensoriais, como aldeídos, álcoois e ésteres (LELIS et al., 2014). Durante sua produção pode ocorrer a formação de carbamato de etila (CE), também chamado de uretana (Figura – 1). Esta substância pode comprometer a segurança do produto devido a seu potencial mutagênico e carcinogênico, sendo relatado um aumento na incidência de câncer no pulmão, vasos sanguíneos e fígado em várias espécies, como ratos, camundongos e macacos que consumiram este composto (XIA et al., 2018).

Figura 1 – Carbamato de etila ou uretana.



Fonte: Autora, 2019.

2.2 Carbamato de etila (CE)

O CE é o éster etílico do ácido carbâmico, sendo solúvel em água e etanol (ZHAO et al., 2013). Apresenta vários usos comerciais como fonte de carbonila para reações orgânicas, na preparação de amino resinas e como co-solvente para pesticidas (ADAM; REFAT; SAAD, 2013). O CE pode ser encontrado naturalmente em diversos alimentos fermentados, como pães, cervejas e iogurtes (UNIÃO EUROPEIA; COMISSÃO, 2016).

Durante o século XX, CE foi utilizado para fins medicinais como antineoplástico, devido a estudos que apontaram a supressão do crescimento de bactérias, tecidos vegetais e carcinomas em ratos *in vitro* (ZHAO et al., 2013). Em 1943, estudos indicaram o potencial tóxico do CE. Sua presença em meio celular provoca danos ao DNA associados ao estresse oxidativo, sendo classificado como carcinógeno do grupo 2A (provavelmente carcinogênico para humanos) pela Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (GOWD et al., 2018; IARC, 2010; ZHAO et al., 2013). Em 2009, o Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos avaliou o CE como provável carcinógeno humano (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2009). A Diretiva de Substâncias Perigosas da União Europeia (UE) incluiu o CE na categoria 1B, a qual constam compostos com presumido potencial carcinogênico para os humanos. Esta classificação é baseada em testes com animais (EUROPEAN COMMISSION, 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura recomendam que em casos de resposta carcinogênica de relevância para a saúde humana, deve-se realizar o cálculo da dosagem de referência do limite inferior de confiança, chamada BMDL (*Benchmark Dose – Lower Confidence Limit*). Essa dosagem se refere ao mais baixo nível de resposta capaz de definir com confiança a extremidade inferior da relação dose-resposta experimental observada com base em bioensaio para câncer com animais, o caso de CE, a BMDL diária é de 0,3 mg por kg de peso corporal. Esta dosagem constitui incidência extra de 10% de neoplasmas alveolares e bronquiolares em camundongos machos e fêmeas (FAO/WHO, 2006; WHO, 2006).

O valor de BMDL permite o cálculo da margem de exposição, também chamado MOE (*Margin Of Exposure*). Este cálculo é baseado na relação de BMDL com o consumo humano estimado, considerando uma pessoa de 70 kg (FAO/WHO, 2006). Valores de MOE acima de

10.000 são considerados de baixo risco para a saúde pública. É o caso da exposição a CE provocada por alimentos exceto bebidas alcoólicas, apresentando MOE de aproximadamente 20.000 (BMDL diária de 15 ng por kg de peso corporal). Quando se trata da exposição a alimentos, incluindo variedades de bebidas alcoólicas, o MOE é próximo a 3.800 (BMDL diária de 80 ng por kg de peso corporal), constituindo risco a saúde dos consumidores (EUROPEAN FOOD SAFETY, 2008; FAO/WHO, 2006; WHO, 2006). O índice fica ainda pior ao se analisar consumidores de bebidas destiladas, chegando ao MOE de cerca de 600, o que demonstra preocupação quanto aos níveis de exposição de CE oferecidos pelas bebidas destiladas aos consumidores (EUROPEAN FOOD SAFETY, 2008).

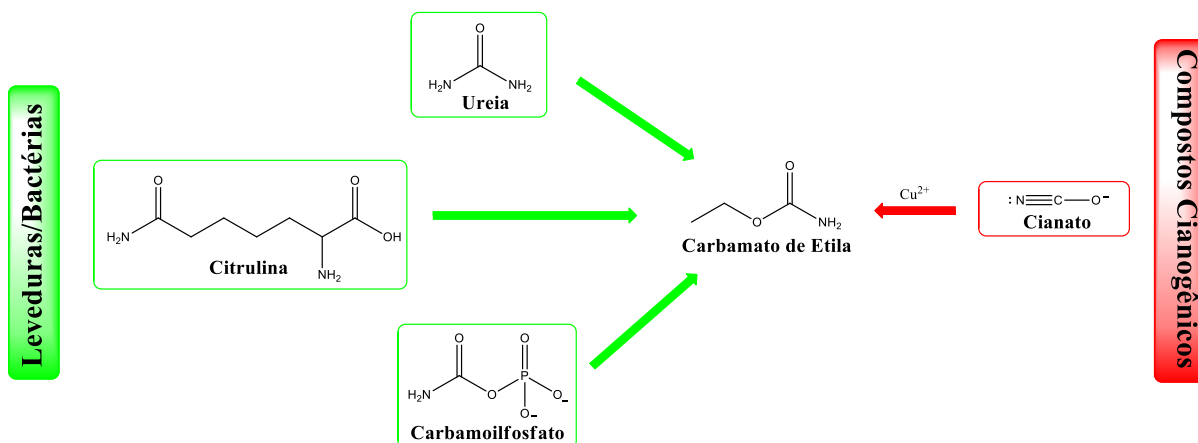
Com o intuito de reduzir a exposição dos consumidores de bebidas destiladas a elevados níveis de CE, diversos países implementaram regulamentações exigindo aos produtores de destilados a redução dos teores de CE em seus produtos. No Canadá, desde 1986, o limite de CE nas bebidas destiladas é de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. O mesmo limite é aplicado na França, nos Estados Unidos e na República Tcheca (EUROPEAN FOOD SAFETY, 2008; RIACHI et al., 2014). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2005 deu o prazo de cinco anos para que os produtores de cachaça adotassem metodologias para limitar o teor de CE à $150 \mu\text{g L}^{-1}$. Em 2010 o prazo foi prorrogado por mais dois anos, e em 2014 esse limite foi alterado para $210 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005, 2010, 2014). A União Europeia recomenda aos Estados-Membro o teor máximo de 1 mg L^{-1} nas bebidas destiladas (EUROPEAN FOOD SAFETY, 2008; UNIÃO EUROPEIA; COMISSÃO, 2016).

2.3 Precursores de CE

Entre os principais precursores de CE estão a ureia, a citrulina e o carbamilsulfato que são produzidos por leveduras e bactérias durante a fermentação (COOK et al., 1990; ZHAO et al., 2013). Outro precursor de grande importância é o cianato, que é produzido através de reações enzimáticas e clivagens térmicas envolvendo glicosídeos cianogênicos naturais da cana-de-açúcar. A formação de CE através de cianato pode ocorrer durante e após a destilação, sendo catalisada por íons de cobre presentes nos condensadores (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001; ZHAO et al., 2013). Existem várias possíveis vias para a formação de CE em bebidas destiladas. Geralmente envolvem a reação

entre o etanol e compostos nitrogenados, sendo que as principais estão resumidas na Figura 2 (a seguir) (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; GOWD et al., 2018).

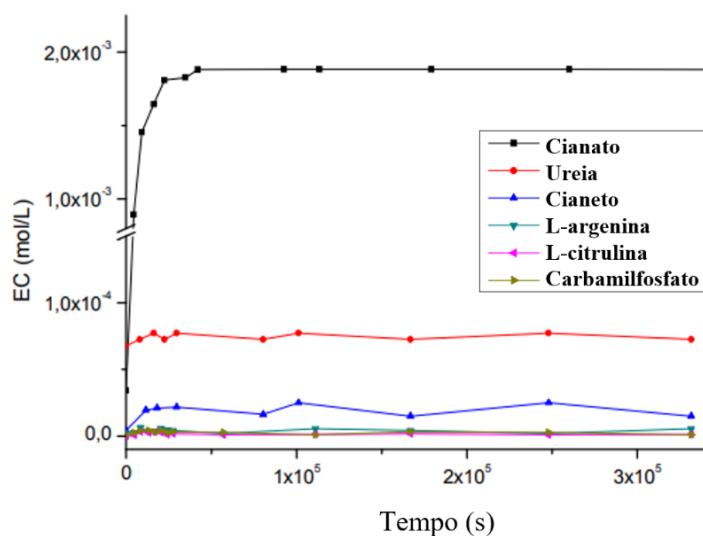
Figura 2 – Principais vias de formação de CE em cachaças. Em verde compostos provenientes da ação de leveduras e bactérias e em vermelho composto proveniente de reações enzimáticas e clivagens térmicas.



Fonte: Autora, 2019.

Alguns estudos relatam que a contribuição de cianato para formação de CE é mais efetiva que a dos demais precursores, a exemplo de GALINARO et al., 2015 que avaliando a formação de CE em amostras modelo de cachaça, na presença de cianato, ureia, cianeto, L-argenina, L-citrulina e carbamioilfosfato (concentrações de até $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), obteve o gráfico expresso na Figura 3, onde observa-se que na presença de cianato houve a formação de aproximadamente $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de CE. Com a adição de ureia observou-se a formação de aproximadamente $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de CE, que é aproximadamente 20 vezes menor que a quantidade formada pelo cianato. A contribuição de cianeto, L-argenina, L-citrulina e carbamioilfosfato não foram significativas.

Figura 3 – Formação de CE em amostra modelo de cachaça pela adição de cianato, ureia, cianeto, L-arginina, L-citrulina e carbamilsfosfato em função do tempo.



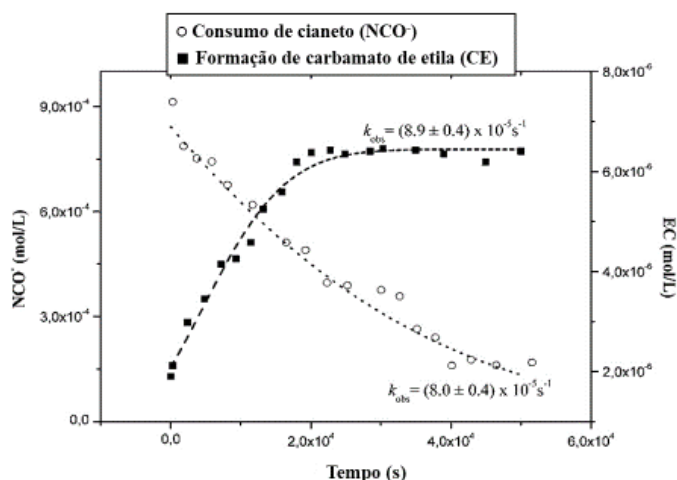
Fonte: Galinaro et al., 2015.

O CE formado durante a fermentação pode ser facilmente eliminado das cachaças durante a destilação, pois o mesmo possui ponto de ebulição elevado (182-185°C). Porém, o mecanismo de ação que envolve o cianato acontece também durante e após a destilação o que torna sua remoção extremamente difícil. Assim, o cianato torna-se o principal precursor de CE em bebidas destiladas (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001). A presença de glicosídeos cianogênicos na matéria-prima e o complexo mecanismo de formação de CE impedem a ausência desse composto no produto final (WEBER; SHARYPOV, 2009).

2.3.1 Formação de CE a partir de cianeto

A formação de CE em bebidas destiladas está fortemente relacionada a presença de cianato. Estudos como os de GALINARO et al., 2015, demonstram que o consumo de cianato ocorre paralelamente a formação de CE, obtendo-se constantes de velocidade (k_{obs}) de formação do CE e de consumo de cianato semelhantes, como demonstra o gráfico da Figura 4:

Figura 4 – Consumo do íon cianeto (○) e formação de CE (■) em função do tempo em soluções modelo de cachaças fortificadas.

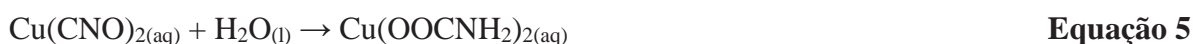


Fonte: Galinaro et al., 2015.

Este mecanismo de formação do CE ainda não foi elucidado. No entanto, uma das possibilidades é a oxidação do cianeto ao cianato catalisada por íons de cobre (II) seguida de reação com etanol, de acordo com as Equações 1 – 4 abaixo (RIACHI et al., 2014). A oxidação do cianeto à cianato também pode ocorrer através da auto-oxidação sob luz UV de compostos insaturados presentes na cachaça, produzindo radicais livres, capazes de promover a reação de oxidação do cianeto à cianato (ARESTA; BOSCOLO; FRANCO, 2001).



Outra possibilidade seria a formação de um cianocomplexo de cobre em solução aquosa, seguido de um ataque nucleofílico do etanol como descrevem as Equações 5 e 6 (BAFFA JÚNIOR, 2011):



Há ainda a possibilidade de formação do CE a partir do ataque do cianocomplexo de cobre ao etanol, posteriormente sofrendo ataque da água gerando CE de acordo com as Equações 7 e 8 (BAFFA JÚNIOR, 2011):



Assim uma estratégia eficiente para evitar/reduzir a formação de CE em bebidas destiladas é a diminuição/eliminação dos compostos cianogênicos no processo. Isso pode ser alcançado de várias maneiras, entre elas a adição de íons prata que são capazes de reduzir a presença de cianeto em até 90% pela formação de sais de baixa solubilidade e/ou a adição da enzima rodanase, a qual converte o cianeto em tiocianeto retirando o reagente do meio reacional. Porém, a eliminação destes compostos cianogênicos pode comprometer as características sensoriais do produto, assim enfrentando resistência ao seu uso (WEBER; SHARYPOV, 2009).

2.4 Fatores que influenciam no teor de CE em cachaças

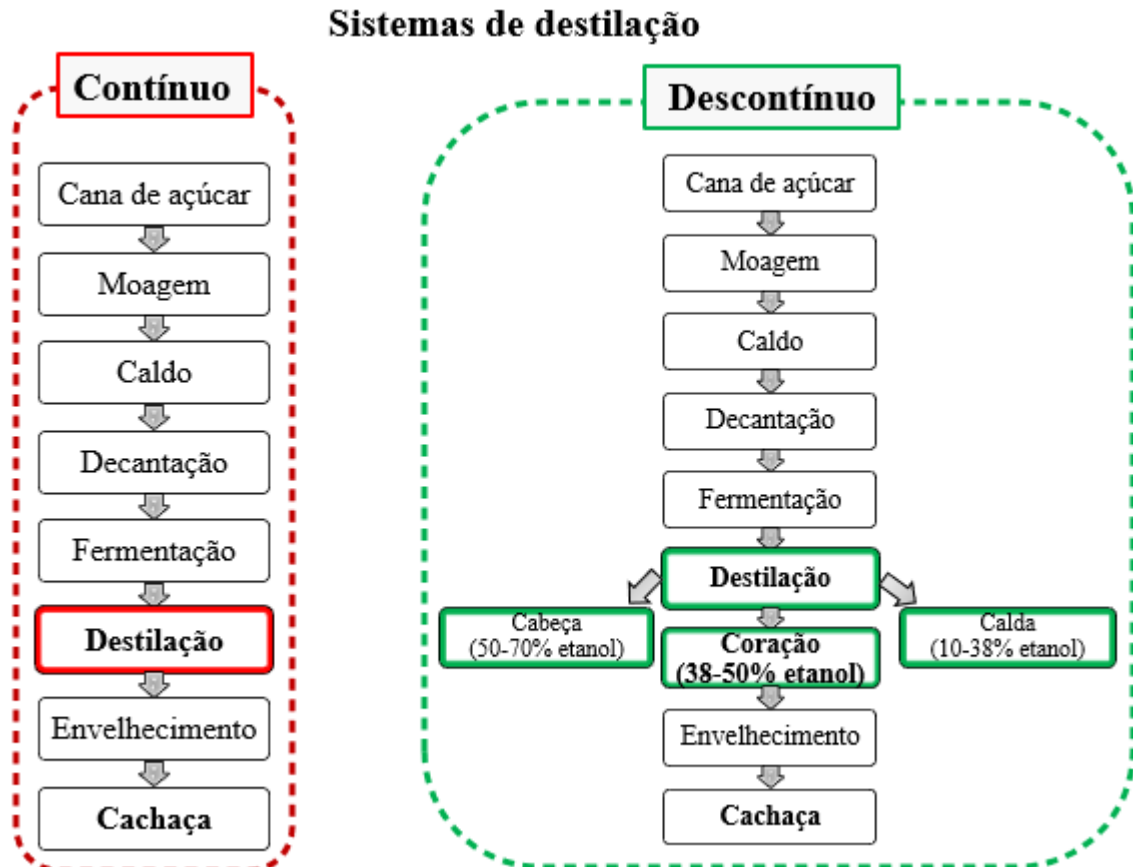
A formação de CE nas cachaças apresenta um mecanismo complexo podendo ocorrer durante e até 48 h após a destilação. Neste contexto, várias metodologias para remoção do CE no produto final foram propostas, entre elas a percolação do destilado com materiais como resinas de troca iônica, carvão ativado e quitosana. Porém esses processos não são seletivos, comprometendo a qualidade sensorial do produto (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; GALINARO; FRANCO, 2011; ZHAO et al., 2013). O que leva a busca de possíveis métodos para o controle de fatores que possam promover a redução no teor de CE na bebida, dentre os principais fatores se tem: o sistema de destilação e a presença de cobre.

2.4.1 Sistema de destilação

O ponto de ebulição do CE (182 – 185 °C) sugere que uma destilação cuidadosa é capaz de controlá-lo. É sabido que o sistema de destilação exerce grande influência no teor de CE encontrado nas cachaças. Normalmente o processo de destilação é realizado de duas formas:

continua (coluna) ou descontínua (alambique), como exemplificado pela Figura 5 (LELIS et al., 2014).

Figura 5 – Fluxogramas do processamento de cachaças utilizando diferentes sistemas de destilação: em vermelho processo contínuo e em verde processo descontínuo.



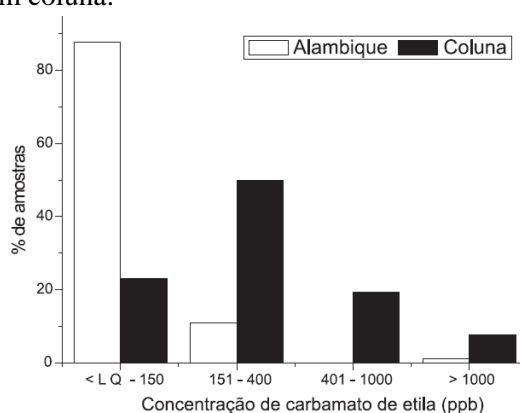
Fonte: Adaptado de SAKAI, 2018.

Os grandes produtores de destilados utilizam o sistema de destilação contínuo. Neles são utilizadas colunas de aço inoxidável constituídas por bandejas distribuídas em função de sua altura e diâmetro. Apenas os condensadores possuem cobre em sua composição sendo este indispensável para manter as propriedades organolépticas do produto. Nesse sistema é obtido apenas um destilado (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009). O sistema de destilação descontínuo é utilizado por pequenos produtores, sendo classificado como um processo artesanal e apresenta um produto de alto valor sensorial agregado. Geralmente o alambique é constituído de três corpos de cobre onde se obtém três frações de destilados com teores alcoólicos diferentes: cabeça (50 – 70% v/v,) coração (38 – 50% v/v) e cauda (10 – 38 % v/v),

sendo que apenas a fração coração é utilizada para a fabricação da cachaça (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009; LELIS et al., 2014).

ANDRADE-SOBRINHO e colaboradores, 2009 realizaram estudos sobre influência do tipo de destilação no teor de CE. Para tal foram analisadas 108 amostras de aguardente de cana (38 a 54% vol de álcool) coletadas no estado de São Paulo, obtendo o gráfico da Figura 6 (abaixo), onde se observa que as amostras obtidas por destilação contínua apresentam teores consideravelmente maiores de CE que as amostras obtidas por destilação descontínua.

Figura 6 – Distribuição de CE (ppb) por faixas de concentração em amostras de água ardente de cana destiladas em alambique e em coluna.



Fonte: Andrade-Sobrinho (2009).

BAFFA JÚNIOR, 2011, realizou estudos para quantificar CE nas frações (cabeça, coração e calda) destiladas em alambique. Este mostrou teores médios de CE de 59,7 ppm na fração cabeça, 0,052 ppm na fração coração e 1,57 ppm na fração cauda, evidenciando assim o menor teor de CE na fração coração em relação as demais e a importância de uma separação eficiente das frações para garantir a qualidade do produto. Estes resultados corroboram com os obtidos por ANDRADE-SOBRINHO e colaboradores e explicam porque as cachaças produzidas pelo método descontínuo tem teores de CE mais baixos que as produzidas pelo método contínuo (LELIS et al., 2014).

A maior concentração de CE na fração cabeça pode ser explicada pelo mesmo apresentar maior solubilidade em meio alcoólico ($1,2 \text{ g mL}^{-1}$) que em meio aquoso ($0,10 \text{ g mL}^{-1}$). Além disso, esta fração apresenta maior concentração de cianeto que é o principal precursor de CE (ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009; RIACHI et al., 2014). A fração cauda apresenta maiores níveis de CE que a fração coração. Apesar desta ter um teor

alcoólico menor, é submetida a temperaturas mais altas e carrega consigo o CE que ficou acumulado na fase de vapor no processo de retirada da fração anterior (RIACHI et al., 2014). Como o processo de destilação contínuo não realiza a separação das frações apresenta maior teor de CE nos produtos (LELIS et al., 2014; RIACHI et al., 2014).

Uma possibilidade para redução do teor de CE é através do uso de re-destilação ou bidestilação. Esta é realizada em duas etapas: a primeira consiste na destilação única da matéria-prima, obtendo-se um único destilado, em seguida esse destilado é diluído até atingir teor alcoólico de 28% e novamente submetido a destilação, até obtenção de um destilado com teor alcoólico entre 38 e 54% (DE ALMEIDA LIMA et al., 2012).

Estudos desenvolvidos por GALINARO; FRANCO, 2011 apresentam resultados que demonstram a viabilidade do uso da bidestilação para redução do teor de CE em amostras de aguardente de cana. Os autores realizaram a bidestilação de 14 amostras obtidas comercialmente e relatam a redução média de 92,5% do teor de CE. Resultados semelhantes foram obtidos por ALCARDE; SOUZA; BORTOLETTO, 2012 que observaram a redução média de 97% do teor de CE em aguardente de cana utilizando o mesmo processo. No entanto, autores como DE ALMEIDA LIMA et al., 2012 e BRUNO et al., 2007 ressaltam que a bidestilação é desnecessária quando o processo de destilação é realizado com cautela utilizando baixas velocidades, baixas temperaturas ($< 80^{\circ}\text{C}$), baixas vazões e altas taxas de refluxo e que o uso de bidestilação geralmente leva a perdas no rendimento e no aroma do etanol.

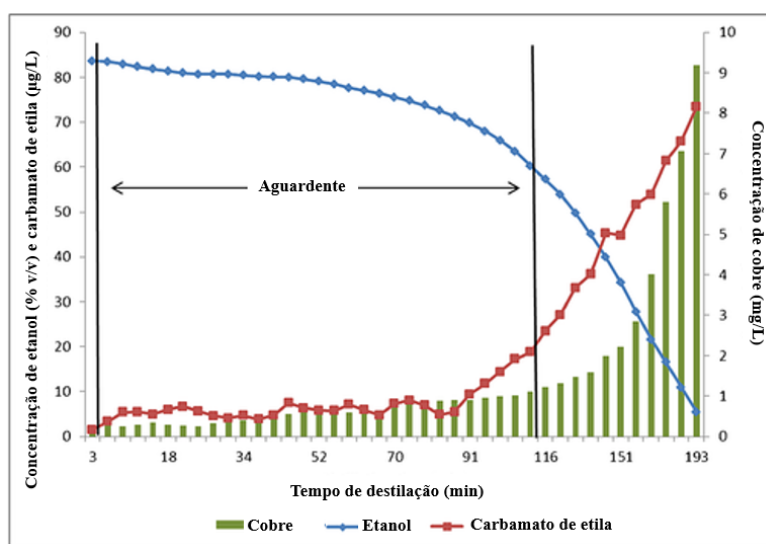
2.4.2. Presença de cobre

Em 2007 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a utilização de cobre em instalações de produção de alimentos. No entanto, quando se refere a indústria de cachaças é usual a presença de cobre nos condensadores dos alambiques e no caso de processos contínuos o cobre é utilizado na seção ascendente para a remoção de moléculas produtoras de sabor como o sulfeto de dimetila, que na presença de cobre é convertido a um sulfato sem sabor (BRASIL, 2007; RIACHI et al., 2014).

As peças de cobre são mais suscetíveis a ação de vapores ácidos que podem promover a corrosão e a liberação do metal na bebida. Sabe-se que o cobre age como catalisador na formação de CE em destilados, como demonstra o estudo realizado por ALCARDE; SOUZA;

BORTOLETTO, 2012, o qual verificou a formação de CE em aguardente de cana ao longo do processo de bidestilação. Eles correlacionaram os níveis de CE com os níveis de cobre e álcool, e obtiveram o gráfico da Figura 7, onde é notável que o aumento do teor de CE ocorre simultaneamente ao aumento do teor de cobre e a diminuição do teor alcoólico, o que corrobora com os estudos de BRUNO et al., 2007 que afirmam que o teor de cobre influencia diretamente na formação de CE em bebidas recém destiladas. O autor conclui ainda que a presença de 8 mg L^{-1} de cobre na fração destilada é suficiente para formação de todo o carbamato de etila e que níveis mais altos de cobre não promovem efeito catalítico adicional.

Figura 7 – Curvas de concentração de etanol, carbamato de etila e cobre na fração destilada da segunda destilação durante a produção de uma aguardente de cana-de-açúcar bidestilada



Fonte: Alcarde et al., (2012).

Com a finalidade de impedir a formação catalítica de CE pela presença de cobre, a possibilidade de substituição dos condensadores de cobre por aço inoxidável já foi avaliada. Entretanto, essa substituição compromete o aroma característico e promove o aumento dos níveis de compostos sulfurados que influenciam negativamente no sabor da cachaça. Assim essa substituição se tornou uma prática incomum (GALINARO; FRANCO, 2011; LIMA et al., 2009).

2.4.3. Presença de luz durante o armazenamento

A luz é um agente iniciador da auto-oxidação do cianeto à cianato que por sua vez promove a formação de CE. Autores como ZACARONI et al., 2015 avaliaram a influência da

luz na formação de CE durante o armazenamento de cachaças. Para tal, foram avaliadas 10 amostras de cachaças comerciais e observou-se um aumento na concentração de CE em 70% das amostras. No entanto, autores como ANDRADE-SOBRINHO et al., 2009 e GALINARO; FRANCO, 2011 não observaram variação significativa no teor de CE em aguardente de cana sob influência de luz, e sugerem estabilidade no teor de CE quanto a este parâmetro.

2.5 Técnicas de preparo de amostras contendo CE

Normalmente o CE apresenta baixos níveis de concentração em alimentos. Assim, para que sua quantificação seja realizada se faz necessária a utilização de técnicas sensíveis e etapas específicas no preparo da amostra. Essas variam de acordo com a composição da amostra e a técnica a ser utilizada para a quantificação.

As técnicas de extração são amplamente empregadas no preparo das amostras, pois elas evitam interferentes e podem concentrar o analito. As técnicas mais utilizadas são: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS) e microextração em fase sólida (MEFS), sendo relatado também o uso de extração líquida pressurizada, microextração em fase sólida headspace (MEFS-HD), microextração avançada de emulsificação assistida por ultrassom e microextração eficiente por adsorvente embalado (GOWD et al., 2018; UBEDA et al., 2012). Na tabela a seguir constam alguns limites de quantificação obtidos com o auxílio de diferentes métodos de preparo de amostras para a quantificação de CE.

Tabela 1 – Uso de diferentes métodos de preparo de amostras para a quantificação de CE em matrizes alimentícias e respectivos limites de quantificação e técnicas de quantificação utilizadas.

Matriz alimentícia	Preparo de amostra	Técnica de quantificação	Limite de quantificação	Autor
Alimentos fermentados	Derivatização e ELL	CG-EM	0,03-0,1 ppb	SHIN; YANG, 2012.
Vinhos	Extração do álcool seguida de EFS	CG-EM	1,0 ppb	JAGERDEO et al., 2002.
Conhaque	EFS de fase reversa	CLAE-FN-APCI-EM/EM	2,1 ppb	ALBERTS; STANDER; DE VILLIERS, 2011.
Vinho de arroz chinês	HD-MEFS	CG-EM	3,96 ppb	LIU; XU; ZHAO, 2012.
Vinho	<i>Extrelut</i> -MEFS	CG-EM	1,2 ppb	NÓBREGA et al., 2015.
Cachaça	QuEChERS	CLAE-EM/EM	Não mencionado	GUERREIRO et al., 2018

Fonte: Autora, 2019.

A ELL é baseada na partição entre a fase orgânica e a fase aquosa. Ela consiste na adição de um solvente de extração às amostras. Em seguida, a mistura é agitada para promover a transferência de massas e então as fases são separadas e a fração de interesse é concentrada por evaporação. Trata-se de uma técnica de fácil operação e de ampla aplicabilidade. Devem ser utilizados solventes de polaridades semelhantes ao analito. No caso do CE são utilizados clorofórmio, diclorometano e éter dietílico (XIA et al., 2018). A utilização de ELL oferece desvantagens consideráveis: requer tempo, elevadas quantidades de solvente orgânico e apresenta baixa reprodutibilidade (GOWD et al., 2018; YE et al., 2011). Seu uso para o tratamento de amostras de CE possibilita a quantificação deste analito com limite de quantificação superior a 10 ppb a depender da matriz analisada, podendo ser utilizadas variações no método como o uso de derivatizantes, como 9-xantidrol, obtendo-se limite de quantificação de 0,03 – 0,1 ppb em amostras de alimentos fermentados (SHIN; YANG, 2012).

Um método alternativo a ELL é o uso de EFS que necessita de menor uso de solventes, apresenta maior sensibilidade e seletividade. Nesta técnica a amostra aquosa passa por uma fase sólida de maior afinidade pelo analito e em seguida é extraída por solventes orgânicos (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012). Ao analisar CE em amostras de vinho JAGERDEO e colaboradores, 2002, realizaram inicialmente a extração do álcool à vácuo. Em seguida utilizaram EFS para extrair o CE da matriz. Logo após o retirou do cartucho com um solvente e o quantificou via Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

obtendo limite de quantificação de 1 ppb. ALBERTS e colaboradores, 2011 analisaram amostras de vinho e conhaque sul-africanos utilizando EFS de fase reversa no preparo das amostras para análise através de cromatografia líquida de fase normal com ionização química a pressão atmosférica acoplada a espectrômetro de massa operando no modo *tandem* (CLAE-FN-APCI-EM/EM) e obteve limite de quantificação de 0,83 ppb para vinhos (teor alcoólico menor que 15%) e 2,1 ppb para conhaque (teor alcoólico menor que 45%).

O uso de EFS ainda apresenta desvantagens como interferências da matriz, alto custo e descarte de cartucho após cada extração. Estes podem ser contornados com o uso de MEFS. Essa técnica utiliza pequenas quantidades de amostra e une em única etapa extração, concentração e injeção cromatográfica (JIAO; DONG; CHEN, 2014). O uso de MEFS em amostras como a cachaça, que apresenta elevado teor alcoólico, exige cuidados com a fase sólida, para evitar competição entre o etanol e CE nas microfibras poliméricas, ocasionando menores rendimentos de CE (REACHI, 2014). Para determinação de CE, o mais comum é a utilização de HD-MEFS, a qual já foi utilizada para a extração de CE em amostras de vinho de arroz. Essa técnica não utiliza solventes, oferece linearidade e reprodutibilidade, mas tem alto custo (GOWD et al., 2018; LIU; XU; ZHAO, 2012). Uma alternativa é a extração da amostra em *Extrelut*® que consiste na utilização de terras de diatomáceas como fase sólida quimicamente inerte, de poros largos e alta pureza, sendo relatada a utilização no preparo de amostras para determinação de CE em vinhos brasileiros (NÓBREGA et al., 2015).

No caso de cachaças adoçadas, a sacarose pode contaminar a coluna cromatográfica, comprometendo a precisão dos resultados e necessitando de maior manutenção dos equipamentos, encarecendo o processo. GUERREIRO et al., 2018 propõe a utilização da técnica QuEChERS (rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura) no preparo de amostras para resolução dessa problemática. A técnica é realizada em duas etapas: inicialmente ocorre uma extração via precipitação induzida por sal, seguida de uma extração em fase sólida utilizando diferentes tipos de sais ou aminas responsáveis pela remoção de interferentes promovendo a limpeza da amostra. Essa técnica já foi utilizada na quantificação de CE em amostras de cachaça (GUERREIRO et al., 2018).

2.6 Técnicas para quantificação de CE

A quantificação de CE em alimentos é relatada há décadas. No entanto, a busca por métodos mais eficientes, de menor custo e maior praticidade é constante, sendo relatada a utilização de métodos cromatográficos, espectrométricos, eletroquímicos e imunoenaios (GOWD et al., 2018; RIACHI et al., 2014; XIA et al., 2018). Na tabela a seguir são mostrados alguns limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos por diferentes técnicas de extração e quantificação utilizadas para determinação de CE em diferentes matrizes alimentícias.

Tabela 2 – Uso de diferentes métodos para a quantificação de CE em matrizes alimentícias e respectivos limites de detecção e quantificação.

Matriz alimentícia	Técnica de separação	Técnica de quantificação	LD (ppb)	LQ (ppb)	Autor
Cachaças	CLAE	Fluorescência	2,48	8,26 ppb	MENDONÇA et al., 2016
Cachaças	CG	EM	1,6	5,1 ppb	BORTOLETTO; ALCARDE, 2016
Vinho de arroz chinês	Cascata enzimática	Espectrofotometria	0,823	-	LU; ZHOU; TIAN, 2015
Vinho de arroz chinês		ELISA	14,8	-	LUO et al., 2017
Vinho de arroz chinês (simulação)	Cascata enzimática	Cronoamperometria	0,472	-	ZHANG et al., 2017

Fonte: Autora, 2019.

O método mais utilizado para a quantificação de CE em matrizes alimentícias é a cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrômetro de massa (EM) com monitoramento iônico selecionado (SIM). Trata-se da técnica oficialmente recomendada pelo MAPA para a quantificação de CE em bebidas destiladas de cana-de-açúcar no Brasil. O mesmo órgão diz que o limite de quantificação dessa técnica é de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005; HUANG et al., 2013). A CG-EM também é a técnica indicada aos Estados-Membros da União Europeia para determinação do teor de CE em bebidas alcoólicas, sendo recomendada a adição de carbamato de propila como padrão interno obtendo-se limite de quantificação na faixa de 3 a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2005).

A CG permite a separação do analito dos demais componentes da amostra através da passagem do analito em fase gasosa + gás de arraste (fase móvel) por uma outra fase estacionária. Essa técnica permite a escolha de diversos sistemas de detecção, já tendo sido relatada para a detecção e quantificação do CE o uso dos detectores de: ionização em chama, seletivo de nitrogênio/fósforo, condutividade térmica, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massa triplo quadrupolo e luminescência (RIACHI et al., 2014; XIA et al., 2018). O uso de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência é relatado como método alternativo para a quantificação de CE alcançando resultados semelhantes aos encontrados com o uso de CG-EM, sendo necessária a derivatização com 9-xantidrol em meio ácido para a formação do carbamato de etil xantil (CEX) (MENDONÇA et al., 2016; RIACHI et al., 2014).

A utilização de métodos cromatográficos exige realização do preparo de amostras, mão-de-obra qualificada e não são indicados para análise de um grande número de amostras. Um método alternativo é a utilização de sistemas enzimáticos, como o trabalho desenvolvido por ZHANG et al., 2017 ao utilizar as enzimas glutamato desidrogenase e uretanase, sendo a última mediadora da cascata enzimática, para determinação de CE em amostras de vinho de arroz chinês. O sistema é baseado na decomposição de CE pela uretanase com produção de amônia. A amônia juntamente ao α -cetoglutarado (co-substrato) atua na formação de glutamato mediada pela enzima glutamato desidrogenase. Durante a reação o cofator reduzido dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) é oxidado a NAD^+ , NADH pode ser rastreado via absorção UV-visível sendo utilizado para determinação quantitativa de CE (ZHANG et al., 2017).

Outro método desenvolvido a partir da cascata das enzimas glutamato desidrogenase e uretanase foi proposto por ZHANG et al., 2017 que desenvolveu um biossensor através do aprisionamento das enzimas em sol-gel de quitosana, gelatina e γ -glicidoxipropiltrimetoxisilano na superfície de eletrodo de grafite pirolítico e determinou CE em amostras modelo de vinho de arroz chinês através de cronoamperometria detectando variações na concentração de NADH. Ambos os métodos enzimáticos oferecem sensibilidade, precisão, rápida resposta e são influenciados pela concentração das enzimas, a presença de co-substrato α -cetoglutarado e pelo pH do meio. Sendo o principal desafio a comercialização das enzimas comprometendo a difusão do método.

Outros métodos espectroscópicos incluem a utilização de espectroscopia de RAMAN integrada ao uso de polímeros molecularmente impressos e nanoestruturas de dendrito de prata como substrato ativo, oferecendo sensibilidade na determinação de CE. O método foi desenvolvido por WU et al., 2016 e o uso de espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier através do método desenvolvido por MANLEY; VAN ZYL; WOLF, 2001 que relaciona o teor de CE ao açúcar presente na amostra, no entanto, foi encontrada fraca correlação entre os valores reais e estimados ($R = 0,47$) comprometendo a exatidão do método.

A utilização de imunoenaios também constitui alternativa ao uso da cromatografia, LUO et al., 2017 desenvolveu um método baseado em ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto competitivo para a análise de CE em amostras de vinho de arroz chinês, o qual se baseia na utilização de um anticorpo policlonal que reconhece o produto da derivatização entre CE e 9-xantidrol. O método oferece seletividade e baixo custo, no entanto, o elevado limite de detecção (14,8 ppb) obtido constitui barreira para o controle de qualidade de outros produtos destilados.

2.7 Sensores eletroquímicos

A eletroquímica trata dos fenômenos e reações químicas que envolvem a transferência de elétrons sob influência de um gradiente de potencial, podendo ocorrer de forma homogênea, em solução, ou heterogênea, na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada de solução adjacente a esta superfície (BRETT; BRETT, 1996; SILVA, 2018). Os métodos eletroquímicos fazem uso da medida de uma propriedade elétrica e o eletrodo de trabalho pode atuar como doador ou receptor de elétrons (COSTA, 2016).

Os métodos eletroquímicos tem atraído a atenção de muitos analistas, pois agregam vantagens como alta sensibilidade, uso de operações simples, baixo custo, rapidez, possibilidade de automação e miniaturização, dentre os métodos eletroquímicos o desenvolvimento de sensores tem se destacado devido a vantagens como: a capacidade de operar em matrizes complexas, seletividade, estabilidade e biocompatibilidade (BEZERRA, 2014; SILVA, 2018; XU et al., 2019).

Os sensores eletroquímicos são formados por um elemento transdutor de sinal, recoberto por uma camada de um elemento de reconhecimento, esta é capaz de converter alterações de

natureza redox no analito de interesse, de modo direto ou indireto, em um sinal quantificável, passível de ser processado e amplificado (COSTA, 2016; JÚNIOR, 2016). Dentre as técnicas utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos destacam-se: a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD) (JÚNIOR, 2016).

A VC utiliza varredura reversa de potencial (E), onde E é aplicado ao eletrodo a uma velocidade constante, ao atingir o E final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial. Esta técnica é amplamente utilizada para adquirir de forma rápida, informações qualitativas sobre os processos envolvidos, as reações de transferência de elétrons, termodinâmica e cinética, possibilita também investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas e auxiliar na elucidação de mecanismos eletrodicos(BARD et al., 2001; SILVA, 2018; SKOOG, WEST, HOLLER, 2014).

A VPD é uma técnica utilizada em medidas analíticas de alta sensibilidade, se baseia na aplicação de pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de E crescente. O voltamograma resultante consiste em picos de corrente de forma gaussiana, cujas áreas são diretamente proporcionais à concentração do analito, estes picos são obtidos através da subtração entre o valor de corrente medida antes da aplicação do pulso e ao final, em função do E aplicado(BARD et al., 2001; SILVA, 2018; SKOOG, WEST, HOLLER, 2014).

Diante das vantagens apresentadas pelo uso de sensores eletroquímicos, da importância da determinação do teor de CE em amostras alimentícias, das desvantagens das técnicas atualmente utilizadas para determinação deste analito, se faz necessário o desenvolvimento de um método rápido, barato, eficiente, portátil e de fácil manipulação, sendo a proposta deste trabalho o desenvolvimento de um sensor eletroquímico que atenda a essas necessidades.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivos geral

Desenvolvimento de sensor eletroquímico para quantificação de carbamato de etila em cachaças comerciais.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar estudo do CE com agentes derivatizantes que possibilitem sua determinação através de métodos eletroquímicos;
- Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas envolvidas no desenvolvimento do sensor;
- Determinar a faixa linear do método desenvolvido;
- Otimizar parâmetros analíticos para obtenção de limite de detecção e quantificação dentro do exigido na legislação;
- Verificar a estabilidade e reprodutibilidade do sensor desenvolvido;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes de grau analítico foram adquiridos de seus respectivos fornecedores e utilizados (Tabela 3).

Tabela 3 – Reagentes utilizados e seus respectivos fornecedores.

Reagente	Fornecedor	Teor de Pureza
9-xantidrol (C ₁₃ H ₁₀ O)	Sigma-Aldrich	98%
Acetato de sódio (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Êxodo científica	99,0 – 101,0%
Ácido acético (CH ₃ COOH)	Acros Organics	99,0%
Ácido clorídrico (HCl)	Dinâmica	36,5 – 38,0%
Ácido nítrico (HNO ₃)	Vetec	65%
Carbamato de etila (C ₃ H ₇ NO ₂)	Sigma-Aldrich	99%
Carvão vegetal	Vetec	91,85%
Cloreto de potássio (KCl)	J. T. Baker	99%
Dimetilformamida (C ₃ H ₇ NO)	Dinâmica	99%
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Panreac	99,8%
Hidroquinona (C ₆ H ₆ O ₂)	Vetec	99%
Ferrocianeto de potássio (C ₆ N ₆ FeK ₃)	Êxodo científica	98,5 – 102,0%
Metanol (CH ₃ OH)	Dinâmica	99,8%
Nanotubo de carbono de paredes múltiplas	Sigma-Aldrich	>95%
Nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com grupo amida	Sigma-Aldrich	>95%
Nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com grupo carboxila	Sigma-Aldrich	>95%

Fonte: Autora, 2019.

Foram preparadas soluções estoque de 9-xantidrol (XT) 1,00 mM e hidroquinona (HQ) 1,00 mM usando etanol. As dispersões dos nanotubos de carbono foram realizadas como descrito abaixo. As demais soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida através do sistema Milli-Q Millipore e os valores de pH da solução tampão de acetato de sódio foram ajustados utilizando pHmetro modelo Quimis Q400A.

4.1.1 Preparo da amostra

Uma amostra de cachaça (39% de etanol v/v) foi obtida comercialmente em supermercado local. Para análise da mesma, foi preparada uma solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando a cachaça como solvente.

4. 2 Derivatização

Devido à ausência de grupamentos eletroativos do CE, faz-se necessário o uso de agentes derivatizantes para a identificação indireta do analito. Para tanto, foram avaliados dois agentes derivatizantes: o XT e a HQ.

4. 3 Estudos de espectroscopia no UV/visível do 9-Xanditrol:

Os estudos espectroscópicos foram realizados no UV-visível HP 8453 (G1103A) da Agilent® no modo de varredura com comprimento de onda de 190 a 400 nm. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com capacidade para 3 mL. Avaliou-se a influência e estabilidade de XT ($2,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) quanto a presença e ausência de luz, oxigênio e CE ($4,68 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

4. 4 Estudos de espectroscopia de fluorescência do 9-Xantidrol

Os experimentos de fluorescência foram realizados em espectrofotômetro RF-5301PC (Shimadzu, Japão). Os espectros seguiram os parâmetros de leitura de emissão na faixa de 240 a 700 nm, $\lambda_{\text{ex.}} = 234 \text{ nm}$, com fenda de excitação de 15 mm e emissão de 10 mm. Utilizou-se XT $2,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e CE $4,68 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações de solução de HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mol L}^{-1}$), as leituras foram efetuadas com diferentes tempos de reação, sendo o tempo máximo de análise de 2 h.

4. 5 Estudos de espectroscopia de infravermelho FTIR

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), IRPrestige (SHIMADZU, 02239), com o uso do acessório para sólidos, ATR. O software utilizado no tratamento dos dados foi o

Shimadzu IR Solution 1.50. Foram avaliados CE, XT, CEX e o solvente éter etílico utilizado na extração de CEX.

4.6 Estudos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos selecionados nesse estudo foram a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD). As medidas foram realizadas à temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, e os gráficos processados foram tratados utilizando o programa Origin 8.0. A eliminação do oxigênio dissolvido foi realizada pela purga de N_2 durante 10 min antes das análises. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab® em um sistema constituído por três eletrodos conforme a Figura 8.

Figura 8 – Representação esquemática de cela eletroquímica de três eletrodos.



Fonte: Autora, 2019.

Foram avaliados diferentes eletrodos de trabalho: eletrodo de carbono vítreo – CV (BAS, diâmetro 3,0 mm), diversos tipos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTC) imobilizados em CV e pasta de carbono com agente derivatizante, como resume a Tabela 4; como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina espiralado e como eletrodo de referência utilizou-se sistema $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ (saturado) da BAS.

Tabela 4 – Eletrodos e siglas utilizadas para eletrodos de trabalho

Eletrodo de trabalho	Sigla
Eletrodo de carbono vítreo	CV
CV modificado com NTC	CVNTC
CV modificado com NTC tratado	CVNTCTT
CV modificado com NTC aminado	CVNTCNH ₂
CV modificado com NTC carboxilado	CVNTCCOOH
Pasta de carbono contendo 10% XT (m/m) em suporte de polietileno	PXT1
Pasta de carbono contendo 10% XT (m/m) em suporte da BAS	PXT2

Fonte: Autora, 2019.

4. 6. 1 Tratamento do NTC

O uso de NTC em sensores eletroquímicos agrega funções como alta área superficial, sensibilidade e boa estabilidade. Com o intuito de obter NTC mais homogêneo, foi realizado tratamento ácido afim introduzir funções oxigenadas na superfície e de remover compostos metálicos ou nanopartículas derivadas de catalisadores no crescimento dos nanotubos (SILVA, 2017).

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram pesados 10 mg de NTC, em seguida adicionou-se 4 mL de ácido nítrico concentrado (SILVA, 2017). O sistema foi aquecido à 140 – 150°C e permaneceu em refluxo durante 4 horas (SILVA, 2017). Em seguida, o material foi resfriado até temperatura ambiente, sendo transferido para eppendorfs e centrifugado. O sobrenadante foi retirado e realizou-se adições sucessivas de água deionizada obtida através de sistema Milli-Q Millipore, o pH foi verificado com auxílio de fita indicadora de pH até obtenção de pH 7 (SILVA, 2017). O sobrenadante foi retirado, em seguida se adicionou etanol absoluto, por fim o material foi submetido a secagem através de dissecador sob vácuo.

4. 6. 2 Procedimento de limpeza do eletrodo de carbono vítreo

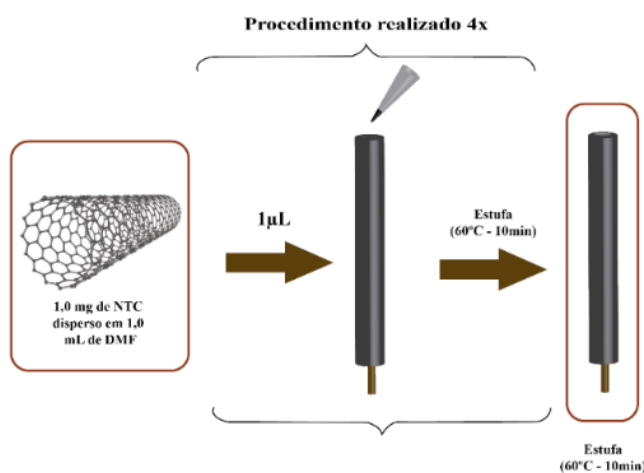
A limpeza de CV foi realizada através de uma etapa mecânica, onde a superfície do eletrodo foi polida em suspensão de alumina (0,3 µm) com auxílio de um tecido de veludo até que esta apresentasse um aspecto espelhado. Em seguida o eletrodo foi lavado com água deionizada, submetido a agitação em ultrassom durante 30 s em etanol absoluto e novamente lavado com água deionizada.

O perfil de limpeza do eletrodo foi avaliado através de uma etapa eletroquímica pela técnica de VC. Foi realizada uma varredura na faixa de potencial de 0,6 a – 0,3V de forma reversível, em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada e secado a temperatura ambiente.

4. 6. 3 Modificação do eletrodo de CV com NTC

A suspensão de NTC foi preparada a partir da pesagem de 1 mg de NTC em eppendorf e adição de 1,0 mL de dimetilformamida (DMF) (SILVA, 2017). Esta mistura foi submetida a agitação em ultrassom por 2 h para melhor dispersão (SILVA, 2017). Este procedimento foi repetido utilizando as variações de NTC citadas na Tabela 4. A modificação do eletrodo se deu a partir da adição de uma alíquota de $1\mu\text{L}$ dessa suspensão à superfície do eletrodo de CV previamente limpo. Para evaporação do DMF, o eletrodo permaneceu em estufa a 60°C durante 10 min (SILVA, 2017). Esse procedimento foi repetido 4 vezes, totalizando $4 \mu\text{L}$ de dispersão na superfície do eletrodo, com cuidado e atenção para que toda a superfície do CV esteja recoberta, conforme esquematizado na Figura 9.

Figura 9 – Representação esquemática da modificação do eletrodo de carbono vítreo com NTC



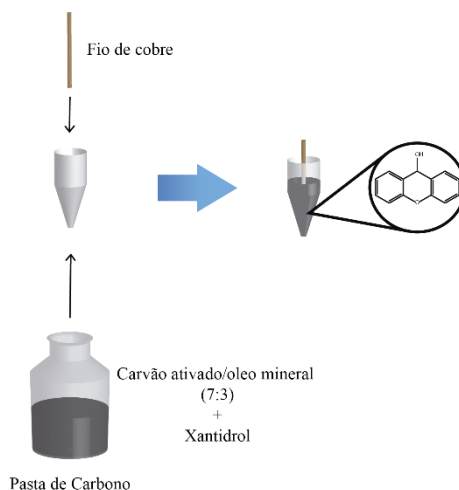
Fonte: Autora, 2019.

4. 6. 4 Eletrodo de pasta de carbono

Para o preparo da pasta de carbono utilizou-se carvão previamente ativado em estufa a 60°C e óleo mineral Nujol® na respectiva proporção 7:3 (m/m) (DE ANDRADE LIMA et al., 2009). A mistura foi homogeneizada e em seguida adicionou-se 10% de XT (m/m). A pasta

contendo o agente derivatizante foi adicionada a um suporte de polietileno, constituindo o corpo do eletrodo. O contato elétrico utilizado foi um fio de cobre. A ponta do eletrodo foi friccionada em papel manteiga para obter uma superfície uniforme. Após cada leitura, a superfície do eletrodo foi renovada usando o mesmo procedimento. Na Figura 10 consta uma representação esquemática da elaboração do eletrodo PXT1.

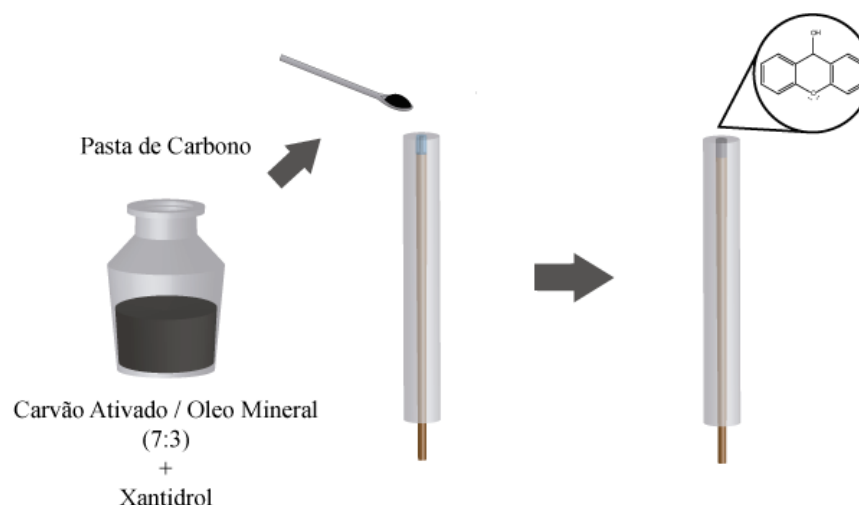
Figura 10 – Representação esquemática da elaboração do eletrodo PXT1



Fonte: Autora, 2019.

Para elaboração do eletrodo PXT2 se utilizou a mesma pasta utilizada para o eletrodo PXT1, no entanto, utilizou-se um suporte semelhante ao de um eletrodo de CV (BAS), mas com cavidade oca. Esta foi preenchida com pasta modificada, prensada e lixada em papel manteiga para obtenção de superfície lisa e uniforme, conforme a Figura 11. Após cada leitura a pasta foi retirada, a cavidade do eletrodo foi limpa com água deionizada, seca com papel toalha e novamente preenchida com pasta.

Figura 11 – Representação esquemática da elaboração do eletrodo PXT2



Fonte: Autora, 2019.

4. 6. 5 Eletrólise

A eletrólise foi realizada em uma cela dividida, com os eletrodos de trabalho e auxiliar separados por membrana. O eletrodo de trabalho utilizado foi feltro de carbono (2,0 cm x 1,0 cm x 0,5 cm), platina como eletrodo auxiliar e o sistema Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado) da BAS, como eletrodo de referência. O procedimento foi realizado aplicando o potencial de -0,3 V durante 3600 s, em uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ com 3,70% de etanol, contendo XT 4,80 mM, o etanol é necessário para melhorar a solubilidade de XT. Todo o procedimento foi acompanhado por VC utilizando eletrodo de trabalho de CV, fio de platina como eletrodo auxiliar e o sistema Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado) como eletrodo de referência. Ao final da análise, os produtos foram extraídos via líquido-líquido utilizando éter etílico como solvente. A fase orgânica foi separada, seca e analisada via FTIR e CG-EM. O mesmo procedimento foi realizado utilizando XT 4,75 mM e CE 5,70mM.

4.7 Análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

A análise foi realizada em um cromatógrafo a gás, acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu, modelo GCMS-QP2010CN Ultra, software GCMS Solution, equipado com injetor split/splitless aquecido a 250°C, coluna cromatográfica capilar do tipo DB-1 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA, NS US13555931H), com fase estacionária composta de 100%

dimetilpolissiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de filme. A programação de temperatura iniciou a 90°C sendo elevada para 120°C a 5°C/min, permanecendo por 1 minuto, seguido de aquecimento até 170 °C a 25°C/min onde permaneceu por 15 minutos. Finalizou-se elevando-se a temperatura até 300°C a 55°C/min. A temperatura da câmara de ionização e da interface entre CG/EM foram 250°C e 280°C, respectivamente. Gás hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,39 mL/min (100 kPa) e utilizado o modo Split com divisão de 5. Foi preparada uma solução de 1mg L⁻¹ do produto em hexano grau HPLC e 1 µL injetado no cromatógrafo. O espectrômetro de massas operou a 70 eV no modo SCAN (Full Scan), no modo SIM (single ion monitoring) foram selecionados os íons 181.10, 182.15, 152.00, 76.10, 151.20, 91.05, 183.10, 153.15, 77.05, 51.10. Para a comparação dos espectros de massas foi utilizada a biblioteca Wiley 11ª edição.

4.8 Limite de detecção e quantificação

Para a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) foram utilizadas as Equações 9 e 10, a seguir:

$$LD = \frac{3 \times S_b}{b} \quad \text{Equação 9}$$

$$LQ = \frac{10 \times S_b}{b} \quad \text{Equação 10}$$

Onde: S_b é o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas por 10 voltamogramas de brancos no mesmo potencial do pico voltamétrico do composto e b é o coeficiente angular da curva analítica (SKOOG, WEST, HOLLER, 2014).

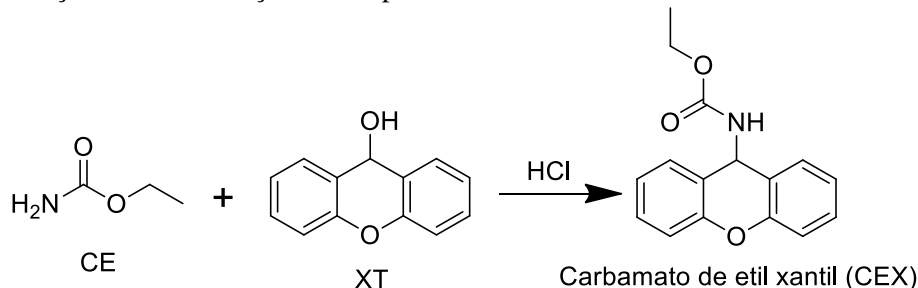
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CE não apresenta sinal eletroquímico, sendo assim se faz necessária sua derivatização com um composto ativo. Para desempenhar tal função foi escolhido o 9-xantidrol (XT), um derivatizante clássico para determinação de CE para os métodos cromatográficos. Para realizar a quantificação via eletroquímica de CE pode-se verificar se o composto derivatizado apresenta um sinal eletroquímico diferente do derivatizante, proporcionando assim uma detecção direta e, caso o composto derivatizado não apresente sinal, avaliar uma possível detecção indireta baseada no consumo de derivatizante. Definido isso, deu-se início ao estudo do sistema. A Hidroquinona (HQ) foi avaliada como agente derivatizante alternativo.

5.1 O 9-Xantidrol e avaliação eletroquímica

O XT é um composto de fórmula $C_{13}H_{10}O_2$, amplamente utilizado como agente derivatizante na determinação de amidas por métodos cromatográficos. A derivatização de CE por XT ocorre em meio ácido (Figura 12), sendo necessária a protonação de XT para que ocorra a substituição nucleofílica, onde o grupo amida é o nucleófilo, obtendo-se o carbamato de etil xantil (CEX) (MARIA et al., 2010). Dada a especificidade de XT a amidas como CE, o mesmo foi avaliado como agente derivatizante neste trabalho.

Figura 12 – Reação de derivatização de CE por XT em meio ácido.



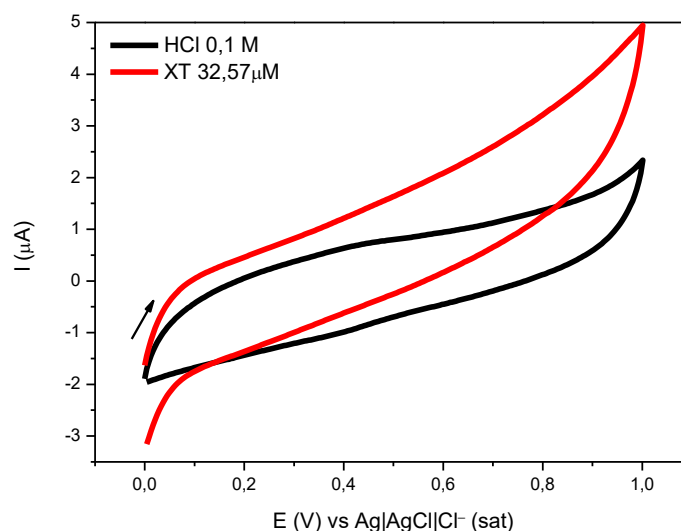
Fonte: a) P. HERBERT, L. SANTOS, M. BASTOS, P. BARROS, 2002.

5.1.1 Estudo de mecanismo

A análise do comportamento eletroquímico do XT ($32,57 \mu M$) foi realizada utilizando eletrodo CV em solução de HCl 0,1 M (branco analítico). A técnica utilizada foi VC em diferentes faixas de potencial. As análises foram realizadas na seguinte ordem: inicialmente foi realizada varredura na faixa de oxidação e devido à limitação do meio ácido e/ou ao limite da

janela de potencial de CV a faixa avaliada foi de 0 a 1,0 V (Figura 13). Nesta análise não se observou sinal de oxidação, no entanto, ao comparar o perfil do branco com o voltamograma do XT observa-se aumento de corrente, o que sugere a presença de sinal em potencial superior ao analisado.

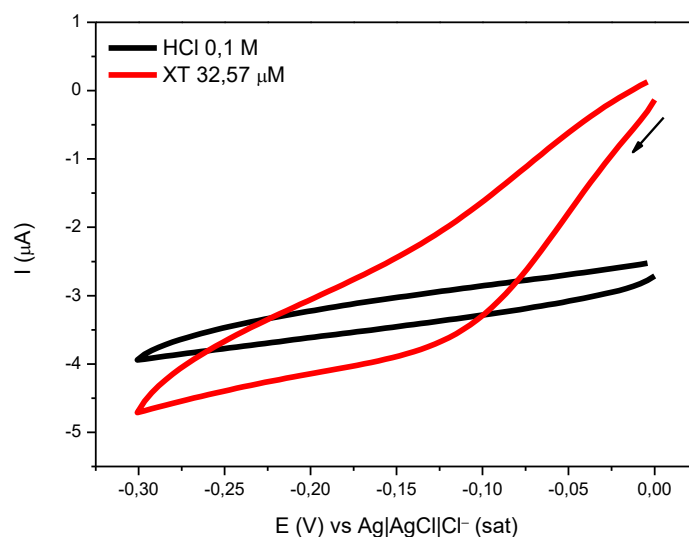
Figura 13 – Voltamogramas obtidos através de varreduras da solução de XT (32,57 μ M) na faixa de oxidação (0 a 1,0 V), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).



Fonte: Autora, 2019.

Em seguida, foi analisada a região de redução de 0 a $-0,30 \text{ V}$ (Figura 14). Nesta região observou-se a presença de um sinal irreversível em torno de $-0,1 \text{ V vs Ag|AgCl|Cl}^-$ (sat.). SALAH; MHALLA, (2000) ao investigar o comportamento eletroquímico do XT em acetonitrila utilizando platina como eletrodo de trabalho, relataram a presença de picos anódicos irreversíveis nos potenciais 1,27 e 1,84 V vs Ag| $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ | Ag^+ , atribuídos a oxidação de XT à xantona. O mesmo autor observou também a presença de pico catódico irreversível em $-0,2 \text{ V vs Ag| } 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ | Ag^+ . O sistema proposto não apresentou picos anódicos devido ao meio ácido que limita a janela de potencial do CV a 1,0 V vs Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.). A utilização do meio ácido faz-se necessária para o desenvolvimento da reação de derivatização, conforme reação da Figura 12. O sinal catódico do sistema proposto mostrou-se em potencial diferente do apresentado na literatura. Este deslocamento pode ser atribuído a três fatores: primeiro ao meio prótico, pois os prótons podem favorecer a redução; à utilização de diferentes eletrodos de referência; e/ou à utilização de diferentes eletrodos de trabalho.

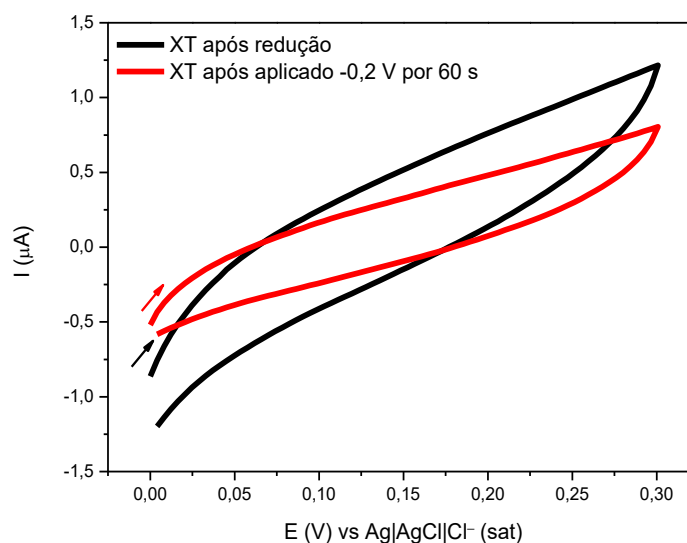
Figura 14 – Voltamogramas obtidos através de varreduras da solução de XT ($32,57\mu\text{M}$) na faixa de redução (0 a $-0,30\text{ V}$), $v = 0,050\text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M)



Fonte: Autora, 2019.

Visto isso, foi decidido avaliar se o produto formado pela redução do XT seria passível de oxidação. Para isso, o sistema foi novamente avaliado na região de oxidação (0 a $1,0\text{ V}$), onde viu-se que na janela de potencial deste sistema o produto de redução não apresenta nenhum produto de oxidação, sugerindo que o sistema é realmente irreversível. Para ter a confirmação que o produto reduzido não apresenta sinal, foi aplicado o potencial de redução ($-0,2\text{ V}$) por 60 s para garantir a formação de uma quantidade considerável do produto reduzido, seguida de leitura na região de oxidação. No gráfico (Figura 15) fica claro que o composto reduzido não apresenta sinal de oxidação nessa faixa de potencial.

Figura 15 – Voltamogramas da faixa de oxidação após leitura em redução e após aplicado potencial de -0,2V por 60 s, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).



Fonte: Autora, 2019.

Para avaliação do produto formado (XT_{red}) foi realizada eletrólise de XT em solução de HCl (0,1 M). O procedimento foi realizado em potencial controlado de $-0,3 \text{ V}$ para garantir a redução em grande escala de todo o XT adicionado, com o tempo total fixado em 3600 s. Considerando que o tempo de 3600 s seja suficiente para atingir a exaustão do sistema, é possível calcular o valor da corrente residual (I_{res}), o número de elétrons envolvidos no processo (n) e a carga envolvida no processo (Q), a partir das equações 11, 12 e 13 a seguir.

$$I_{\text{res}} = \frac{Q_{\text{res}}}{t} \quad \text{Equação 11}$$

$$n = \frac{Q_{\text{liq}} \times M}{m \times F} \quad \text{Equação 12}$$

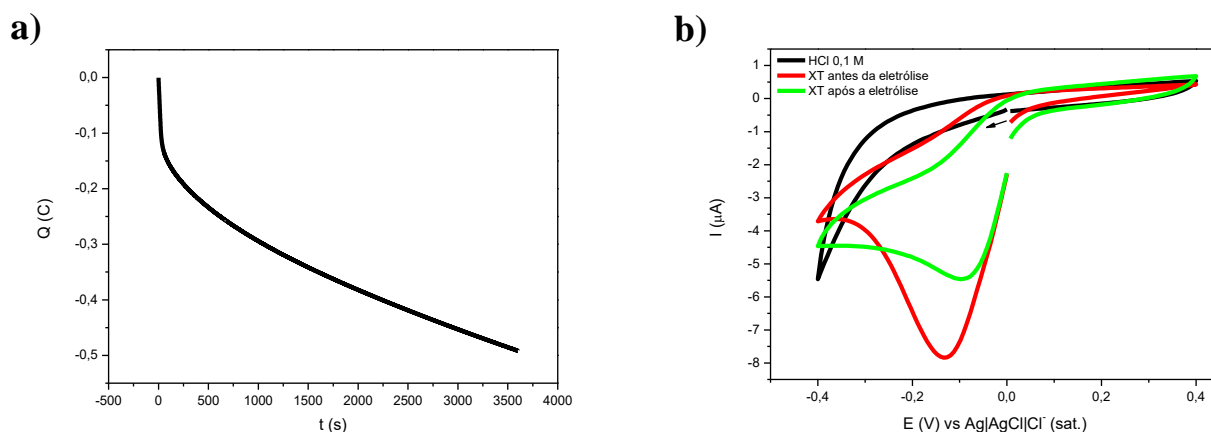
$$Q = \frac{m \times F \times n}{M} \quad \text{Equação 13}$$

Onde: Q_{res} é a carga residual do processo (C), t é o tempo de eletrólise (s), Q_{liq} é a carga líquida (subtração entre a carga total e Q_{res}), M é a massa molar de XT (g mol^{-1}), m é a massa de XT (g) e F é a constante de Faraday (96484 C mol^{-1}).

Ao observar os voltamogramas realizados durante o acompanhamento da eletrólise (Figura – 16 b), é notável que após a eletrólise ainda há presença de sinal de redução em torno de $-0,1 \text{ V vs Ag|AgCl|Cl}^{-} (\text{sat.})$, provavelmente proveniente do XT que não foi consumido, o

que indica que o tempo de 3600 s não foi suficiente para a exaustão do sistema. Comparando a intensidade das correntes antes e após a eletrólise (Figura – 16 b), sabe-se que 46,59% do XT foi consumido. Para obtenção dos valores corrigidos foi utilizada regra de três simples. Deste modo, a eletrólise de XT em potencial controlado ($-0,3$ V) envolveu 0,084 elétrons, apresentou corrente residual de $2,931 \times 10^{-4}$ A e carga de 1,055 C.

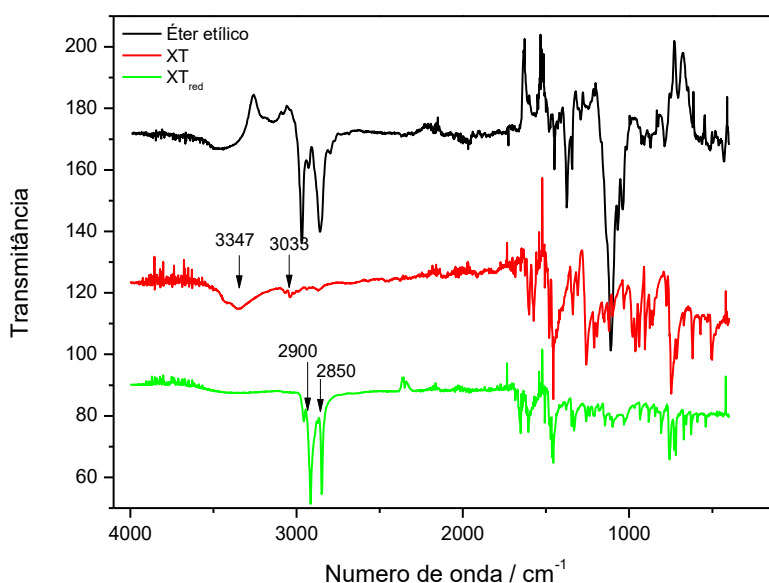
Figura 16 – a) Coulometria obtida através da eletrólise em potencial controlado ($-0,3$ V) de XT em HCl 0,1 M e em b) Voltamogramas da faixa de redução antes e após da eletrólise em potencial controlado ($-0,3$ V), $v = 0,050$ V s $^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).



Fonte: Autora, 2019.

O produto obtido através da eletrólise de XT foi extraído utilizando éter etílico como solvente. Em seguida foi seco e analisado por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Os espectros no infravermelho (Figura 17) permitem a comparação entre XT e XT $_{red}$. Observa-se que em XT $_{red}$ há supressão das bandas nos números de onda 3347 e 3033 cm $^{-1}$, pertencentes aos estiramentos da ligação O–H, e o surgimento de bandas nos comprimentos de onda de 2900 e 2850 cm $^{-1}$, que indicam estiramento de ligação C–H de carbono sp 3 (PAPAN et al., 2017; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

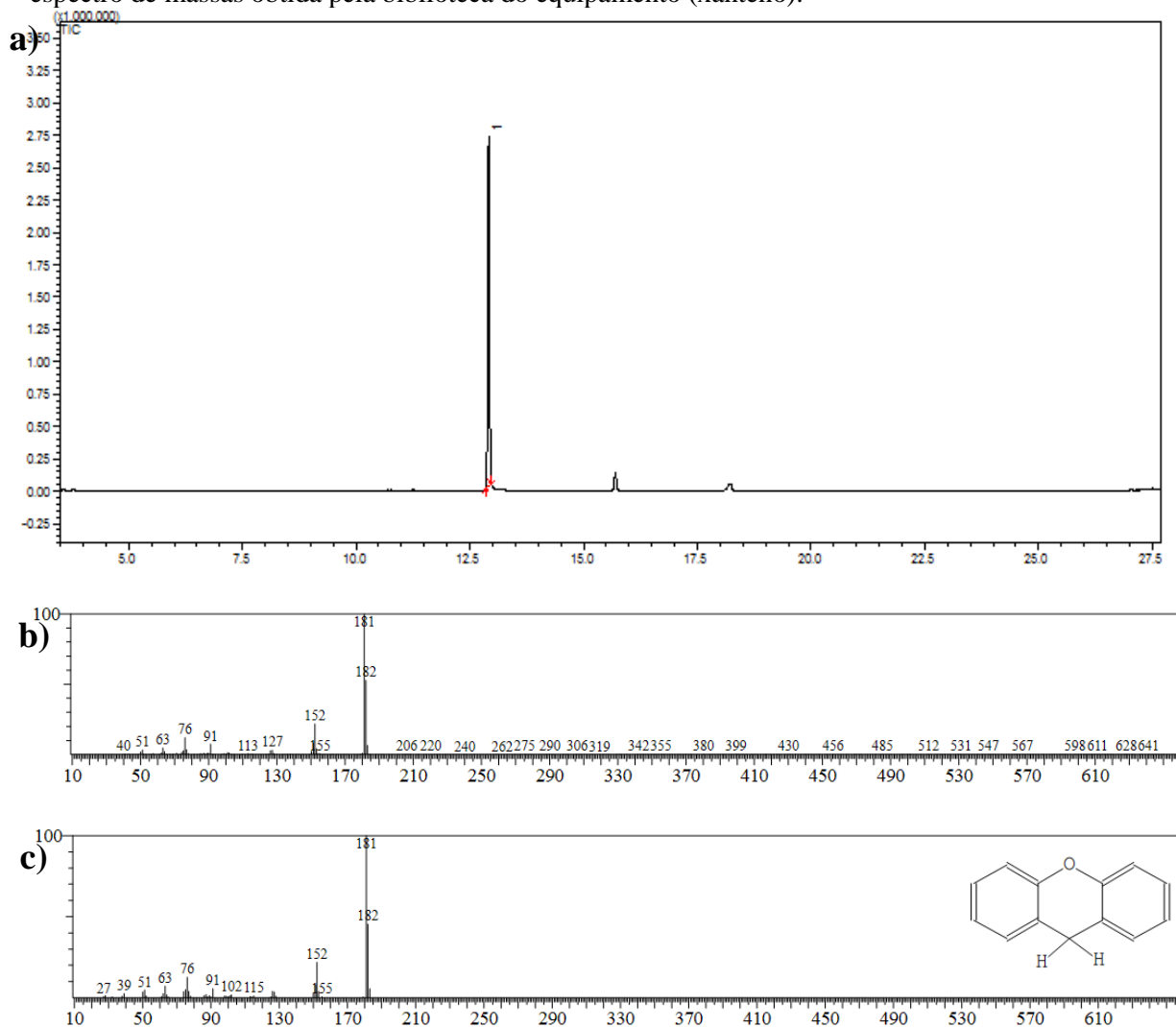
Figura 17 – Espectros no infravermelho FTIR de éter etílico, XT e XT após a eletrólise (XT_{red}).



Fonte: Autora, 2019.

O produto da eletrólise de XT também foi analisado via CG-EM, obtendo-se o cromatograma da Figura 18 – a), no qual são observados diversos picos provavelmente provenientes do xantidrol não reduzido, dímeros e demais subprodutos que possam ter sido formados durante a eletrólise. Observa-se um pico com tempo de retenção em torno de 13 min indicado pelo espectrômetro de massas como provavelmente pertencente ao xanteno. Essa indicação foi feita devido à observação de semelhanças significativas em comparação com a biblioteca do equipamento (Figura 18 – b e c).

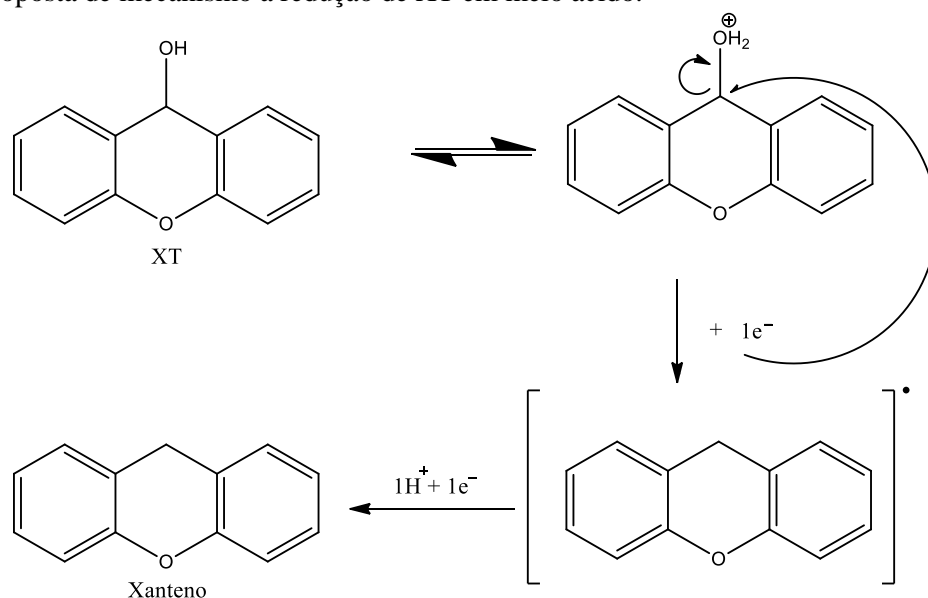
Figura 18 – a) Cromatograma CG-EM do produto obtido pela eletrólise em potencial controlado de XT, b) Espectro de massa do pico obtido no tempo de retenção de 13,172 min e em c) Combinação do espectro de massas obtida pela biblioteca do equipamento (xanteno).



Fonte: Autora, 2019.

Dado o exposto, uma proposta a redução de XT à xanteno é apresentada no mecanismo a seguir (Figura 19), que envolve a protonação da hidroxila devido a acidez do meio, a adição de 2 elétrons, desidratação e adição de 1 próton.

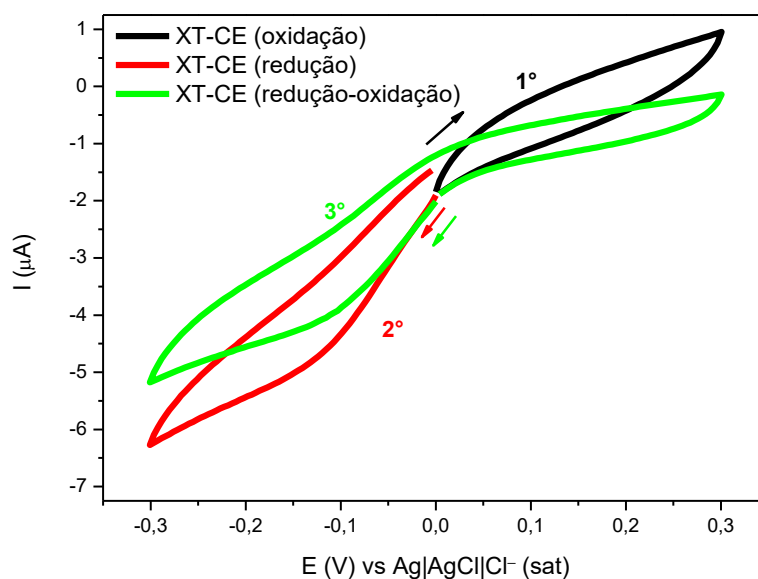
Figura 19 – Proposta de mecanismo a redução de XT em meio ácido.



Fonte: Autora, 2019.

Para avaliação da influência de CE (271,9 ppb) no comportamento eletroquímico de XT (32,57 μM), utilizou-se as mesmas condições utilizadas anteriormente (VC, CV em HCl 0,1 M). Inicialmente foi analisada a faixa de oxidação 0 a 0,5 V (Figura 20 – 1°). Nessa análise é visto que a adição de CE não deu origem a novos sinais eletroquímicos. Em seguida foi analisada a região de redução de 0 a -0,30 V (Figura 20 – 2°) e foi verificado que a adição de CE ao sistema também não apresentou novos sinais eletroquímicos. Por fim, verificou-se ainda o perfil redox do sistema XT-CE utilizando toda a janela (Figura 20 – 3°) e novamente foi observada a ausência de novos sinais.

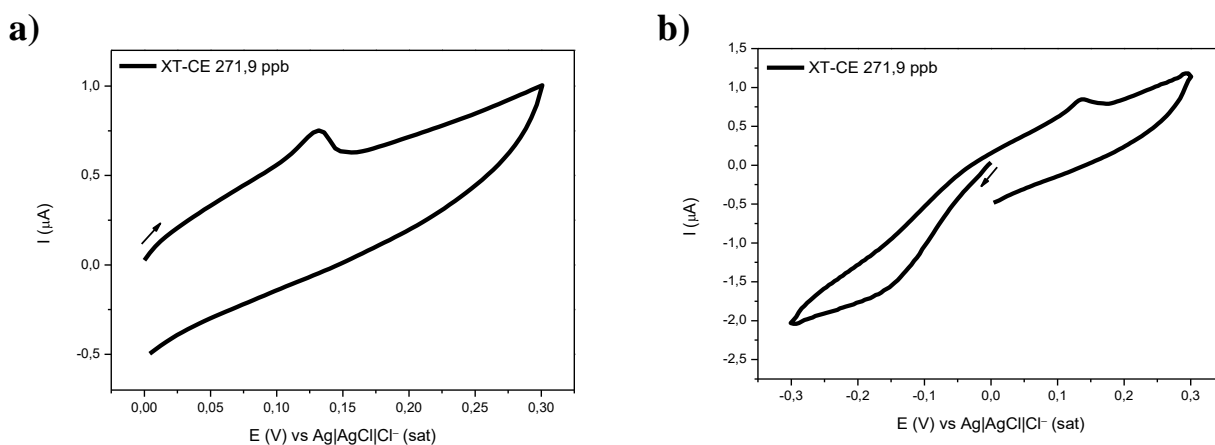
Figura 20 – Voltamogramas de XT na presença de CE em varreduras na faixa de oxidação (1°), redução (2°) e redução-oxidação (3°), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M).



Fonte: Autora, 2019.

Definido isso, avaliou-se a possibilidade de uma reação entre as espécies geradas com a redução de XT e o CE presente no meio. Para tal, foi aplicado o potencial de redução do XT por 60 s para gerar uma quantidade significativa de XT_{red} , esperado um tempo de equilíbrio de 10 s e, em seguida, foi realizada a leitura do sistema na região da oxidação 0 a 0,3 V (Figura 21 – a) e observado o surgimento de um sinal de oxidação irreversível em torno de 0,12 V, que foi atribuído ao produto da reação entre XT_{red} e CE. Constatada a presença desse sinal de oxidação, foi decidido ampliar a faixa de leitura para verificar se esse novo composto é reversível, e observou-se que o sinal do novo composto não é reversível (Figura 21 – b).

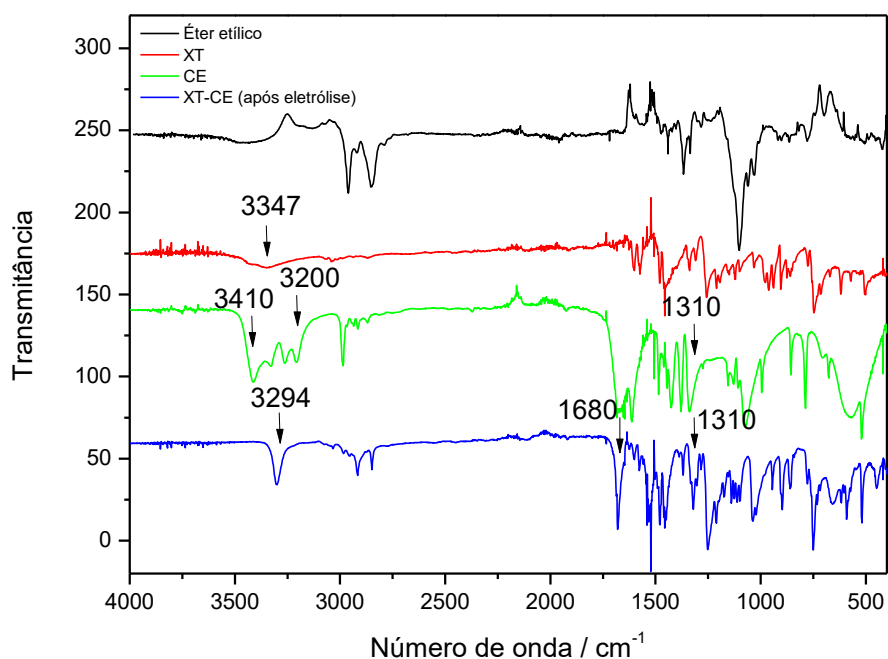
Figura 21 – Voltamogramas de XT na presença de CE, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, em solução de HCl (0,1 M), em a) varredura na faixa de oxidação após aplicação de potencial em $-0,2 \text{ V}$ por 60 s e em b) varredura de redução seguida de oxidação após aplicação de potencial em $-0,2 \text{ V}$ por 60 s.



Fonte: Autora, 2019.

Para avaliação do produto formado foi realizada eletrólise de XT e CE em solução de HCl (0,1 M) em potencial de $-0,3 \text{ V}$ com duração fixa de 3600 s. O produto obtido foi também extraído via extração líquido-líquido, utilizando éter etílico como solvente, seco e analisado por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) (Figura 22). Ao comparar os espectros de XT, CE e o produto de XT com CE após a eletrólise, observa-se que no produto entre XT e CE há supressão da banda no comprimento de onda 3347 cm^{-1} , pertencente ao estiramento da ligação O–H. As bandas entre 3450 e 3200 cm^{-1} no espectro de CE são atribuídos à ligação entre amina primária associada a carbonila. Essas também são suprimidas no produto XT–CE, dando origem a uma banda em torno de 3300 cm^{-1} , relacionada a vibração de amina secundária que apresenta uma banda de estiramento correspondente em torno de 1680 cm^{-1} . Os espectros de CE e XT-CE mostram uma banda de estiramento em 1310 cm^{-1} que é atribuída a ligação C-N (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

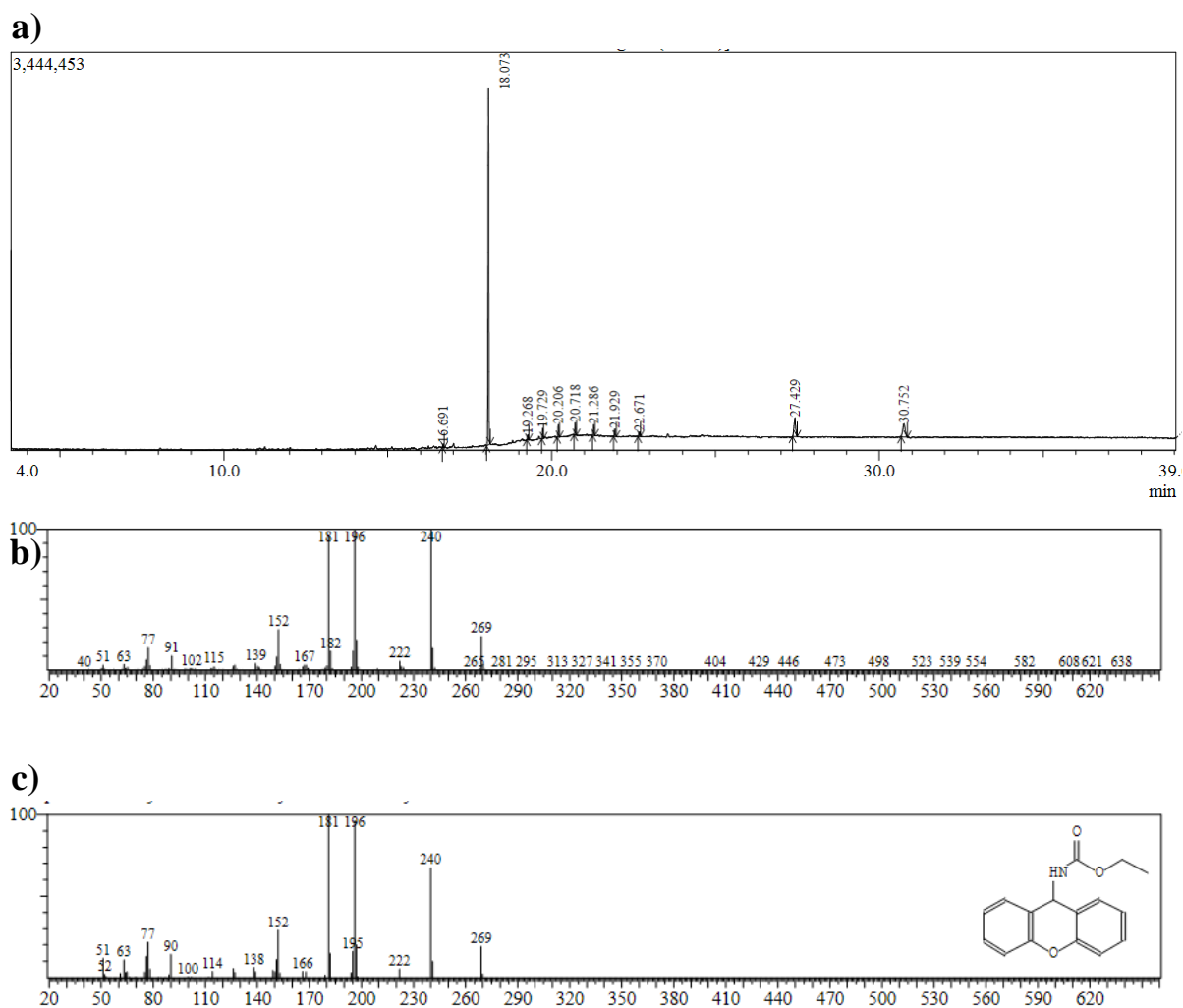
Figura 22 – Espectros no infravermelho FTIR de éter etílico, XT, CE e do produto da eletrólise de XT com CE em meio ácido (HCl 0,1 M).



Fonte: Autora, 2019.

Os produtos obtidos através da eletrólise de XT e CE em meio ácido também foram analisados via CG-EM, onde se observa a presença de um pico majoritário no tempo de retenção de 18,073 min (Figura 23 – a). Analisando o espectro de massas deste pico (Figura 23 – b) e comparando com os dados da biblioteca do equipamento (Figura 23 – c), observa-se a similaridade entre o espectro do produto obtido na eletrólise de XT e CE e o CEX, o que indica a possibilidade de o CEX ser o produto obtido através da reação entre CE e XT_{red}.

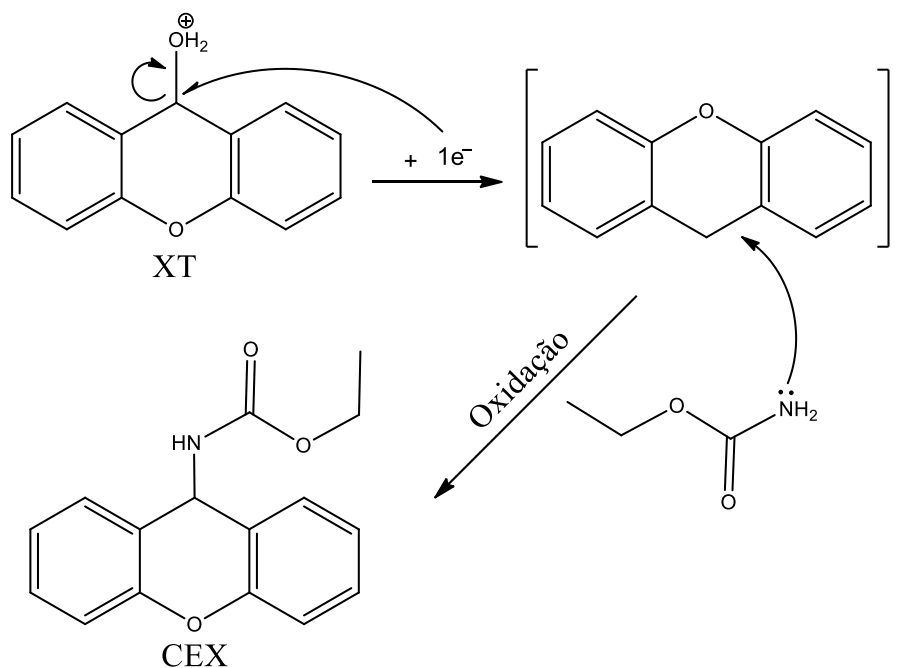
Figura 23 – a) Cromatograma CG-EM do produto obtido pela eletrólise em potencial controlado de XT com CE, b) Espectro de massa do pico obtido no tempo de retenção de 18,072 min e em c) Combinação do espectro de massas obtida pela biblioteca do equipamento (CEX).



Fonte: Autora, 2019.

Com base nos resultados observados através do espectro do infravermelho FTIR e CG-EM quanto ao provável produto obtido entre XT e CE envolvendo etapa eletroquímica, propõe-se o mecanismo a seguir (Figura 24), o qual conta com a formação de um radical intermediário ao xanteno estabilizado por ressonância com os anéis, esse reage com o CE quando submetido a oxidação dando como produto o CEX que é o mesmo produto da reação de derivatização clássica.

Figura 24 – Mecanismo proposto para reação entre XT_{red} e CE em meio ácido.

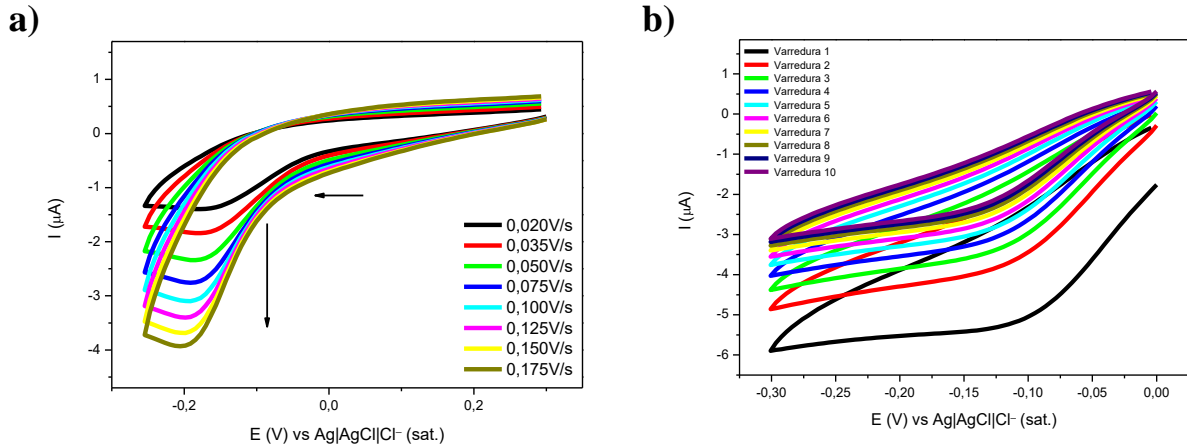


Fonte: Autora, 2019.

5. 1. 2 Estudos utilizando eletrodo CV

Para avaliação da natureza do processo de transferência de massa até a superfície eletródica foi realizado estudo de velocidade da solução de XT (90 μM) em eletrodo de trabalho de CV. As velocidades variaram de 0,020 V/s à 0,175 V/s (Figura 25 – a), onde se observa aumento da intensidade do pico catódico e deslocamento do potencial para potencial mais negativo (um indicativo de processo adsortivo), o que é corroborado pelo decréscimo da corrente de pico após sucessivas varreduras na faixa de redução (Figura 25 – b).

Figura 25 – Estudo de velocidade em a) Voltamogramas de XT em diferentes velocidades de varredura e em b) comportamento eletroquímico de XT em varreduras sucessivas, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

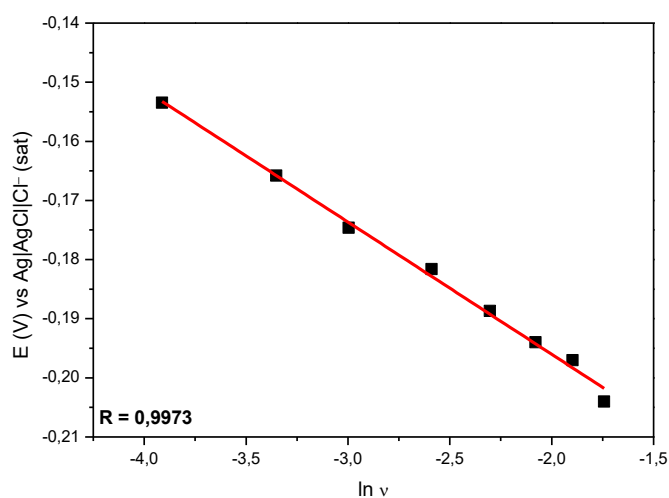


Fonte: Autora, 2019.

Sabendo que o analito apresenta pico irreversível, verificou-se a natureza do processo envolvido através da Equação 14, a qual é indicada para processos irreversíveis e adsorptivos, obtendo-se regressão linear ($R = 0,9973$) de E (V) versus $\ln \nu$ (Figura 26), o que confirma a natureza adsorptiva do processo (BRETT; BRETT, 1996; FERREIRA, 2010; LA-SCALEA et al., 2007).

$$E_p = E + \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \cdot \log \left(\frac{RT K^0}{\alpha n F} \right) + \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log \nu \quad \text{Equação 14}$$

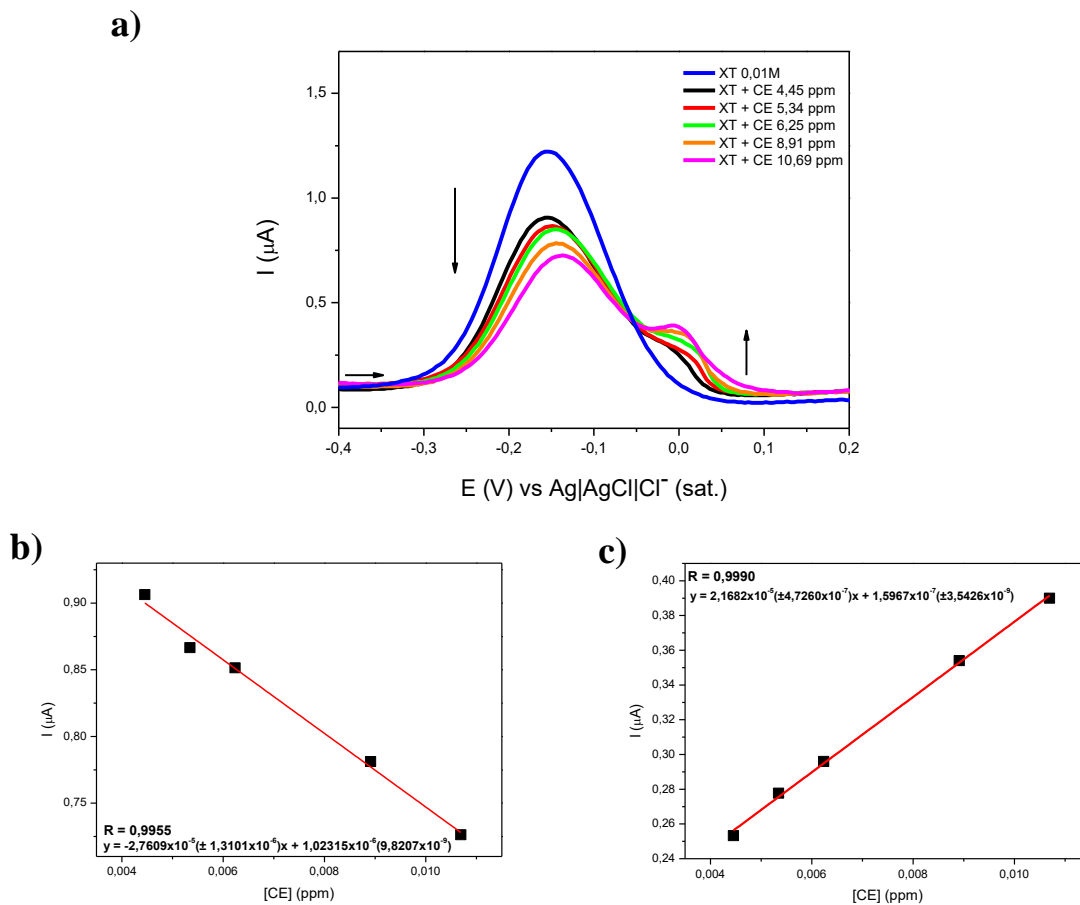
Onde: E_p é o potencial de pico catódico, E é o potencial padrão, R é a constante geral dos gases, T é a temperatura, α é o coeficiente de transferência de carga, n é o número de elétrons envolvidos, F é a constante de Faraday, K^0 é a constante de transferência de elétrons e ν é a velocidade de varredura.

Figura 26 – Regressão linear de E (V) versus $\ln v$.

Fonte: Autora, 2019.

Foi avaliada a influência de adições de CE (4,45 a 10,69 ppm) no sistema utilizando a técnica de VPD e com eletrodo de trabalho CV na faixa de $-0,4$ a $0,2$ V (Figura 27 – a). Sabendo da natureza adsorviva do sistema, após cada varredura o eletrodo CV foi polido conforme descrito na metodologia. Observa-se que o aumento da concentração de CE provocou redução linear ao pico em torno de $-0,15$ V (Figura 27 – b), provavelmente devido ao consumo de XT pela derivatização com CE. Observa-se também o surgimento de sinal linear em torno de 0 V (Figura 27 – c), o qual pode ser atribuído à provável reação eletroquímica entre o intermediário do xanteno e CE, gerando CEX. As elevadas concentrações de CE utilizadas inviabilizam a utilização desse sistema para quantificação de CE em amostras reais, sendo necessária a otimização desse parâmetro.

Figura 27 – a) Voltamogramas de XT 1 μM , CE (4,45 a 10,69 ppm), em HCl (0,1 M) e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e em b) Curva de calibração para sinal em $-0,15 \text{ V}$ e c) Curva de calibração para sinal em $0,00 \text{ V}$.

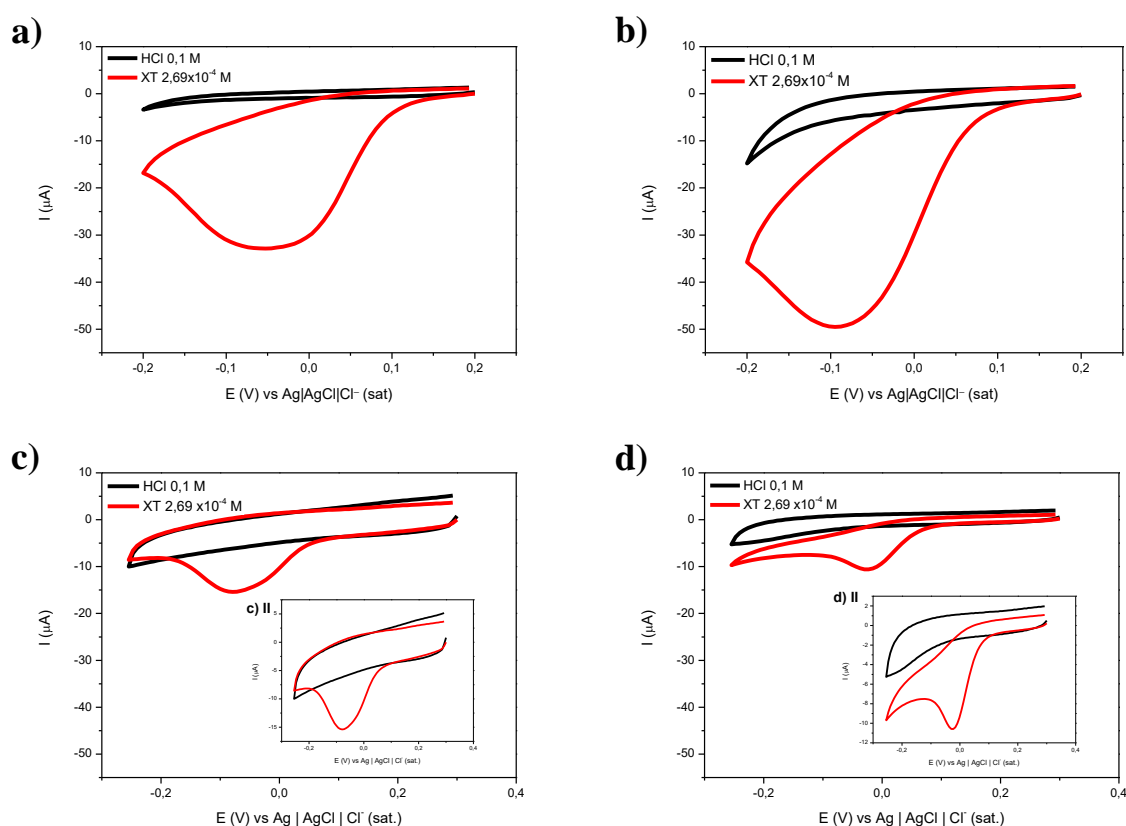


Fonte: Autora, 2019.

5. 1. 3 Estudo utilizando eletrodo modificado com NTC

Sabendo que o uso de NTC funcionalizados pode facilitar a interação com diversas moléculas orgânicas a depender da reatividade do grupo funcional inserido, podendo promover maior sensibilidade a estes materiais que apresentam elevada área superficial e visando obter um sistema que não apresente processo adsorptivo no eletrodo, foi proposta a modificação da superfície de CV com nanotubos variados. Para tal função foram avaliados quatro tipos de NTC suportados em CV, conforme a metodologia, obtendo-se os seguintes eletrodos de trabalho: CVNTC, CVNTCTT, CVNTCCOOH e CVNTCNH₂ (GOMES; FILHO, 2007). A Figura 28 apresenta os voltamogramas de uma solução de XT ($2,69 \times 10^{-4} \text{ M}$) em HCl 0,1 M utilizando os quatro eletrodos modificados com os diferentes tipos de NTC.

Figura 28 – Voltamogramas de XT ($2,69 \times 10^{-4}$ M) em solução de HCl (0,1 M), $v = 0,050$ V s $^{-1}$, utilizando diferentes eletrodos de trabalho em a) CVNTC, b) CVNTCTT, c) NTCCOOH (em c) II ampliação do sinal) e em d) CVNTCNH $_2$ (em d) II ampliação do sinal).



Fonte: Autora, 2019.

Observando a Figura 28, é notável que os eletrodos que tiveram sua superfície modificada com os NTC e NTCTT apresentam perfis semelhantes, no entanto, o NTCTT apresenta pico mais estreito e potencial mais negativo. Essas mudanças provavelmente foram causadas pelo tratamento ácido o qual o NTC foi submetido. Esse procedimento remove resíduos dos catalisadores metálicos utilizados na síntese dos NTCs. Essa remoção pode promover alterações como a diminuição do tamanho e a abertura de extremidades bloqueadas, ocasionando também o aparecimento de grupos oxigenados nas bordas (COSTA, 2016). No caso dos NTC funcionalizados com grupos COOH (Figura 28 – c) e NH $_2$ (Figura 28 – d), é notável menor intensidade de corrente, no entanto, com a ampliação da faixa (Figura 28c – c)II e Figura 28d – d)II) é perceptível que o eletrodo modificado com CVNTCNH $_2$ proporcionou melhor definição do pico catódico e deslocamento para potencial menos negativo (favorecendo a redução), o que pode ser atribuído a interações favoráveis entre os grupos NH $_2$ e/ou os

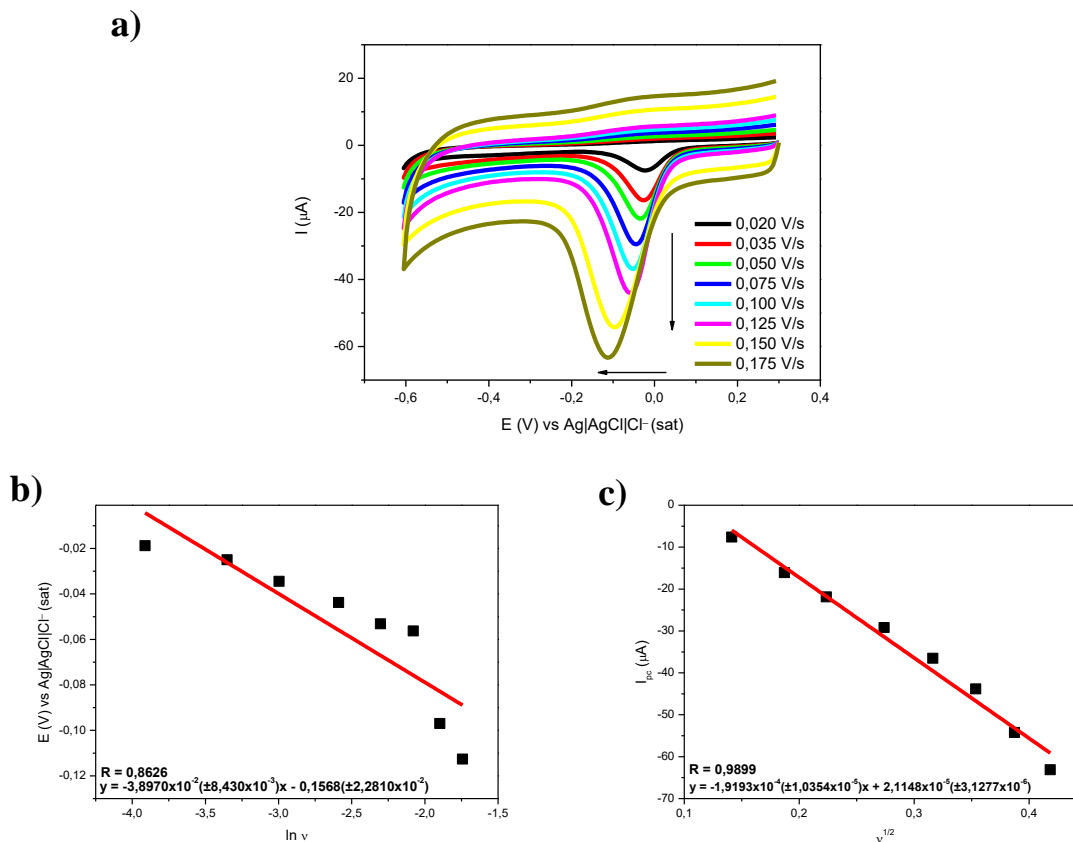
resíduos de catalisadores presentes na superfície do eletrodo e o analito. Dado o exposto, o eletrodo de CVNTCNH₂ foi escolhido para os testes posteriores.

Definido o eletrodo, foi realizado estudo de velocidade utilizando uma solução de XT (90 µM) em HCl (0,1 M). As velocidades variaram de 0,020 V/s a 0,175 V/s (Figura 29 – a), onde se observa que o aumento da velocidade proporcionou aumento da intensidade do pico catódico e deslocamento de pico para potenciais mais negativos. Para análise da natureza do processo envolvido foi realizada a regressão de E_{pc} versus $\ln v$ de acordo com a Equação 14 (Figura 29 – b), onde a ausência de linearidade indica que o processo envolvido não é adsorptivo (BRETT; BRETT, 1996; FERREIRA, 2010; LA-SCALEA et al., 2007). Para averiguar se o processo envolvido é difusional foi realizada a regressão linear de I_{pc} versus $v^{1/2}$ (Figura 29 – c) com base na Equação 15, que é indicada para processos irreversíveis e difusionais, obtendo-se coeficiente de correlação linear de 0,9899, corroborando a natureza difusional do sistema (BARD et al., 2001).

$$I_p = (2,99 \times 10^5) \alpha^{1/2} A C_0^* D_0^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 15}$$

Onde: I_p é a corrente de pico catódico, α é o coeficiente de transferência de carga, A é a área do eletrodo, C_0^* é a concentração da espécie em solução, D_0 é o coeficiente de difusão e v é a velocidade de varredura.

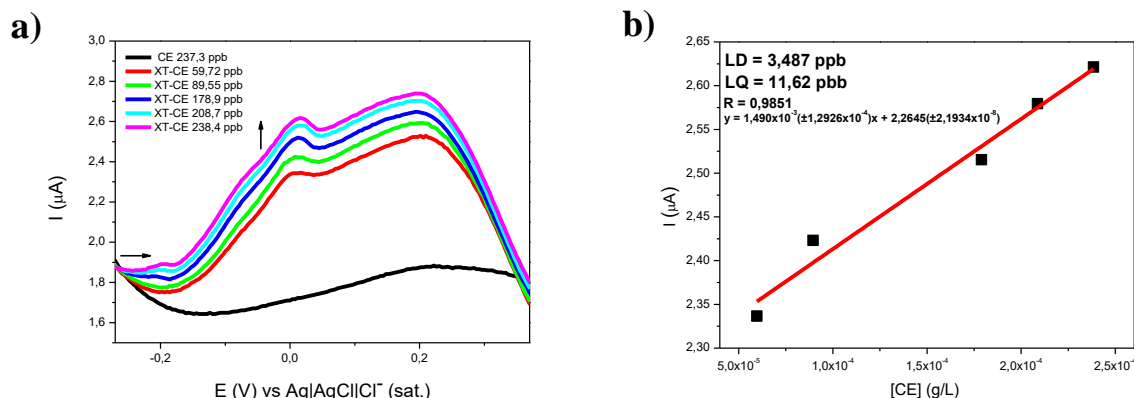
Figura 29 – a) Estudo de velocidade (0,020 – 0,175 V/s) da solução de XT utilizando o eletrodo CVNTCNH₂, b) regressão linear E (V) versus $\ln v$ e em c) regressão linear I_{pc} versus $v^{1/2}$.



Fonte: Autora, 2019.

Decidiu-se avaliar o comportamento eletroquímico de um sistema que possui CE e sofre a adição de XT. Para tal, uma solução de CE com concentração de 237,3 ppb foi submetida a técnica de VPD na faixa de $-0,3$ a $0,4$ V e, em seguida, foram feitas adições de XT a esse sistema. O gráfico obtido desses ensaios é mostrado na Figura 30 – a, onde o pico em torno de 0 V é relativo ao derivatizado XT-CE. Como a reação entre o XT e o CE segue estequiometria 1:1, a concentração molar do complexo é igual a de CE, logo a concentração de CE foi calculada multiplicando a massa molar do CE pela concentração molar do XT adicionado. Através desse sistema se obteve a curva de calibração (Figura 30 – b), onde se observa linearidade ($R = 0,9851$), possibilitando o cálculo de LD e LQ, 3,487 ppb e 11,62 ppb, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação obtidos estão muito abaixo das concentrações de CE permitidas pela legislação vigente, o que torna o sistema promissor para a determinação de CE.

Figura 30 – a) Voltamogramas das adições de XT em solução de CE em HCl (0,1 M) e $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e em b) Regressão linear da corrente versus concentração de CE.

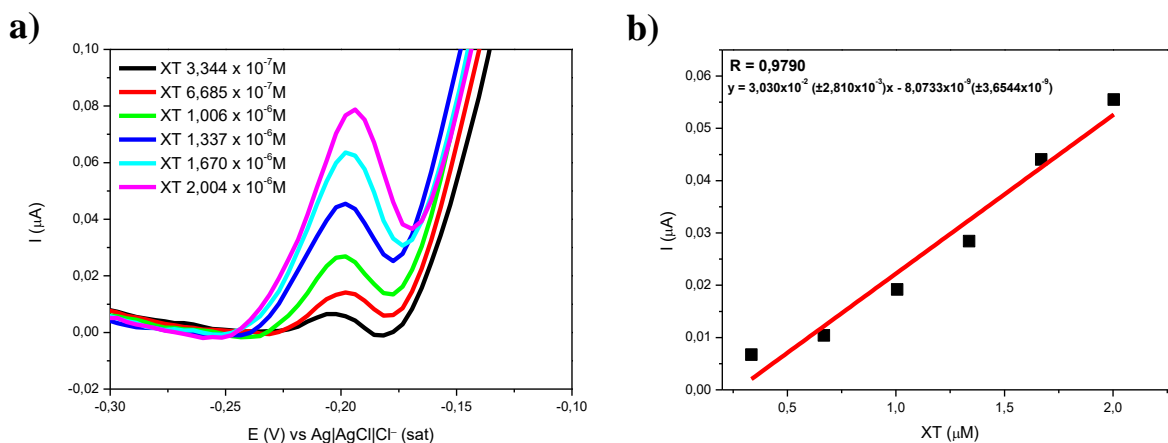


Fonte: Autora, 2019.

Através do gráfico apresentado na Figura 30 – a, percebe-se que quando o sistema tem apenas o CE (linha preta) não são observados sinais eletroquímicos. Com a adição de XT ocorre o aumento da intensidade da corrente na faixa de $-0,22$ a $0,3 \text{ V}$, o que pode ser atribuído a alguma interação intensificada entre os grupos funcionais presentes no NTC ou à presença de impurezas que apresentem maior afinidade pelo XT. Com a adição de XT foi observado um sinal crescente em torno de 0 V , provavelmente referente a oxidação do produto entre o XT reduzido e CE, obtido através da derivatização.

Visando identificar se todo o XT foi consumido na reação, continuou-se a adição de XT e foi observado que quando o XT fica em excesso surge um sinal em torno de $-0,2 \text{ V}$, que é a mesma região onde observou-se um sinal referente ao XT no sistema anterior. Para melhor visualização do mesmo, utilizou-se a correção de linha de base no modo média móvel (Figura 31) disponível no NOVA 2.1.2.

Figura 31 – a) Voltamogramas obtidos a partir do excesso de XT no meio e em b) Regressão linear da corrente de pico versus concentração de XT.



Fonte: Autora, 2019.

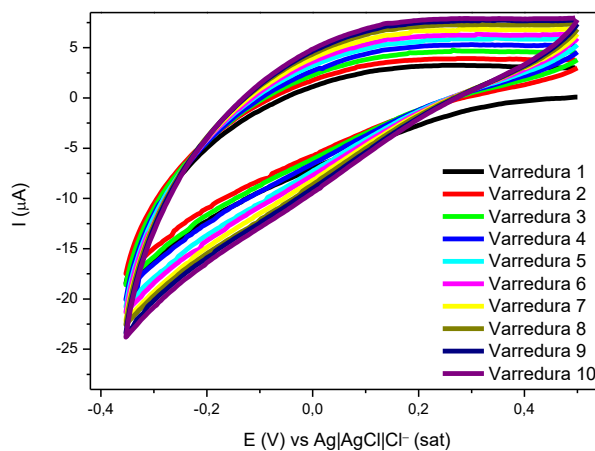
A análise dos dados mostrou que o sinal em $-0,2$ V teve um aumento de corrente proporcional à concentração e um coeficiente de correlação de 0,9790 proporcionado pelo excesso de XT no meio (Figura 31 – b). No entanto, tentativas de reprodução do experimento utilizando o eletrodo CVNTCNH₂ não foram alcançadas, provavelmente devido a variações na dispersão de NTC preparada.

5. 1. 4 Estudos utilizando eletrodo de PXT

5.1.4.1 PXT1

Visando obter um sistema reprodutível, foi decidido que uma boa alternativa seria a formulação de um eletrodo de pasta de carbono contendo o derivatizantes XT. Inicialmente os estudos foram realizados utilizando pasta de carbono, com adição de 10% de XT para melhor sensibilidade do método. Antes da incorporação de XT foram realizadas varreduras da pasta em solução de HCl 0,1 M (Figura 32), onde não é observada a presença de sinal catódico e/ou anódico em varreduras consecutivas.

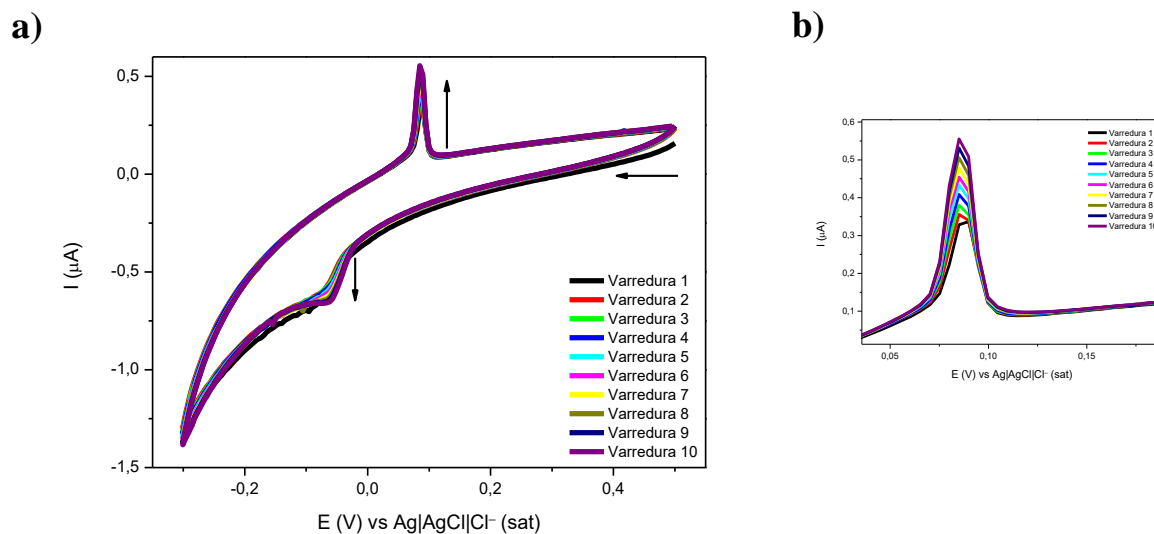
Figura 32 – Voltamogramas de HCl (0,1 M) utilizando eletrodo de pasta de carbono, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2019.

Com o desenvolvimento das varreduras observa-se aumento na intensidade de corrente, possivelmente devido ao aumento da área ativa do eletrodo que pode se tornar poroso ao decorrer do experimento. Assim, foi constatada a necessidade de análises rápidas utilizando esse eletrodo. Posteriormente foi incorporado 10 % de XT à pasta e esta foi avaliada nas mesmas condições. Nesta avaliação foi observada a presença de um sinal de redução referente ao XT incorporado à pasta e a ausência de sinais de oxidação. Visto isso, o eletrodo PXT1 foi avaliado quanto à presença de CE (83,74 ppb), sabendo que a espécie que reage com CE provavelmente trata-se de um intermediário da reação de redução de XT. Foi aplicado potencial de $-0,2 \text{ V}$ durante 60 s no eletrodo antes da análise para a formação do provável intermediário do xanteno (Figura 33).

Figura 33 – a) Voltamogramas referentes ao sistema XT-CE utilizando eletrodo PXT1, CE (83,74 ppb), em HCl (0,1 M) e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e em b) Ampliação do sinal próximo a 0,1 V.



Fonte: Autora, 2019.

Através da Figura 33 – a, observa-se a presença de um pico catódico de caráter irreversível em torno de $-0,07 \text{ V vs Ag|AgCl|Cl}^- (\text{sat.})$ que pode ser atribuído a redução do XT, como já discutido anteriormente. Em potencial próximo à $0,075 \text{ V}$ é notável a presença de um pico anódico que possivelmente é referente à oxidação do produto entre o XT reduzido e CE, obtido através da derivatização. Com o desenvolvimento das varreduras é perceptível o aumento da intensidade da corrente de modo mais efetivo no sinal em $0,075 \text{ V}$ (Figura 33 – b), o que pode ser atribuído a provável ação catalítica da pasta à oxidação do produto observado.

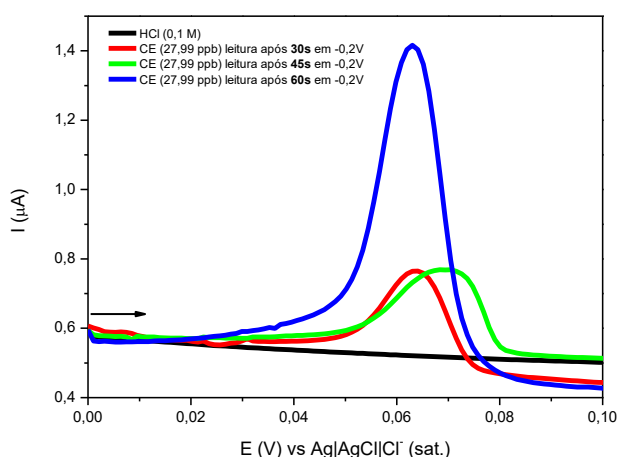
Diversas tentativas de obtenção de uma curva analítica para CE utilizando o eletrodo PXT1 foram realizadas, no entanto, o método não mostrou linearidade nem repetibilidade, provavelmente devido a porosidade do eletrodo que permite a entrada da solução por capilaridade, promovendo a redução do XT presente no interior do eletrodo.

5.1.4.2 PXT2

Visando sanar os problemas apresentados pelo eletrodo PXT1, foi proposto um novo eletrodo denominado PXT2, tendo como principal diferencial que esse permite a troca de toda a pasta após cada varredura, conforme a metodologia, eliminando assim o produto reduzido de XT presente no interior da pasta. Inicialmente foram realizados testes para determinar qual o tempo ideal de condicionamento aplicado no eletrodo para garantir a formação do intermediário

ativo. Os testes foram realizados em solução de HCl (0,1 M) na presença de CE (27,99 ppb). A técnica utilizada foi VPD e foram avaliados os tempos de condicionamento de 30, 45 e 60 s (Figura 34).

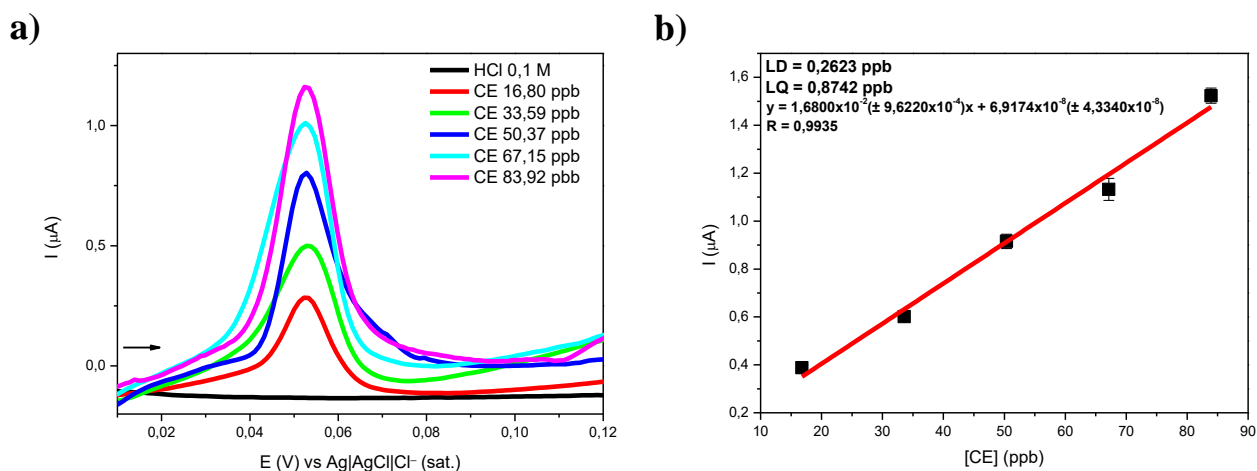
Figura 34 – Voltamogramas relacionados a oxidação da derivatização entre XT-CE, em CE (27,99 ppb) utilizando diferentes tempos de condicionamento (30, 45 e 60 s) no eletrodo PXT2 antes da análise, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2019.

Observa-se na Figura 34 que com 30 s de condicionamento o eletrodo já mostra resposta significativa de oxidação do produto da reação envolvendo CE. No entanto, o tempo de 60 s mostrou-se muito mais eficiente, sendo então adotado para condicionamento do eletrodo nos estudos posteriores. Para verificar a reprodutibilidade e a linearidade do método utilizando o eletrodo PXT2, foi construída curva analítica em função da oxidação do produto XT-CE. Para isso, utilizou-se VPD, em solução de HCl (0,1 M), obtendo faixa linear de resposta de 16,80 a 83,92 ppb, com coeficiente de correlação de 0,9935 para $n = 5$ (Figura 35 – b). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados foram de 0,2623 ppb e 0,8742 ppb, respectivamente.

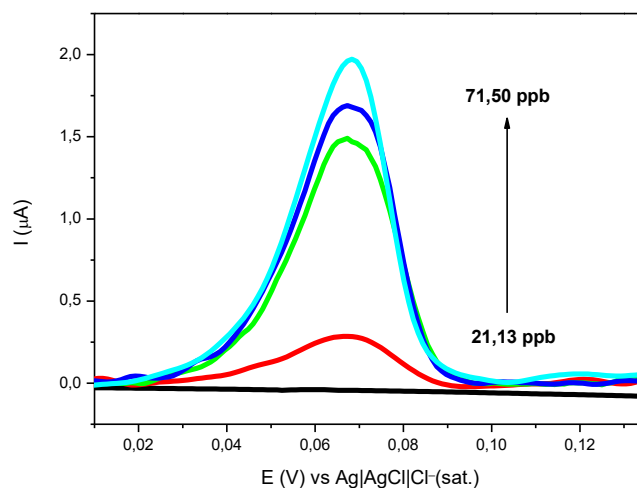
Figura 35 – a) Voltamogramas relacionados a oxidação da derivatização entre XT-CE em diferentes concentrações de CE, utilizando eletrodo PXT2 condicionado em $-0,2$ V por 60 s, em HCl $0,1$ M e $v = 5$ mV s^{-1} e em b) Regressão linear da corrente de pico versus concentração de CE.



Fonte: Autora, 2019.

O método desenvolvido utilizando o PXT2, foi avaliado em análise de uma amostra comercial de cachaça (39% de etanol v/v) previamente acidificada conforme a metodologia. A análise demonstrou que a metodologia foi eficiente para a quantificação do analito, a amostra apresentou $21,13$ ppb de CE (Figura 36 – linha vermelha). Em seguida foram realizadas adições de padrão a amostra, observou-se sinal analítico no mesmo potencial que a análise da amostra não fortificada e aumento da intensidade de corrente (Figura 36 – linha verde), confirmando a eficiência do método desenvolvido.

Figura 36 – Voltamogramas obtidos através da análise da amostra comercial de cachaça e da adição de padrão, utilizando PXT2 condicionado em -0,2 V por 60 s, em HCl 0,1 M e $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2019.

Diante dos resultados obtidos, é notável que a utilização do eletrodo PXT2 sob condicionamento de $-0,2 \text{ V}$ durante 60 s, em meio ácido (HCl 0,1 M), mostrou-se um método eficiente, com LD e LQ com valores bem inferiores ao máximo exigido pelos regulamentos nacionais e internacionais, o que demonstra a viabilidade do uso. A Tabela 5, permite a comparação entre o LD e LQ do método aqui proposto com o de outros métodos disponíveis na literatura. Pode-se observar que a maioria dos métodos são cromatográficos, que exigem pré-tratamento da amostra, pessoal qualificado e apresentam alto custo. O método desenvolvido neste trabalho apresenta LQ compatível com o das outras publicações, fácil preparação, baixo custo, rapidez, passibilidade de portabilidade e miniaturização.

Tabela 5 – Uso de diferentes métodos para a quantificação de CE em matrizes alimentícias e respectivos limites de detecção e quantificação.

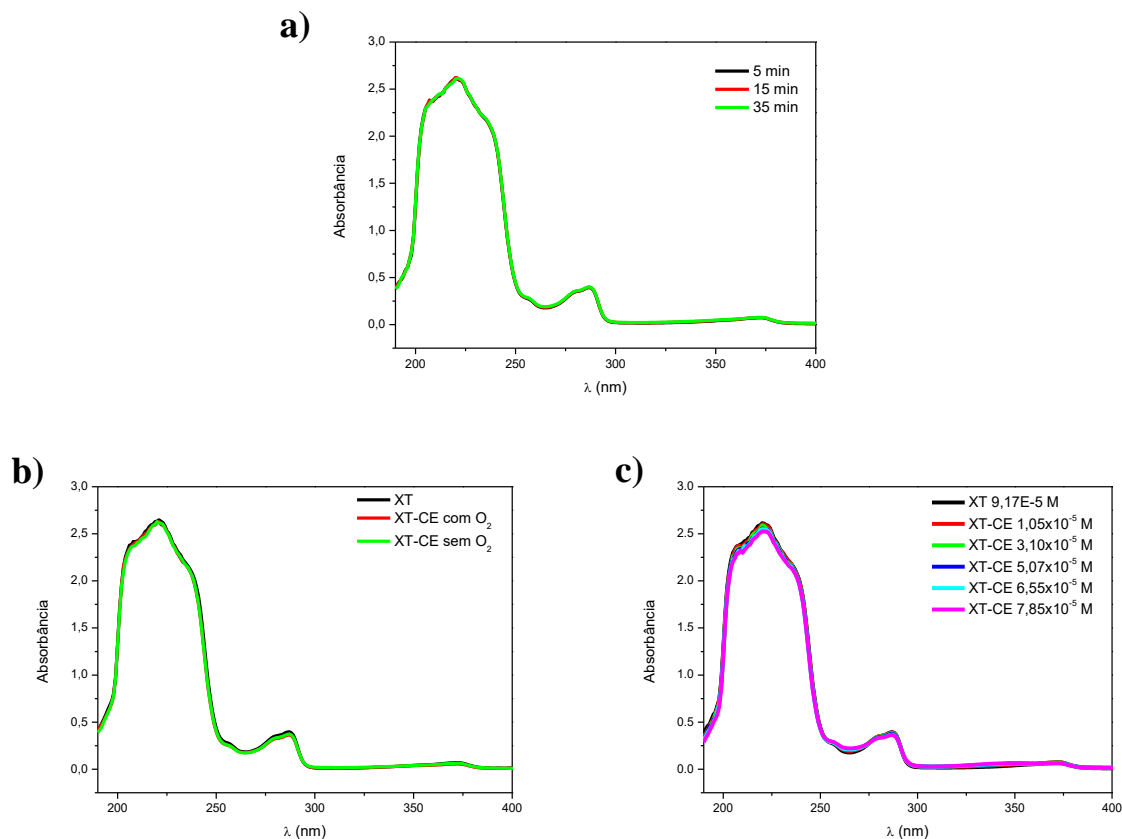
Métodos	LD (ppb)	LQ (ppb)	Autor
Derivatização-ELL CG-EM	0,01-0,03	0,03-0,1	SHIN; YANG, 2012.
EFS CG-EM	0,1	1,0	JAGERDEO et al., 2002.
Cascata enzimática (espectrofotometria)	0,827	-	LU; ZHOU; TIAN, 2015
Derivatização VPD	0,2623	0,8742	Este trabalho
<i>Extrelut</i> -MEFS CG-EM	0,4	1,2	NÓBREGA et al., 2015.
CLAE-Fluorescência	2,48	8,26	MENDONÇA et al., 2016
Cascata enzimática (cronoamperometria)	0,472	-	ZHANG et al., 2017

Fonte: Autora, 2019.

5. 1. 5. Estabilidade no UV-Vis do XT

Foi avaliada a influência e estabilidade de XT ($2,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em HCl (0,1 M) quanto a presença e ausência de luz, oxigênio e CE ($4,68 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Na Figura 37 observa-se que o espectro de absorção de XT apresentou duas bandas: a primeira entre 200 e 250 nm, que é característica de compostos aromáticos; e a segunda em torno de 275 nm, devido ao deslocamento de elétrons do átomo de oxigênio do éter. Não se observou variação no espectro com a adição de CE, luz e oxigênio no meio, o que indica estabilidade da região aromática e do éter da molécula de XT a esses fatores.

Figura 37 – Espectros no UV-vis do XT em a) em diferentes tempos de derivatização com CE, em b) na ausência e na presença de O₂ e em c) em diferentes concentrações de CE.

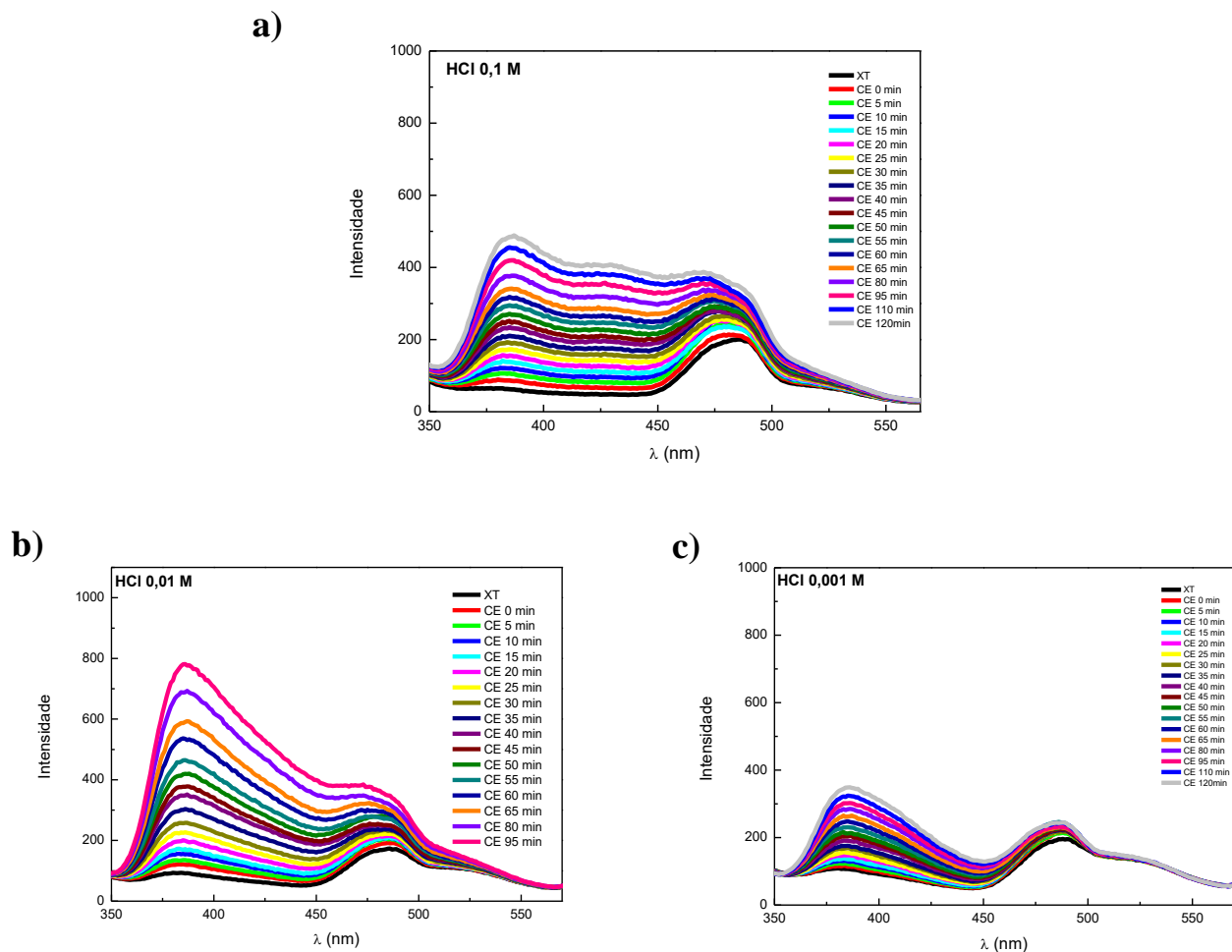


Fonte: Autora, 2019.

5. 1. 6. Monitoramento do CEX em diferentes concentrações de HCl via Fluorescência

Foi avaliada a influência da concentração de HCl (0,1 mol L⁻¹, 0,01 mol L⁻¹ e 0,001 mol L⁻¹) na reação de derivatização (XT 2,53 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ e CE 4,68 × 10⁻⁷ mol L⁻¹) utilizando espectroscopia de fluorescência. Foram realizadas leituras de emissão na faixa de 350 a 560 nm, λ_{ex.} = 234 nm (Figura 38), onde observa-se que o espectro de fluorescência do XT apresenta banda em torno de 475 nm, pois se trata de estrutura com anéis aromáticos conjugados em ressonância. Com a adição de CE, é notável o surgimento de nova banda em torno de 375 nm, tratando-se provavelmente do produto da derivatização o CEX. Observa-se que com as alterações da concentração de HCl há mudanças na cinética de reação envolvida. Ao utilizar solução de HCl 0,01 M há maior intensidade de fluorescência que utilizando as demais concentrações, indicando a provável concentração ideal de prótons no meio em favorecimento da intensidade de fluorescência.

Figura 38 – Espectros de fluorescência de XT+CE em diferentes concentrações de HCl, em a) HCl 0,1 M, em b) HCl 0,01 M e em c) HCl 0,001M.



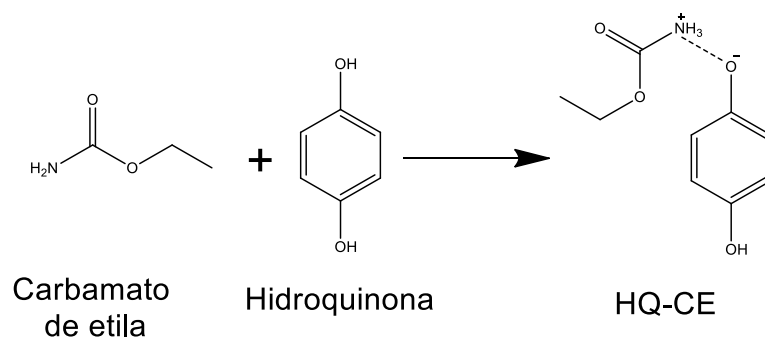
Fonte: Autora, 2019.

5.2 A Hidroquinona e avaliação eletroquímica

A hidroquinona (HQ), também chamada quinol ou 1,4-dihidroxibenzeno, é um composto orgânico do tipo fenólico que possui dois grupos hidroxila ligados a um benzeno na posição para (CALAÇA, 2015). A HQ apresenta diversas aplicações, principalmente associadas à sua ação redutora, como a utilização para síntese de herbicidas, borrachas e formulações farmacêuticas (BONI, 2011). No que se refere as propriedades eletroquímicas, a HQ é amplamente utilizada por sua ação mediadora na transferência de elétrons e prótons (GUO et al., 2015; SILVA, 2017). ADAM; REFAT; SAAD, (2013) avaliaram a utilização de complexação de transferência de carga realizada por HQ na detecção de CE através de espectros de absorção eletrônica, titulação fotométrica, espectroscopia de infra-vermelho e ressonância

magnética nuclear, por meio da reação de derivatização a seguir (Figura 39). Dado o exposto, a possibilidade de detecção eletroquímica de CE através da formação de complexo com HQ foi avaliada neste trabalho.

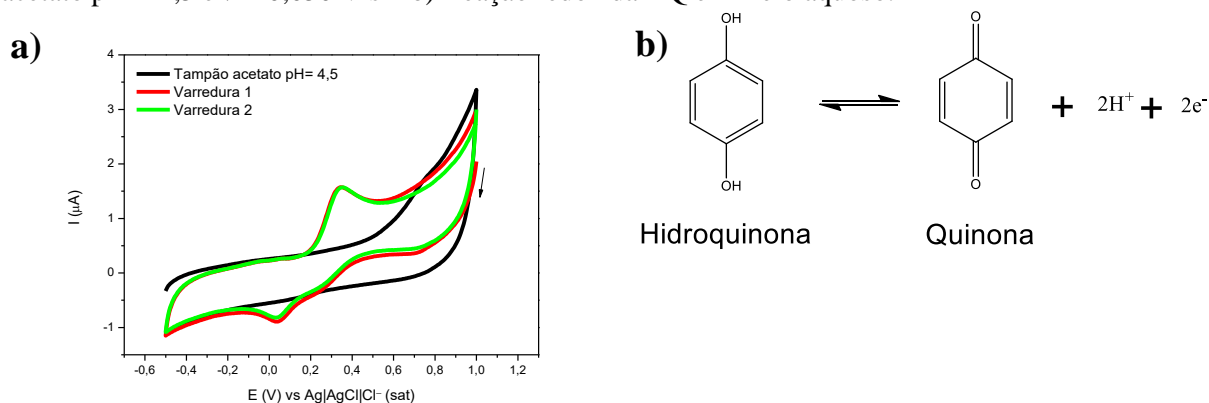
Figura 39 – Reação de derivatização de CE por HQ.



Fonte: ADAM; REFAT; SAAD, 2013.

O comportamento eletroquímico de HQ ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi avaliado em CV, usando tampão acetato pH = 4,5, através de voltametria cíclica (VC) em faixa de potencial de -0,5 a 1,0 V, onde se observa que a HQ apresenta picos de redução em -0,4 V e de oxidação em 0,02 V vs Ag|AgCl|Cl⁻ (sat.) (Figura 40 – a). É notável que o pico de oxidação apresenta maior intensidade que o pico de redução, o que indica processo semi-reversível. A HQ apresenta processo redox em meio aquoso já descrito que envolve a transferência de dois prótons e dois elétrons (Figura 40 – b) (BONI, 2011).

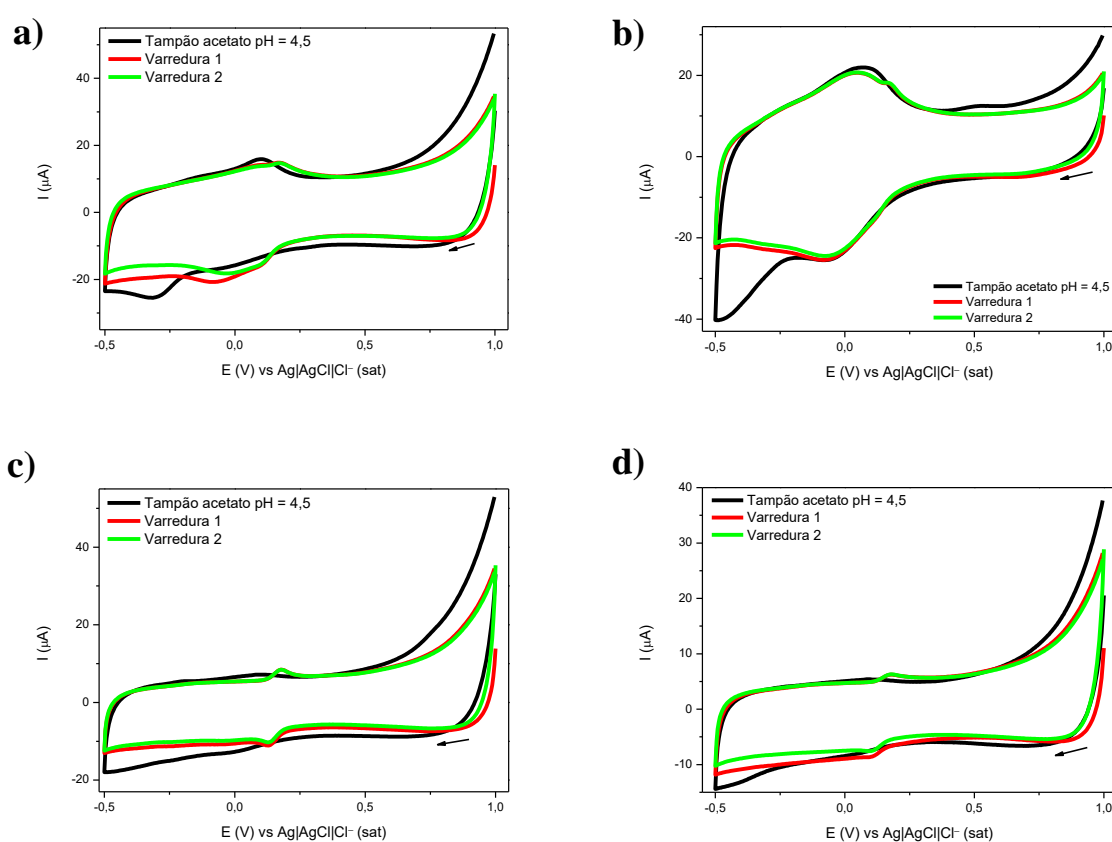
Figura 40 – a) Voltamograma obtido utilizando CV e solução de HQ ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato pH = 4,5 e $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ b) Reação redox da HQ em meio aquoso.



Fonte: a) Autora, 2019. b) BONI, 2011

Devido às características apresentadas por NTC em sensores eletroquímicos, como alta condutividade elétrica, menor resistência ao transporte de massa (impedindo a passivação do eletrodo), alta sensibilidade e elevada área superficial, avaliou-se também o comportamento da HQ frente a modificações do eletrodo de trabalho com NTC (SILVA, 2017). Foram utilizados os seguintes eletrodos de trabalho: CVNTC, CVNTCTT, CVNTCCOOH e CVNTCNH₂ (Figura 41).

Figura 41 – Voltamogramas da HQ ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato (pH = 4,5), $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ utilizando diferentes eletrodos de trabalho, a) CVNTC, b) CVNTCTT, c) CVNTCCOOH e em d) CVNTCNH₂



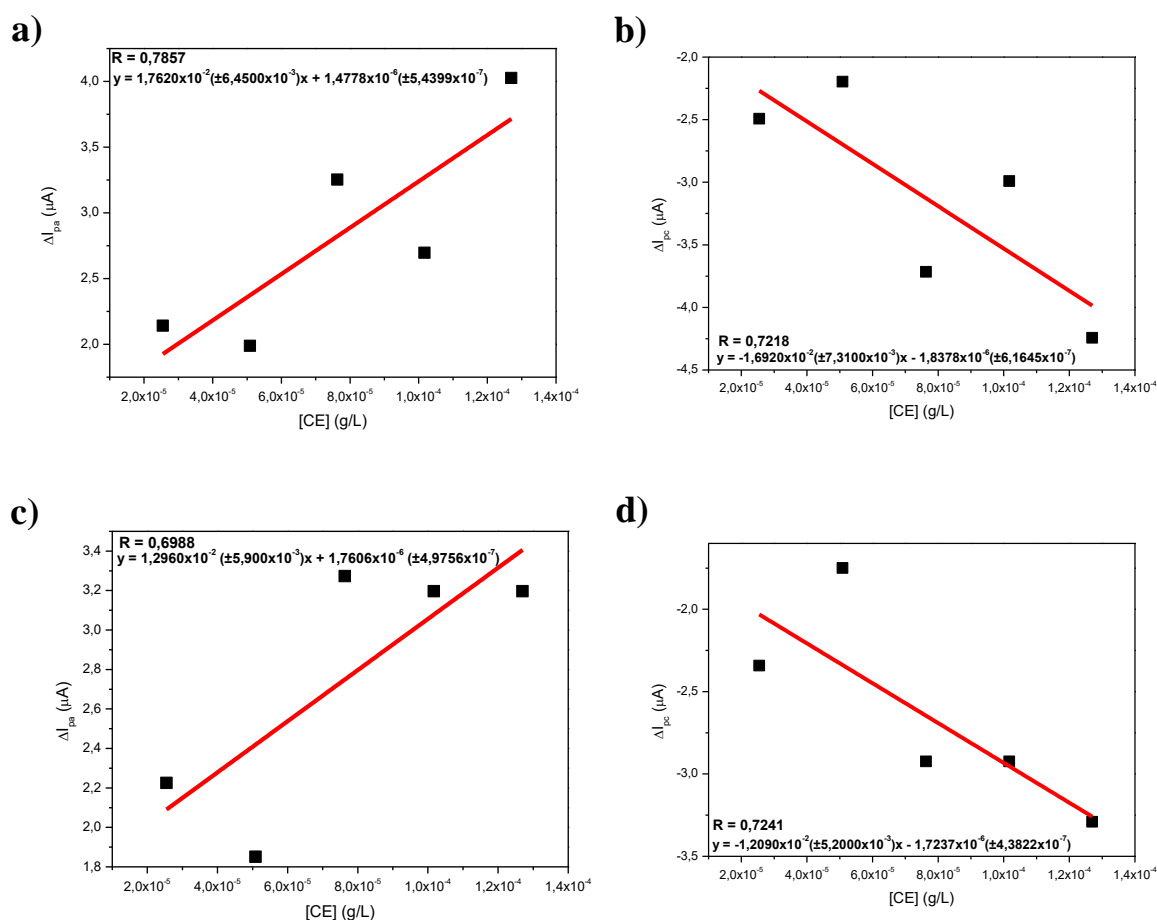
Fonte: Autora, 2019.

Observa-se que os voltamogramas obtidos a partir dos eletrodos CVNTC e CVNTCTT apresentam perfis diferentes. Segundo MINNIKANTI; SKEATH; PEIXOTO, (2008) o comportamento eletroquímico dos NTC depende diretamente de fatores como defeitos estruturais e a presença de impurezas como catalisadores metálicos. Com o processo de tratamento do NTC e a provável remoção de interferentes, observa-se deslocamento do sinal de oxidação do NTC para mesmo potencial de oxidação de HQ. Na faixa de redução observa-se

surgimento de banda do NTC submetido a tratamento em mesmo potencial que a HQ, o que dificulta a identificação de HQ através deste método, visto que possivelmente este NTC apresenta os mesmos grupos eletroativos que a HQ. Nos voltamogramas obtidos com CVNTCCOOH e CVNTCNH₂ (Figura 41 – c/d) pode-se observar comportamento eletroquímico similar inclusive na presença de HQ.

Os eletrodos modificados CVNTC, CVNTCCOOH e CVNTCNH₂ foram também avaliados quanto a presença de CE (25,44 – 127,0 ppb). A concentração de HQ foi fixa em $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As análises foram realizadas em tampão acetato pH = 4,5. À cada adição de CE, o sistema reacional permaneceu sob agitação durante 20 min para realização da reação de derivatização (Figura 39). Observou-se que com a adição de CE os voltamogramas obtidos apresentaram as mesmas características que os da Figura 39. No entanto, os eletrodos CVNTCCOOH e CVNTCNH₂ não apresentaram resposta linear quanto as adições de CE (Figura 42), possivelmente a presença dos grupos funcionais ou de impurezas nesses NTC não apresente favorecimento da reação redox do produto da derivatização (HQ-CE) na superfície do eletrodo. Outra possibilidade é a influência dos potenciais aplicados durante a análise. Tal processo pode ter promovido a redução dos grupos funcionais presentes no eletrodo após cada análise inviabilizando a homogeneidade da superfície, sendo necessários estudos em outras faixas de potencial para melhor compreensão do mecanismo reacional envolvido no sistema.

Figura 42 – Regressões lineares para HQ-CE utilizando diferentes eletrodos de trabalho a) eletrodo CVNTCCOOH (ΔI_{pa} vs CE), b) eletrodo CVNTCCOOH (ΔI_{pc} vs CE), c) eletrodo CVNTCNH₂ (ΔI_{pa} vs CE) e em d) eletrodo CVNTCNH₂ (ΔI_{pc} vs CE).

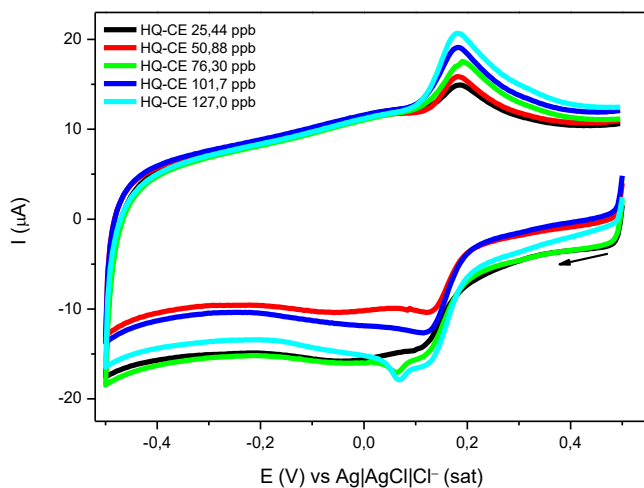


Fonte: Autora, 2019.

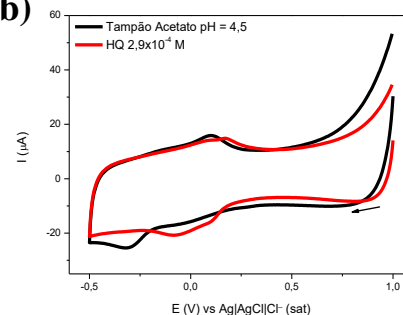
O eletrodo CVNTC apresentou resposta linear na faixa de oxidação quanto a adição de CE ao sistema contendo HQ (Figura 43). Observa-se o aumento da intensidade do sinal de HQ que pode ter ocorrido devido a fatores como: a oxidação de HQ-CE; a oxidação de produtos de HQ-CE previamente reduzidos; e/ou a ação eletrocatalítica de HQ no sistema, promovendo a transferência de elétrons reversível seguida de reação química catalítica, sendo necessários mais estudos para melhor compreensão sobre as reações, espécies e mecanismos envolvidos no sistema.

Figura 43 – a) Voltamogramas de HQ na presença de CE (25,44 – 127,0 ppb) utilizando eletrodo de CVNTC, em tampão acetato pH = 4,5 e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e em b) Voltamogramas do branco analítico e da solução de HQ ($2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), em tampão acetato pH = 4,5 e $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ e em c) curva de calibração em função de ΔI_{pa} vs CE.

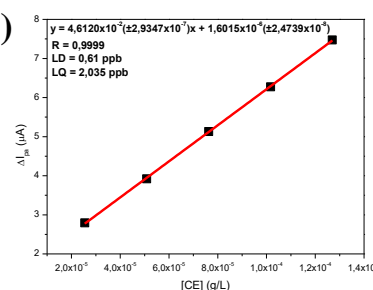
a)



b)



c)



Fonte: Autora, 2019.

Com base na resposta de oxidação e a regressão linear obtida pelas adições de CE no sistema contendo HQ utilizando eletrodo CVNTC, calculou-se o LD e o LQ, obtendo-se 0,61 ppb e 2,035 ppb, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação estão muito abaixo das concentrações de CE permitidas pela legislação vigente, o que o torna bastante promissor para seu uso, além de possibilitar rastrear concentrações bem menores, podendo ser utilizado como parâmetro de qualidade do produto. Assim pode-se concluir que a HQ é um agente derivatizante muito eficiente para o sistema proposto. No entanto, a elevada reatividade da HQ com outros compostos que podem estar presentes em amostras reais, pode inviabilizar o seu uso, sendo necessário o desenvolvimento de estudos em presença de possíveis interferentes como Cu, Pb e carbamato de metila.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho desenvolveu um método eletroquímico para detecção e quantificação de CE (não apresenta sinal eletroquímico). Foram avaliados dois agentes derivatizantes: o XT e a HQ. Utilizando o XT foi possível a determinação indireta de CE através da redução do pico de XT e/ou da oxidação do produto provavelmente formado pelo intermediário de redução de XT e o CE, gerando provavelmente CEX como produto reacional.

No eletrodo de CV, o XT apresentou natureza adsorptiva, obteve-se melhores resultados com NTC funcionalizado com grupos NH_2 observando-se natureza difusional e linearidade quanto a adições de CE, cujos LD e LQ foram 3,487 e 11,62 ppb, bem abaixo do limite máximo permitindo na legislação. Apesar de apresentar potencial de uso, este método não apresentou repetibilidade.

Foi desenvolvido o eletrodo PXT1 à base de pasta de carvão vegetal ativado, óleo mineral e 10% de XT que apresentou sensibilidade. No entanto, também não se observou repetibilidade, dentre os métodos avaliados utilizando XT. O desenvolvimento do eletrodo PXT2 que permite a troca de toda a pasta utilizada após cada análise apresentou o melhor resultado, proporcionando linearidade, repetibilidade, LD e LQ de 0,2623 e 0,8742 ppb, o método permitiu a detecção de CE em amostra de cachaça comercial, a qual apresentou 21,13 ppb de CE.

Utilizando a HQ, o eletrodo modificado com NTC sem tratamento mostrou linearidade, obtendo-se LD e LQ de 0,61 e 2,035 ppb, respectivamente. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a repetibilidade do sistema, além de estudos com interferentes, visto que a HQ apresenta elevada reatividade.

7. PERSPECTIVAS

Realizar estudo elaborado de prováveis interferentes comumente presentes em cachaças utilizando o eletrodo PXT2.

Realizar estudos quanto a viabilidade e otimização do uso da HQ como agente derivatizante para determinação de CE.

Promover a validação dos métodos propostos através do uso da técnica oficialmente recomendada na legislação (CG-EM).

8. REFERÊNCIAS

ADAM, A. M. A.; REFAT, M. S.; SAAD, H. A. Utilization of charge-transfer complexation for the detection of carcinogenic substances in foods: Spectroscopic characterization of ethyl carbamate with some traditional π -acceptors. **Journal of Molecular Structure**, v. 1037, p. 376–392, 2013.

ALBERTS, P.; STANDER, M. A.; DE VILLIERS, A. Development of a novel solid-phase extraction, LC-MS/MS method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages: Application to South African wine and spirits. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 28, n. 7, p. 826–839, 2011.

ALCARDE, A. R.; SOUZA, L. M.; BORTOLETTO, A. M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. Part 2: Influence of type of pot still. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 4, p. 352–355, 2012.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G. DE et al. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Quimica Nova**, v. 25, n. 6, p. 1074–1077, 2002.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G. et al. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 116–119, 2009.

ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2819–2824, 2001.

BAFFA JÚNIOR, J. C. **Mecanismos De Formação Do Carbamato De Etila Durante a Produção E Estocagem De Aguardente De Cana-De-Açúcar**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 7-60. 2011.

BARD, A. J. et al. **Electrochemical methods - Fundamentals and Applications**. 2ª edição ed. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.: John Wiley & Sons, INC, 2001.

BEZERRA, C. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos com utilização de nanotubos de carbono e diferentes mediadores na determinação de peróxido de hidrogênio e epinefrina**. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, p. 21-30. 2014.

BONI, T. C. **Desenvolvimento e aplicação de sensor biomimético descartável para detecção seletiva de hidroquinona**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, p. 33-60. 2011.

BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Assessment of Ethyl Carbamate Contamination in Cachaça (Brazilian Sugar Cane Spirit). **Beverages**, MDPI, v. 28 p. 1–9, 2016.

BRASIL. Instrução Normativa N° 13, de 29 de Junho de 2005. In: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2005. p. 3.

BRASIL. Regulamento Técnico sobre Disposições para Embalagens, Revestimentos, Utensílios, Tampas e Equipamentos Metálicos em Contato com Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. Resolução, 2007.

BRASIL. Instrução normativa N° 28, de 8 de agosto de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 72315, 2014.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electroquímica - Princípios, métodos e aplicações**. 1ª edição, ed. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.

BRUNO, S. N. F. et al. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1345–1352, 2007.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.

CALAÇA, G. N. **Desenvolvimento de métodos voltamétricos utilizando**

planejamento fatorial para determinações simultâneas de associações farmacêuticas e cosméticas. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Estadual de Londrina e Universidade Estadual do Centro Oeste, Ponta Grossa, p. 39-41. 2015.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (CE) N.º 2073/2005. **Jornal Oficial da União Europeia**, p. 1–26, 2005.

COOK, R. et al. Ethyl Carbamate Formation in Grain-Based Spirits: Part Iii. the Primary Source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, n. 4, p. 233–244, 1990.

COSTA, E. DE O. **Desenvolvimento de sensor nanoestruturado e biossensor de dsDNA para determinação de substâncias de interesse biológico: Nitrotirosina, ácido ascórbico e ácido úrico.** Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, p. 22-28. 2016.

DANIEL, I.; BARRETO, D. C. Fluxo das Exportações Brasileiras de Cachaça : traços da influência do. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, n. 4, p. 733–750, 2017.

DE ALMEIDA LIMA, U. et al. Influence of fast and slow distillation on ethyl carbamate content and on coefficient of non-alcohol components in Brazilian sugarcane spirits. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 3, p. 305–308, 2012.

DE ANDRADE LIMA, A. C. et al. Electrochemical behavior of metribuzin on a glassy carbon electrode in an aqueous medium including quantitative studies by anodic stripping voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1698–1704, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (Regulamento (CE)) N.º 1272/2008 de 16 de Dezembro de 2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas. **Jornal Oficial da União Europeia**, p. L353/1-L353/1355, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants (Question N o EFSA-Q-2006-076). **The EFSA Journal**, n. September 2007, p. 1–44, 2008.

FAO/WHO. **Safety evaluation of certain contaminants in food.** [s.l.: s.n.].

FERREIRA, C. A. **Complexos de dopamina com albumina como modelo para etiquetagem eletroquímica de proteínas desprovidas de centros redox metálicos.** Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas. 2010.

GALINARO, C. A. et al. Cyanate as an active precursor of ethyl carbamate formation in sugar cane spirit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 33, p. 7415–7420, 2015.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Formação de carbamato de etila em aguardentes recém-destilladas; proposta para seu controle. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 996–1000, 2011.

GOMES, A.; FILHO, D. S. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Quimica Nova**, v. 30, n. 7, p. 1695–1703, 2007.

GOWD, V. et al. Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant. **Food Chemistry**, v. 248, n. November 2017, p. 312–321, 2018.

GUERREIRO, T. M. et al. New Approach of QuEChERS and GC-MS Triple-Quadrupole for the Determination of Ethyl Carbamate Content in Brazilian cachaças. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. April, p. 1–9, 2018.

GUO, J. et al. Redox activity and accelerating capacity of model redox mediators during bionitrification. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 4, p. 673–679, 2015.

HELENA, M.; SPOTO, F. Influence of thermal treatment of wood on the aroma of a sugar cane spirit (cachaça) model-solution. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 427–429, 2011.

HUANG, Z. et al. Validation (in-house and collaborative) of the quantification method for ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by GC-MS. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4161–4165, 2013.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **WHO-**

International Agency for Research on Cancer, v. 92, 2010.

IBRAC. **IBRAC celebra crescimento das exportações de cachaça em 2016**. Disponível em: <<http://www.ibrac.net/index.php/noticias/cachaca-na-midia/509-ibrac-celebra-crescimento-das-exportacoes-de-cachaca-em-2016>>. Acesso em: 24 maio. 2018.

JAGERDEO, E. et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5797–5802, 2002.

JIAO, Z.; DONG, Y.; CHEN, Q. Ethyl carbamate in fermented beverages: Presence, analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation proposals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 611–626, 2014.

JÚNIOR, W. P. **Eletrodos quimicamente modificados a partir de nanotubos de carbono e nitroanilinas e sua aplicação na determinação de antioxidantes de importância biológica**. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, p. 2-9. 2016.

LA-SCALEA, M. A. et al. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 371-383, 2007.

LELIS, V. G. et al. Ocorrência de carbamato de etila em cachaças de alambique e em aguardentes industriais. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 467–474, 2014.

LIMA, A. D. J. B. et al. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 845–848, 2009.

LIU, J.; XU, Y.; ZHAO, G. Rapid determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 2, p. 217–222, 2012.

LU, X.; ZHOU, N.; TIAN, Y. Spectrophotometric determination of ethyl carbamate through bi-enzymatic cascade reactions. **Analytical Methods**, v. 7, n. 4, p. 1261–1264, 2015.

LUO, L. et al. Analytica Chimica Acta Development of an indirect ELISA for the determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 950, n. 483, p. 162–169, 2017.

MANLEY, M.; VAN ZYL, A.; WOLF, E. E. H. The Evaluation of the applicability of FT NIR spectroscopy in the measurement of analytical parameters in must and wine.pdf. **S. Afr. J. Enol. Vitic.**, v. 22, n. 2, p. 93–100, 2001.

MARIA, A. N. A. et al. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos : caracterização e quantificação em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com acondicionadas em vidros e “ bombonas ” de pead.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 22-100. 2010.

MENDONÇA, J. G. P. et al. Determination of ethyl carbamate in cachaças produced by selected yeast and spontaneous fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 1, p. 63–68, 2016.

MILANI, M. I. et al. Paper platform for reflectometric determination of furfural and hydroxymethylfurfural in sugarcane liquor. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 286–292, 2017.

MINNIKANTI, S.; SKEATH, P.; PEIXOTO, N. Electrochemical characterization of multi-walled carbon nanotube coated electrodes for biological applications. **Carbon**, v. 47, n. 3, p. 884–893, 2008.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Report on Carcinogens, Urethane. **Report on Carcinogens, Fourteenth Edition**, n. Iarc 1974, 2009.

NÓBREGA, I. C. C. et al. Improved sample preparation for GC-MS-SIM analysis of ethyl carbamate in wine. **Food Chemistry**, v. 177, p. 23–28, 2015.

P. HERBERT, L. SANTOS, M. BASTOS, P. BARROS, A. A. A. New HPLC Method to Determine Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1616–1620, 2002.

PAPAN, A. et al. Synthesis of a Novel Cyclotriphosphazene by Using Xanthidrol

Oxygen Containing Ligand. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 36, n. 6, p. 49–56, 2017.

RIACHI, L. G. et al. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. **Food Chemistry**, v. 149, p. 159–169, 2014.

SAKAI, H. R. **Cachaça**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>>.

SALAH, N. BEN; MHALLA, F. M. Mechanistic investigation of xanthene oxidation by heterogeneous and homogeneous electron transfers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 485, n. 1, p. 42–48, 2000.

SHIN, H. S.; YANG, E. Y. Simultaneous determination of methylcarbamate and ethylcarbamate in fermented foods and beverages by derivatization and GC-MS analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1, 2012.

SILVA, E. G. DA. **Estudo da interação de carreadores com compostos naturais bioativos, via espectroscopia e eletroquímica: avaliação e desenvolvimento de plataformas contendo sistemas de nanocarreadores híbridos, conjugados com pontos quânticos de CdSe/CdS**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, p. 20-50. 2018.

SILVA, L. V. DA. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono e polímeros de ácido ferúlico e capsaicina para detecção e quantificação de 3-nitro-L-tirosina, epinefrina e dopamina**. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, p.22-90. 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, INC, 2007.

SKOOG, WEST, HOLLER, C. **Fundamentos de química analítica**. 9^a edição ed. [s.l.] Cengage Learning, 2014.

TOLEDO, J. F. A. DE; FARIA, J. B. Método Níquel-Raney E Aceitabilidade De Amostras De Cachaça. **Alim. Nutr.**, v. 15, p. 51–54, 2004.

UBEDA, C. et al. Validation of an analytical method for the determination of ethyl carbamate in vinegars. **Talanta**, v. 89, p. 178–182, 2012.

UNIÃO EUROPEIA, R.; COMISSÃO, D. A. Relativa à prevenção e redução da contaminação com carbamato de etila das aguardentes de frutos com caroço e das aguardentes de bagaço de frutos com caroço. **Jornal Oficial da União Europeia**, p. 8–12, 2016.

WEBER, J. V.; SHARYPOV, V. I. Ethyl carbamate in foods and beverages: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 3, p. 233–247, 2009.

WHO. **Evaluation of certain food contaminant**. Series 930 ed. Geneva: World Health Organization, 2006.

WU, Z. et al. Highly sensitive determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by surface-enhanced Raman spectroscopy combined with a molecular imprinting polymer. **RSC Adv.**, v. 6, n. 111, p. 109442–109452, 2016.

XIA, Q. et al. Quantitative strategies for detecting different levels of ethyl carbamate (EC) in various fermented food matrices : An overview. **Food Control**, v. 84, n. 800, p. 499–512, 2018.

XU, W. et al. Electrochimica Acta Electrochemical method of pyrophosphate determination by quinone reduction. **Electrochimica Acta**, v. 300, p. 171–176, 2019.

YE, C. W. et al. Multiple headspace solid-phase microextraction of ethyl carbamate from different alcoholic beverages employing drying agent based matrix modification. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 31, p. 5063–5070, 2011.

ZACARONI, L. M. et al. Effect of light on the concentration of ethyl carbamate in

cachaça stored in glass bottles. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 238–243, 2015.

ZHANG, Z. et al. High-sensitive Electrochemical Determination of Ethyl Carbamate Using Urethanase and Glutamate Dehydrogenase Modified Electrode. **Electroanalysis**, v. 29, n. 2, p. 481–488, 2017.

ZHAO, X. et al. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. **Trends in Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 97–107, 2013.