

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós Graduação em Química  
Mestrado em Química Analítica

Diego Teixeira Delage

**USO DE ELETRODOS IMPRESSOS  
PARA ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO  
EM CACHAÇAS E METAIS PESADOS  
EM LEITE**

JUIZ DE FORA (MG)  
2010

DIEGO TEIXEIRA DELAGE

**USO DE ELETRODOS IMPRESSOS PARA ANÁLISE DO TEOR  
ALCÓOLICO EM CACHAÇAS E METAIS PESADOS EM LEITE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química – Área: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

JUIZ DE FORA (MG)

2010

Delage, Diego Teixeira.

Uso de eletrodos impressos para análise do teor alcoólico em cachaças e metais pesados em leite / Diego Teixeira Delage. – 2010.

112 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Química. 2. Etanol. 3. Metais pesados. I. Título.

CDU 54



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

UFJF  
Pós-Graduação  
em Química

A presente dissertação, intitulada “**Uso de Eletrodos Impressos para Análise do Teor Alcoólico em Cachaças e Metais Pesados em Leite**” de autoria de Diego Teixeira Delage, submetida à Comissão Examinadora abaixo assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA** em 06 de outubro de 2010.

Juiz de Fora, 06 de outubro de 2010.

*Renato Camargo Matos*  
Prof. Dr. Renato Camargo Matos  
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Felipe Silva Semaan*  
Prof. Dr. Felipe Silva Semaan  
Universidade Federal Fluminense

*Júlio César José da Silva*  
Prof. Dr. Júlio César José da Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico a meus pais Marlei e Fernando, meus avós Cleuza, Ubi (in  
memorian), Edna e Benito, minhas irmãs Raquel e Amanda e a  
minha noiva Fernanda*

*Agradeço a Deus por ter vocês perto de mim.*

*Dedico a meu orientador Renato Camargo Matos pela paciência,  
incentivo, pela oportunidade de trabalhar a seu lado e por ser um  
exemplo em muitos aspectos na minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores do departamento de química que contribuíram para minha formação com ensinamentos que farão parte da minha vida, em especial à professora Dora atenção e anos de convivência.

Aos amigos do NUPIS, desde Cabrini e Filipo até os mais recentes, pela convivência, momentos de descontração e ajuda mútua.

A Michele por ter me ajudado na execução de uma parte do trabalho, pela amizade e por ser sempre solícita a mim nos momentos de dificuldade.

Aos funcionários do departamento de química, Fernando, Serginho, Mariângela, Simone e Alice por sempre me ajudarem quando foram solicitados, em especial a Gedair.

A todos meus familiares por me apoiarem sempre, em especial a minha Tia Ana Elisa por ter me acolhido com tanto carinho.

Aos meus amigos da graduação Rafael Alvim, Humberto, Melina, Patrícia, João Vítor, Viviane, Marinez, Tais, Antônio, Dudu, Douglas e tantos outros que ficarão na minha memória por toda minha vida.

Finalmente a Deus por me proporcionar tantas alegrias e oportunidades, além de ter sido e ser meu amparo em todos os momentos de dificuldade.

À Fapemig, CAPES e PROPESQ/UFJF pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A utilização dos eletrodos impressos descartáveis vem crescendo nos últimos anos à medida que cresce a demanda por análises ambientais, farmacêuticas e industriais que requerem resultados rápidos e muitas vezes exigem a análise “in situ” das amostras. Neste sentido a aplicação de técnicas eletroanalíticas utilizando os eletrodos impressos se destaca pela facilidade de transporte, manuseio, resposta rápida e baixo custo frente a outros métodos tradicionais de análise. No presente trabalho, eletrodos impressos de cobre e ouro foram fabricados a partir de uma placa condutiva de cobre e de um *compact disc (CD)* gravável de ouro e aplicado na análise de amostras de cachaça e leite, respectivamente. O eletrodo impresso de cobre foi utilizado na determinação do teor alcoólico em amostras de cachaças da Zona da Mata Mineira, por voltametria cíclica e amperometria, sem qualquer pré-tratamento da amostra. As análises foram realizadas utilizando NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito suporte, que também desempenhou papel importante na ativação do eletrodo. Os resultados obtidos pelas duas técnicas tiveram uma forte correlação, e foram ainda comparados com o teor alcoólico expresso nos rótulos e com resultados obtidos usando um densímetro digital utilizado na determinação do teor alcoólico em alambiques. As técnicas amperométrica e voltamétrica obtiveram limites de detecção de  $0,024 \text{ \%v/v}$  e  $0,085 \text{ \%v/v}$ , respectivamente. O eletrodo impresso de ouro foi utilizado na determinação de chumbo e cobre em amostras de leite industrializado. As amostras de leite foram totalmente carbonizada a  $500 \text{ }^\circ\text{C}$ , processo auxiliado pela adição  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $30\% \text{ m/v}$ ), e posteriormente ressolubilizadas em eletrólito suporte HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Desta forma os teores de  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  foram determinados por redissolução voltamétrica anódica, e parâmetros como tempo de deposição e potencial de deposição foram otimizados para os eletrodos impressos de ouro. Os limites de detecção do método para a determinação de cobre e chumbo foram de  $0,60$  e  $0,80 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , aplicando  $-500 \text{ mV}$  como potencial de deposição por intervalos de  $120 \text{ s}$ . As concentrações de chumbo variaram entre  $50$  e  $411 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , valores acima do permitido pela legislação Brasileira que é de  $0,05 \text{ mg Kg}^{-1}$ , enquanto as concentrações de cobre variaram entre  $44$  e  $299 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , com duas amostras excedendo o valor máximo permitido de  $0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ .

Palavras-chave: Eletrodo impresso. Voltametria. Etanol. Metais.



## ABSTRACT

The use of disposable screen-printed electrodes has been growing in recent years as growing demand for environmental analysis, pharmaceutical and industrial products that require quick results and often require the analysis “in situ” samples. In this sense the application of electroanalytical techniques using screen-printed electrodes stands out for easy of transport, handling, rapid and low cost compared to other traditional methods of analysis. In this study copper and gold screen-printed electrodes were produced from a conductive plate of copper and a compact disc (CD) recordable gold and applied to analysis of samples of cachaça and milk, respectively. Copper screen-printed electrode was used to measure the ethanol content in cachaças from Minas Gerais, by cyclic voltammetry and amperometry, without any pretreatment of the sample. Analyses were performed using NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> as supporting electrolyte, which also played an important role in the activation of the electrode. The results obtained by both techniques had a strong correlation, and were compared with the alcohol content expressed on the labels and with results obtained using a digital densimeter used to determine the alcohol content in distilleries. Voltammetric and amperometric techniques obtained detection limits of 0,024% v / v and 0,085% v / v, respectively. Gold screen-printed electrode was used in the determination of lead and copper in samples of processed milk. Milk samples were completely carbonized at 500°C, a process aided by adding HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% w/v), and subsequently dissolved in HCl supporting electrolyte 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Thus the concentration of Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> were determined by anodic stripping voltammetric, and parameters such as time of deposition and deposition potential were optimized for the gold screen-printed electrodes. The limits of detection for the determination of copper and lead were 0.60 and 0.80 mg L<sup>-1</sup>, using 120 s as deposition time and -500 mV as deposition potential. The lead concentrations ranged between 50 and 411 µg L<sup>-1</sup>, values above those permitted by Brazilian law, while copper concentrations ranged between 44 and 299 µg L<sup>-1</sup>, with two samples exceeding the maximum allowed.

Keywords: Screen-printed electrode. Voltammetry. Ethanol. Metals.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b>	Publicações por ano referentes ao uso dos SPE. (Fonte: ISE Web of Knowledge para tópicos de Química e eletroanalítica – palavra-chave: <i>Screen Printed Electrodes</i> ). Até junho/2010..	21
<b>FIGURA 2</b>	Eletrodo Impresso após a impressão do substrato sobre uma superfície inerte (IV). A área de contato elétrico (I) e a superfície dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar (III) foram definidas com o auxílio de uma tinta isolante.....	22
<b>FIGURA 3</b>	(A) Placa de cobre com a forma dos eletrodos já impressos e (B) a prensa utilizada no processo de transferência.....	42
<b>FIGURA 4</b>	(A) Recipiente contendo uma solução saturada de cloreto férrico onde as placas de cobre foram imersas e (B) bomba de aquário para oxigenação da solução de cloreto férrico.....	43
<b>FIGURA 5</b>	(A) Serra da marca Ferrari e (B) a placa de cobre sem o excesso de metal sendo cortada.....	44
<b>FIGURA 6</b>	(A) Eletrodo impresso pronto para oxidação do excesso de cobre e para remoção do toner e (B) Eletrodo impresso de cobre pronto para ser utilizado. (I) Eletrodo de trabalho, (II) Eletrodo de referência e (III) Eletrodo auxiliar.....	45
<b>FIGURA 7</b>	Eletrodo impresso de cobre e seu tamanho relativo a uma moeda.....	46
<b>FIGURA 8</b>	Algumas das 15 amostras utilizadas no projeto.....	48
<b>FIGURA 9</b>	Constituição do CD-R de ouro. (A) policarbonato, (B) camada fotodegradável, (C) ouro, (D e E) filmes protetores...	49
<b>FIGURA 10</b>	CD de ouro com as trilhas já impressas.....	50
<b>FIGURA 11</b>	Voltamograma do eletrodo convencional de cobre ativado após 30 ciclos com uma velocidade de varredura de $50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	53
<b>FIGURA 12</b>	Eletrodo Impresso de cobre ativado após 30 ciclos com uma velocidade de varredura de $50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	54
<b>FIGURA 13</b>	Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de cobre em $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ antes (A) e após (B) a adição de 5 % v/v de etanol. R representa a região de oxidação do etanol.	

	Velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> . Velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> .....	55
<b>FIGURA 14</b>	Esquema demonstrando a eletrocatalise realizada pelo Cu(III) na oxidação do etanol.....	56
<b>FIGURA 15</b>	Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de cobre em NaOH 1 mol L <sup>-1</sup> antes e após a adição de etanol. Velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> .....	58
<b>FIGURA 16</b>	Curva analítica da adição de etanol variando de 1% a 10% v/v.....	58
<b>FIGURA 17</b>	Gráfico de resíduos da curva analítica de etanol.....	59
<b>FIGURA 18</b>	Cela eletroquímica para análise voltamétrica de etanol em cachaça. Eletrodo impresso de cobre introduzido em um béquer de 5 mL contendo 4,00 mL de NaOH 1,0 mol L <sup>-1</sup> .....	60
<b>FIGURA 19</b>	Voltamogramas cíclicos para a amostra Ouro Verde e padrões de etanol. Parâmetros instrumentais e analíticos estão apresentados nas tabelas 3 e 4.....	61
<b>FIGURA 20</b>	Curva de adição de padrão da amostra Ouro Verde.....	62
<b>FIGURA 21</b>	Voltamogramas cíclicos para a amostra Deixa Vir e padrões de etanol. Parâmetros instrumentais e analíticos estão apresentados nas tabelas 3 e 4.....	62
<b>FIGURA 22</b>	Curva de adição de padrão da amostra Deixa Vir.....	63
<b>FIGURA 23</b>	Amperogramas obtidos para adições sucessivas de etanol 1 %, 2 %, 3 %, 4 % v/v em 4,00 mL de eletrólito suporte (NaOH 1,0 mol L <sup>-1</sup> ).....	65
<b>FIGURA 24</b>	Amperogramas obtidos no estudo do potencial de pré-tratamento aplicado ao eletrodo de trabalho para gerar as espécies eletrocatalíticas.....	66
<b>FIGURA 25</b>	Amperograma obtido para a análise de etanol na amostra Serrana. Parâmetros instrumentais estão apresentados na tabela 6.....	68
<b>FIGURA 26</b>	Curva de adição de padrão da amostra Serrana.....	68
<b>FIGURA 27</b>	Amperograma obtido para a análise de etanol na amostra Montana de Salinas. Parâmetros instrumentais estão apresentados na tabela 6.....	69

<b>FIGURA 28</b>	Curva analítica da amostra Montana de Salinas.....	69
<b>FIGURA 29</b>	Voltamogramas cíclicos para adições de glicose nas mesmas condições de análise do etanol. Parâmetros instrumentais e analíticos estão apresentados nas tabelas 3 e 4.....	72
<b>FIGURA 30</b>	Cromatograma da adição de padrão de glicose, na concentração de 500 mgL <sup>-1</sup> .....	73
<b>FIGURA 31</b>	Cromatograma da adição da amostra Deixa Vir. Condição de derivatização da amostra: 2 mL de amostra + 1 mL de PABA + 25 mg de cianoboroidreto. Na área de detecção da glicose não foi observado sinal.....	73
<b>FIGURA 32</b>	Densímetro digital utilizado na determinação do teor alcoólico das amostras de cachaça. O compartimento de análise está representado por A e a ponteira por B.....	75
<b>FIGURA 33</b>	Comparação dos resultados obtidos entre a técnica amperométrica e pelo densímetro digital para a determinação de etanol em amostras de cachaça.....	78
<b>FIGURA 34</b>	Comparação dos resultados obtidos entre a técnica voltamétrica e pelo densímetro digital para a determinação de etanol em amostras de cachaça.....	78
<b>FIGURA 35</b>	Comparação dos resultados obtidos entre a técnica voltamétrica e amperométrica para a determinação de etanol em amostras de cachaça.....	79
<b>FIGURA 36</b>	Variação do potencial de deposição para a análise de cobre e chumbo. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.....	82
<b>FIGURA 37</b>	Estudo do potencial de deposição para a quantificação do chumbo. Eletrólito HCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> , [Pb] = 80 µg L <sup>-1</sup> e [Cu] = 16 µg L <sup>-1</sup> .....	82
<b>FIGURA 38</b>	Variação do tempo de deposição. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.....	83
<b>FIGURA 39</b>	Estudo do tempo de deposição para o chumbo. Eletrólito HCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> , [Pb] = 80 µg L <sup>-1</sup> e [Cu] = 16 µg L <sup>-1</sup> .....	84

<b>FIGURA 40</b>	Variação do degrau de pulso na determinação de cobre e chumbo. A = 30 mV, B = 3 mV e C = 0,3 mV. Eletrólito HCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> , [Pb] = 14 µg L <sup>-1</sup> e [Cu] = 16 µg L <sup>-1</sup> .....	85
<b>FIGURA 41</b>	Variação da amplitude de pulso na determinação de cobre e chumbo. A = 28 mV, B = 24 mV e C = 20 mV. Eletrólito HCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> , [Pb] = 14 µg L <sup>-1</sup> e [Cu] = 16 µg L <sup>-1</sup> .....	85
<b>FIGURA 42</b>	Variação da freqüência do pulso na determinação de cobre e chumbo. A = 10 Hz, B = 15 Hz e C = 20 Hz. Eletrólito HCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> , [Pb] = 14 µg L <sup>-1</sup> e [Cu] = 16 µg L <sup>-1</sup> .....	86
<b>FIGURA 43</b>	Influência do eletrólito suporte na sensibilidade. As concentrações de HCl foram de 1,0 mol L <sup>-1</sup> (A), 0,50 mol L <sup>-1</sup> (B) e 0,10 mol L <sup>-1</sup> (C).....	88
<b>FIGURA 44</b>	Influência do eletrólito suporte na análise de Chumbo.....	88
<b>FIGURA 45</b>	Influência do eletrólito suporte na análise de Cobre.....	89
<b>FIGURA 46</b>	Organograma de abertura da amostra. A: mistura do leite com ácido e peróxido; B: a solução é aquecida até a secura; C: a amostra é então levada à mufla por 3 horas a 500 °C e D: cinzas prontas para ser solubilizadas.....	90
<b>FIGURA 47</b>	Variação das concentrações de chumbo frente aos parâmetros da tabela 14. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.....	92
<b>FIGURA 48</b>	Variação da concentração de cobre frente aos parâmetros da tabela 14. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.....	93
<b>FIGURA 49</b>	Variação da concentração de cobre e chumbo frente aos parâmetros da tabela 14. A concentração de chumbo variou de 0 a 36 µg L <sup>-1</sup> , já o cobre variou de 0 a 24 µg L <sup>-1</sup> .....	94
<b>FIGURA 50</b>	Curva de calibração para o chumbo.....	94
<b>FIGURA 51</b>	Curva de calibração para o cobre.....	95
<b>FIGURA 52</b>	Adição de padrão de cobre e chumbo para a análise da amostra 8.....	96
<b>FIGURA 53</b>	Curva de adição de padrão para o chumbo referente à amostra 8.....	96
<b>FIGURA 54</b>	Curva de adição de padrão para o cobre referente à amostra 8.....	97

<b>FIGURA 55</b>	Adição de padrão de cobre e chumbo para a análise da amostra 6.....	97
<b>FIGURA 56</b>	Curva de adição de padrão para o chumbo referente à amostra 6.....	98
<b>FIGURA 57</b>	Curva de adição de padrão para o cobre referente à amostra 6.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Amostras de cachaças mineiras analisadas.....	47
<b>TABELA 2</b>	Amostras de leite analisadas.....	52
<b>TABELA 3</b>	Parâmetros instrumentais para a determinação voltamétrica de etanol.....	60
<b>TABELA 4</b>	Parâmetros analíticos para a determinação voltamétrica de etanol.....	60
<b>TABELA 5</b>	Concentrações de etanol nas amostras de cachaça analisadas, intervalo de confiança, valores indicados pelo fabricante e valor de t determinado para cada amostra. O valor de t tabelado é de 4,303 a um nível de confiança de 95%.....	64
<b>TABELA 6</b>	Parâmetros instrumentais para a determinação amperométrica de etanol.....	67
<b>TABELA 7</b>	Concentrações de etanol nas amostras de cachaça analisadas, intervalo de confiança, valores indicados pelo fabricante e valor de t determinado para cada amostra. O valor de t tabelado é de 4,303 a um nível de confiança de 95%.....	70
<b>TABELA 8</b>	Resultados obtidos pelo densímetro digital (índice D) comparado aos resultados voltamétricos (índice V) e amperométricos (índice A) para a determinação de etanol em cachaça, intervalo de confiança e o valor indicado pelo fabricante.....	76
<b>TABELA 9</b>	Avaliação qualitativa do grau de correlação de Pearson entre duas variáveis.....	77
<b>TABELA 10</b>	Resultados da análise da amostra de referência.....	91
<b>TABELA 11</b>	Parâmetros eletroquímicos.....	92
<b>TABELA 12</b>	Concentrações de cobre e chumbo nas amostras de leite analisadas e intervalo de confiança.....	99
<b>TABELA 13</b>	Variação das concentrações de chumbo e cobre nas amostras analisadas.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SPE	<i>Screen Printed Electrods</i>
HMLs	<i>home-made inks</i>
ppb	Parte por bilhão
SVAVL	Stripping voltamétrico anódico de varredura linear
Bi-SPCE	Eletrodos impressos modificados com bismuto
Au-SPCE	Eletrodos Impressos de carbono modificados com ouro
Ni-SPCE	Eletrodos Impressos de carbono modificados com níquel
Hg-SPCE	Eletrodos Impressos de carbono modificados com mercúrio
AC	Acetilcolinesterase
AC-SPE	Eletrodos Impressos de carbono modificados com acetilcolinesterase
TC	Tiocolina
GOx	Glicose oxidase
GD	Glicose desidrogenase
AOx	Álcool oxidase
ADH	Álcool desidrogenase
IE-SPE	Eletrodos impressos modificados com antígenos-anticorpos (Imunossensores)
VTG	Vitelogenina
SPCEs	Eletrodos impressos sem modificação
Ag-SPE	Eletrodo impresso à base de prata
JECFA	Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives
p.c.	Peso corpóreo
OMS	Organização Mundial da Saúde
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
PSA	Potentiometric Stripping Analysis
EIs	Eletrodos impressos
CD	Compact disc
USP	Universidade de São Paulo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
PABA	Ácido para-aminobenzóico



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1. ELETRODOS IMPRESSOS (EIs).....	20
1.1.1. Eletrodos Impressos modificados por filme.....	23
1.1.2. Eletrodos Impressos modificados por nanopartículas metálicas.....	25
1.1.3. Eletrodos Impressos modificados por enzimas.....	25
1.1.4. Eletrodos Impressos modificados com anticorpos.....	29
1.1.5. Eletrodos Impressos sem modificação.....	30
1.2. CACHAÇA: PRODUÇÃO, LEGISLAÇÃO E O ETANOL.....	32
1.3. LEITE: PRODUÇÃO, LEGISLAÇÃO, COBRE E CHUMBO.....	35
1.4. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DIRETA DE METAIS EM AMOSTRAS COM ALTO TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA.....	38
<b>2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS</b> .....	39
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	40
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	40
3.2. INSTRUMENTAÇÃO.....	41
3.3. USO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE COBRE NA DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO DE CACHAÇAS MINEIRAS.....	41
3.3.1. Fabricação dos Eletrodos Impressos de cobre.....	41
3.3.2. Metodologia analítica.....	46
3.3.3. Amostras de cachaças mineiras.....	47
3.4. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS PESADOS EM LEITE USANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE COBRE.....	48
3.4.1. Fabricação dos Eletrodos Impressos de ouro.....	48
3.4.2. Metodologia analítica.....	51
3.4.3. Amostras de leite.....	51
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	52
4.1. USO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE COBRE NA DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO DE CACHAÇAS MINEIRAS.....	52

4.1.1. Ativação do Eletrodo de cobre.....	52
4.1.2. Determinação voltamétrica de etanol em cachaças mineiras.....	57
4.1.3. Determinação amperométrica de etanol em cachaças mineiras.....	64
4.1.4. Estudo da interferência da glicose.....	71
4.1.5. Determinação do teor alcoólico através de um densímetro digital.....	74
4.1.6. Comparação dos resultados obtidos por voltametria, amperometria e pelo densímetro digital.....	76
4.2. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS PESADOS EM LEITE USANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE OURO.....	80
4.2.1 Eletrodos Impressos de Ouro na análise de Metais.....	80
4.2.1.1. Potencial de deposição.....	80
4.2.1.2. Tempo de deposição.....	83
4.2.1.3. Degrau, amplitude e frequência de pulso.....	84
4.2.1.4. Concentração do eletrólito suporte.....	87
4.2.2. Digestão das amostras.....	89
4.2.3. Determinação de cobre e chumbo por voltametria de onda quadrada.....	90
4.2.3.1. Avaliação da exatidão do método analítico.....	90
4.2.3.2. Análise das amostras de leite.....	91
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>101</b>
5.1. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	102
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A química analítica busca compreender, identificar e quantificar os componentes de uma amostra seja através de métodos clássicos ou instrumentais. Nos métodos clássicos os analitos são separados através da precipitação, extração e destilação; as informações qualitativas são obtidas através de reações que fornecem produtos que podem ser conhecidos por suas cores e características específicas; já as informações quantitativas são obtidas por medidas titulométricas e/ou gravimétricas. Por outro lado métodos instrumentais utilizam propriedades físicas como a condutividade, emissão e absorção de luz, potencial de eletrodo, corrente, além das técnicas de separação como cromatografia e eletroforese capilar na obtenção de resultados qualitativos e quantitativos.

A eletroanalítica compreende um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de um analito em solução na célula eletroquímica. As técnicas eletroanalíticas estão divididas em dois grupos, as que estão relacionados com a interface eletrodo/solução e as que monitoram propriedades independentes de uma reação no nível da interface eletrodo/solução. Reações de oxiredução gerando corrente elétrica, potencial elétrico, etc, fornecem informações importantes na caracterização de analitos. A crescente necessidade no desenvolvimento de métodos para a análise “in situ”, em amostras reais, faz necessário o desenvolvimento de métodos sensíveis e precisos além de possibilitar a determinação de diversas substâncias com propriedades diferentes. Neste sentido a eletroanalítica se destaca devido à sua alta sensibilidade, seletividade, além de equipamentos portáteis e de baixo custo [1-2].

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, ambiental e alimentício, que têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como; alta sensibilidade, seletividade, estabilidade e robustez. A utilização destes sensores é necessária para análises em tempo real, em amostras “in situ”, buscando o monitoramento de contaminantes visando manter um controle de qualidade. [2]

Dentre os métodos eletroanalíticos, as análises por redissolução são as mais utilizadas como alternativa à espectroscopia absorção atômica e outras técnicas na análise de traço de substância, onde as concentrações dos analitos variam entre 0,1 e 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  de amostra, principalmente devido à etapa de pré-concentração do analito de interesse na superfície do eletrodo. As técnicas de redissolução são classificadas em voltametria de redissolução anódica (análise de metais), voltametria de redissolução catódica (análise de ânions) e voltametria de adsorção. As técnicas de redissolução derivam da polarografia onde a presença do mercúrio auxilia o processo de pré-concentração na superfície do eletrodo. Já o uso de eletrodos descartáveis tem mostrado algumas vantagens frente aos eletrodos convencionais que necessitam da utilização do mercúrio. Os eletrodos descartáveis são chamados de Eletrodos Impressos ou *Screen-Printed Electrodes* [3].

### 1.1. ELETRODOS IMPRESSOS (EIs)

Desde a década de 90 a tecnologia dos eletrodos impressos, adaptados a partir da indústria da microeletrônica, tem possibilitado a produção em alta escala, a baixo custo, com alta reprodutibilidade e robustez de sensores aplicáveis a análises de campo, o que satisfaz parcialmente a necessidade de sensores adequados às amostras de interesse industrial, ambiental e alimentício [4].

A utilização de eletrodos descartáveis vem crescendo paralelamente ao crescimento da demanda por análises onde se faz necessário um resultado rápido, confiável e uma aparelhagem de baixo custo e fácil transporte, culminando com um resultado onde não é necessário o transporte e manuseio da amostra gerando uma descentralização das análises. Outro aspecto que torna os EIs extremamente atrativos é a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos no mesmo suporte através de um processo simples e possível de ser praticado em qualquer laboratório [5].

Na figura 1 pode ser observado o crescente número de publicações nos últimos anos demonstrando o interesse da comunidade científica acerca dos eletrodos impressos, ou *Screen Printed Electrodes* (SPE) e suas aplicações em diferentes áreas de interesse.

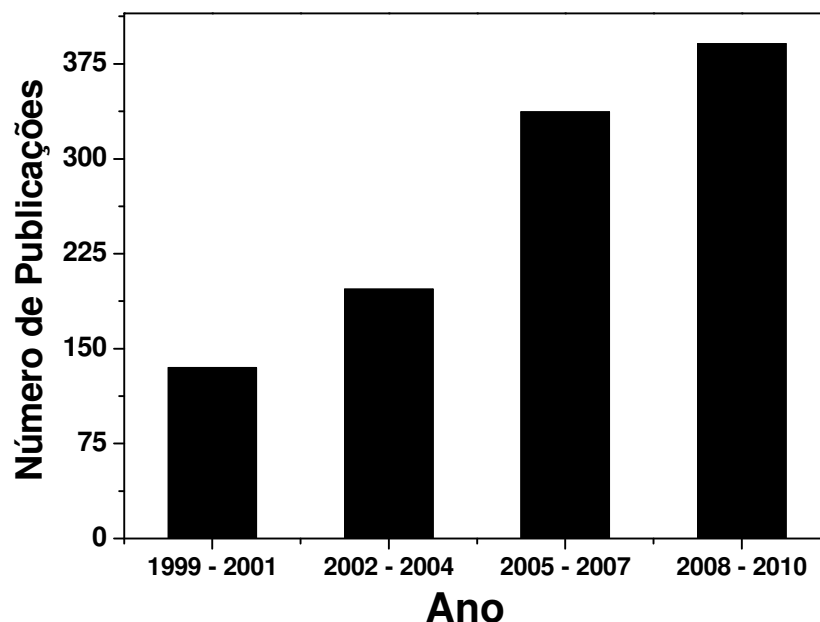


Figura 1. Publicações por triênios referentes ao uso dos SPE. (Fonte: ISE Web of Knowledge para tópicos de Química e eletroanalítica – palavra-chave: *Screen Printed Electrodes*). Até junho/2010.

Um eletrodo impresso é produzido depositando-se um filme (substrato, que são tintas utilizadas na construção de circuitos elétricos) sobre uma superfície inerte como PVC, plástico, cerâmica e mais recentemente celulose (papel). De modo geral este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um isolante (toner) para definir a área do contato elétrico em uma extremidade e outra área delimitada para ser a superfície do eletrodo, como pode ser observado na figura 2. O material usado como substrato na confecção de eletrodos voltamétricos necessita geralmente apresentar elevada inércia química e eletroquímica, esta última em uma ampla faixa de potenciais, elevado sobrepotencial para produção de hidrogênio e oxigênio, baixa corrente residual, alta condutividade elétrica e propiciar uma fácil regeneração da superfície. Estas características têm levado o carbono a ser amplamente empregado como matéria-prima para confecção de eletrodos impressos [5-7].

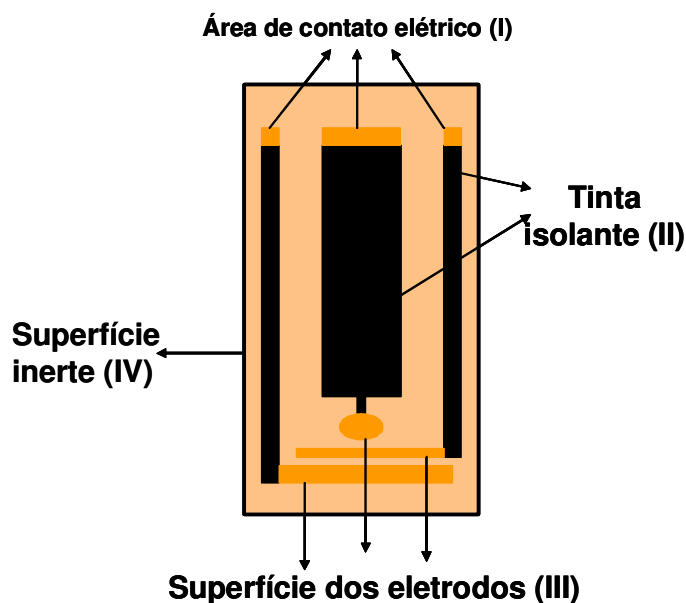


Figura 2. Eletrodo Impresso após a impressão do substrato sobre uma superfície inerte (IV). A área de contato elétrico (I) e a superfície dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar (III) foram definidas com o auxílio de uma tinta isolante.

A elaboração de eletrodos modificados descartáveis é sem dúvida o objetivo mais atrativo do emprego da tecnologia de “screen-printing” na fabricação de eletrodos. No entanto, alguns trabalhos da literatura mostram que o uso de Els não modificados representa uma alternativa extremamente atraente ao uso de eletrodos convencionais de mercúrio, carbono vítreo, metais nobres e pasta de carbono em eletroanálise. E mais, o formato planar e a facilidade de miniaturização destes eletrodos são bastante apropriados para sua integração a pequenos equipamentos portáteis [5].

Tintas condutoras e isolantes comerciais, originalmente desenvolvidas para aplicações na elaboração de circuitos impressos na área da eletrônica têm-se mostrado também apropriadas para serem utilizadas como substrato na confecção dos eletrodos impressos. Seus principais componentes são vidros ligantes (aglutinante), como borossilicatos ou aluminossilicatos e solventes, tais como etilcelulose e aditivos, dependendo da aplicação. Tintas com elevada condutividade, usadas para produção de contatos elétricos, contêm pó de

metais, tais como Au, Pt, Ag e Pd. Para aplicações especiais, como a produção de resistores, tintas a base de carbono estão disponíveis no mercado e, portanto podem ser amplamente empregadas na confecção de eletrodos impressos [8].

Com o crescimento na fabricação dos Eletrodos Impressos foi necessário o desenvolvimento de tintas apropriadas para este propósito, já que as anteriormente utilizadas eram fabricadas para outros fins. Desta forma surgiram fórmulas de preparo de tintas no próprio laboratório, as chamadas “*home-made inks*” (HMIs). A fabricação das tintas possibilita algumas vantagens como o controle da composição e de todas as etapas envolvidas no processo, permitindo a elaboração de formulações com propriedades específicas para viabilizar ou otimizar, por exemplo, a imobilização de um componente biológico no desenvolvimento de biossensores ou metais que possam eletrocatalizar uma reação eletroquímica. [9-12].

A grande versatilidade apresentada pelos eletrodos impressos reside na diversidade de formas com que estes eletrodos podem ser modificados. A composição das tintas utilizadas como substrato pode ser alterada pela adição de várias substâncias como metais, enzimas, polímeros, agentes complexantes, etc, além da possibilidade de se modificar o eletrodo já fabricado através da deposição de metais, filmes polímeros e enzimas. Desta forma os eletrodos impressos são classificados de acordo com o com a modificação do eletrodo de trabalho, sendo chamados de EI sem modificação, modificados por filme, modificados por enzima e modificado por antígeno-anticorpo. [2,3,9]

#### 1.1.1. Eletrodos Impressos modificados por filme

O carbono é o material mais utilizado como substrato na fabricação dos eletrodos impressos, pois atende bem às características citadas anteriormente, além do seu baixo custo e facilidade na modificação, pois todos os artifícios utilizados na modificação de eletrodos convencionais de pasta de carbono podem ser aplicáveis a estes Eletrodos Impressos. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura utiliza eletrodos de trabalho de grafite modificados por algum filme, como no trabalho pioneiro de Wang na determinação de chumbo em amostras de urina e água com Eletrodo Impresso de carbono modificado

com mercúrio. Posteriormente o trabalho foi estendido para a análise de Cd, Pb e Cu a níveis de ppb, demonstrando resultados satisfatórios quando comparados às análises feitas por eletrodos de carbono vítreo e de gota pendente de mercúrio [4,13]. Palchetti e colaboradores utilizaram eletrodos impressos de carbono modificados com mercúrio na determinação de Cu(II), Pb(II) e Cd(II) por stripping potenciométrico, obtendo limites de detecção de 0,8 ppb, 0,6 ppb e 0,4 ppb respectivamente, e realizou também a análise por voltametria de onda quadrada obtendo limites de detecção de 8 ppb para Cu(II), 0,4 ppb para Pb(II) e 1 ppb para Cd(II), além de outros trabalhos semelhantes [14-18].

Eletrodos Impressos de carbono modificados com mercúrio e crown-éter foram utilizados na determinação de metais no nível de traço demonstrando boa sensibilidade. Desta forma foi possível detectar Pb(II) e Cd(II) ao nível de ppb com boa reprodutibilidade, em diferentes valores de pH usando stripping voltamétrico anódico de varredura linear (SVAVL) [19].

O mercúrio vem sendo substituído na modificação dos eletrodos para análise de metais devido à sua alta toxicidade. Neste sentido eletrodos impressos de carbono modificados com bismuto também são descritos, já que apresentam características semelhantes aos modificados com mercúrio no processo de pré-concentração dos analitos utilizado nas técnicas de redissolução. Na literatura são encontrados trabalhos utilizando eletrodos impressos modificados com bismuto (Bi-SPCE) para a determinação de Cu(II), Pb(II) e Cd(II) em amostras de solo e água [20-23]. Utilizando um Bi-SPCE também foi realizada a análise de Pb(II) e Cd(II) por stripping cronoamperométrico obtendo limites de detecção de 10 e 8 ppb, respectivamente, para um tempo de deposição de 120 s [24].

Eletrodos Impressos de carbono modificados com ouro (Au-SPCE) são utilizados para a eliminação de elementos tóxicos como o Hg. Este tipo de Eletrodo Impresso foi utilizado por Wang na determinação de Pb(II) e Hg(II) demonstrando alta reprodutibilidade para ambos os elementos. Pb(II) foi analisado em amostras de água potável e água de torneira, já a análise de Hg(II) foi feita por stripping potenciométrico obtendo alta sensibilidade [25-27].

Eletrodos Impressos de carbono modificados com níquel (Ni-SPCE) foram utilizados na análise de compostos orgânicos. Slater e Dilleen realizaram um estudo comparando o Ni-SPCE com o Hg-SPCE na determinação de 2-



furaldeído, que demonstrou as vantagens dos eletrodos impressos de carbono modificados com mercúrio frente aos modificados com níquel na análise dos derivados do furaldeído [28].

#### 1.1.2. Eletrodos Impressos modificados por nanopartículas metálicas

O desenvolvimento de materiais em nanoescala vem crescendo nos últimos anos e abrindo caminho para o desenvolvimento de tecnologias que se incorporam bem à produção dos Eletrodos Impressos. Foram desenvolvidas técnicas para a síntese de nanopartículas metálicas em solução, bem como a sua deposição sobre superfícies de interesse. Dentre os vários métodos, síntese de nanopartículas metálicas por métodos eletroquímicos se destaca por ser uma alternativa fácil e rápida de ser utilizada na produção de eletrodos com nanopartículas metálica. A combinação dos Eletrodos Impressos com a eletrodeposição de nanopartículas metálicas permite a produção em massa de sensores que catalisam várias reações, o que gera dispositivos mais sensíveis quanto aos limites de detecção [29, 30].

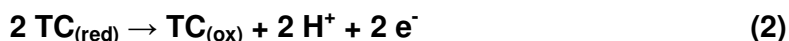
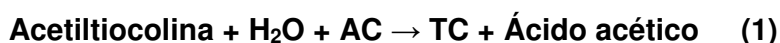
Eletrodos impressos de carbono modificados com nanopartículas de ouro e platina foram usados na determinação de  $H_2O_2$ , eletrodos impressos de carbono modificados com ouro e ácido láctico foram utilizados na análise de As(III) por stripping voltamétrico de pulso diferencial em amostras de água e na determinação de sulfito [30, 31]. Eletrodos Impressos modificados com nanopartículas de prata foram empregados na determinação de Sb(III), um poluente de grande interesse [32].

#### 1.1.3. Eletrodos Impressos modificados por enzimas

A utilização de enzimas na modificação de Eletrodos Impressos resulta nos biossensores. Apesar do alto custo referente à extração, isolamento e purificação, as enzimas são largamente utilizadas devido à especificidade com que catalisam reações específicas. O primeiro trabalho referente à utilização de eletrodos modificados com enzimas data de 1962, onde Clark e Lyons desenvolveram um biossensor para a determinação de glicose [33-34]. Os biossensores oferecem a possibilidade de análise de analitos como pesticidas,

herbicidas, metais pesados, colesterol, glicose, álcoois, peróxidos, compostos fenólicos, etc.

Com relação à análise de pesticidas e herbicidas, foi realizada a determinação de carbamatos e organofosforados baseada no processo de inibição enzimática, na maioria dos casos na inibição enzimática da acetilcolinesterase (AC) gerando os AC-SPE. A AC é imobilizada no eletrodo de trabalho e sua interação com o substrato (acetiltiocolina) produz a tiocolina (TC), uma espécie eletroativa, a qual sofre o processo de oxidação no eletrodo onde a intensidade da corrente tem relação direta com a medida quantitativa da atividade enzimática [35]. Pode-se observar os processos nas equações 1 e 2 abaixo:



A presença de pesticidas nas amostras inibi a atividade enzimática diminuindo a intensidade do sinal referente à oxidação da tiocolina que é medido. A maioria dos trabalhos descritos na literatura descreve a produção de AC-SPEs onde a superfície do eletrodo de trabalho é modificada com um mediador (a AC descrita anteriormente), contudo existem trabalhos recentes em que o mediador não é imobilizado no Eletrodo Impresso. Shi e colaboradores imobilizaram a AC em uma matriz sol-gel de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  que se demonstrou mais suscetível ao processo de imobilização, reteve a atividade da enzima por mais tempo e promoveu efetivamente o processo de transferência de elétrons entre a tiocolina e o eletrodo. Desta forma, houve a diminuição do potencial final na análise da tiocolina, o que levou também a uma diminuição na ação de interferentes e impurezas [36].

Eletrodos modificados com mediadores reduzem o potencial de trabalho, evitam efeitos de interferentes e aumentam a reversibilidade das reações no eletrodo. Bonet desenvolveu um método simples para a análise de pesticidas baseado na imobilização da acetilcolinesterase, por adsorção, à superfície do eletrodo, usando o 7,7,8,8-tetracianoquinonedimetano como mediador em pasta de grafite, o que possibilitou a oxidação da tiocolina em 100 mV. Outro método de imobilização empregado na produção AC-SPCEs é baseado no processo de cross-linking usando albumina sérica bovina e glutaraldeído. Slona

e colaboradores usaram este método na imobilização simultânea da acetilcolinesterase, tirosina, peroxidase e butirilcolinesterase em um eletrodo impresso de platina, gerando um sensor multi-enzimático, que permitiu a determinação de um grande número de compostos fenólicos e pesticidas. Sotiropoulo empregou a imobilização de acetilcolinesterase em sol-gel na determinação de pesticidas diclorados por amperometria, onde o eletrodo de trabalho de grafite usava ftalocianina de cobalto como mediador [37-41].

Metais pesados também podem ser determinados por biossensores através do processo de inibição enzimática. A enzima mais utilizada nestas determinações é a urease, e sua atuação sobre a ureia gera amônia que tem influência no pH do meio. Rutênio, prata, cobre, mercúrio e cádmio foram analisados através da ação destes metais inibindo a ação da urease [42-45].

A análise de glicose é um dos campos mais estudados quando se fala em biossensores. Os eletrodos Impressos nesta análise são modificados com glicose oxidase (GOx), onde os elétrons envolvidos nas reações redox geram correntes elétricas que são proporcionais à concentração de glicose no meio [46, 47]. Um dos trabalhos pioneiros na produção de biossensores, utilizando eletrodos impressos, foi desenvolvido por Newman e colaboradores onde a glicose oxidase era imobilizada por cross-linking com glutaraldeído e utilizava a tetratiafulvalina como mediador. Vários trabalhos são encontrados na literatura demonstrando diferentes tipos de mediadores e formas de imobilização da GOx [48].

Grande parte dos biossensores determina a concentração da glicose baseados na concentração do peróxido de hidrogênio gerado na reação da glicose com glicose oxidase de acordo com a reação abaixo.



A oxidação ou redução do peróxido de hidrogênio geralmente requerem altos potenciais de trabalho, o que implica em pouca sensibilidade. Por esta razão, estes biossensores também utilizam mediadores para diminuir o potencial de trabalho, diminuindo também a ação de uma grande parte de interferentes. Lupu e colaboradores desenvolveram um biossensor utilizando como mediador o azul da prússia, que tem como propriedade a catalização da reação de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vários trabalhos encontrados na literatura utilizam

a glicose oxidase juntamente com algum mediador na determinação de glicose [49-52].

Devido a algumas características dos biossensores utilizando GOx, algumas inovações tem sido aplicadas atualmente na produção destes dispositivos. Crouch e colaboradores demonstraram a possibilidade de fabricação de um sensor amperométrico descartável de glicose utilizando tintas de carbono a base de água. Este tipo de tinta evita problemas como a desnaturação da enzima pela ação de solventes orgânicos, não sendo necessário o tempo de cura do eletrodo, evitando problemas com altas temperaturas, o que pode ocasionar a desnaturação da enzima. Nestes trabalhos a ftalocianina de cobalto é utilizada como mediadora no processo de oxidação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na análise de glicose [53, 54]. Vários outros trabalhos são relatados na literatura demonstrando diversas formas de imobilização da enzima GOx e também a utilização de alguns mediadores [55-58].

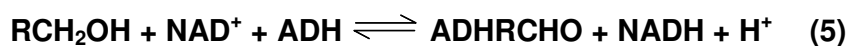
A glicose oxidase é uma enzima dependente de oxigênio, como pode ser observado na equação 3, o que pode ser um complicador em determinadas amostras, desta forma, outras enzimas são utilizadas na produção de biossensores para análise de glicose. A glicose desidrogenase (GD) tem sido utilizada como alternativa à GOx, sendo que a GD necessita da utilização de um mediador que facilite a regeneração da coenzima NAD<sup>+</sup>. Razumiene e colaboradores descrevem um biossensor para glicose utilizando GD e um derivado do ferroceno como mediador. Diversos trabalhos relatam a utilização da enzima glicose desidrogenase usando mediadores derivados do ferroceno em diferentes amostras [59-62].

Na análise do etanol são necessários métodos seletivos, sensíveis e precisos em diferentes áreas de análise. Na análise de etanol, além de metanol e álcoois alifáticos, os biossensores enzimáticos tem obtido destaque. Duas enzimas tem sido utilizadas na construção destes biossensores: a álcool oxidase (AOx) e a álcool desidrogenase (ADH). A AOx cataliza a oxidação de álcoois de baixo peso molecular em seus correspondentes aldeídos, utilizando o O<sub>2</sub> como receptor de elétrons de acordo com a reação 4 [63].



A determinação do álcool é feita diretamente pela análise do peróxido gerado. Boujita e colaboradores utilizaram eletrodos impressos de carbono modificados com AOx e CoPC na determinação de etanol em cerveja. O CoPC age catalisando a reação de oxidação do peróxido de hidrogênio. Um biossensor de baixo custo foi construído usando uma mistura de AOx com polisulfonato hidrogel que facilitou a fixação da enzima no eletrodo de trabalho de platina. Este sensor foi aplicado na determinação de etanol em amostras de vinho [64,65].

A álcool desidrogenase catalisa a reação reversível de álcoois alifáticos e aromáticos, com excessão do etanol, de acordo com a equação 5.



Na construção dos biossensores para determinação de etanol também são utilizados mediadores. Sprules e colaboradores desenvolveram um biossensor, modificando um eletrodo impresso de carbono com azul de Meldola (que é o mediador) e revestindo-o com uma mistura de ADH e NAD<sup>+</sup>. A determinação de etanol foi então realizada acompanhando a reação de oxidação amperométrica do azul de Meldola na superfície do eletrodo. Resumiene e colaboradores utilizaram derivados do ferroceno como mediadores na fabricação de sensores descartáveis para etanol baseados na enzima ADH [59-61]. Outros biossensores descartáveis para etanol utilizam partículas de rutênio que atuam eficientemente na catálise da reação de determinação do NADH liberado na oxidação do álcool [66].

#### 1.1.4. Eletrodos Impressos modificados com anticorpos

Os imunossensores são usados em pesquisas biológicas, em diagnósticos na medicina, em genética forense, testes de drogas e pesticidas. A união dos imunossensores pela complexação de específicos antígenos-anticorpos na superfície dos eletrodos impressos gera um IE-SPE. IE-SPE associados a técnicas eletroquímicas oferecem alta sensibilidade e baixo custo de análise, além de serem aparelhos miniaturizados de fácil transporte, fácil manuseio, confiáveis, baratos, e que apresentam resultados em poucos minutos [67,68].

IE-SPE são comumente usados na análise de hormônios. Butler e Guibault desenvolveram um IE-SPCE descartável para a análise amperométrica de 17- $\beta$  estradiol em água, uma vez que rios e lagos são o destino final de hormônios esteróides. Esteróides anabolizantes são utilizados para promover o crescimento de animais destinados ao abate, contudo são proibidos. Lu e colaboradores utilizaram um IE-SPCE para a determinação destes hormônios por cronoamperometria, técnica posteriormente usada na determinação de testosterona em urina bovina [69, 71].

Recentemente, a feminização de peixes machos pela exposição à hormônios femininos foi observada. Vitelogenina (VTG) é uma proteína precursora da gema de ovo que tem sido proposta como um biomarcador para xenobióticos estrogênicos, causando perturbações endócrinas. Um sensor amperométrico descartável foi desenvolvido para a detecção rápida de VTG em carpas [72].

IE-SPE foram aplicados em testes genéticos. Mutações responsáveis por doenças hereditárias, bactérias e vírus são detectáveis por suas sequências de ácidos nucléicos. Um IE-SPE foi desenvolvido para a detecção de determinadas sequências de DNA [73].

O diagnóstico de infecções em seres humanos ou animais pode ser feito por IE-SPE. Desta forma foram desenvolvidos sensores descartáveis para pneumonia, tuberculose. Também foi realizada a detecção amperométrica do vibrião colérico, agente causador da cólera, e de um imunossensor para diagnóstico para doença de chagas [74, 77].

Imunossensores foram relatados na detecção de anfetaminas, drogas amplamente consumidas por estimularem o sistema nervoso central. Na literatura são descritos trabalhos relatando a determinação de anfetaminas, por EI-SPE, em saliva e urina por amperometria [78,79].

#### 1.1.5. Eletrodos Impressos sem modificação

Existem poucos trabalhos relatando a utilização de eletrodos impressos sem modificação (SPCEs). O material mais utilizado na confecção dos SPCEs tem sido o grafite, devido à sua simples manipulação, características e baixo custo. Diferentes tipos de tintas de grafite foram testadas na análise de  $H_2O_2$ , e o melhor resultado obteve um limite de detecção de  $2,28 \mu\text{mol L}^{-1}$  [80, 81].

Utilizando eletrodos impressos de carbono sem modificação foi desenvolvido recentemente um método simples e rápido para a determinação amperométrica, por sistema de injeção em fluxo, de procaina. Os mesmos autores realizaram a determinação aurotiomalato, medicamento usado no tratamento de artrite, em amostras de urina humana. Ainda no campo das amostras reais, foi realizada a determinação de creatinina, que é um indicador de insuficiência renal, muscular e disfunções tireoidianas [82-84].

A determinação direta de clorofila por voltametria cíclica, usando SPCE, resultou em um único pico anódico irreversível em + 400mV. Investigações posteriores demonstraram a adsorção da clorofila na superfície do SPCE, o que levou ao desenvolvimento de um método para a determinação de clorofila em fezes de vacas por redissolução voltamétrica [85].

Eletrodos impressos à base de carbono foram ainda aplicados na determinação de metais pesados. Foi realizada a determinação de Pb em amostras de água por redissolução voltamétrica de pulso diferencial. Utilizando o mesmo método foi realizada a determinação de traços de Cu em amostras de água e soro bovino. A determinação de Ag(I) em soluções fotográficas foi feita por redissolução voltamétrica de onda quadrada, para baixas concentrações do analito, e por cronoamperometria para altas concentrações. Nos dois casos a determinação do metal baseava-se na adsorção dos complexos de prata/tiocianato de amônio na superfície do eletrodo [86-88].

Uma alternativa aos eletrodos fabricados com tinta de grafite, os SPCE, são os eletrodos impressos fabricados com tintas de metais como ouro e prata. Mascini e colaboradores utilizaram um eletrodo impresso à base de ouro (Au-SPE) na determinação Cu, Hg e Cd por redissolução voltamétrica de onda quadrada. Este mesmo método foi utilizado na determinação de Pb em águas residuais e amostras de solo. Um eletrodo impresso à base de prata (Ag-SPE) foi utilizado na determinação de Pb, gerando a possibilidade de desenvolvimento de um sensor descartável com limite de detecção de 0,46 ppb [89-91]. Nos últimos anos vem aumentando o interesse da comunidade científica no desenvolvimento de eletrodos sem modificação, devido principalmente aos problemas gerados no descarte de substâncias tóxicas como o mercúrio.

## 1.2. CACHAÇA: PRODUÇÃO, LEGISLAÇÃO E O ETANOL

No mercado Brasileiro podemos encontrar dois destilados de cana-de-açúcar diferentes de acordo com a definição do decreto N° 4851, de 02/12/2003; a caninha industrial e a cachaça artesanal de alambique. A primeira possui teor alcoólico de 38% a 54%, à temperatura de 20°C, obtida da destilação simples da cana-de-açúcar, em coluna contínua, com teor alcoólico corrigido pela diluição de água e adição de adoçantes (até seis gramas por litro) e corantes (para diferenciar a tonalidade da cor). Já a cachaça pura de alambique, também com teor alcoólica de 38% a 54% e à mesma temperatura de 20°C, é obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, em alambique de cobre, sem adição de açúcar, corante ou outro ingrediente qualquer. Muitos conhecem a bebida brasileira como “aguardente de cana”. Na verdade, trata-se de um termo genérico, usado para denominar os destilados brasileiros obtidos da cana-de-açúcar: a caninha industrial e a cachaça artesanal de alambique [92,93].

O mercado de cachaça conta com mais de 5.000 marcas e 30 mil produtores, responsáveis pela geração de aproximadamente 400 mil empregos diretos e indiretos. Em 2002, a produção do setor atingiu 1,3 bilhão de litros, alcançando um faturamento de US\$ 500 milhões [94]. Sendo que a produção formal foi de 800 milhões de litros e a informal de 500 milhões de litros aproximadamente. Essa é a segunda bebida alcoólica mais consumida no país, perdendo somente para a cerveja. Seu consumo é quase 5 vezes maior do que o do whisky (348 milhões de litros) e da vodca (270 milhões de litros). São Paulo se destaca no setor como o maior produtor de cachaça industrial do país (44% da produção nacional), seguido por Pernambuco (12,1%) e pelo Ceará (12%) [94]. Minas Gerais, apesar de não estar entre os primeiros colocados, tem um papel diferenciado dos outros estados por produzir uma cachaça que sobressai por técnicas de pequena produção. Segundo diagnóstico do SEBRAE/MG, Minas Gerais possui 8.460 produtores para uma produção anual de 200 milhões de litros [95].

A Europa é o principal destino da bebida brasileira, especificamente a Alemanha, principal mercado consumidor de cachaça, responsável por 30% dos embarques nacionais. Itália, Portugal, Espanha e Estado Unidos também



são grandes apreciadores da bebida, além de países vizinhos como Paraguai e Uruguai. Estes são os importadores de maior destaque entre mais de 50 países que compram o produto brasileiro. Apesar de ser o estado de maior tradição no setor e o maior produtor de cachaça artesanal, Minas Gerais tem participação insignificante nas exportações brasileiras. Do total das vendas brasileiras de cachaça para o exterior, o estado mineiro detém uma fração de apenas 2%. Os fatores responsáveis pela tímida participação mineira estão relacionados ao volume, padronização e preço [96].

Atualmente, o mercado mundial e também o brasileiro de melhor poder aquisitivo estão ávidos por produtos denominados “naturais”. O produto artesanal tem maior apelo comercial, permitindo ao micro, pequeno e médio produtores, a chance na competição com o chamado “produto industrial”, sendo imprescindível para isso que ele apresente qualidade e padrão. Para se obter uma cachaça artesanal de qualidade, é preciso colher a cana sem promover a queima do canavial e moê-la no mesmo dia, deixando a fermentação ocorrer de forma natural. Com mais de oito mil alambiques espalhados por todo o estado, sofrendo influências de suas respectivas regiões em todo processo produtivo, torna-se difícil obter um produto com relativo padrão de qualidade em termos de aroma, sabor e principalmente o teor alcoólico. A respeito do teor alcoólico o Decreto nº 2314, de 04/09/1997, artigo 91, diz que cachaça é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 48 % v/v em álcool, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar. Estes valores têm de ser respeitados para fins comerciais (exportação) e visando a saúde do consumidor [96, 97].

O etanol, quando ingerido, é rapidamente absorvido pelo trato intestinal (principalmente o intestino delgado) e cai na corrente sanguínea, provocando alterações fisiológicas. Considerado como uma droga hipnótica e sedativa deprime o sistema nervoso central, produzindo sonolência, inconsciência e coma. Embora popularmente conhecido como estimulador, o etanol inicialmente age inibindo os mecanismos de controle do cérebro, principalmente aqueles relacionados com a sobriedade, provocando normalmente expansão na personalidade e humor incontrolado. Com o aumento da intoxicação, o quadro evolui para um estado de anestesia geral. A

concentração de etanol na corrente sanguínea, que está relacionada com a intoxicação pode ser assim classificada: a) O controle motor e a capacidade crítica diminuída ocorrem normalmente com uma concentração de 20 a 30 mg por decilitro de sangue; b) Alto grau de intoxicação quando a concentração atinge 150 mg por decilitro e c) As doses fatais normalmente ocorrem em torno de 400 mg por decilitro [97].

Aproximadamente 95 % do etanol ingerido são completamente oxidados, o restante é normalmente excretado pelo rim (urina) e pelos pulmões (ar expirado). A oxidação do etanol ocorre principalmente no fígado e é realizado por duas vias metabólicas: a primeira e principal envolve as enzimas álcool-desidrogenase e acetaldeído-desidrogenase, a segunda é o sistema microsomal de oxidação do etanol através de proteínas do complexo do citocromo P-450. O produto da oxidação do etanol, o acetaldeído, é uma molécula muito reativa e pode provocar vários efeitos deletérios ao organismo (aumento da formação de peróxidos lipídicos com danos às membranas, diminuição do glutathione, cofator responsável pela eliminação de substâncias tóxicas, podendo levar a um aumento na incidência de câncer, diminuição de vitaminas e metais e diminuição do transporte e secreção de proteínas). Essas alterações levam a um aumento de células do fígado com uma maior quantidade de proteínas, lipídeos e água, que evolui para necrose e fibrose, que é uma característica da cirrose hepática [97].

Existem vários trabalhos relatando a análise de etanol em bebidas. Tubino e Barros realizaram a análise de etanol em bebidas através de um sensor capacitométrico [98], já Boujtita *et al* utilizaram um eletrodo impresso de carbono modificado com álcool oxidase na determinação indireta de etanol em cervejas através do peróxido de hidrogênio gerado na reação enzimática [99]. Outros métodos utilizados na determinação do etanol são: cromatografia a gás na análise de cervejas [100], cromatografia a líquido com detecção amperométrica na análise de urina [101], refractometria [102] e espectrofotometria [103]. A maioria destes trabalhos usa uma aparelhagem relativamente cara se comparado aos valores referentes à aparelhagem utilizada na análise por métodos eletroanalíticos.

### 1.3. LEITE: PRODUÇÃO, LEGISLAÇÃO, COBRE E CHUMBO

O leite é um composto nutritivo líquido, produzido pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos, é formado por água, uma proteína principal, a caseína, uma gordura específica, a butirina e um açúcar predominante, a lactose, ainda possui as vitaminas A, B1, B2 e minerais (cálcio especialmente) que favorecem o crescimento e a manutenção de uma vida saudável. Além do seu valor nutritivo, o leite possui uma grande importância econômica, ele está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz. O agronegócio do leite e seus derivados desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, superior à de todos os países que ocupam os primeiros lugares [104].

Internacionalmente, têm se observado várias exigências na maneira de produzir e como gerenciar a saúde dos rebanhos com relação à produção do leite. Dentre elas destacam-se: equipamentos automatizados para produzir análises com rapidez, exatidão e precisão; conhecimento da patogenia das infecções, gerando métodos de controle e prevenção de doenças importantes como a mastite; adoção de critérios gerenciais para promoção da saúde dos rebanhos, em contraposição aos conceitos tradicionais de tratamento individual dos animais; desenvolvimento de métodos epidemiológicos analíticos; e inclusão de parâmetros econômicos no gerenciamento da saúde dos rebanhos [105].

A contaminação do leite por agentes químicos é considerada um problema de Saúde Pública. Os principais perigos químicos encontrados no leite são a aflatoxina M1, resíduos de medicamentos veterinários, metais, resíduos de praguicidas, bifenilas policloradas e melamina, que chegam até o alimento após a exposição dos animais a rações contaminadas, tratamentos contra pragas, armazenamento inadequado, etc. Estas substâncias induzem efeitos agudos, crônicos, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. A qualidade dos alimentos de origem animal vem sendo amplamente debatida nos últimos anos, particularmente, devido a três 'escândalos' de segurança

alimentar: a 'doença da vaca louca' na Inglaterra, a toxiinfecção alimentar por *E. coli* 0157 em carne da Escócia e a contaminação por dioxinas em frangos na Bélgica. Para que os alimentos apresentem segurança é preciso repensar na integridade da cadeia alimentar, manuseio, transporte, armazenamento e como estes poderiam ser controlados [106].

Especificamente com relação a metais pesados, têm sido tomadas atitudes para se diminuir a contaminação. De acordo com a legislação do Ministério da Agricultura, todo vasilhame empregado no acondicionamento de leite, na ordenha, na coleta ou para mantê-lo em depósito deve ser de aço inoxidável, alumínio ou ferro estanhado, de perfeito acabamento e sem falhas [107]. Na literatura científica são relatados vários casos de intoxicação de bovinos por exposição ambiental ou ingestão de ração contaminada com chumbo e cádmio [108-111]. Sharma e colaboradores [111] observaram que a ingestão, pelos animais, de quantidades maiores que 500 mg de chumbo por dia ocasionou um aumento nos níveis de chumbo no leite, atingindo valores de cerca de  $0,06 \text{ mgL}^{-1}$ . Devido à elevada toxicidade do chumbo e cobre, mesmo em nível de traços, as autoridades sanitárias mundiais estão preocupadas em estabelecer medidas para reduzir a concentração desses metais nos alimentos, uma vez que são considerados a principal fonte de ingestão desses contaminantes. Nos Estados Unidos existe uma campanha junto às indústrias alimentícias para conscientizar da necessidade de restringir esta contaminação e preservar a saúde coletiva. Observou-se que os níveis de chumbo e cobre vêm diminuindo significativamente em função da substituição gradativa dos tipos de embalagens e soldas que possam liberá-los durante o armazenamento dos alimentos [112].

A *JECFA - Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives* – [113] estabeleceu uma Ingestão Diária Máxima Provisória de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corpóreo (p.c.) como dose diária de cobre em nível aceitável para o homem. O risco à saúde humana está relacionado com desordens do metabolismo do cobre. Apesar de apresentar baixa toxicidade, quando o cobre é absorvido em grandes quantidades, pode causar vários problemas à saúde humana. A contaminação por cobre pode causar câimbras, vômitos, necrose hepática, anemia hemolítica, inflamações, destruição da vitamina C, doença na artéria coronária

e doença de Wilson, onde há um acúmulo excessivo de cobre pelo corpo. Na doença de Menkes, onde há um distúrbio no metabolismo do cobre, ocorre o acúmulo de cobre em certos tecidos e a escassez dele em outros, podendo ser fatal para crianças em torno de três anos [114].

A Organização Mundial da Saúde – OMS demonstrou em 1995 que existe uma variação de 0,01 a 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de chumbo em leite de vaca. Devido à maior suscetibilidade das crianças ao chumbo, a avaliação dos níveis deste metal em alimentos a elas destinado, deve ser incrementada, a fim de diminuir ao máximo a ingestão diária do metal [115]. O chumbo apresenta efeitos neurotóxicos e hematotóxicos, como o quadro de anemia ferropriva, bem como a sua ação nefrotóxica [116]. A FAO/WHO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - (1996) recomendou uma Ingestão Semanal Tolerável Provisória de 0,025  $\text{mg kg}^{-1}$  p.c.. Os efeitos adversos associados com o chumbo estão relacionados com o subdesenvolvimento do sistema nervoso central do feto e do recém nascido. A contaminação pro-chumbo afeta todas as pessoas, mas as crianças estão apresentam risco mais elevado, uma vez que ainda estão em fase de crescimento. O chumbo interfere na função cerebral, atuando na liberação de neurotransmissor e na formação de sinapses. A exposição ao chumbo tem sido associada com a redução da qualidade intelectual, dificuldades de aprendizagem, crescimento lento, hiperatividade, comportamentos anti-sociais e problemas auditivos. O chumbo é conhecido por causar danos aos rins, fígado e sistema reprodutor, em processos celulares básicos e na função cerebral [117].

Têm-se feito estudos expressivos sobre a contaminação de metais pesados em leite, no entanto, os resultados diferem de acordo com as diferentes áreas de amostragem e os métodos analíticos utilizados. Dentre as principais técnicas utilizadas para análises, a espectrometria de absorção atômica tem sido a mais usada para a realização destas determinações [118, 119], assim como a espectrometria de emissão atômica [120], quanto aos métodos eletroanalíticos para tais determinações, são publicadas na literatura a análise por redissolução oxidativa [121] e a polarografia de pulso diferencial [122], no entanto, o número de estudos que empregam estas técnicas ainda são pequenos.

#### 1.4. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DIRETA DE METAIS EM AMOSTRAS COM ALTO TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA

Após a descoberta de Baker e Jenkins sobre a possibilidade de pré-concentrar espécies eletroativas na gota de um eletrodo de mercúrio conferindo grande aumento de sensibilidade, a polarografia ganhou novo impulso como técnica analítica tornando-se mais popular [123]. O processo de pré-concentração pôde ser estendido para outros eletrodos permitindo ganhos em sensibilidade na ordem de 100 a 1000 vezes e diminuição dos limites de detecção por 2 a 3 ordens de magnitude, alcançando concentrações abaixo de  $10^{-10}$  mol L<sup>-1</sup> [124]. Estas técnicas eletroanalíticas são denominadas na literatura de análise por redissolução (*Stripping Analysis*) e vêm sendo aplicadas para análises de amostras ambientais, biológicas, alimentícias e de interesse industrial. O desenvolvimento de instrumentação portátil, simples e de baixo custo aliado à característica de sensibilidade e seletividade das técnicas de análise por redissolução tornaram-na popular dentro da química analítica [125]. O desafio atual das técnicas eletroanalíticas encontra-se na miniaturização dos sistemas analíticos e análises em tempo real [126]. No uso de técnicas eletroanalíticas, a etapa de pré-tratamento da amostra torna-se um processo de extrema importância, principalmente com relação à eliminação de compostos orgânicos presentes em solução, uma vez que estes provocam a “passivação” do eletrodo através do processo de adsorção destas espécies a sua superfície, interferindo nas medidas eletroquímicas.

Jagner e Granelli demonstraram a possibilidade da análise de amostras biológicas, mais precisamente fluidos biológicos, diretamente sem qualquer pré-tratamento usando a técnica de redissolução potenciométrica (*Potentiometric Stripping Analysis, PSA*) [127]. Eles demonstraram a potencialidade da técnica, frente às técnicas de redissolução voltamétrica anódica, no que se refere à eliminação de processos de passivação do eletrodo, devido à matriz orgânica das amostras. A etapa de pré-concentração das espécies metálicas na superfície do eletrodo ocorre da mesma forma que no processo amperométrico, enquanto que na etapa de redissolução um agente químico é responsável pela oxidação das espécies no eletrodo. Dessa forma como não há corrente aplicada ao eletrodo de trabalho, espécies eletroativas orgânicas da matriz da amostra não interferem nos picos de

redissolução, ocorrendo o mesmo com o oxigênio dissolvido. Através da simples diluição da amostra no eletrólito adequado, cádmio e chumbo foram determinados em sangue, soro e urina [128-130], além de bebidas como vinho e cerveja [131, 132] e em mel [133].

Entretanto, amostras com alto teor de matéria orgânica em sua composição, como alimentos, petróleo e produtos derivados, e mesmo amostras de sedimentos são exemplos de matrizes que não permitem a determinação direta de metais por PSA ou qualquer outra técnica eletroanalítica através da simples diluição das amostras em eletrólito. Nestes casos, a matriz deve ser eliminada, ou melhor, os analitos devem apresentar-se em uma solução que possibilite a medida eletroquímica e a conseqüente determinação dos elementos.

## **2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS**

É cada vez maior o apelo da comunidade científica em identificar e quantificar os componentes possivelmente encontrados em amostras complexas. A complexidade da matriz é um desafio para os pesquisadores e a determinação de sua composição química tem vários propósitos analíticos além da simples verificação da adulteração ou controle de qualidade do alimento.

A química analítica tem sido de grande importância no controle de processos industriais, no monitoramento ambiental e em diferentes aplicações na medicina e na biotecnologia. O aumento da demanda das análises químicas e a necessidade do desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e de baixo custo capazes de fornecer informações sobre a composição de um sistema *on-line* para o monitoramento de espécies químicas têm evoluído de maneira muito acentuada. Nas últimas décadas, poucos temas geraram tanto interesse e agregou tantas áreas distintas como o desenvolvimento de sensores químicos miniaturizados.

Os sensores químicos eletroanalíticos podem responder a mais de uma espécie eletroativa ao mesmo tempo, ocasionando problemas durante a metodologia de identificação ou quantificação de um determinado componente. Frente a estes comentários e justificativas surgiu à necessidade do desenvolvimento deste trabalho que se apresenta com os principais objetivos:

- ✓ Construção de eletrodos impressos (EIs) de cobre e ouro usando placas de circuito impresso e *compact disc* (CD), respectivamente.
- ✓ Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do teor alcoólico de cachaças mineiras usando eletrodos impressos de cobre.
- ✓ Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de cobre e chumbo em amostras de leite integral usando eletrodos impressos de ouro.
- ✓ Aplicação das metodologias desenvolvidas em amostras de cachaça e leite obtidas comercialmente.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Milli-Q – Quantum Ex), com resistividade maior ou igual a  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

HCl (37 % m/v – Vetec) e NaOH P.A. (Vetec) foram utilizados para o preparo do eletrólito suporte para as análises eletroanalíticas do etanol e dos metais, respectivamente. Cloreto férrico (Vetec) foi usado na etapa de revelação dos eletrodos impressos de cobre. Tintas de carbono (Viatronic) e de prata (Pratamax) foram usadas para montar os eletrodos auxiliar e referência, respectivamente.

As soluções analíticas de etanol foram preparadas a partir de diluições da solução estoque de Etanol (95 % v/v – SIGMA).

As soluções analíticas dos metais foram preparadas a partir de diluições das soluções padrões da Titrisol  $1000 \text{ mg g}^{-1}$  (Merck) dos respectivos metais (Cu e Pb) em meio de ácido nítrico  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ . Soluções cuja concentração do metal na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram preparadas a partir das soluções estoque, por sua vez preparadas a partir das soluções  $1000 \text{ mg g}^{-1}$ .

Para os procedimentos de digestão e extração das amostras foram utilizados:  $\text{HNO}_3$  (65 % m/v – Vetec) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 % m/v - Vetec) de grau analítico.



Para as amostras de leite em pó, foi feita a análise de uma amostra de referência (Milk Powder BCR<sup>®</sup>-151 da Commission of the European Communities) adquirida da Sigma.

### 3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Para a realização de todas as medidas eletroquímicas, um potenciostato  $\mu$ Autolab Type III (EcoChemie, Utrecht, Holanda) interfaceado a um microcomputador e um agitador magnético (IKA) foram usados.

Um densímetro digital da marca Anton Paar, modelo DM 35, foi utilizado na determinação do teor alcoólico nas amostras de cachaça, a fim de comparar os resultados obtidos pela voltametria.

Serra elétrica da marca Ferrari foi usada para cortar as placas com os eletrodos impressos.

Para o pré-tratamento das amostras de leite foi usado uma chapa aquecedora da marca HT e uma mufla da marca QUIMIS.

A análise e tratamento dos dados obtidos foram realizados no GPES 4.9 e Exel 2003.

### 3.3. USO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE COBRE NA DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO DE CACHAÇAS MINEIRAS

#### 3.3.1. Fabricação dos Eletrodos Impressos de cobre

Os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar foram compactados em uma pequena área através do uso da tecnologia de *screen printing*. Para isso foi realizada a produção em alta escala de eletrodos descartáveis de cobre em placas condutoras usadas para circuito impresso.

A construção dos eletrodos impressos foi realizada no Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos do Prof. Dr. Mauro Bertotti do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Na produção dos eletrodos impressos, o primeiro passo foi utilizar o *software* Broffice para desenhar o layout desejado para a disposição dos eletrodos, bem como suas respectivas áreas. Posteriormente, as trilhas foram impressas sobre uma folha de etiqueta usando uma impressora a laser, sendo em seguida prensada, a

uma temperatura 60 °C e pressão controladas por 10 minutos, sobre uma placa de circuito impresso de cobre, conforme mostrado na figura 3.

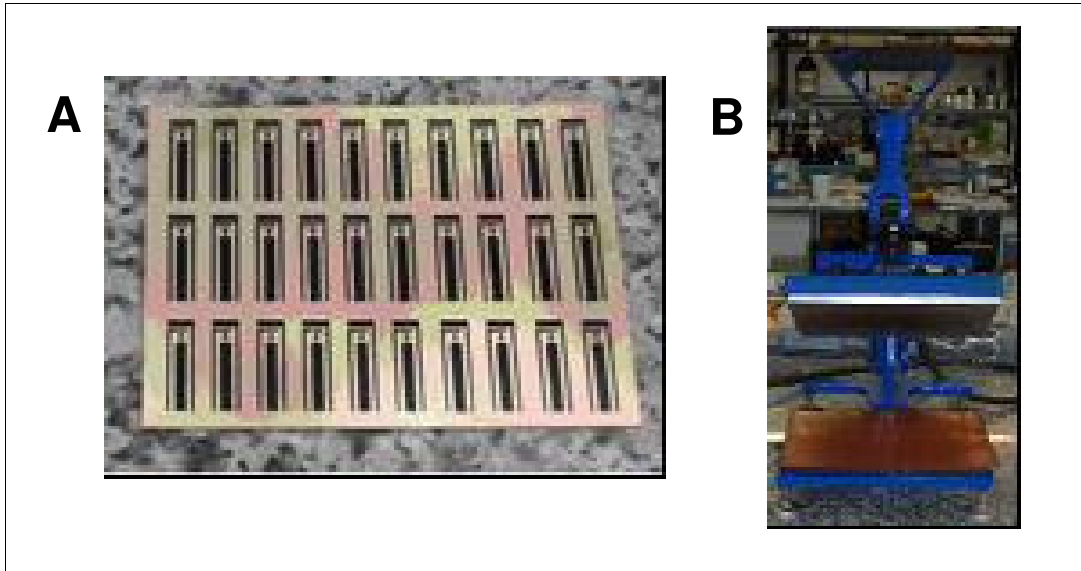


Figura 3. (A) Placa de cobre com a forma dos eletrodos já impressos e (B) a prensa utilizada no processo de transferência.

A tinta utilizada para dar forma aos eletrodos impressos (tonner) teve como finalidade proteger o metal que formou a trilha dos eletrodos (trabalho, referência e auxiliar), durante o processo de retirada do excesso de metal da placa de circuito impresso. Para a oxidação do excesso de cobre presente na placa foi usada uma solução saturada de cloreto férrico sob constante aeração, visando contribuir para o processo de oxidação do excesso de cobre, como demonstrado abaixo na figura 4.

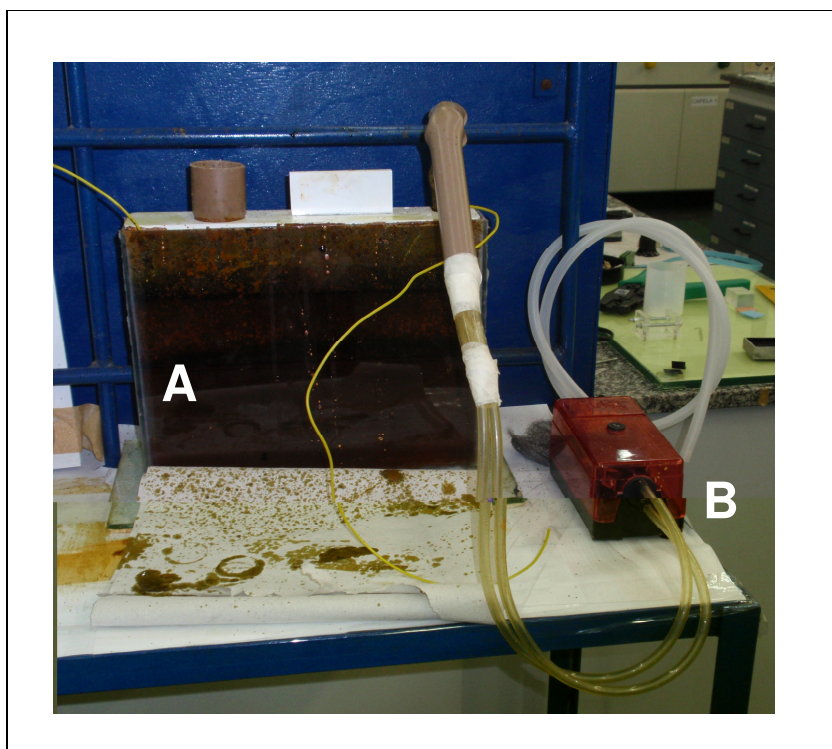


Figura 4. (A) Recipiente contendo uma solução saturada de cloreto férrico onde as placas de cobre foram imersas e (B) bomba de aquário para oxigenação da solução de cloreto férrico.

Posteriormente à oxidação do excesso de metal que não foi recoberto pelo tonner, a placa de circuito impresso foi lavada com água corrente e o conjunto de eletrodos foi cortado com o auxílio de uma serra elétrica da marca Ferrari (Figura 5), dando origem aos eletrodos com as trilhas prontas e protegidas pelo tonner da impressora. Em uma única impressão foi possível fabricar cerca de 30 eletrodos impressos de cobre, onde esse número pode ser maior a depender da dimensão da placa de circuito impresso usada.

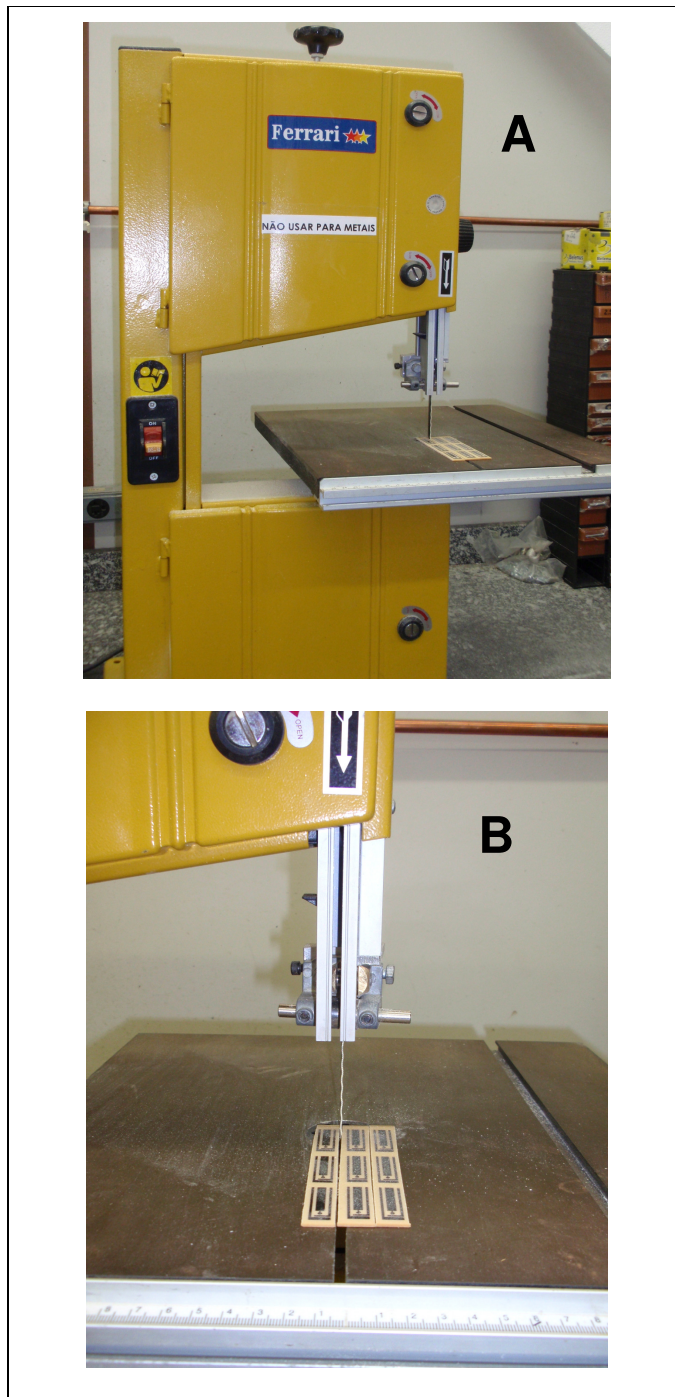


Figura 5. (A) Serra da marca Ferrari e (B) a placa de cobre sem o excesso de metal sendo cortada.

Após esta etapa os eletrodos estavam prontos para serem preparados para o uso, bastando apenas retirar a tinta isolante da superfície correspondente às áreas dos eletrodos de trabalho, referência, auxiliar e da

parte onde se conecta o eletrodo impresso ao potenciostato (figura 6A). Esta remoção foi feita com o auxílio de um solvente orgânico (acetonitrila). Como pode ser observado na figura 6B as áreas referentes aos eletrodos de referência e auxiliar são referentes às regiões onde o metal era anteriormente protegido pelo toner, e após a retirada com acetonitrila, foram recobertas utilizando tintas condutoras de prata e carbono, respectivamente. Neste trabalho utilizou-se inicialmente tintas de carbono (Viatronic) e de prata (Pratamax) vendidas comercialmente. Na figura 7 pode-se observar a dimensão final do eletrodo impresso.

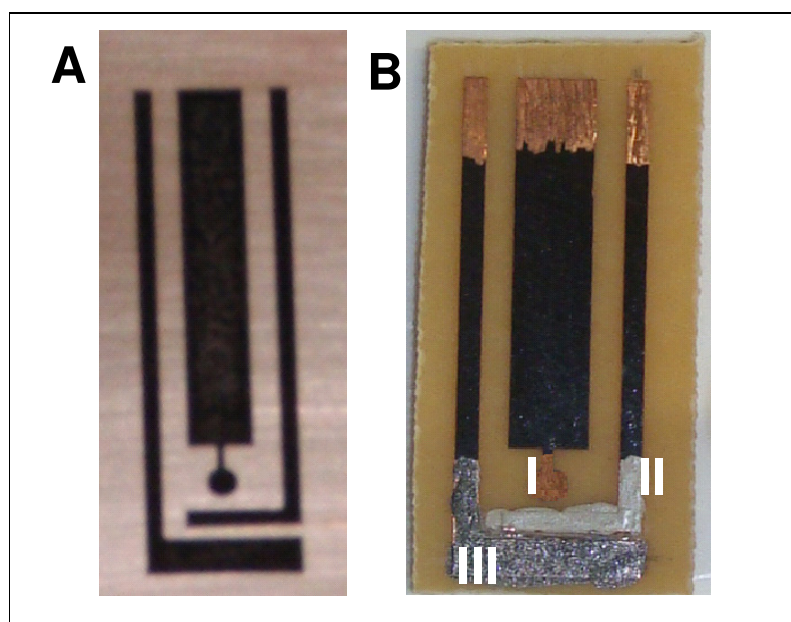


Figura 6. (A) Eletrodo impresso pronto para oxidação do excesso de cobre e para remoção do toner e (B) Eletrodo impresso de cobre pronto para ser utilizado. (I) Eletrodo de trabalho, (II) eletrodo de referência e (III) eletrodo auxiliar.

O custo final de cada eletrodo foi de aproximadamente 0,30 reais. Este valor foi calculado levando-se em consideração os preços da placa de metal, do papel de etiqueta e das tintas condutivas utilizadas.



Figura 7. Eletrodo impresso de cobre e seu tamanho relativo a uma moeda.

### 3.3.2. Metodologia analítica

As análises do teor alcoólico em cachaça foram realizadas usando duas técnicas eletroanalíticas, a voltametria cíclica e a amperometria. Na voltametria cíclica, a faixa de potencial aplicada na varredura linear variou de -0,80 a 1,10 V usando uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . A análise da amostra foi feita por adição de padrão, adicionando-se  $20 \mu\text{L}$  de álcool etílico absoluto (95 % v/v) para cada medida, o que corresponde a uma variação de concentração de 1 % v/v. A medida da corrente de oxidação do etanol nas amostras e nos padrões foram realizadas em um potencial de +0,90 V, entretanto uma faixa de potencial foi aplicada a fim de realizar a ativação do eletrodo de cobre, a qual será discutida posteriormente.

Na amperometria foram aplicados dois potenciais, +0,20 V e +0,90 V, sendo o primeiro responsável pela ativação do eletrodo de cobre e o segundo pela oxidação do etanol. As análises por amperometria também foram realizadas por adição de padrão sob agitação constante.

Tanto na voltametria quanto na amperometria as análises foram feitas adicionando-se um volume de  $75 \mu\text{L}$  de cada amostra, sem prévio pré-tratamento, na célula eletroquímica contendo 4,00 mL de eletrólito suporte,

NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>, posterior agitação e medida eletroquímica da corrente de oxidação.

### 3.3.3. Amostras de cachaças mineiras

Quinze (15) amostras de cachaça mineira foram adquiridas comercialmente para serem analisadas no projeto (Tabela 1). As amostras foram abertas minutos antes da análise e posteriormente lacradas para evitar perdas do etanol no processo de armazenamento. Todas as amostras de cachaça obtidas são da região da zona da Mata Mineira e utilizam produção artesanal em alambique de cobre. Algumas das amostras podem ser vistas na figura 8.

Tabela 1. Amostras de cachaças mineiras analisadas.

<b>AMOSTRA</b>	<b>NOME</b>	<b>PROCEDÊNCIA (MG)</b>
1	Ouro Verde	Guidoval
2	Deixa Vir	São João Nepomuceno
3	Serrana	São João Nepomuceno
4	Montana	Salinas
5	Vereda Tropical	Pedra Azul
6	Cachaça Relíquia	Coronel Murta
7	Tabaroa	Coqueiral
8	Água Marinha	Congonhas
9	C. Garrancho	Paraopeba
10	Ariana	Cláudio
11	Coluninha Ouro	Coluna
12	Coluninha Prata	Coluna
13	Mel de Minas	Januária
14	Salineira	Salinas
15	C. Saliníssima	Salinas



Figura 8. Algumas das 15 amostras utilizadas no projeto.

### 3.4. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS PESADOS EM LEITE USANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE OURO

#### 3.4.1. Fabricação dos Eletrodos Impressos de ouro

Nesta etapa do trabalho os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar foram compactados em uma pequena área através do uso da tecnologia de *screen printing*. Para isso foi realizada a produção em alta escala de eletrodos descartáveis a base de CDs de ouro.

Os CDs graváveis são constituídos por uma base de policarbonato, camada orgânica fotossensível, material defletor e um ou dois filmes de material polimérico. A camada defletora pode ser constituída por uma fina camada de ouro ou prata, cuja espessura varia entre 50 e 100 nanômetros e uma superfície com área total de 100 cm<sup>2</sup> [134-136]. A estrutura típica de um CD pode ser observada na figura 9.



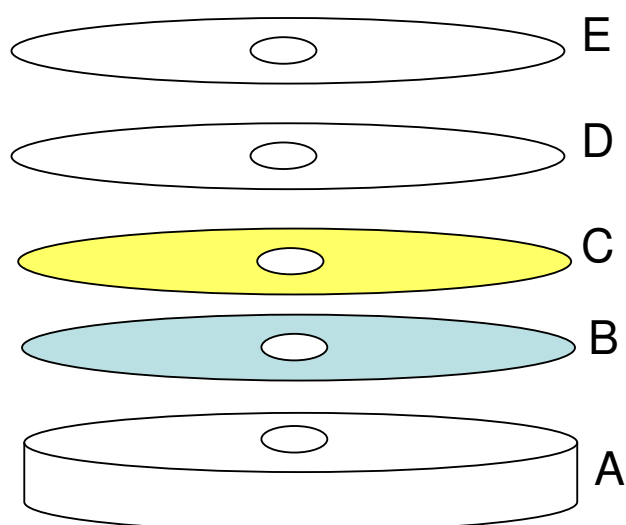


Figura 9. Constituição do CD-R de ouro. (A) policarbonato, (B) camada fotodegradável, (C) ouro, (D e E) filmes protetores

A construção dos eletrodos impressos também foi realizada no Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos do Prof. Dr. Mauro Bertotti do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Na produção dos eletrodos impressos o primeiro passo foi utilizar o *software* Broffice para desenhar a forma que se deseja para as trilhas dos eletrodos. Posteriormente, faz-se necessário retirar a camada polimérica existente no CD utilizando ácido nítrico concentrado para deixar o metal exposto para receber a máscara [137], visando à impressão das trilhas dos eletrodos. O tempo de retirada da camada polimérica é de aproximadamente 120 s e pode variar com o tipo de fabricante do CD.

Com o ouro exposto, as trilhas foram impressas sobre uma folha de etiqueta usando uma impressora a laser, como descrito no item 3.3.1, sendo em seguida prensada a uma temperatura de aproximadamente 60 °C e pressão constante controladas por 10 minutos, sobre um CD de ouro (figura 10). A prensa utilizada foi a mesma da figura 3.

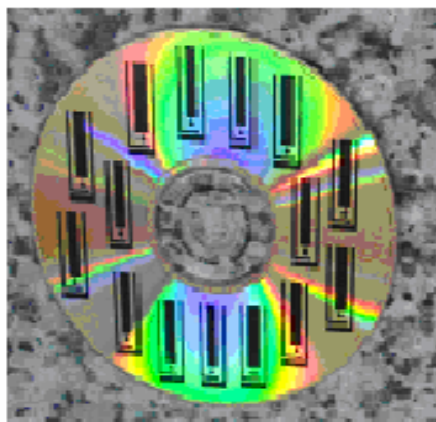


Figura 10. CD de ouro com as trilhas já impressas.

A tinta utilizada para dar forma aos eletrodos impressos (toner) teve como finalidade proteger o metal que formou a trilha dos eletrodos (trabalho, referência e auxiliar), durante o processo de retirada do excesso de metal do CD, mesmo papel desempenhado na fabricação dos eletrodos impressos de cobre. Para a oxidação do excesso de ouro presente no CD foi usada uma solução saturada de triodeto. Posteriormente a oxidação do excesso de metal, o CD foi lavado com água corrente e o conjunto de eletrodos foi cortado com o auxílio de uma serra elétrica da marca Ferrari (Figura 5), dando origem aos eletrodos com as trilhas prontas e cobertas pelo toner da impressora.

Após esta etapa os eletrodos estavam prontos para serem preparados para o uso, bastando apenas retirar a tinta isolante da superfície correspondente às áreas dos eletrodos de trabalho, referência, auxiliar e da parte onde se conecta o eletrodo impresso ao potenciostato. Esta remoção também foi feita com o auxílio da acetonitrila. As áreas dos eletrodos de referência e auxiliar foram cobertas da mesma forma do que os eletrodos de cobre, como pode ser observado na figura 6B. Neste trabalho utilizou-se inicialmente tintas de carbono (Viatronic) e de prata (Pratamax) para revestir respectivamente os eletrodos de referência e auxiliar.

### 3.4.2. Metodologia analítica

As amostras foram pesadas como alíquotas de leite de 5,00 mL em cadinhos de porcelana, em seguida foram adicionados 2 mL de ácido nítrico concentrado e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30 % v/v, posteriormente essas amostras foram aquecidas até a secura em uma chapa elétrica. Em uma segunda etapa, as amostras ainda nos cadinhos foram levadas à mufla e acondicionadas a uma temperatura de 500 °C por duas horas, provocando a completa calcinação do material. As cinzas contendo os metais foram solubilizadas a um volume final de 5,00 mL em um balão volumétrico com eletrólito suporte (HCl 100 mmol L<sup>-1</sup>).

A técnica utilizada para a quantificação dos metais nas amostras de leite foi a voltametria de onda quadrada, onde foi mantido um potencial de pré-concentração de -0,5 V durante um tempo de 120 segundos e posterior varredura do potencial até 0,4 V.

A análise foi realizada por adição de padrão, utilizando as soluções analíticas dos metais preparadas a partir da diluição das soluções padrões dos metais Cu e Pb em meio de ácido nítrico 0,30 mol L<sup>-1</sup>.

As análises foram feitas adicionando 100 µL de amostra tratada na célula eletroquímica contendo 3,90 mL de eletrólito suporte, HCl 100 mmol L<sup>-1</sup>, posterior agitação e medida eletroquímica.

### 3.4.3. Amostras de leite

Nove amostras de leite integral foram adquiridas comercialmente em padarias e supermercados da cidade de Juiz de Fora para serem analisadas (Tabela 2). Antes do processo de pré-tratamento, as amostras foram conservadas em geladeira.

Tabela 2: Amostras de leite analisadas.

Número	Amostra
1	Amostra 1
2	Amostra 2
3	Amostra 3
4	Amostra 4
5	Amostra 5
6	Amostra 6
7	Amostra 7
8	Amostra 8
9	Amostra 9

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. USO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE COBRE NA DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO DE CACHAÇAS MINEIRAS

#### 4.1.1. Ativação do eletrodo de cobre

O comportamento eletroquímico do eletrodo de cobre em meio alcalino tem sido utilizado em trabalhos envolvendo técnicas galvanostáticas [138-140]. Os principais processos de oxidação observados para o eletrodo de cobre em meio alcalino são a formação de  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_2^-$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  e  $\text{CuO}$ . Para os dois últimos, há a predominância do primeiro à temperatura ambiente e do segundo a altas temperaturas, ou mistura de ambos [141]. Outros estudos ainda demonstraram que a formação das camadas de  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_2^-$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  e  $\text{CuO}$  são dependentes de condições como potencial, pH, condições do transporte de massa, envelhecimento e processos de reestruturação do filme [142].

Outro processo de oxidação é observado nos eletrodos de cobre, além dos dois mencionados, que refere-se à formação do  $\text{Cu}(\text{III})$  postulado no trabalho precursor de Muller. Alguns trabalhos atribuem a esta espécie a função de catalisadora na reação de oxidação de álcoois, o que vem tornando o eletrodo de cobre peça importante na determinação de etanol em bebidas, como pode ser observado nos trabalhos publicados nos últimos anos na literatura [143, 144].

Assim a aplicação do eletrodo de cobre em determinações eletroquímicas requer a formação dos óxidos de cobre através da ativação do eletrodo, a fim de auxiliar no processo catalítico. A ativação do eletrodo de cobre, que gera os óxidos descritos anteriormente, é realizada através de 30 ciclos voltamétricos variando o potencial aplicado de -0,80 a 0,80 V, em meio de  $\text{NaOH}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , usando uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , como já descrito na literatura [145]. A figura 11 representa um voltamograma do eletrodo convencional de cobre obtido em meio alcalino.

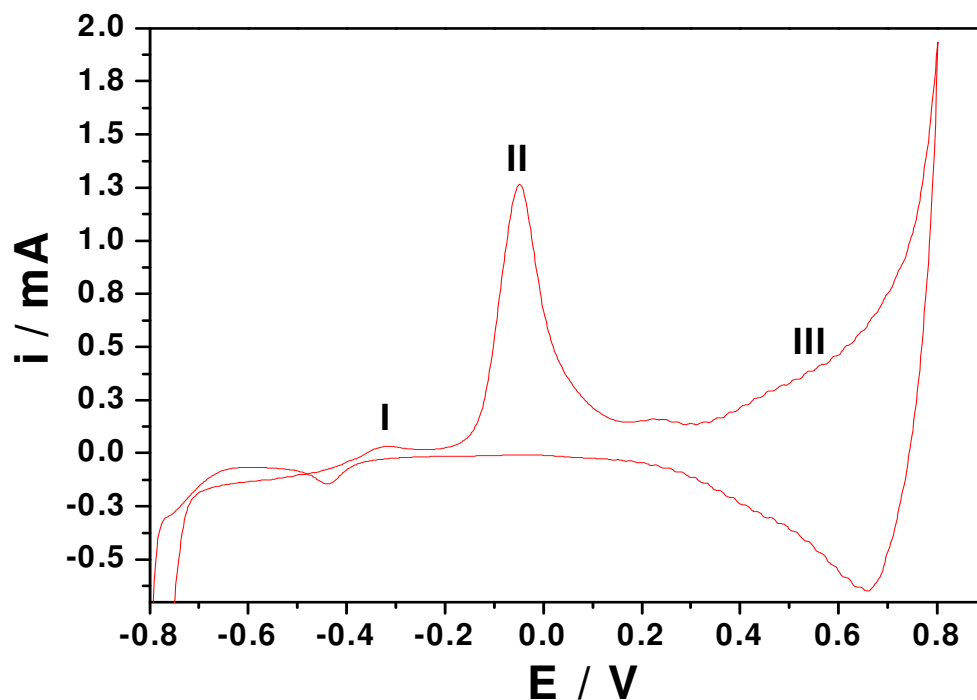


Figura 11. Voltamograma do eletrodo convencional de cobre ativado após 30 ciclos com uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . I, II e III representam as regiões de formação das espécies de cobre I, II e III respectivamente.

A ativação do eletrodo de cobre convencional foi feita como parâmetro de comparação para a ativação do eletrodo impresso. Na figura 12 temos o resultado da ativação do eletrodo impresso de cobre. Comparando com o eletrodo de cobre convencional, há um deslocamento de aproximadamente 200 mV nos picos gerados pós-ativação. Isso pode ser explicado pela ação do eletrodo de referência, que no eletrodo impresso é um pseudo-eletrodo de referência, já que conta apenas com a tinta de prata, ou seja, não está em contato com uma solução de KCl [146]. O pico anódico da figura 11 representado por II encontra-se, aproximadamente, em 0,0 V. Já na figura 12, que representa o eletrodo impresso ativado, o mesmo pico encontra-se em 0,2 V.

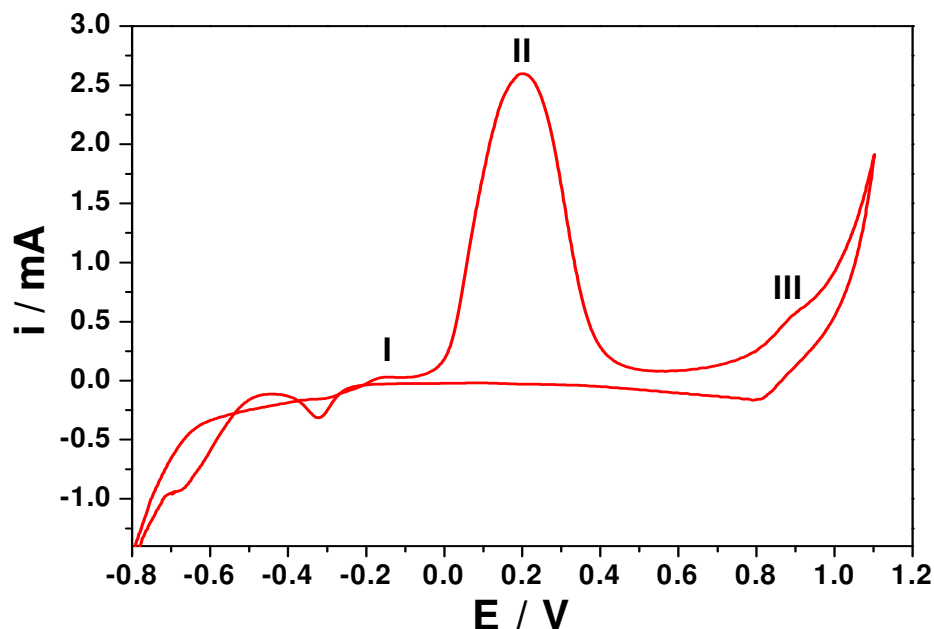
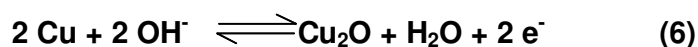
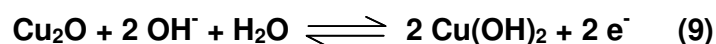
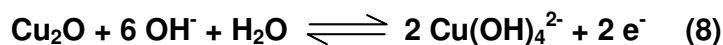


Figura 12. Eletrodo Impresso de cobre ativado após 30 ciclos com uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

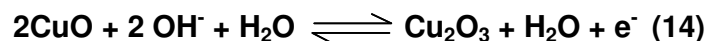
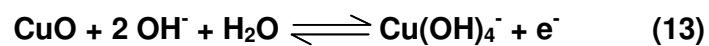
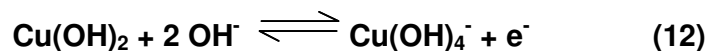
O processo anódico representado por (I) nas figuras 11 e 12 é descrito na literatura como provável formação das espécies  $\text{Cu}_2\text{O}$  e  $\text{Cu}(\text{OH})_2^-$ , de acordo com as equações 6 e 7 [147]:



O pico representado por (II) é referente à formação das espécies  $\text{CuO}$  e  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  de acordo com estudos relacionados ao eletrodo de cobre [147, 148]. As equações de 8 a 11 representam os prováveis processos de formação das espécies de  $\text{Cu}(\text{II})$ :



Já o pico (III) é referente à formação da espécie de Cu(III) de acordo com as equações 12, 13 e 14 abaixo:



A presença de espécies solúveis e não solúveis de Cu(III) já está bem descrita na literatura [149]. Com a adição de etanol, figura 13, pode ser observado um processo irreversível na região correspondente à formação do Cu(III) ( $E = 0,9 \text{ V}$ ), indicando que a oxidação do etanol na superfície do eletrodo é catalisada pelas espécies de Cu(III), como o observado na figura 14.

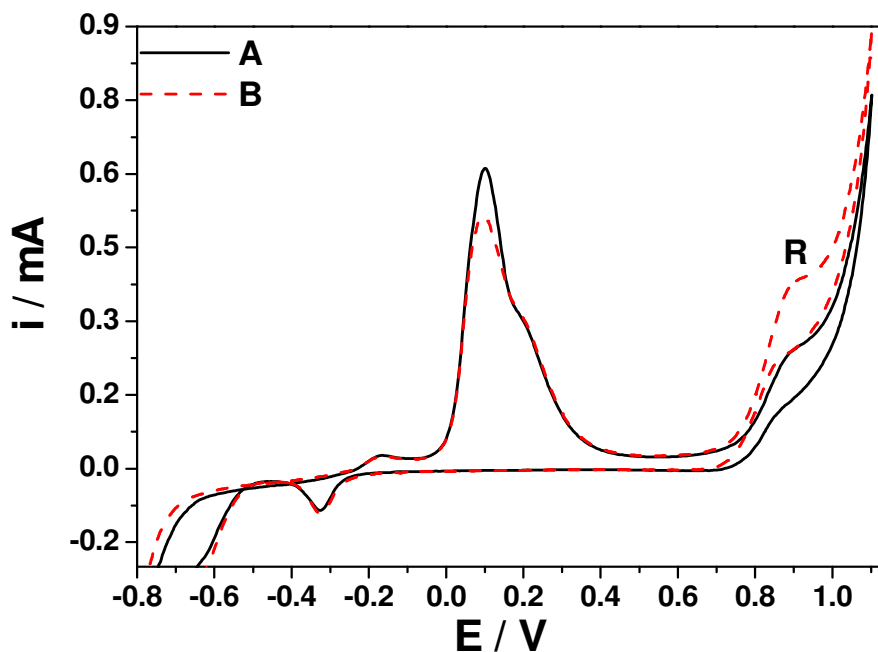


Figura 13. Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de cobre em NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> antes (A) e após (B) a adição de 5 % v/v de etanol. R representa a região de oxidação do etanol. Velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>.



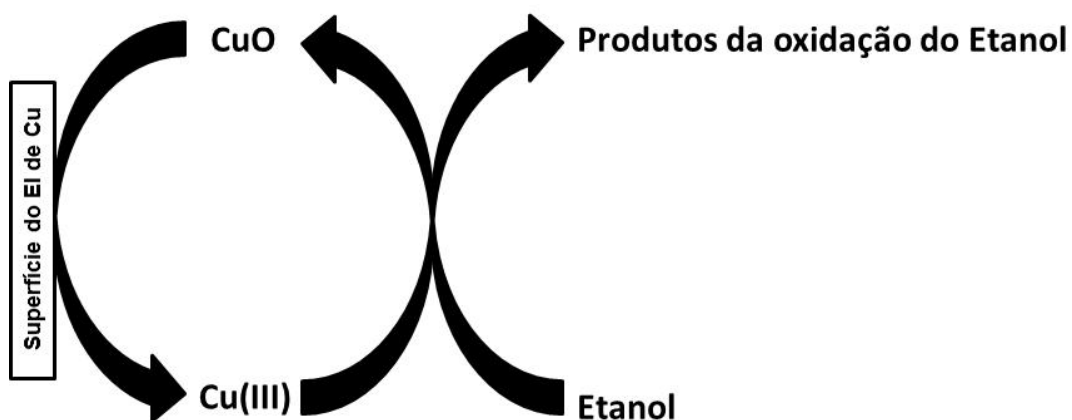
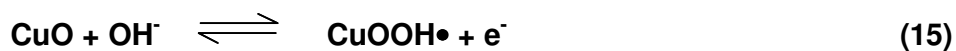


Figura 14. Proposta para a eletrocatalise realizada pelo Cu(III) na oxidação do etanol.

Assim a ativação do eletrodo de cobre faz-se necessária para as análises amperométricas e voltamétricas, de acordo com as equações 15, 16 e 17 que demonstram o processo de oxidação de etanol na superfície do eletrodo de cobre [150]. Como demonstrado no esquema da figura 14, a espécie de Cu(II) dá origem ao Cu(III) que catalisa a oxidação do etanol na superfície do eletrodo e regenera a espécie de Cu(II) que dá continuidade ao processo. As medidas amperométricas e voltamétricas foram usadas na quantificação do teor de etanol das amostras de cachaça.



#### 4.1.2. Determinação voltamétrica de etanol em cachaças mineiras

Após a ativação do eletrodo impresso foi realizada uma adição de uma alíquota de etanol ao eletrólito suporte visando determinar o potencial de resposta do etanol frente ao eletrodo de cobre. Os resultados obtidos foram compatíveis com os encontrados na literatura levando-se em conta o deslocamento causado pelo pseudo-eletrodo de referência [146]. Com a adição

sucessiva de etanol ao sistema, figura 15, um processo irreversível pode ser observado na região que corresponde à formação de Cu(III) ( $E = 0,9V$ ), demonstrando assim que a oxidação do etanol na superfície do eletrodo é mediada pelas espécies de Cu(III).

A curva analítica, além de validar a sensibilidade e confiabilidade do método, tem como objetivo mostrar a correlação linear entre a corrente limite de oxidação do etanol e sua concentração, de modo que seja possível a determinação do etanol nas amostras de cachaça. A figura 16 mostra a dependência da corrente de oxidação do etanol, medida em  $0,9 V$ , em função da sua concentração. A curva apresentou um coeficiente de correlação de  $0,9989$ , o que poderia gerar alguma dúvida quanto a linearidade da análise. Contudo o coeficiente de correlação é apenas um indicativo de linearidade. Desta forma foi feita a análise dos resíduos. O resíduo para cada ponto da curva foi então determinado fazendo a diferença entre o sinal medido e o sinal calculado através da curva de calibração, e então, plotou-se o gráfico dos resíduos versus a concentração do analito (figura 17). Observou-se que os pontos apresentaram uma distribuição randômica, o que indica que as curvas de calibração são lineares na faixa estudada [151].

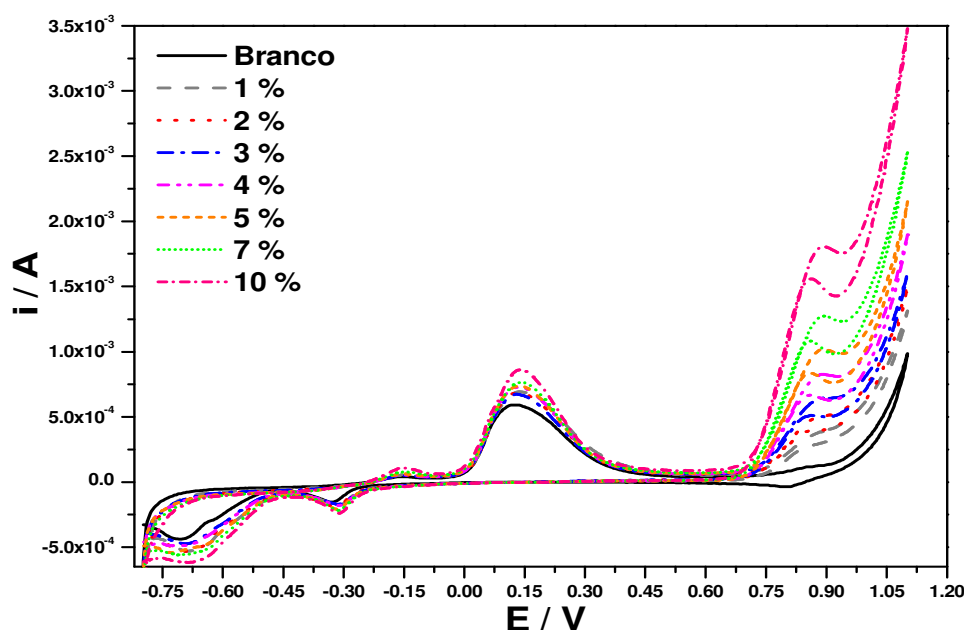


Figura 15. Voltamogramas cíclicos do eletrodo impresso de cobre em NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$  antes e após a adição de etanol. Velocidade de varredura  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

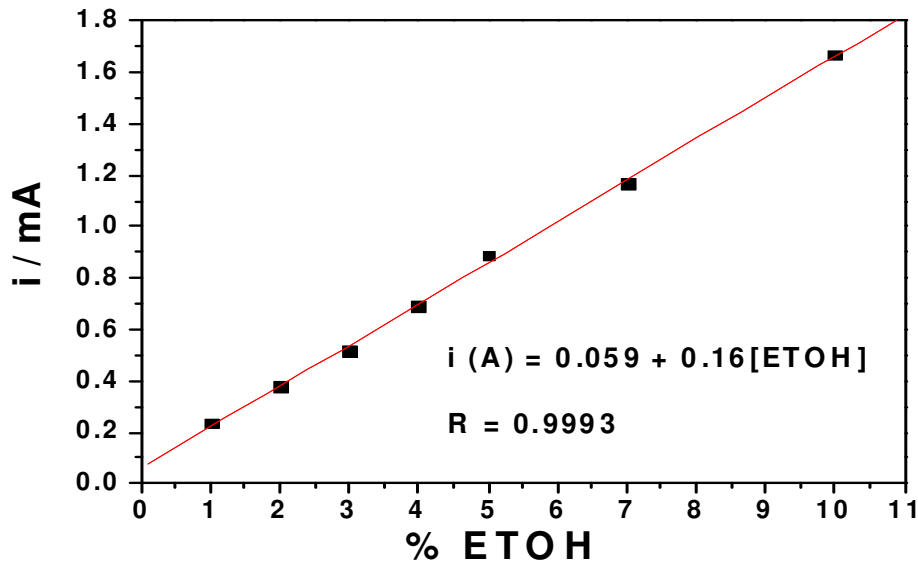


Figura 16. Curva analítica da adição de etanol variando de 1% a 10% v/v.

A curva analítica apresentou ótima sensibilidade analítica, obtendo limites de detecção ( $3s_b$ ) e quantificação ( $10s_b$ ) calculados em função da linha base na ausência do analito, respectivamente de 0,085% e 0,28% v/v.

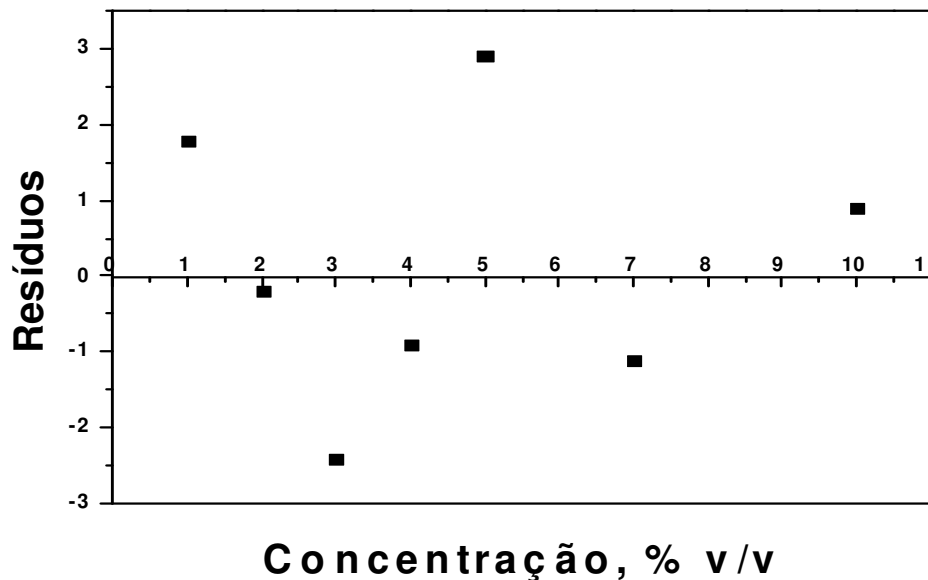


Figura 17. Gráfico de resíduos da curva analítica de etanol.

Utilizando os parâmetros analíticos otimizados fez-se a quantificação do etanol nas amostras de cachaças mineiras selecionadas e comparou os valores obtidos com os indicados pelos fabricantes, e com os obtidos através do densímetro digital, método este largamente usado nas destilarias e alambiques.

A metodologia utilizada para a determinação foi baseada no método da adição de padrão, visto que análises envolvendo curva de calibração tradicional não demonstraram resultados satisfatórios em função do efeito de matriz das amostras estudadas. Como não há um padrão de fabricação e cada amostra vem de um produtor diferente que emprega seus próprios métodos, diferentes fatores como viscosidade, tensão superficial e as substâncias constituintes das amostras podem variar com o tipo de fabricante, o que influenciaria nos resultados obtidos por curva de calibração tradicional.

As análises foram realizadas acionando-se 4,0 mL de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> em um béquer de 5 mL, como pode ser observado na figura 18, onde foi feita a análise do branco, etapa em que foi obtida a corrente residual (componente faradaico + componente capacitivo). Posteriormente foram adicionados 70 µL de amostra de cachaça sem nenhum pré-tratamento, onde foram medidas as correntes de oxidação do etanol presente na amostra. Por fim foram adicionadas quatro alíquotas de 20 µL de uma solução estoque de etanol 95 % v/v medindo então as correntes referentes ao etanol presente na amostra de cachaça e aos padrões adicionados. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As tabelas 3 e 4 mostram os parâmetros instrumentais e analíticos otimizados para o método proposto.

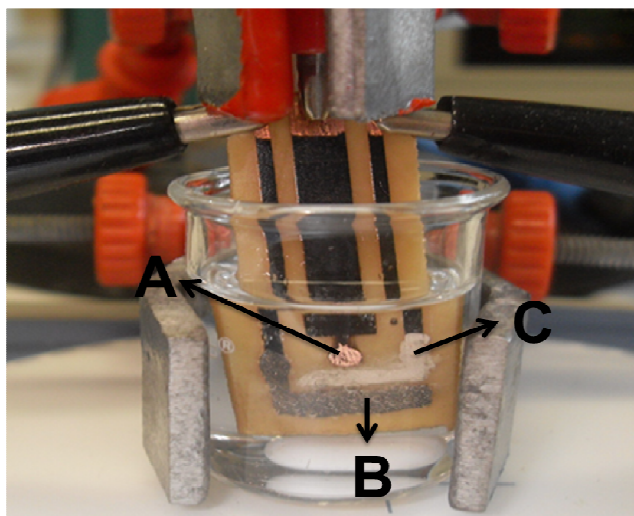


Figura 18. Cella eletroquímica para análise voltamétrica de etanol em cachaça. Eletrodo impresso de cobre introduzido em um béquer de 5 mL contendo 4,00 mL de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>. A, B e C representam os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência respectivamente.

Tabela 3. Parâmetros instrumentais para a determinação voltamétrica de etanol.

<b>Parâmetros Eletroquímicos</b>	<b>ETOH</b>
<b>E<sub>inicial</sub> (mV)</b>	-800
<b>E<sub>final</sub> (mV)</b>	1100
<b>E<sub>degrau</sub> (mV)</b>	-800
<b>Velocidade de varredura (mV/s)</b>	50

Tabela 4. Condições experimentais para a determinação voltamétrica de etanol.

<b>Parâmetros Analíticos</b>	
<b>Vol. de NaOH 1,0 molL<sup>-1</sup></b>	4,0 mL
<b>Vol. de amostra</b>	70 µL
<b>Vol. de Etanol 95,0%</b>	20 µL

As figuras de 19 a 22 mostram os voltamogramas cíclicos e as curvas de adição de padrão para duas amostras (Ouro Verde e Deixa Vir) de cachaças analisadas. Na primeira o teor de etanol obtido por voltametria cíclica foi de 39,5 % v/v, enquanto que o fabricante informa um valor no rótulo de 39 % v/v. Já para a amostra Deixa Vir foi obtido um resultado de 45,7 % v/v, sendo indicado pelo fabricante um valor de 45 % v/v. Para as demais amostras os teores de etanol determinados variaram de 38,0 % v/v a 49,4 % v/v. Para todas as amostras analisadas foi aplicado o teste *t-student* e para todos os casos o valor de t encontrado estava abaixo do tabelado, indicando não haver diferenças significativas, a 95% de confiança, entre os resultados obtidos e os informados pelo fabricante.

A tabela 5 mostra os resultados obtidos para todas as amostras analisadas, bem como seus intervalos de confiança a 95 % e os valores indicados pelos fabricantes.

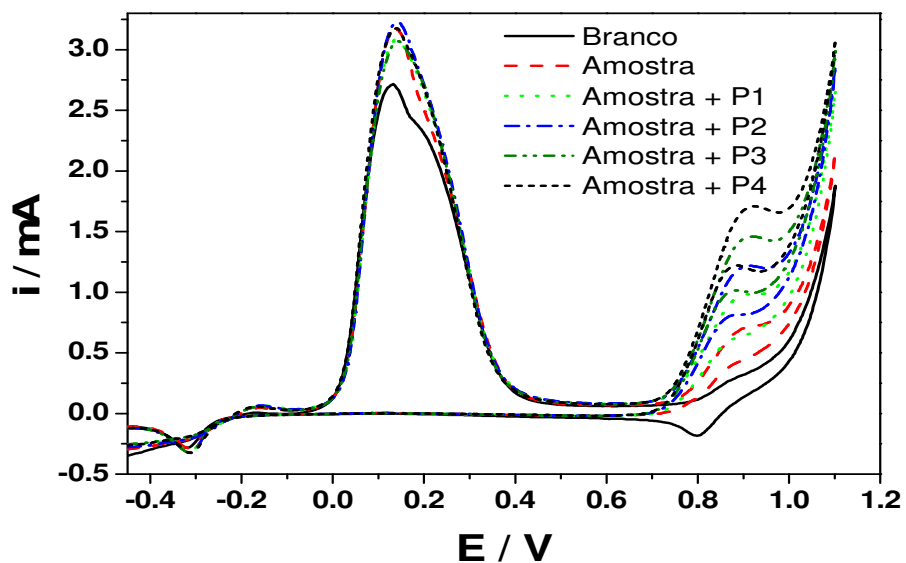


Figura 19. Voltamogramas cíclicos para a amostra Ouro Verde e padrões de etanol. Parâmetros instrumentais e analíticos estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

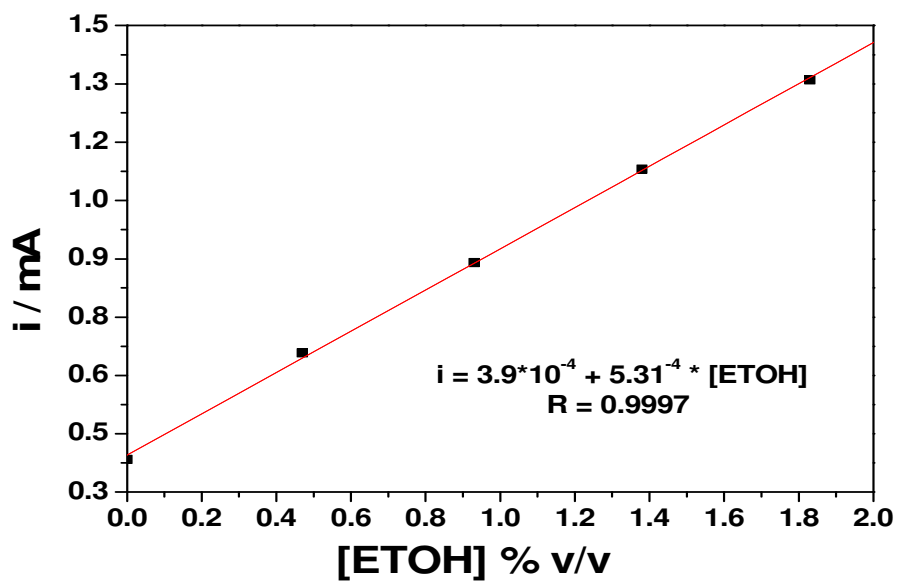


Figura 20. Curva de adição de padrão da amostra Ouro Verde.

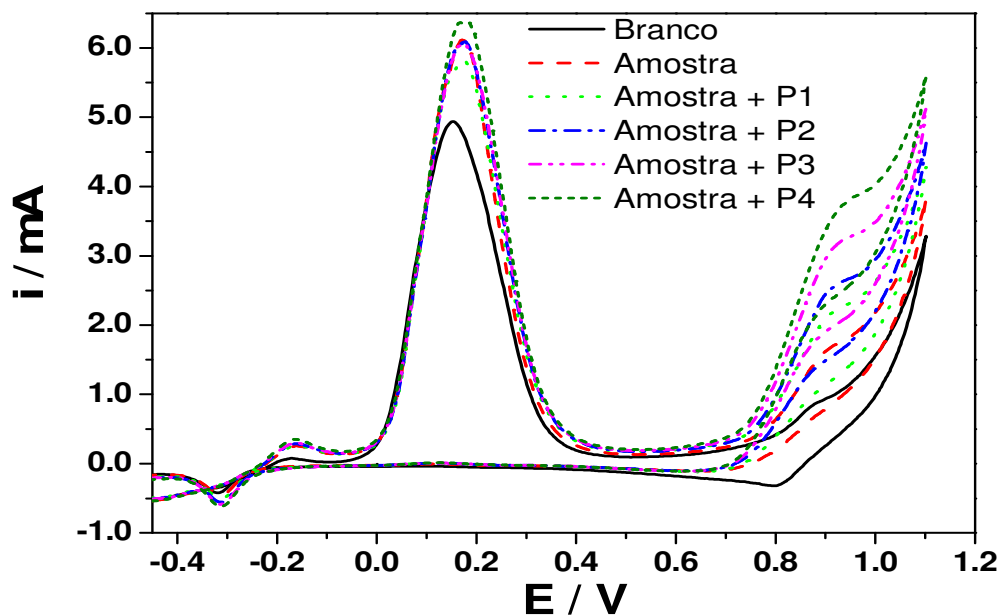


Figura 21. Voltamogramas cíclicos para a amostra Deixa Vir e padrões de etanol. Parâmetros instrumentais e anlíticos estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

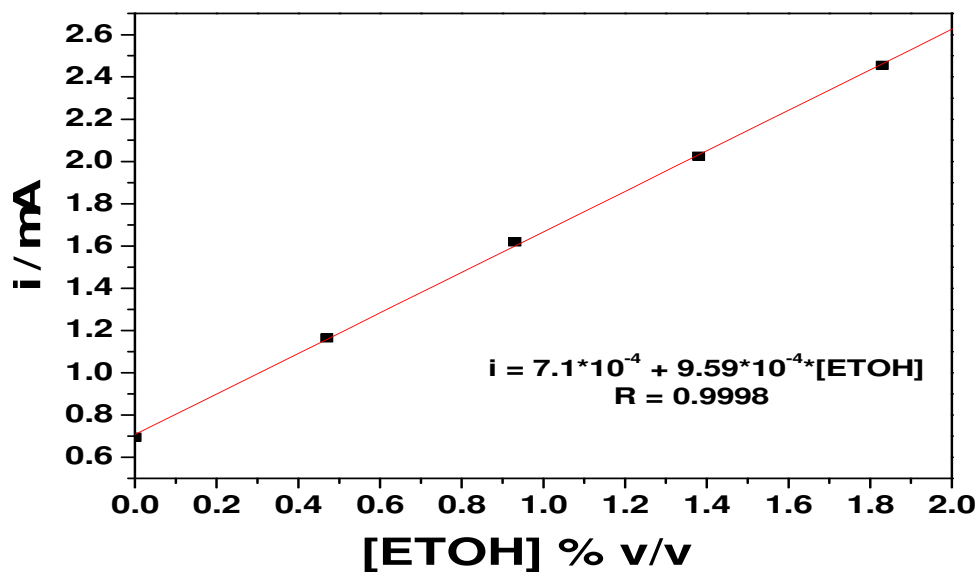


Figura 22. Curva de adição de padrão da amostra Deixa Vir.

Após a determinação voltamétrica do etanol nas amostras, um método amperométrico para realizar esta mesma determinação foi desenvolvido, buscando inclusive aumentar a sensibilidade do método proposto. Para isto

vários estudos de otimização foram realizados antes da quantificação nas amostras.

Tabela 5. Concentrações de etanol nas amostras de cachaça analisadas, intervalo de confiança, valores indicados pelo fabricante e valor de t determinado para cada amostra. O valor de t tabelado é de 4,303 a um nível de confiança de 95% e n = 2.

<b>CACHAÇA</b>	<b>[ETOH] % v/v</b>	<b>RÓTULO</b>	<b>t<sub>calculado</sub> (95%)</b>
<b>Ouro Verde</b>	39,7 ± 1,8	39,0	0,673
<b>Deixa Vir</b>	45,7 ± 2,8	45,0	0,433
<b>Serrana</b>	44,3 ± 1,8	45,0	0,674
<b>Montana de salinas</b>	46,0 ± 1,5	46,0	0
<b>Vereda Tropical</b>	47,4 ± 1,4	46,0	1,732
<b>Cachaça Relíquia</b>	42,9 ± 1,6	43,0	0,108
<b>Tabaroa</b>	43,0 ± 1,3	46,0	3,997
<b>Água Marinha</b>	49,4 ± 2,7	45,0	2,823
<b>Cachaça Garrancho</b>	41,5 ± 2,4	40,0	1,083
<b>Ariana</b>	43,6 ± 2,6	44,0	0,265
<b>Coluninha Ouro</b>	40,3 ± 2,2	40,0	0,236
<b>Coluninha Prata</b>	44,6 ± 2,6	40,0	3,064
<b>Mel de Minas</b>	38,0 ± 4,8	40,0	0,722
<b>Dona onça</b>	43,6 ± 1,6	45,0	1,516
<b>Cachaça Saliníssima</b>	41,0 ± 4,1	45,0	1,690

#### 4.1.3. Determinação amperométrica de etanol em cachaças mineiras

Na análise amperométrica um potencial fixo foi aplicado ao eletrodo de trabalho e uma corrente de oxidação foi medida quando alíquota do analito de interesse é adicionada à célula eletroquímica. A figura 23 mostra um amperograma para adições sucessivas de etanol ao hidróxido de sódio, o qual



foi usado também nesta etapa como eletrólito suporte. Como já foi demonstrado anteriormente, a determinação do etanol requer um pré-tratamento do eletrodo de trabalho, a fim de gerar as espécies de cobre eletrocatalíticas da reação de oxidação do etanol. Assim, buscou-se trabalhar com a amperometria aplicando à célula eletroquímica dois potenciais alternadamente, onde no primeiro as espécies catalíticas de cobre fossem geradas na superfície do eletrodo e no segundo ocorresse a oxidação do etanol. Este potencial de pré-tratamento foi escolhido dentre os potenciais I, II e III da figura 12, pois são os potenciais onde são gerados os espécies de Cu(I), Cu(II) e Cu(III) que poderiam catalisar a oxidação do etanol. Na figura 23 pode-se observar as correntes obtidas para o hidróxido de sódio (B) e para os padrões de etanol com concentrações variado entre 1 e 4 % v/v, sendo as correntes monitoradas na posição R1 referentes ao pré-tratamento do eletrodo de cobre no potencial pré-determinado.

A curva analítica apresentou ótima sensibilidade analítica, obtendo limites de detecção ( $3s_b$ ) e quantificação ( $10s_b$ ), calculados em função da linha base na ausência do analito, respectivamente de 0,024 % e 0,080 % v/v.

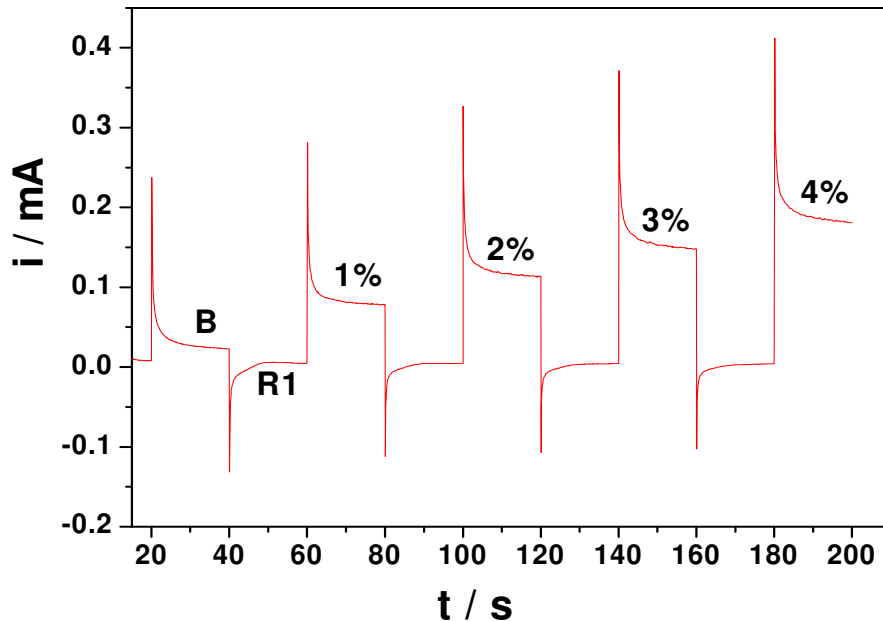


Figura 23. Amperogramas obtidos para adições sucessivas de etanol 1 %, 2 %, 3 %, 4 % v/v em 4,00 mL de eletrólito suporte ( $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Desta forma foi feito o estudo visando definir qual o melhor potencial de pré-tratamento do eletrodo de trabalho. Para isto, utilizou-se para pré-

tratamento os potenciais de -0,60; -0,30 e 0,20 V referentes aos potenciais das regiões I, II e III como foi mostrado na figura 12, nesta etapa trabalhou-se com uma concentração constante de etanol igual a 5 %v/v. Os resultados nesta etapa do trabalho podem ser observados na figura 24. Pelos amperogramas obtidos optou-se por utilizar o potencial de 0,20 V para o pré-tratamento do eletrodo, pois foi o que apresentou maior corrente de oxidação do etanol quando um potencial de 0,90 V era aplicado, melhorando assim a sensibilidade do método analítico.

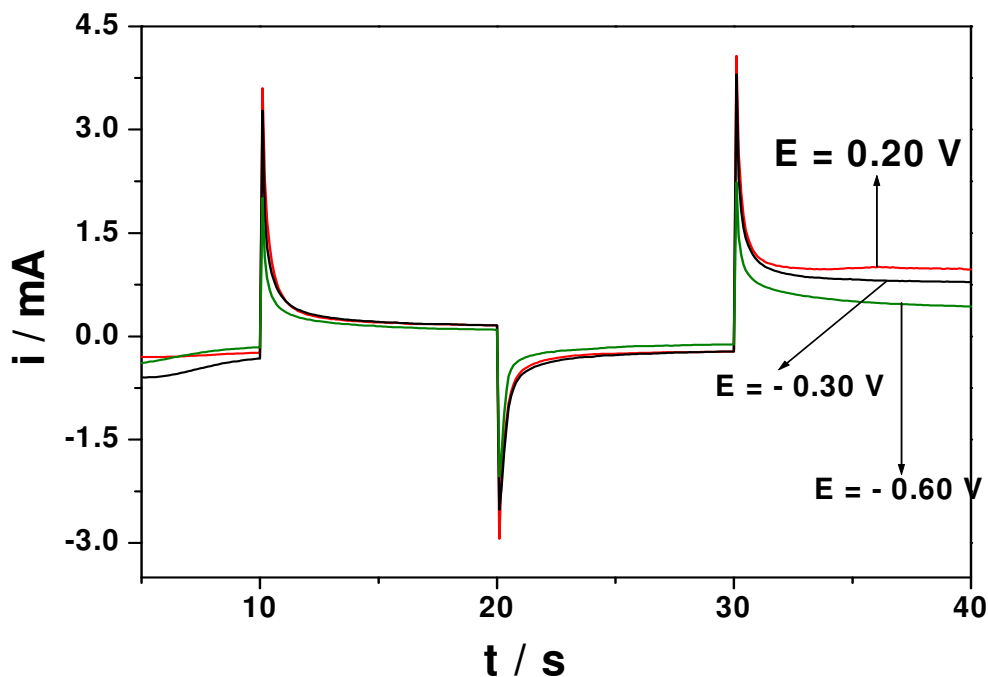


Figura 24. Amperogramas obtidos no estudo do potencial de pré-tratamento aplicado ao eletrodo de trabalho para gerar as espécies electrocatalíticas. As cores em verde, preto e vermelho representam os potenciais de pré-tratamento citados na figura.

Após este estudo, utilizando o melhor potencial de pré-tratamento e os parâmetros analíticos da metodologia voltamétrica fez-se a quantificação do etanol nas amostras de cachaças selecionadas, correlacionando os resultados obtidos com os determinados por voltametria cíclica e com os indicados no rótulo pelos fabricantes.

A metodologia utilizada para a determinação amperométrica foi baseada no método da curva de adição de padrão, visto que análises envolvendo curva de calibração externa não demonstraram resultados satisfatórios em função,

possivelmente, do efeito de matriz. As análises foram realizadas acionando-se 4,00 mL de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> em um béquer de 5 mL, onde foi feito o branco. Posteriormente foram adicionados 70 µL da amostra de cachaça sem qualquer pré-tratamento e por fim foram adicionadas alíquotas de 20 µL da solução estoque de etanol 95 % v/v. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A tabela 6 mostra os parâmetros instrumentais otimizados para o método proposto.

As figuras de 25 a 28 mostram os amperogramas e as curvas de adição de padrão para duas amostras (Serrana e Montana de Salinas) de cachaça dentre as analisadas neste trabalho. Na primeira o teor de etanol obtido por amperometria foi de 45,2 % v/v, enquanto que o fabricante informa um valor no rótulo de 45 % v/v. Já para a amostra Montana de Salinas pela amperometria foi obtido um resultado de 47,5 % v/v, sendo indicado pelo fabricante um valor de 46 % v/v. Para as demais amostras os teores de etanol determinados variaram de 33,8 % v/v a 51,0 % v/v. Para todas as amostras analisadas foi aplicado o teste *t-student* e para todos os casos, exceto para as amostras Água Marinha e Garrancho que serão discutidas adiante, o valor de t encontrado estava abaixo do tabelado, indicando não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos e os informados pelo fabricante.

Tabela 6. Parâmetros instrumentais para a determinação amperométrica de etanol.

<b>Parâmetros Eletroquímicos</b>	
<b>E pré-tratamento (mV)</b>	200
<b>T pré-tratamento (s)</b>	10
<b>E análise (mV)</b>	-900

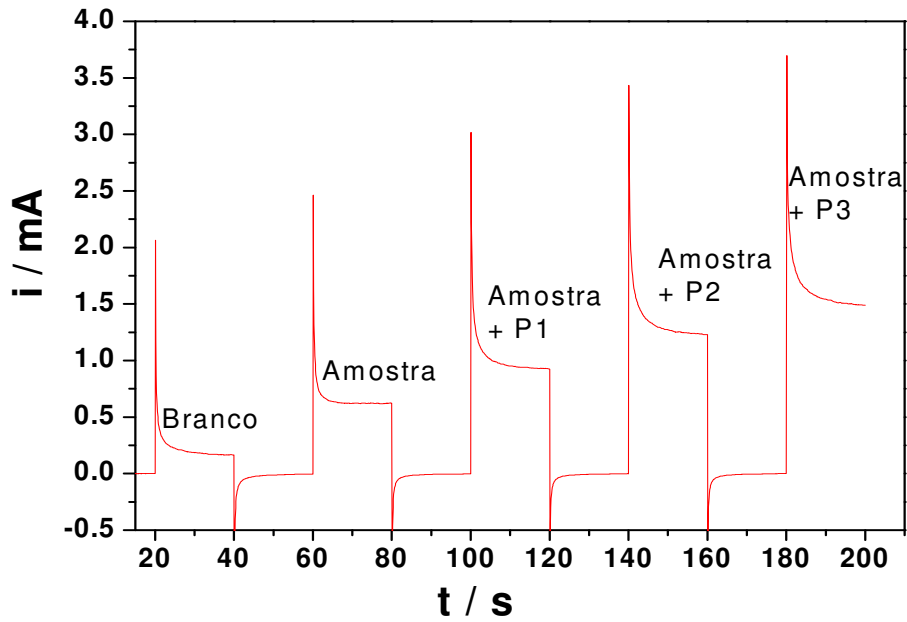


Figura 25. Amperograma obtido para a análise de etanol na amostra Serrana. Parâmetros instrumentais estão apresentados na tabela 6.

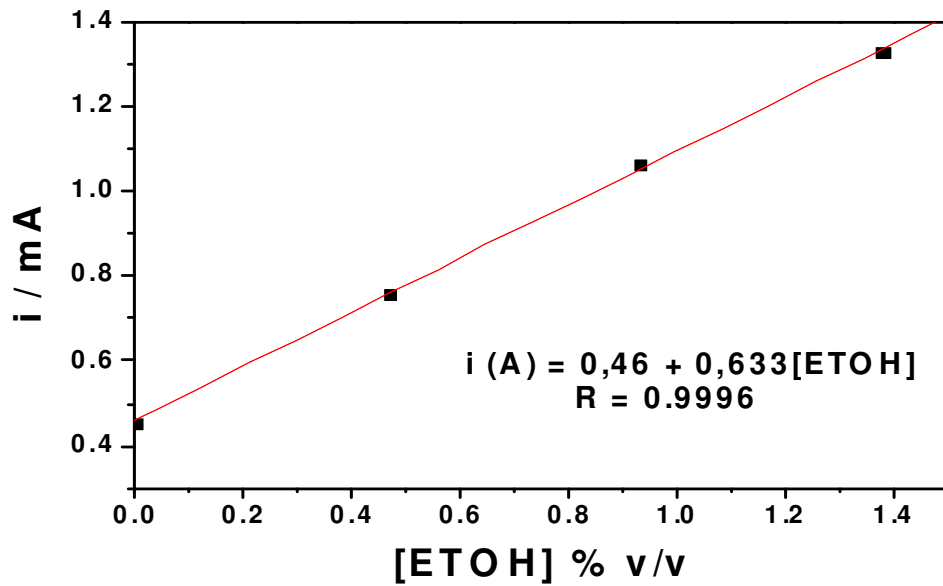


Figura 26. Curva de adição de padrão da amostra Serrana.

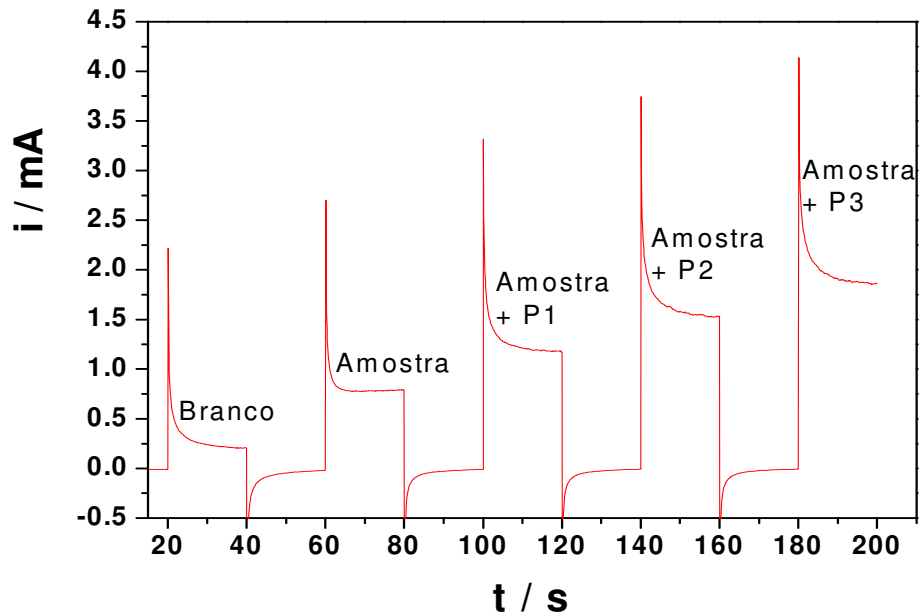


Figura 27. Amperograma obtido para a análise de etanol na amostra Montana de Salinas. Parâmetros instrumentais estão apresentados na tabela 6.

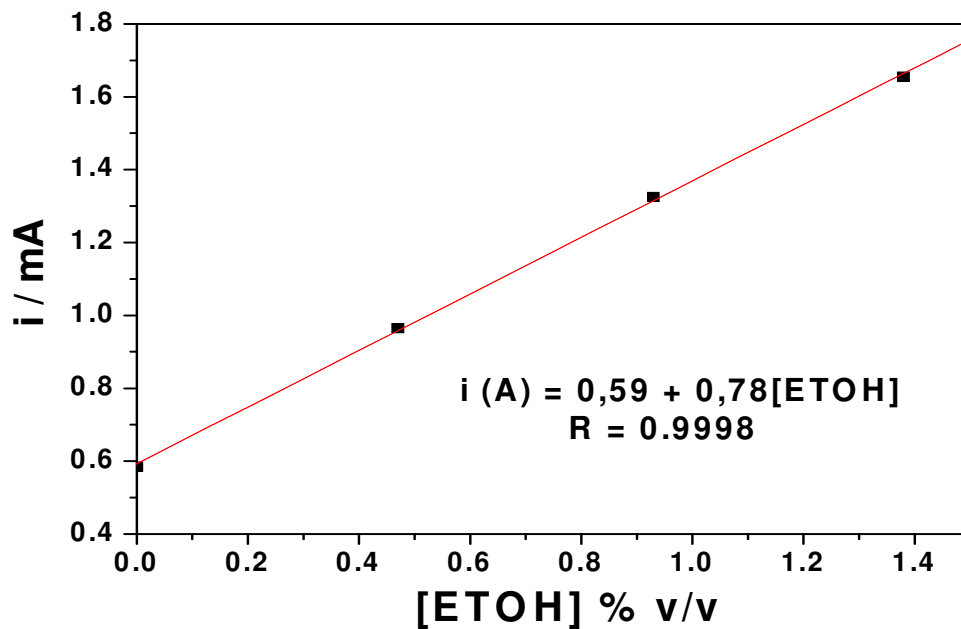


Figura 28. Curva analítica da amostra Montana de Salinas.

A tabela 7 mostra os resultados obtidos para todas as amostras analisadas, bem como seus intervalos de confiança a 95 % e os valores indicados pelos fabricantes. O coeficiente de variância para todas as amostras encontraram-se abaixo de 4 %, demonstrando uma boa precisão dos

resultados obtidos. Teste de reprodutibilidade também foi realizado para duas amostras distintas de cachaça, Tabaroa e Mel de Minas, as quais foram analisadas três vezes em diferentes semanas e foram encontrados coeficientes de variância menor que 3 % para ambas as amostras.

Tabela 7. Concentrações de etanol nas amostras de cachaça analisadas, intervalo de confiança, valores indicados pelo fabricante e valor de t determinado para cada amostra. O valor de t tabelado é de 4,303 a um nível de confiança de 95% e n = 2.

<b>CACHAÇA</b>	<b>[ETOH] % v/v</b>	<b>RÓTULO</b>	<b>t<sub>calculado</sub> (95%)</b>
<b>Ouro Verde</b>	42,2 ± 2,3	39,0	2,410
<b>Deixa Vir</b>	51,0 ± 2,6	45,0	3,997
<b>Serrana</b>	45,2 ± 1,4	45,0	0,247
<b>Montana de salinas</b>	47,9 ± 0,9	46,0	3,657
<b>Vereda Tropical</b>	44,8 ± 0,6	46,0	3,464
<b>Cachaça Relíquia</b>	42,9 ± 3,1	43,0	0,056
<b>Tabaroa</b>	43,9 ± 3,0	46,0	1,212
<b>Água Marinha</b>	50,6 ± 0,4	45,0	24,249
<b>Cachaça Garrancho</b>	33,8 ± 1,6	40,0	6,712
<b>Ariana</b>	46,4 ± 2,7	44,0	1,540
<b>Coluninha Ouro</b>	38,1 ± 1,6	40,0	1,732
<b>Coluninha Prata</b>	38,8 ± 3,4	40,0	0,611
<b>Mel de Minas</b>	38,7 ± 1,8	40,0	1,251
<b>Dona onça</b>	47,4 ± 1,3	45,0	3,597
<b>Cachaça Saliníssima</b>	43,9 ± 1,6	45,0	1,191

O valor de t calculado para a amostra água marinha ficou acima do valor do t crítico indicando uma diferença entre o valor encontrado e o valor tabelado. Como os valores encontrados na análise voltamétrica e posteriormente pelo densímetro digital estiveram de acordo com o valor indicado pelo fabricante concluímos que esta diferença para a análise amperométrica se deve a algum

erro no manuseio da amostra ou até diferença nas condições de análise como temperatura, etc., no momento da análise.

Já para a amostra garrancho o valor de  $t$  calculado ficou acima do valor de  $t$  tabelado, contudo neste caso a medida voltamétrica foi concordante com o valor descrito pelo fabricante e o resultado obtido pelo densímetro ficou abaixo do valor rotulado. Este fato pode ser explicado pela cronologia da análise da amostra, pois primeiro foi realizada a análise voltamétrica, seguido da análise amperométrica e pela análise utilizando o densímetro. Entre as análises houve, provavelmente, perda do analito devido a alguma falha na estocagem. Como a análise voltamétrica foi realizada logo após a abertura da amostra seu valor foi mais próximo do descrito pelo fabricante, seguido de valores mais baixos nas análises posteriores.

#### 4.1.4. Estudo da interferência da glicose

De acordo com o Inmetro:

*“Cachaça é a denominação típica e exclusiva da Aguardente de Cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 % vol (trinta e oito por cento em volume) a 48% vol (quarenta e oito por cento em volume), a 20 °C (vinte graus Celsius), obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L (seis gramas por litro), expressos em sacarose.”*

Várias substâncias encontradas na cachaça podem influenciar nos resultados obtidos, contudo a maioria destas substâncias encontram-se em concentrações muito baixas, pois são geradas no processo de fabricação da cachaça, diferentemente da glicose que pode ser adicionada após o processo de fabricação em concentrações elevadas. Desta forma foi realizado um estudo para verificar a interferência da glicose presente na amostra. Adições de padrão de glicose de concentração variando de 20 a 100 mg L<sup>-1</sup> foram feitas na célula eletroquímica, a fim de observar possível sinal de oxidação deste analito no potencial de oxidação do etanol. Na figura 29 pode-se observar que não houve variação na corrente de oxidação com a variação de glicose nas concentrações estudadas. Estas concentrações foram estudadas, pois em

análise prévia (usando a cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE) feita no grupo de pesquisa, os níveis de glicose foram encontrados abaixo destes valores nas amostras analisadas. Para a utilização do método desenvolvido no grupo de pesquisa na determinação de glicose por CLAE [152], foi necessário a derivatização da glicose com o ácido para-aminobenzóico e cianoboroidreto (que catalisava a reação). A derivatização foi necessária, pois a glicose não absorve no visível e a detecção foi realizada na região do UV, em coluna reversa C-18. A fase móvel foi composta de metanol/solução aquosa de ácido fosfórico pH 2,50 (2:98), com fluxo de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$  e comprimento de onda de 305 nm para adeteccção. Nas figuras 30 e 31 pode-se observar uma adição de padrão de glicose derivatizada e a análise de uma amostra após derivatização, respectivamente.

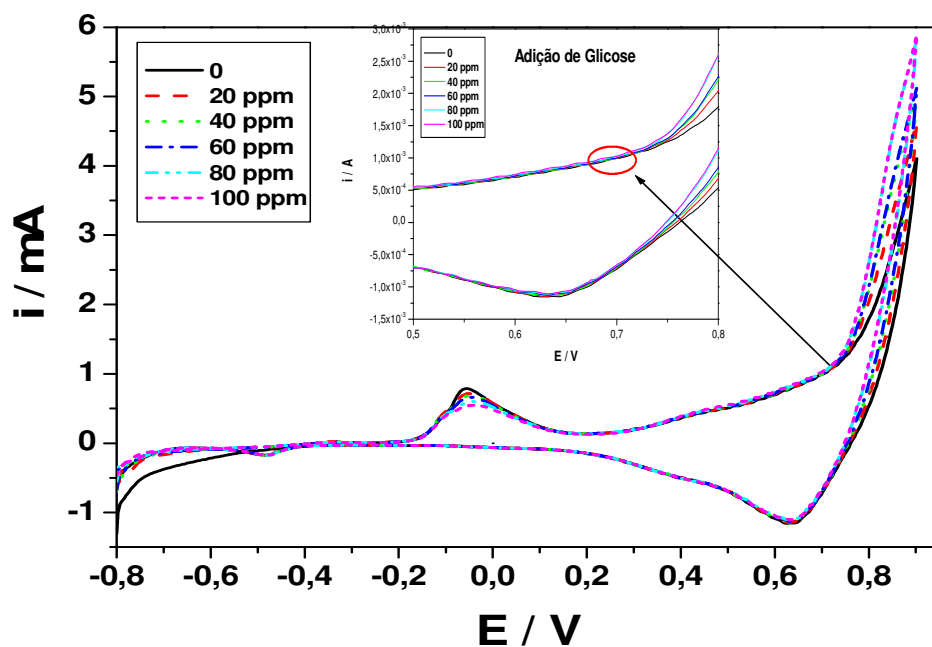


Figura 29. Voltamogramas cíclicos para adições de glicose nas mesmas condições de análise do etanol. Parâmetros instrumentais e analíticos estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Na figura 30 observou-se um tempo de retenção de aproximadamente 11 minutos para a glicose e de aproximadamente 8 minutos para o excesso de PABA que restou da reação de derivatização. Na figura 31, análise de uma das amostras, o PABA aparece normalmente como na adição do padrão, já a



glicose não é observada mesmo com a ampliação da região onde seria feita sua detecção, fato observado em todas as outras amostras analisadas.

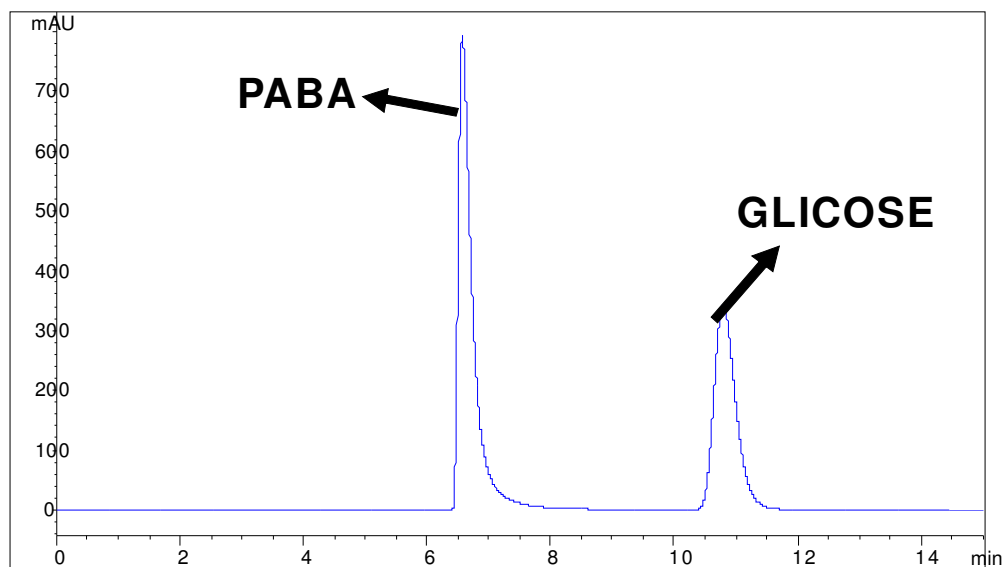


Figura 30. Cromatograma da adição de padrão de glicose, na concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Detecção foi realizada na região do UV, em coluna reversa C-18. A fase móvel foi composta de metanol/solução aquosa de ácido fosfórico pH 2,50 (2:98), com fluxo de  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$  e comprimento de onda de 305 nm para adetecção.

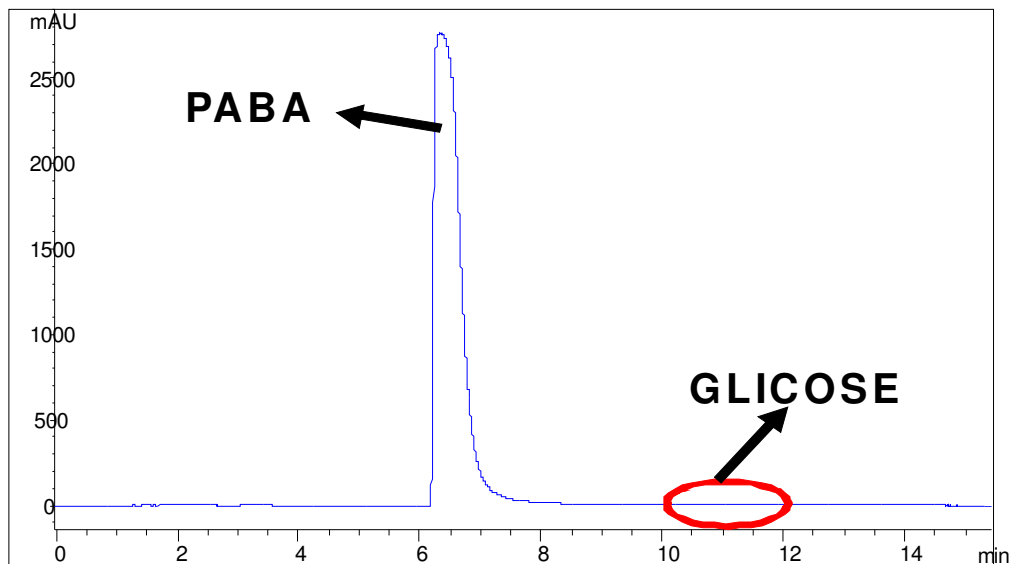


Figura 31. Cromatograma da adição da amostra Deixa Vir. Condição de derivatização da amostra: 2 mL de amostra + 1 mL de PABA + 25 mg de cianoboroidreto. Na área de detecção da glicose não foi observado sinal.

#### 4.1.5. Determinação do teor alcoólico através de um densímetro digital

As análises de etanol usando um densímetro digital foram realizadas no Laboratório de Bebidas Alcoólicas e Fermentações da Universidade Federal de Viçosa, o qual é coordenado pelo Professor Paulo Henrique Alves da Silva. Estas análises foram realizadas com o intuito de comparar com os resultados obtidos por amperometria e voltametria cíclica, para isso foi usado um densímetro digital, modelo DMA 35, da AnTon Paar (figura 32).

Nos alambiques, o alcóometro é a forma mais usual de se medir o teor alcoólico das cachaças. A concentração de etanol é definida pela densidade da amostra onde o alcóometro é colocado. A utilização do alcóometro pode levar a um erro se não manuseado por uma pessoa treinada, além das variações causadas pela temperatura, já que estes aparelhos devem ser utilizados em temperaturas pré-definidas pelo fabricante. O densímetro digital da Anton Paar, modelo DMA 35, surge como alternativa aos alcóometros convencionais [45].

O equipamento da Anton Paar faz medidas digitais de densidade e temperatura da amostra, que são processados em software interno, dando um resultado bem próximo à realidade.

O aparelho realiza um processo semelhante à de uma pipeta, aspirando um volume de 2,00 mL de amostra para um compartimento interno onde são feitas as medidas de temperatura e densidade da amostra. Os dados são posteriormente convertidos em concentração % v/v de etanol e demonstrados no visor digital.

Na tabela 8 estão expressas as concentrações de etanol obtidas pelo densímetro, juntamente com os valores obtidos na voltametria cíclica, amperometria e os descritos no rótulo pelo fabricante.

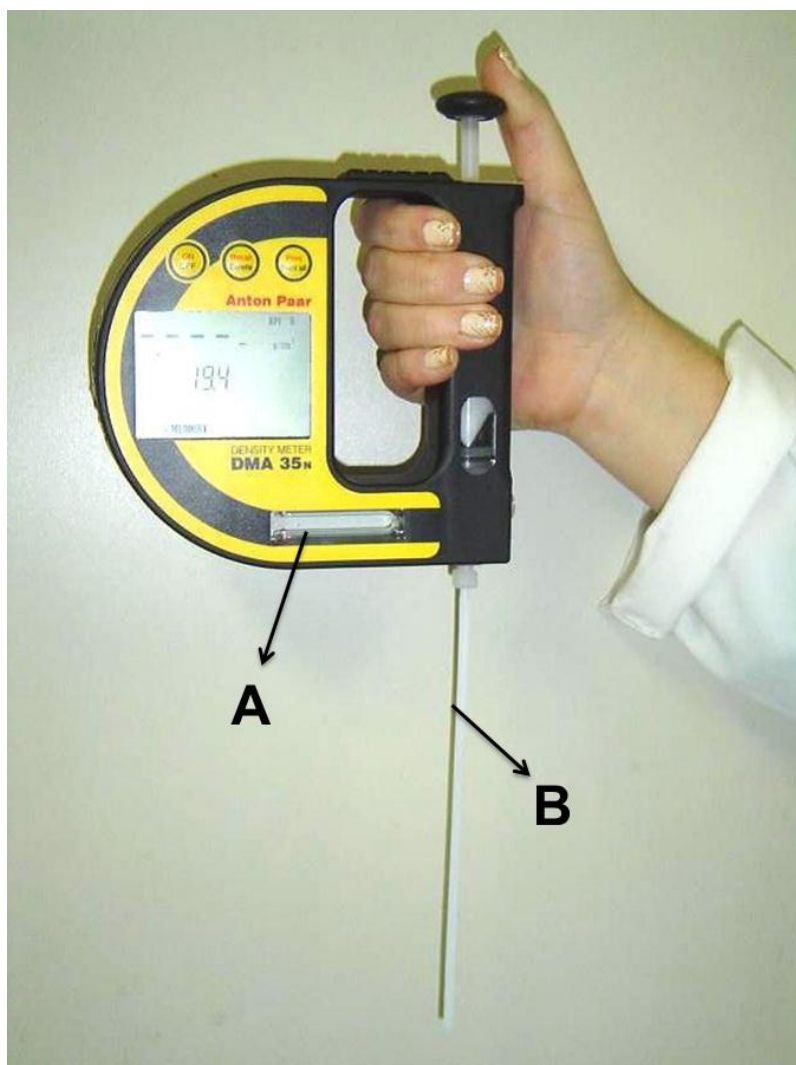


Figura 32. Densímetro digital utilizado na determinação do teor alcoólico das amostras de cachaça. O compartimento de análise está representado por A e a ponteira por B.

Tabela 8. Resultados obtidos pelo densímetro digital (índice D) comparado aos resultados voltamétricos (índice V) e amperométricos (índice A) para a determinação de etanol em cachaça, intervalo de confiança e o valor indicado pelo fabricante.

<b>CACHAÇA</b>	<b>[ETOH]<sub>D</sub> % v/v</b>	<b>[ETOH]<sub>V</sub> % v/v</b>	<b>[ETOH]<sub>A</sub> % v/v</b>	<b>RÓTULO</b>
Ouro Verde	38,4 ± 0,4	39,7 ± 1,8	42,2 ± 2,3	39,0
Deixa Vir	44,6 ± 0,7	45,7 ± 2,8	51,0 ± 2,6	45,0
Serrana	43,9 ± 0,6	44,3 ± 1,8	45,2 ± 1,4	45,0
Montana de salinas	40,6 ± 0,4	46,0 ± 1,5	47,9 ± 0,9	46,0
Vereda Tropical	43,8 ± 0,4	47,4 ± 1,4	44,8 ± 0,6	46,0
Cachaça Relíquia	45,4 ± 0,4	42,9 ± 1,6	42,9 ± 3,1	43,0
Tabaroa	43,1 ± 0,8	43,0 ± 1,3	43,9 ± 3,0	46,0
Água Marinha	43,8 ± 0,6	49,4 ± 2,7	50,6 ± 0,4	45,0
Cachaça Garrancho	27,2 ± 0,2	41,5 ± 2,4	33,8 ± 1,6	40,0
Ariana	40,0 ± 0,2	43,6 ± 2,6	46,4 ± 2,7	44,0
Coluninha Ouro	37,6 ± 0,4	40,3 ± 2,2	38,1 ± 1,6	40,0
Coluninha Prata	37,5 ± 0,4	44,6 ± 2,6	38,8 ± 3,4	40,0
Mel de Minas	37,6 ± 0,6	38,0 ± 4,8	38,7 ± 1,8	40,0
Dona onça	41,5 ± 0,2	43,6 ± 1,6	47,4 ± 1,3	45,0
Cachaça Saliníssima	43,8 ± 0,8	41,0 ± 4,1	43,9 ± 1,6	45,0

Através da tabela pode-se observar a concordância dos resultados obtidos pelos métodos eletroanalíticos e pelo método utilizado no Laboratório de Bebidas Alcoólicas e Fermentações da Universidade Federal de Viçosa. Vale ressaltar que alíquotas da mesma amostra foram analisadas em dias diferentes pelas técnicas eletroanalíticas visando analisar a repetibilidade e

reprodutibilidade dos métodos, o que resultou em desvios acima dos encontrados nas análises feitas pelo densímetro. Na maioria dos casos as concentrações de etanol obtidas pelo densímetro estiveram abaixo das encontradas pela voltametria/amperometria, o que se explica pelo fato das análises realizadas na UFV terem ocorrido um ano após as amostras serem abertas e analisadas pelas técnicas eletroanalíticas, e mesmo estas sendo lacradas e armazenadas adequadamente perdas do analito aconteceram devido à sua volatilidade.

#### 4.1.6. Comparação dos resultados obtidos por voltametria, amperometria e pelo densímetro digital

A determinação das concentrações de etanol por voltametria, amperometria e densidade demonstraram-se equivalentes. A maioria das análises voltamétricas e amperométricas foram realizadas simultaneamente, contudo variações puderam ser observadas nos valores de concentração determinados pelas duas técnicas, fato este devido a fatores como temperatura de análise, manipulação, estocagem e diluição das amostras. A tabela 8 e as figuras 33, 34 e 35 fazem uma comparação entre as técnicas voltamétrica e amperométrica com os resultados obtidos pelo densímetro digital referente às concentrações de etanol obtidas para as amostras analisadas. A avaliação qualitativa do coeficiente de correlação linear de Pearson (ou coeficiente de regressão linear) entre para as determinações podem ser avaliadas quanto ao seu grau de significância conforme a tabela 9 [153].

Tabela 9: Avaliação qualitativa do grau de correlação de Pearson entre duas variáveis.

<b>IRI</b>	<b>A correlação é dita</b>
<b>0</b>	<b>NULA</b>
<b>0 --- 0,3</b>	<b>FRACA</b>
<b>0,3 --- 0,6</b>	<b>REGULAR</b>
<b>0,6 --- 0,9</b>	<b>FORTE</b>
<b>0,9 --- 1</b>	<b>MUITO FORTE</b>
<b>1</b>	<b>PLENA OU PERFEITA</b>

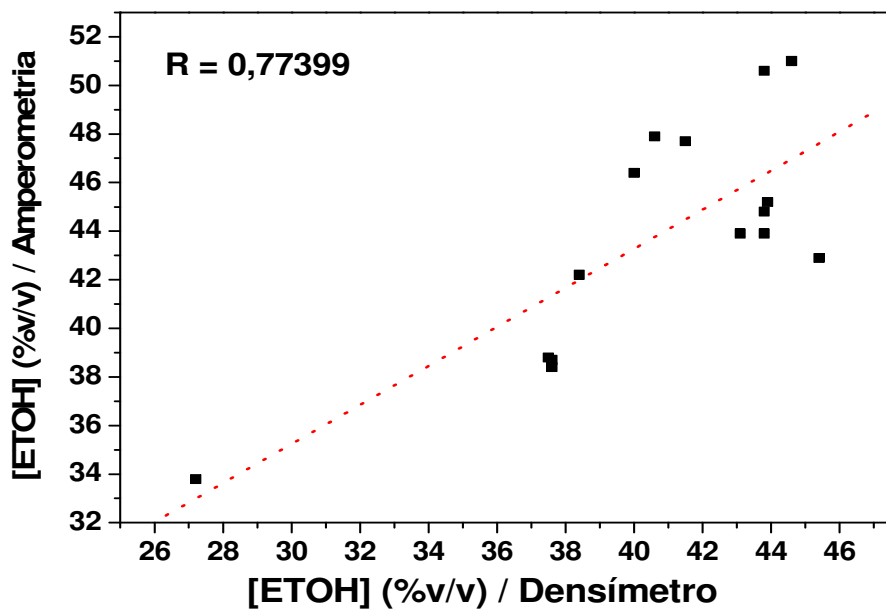


Figura 33. Comparação dos resultados obtidos entre a técnica amperométrica e pelo densímetro digital para a determinação de etanol em amostras de cachaça.

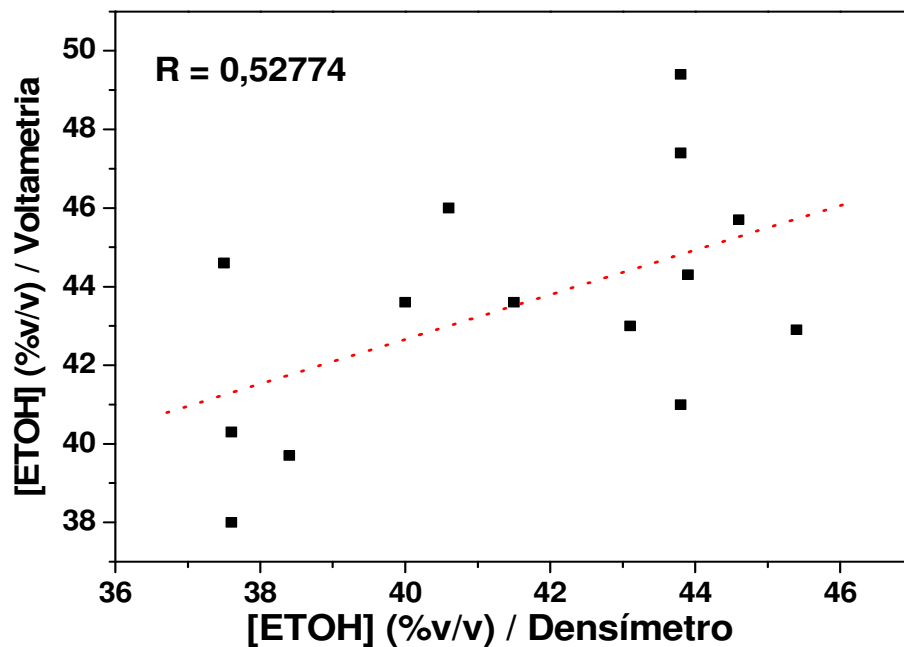


Figura 34. Comparação dos resultados obtidos entre a técnica voltamétrica e pelo densímetro digital para a determinação de etanol em amostras de cachaça.

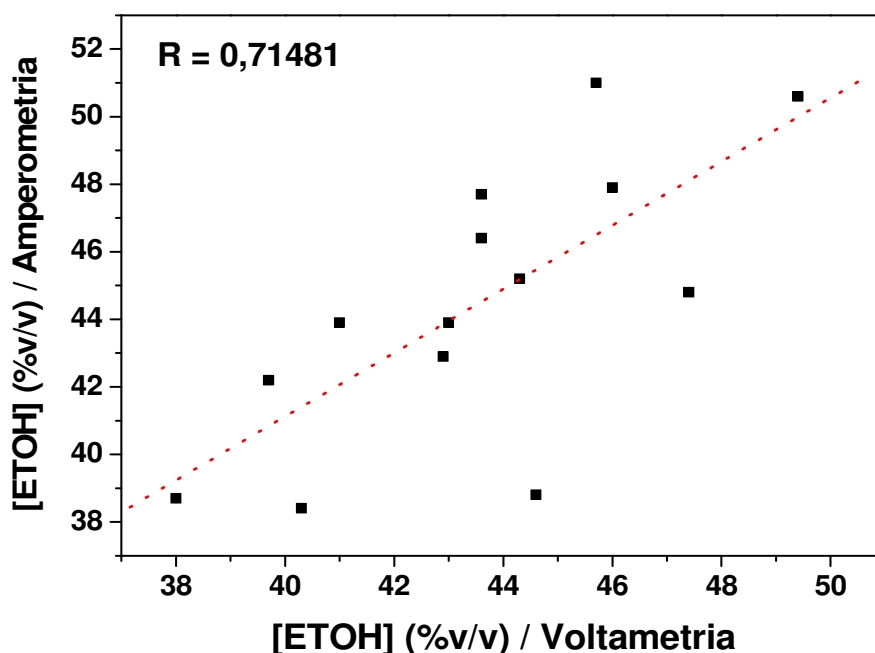


Figura 35. Comparação dos resultados obtidos entre a técnica voltamétrica e amperométrica para a determinação de etanol em amostras de cachaça.

De acordo com o coeficiente de correlação obtido no gráfico da figura 33, conclui-se que existe uma correlação de grau forte ( $R = 0,77$ ) entre os resultados obtidos pelo método amperométrico e os resultados obtidos pelo densímetro. Entre os resultados obtidos pelo método voltamétrico e os resultados apresentados pelo densímetro houve uma correlação regular ( $R = 0,53$ ), o que pode ser explicado pelo grande intervalo de tempo entre as análises, e a volatilidade do analito, o que influencia nos níveis de etanol obtidos uma vez que cada amostra foi vedada de formas diferentes podendo em cada uma haver perdas diferentes de analito. Já entre as técnicas voltamétrica e amperométrica houve uma correlação forte ( $R = 0,72$ ) entre os métodos propostos.

Com os resultados obtidos podemos observar que o sensor de cobre apresentou resultados muito próximos ao do densímetro digital. Apesar do densímetro apresentar um fácil manuseio, a vantagem dos sensores de cobre está numa futura monitoração on-line das cachaças produzidas em alambiques, onde o sensor faria a medição das concentrações de etanol

continuamente o que possibilitaria um maior controle de qualidade visando a exportação.

## 4.2. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS PESADOS EM LEITE USANDO ELETRODOS IMPRESSOS DE OURO

### 4.2.1 Eletrodos Impressos de ouro na análise de metais

As técnicas de redissolução representam uma ferramenta poderosa na análise de metais em amostras ambientais, industriais e medicinais. Eletrodos modificados com mercúrio têm sido utilizados na busca de sensores com alta reprodutibilidade e sensibilidade. Entretanto, o crescente interesse em análises descentralizadas juntamente com questões ambientais necessita de novas técnicas livres de mercúrio [154-157]. Eletrodos de ouro sem modificação têm sido aplicados na detecção de metais pesados como chumbo, cobre e mercúrio através de técnicas de redissolução em diferentes matrizes [158-164]. Eletrodos impressos de ouro, ou eletrodos impressos de carbono revestidos de ouro, são relatados na literatura como sensores descartáveis na análise de metais [161, 165].

A utilização destes eletrodos juntamente com a redissolução voltamétrica de onda quadrada vem apresentando resultados interessantes nas quantificações de metais. Neste tipo de análise é aplicado um potencial de redução adequado onde os analitos de interesse irão se depositar na superfície do eletrodo. Após esta etapa, é aplicado um sinal em degraus que é adicionado a um trem de pulsos originando o sinal de excitação de onda quadrada, etapa na qual os analitos são redissolvidos sendo removidos do eletrodo através do processo de oxidação. Buscando encontrar um menor tempo de análise com as melhores condições, alguns parâmetros eletroquímicos devem ser estudados nesta técnica como potencial de deposição, tempo de deposição, degrau, amplitude, frequência de pulso e concentração do eletrólito suporte [146].

#### 4.2.1.1. Potencial de deposição

O potencial de deposição foi estudado de maneira crescente variando de -0,80 a -0,40 V usando a voltametria de onda quadrada. As figuras 36 e 37



mostram a variação do sinal analítico com o potencial de deposição aplicado. Neste estudo foi levado em consideração somente o sinal de corrente do chumbo como parâmetro, pois não houve variação significativa no sinal do cobre frente à variação do potencial de deposição aplicado.

O potencial de trabalho se mostrou ótimo em -0,50 V. A partir deste potencial o sinal se mantém constante até -0.70 V devido, provavelmente, à saturação da superfície do eletrodo. Já a partir de -0,80 V ocorre uma diminuição no sinal analítico possivelmente devido à formação de hidrogênio impedindo a redução dos metais na superfície do eletrodo.

Na figura 36 é possível ainda observar dois picos de contaminação referentes a alguma espécie eletroativa existente nas tintas utilizadas na fabricação dos eletrodos. Em testes anteriores utilizando eletrodo de ouro convencional e em trabalhos publicados na literatura não houve a observação de tal comportamento. Durante as análises foram testadas diversos tipos de tintas condutivas de prata e carbono, sendo que cada eletrodo produzido por tintas diferentes apresentava resultados específicos com relação à contaminação dita anteriormente.

A eliminação destes interferentes não foi possível, visto que podem ser qualquer um componente da tinta. Já a diminuição da intensidade dos sinais referentes à contaminação foi possível, através da utilização de tintas de prata e carbono previamente testadas, fornecendo assim resultados mais satisfatórios.

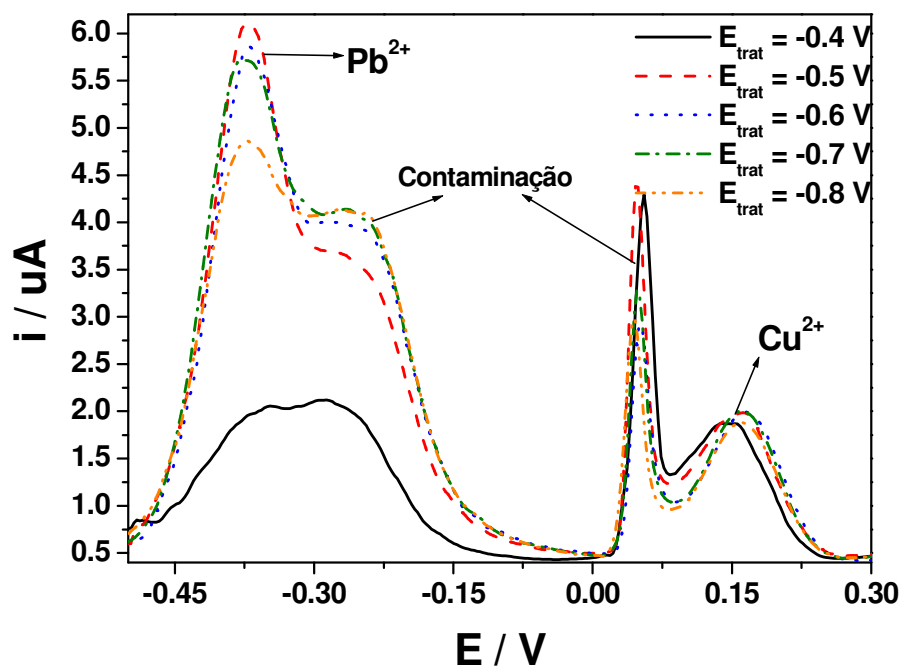


Figura 36. Variação do potencial de deposição para a análise de cobre e chumbo. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.

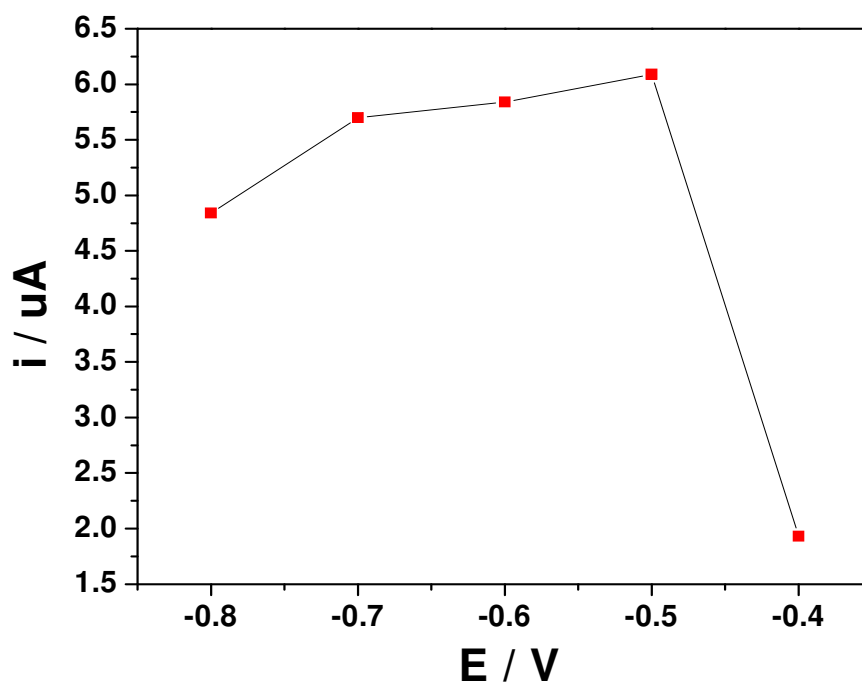


Figura 37. Estudo do potencial de deposição para a quantificação do chumbo. Eletrólito  $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Pb}] = 80 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $[\text{Cu}] = 16 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.2.1.2. Tempo de deposição

O tempo de deposição é um dos parâmetros que influencia diretamente no tempo e na sensibilidade da análise, portanto sua redução é sempre satisfatória. O tempo de deposição é o período de tempo em que é aplicado o potencial catódico para a redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, por isso quanto maior esse tempo, maior será a pré-concentração das espécies de interesse na superfície do eletrodo. Foram estudados intervalos de tempo entre 60 e 300 segundos. As figuras 38 e 39 mostram as respostas obtidas para diferentes tempos de deposição. Novamente o chumbo foi o fator limitante na escolha, pois sofreu maiores alterações com a variação do tempo de deposição. Podemos observar que inicialmente ocorreu um aumento significativo na sensibilidade do método quando o tempo variou de 60 s para 120 s, já entre 180 e 300 s não foi observado um aumento significativo no valor de corrente, o que justificou um aumento bastante acentuado no tempo de análise da amostra. Desta forma o tempo de 120 segundos foi escolhido como o mais eficiente para este trabalho.

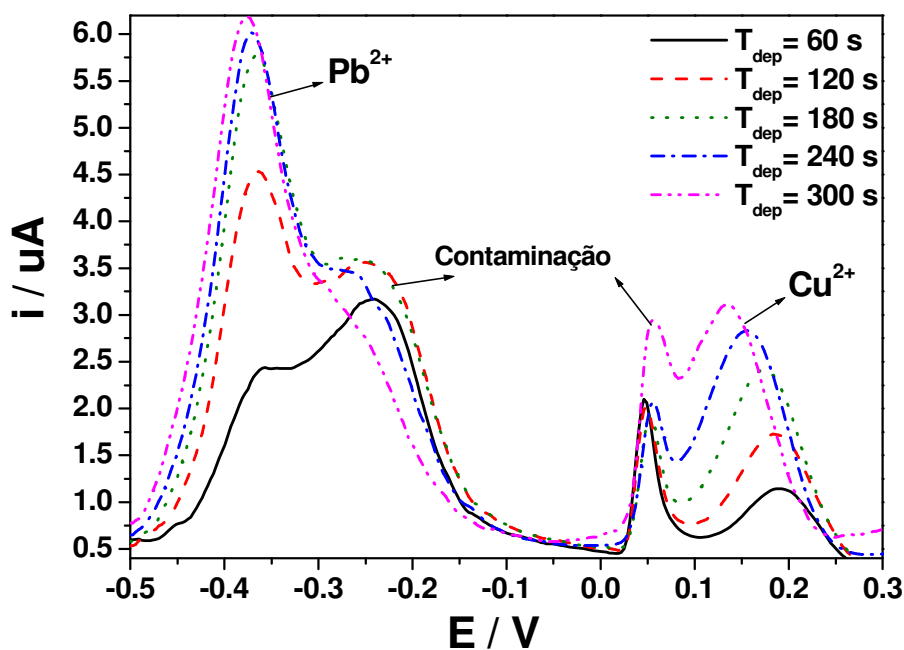


Figura 38. Variação do tempo de deposição. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.

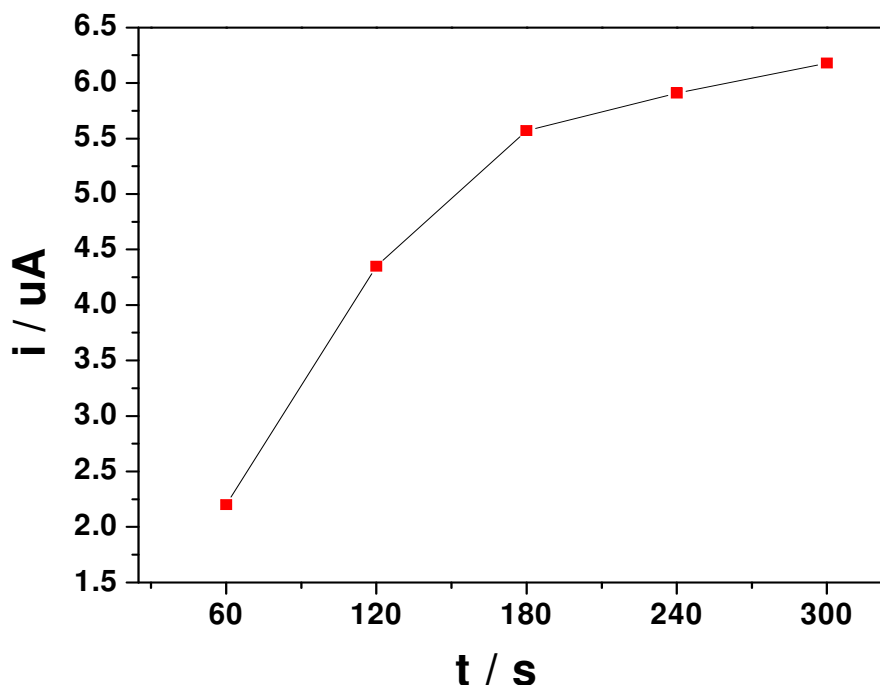


Figura 39. Estudo do tempo de deposição para o chumbo. Eletrólito HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, [Pb] = 80 µg L<sup>-1</sup> e [Cu] = 16 µg L<sup>-1</sup>.

Em situações específicas de amostras com menores concentrações dos metais, um tempo de deposição de 180 s poderia ser utilizado, pois apesar de aumentar o tempo de análise, aumentaria também a sensibilidade do método. Desta forma, o tempo de deposição em análises futuras será definido pela concentração dos analitos nas amostras.

#### 4.2.1.3. Degrau, amplitude e frequência de pulso

Além do tempo de deposição e potencial de deposição, que são os parâmetros mais importantes para a análise, tais como; degrau, amplitude e a frequência de pulso também foram avaliados. Na literatura encontram-se aplicações da técnica envolvendo diferentes valores de degrau, amplitude e frequência de pulso. Desta forma foram testados alguns valores para os parâmetros, a fim de identificar a real influência na análise [80, 146].

As figuras 40, 41 e 42 demonstram os resultados obtidos para o degrau, amplitude e frequência de pulso, respectivamente.

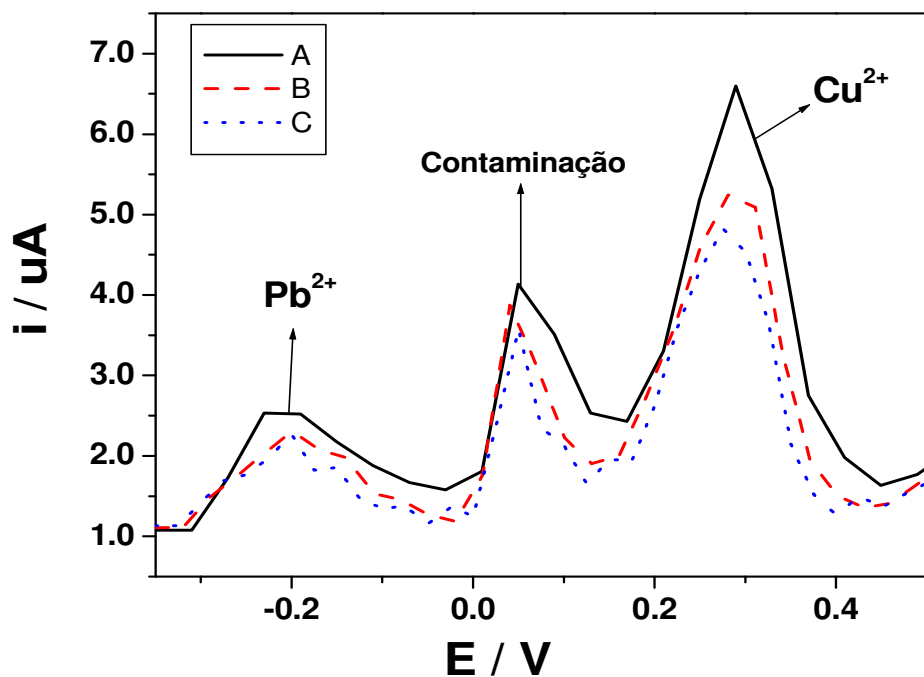


Figura 40. Variação do degrau de pulso na determinação de cobre e chumbo. A = 30 mV, B = 3 mV e C = 0,3 mV. Eletrólito HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, [Pb<sup>2+</sup>] = 14 µg L<sup>-1</sup> e [Cu<sup>2+</sup>] = 16 µg L<sup>-1</sup>.

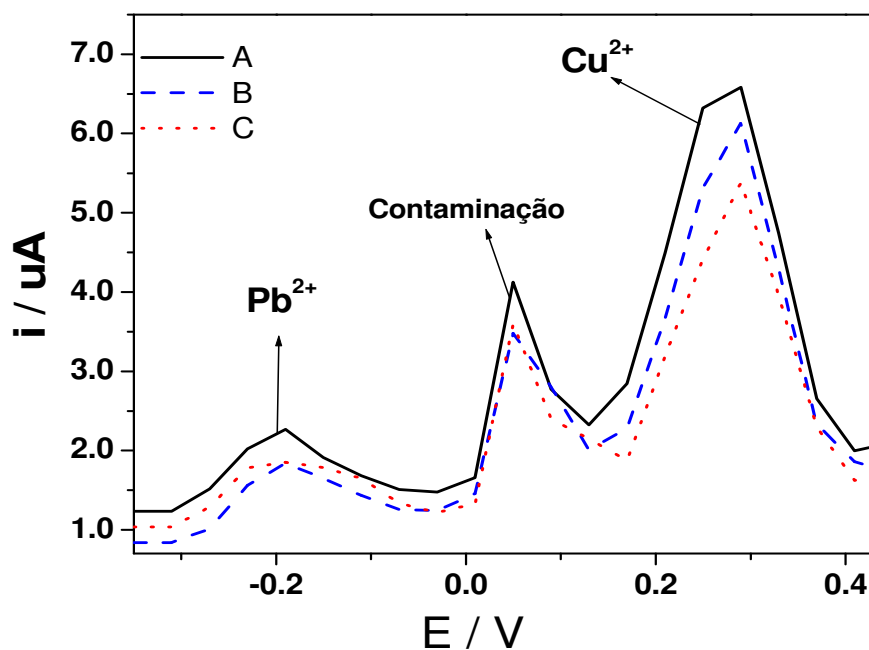


Figura 41. Variação da amplitude de pulso na determinação de cobre e chumbo. A = 28 mV, B = 24 mV e C = 20 mV. Eletrólito HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, [Pb<sup>2+</sup>] = 14 µg L<sup>-1</sup> e [Cu<sup>2+</sup>] = 16 µg L<sup>-1</sup>.

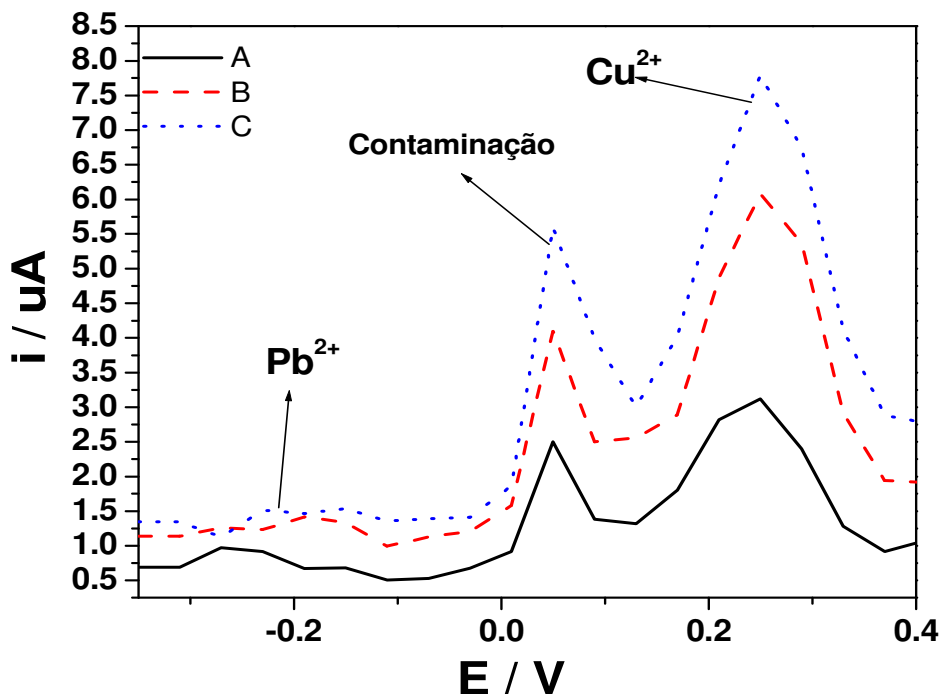


Figura 42. Variação da frequência do pulso na determinação de cobre e chumbo. A = 10 Hz, B = 15 Hz e C = 20 Hz. Eletrólito HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, [Pb<sup>2+</sup>] = 14 µg L<sup>-1</sup> e [Cu<sup>2+</sup>] = 16 µg L<sup>-1</sup>.

Com os estudos realizados, os parâmetros escolhidos para análise foram: degrau = 3 mV, amplitude = 28 mV e frequência = 15 Hz. A escolha foi feita levando-se em consideração análises prévias utilizando estes valores, parâmetros já estabelecidos na literatura e no fato de que nenhum deles afeta significativamente as análises.

Comparando as figuras dos itens 4.2.1.2. e 4.2.1.3. pode-se observar o deslocamento dos picos referentes ao cobre e ao chumbo. Este deslocamento está diretamente ligado ao pseudo-eletrodo de referência, e conseqüentemente à confecção dos eletrodos. Com o decorrer do trabalho foi uniformizado o processo de confecção dos eletrodos diminuindo assim esta variação.

#### 4.2.1.4. Concentração do eletrólito suporte

O ácido clorídrico é largamente utilizado como eletrólito suporte na detecção de metais pesados, contudo neste trabalho ele desempenha outras funções. Como o eletrodo impresso de ouro apresenta um pseudo-eletrodo de prata, consistindo somente em prata metálica, uma concentração constante de íons cloreto, no eletrólito suporte, é necessário para a estabilização do pseudo-eletrodo de referência.

Contudo, elevadas concentrações de ácido clorídrico causam a diminuição da sensibilidade na análise de metais, algo já relatado na literatura [159, 163]. Foram feitos então testes mantendo as concentrações de chumbo e cobre constantes e variando a concentração do eletrólito suporte. Foram escolhidos os seguintes valores de concentração de ácido clorídrico: 0,10; 0,50 e 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Os valores escolhidos deveriam ser suficientes para estabilizar o pseudo-eletrodo de prata, mas não causar o efeito de diminuição da sensibilidade. Os resultados são demonstrados nas figuras 43, 44 e 45, onde fica evidente a diminuição dos sinais referentes aos metais frente ao aumento da concentração do eletrólito suporte.

Para o chumbo, comparando o máximo de corrente obtido em 1,0 mol L<sup>-1</sup> e 0,10 mol L<sup>-1</sup>, houve uma diminuição de 30 % no sinal obtido quando utilizou-se a maior concentração. Para o cobre, comparando o máximo de corrente obtido em 1,0 mol L<sup>-1</sup> e 0,10 mol L<sup>-1</sup>, houve uma diminuição de aproximadamente 65 % no sinal obtido quando utilizou-se a maior concentração.

Frente aos resultados obtidos optou-se pela utilização do eletrólito suporte na concentração de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico.

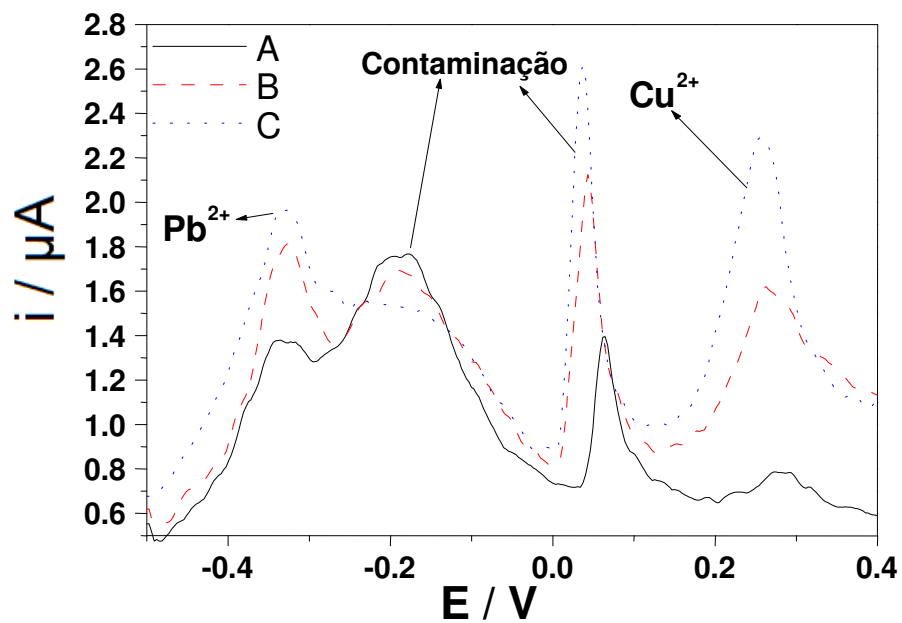


Figura 43. Influência do eletrólito suporte na sensibilidade. As concentrações de HCl foram de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (A),  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  (B) e  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (C).

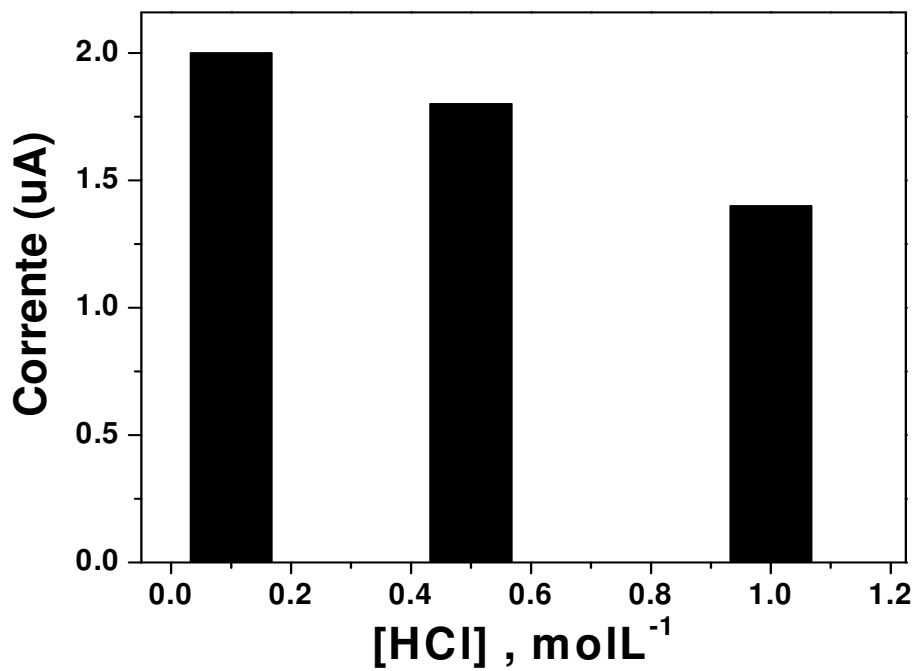


Figura 44. Influência do eletrólito suporte na análise de chumbo.



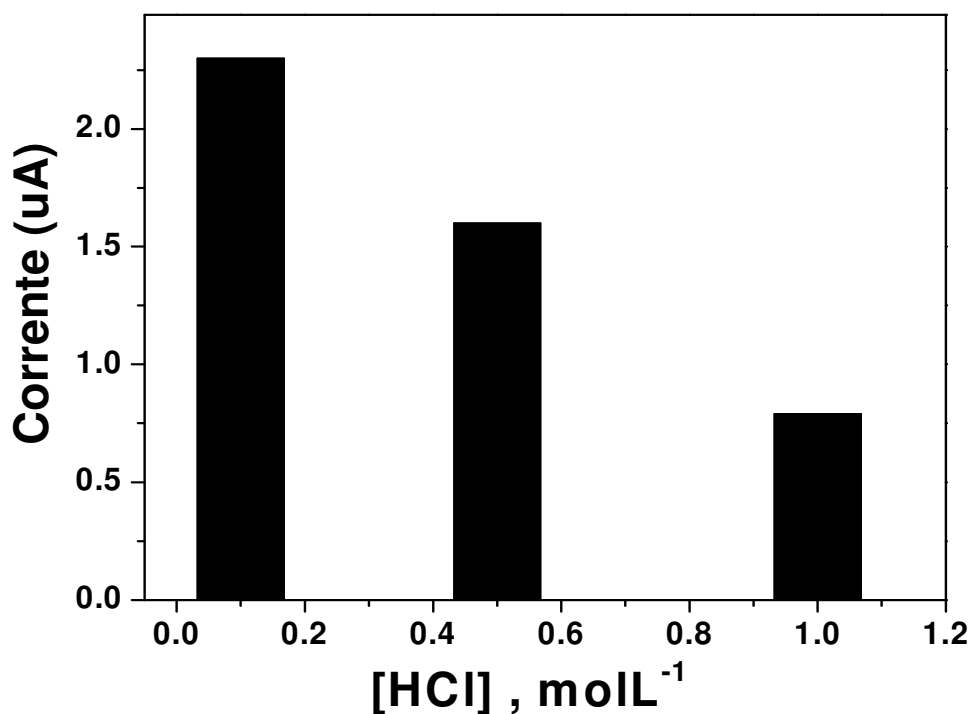


Figura 45. Influência do eletrólito suporte na análise de cobre.

#### 4.2.2. Digestão das amostras

Inicialmente tentou-se realizar a extração da amostra utilizando ácido clorídrico e etanol. Os resultados obtidos com este método não foram satisfatórios devido à grande quantidade de matéria orgânica vinda do leite, e não destruída no processo. A matéria orgânica envenena o eletrodo de trabalho, sendo um forte interferente de medidas voltamétricas [159, 165].

Desta forma foi realizada a digestão das amostras através da carbonização da matéria orgânica. Inicialmente um volume de 5,00 mL de amostra foi adicionado a um cadinho, juntamente com 2,00 mL de ácido nítrico concentrado e 2,00 mL de peróxido de hidrogênio 30 % v/v. A solução resultante foi então levada a uma chapa aquecedora até a secura. Após esta etapa, o cadinho foi levado até a mufla onde foi acondicionado a 500 °C durante 3 horas. Após a destruição total da matéria orgânica, as cinzas contendo os metais foram então solubilizadas em HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> em um balão volumétrico de 5,00 mL. O processo está descrito na figura 46.

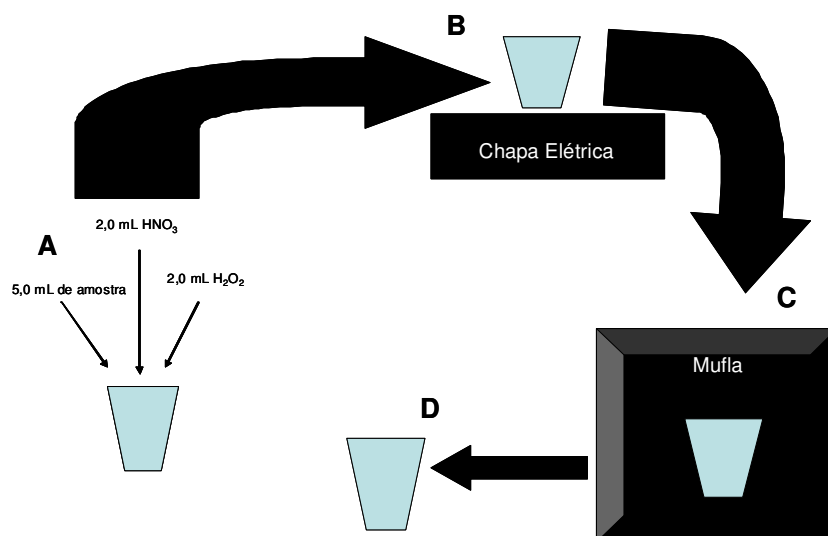


Figura 46. Organograma de abertura da amostra. A: mistura do leite com ácido e peróxido; B: a solução é aquecida até a secura; C: a amostra é então levada à mufla por 3 horas a  $500\text{ }^\circ\text{C}$  e D: cinzas prontas para serem solubilizadas.

#### 4.2.3. Determinação de cobre e chumbo por voltametria de onda quadrada

##### 4.2.3.1. Avaliação da exatidão do método analítico

Foi feita a análise de uma amostra de referência (Milk Powder BCR<sup>®</sup>-151 da Commission of the European Communities). Trata-se de uma amostra de leite em pó desnatado contendo quantidades certificadas de alguns metais, dentre eles, cobre e chumbo. Uma massa de 510 mg da amostra foi solubilizada em 5,00 mL de água e foi submetida a todo o processo de abertura da amostra empregado na análise das amostras de leite. Os valores de cobre e chumbo certificados são de  $(5,23 \pm 0,08)\ \mu\text{g g}^{-1}$  e  $(2,002 \pm 0,026)\ \mu\text{g g}^{-1}$  de amostra, respectivamente.

A tabela 13 mostra o resultado final dessa análise junto com os valores certificados da amostra de referência. Por medida de comparação desses resultados foi utilizado o teste estatístico t de Student a um nível de 95% de confiança. Como todos os valores calculados de t foram menores que o tabelado, dizemos que os valores obtidos são comparáveis com os valores certificados e que, conseqüentemente, o método apresenta uma boa exatidão,

além de não haverem perdas de analitos durante o processo de abertura da amostra para todas as espécies analisadas.

Tabela 10. Resultados da análise da amostra de referência.

	<b>Cu, <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	<b>Pb, <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>
<b>1</b>	5,80	2,06
<b>2</b>	5,39	1,63
<b>3</b>	4,60	1,73
<b>MEDIA</b>	5,26	1,81
<b>DP</b>	0,61	0,23
<b>t<sub>calculado</sub></b>	0,09	1,446
<b>t<sub>tabelado 95%</sub></b>	4,303	
<b>VALOR CERTIFICADO</b>	5.23 $\pm$ 0,08	2,002 $\pm$ 0,026

#### 4.2.3.2. Análise das amostras de leite

Utilizando os parâmetros eletroquímicos anteriormente definidos (tabela 14) foi realizada a adição de padrão de cobre e chumbo separadamente a fim de se determinar o potencial de resposta de cada um dos analitos. As figuras 47 e 48 mostram os resultados obtidos para adições consecutivas de cobre e chumbo, a fim de avaliar a variação do sinal instrumental com a concentração dos metais.

Tabela 11. Parâmetros eletroquímicos.

Parâmetros eletroquímicos	Cu/Pb
$E_{limpeza}$ (mV)	500
$t_{limpeza}$ (s)	30
$E_{deposição}$ (mV)	-500
$t_{deposição}$ (s)	120
$t_{equilíbrio}$ (s)	30
$E_{degrau}$ (mV)	3
Amplitude (mV)	28
frequência (Hz)	15
$E_{limite}$ (mV)	400

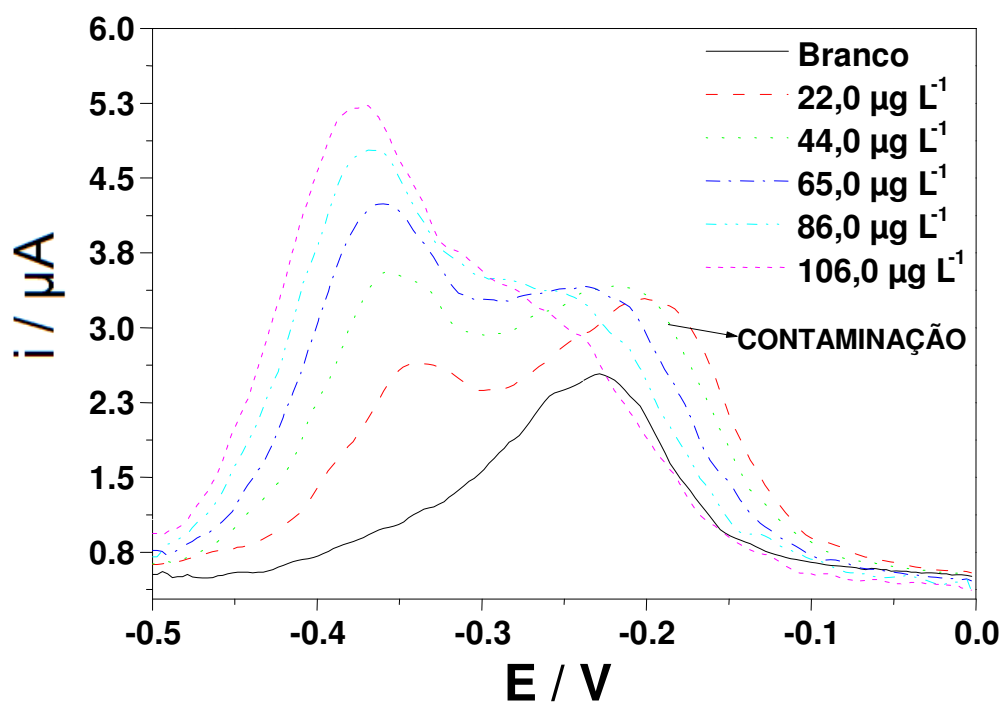


Figura 47. Variação das concentrações de chumbo frente aos parâmetros da tabela 14. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.

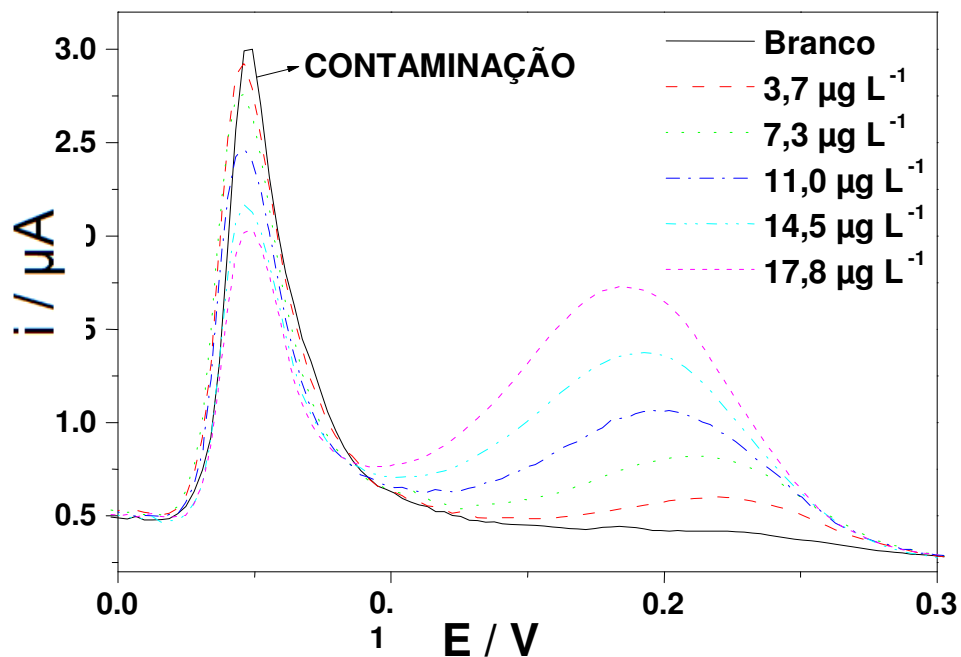


Figura 48. Variação da concentração de cobre frente aos parâmetros da tabela 14. A contaminação é referente à tinta condutora utilizada na montagem dos eletrodos.

As análises das figuras 47 e 48 foram realizadas variando a concentração de cobre e chumbo em  $3,7 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $22 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, tendo como eletrólito suporte  $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Posteriormente foi feita uma adição de padrão envolvendo os dois metais, como pode ser observado na figura 49. As figuras 50 e 51 são as curvas de calibração para o chumbo e para o cobre, respectivamente.

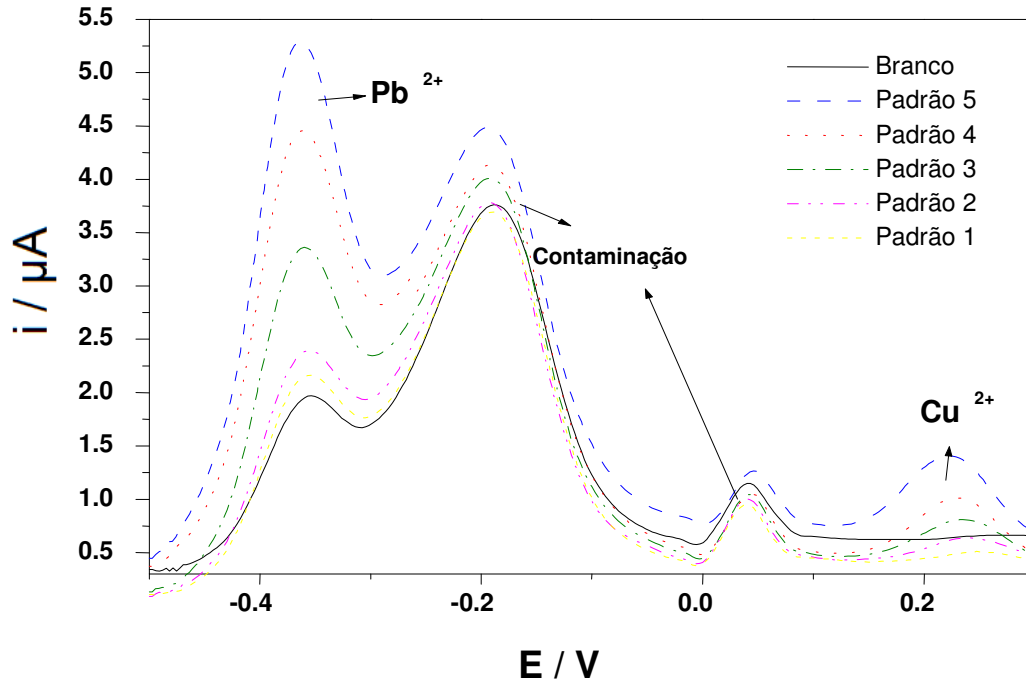


Figura 49. Variação da concentração de cobre e chumbo frente aos parâmetros da tabela 11. A concentração de chumbo variou de 0 a  $36 \mu\text{g L}^{-1}$ , já o cobre variou de 0 a  $24 \mu\text{g L}^{-1}$ .

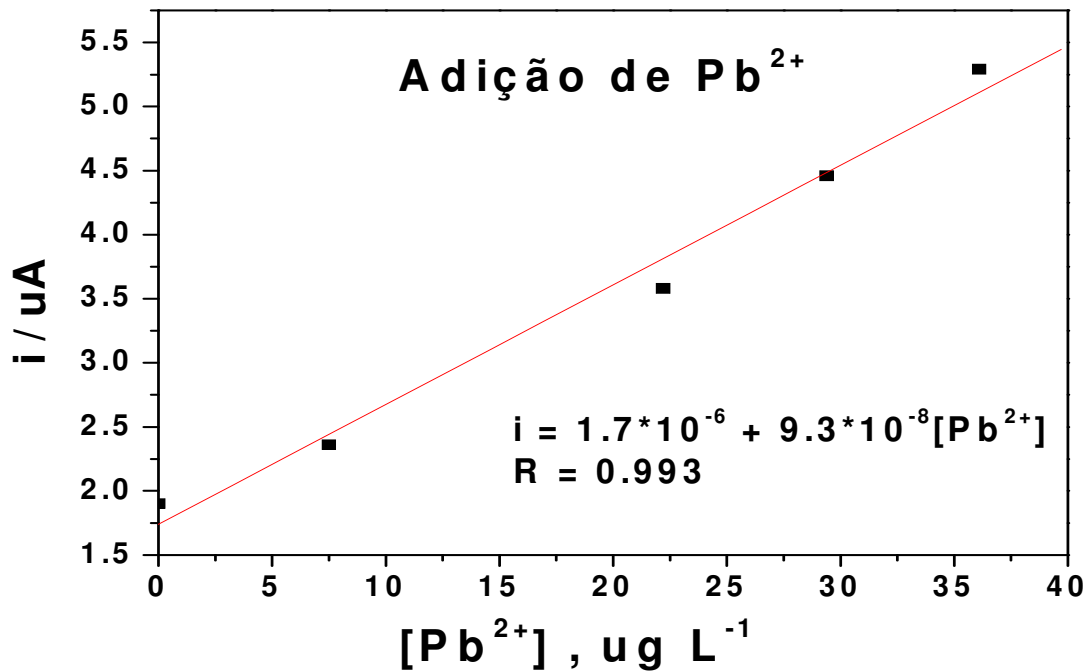


Figura 50. Curva de calibração para o chumbo.

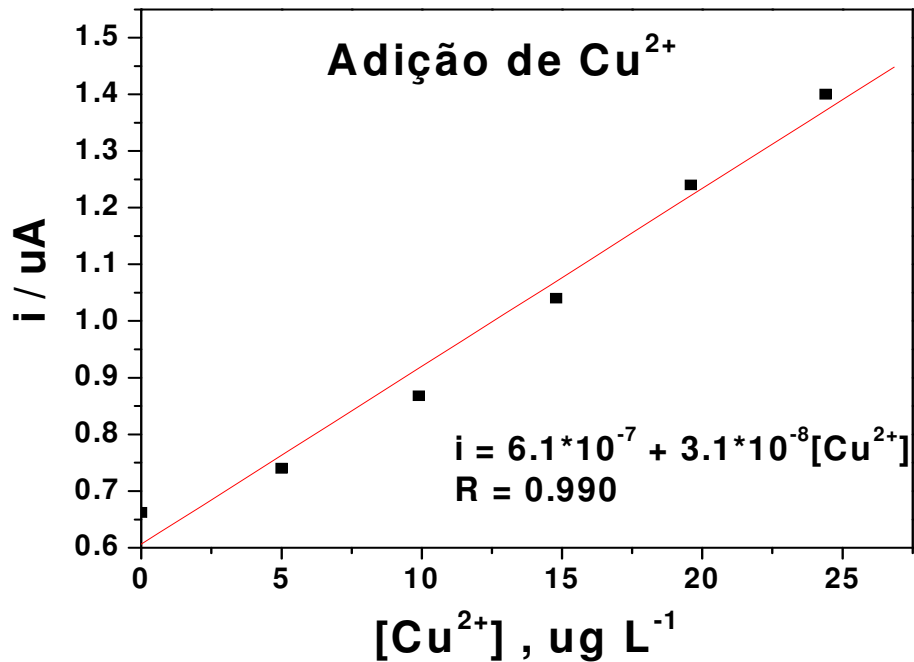


Figura 51. Curva de calibração para o cobre.

As curvas analíticas para o chumbo e o cobre apresentaram ótima sensibilidade analítica, obtendo limites de detecção ( $3s_b$ ) e quantificação ( $10s_b$ ) calculados em função da linha base na ausência do analito. Para o chumbo os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, de  $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,7 \mu\text{g L}^{-1}$ . Já para o cobre, os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, de  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Após estas análises foram realizadas as medidas das amostras. A metodologia utilizada para a determinação foi a de adição de padrão, visto que análises envolvendo curva de calibração tradicional poderia não demonstrar resultados satisfatórios em função do efeito de matriz.

As análises foram realizadas adicionando-se  $3,90 \text{ mL}$  de  $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$  em uma célula eletroquímica onde foi feito o branco. Posteriormente foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  de amostra de leite já digerida e diluída. Por fim, foram adicionadas alíquotas de  $15 \mu\text{L}$  de chumbo  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $10 \mu\text{L}$  de cobre  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ . As análises foram realizadas em triplicata.

As figuras 52, 53 e 54 referem-se à amostra 8 e mostram a adição de Pb e Cu. Já as figuras 55, 56 e 57 são referentes à amostra 9.

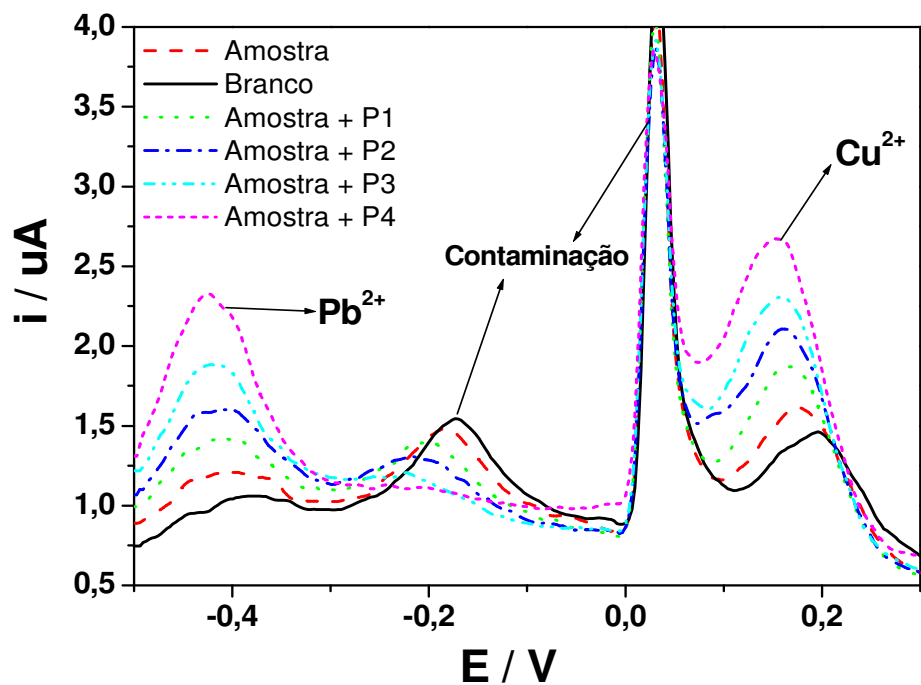


Figura 52. Adição de padrão de cobre e chumbo para a análise da amostra 8.

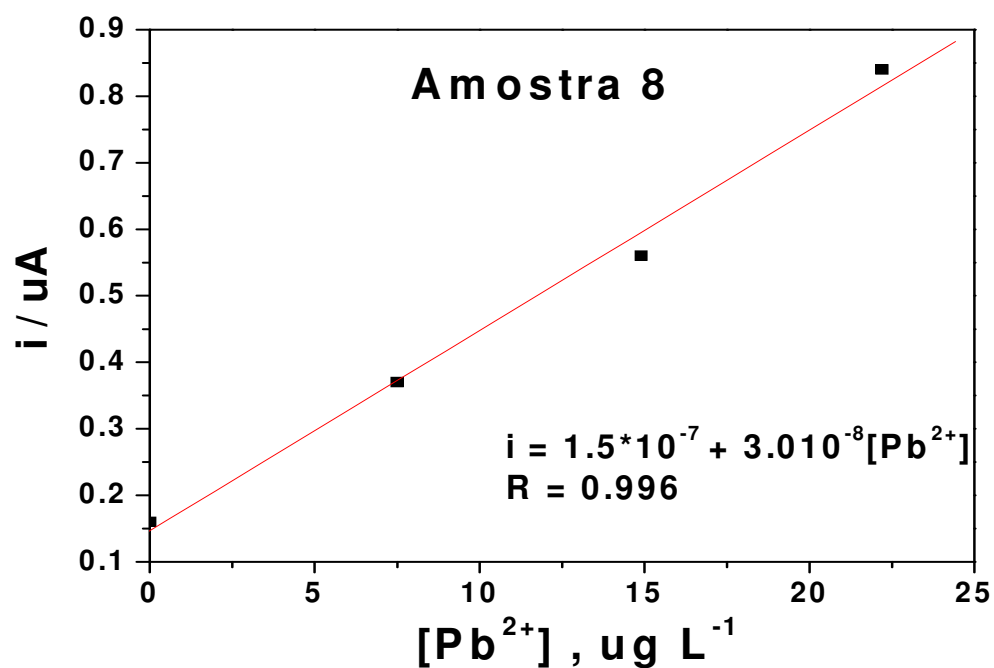


Figura 53. Curva de adição de padrão para o chumbo referente à amostra 8.



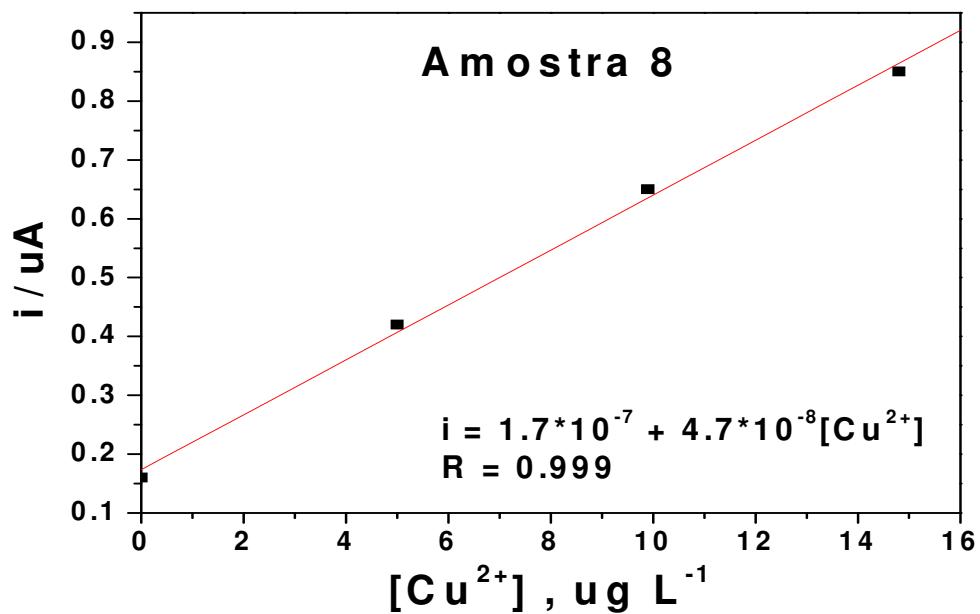


Figura 54. Curva de adição de padrão para o cobre referente à amostra 8.

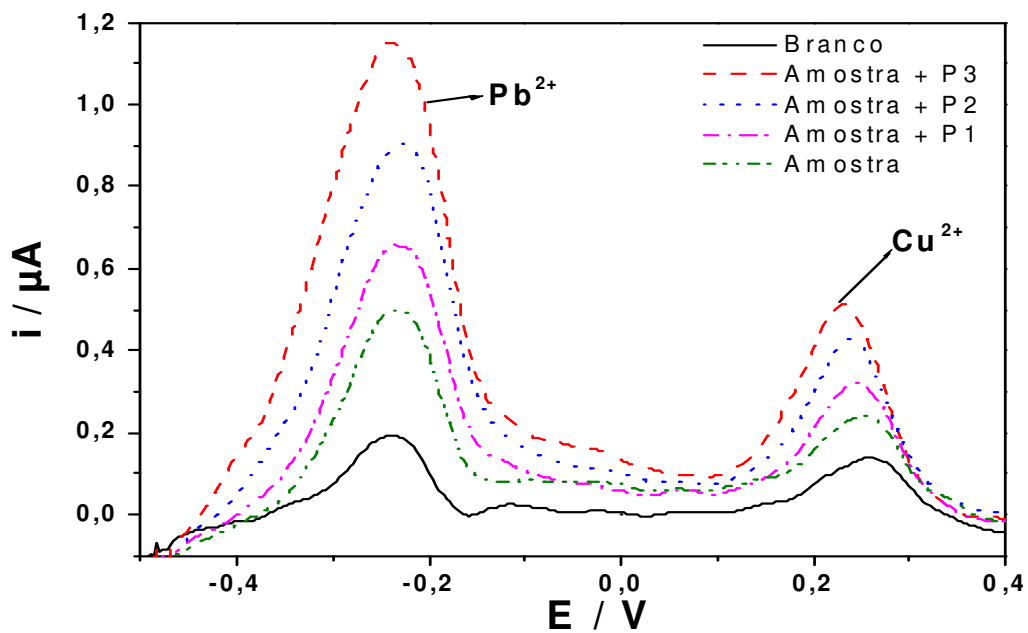


Figura 55. Adição de padrão de cobre e chumbo para a análise da amostra 6.

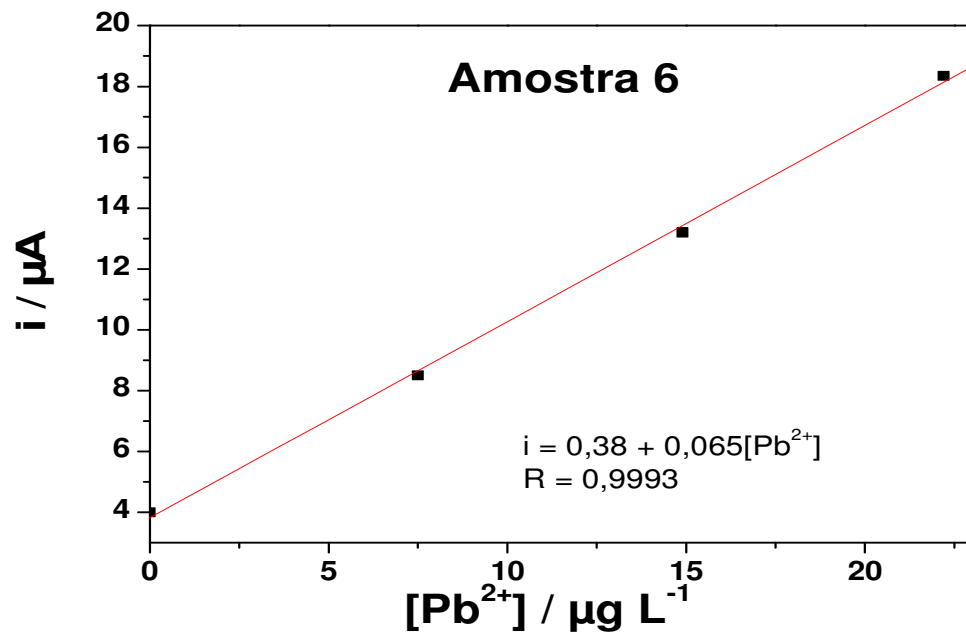


Figura 56. Curva de adição de padrão para o chumbo referente à amostra 6.

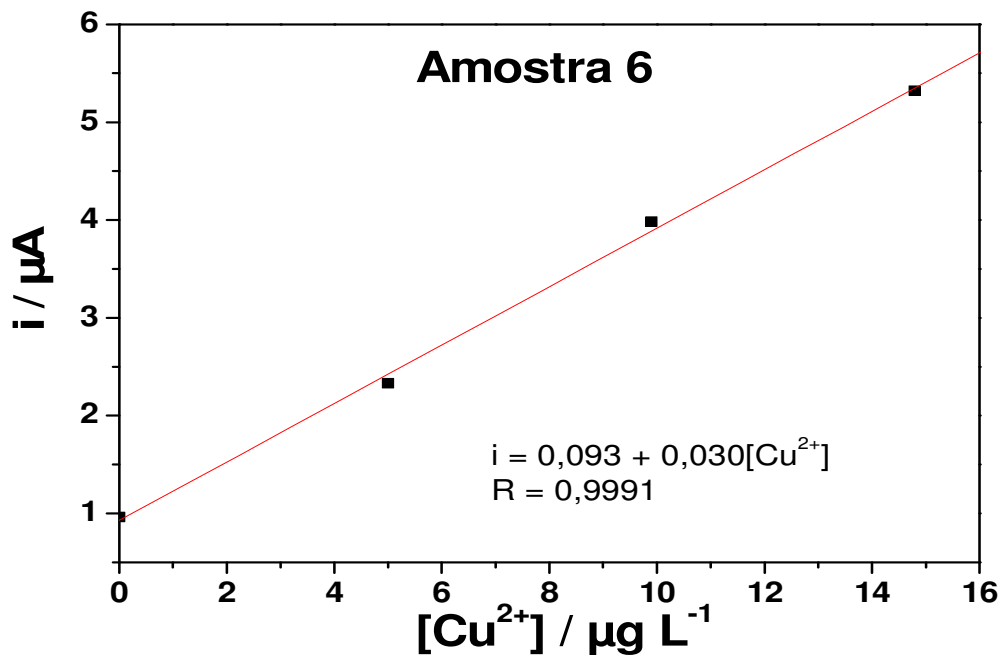


Figura 57. Curva de adição de padrão para o cobre referente à amostra 6.

Através das figuras 52 e 55 podemos observar a influência das tintas utilizadas na confecção dos eletrodos com relação à presença da contaminação. Na figura 52 existe um grande sinal de contaminação entre 0,0 e 0,1 V que não é observado na figura 55, pois foram utilizados eletrodos impressos diferentes em cada análise. Os eletrodos impressos de ouro se mostraram duráveis, podendo ser utilizados, em média, por 5 análises ou até mais, desde que seu eletrodo de trabalho seja limpo entre as análises com ácido nítrico ou sulfúrico para retirada do excesso de metal depositado na superfície.

Na tabela 15 estão às concentrações de chumbo e cobre determinadas para as amostras de 1 a 9. Apesar de não haver comparação com outros métodos de análise, vale ressaltar que a análise da amostra de referência, que passou pelo mesmo tratamento das amostras, chegou a resultados satisfatórios frente ao descrito pelo fabricante.

Tabela 12. Concentrações de cobre e chumbo nas amostras de leite analisadas e intervalo de confiança.

<b>AMOSTRA</b>	<b>Pb<sup>2+</sup>, µg L<sup>-1</sup></b>	<b>Cu<sup>2+</sup>, µg L<sup>-1</sup></b>
<b>1</b>	159 ± 14	127 ± 27
<b>2</b>	48 ± 10	116 ± 36
<b>3</b>	293 ± 12	57 ± 18
<b>4</b>	410 ± 32	135 ± 6
<b>5</b>	83 ± 16	104 ± 13
<b>6</b>	130 ± 12	229 ± 6
<b>7</b>	298 ± 34	177 ± 24
<b>8</b>	108 ± 12	221 ± 9
<b>9</b>	318 ± 46	296 ± 6

De acordo com a regulamentação brasileira, as concentrações de chumbo estiveram acima do valor máximo permitido que é de 0,05 mg kg<sup>-1</sup>. Em trabalhos anteriores realizados no Brasil também foram encontrados valores de chumbo acima do permitido em um grande número de amostras comerciais, o que revela a dificuldade de controle deste metal. Os níveis de chumbo variaram de 50 a 411 µg L<sup>-1</sup>, com teor médio de 199,8 µg L<sup>-1</sup>, resultado semelhante ao encontrado em 2008, na região de Goiás e publicado pelo Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, onde foram analisadas amostras de leite comercial [166].

Já para o cobre, os valores encontrados estão abaixo do valor máximo permitido pela legislação brasileira que é de 0,2 mg kg<sup>-1</sup>, com exceção das amostras 8 e 9. Os níveis de cobre variaram de 44 a 299 µg L<sup>-1</sup>, com teor médio de 146,4 µg L<sup>-1</sup>. Vale ressaltar que o valor máximo para ingestão diária do cobre é de 2 mg/dia [166, 167].

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Todos os testes realizados (voltamétrico e amperométrico) correspondem às expectativas no que concerne aos objetivos propostos gerais e específicos do projeto de pesquisa.

Nos três métodos, a otimização da quantidade de reagentes e soluções para as análises foi satisfatória, promovendo assim, a possibilidade das análises, com exatidão e precisão, e sem custos excessivos.

O eletrodo impresso de cobre mostrou resultados similares ao eletrodo convencional, o que revela sua grande potencialidade na determinação de etanol em diferentes matrizes. As concentrações de etanol determinadas por voltametria variaram de 38,0 a 49,4 % v/v e os limites de detecção e quantificação foram de 0,085 e 0,28 %v/v, respectivamente. As concentrações de etanol determinadas por amperometria variaram de 33,8 a 51,0 %v/v, e os limites de detecção e quantificação foram de 0,024 e 0,080 %v/v, respectivamente.

Os resultados obtidos pelas técnicas amperométrica, voltamétrica e pelo densímetro estão em concordância entre si e com os valores descritos nos rótulos das bebidas. Desta forma abre-se caminho para novas pesquisas, além da possibilidade de análises em campo, como em alambiques na monitoração *on-line* da produção de cachaça.

O eletrodo impresso de ouro mostrou resultados similares ao eletrodo convencional. O tempo de pré-concentração e potencial de deposição otimizados foram de 120 s e -500 mV respectivamente. As concentração de chumbo nas amostras variaram de 50 a 411  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e os limites de detecção e quantificação para o metal foram de 0,8 e 2,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. As concentrações de cobre nas amostras variaram de 44 a 299  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e os limites de detecção e quantificação foram de 0,6 e 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. O método mostrou-se eficaz e o eletrodo robusto, o que possibilitará novas pesquisas, a possibilidade de análises em laticínios, além da possibilidade da utilização dos eletrodos impressos de ouro na análise de compostos orgânicos como pesticidas e metabólitos em diferentes tipos de amostras reais.

Tabela 13: Variação das concentrações de chumbo e cobre nas amostras analisadas.

	Mínimo, $\mu\text{g L}^{-1}$	Máximo, $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	<b>50</b>	<b>411</b>
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>44</b>	<b>299</b>

Foram analisadas 15 amostras de cachaça por voltametria e amperometria, 9 amostras de leite comercial por redissolução voltamétrica de onda quadrada. Os resultados referentes ao etanol se mostraram compatíveis entre si e com o descrito pelo fabricante. Com relação aos metais, em todas as amostras de leite analisadas os teores de chumbo estiveram acima do estabelecido pela legislação brasileira, já os teores de cobre estiveram de acordo com a legislação brasileira, com exceção de duas amostras.

Os eletrodos impressos demonstraram resultados satisfatórios, facilidade de produção, baixo preço de produção, produção em alta escala o que abre caminho para uma vasta gama de análises em laboratório e em campo.

### 5.1. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Utilizar os eletrodos impressos de ouro e cobre desenvolvidos na análise de diferentes analitos de interesse como pesticidas, creatinina e outros.

Correlacionar os resultados obtidos na análise de novas amostras de leite, através do eletrodo impresso de ouro, com outras técnicas já estabelecidas. Aplicar o método desenvolvido no presente trabalho para quantificar chumbo, cobre e outros metais em cachaças, como também em outras amostras de interesse.

Produzir eletrodos impressos de prata a partir de CDs graváveis de prata, através da metodologia estabelecida, o que aumentaria as possibilidades de análise.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Sawyer, D. T.; Sobkowiak, A.; Roberts J. L.; *Electrochemistry for Chemists*, 2nd. Ed. New York: Wiley, **1995**.
- 2 - Renedo, O. D.; Alonso-Lomillo, M. A.; Martínez, M. J. A.; *Talanta* **2007**, *73*, 202.
- 3 - Hart, J. P.; Crew, A.; Crouch, E.; Honeychurch, K. C.; Pemberton, R. M.; *Anal. Lett.* **2004**, *37*, 789.
- 4 - Wang, J.; *Analyst* **1994**, *119*, 763.
- 5 - Nascimento, V. B.; Angnes, L.; *Química Nova* **1998**, *21*(5), 614.
- 6 - Brainina, Kh. Z.; Bond, A. M.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2586.
- 7 - Carvalhal, R. F.; Kfoury, M. S.; Piazzetta, M. H. O.; Gobbi, A.; Kubota, L. T., *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1162.
- 8 - Alvarez-Icaza, M.; Bilitewski, U.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 525A.
- 9 - Eggings, B. R.; *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley and Sons, Chichester, **2002**.
- 10 - Newman, J. D.; White, S. F.; Tothill, I. E.; Turner, A. P. F.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4594.
- 11 - Cardosi, M. F.; Birch, S. W.; *Anal. Chim. Acta.* **1993**, *276*, 69.
- 12 - Collier, W. A.; Janssen, D.; Hart, A. L.; *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1041.
- 13 - Wang, J.; Tian, B. M.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1706.
- 14 - Ashley, K.; *Electroanalysis* **1994**, *6*, 805.
- 15 - Ashley, K.; Wise, T. J.; Mercado, W.; Parry, D. B.; *J. Hazard. Mater.* **2001**, *83*, 41.
- 16 - Desmond, D.; Lane, B.; Alderman, J.; Hall, G.; Alvarez-Icaza, M.; Garde, A.; Ryan, J., Barry, L.; Svehla, G.; Arrigan, D. W. M.; Schniffner, L.; *Sensors and Actuators* **1996**, *34*, 466.
- 17 - Desmond, D.; Lane, B.; Alderman, J.; Hill, M.; Arrigan, D. W. M.; Glennon, J. D., *Sensors and Actuators* **1998**, *48*, 409.

- 18 - Palchetti, I.; Cagnini, A.; Mascini, M.; Turner, A. P. F.; *Mikrochim. Acta* **1999**, *131*, 65.
- 19 - Parat, C.; Betelu, S.; Authier, L.; Potin-Gautier, M. ; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *14*, 573.
- 20 - Wang, J.; *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1133.
- 21 - Wang, J.; Kirgoz, U. A.; Lu, J. M.; *Electrochem. Commun.* **2001**, *3*, 703.
- 22 - Wang, J.; Lu, J. M.; Hocevar, S. B.; Ogorevc, B.; *Electroanalysis* **2001**, *13*, 13.
- 23 - Kadara, R. O.; Tothill, L. E.; *Talanta* **2005**, *66*, 1089.
- 24 - Kadara, R. O.; Tothill, I. E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 770.
- 25 - Wang, J.; Tian, B. M.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1529.
- 26 - Wang, J.; Tian, B. M.; *Anal. Chem. Acta* **1993**, *274*, 1.
- 27 - Masawat, P.; Liawruangrath, S.; Slater, J. M.; *Sens. Actuators* **2003**, *91*, 52.
- 28 - Slater, J. M. Dilleen, J. W.; *Electroanalysis* **1997**, *9*, 1353.
- 29 - Majid, E.; Hrapovic, S.; Liu, Y. L.; Male, K. B.; Luong, J. H. T.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 762.
- 30 - Chikae, M.; Idegami, K.; Kerman, K.; Nagatani, N.; Ishikawa, M.; Takamura, Y.; Tamiya, E.; *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 1763.
- 31 - Song, Y. S.; Muthuraman, G.; Chen, Y. Z.; Lin, C. C.; Zen, J. M.; *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1763.
- 32 - Dominguez, O.; Arcos, J.; *Electrochem. Comm.* **2007**, *9*, 820.
- 33 - Clark, L. C. ; Lyons, C.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29.
- 34 - Kauffmann, J. M.; Guillbaut, G. G.; *Methods Biochem. Anal.* **1992**, *36*, 63.
- 35 - Nunes, G. S.; Jeanty, G.; Marty, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *523*, 107.
- 36 - Shi, M. H.; Xu, J. J.; Zhang, S.; Liu, B. H.; Kong, J. L.; *Talanta* **2006**, *68*, 1089.
- 37 - Walbel, M.; Schulze, H.; Huber, N.; Bachmann, T. T., *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1132.



- 38 - Suprun, E.; Evtugyn, G.; Budnikov, H.; Ricci, F.; Moscone, D.; Palleschi, G.; *Anal. Bioanal.* **2005**, *383*, 597.
- 39 - Bonnet, C.; Andreescu, S.; Marty, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 209.
- 40 - Solna, R.; Sapelnikova, S.; Skladal, P.; Winther-Nielsen, M.; Carlsson, C.; Emneus, J.; Ruzgas, T.; *Talanta* **2005**, *65*, 349.
- 41 - Sotiropoulou, S.; Chaniotakis, N. A.; *Biomaterials* **2005**, *20*, 825.
- 42 - Rodriguez, B. B.; Bolbot, J. A.; Tothill, I. E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 284.
- 43 - Ogonczyk, D.; Tymecki, L.; Wyzkiewicz, I.; Koncki, R.; Glab, S.; *Sens. Actuators* **2005**, *106*, 450.
- 44 - Tymecki, L.; Zwierkowska, E.; Koncki, R.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 251.
- 45 - Rodriguez, B. B.; Bolbot, J. A.; Tothill, I. E.; *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1157.
- 46 - Newman, J. D.; Setford, S. J.; *Mol. Biotechnol.* **2006**, *32*, 249.
- 47 - Gui, G.; Yoo, J. H.; Woo, B. W.; Kim, S. S.; Cha, G. S.; Nam, H.; *Talanta* **2001**, *54*, 1105.
- 48 - Newman, J. D.; Turner, A. P. F.; Marrazza, G.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *262*, 13.
- 49 - Lupu, A.; Compagnone, D.; Palleschi, G. ; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 67.
- 50 - Gui, G.; Kim, S. J.; Choi, S. H.; Nam, H.; Cha, G. S.; Paeng, K. J.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1925.
- 51 - Ohfuji, K.; Sato, N.; Hamada-Sato, N.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Okuma, H.; Watanabe, F.; *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1237.
- 52 - Nagata, R.; Yokoyama, K.; Durliat, H.; Comtat, M.; Clark, S. A.; Karube, I.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 1027.
- 53 - Crouch, E.; Cowell, D. C.; Hoskins, S.; Pittson, R. W.; Hart, J. P.; *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 712.
- 54 - Crouch, E.; Cowell, D. C.; Hoskins, S.; Pittson, R. W.; Hart, J. P.; *Anal. Biochem.* **2005**, *347*, 17.
- 55 - Gao, Z. Q.; Xie, F.; Shariff, M.; Arshad, M.; Ying, J. Y.; *Sens. Actuators*

**2005**, 111, 339.

56 - Guan, W. J.; Li, Y.; Chen, Y. Q.; Zhang, X. B.; Hu, G. Q.; *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 508.

57 - Lu, B. W.; Chen, W. C. ; *J. Magn. Magn. Mater.* **2006**, 304, e400.

58 - Chen, L. Q.; Zhang, X. E.; Xie, W. H.; Zhou, Y. F.; Zhang, Z. P.; Cass, A. E. G., *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 851.

59 - Razumiene, J.; Gureviciene, V.; Vilkanauskyte, A.; Marcinkeviciene, L.; Bachmatova, I.; Meskys, R.; Laurinavicius, V.; *Sens. Actuators* **2003**, 95, 378.

60 - Razumiene, J.; Vilkanauskyte, A.; Gureviciene, V.; Laurinavicius, V.; Roznyatovskaya, N. V.; Ageeva, Y. V.; Reshetova, M. D.; Ryabov, A. D.; *J. Organomet. Chem.* **2003**, 668, 83.

61 - Razumiene, J.; Gureviciene, V.; Laurinavicius, V.; Grazulevicius, J. V., *Sens. Actuators* **2001**, 78, 243.

62 - Razumiene, J.; Vilkanauskyte, A.; Gureviciene, V.; Barkuskas, J.; Meskys, R.; Laurinavicius, V.; *Electrochim. Acta* **2006**, 51, 5150.

63 - Azevedo, A. M.; Prazeres, D. M. F.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P., *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 235.

64 - Boujtita, M.; Hart, J. P.; Pittson, R.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 257.

65 - Patel, N. G.; Meier, S.; Cammann, K.; Chemnitz, G. C. ; *Sens. Actuators* **2001**, 75, 101.

66 - Wang, J.; Chen, Q. A.; Pedrero, M.; Pingarron, J. M.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, 300, 111.

67 - Skandal, P.; *Electroanalysis* **1997**, 9, 737.

68 - Warsinke, A.; Benkert, A.; Scheller, F. W.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 622.

69 - Butler, D.; Guilbault, G. G.; *Actuators Sens.* **2006**, 113, 692.

70 - Lu, H. H.; Conneely, G.; Pravda, M.; GUILBAULT, G.G., *Steroids*, 2006, 71, 760.

71 - Conneely, G.; Aherne, M.; Lu, H. H.; Guilbault, G. G.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 153.

- 72 - Darain, F.; Park, D. S.; Park, J. S.; Chang, S. C.; Shim, Y. B.; *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1780.
- 73 - Carpini, G.; Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Mascini, M.; *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 167.
- 74 - Diaz-Gonzalez, M.; Gonzalez-Garcia, M. B.; Costa-Garcia, A.; *Sens. Actuators* **2006**, *113*, 1005.
- 75 - Alvarez, M.; Abedul, M.; Garcia, A.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *462*, 31.
- 76 - Diaz-Gonzalez, M.; Gonzalez-Garcia, M.B.; Costa-Garcia, A.; *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2035.
- 77 - Ferreira, A. A. P.; Colli, W.; Alves, M. J. M.; Oliveira, D. R.; Costa, P. I.; Guell, A. G.; Sanz, F.; Benedetti, A. V.; Yamanaka, H.; *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 5046.
- 78 - Butler, D.; Pravda, M.; Guilbault, G. G.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 333.
- 79 - Luangaram, K.; Boonsua, D.; Soontornchai, S.; Promptmas, C.; *Biocatal. Biotransform.* **2002**, *20*, 397.
- 80 - Honeychurch, K. C.; Hart, J. P.; *Trac-Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 456.
- 81 - Krejci, J.; Prasek, J.; Fucik, L.; Khatib, S.; Hejatkova, E.; Jakubka, L.; Giannoudi, L.; *Microelectron. Int.* **2004**, *21*, 20.
- 82 - Bergamini, M. F.; Santos, A. L.; Stradiotto, N. R.; Zanoni, M. V. B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 315.
- 83 - Bergamini, M. F.; Boldrin Zanoni, M. V.; *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1457.
- 84 - Chen, J. C.; Kumar, A. S.; Chung, H. H.; Chien, S. H.; Kuo, M. C.; Zen, J. M.; *Sens. Actuators* **2006**, *115*, 473.
- 85 - Pemberton, R. M.; Amine, A.; Hart, J. P.; *Anal. Lett.* **2004**, *37*, 1625.
- 86 - Honeychurch, K. C.; Hart, J. P.; Cowell, D. C.; *Electroanalysis* **2000**, *12*, 171.
- 87 - Honeychurch, K. C.; Hawkins, D. M.; Hart, J. P.; Cowell, D. C.; *Talanta* **2002**, *57*, 565.
- 88 - Dilleen, J. W.; Sprules, S. D.; Birch, B. J.; Haggett, B. G. D.; *Analyst* **1998**, *123*, 2905.

- 89 - Laschi, S.; Palchetti, I.; Mascini, M.; *Sensors and Actuators B-Chemical* **2006**, *114*, 460.
- 90 - Noh, M. F. M.; Tothill, I. E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 2095.
- 91 - Zen, J. M.; Yang, C. C.; Kumar, A. S.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *464*, 229.
- 92 - BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 4.851, 2 out. 2003. Brasília, DF: *Diário Oficial*, 2003.
- 93 - Editado por Cardoso, M. G.. Produção de Aguardente de Cana. 2. ed. Lavras: Editora Ufla, 2006, 208.
- 94 - APEX – Agência de Promoção de Exportações.
- 95 - SEBRAE/MG. Diagnóstico da Cachaça de Minas Gerais: sumário executivo. Belo Horizonte, 2001, 25.
- 96 - PBDAC; Dados do Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Aguardente de Cana (PBDAC).
- 97 - Editado por Cardoso, M. G.. Produção de Aguardente de Cana. 2. ed. Lavras: Editora Ufla, 2006, 220.
- 98 - Tubino, M.; Barros, F. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10(2)*, 117.
- 99 - Boujtita, M.; Hart J. P.; Pittson, R.; *Biosensors & Bioelectronics* **2000**, *15*, 257.
- 100 - Clarkson, S. P.; Onnrod, I. H. L.; Sharpe, F.R.; *J. Inst. Brew.* **1995**, *101*, 191.
- 101 - Liden, H.; Vijayakumar, A. R.; Gorton, L.; Varga, G. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 1111.
- 102 - Willian, S.. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14. ed. Washington DC: *Association of Official Analytical Chemists*, **1984**.
- 103 - Dubowski, K. M.. Alcohol Analysis: Clinical laboratory aspects. Part II. Laboratory Management, **1982**.
- 104 - <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>; acesso em: 09 setembro 2008.
- 105 - Beltrane, M. A.; Machinski Junior, M.; *Principais Riscos Químicos no*

*Leite: um problema de Saúde Pública. Arq. Ciênc. Saúde Unipar; Umuarama* **2005**, 9, 141.

106 - Mcevoy, J. D. G.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, 473, 3.

107 - BRASIL. Leis, etc. *Regulamento da inspeção individual e sanitária de produtos de origem animal: aprovado pelo decreto nº 30.391 de 29 de março de 1952 alterado pelo decreto nº 1255, de 25 de julho de 1962*. Brasília, Ministério da Agricultura, **1980**.

108 - Baars, A. J.; Vanbeek, H.; Visser, I. J. R.; *Food Addit. Contam.* **1992**, 9, 357.

109 - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Metal contaminants in milk and milk products. *Bull. Int. Dairy Fed.*, **1978**, 105, 27.

110 - Murta, P. H. G.; Germano, M. I. S.; Miguel, O.; Germano, P. M. L.; *Hig. Aliment.* **1993**, 7, 12.

111 - Sharma, R. P.; Street, J. C.; Shupe, J. L.; Bourcier, D. R.; *J. Dairy Sci.* **1982**, 65, 972.

112 - Licata, P.; Trombeta, D.; Cristani, M.; Giofre, F.; Martino, D.; Calo, M.; Naccari, F.; *Environment International* **2004**, 30, 10.

113 - FAO/WHO. *Residues of metals in foods*. Monographs prepared by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome: JECFA, **1996**.

114 - Linder, M. C. A.; *Biochemistry of Copper*, Plenum Press, New York, **1991**.

115 - WHO, World Health Organization. *Inorganic lead*. Environmental Health Criteria n. 165. New York: WHO, **1995**.

116 - Mídio, A. F.; Martins, D. I.. *Toxicologia de alimentos*. São Paulo: Varela, **2000**, 295.

117 - Dahiya, S.; Karpe, R.; Hegde, A. G.; Sharma, R. M.; *J. of Food Comp. an Anal.* **2005**, 18, 517.

118 - Okada, I. A.; Sakuma, A. M.; Maio, F. D.; Dovidauskas, S.; Zenebon, O.; *Ver Saúde Pública* **1997**, 31(2), 140.

119 – Mottaleb, M. A.; Woo, Y. A.; Kim, H. J.; *Microchemical. Journal* **2001**, 69(3), 219.

120 - Carrion, N.; Itriago, A.; Murillo, M.; *J. of Anal. Atom. Spectr.* **1994**, 9, 205.

- 121 - Muñoz, E.; Palmero, S.; *Food Control* **2004**, *15*, 635.
- 122 - Tokusügy Lu, Ö.; Aycan, SÜ.; Akalin, S.; Kocu Ak, S.; Ersoy, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1795.
- 123 - Baker, G. C.; Jenkins, I. I.; *Analyst* **1952**, *77*, 685.
- 124 - Wang, J.; *Analytical Electrochemistry* **1994**, VCH.
- 125 - Wang, J.; Tian, B.; Lu, J.; Olsen, C.; Yarnitzky, C.; Olsen, K.; Hammerrstrm, D.; Bennet, W.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 429.
- 126 - Brett, C. M. A.; *Electroanalysis* **1999**, *11*, 1013.
- 127 - Jagner, D.; Granelli, A. ; *Anal. Chim. Acta* **1976**, *83*, 19.
- 128 - Aren, K.; *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1406.
- 129 - Ostapczuk, P.; *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 1995.
- 130 - Jagner, D.; Josefson, M.; Westeerlf, S.; *Anal. Chem.* **1981**, *128*, 155.
- 131 - Jagner, D.; Westeerlund, S.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *117*, 159.
- 132 - Marin, C.; Ostapczuk, P.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, *343*, 881.
- 133 - Li, Y.; Wahdat, F.; Neeb, R.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *251*, 678.
- 134 - <http://www.cdrrfaq.org/faq02.html>; acesso em: 07 julho 2009.
- 135 - [http://www.kopyrite.com/cd/theory/cdr\\_disc.html](http://www.kopyrite.com/cd/theory/cdr_disc.html); acesso em: 07 julho 2009.
- 136 - <http://www.aiim.org/inform/Oct97/Doculbs1.html>; acesso em: 07 julho 2009.
- 137 - Richter, E. M.; Desenvolvimento e Aplicações de Eletrodos de Ouro Confeccionados a Partir de Discos Compactos Graváveis (CD-Rs); Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- 138 - Feitknecht, W.; Linel, H. W.; *Helv. Chim. Acta* **1944**, *27*, 775.
- 139 - El. Wakkad, S. E. S.; Emara, S. H.; *J. Chem. Soc.* **1953**, 3508.
- 140 - De Brouckere, L.; Bouillon, F.; Bouillon-Nyssen, Y.; *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1951**, *60*, 26.
- 141 - Bouillon, F.; Piron, J.; Steven, J.; *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1958**, *67*, 643.

- 142 - Chialvo, M. R. G.; Marchiano, S. L.; Arvía, A. J.; J. Appl. Electrochem. **1984**, *14*, 165.
- 143 - Muller, E.; Z. Electrochem. **1907**, *13*, 133.
- 144 - Paixão, T. R. L. C.; Corbo, D.; Bertotti, M.; Anal. Chim. Acta **2002**, *472*, 123.
- 145 - Paixão, T. R. L. C.; Bertotti, M.; J. Electroanal. Chem. **2004**, *571*, 101.
- 146 - Laschi, S.; Palchetti, I.; Mascini, M.; Sensors and Actuators B-Chemical **2006**, *114*, 460.
- 147 - Ambrose, J.; Baradas, R. G.; Shoesmith, D. W.; Electroanal. Chem. **1973**, *47*, 47.
- 148 - Hampson, N. A.; Lee, J. B.; MacDonald, K. I.; J. Electroanal. Chem. **1971**, *32*, 165.
- 149 - Miller, B.; J. Electrochem. Soc. **1969**, *116*, 1675.
- 150 - Xie, Y.; Huber, C.O.; Anal. Chem. **1991**, *63*, 1714.
- 151 - Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1997.
- 152 - Dornelas, R. M.; Determinação de carboidratos estruturais em forrageiras tropicais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV); Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.
- 153 - CALLEGARI, J.; Sídia M.; **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre (RS): Artmed, 2003, 255 p..
- 154 - Ashley, K.; Electroanalytical applications in occupational and environmental health, Electroanalysis **1994**, *6*, 805.
- 155 - Wang, J.; Stripping Analysis, VCH Publishers Inc., Deerfield Beach, Florida, 1985.
- 156 - Brainina, Kh.; Neyman, E.; Electroanalytical Stripping Methods, John Wiley and Sons Inc., New York, 1993.
- 157 - Florence, T. M.; J. Electroanal. Chem. **1970**, *27*, 73.
- 158 - Bonfil, Y.; Brand, M.; Kirowa-Eisner, E.; Anal. Chim. Acta **1999**, *387*, 85.

- 159 - Bonfil, Y.; Brand, M.; Kirowa-Eisner, E.; Anal. Chim. Acta **2000**, 424, 65.
- 160 - Sipos, I.; Nurnberg, H.W.; Valenta, P.; Branica, M.; J. Electroanal. Chem. **1977**, 77, 263.
- 161 - Wang, J.; Tian, B.; Electroanalysis **1993**, 5, 809.
- 162 - Wang, J.; Tian, B.; Anal. Chim. Acta **1993**, 274, 1.
- 163 - Masawat, P.; Liawruangrath, S.; Slater, J.M.; Sens. Actuators B: Chem. **2003**, 91, 52.
- 164 - Laschi, S.; Palchetti, I.; Mascini, M.; Anal. Chim. Acta **2005**, 530, 61.
- 165 - Faller, C.; Stojko, N.; Henze, G.; Brainina, Kh.; Anal. Chim. Acta **1999**, 396, 195.
- 166 - Gonçalves, J. R.; Mesquita, A. J.; Gonçalves, R. M.; Ciência Animal Brasileira **2008**, 9, 365.
- 167 - Resolução Mercosul. Limites Máximos de Tolerância para Contaminantes Inorgânicos. resolução número 91/93, de 1 de janeiro de 1995. Grupo Mercado Comum e a Recomendação nº 83/94 do SGT nº.3 - Normas Técnicas.