UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Departamento de Química Fundamental
Área de Química Analítica

*"ESTABILIZAÇÃO DE Cu(III) EM
MEIO CONTENDO PEPTÍDEOS:
ESTUDOS ELETROQUÍMICOS E
APLICAÇÕES ANALÍTICAS"*

Denise Lowinsohn
Dissertação de Mestrado

Prof. Dr. Mauro Bertotti
Orientador

SÃO PAULO
05 de Maio de 2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lowinsohn, Denise
L918e Estabilização de Cu(III) em meio contendo peptídeos:
estudos eletroquímicos e aplicações analíticas / Denise
Lowinsohn. -- São Paulo, 2003.
72p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.

Orientador: Bertotti, Mauro

1. Química eletroanalítica 2. Análise por injeção
em fluxo : Química I. T. II. Bertotti, Mauro, orientador.

543.0871 CDD

‘Estabilização de Cu(III) em meio Conteúdo Peptídico: Estudos eletroquímicos e Aplicações Analíticas

DENISE LOWINSOHN

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
de Mestre em Química - Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Prof. Dr. MAURO BERTOTTI
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. NINA COICHEV
IQ – USP

Prof. Dr. LAURO TATSUO KUBOTA
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
05 DE MAIO 2003.

Aos meus pais, irmãos e amigos.

Ao meu tio Megumi (In Memoriam).

***Ao Prof. Dr. Mauro Bertotti pela
orientação, paciência, amizade no
desenvolver deste trabalho e pelo
privilegio de aprender.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Tokoro, pelo convívio, conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Renato Camargo Matos, pela descontraída e estimulante convivência.

À Profa. Dra. Nina Coichev, pelos auxílios e dúvidas sanadas.

Aos Profs. Drs. Claudimir Lucio do Lago, Elizabeth de Oliveira, Ivano Gebhart Rolf Gutz, Jorge César Masini, Lúcio Angnes, Márcia Laudelina Arruda Temperini, Maria Encarnación Vásquez Suárez Iha, Marina Franco Maggi Tavares, Paulo Teng An Sumodjo, Pedro Vitoriano de Oliveira, Silvia Helena Pires Serrano, pelo incentivo e conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas e ex-colegas do laboratório, Alexandra, Audrei, Dennys, Fernanda, José Roberto, Luis, Thiago, Tiago, Vânia, pela amizade e pelos bons momentos.

Aos colegas da pós-graduação Andrea, Alexandre, Daniela, Dosil, Eduardo, Laerte, Luciana, Maria, Paulo, Patrícia, Rodrigo, Rubén, pelas conversas e constante ajuda.

Aos meus amigos de USP André, Allan, Cláudia, Cristiane, Celina, Elaine, Mara, Sérgio e Wilma, que me concederam suas amizades.

Aos técnicos Cristina, Nivaldo, Renato, Ricardo e Wilson pelos constantes auxílios.

Às secretárias da Química Analítica, Célia e Marlene, pela presteza de seus serviços e constantes bate papos.

Às funcionárias Lúcia e Luciana que sempre foram muito prestativas.

A todos os funcionários da Seção de Graduação, de Pós Graduação e Assistência Acadêmica, pela forma eficaz e bondosa como realizam os seus trabalhos.

Aos colegas, professores e funcionários do Instituto de Química, pelo agradável convívio.

Aos meus professores e colegas da Planet Sport, Bruna, Giuliano, Helena, Maurício, Rafael, Ricardo, Rogério, Rosângela, Sandra e Susan pelos momentos divertidos.

Agradecimento especial à Milena, pela amizade e constantes bate-papos.

Aos meus pais, Jean e Kazuko, verdadeiros responsáveis pela minha formação.

Aos meus irmãos, Daniela e Daniel, pelo incentivo e apoio ao longo desta caminhada.

A todos que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

A FAPESP, CNPq, CAPES e Pró Reitoria de Pós Graduação da USP pelo suporte financeiro.

Muito Obrigada

Abreviaturas, símbolos e definições

A	Área do eletrodo
G_3	Triglicina
G_4	Tetraglicina
G_5	Pentaglicina
$[Cu^{II}(H_{-x}G_n)]^{(1-x)}$	Complexo de Cu(II) com o peptídeo G_n
$[Cu^{III}(H_{-x}G_n)]^{(2-x)}$	Complexo de Cu(III) com o peptídeo G_n
C_0^*	Concentração inicial do analito em solução
C^0	Concentração da amostra antes o processo de dispersão
$C^{máx}$	Concentração da amostra após o processo de dispersão
C_{final}	Concentração final
D	Coeficiente de dispersão
D_o	Coeficiente de difusão
e^-	Elétrons
E_a	Eletrodo auxiliar
E_{anel}	Potencial aplicado no anel
$E_{apl.}$	Potencial aplicado
E_i	Potencial inicial
E_f	Potencial final
E_{max}	Potencial máximo
E_{min}	Potencial mínimo
E_r	Eletrodo de referência
E_t	Eletrodo de trabalho
F	Constante de Faraday
FIA	Análise por Injeção em Fluxo (<i>Flow Injection Analysis</i>)
I_D	Intensidade de corrente medida no disco

I_R	Intensidade de corrente medida no anel
I	Intensidade de corrente
I_L	Intensidade de corrente limite
K	Constante de equilíbrio
n	Número de elétrons
N	Fator de coleta
O	Espécie oxidada da reação $O + ne^- \rightarrow R$
PTFE	Politetrafluoretileno
r	Raio
R	Produto da reação $O + ne^- \rightarrow R$
RRDE	Eletrodo rotativo disco-anel
v	Velocidade de varredura
T	Temperatura
ϕ	Diâmetro interno
ω	Velocidade de rotação

Índice geral

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MÉTODOS ELETROANALÍTICOS	1
1.2. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE VOLTAMETRIA CÍCLICA, AMPEROMETRIA E FIA	3
1.3. COULOMETRIA A POTENCIAL CONTROLADO	8
1.4. ELETRODO ROTATIVO DISCO-ANEL	9
1.5. SULFITO	11
1.5.1. <i>Sulfito como conservante em vinhos</i>	11
1.5.2. <i>Adutos entre sulfito e compostos orgânicos presentes no vinho</i>	12
1.5.3. <i>Toxicidade do sulfito</i>	12
1.5.4. <i>Métodos utilizados para análise de sulfito (em vinho)</i>	13
1.5.5. <i>Uso de técnicas de separação de sulfito de matrizes complexas</i>	14
1.6. Cu(III) EM MEIO CONTENDO PEPTÍDEOS	15
2. OBJETIVOS	18
3. PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	19
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	20

3.2.1. Construção dos eletrodos de referência de Ag/AgCl	22
3.2.2. Eletrodo de carbono	23
3.2.3. Microeletrodo de fibra de carbono	23
3.3. SISTEMA FIA E MEMBRANAS	24
3.3.1. Componentes do sistema FIA	24
3.3.2. Sistema de difusão gasosa	25
3.3.3. Montagem experimental final	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS PRELIMINARES COM ELETRODO ROTATIVO DISCO-ANEL	28
4.2. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO Cu(II) EM MEIO CONTENDO TRIGLICINA, TETRAGLICINA E PENTAGLICINA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO	30
4.3. ESTUDOS COULOMÉTRICOS E ESPECTROFOMÉTRICOS	38
4.4. EXPERIMENTOS COM ELETRODO ROTATIVO DISCO-ANEL E CRONOAMPEROMÉTRICOS	41
4.5. ESTUDOS ELETROANALÍTICOS SOBRE O SISTEMA Cu(II)/Cu(II)	46
4.6. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA POR FIA COM SISTEMA DE DIFUSÃO GASOSA	50
4.6.1. Voltametria hidrodinâmica	51
4.6.2. Estudo de vazão	52
4.6.3. Repetibilidade e frequência analítica	52
4.6.4. Linearidade	53
4.6.5. Determinação de sulfito em vinhos e sucos utilizando análise por injeção em fluxo	54

5. CONCLUSÕES	60
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. CURRICULUM VITAE	67

Resumo

Neste trabalho são apresentados alguns resultados relacionados a estudos sobre o comportamento eletroquímico do Cu(II) em meio contendo diferentes peptídeos (tri, tetra e pentaglicina) em função da acidez utilizando-se voltametria cíclica. Os experimentos foram realizados em uma faixa de pH entre 7,0 e 10,0. Experimentos espectrofotométricos e coulométricos também foram feitos, ambos para se caracterizar as espécies de Cu(II) e Cu(III) em solução e provar a existência da degradação dos complexos de Cu(III). Além disso, experimentos para esses sistemas também foram realizados em diferentes temperaturas utilizando eletrodo rotativo na configuração disco-anel.

Estudos eletroanalíticos demonstraram a potencialidade de se empregar o sistema Cu(II)/Cu(III) no desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de sulfito. Neste contexto, um método amperométrico indireto para a determinação de sulfito em fluxo é proposto neste trabalho. O método baseia-se na medida amperométrica (0V vs Ag/AgCl (sat. NaCl)) do Cu(III) gerado quimicamente no processo de auto-oxidação do S(IV) em soluções de Cu(II)/tetraglicina na presença de traços de Ni(II) utilizando uma célula em fluxo com sistema adequado para separação de gases. A oxidação espontânea do complexo pelo oxigênio dissolvido e S(IV) é muito lenta ao contrário do que ocorre quando há traços de Ni(II).

A faixa de trabalho foi de 20-100 μmolL^{-1} com limite de detecção de 2 μmolL^{-1} (S/N = 3). A repetibilidade para a determinação (100 μmolL^{-1}) levou a um desvio de 4,9% (n = 38), valor superior aos encontrados na literatura para determinações de sulfito em vinho por FIA com detecção

amperométrica indireta (1-4,6%), e a frequência analítica foi de 40h^{-1} , valor coerente com os dos outros métodos amperométricos.

Ambas as análises de sulfito em amostras de vinhos e de sucos tiveram seus resultados comparados com aqueles obtidos utilizando-se o método padrão.

Abstract

The electrochemistry of Cu(II) in aqueous solutions containing triglycine, tetraglycine and pentaglycine had been investigated at glassy carbon surfaces. Experiments were carried out in the pH range between 7.0 and 10.0. A correlation between voltammetric waves and the nature of the Cu(II) species involved in the electrochemical steps was performed. Spectrophotometric and coulometric studies were also done to characterise Cu(II) and Cu(III) species in solution and prove the existence of a degradation step related to Cu(III) complexes. Rotating ring-disc voltammetry was employed to follow this chemical step coupled to the electrode reaction, at three different temperatures. Data show that Cu(III)/triglycine species degrade, with faster kinetics, when the results are compared with those obtained for tetraglycine and pentaglycine.

An indirect amperometric method for the determination of sulfite in a flow injection configuration is described. The method is based on the amperometric measurement (0V vs Ag/AgCl (sat. NaCl)) of Cu(III) chemically generated by the sulfite induced autoxidation of Cu(II)/tetraglycine complex in the presence of traces of Ni(II) with a manifold that incorporates flow extraction of sulfite as SO₂ through a PTFE membrane. The operational range was 20-100 μmolL⁻¹ with a detection limit of 2 μmolL⁻¹ (S/N = 3). The repeatability for the determination (100 μmolL⁻¹) was evaluated to be 4.9% (n = 20) and the analytical frequency was 40h⁻¹. Results for 3 wines and 2 juices samples showed excellent agreement with those obtained by using a recommended procedure for sulfite analysis.

1. INTRODUÇÃO

Este capítulo tem o objetivo de fornecer alguns fundamentos teóricos das técnicas e equipamentos utilizados neste trabalho. Serão abordados aspectos relacionados com o trabalho desenvolvido.

1.1. MÉTODOS ELETROANALÍTICOS

A química eletroanalítica engloba um grupo de métodos analíticos quantitativos que são baseados nas propriedades elétricas de uma espécie em solução. O potencial, a corrente, a concentração e o tempo são as principais variáveis nesses métodos^[1].

Os métodos eletroanalíticos são divididos em dois grupos (*Figura 1*): (a) os métodos que levam em consideração o fenômeno de interface entre o eletrodo e a solução (interfacial) e (b) os que se baseiam no fenômeno que ocorre no seio da solução (difusão)^[2].

Os métodos interfaciais podem ser divididos em duas categorias: estática e dinâmica, baseadas no fato da célula eletroquímica ser operada na ausência ou na presença de corrente. Os métodos estáticos incluem as técnicas potenciométricas enquanto que os dinâmicos são divididos em métodos com potencial controlado e com corrente constante^[1,2].

Dentre as técnicas que utilizam o potencial controlado encontram-se a voltametria, amperometria e coulometria. Essas três técnicas foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho e por isso receberão maior atenção.

Figura 1 - Resumo dos métodos eletroanalíticos^[2].

1.2. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE VOLTAMETRIA CÍCLICA, AMPEROMETRIA E FIA

Uma técnica eletroquímica bastante utilizada é a voltametria cíclica, que é expressa pela medida de corrente em função do potencial aplicado. Para controlar o potencial aplicado e registrar a corrente no eletrodo de trabalho, um potenciostato é necessário^[3].

Uma célula convencional geralmente utilizada é composta por um sistema de três eletrodos (de trabalho, auxiliar e de referência) - *Figura 2*, de modo a evitar que elevadas correntes percorram o eletrodo de referência, alterando o potencial aplicado. O circuito elétrico, através do qual a corrente passa, se estabelece entre o eletrodo de trabalho (indicador) e o eletrodo auxiliar. O eletrodo de referência serve para controlar o potencial do eletrodo de trabalho, no qual a reação de interesse ocorre^[4].

Figura 2 - Esquema de célula eletroquímica composta de eletrodo de trabalho (Et), eletrodo auxiliar (Ea) e eletrodo de referência (Er).

A técnica consiste em varrer uma região de potencial e medir a corrente associada à transferência de elétrons e à(s) reação(ões) ocorrida(s).

O esquema básico da voltametria cíclica é mostrado na *Figura 3*.

Figura 3 - Representação esquemática de um experimento de voltametria cíclica, no qual E_i e E_f indicam os potenciais inicial e final aplicados e E_{max} e E_{min} , os potenciais máximo e mínimo.

A voltametria fornece informações a respeito da reversibilidade de um sistema. A reversibilidade eletroquímica está associada à troca rápida de elétrons das espécies redox com o eletrodo.

Apesar das informações importantes que podem ser obtidas com auxílio da voltametria cíclica, esta técnica é pouco favorável quando busca-se quantificar baixas concentrações de analito. Isto deve-se ao fato de que, durante a varredura de potencial, ao sinal faradaico soma-se a componente capacitiva, que torna-se muito significativa frente às baixas correntes geradas pelo processo faradaico em condições de concentrações reduzidas da espécie eletroativa.

A utilização de métodos de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) constitui-se em uma forma satisfatória de contornar este problema. Destaca-se por diversas vantagens, dentre as quais, um menor consumo de tempo por análise, eliminação de algumas etapas

“manuais”, melhora na sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados, minimização do consumo de amostras e reagentes.

O processo de análise química por injeção em fluxo tem como conceito básico a inserção da amostra em um fluido carregador que transporta a mesma para o detector^[5,6]. Este registra continuamente um sinal de corrente, absorvância ou outro parâmetro de interesse, que sofre alteração quando a amostra passa pelo detector, em função do tempo. O registro típico é um pico cuja área ou altura são diretamente proporcionais à concentração da amostra. O mais simples diagrama de fluxo é o de linha única, onde o fluido carregador é o reagente (*Figura 4*).

Figura 4 - Diagrama de fluxo de um módulo de análise em linha única (a), cujo registro típico do sinal analítico é um pico em função do tempo (b).

O sistema utilizado em FIA pode ser dividido em quatro partes: propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção.

A(s) solução(ões) carregadora(s) pode(m) ser impulsionada(s) pela ação da gravidade e por uma bomba peristáltica ou de aquário e os injetores podem ser manuais ou automáticos, fazendo com que os sistemas ofereçam vários recursos às análises.

A eficiência de um sistema FIA pode ser acompanhada por meio do coeficiente de dispersão (D). O coeficiente de dispersão fornece uma informação do quanto a solução amostra original é diluída no fluxo durante o percurso entre a injeção da amostra e a detecção, como ilustrado na *Figura 5*.

Figura 5 - Representação esquemática do coeficiente de dispersão (D) de um sistema FIA. A zona de amostra original se dispersa durante o movimento em um reator tubular, originando o perfil da curva.

Desta forma, o coeficiente de dispersão (equação 1) refere-se à razão entre a concentração da amostra antes (C°) e após ($C^{\text{máx}}$) o processo de dispersão.

$$D = C^{\circ} / C^{\text{máx}} \quad (1)$$

A literatura^[7] classifica que valores de coeficiente de dispersão abaixo de 2 indicam sistemas com baixas dispersões, de 2 a 10 médias e maiores do que 10 elevadas.

Os fatores que influenciam a dispersão da zona de amostra em sistemas em fluxo incluem as dimensões e configurações dos canais condutores do sistema (percurso analítico), as vazões dos carregadores, volume de amostra injetado, a temperatura e a viscosidade.

Segundo Ruzicka e Hansen^[5] a dispersão da zona da amostra aumenta com a raiz quadrada da distância percorrida através do condutor tubular. Contudo, isto é válido quando o condutor é linear. No caso de configurações espirais, este efeito é menos pronunciado devido ao desenvolvimento de um fluxo secundário que promove uma dispersão radial e limita a dispersão axial. Um tubo em espiral é a geometria de reator mais freqüentemente utilizada em FIA, pois além de promover uma mistura na direção radial, permite que um tubo longo possa ser convenientemente acomodado no sistema. Neste caso, os resultados são picos mais simétricos e maiores do que os obtidos com reator tubular linear com as mesmas dimensões.

Estudos sobre a influência do diâmetro interno do tubo sobre a dispersão Karlberg e Pacey^[8] concluíram que em uma faixa entre 0,35 e 0,9mm, a contribuição não é crítica, levando a variações no valor do coeficiente de dispersão entre 3,0 e 3,8. Já em relação à vazão, pode-se afirmar que a dispersão diminui com o aumento das vazões.

Por fim, a variação do volume de amostra injetado é um caminho muito conveniente para manipular a dispersão da amostra e é um dos fatores mais estudados freqüentemente, e o decréscimo da dispersão em função do aumento do volume injetado é bem documentado. Em sistemas em fluxo o limite superior de volume de amostra injetado que é utilizado para manipular a dispersão, em geral, encontra-se na faixa de 100 a 200 μ L. Entretanto, volumes de amostras maiores podem ser utilizados, com algum sacrifício da freqüência de amostragem, quando pequenas dispersões ou elevadas sensibilidades são desejadas. O limite inferior de volume de amostra injetado é determinado pelo tipo de injetor utilizado, mas geralmente situa-se na faixa de 10 a 30 μ L.

O acoplamento de sensores eletroquímicos a sistemas em fluxo tem se mostrado extremamente favorável em razão de vantagens como

possibilidade de automação, preparação das amostras "on-line", melhoria na precisão e exatidão das medidas, aumento da vida útil do sensor em função da contínua passagem do eletrólito por sua superfície e melhoria na frequência analítica. Outro ponto de relevância o qual justifica a associação entre sensores eletroquímicos e procedimentos em FIA diz respeito à necessidade de transportar o analito para a superfície do eletrodo de maneira contínua (transporte hidrodinâmico), pois em caso contrário (solução estacionária) a corrente cai em função do tempo devido ao esgotamento progressivo do material eletroativo na camada de difusão.

A detecção eletroquímica nesses sistemas em fluxo é realizada controlando-se o potencial do eletrodo de trabalho num valor fixo (correspondente à região de corrente limite da espécie de interesse) e monitorando-se a corrente em função do tempo. Esta técnica é denominada amperometria.

1.3. COULOMETRIA A POTENCIAL CONTROLADO

A coulometria é um dos mais antigos métodos eletroanalíticos. A substância é depositada (ou convertida a outro estado de oxidação) num eletrodo a potencial constante e a quantidade de eletricidade (carga em Coulombs) que passa é proporcional à quantidade de substância convertida^[9].

A coulometria a potencial constante é baseada nas leis estabelecidas por Faraday em 1833; quando a corrente elétrica provoca uma reação eletródica com 100% de eficiência, a quantidade total de eletricidade consumida e a de substância envolvida na reação podem ser determinadas^[10].

A completa eletrólise é indicada quando a corrente se torna praticamente zero (ou indistinguível da corrente residual)^[11].

A coulometria a potencial constante pode ser utilizada para determinar o valor de elétrons envolvidos na reação eletródica e também

para elucidar as reações de eletrodo^[12]. Uma desvantagem dessa técnica é o longo tempo requerido para completar a eletrólise^[9].

1.4. ELETRODO ROTATIVO DISCO-ANEL

A Figura 6 mostra um eletrodo rotativo disco-anel (RRDE). Esse eletrodo foi desenvolvido primeiramente por Frumkin e Nekrasov^[13] para detectar intermediários instáveis em reações de eletrodo. O RRDE consiste em um eletrodo de disco central cercado por um círculo isolante concêntrico e um eletrodo anel concêntrico; tem-se assim dois eletrodos que podem ser controlados independentemente por um bipotenciostato.

Figura 6 - Eletrodo rotativo disco-anel. A: disco, B: anel e C: teflon.

Em se tratando do eletrodo disco-anel pode-se dizer que ele é um sistema gerador-coletor (equações 2 e 3)^[3], pois no disco a espécie em solução, por exemplo, *O*, sofre redução eletroquímica, gerando um produto *R* e no anel (onde é mantido um potencial que possibilita a oxidação de *R*), uma fração do produto eletroquimicamente gerado (*R*) no disco é oxidado a *O* (podendo ser diferente de *O*). Outra parte desse produto por convecção é arrastada para o interior da solução antes de chegar no anel.

Um típico experimento, onde os sinais de corrente são plotados em função do potencial é mostrado na *Figura 7*.

Figura 7 - Voltamogramas obtidos com eletrodo rotativo disco-anel.

Dos experimentos com eletrodo rotativo disco-anel é possível obter o fator de coleta (N), que é definido pela razão entre o sinal do produto gerado eletroquimicamente no disco (I_R - corrente medida no anel) e o sinal da espécie em solução (I_D - corrente medida no disco) (equação 4). Para um sistema que envolve um elétron, esse fator de coleta é sempre menor do que um, já que, como foi dito anteriormente, uma parte do material gerado no disco é arrastada para o seio da solução.

$$N = -I_R / I_D \quad (4)$$

Experimentos com RRDE servem para obter informações sobre mecanismos e intermediários de reação assim como sobre cinética.

1.5. SULFITO

1.5.1. Sulfito como conservante em vinhos

A adição de sulfito a alimentos é geralmente utilizada para prevenir a oxidação e o crescimento bacterial, assim como no controle de reações enzimáticas^[14].

SO_2 tem sido utilizado na produção de vinhos desde a antiguidade e por muito tempo queimou-se enxofre dentro dos tonéis de vinho vazios como forma de eliminar bolores, leveduras e bactérias^[15]. Uvas ainda hoje são tratadas durante armazenagem com dióxido de enxofre gasoso com auxílio de sistemas que mantêm um fluxo baixo e constante de gás, garantindo assim a ausência de bolores^[16].

A concentração relativa das espécies de sulfito depende do pH do meio conforme a *Figura 8*. Desta maneira, a concentração total de sulfito necessária para manter o vinho livre de leveduras indesejáveis dependerá da concentração total destas espécies.

Figura 8 - Distribuição das espécies H_2SO_3 , HSO_3^- e SO_3^{2-} em função do pH do meio.

1.5.2. Adutos entre sulfito e compostos orgânicos presentes no vinho

Além das espécies de sulfito livre (SO_3^{2-} , HSO_3^- e SO_3^{2-}), o sulfito também encontra-se presente no vinho em suas formas ligadas. O ânion bissulfito reage com carbonilas da maioria dos aldeídos (equação 5)^[17], metil-cetonas e cetonas cíclicas estericamente desimpedidas formando adutos bastante estáveis:

Desta forma, o sulfito pode ser encontrado em vinhos sob duas formas distintas: o sulfito livre, ou seja, HSO_3^- (S(IV) livre), espécie predominante nas condições de acidez encontrada no vinho (pH~3,5) e o sulfito combinado, sendo representado pelo composto aduto, formado pela reação de grupos carbonílicos com HSO_3^- (equação 5). Este composto é muito estabilizado em meio levemente ácido, onde o HSO_3^- prevalece, mas em valores de pH muito baixos ou muito altos o aduto é destruído devido à formação de SO_2 e SO_3^{2-} respectivamente^[18].

1.5.3. Toxicidade do sulfito

SO_2 reage com coenzimas (NAD^+), cofatores e grupos protéicos (flavina, tiamina e ácido fólico), conseqüentemente inativando uma série de enzimas metabólicas^[19] e controlando as reações enzimáticas que ocorrem durante a produção e armazenagem.

Sulfito é considerado prejudicial à saúde humana especialmente para indivíduos com deficiência na enzima sulfito oxidase^[20]. Deficiência em

sulfito oxidase manifesta-se clinicamente com danos cerebrais, deslocamento de retina, retardamento mental e morte prematura.

É conhecido que a ingestão de sulfito por pessoas hipersensíveis pode causar efeitos prejudiciais justificando o desenvolvimento de metodologias para quantificar a substância conforme os níveis estabelecidos pela legislação.

1.5.4. Métodos utilizados para análise de sulfito (em vinho)

O método clássico para análise de sulfito em alimentos é o método de Monier-Williams^[21], onde o analito é extraído da amostra por meio de destilação e coletado em uma solução contendo peróxido de hidrogênio gerando ácido sulfúrico que, por sua vez, é titulado com hidróxido de sódio padronizado. Porém trata-se de um método que envolve destilações longas e tediosas. Melhorias para minimizar o efeito de espécies interferentes foram realizadas e elas incluem destilações a baixas temperaturas assim como o controle meticuloso do fluxo de nitrogênio^[22].

Outros métodos convencionais também foram reportados na literatura^[23], como por exemplo a iodimetria, um método direto, onde o sulfito é simplesmente titulado com o iodo. Uma desvantagem deste método é a oxidação do S(IV) pelo ar atmosférico^[24]. Outro exemplo é a iodometria, um método indireto, que consiste na geração química de iodo em excesso conhecido a partir de IO_3^- e I^- em meio ácido, posterior reação de sulfito com iodo e titulação do excesso de iodo com solução padrão de tiosulfato.

Alguns métodos instrumentais também foram utilizados para a determinação de sulfito. Métodos com detecção fotométrica^[25], eletroquímica^[26,27,28] ou quimiluminescente^[29], têm sido usados em procedimentos cromatográficos e em análises por injeção em fluxo. Em todos os casos, além da diminuição dos limites de detecção aponta-se como

vantagem importante a melhoria na frequência analítica, dado particularmente relevante quando se pensa em processos industriais.

1.5.5. Uso de técnicas de separação de sulfito de matrizes complexas

Vinhos são matrizes bastante complexas e análises em fluxo de sulfito em vinho envolvem, em sua grande maioria, a separação do sulfito da matriz.

Técnicas de permeação/difusão gasosa estão cada vez mais presentes em química analítica por oferecer um grande potencial para a melhoria de seletividade e/ou sensibilidade. Sistemas de separação por difusão gasosa têm como principal vantagem a separação do analito da matriz, eliminando assim possíveis interferentes da análise.

Vários tipos de membranas semipermeáveis podem ser utilizadas no processo de separação gasosa^[30]. Dentre as utilizadas em FIA têm-se dois tipos diferentes:

- Membranas não porosas (borrachas naturais e de silicone): são membranas homogêneas onde ocorre permeação do gás de um lado para o outro.

- Membranas microporosas (Politetrafluoretileno, policloreto de vinila, polipropileno, ésteres de celulose e outros materiais): nestas membranas a passagem do gás de um lado para o outro se dá por difusão.

As membranas microporosas são as mais versáteis e podem ser utilizadas com grande variedade de gases e compostos voláteis e diversos tipos de analito.

As membranas devem possuir duas características importantes: serem semipermeáveis com boa estabilidade química e mecânica e permitir a completa passagem de certas espécies químicas e não de outras indesejáveis.

1.6. Cu(III) EM MEIO CONTENDO PEPTÍDEOS

O estado de oxidação trivalente do cobre é geralmente considerado incomum, apesar de sua ocorrência em grande número de compostos, muitos dos quais instáveis em solução aquosa^[31]. Desde o descobrimento da estabilização do cobre trivalente por ligantes peptídicos^[32], muitos complexos têm sido reportados neste estado de oxidação^[33]. O complexo de tetraglicina triplamente desprotonado $[\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^-$ foi o primeiro complexo peptídico de cobre trivalente a ser caracterizado em solução aquosa^[34].

Há um especial interesse na química desses complexos de Cu(III) no campo de reações de interesse biológico envolvendo processos redox devido à estabilidade dos complexos formados.

Esses ligantes peptídicos complexam o íon metálico via átomos de nitrogênio desprotonados. Os grupos desprotonados N (peptídeo) e N (amida) são bases de Lewis muito fortes, o que ajuda estabilizar o íon cobre

no estado trivalente. O Cu(II) ou (III) reagem rapidamente com peptídeos para formar ligações Cu-N(peptídeo) e liberam íons hidrogênio dos mesmos.

Uma propriedade interessante dos complexos de Cu(III) é sua capacidade para desenvolver reações muito rápidas de transferência de elétrons^[35], assim eles podem oxidar uma variedade de substratos incluindo ferro(II), iodeto e sulfito^[33]. Além disso, apresentam duas bandas fortes de transferência de carga na região do UV-visível com máximos em 250 e 365nm^[36].

Métodos de preparação de Cu(III) em meios contendo peptídeos usualmente partem de soluções de Cu(II) contendo tartarato, às quais se adicionam oxidantes como O_2 , $IrCl_6^{2-}$ ou $S_2O_8^{2-}$ ^[34,35]. Procedimentos envolvendo a oxidação eletroquímica também merecem destaque.

Estudos sobre as propriedades químicas e eletroquímicas no sistema Cu(II)/Cu(III) em soluções contendo diversos peptídeos são largamente difundidos na literatura^[37], havendo inclusive trabalhos em que se aproveita a estabilização do Cu(III) e conseqüente formação de espécie eletroativa para a detecção amperométrica de certos peptídeos^[38,39,40].

Em certas circunstâncias os compostos peptídicos de Cu(III) podem atuar como poderosos oxidantes. Por exemplo, em meio contendo sulfito e em condições de ausência de oxigênio, ocorre a redução do complexo Cu(III)/tetraglicina e a formação de um ânion radical de sulfito^[41]. Como resultado da reação obtém-se Cu(II)/tetraglicina e trióxido de enxofre, que em meio aquoso hidrolisa formando sulfato. Entretanto, em soluções aeradas o oxigênio reage com o radical sulfito com a conseqüente geração de um oxidante poderoso, o qual regenera o complexo Cu(III)/tetraglicina via complexo de Cu(II).

Em soluções aeradas contendo Cu(II)/tetraglicina e traços de sulfito, o processo de autooxidação de S(IV) é rápido e ocorre por um mecanismo

auto-catalítico, onde traços do complexo Cu(III)/tetraglicina são responsáveis pela iniciação do processo^[42].

A oxidação de Cu(II)/tetraglicina a Cu(III)/tetraglicina em meio aquoso, por oxigênio dissolvido, é acelerada por sulfito^[43]. No entanto, na presença de traços de Ni(II) (ordem de 10^{-5}molL^{-1}) a reação é fortemente acelerada^[44].

2. OBJETIVOS

Esta dissertação tem por objetivo relatar e discutir a estabilização de Cu(III) em meio contendo diferentes peptídeos através de estudos eletroquímicos e o desenvolvimento de metodologia associada.

Pretende-se investigar o comportamento eletroquímico do Cu(II) em meio contendo diferentes peptídeos (tri, tetra e pentaglicina) em função da acidez utilizando-se voltametria cíclica.

Deseja-se, ainda, verificar a influência do S(IV) na oxidação induzida dos complexos de Cu(II) e caracterizar eletroquimicamente a formação do complexo de Cu(III).

Dando continuidade aos estudos relacionados ao S(IV), pretende-se desenvolver uma montagem experimental para a determinação indireta de sulfito por análise em fluxo com uma adaptação de câmara de difusão gasosa para a extração de SO₂. Neste método pretende-se medir amperometricamente o Cu(III) gerado quimicamente no processo de auto-oxidação do S(IV) em soluções de Cu(II)/tetraglicina. Serão otimizadas as condições de análise para obtenção de maior sinal analítico no desenvolvimento do método para essa determinação.

Após a otimização pretende-se determinar sulfito em amostras reais tanto pelo método proposto quanto pela metodologia padrão, assim como realizar um estudo de interferentes.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Este capítulo tem o objetivo de fornecer informações quanto aos materiais e instrumentação utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

- *Água:* No preparo de todas as soluções utilizadas no desenvolvimento do trabalho experimental foi empregada água desionizada (Nanopure Infinity, Barnstead $-18\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$).
- *Cloreto de potássio:* A solução estoque 1molL^{-1} foi preparada dissolvendo-se o sal KCl (Merck) em água desionizada.
- *Ferrocianeto de potássio:* A solução estoque 10mmolL^{-1} foi preparada dissolvendo-se o sal $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Merck) em uma solução de KCl 1molL^{-1} .
- *Borato:* A solução estoque $0,05\text{molL}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução do reagente $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Synth) em água.
- *Perclorato de sódio:* A solução estoque $0,1\text{molL}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se o sal NaClO_4 (Merck) em água. Este sal, juntamente com soluções de borato, foi utilizado como eletrólito suporte.
- *Perclorato de cobre:* A solução estoque $0,2\text{molL}^{-1}$ foi preparada a partir da reação direta de carbonato de cobre com ácido perclórico e após o término da mesma preparou-se outra solução estoque $0,2\text{molL}^{-1}$ a partir do reagente $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich). Ambas foram posteriormente padronizadas por eletrogravimetria^[45].
- *Hidróxido de sódio:* A solução estoque 1molL^{-1} foi preparada a partir do reagente sólido NaOH (Merck).
- *Ácido perclórico:* A solução estoque foi preparada diluindo-se o ácido perclórico concentrado (70-72% - Merck) em água.

- *Complexos peptídicos (com tri, tetra e pentaglicina):* As soluções de trabalho foram preparadas adicionando-se na seguinte ordem: quantidades adequadas do ligante, do eletrólito suporte e da solução estoque de Cu(II). O ajuste do pH do meio foi efetuado utilizando HClO_4 $0,1\text{molL}^{-1}$ ou NaOH $0,1\text{molL}^{-1}$. Estas soluções de trabalho foram preparadas imediatamente antes do seu uso, com excesso de ligante (25%) para suprimir a precipitação do hidróxido de cobre.
- *S(IV):* Para as soluções de S(IV) empregou-se o sal Na_2SO_3 (Merck) e foram preparadas diariamente.
- *Solução de níquel:* A solução estoque $0,01\text{molL}^{-1}$ foi preparada a partir do reagente $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck).
- *Outros:* Demais reagentes utilizados no decorrer dos experimentos foram de grau analítico e no preparo de suas soluções tomou-se sempre o cuidado de seguir um procedimento estabelecido na literatura.

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Na aquisição dos voltamogramas foi empregado bipotenciostato modelo AFCBP1 da Pine Instruments Co., com compartimento rotativo disco-anel. Os experimentos foram realizados em célula eletroquímica convencional e sistema de três eletrodos (*Figura 2*): carbono vítreo (eletrodo de trabalho), platina (eletrodo auxiliar) e Ag/AgCl , NaCl saturado (eletrodo de referência).

Para os estudos amperométricos utilizou-se o potenciostato Autolab PGSTAT30. Os eletrodos utilizados foram os mesmos dos experimentos voltamétricos.

Para o ajuste do pH das soluções de trabalho utilizou-se o pHmetro modelo 713 da Metrohm, utilizando tampões apropriados para a calibração.

No caso da eletrogravimetria foi utilizado o equipamento Electrolytic Analyzer da Sargent-Slomin. Os experimentos foram efetuados em sistema de dois eletrodos: rede e espiral de platina.

Os espectros de absorção foram obtidos no espectrofotômetro Hitachi modelo U2001 utilizando cubeta de quartzo de 1,00cm de caminho óptico. Os espectros foram obtidos utilizando o eletrólito suporte como branco.

Os experimentos coulométricos a potencial constante foram realizados empregando-se o potenciostato Autolab PGSTAT30 como fonte de aplicação de potencial. Como eletrodo de trabalho utilizou-se uma placa de carbono. Os eletrodos de referência e auxiliar foram os mesmos dos experimentos voltamétricos. Os voltamogramas nesta parte do experimento foram obtidos com microeletrodo de fibra de carbono. Estes experimentos foram feitos em uma célula de acrílico feita no próprio laboratório (*Figura 9*), com entradas para o eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência, assim como para o argônio, que serviu para agitação do sistema.

Figura 9 - Célula coulométrica. A: eletrodo de trabalho, B: eletrodo de referência, C: eletrodo auxiliar e D: entrada de argônio.

Para o ajuste da temperatura utilizou-se um termostato (Contemp CDC49).

3.2.1. Construção dos eletrodos de referência de Ag/AgCl

Um fio de Ag de aproximadamente 1mm de diâmetro foi utilizado para a construção do eletrodo de Ag/AgCl. Este fio foi polido com lixa

d'água 600 (óxido de silício). Em seguida, depositou-se AgCl sobre o fio de prata mantendo um potencial constante (0,3V) por 10 segundos em uma solução de NaCl saturada utilizando um eletrodo de Ag/AgCl comercial como referência e um eletrodo de platina como auxiliar. A seguir o fio foi introduzido em ponta plástica de pipeta contendo solução saturada de NaCl e na extremidade inferior da ponteira de plástico foi fixado sob pressão um pedaço de separador de baterias com objetivo de permitir o contato eletrolítico^[46]. Os eletrodos de referência foram checados medindo-se o potencial contra um eletrodo de referência comercial.

3.2.2. Eletrodo de carbono

Nos experimentos voltamétricos foi empregado eletrodo rotativo de carbono vítreo na configuração disco-anel encapsulado em peça cilíndrica de teflon, com raio do disco = 0,5613cm, o raio interno do anel = 0,6248cm e o raio externo do anel = 0,7925cm (*Figura 6*).

Nos experimentos amperométricos foi empregado eletrodo de carbono vítreo encapsulado em peça cilíndrica de teflon com raio de 1,5mm. Antes da realização de todos os experimentos a superfície do eletrodo foi polida com alumina ($\phi = 1\mu\text{m}$).

Nos estudos coulométricos utilizou-se uma placa de carbono como eletrodo de trabalho.

3.2.3. Microeletrodo de fibra de carbono

Os microeletrodos foram fabricados com microfibras de carbono de diferentes diâmetros (99,5%, Alfa Aesar), as quais foram introduzidas em ponteira plástica de pipeta. O contato entre a fibra de carbono e o fio de Ni/Cr foi efetuado empregando-se cola de prata. O preenchimento da ponteira foi feito com araldite. O polimento da superfície dos

microeletrodos envolveu um processo de abrasão manual com lixas de diferentes graus de polimento, seguindo-se etapa de lavagem e remoção de partículas dos abrasivos com jatos de água destilada. Os microeletrodos foram testados em soluções de ferrocianeto.

3.3. SISTEMA FIA E MEMBRANAS

3.3.1. Componentes do sistema FIA

Nos estudos envolvendo sistemas em fluxo, inicialmente trabalhou-se com célula do tipo "wall-jet" construída em acrílico com base em modelos já desenvolvidos e em uso no laboratório, os quais permitem o encaixe do eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência e a regulação de sua distância em relação à ponta de polietileno por onde escoo o fluxo de material conforme *Figura 10*.

Figura 10 - Célula do tipo "wall-jet" onde observa-se um eletrodo de trabalho (Et), eletrodo auxiliar (Ea) e eletrodo de referência (Er).

O bombeamento da solução carregadora foi efetuado com auxílio de bomba peristáltica (Ismatec - *Figura 11*) e o injetor de amostra (*Figura 12*)

utilizado em todos os experimentos de análise em fluxo foi construído no CENA - Centro de Energia Nuclear em Agricultura, em Piracicaba (SP). Este é fabricado com acrílico e composto por uma parte central móvel.

Figura 11 - Bomba peristáltica.

Figura 12 - Sistema injetor utilizado nos experimentos. A: entrada de solução transportadora, B: solução de Cu(II)/Ligante, C: seringa, D: alça de amostragem e E: válvula de injeção.

3.3.2. Sistema de difusão gasosa

Nos estudos envolvendo a análise de amostras reais foi empregada uma etapa prévia de acidificação da amostra e passagem por câmara de

difusão para extração do SO_2 conforme apresenta-se em trabalhos já relatados na literatura^[28,47] (*Figura 13*).

As membranas hidrofóbicas utilizadas foram fitas de PTFE ("fita de encanador"), que eram esticadas antes do uso.

Figura 13 - Sistema de difusão gasosa. (M5 = tamanho do parafuso)

3.3.3. Montagem experimental final

A *Figura 14* apresenta a montagem experimental final para a determinação de sulfito.

Neste caso trabalha-se com o sistema de análise em fluxo reverso, no qual a amostra e o reagente são invertidos de posição, o método é baseado na injeção do(s) reagente(s) no fluido carregador da amostra. Este tipo de FIA é utilizado nos casos em que a quantidade de amostra é abundante e a dos reagentes não (forma econômica de utilização dos mesmos). Além disso, em muitas aplicações, o FIA reverso aumenta a sensibilidade das medidas.

O uso do sistema de análise em fluxo reverso no trabalho deve-se ao fato de que o ligante utilizado é relativamente caro.

Figura 14 - Ilustração da montagem experimental usada nas determinações de sulfito em vinhos e sucos. A: solução de H_2SO_4 1molL^{-1} , B: amostra, C: eletrólito suporte (borato $0,02\text{molL}^{-1}$ + perclorato de sódio $0,06\text{molL}^{-1}$), D: bomba peristáltica com vazão variando de $0,7$ a $1,7\text{mLmin}^{-1}$, E: bobina de reação de 30cm , F: válvula de injeção com $\text{Cu(II)}/\text{G}_4$ e traços de Ni(II) (volume da alça de amostragem $100\mu\text{L}$), G: sistema de difusão gasosa, H: célula eletroquímica e I: descarte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS PRELIMINARES COM ELETRODO ROTATIVO DISCO-ANEL

A etapa inicial do trabalho visou a familiarização com o bipotenciostato e seu módulo rotativo, utilizando-se, para isso, um sistema de comportamento eletroquímico bem conhecido: o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Com o intuito de avaliar o comportamento do eletrodo rotativo disco-anel frente a um sistema reversível, e de calcular o fator de coleta^[48] para esse eletrodo, foram realizados experimentos em diferentes velocidades de rotação (*Figura 15*).

As equações responsáveis pelos sinais são:

Figura 15 - Voltamogramas obtidos para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1mmolL^{-1} em solução de cloreto de potássio 1molL^{-1} , utilizando eletrodo rotativo disco-anel, fixando a velocidade de varredura em 20mVs^{-1} e variando a velocidade de rotação. A = 4900rpm, B = 3600rpm, C = 2500rpm, D = 1600rpm, E = 900rpm, F = 400rpm e G = 100rpm. No disco varre-se o potencial e no anel o potencial é mantido fixo em 0V.

Conforme o esperado, no eletrodo disco-anel, obteve-se o sinal de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ no disco e de redução do produto eletroquimicamente gerado ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) no anel, ambos os sinais aparecendo ao mesmo tempo para cada velocidade de rotação. Para velocidades de rotação mais altas, os sinais de corrente tanto no disco quanto no anel se intensificam devido à maior convecção.

A Figura 16 apresenta a dependência das correntes de pico com a raiz quadrada das velocidades de rotação do eletrodo tanto para a oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ no disco quanto para a redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ no anel.

Figura 16 - Dependência das correntes de pico com a raiz quadrada das velocidades de rotação do eletrodo para a oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ no disco (A) e a redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ no anel (B).

Nos processos reversíveis de eletrodo, controlados pelo transporte de massa, o sinal de corrente de pico deve variar linearmente com a raiz quadrada da velocidade de rotação, conforme prediz a equação de Levich (I_L

$= 0,62nFAD_o^{2/3}\omega^{1/2}v^{-1/6}C_o^*$)^[11], como de fato acontece e se observa na *Figura 16* tanto para a oxidação do $[Fe(CN)_6]^{4-}$ no disco quanto para a redução do $[Fe(CN)_6]^{3-}$ no anel. A razão entre as correntes de pico no disco e no anel (fator de coleta) para cada velocidade foram muito próximas entre si, na ordem de 0,38.

4.2. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO Cu(II) EM MEIO CONTENDO TRIGLICINA, TETRAGLICINA E PENTAGLICINA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO

Após a familiarização com o instrumento, investigou-se o comportamento eletroquímico do Cu(II) em meio contendo diferentes peptídeos (tri, tetra e pentaglicina) em função da acidez utilizando-se eletrodo de carbono vítreo (*Figura 19*).

Os complexos de Cu(II)/ligante apresentam diversos equilíbrios ácido-base (equações 8 a 12) e estruturas^[49,50,51,52] (*Figura 17*).

(estrutura I)^[49]

(estrutura II)^[49]

(estrutura III)^[49]

(estrutura IV)^[49]

(estrutura V)

(estrutura VI)

(estrutura VII)^[40,53]

(estrutura VIII)^[34]

(estrutura IX)^[52]

Figura 17 - Estruturas dos complexos peptídicos de Cu(II).

Tabela 1 - Interação do Cu(II) e triglicina, tetraglicina e pentaglicina^[32,49,54].

K_x	Quociente	Log K_x		
	Equilíbrio	Triglicina ($n=3$)	Tetraglicina ($n=4$)	Pentaglicina ($n=5$)
K_1	$[\text{Cu}^{\text{II}}\text{G}_n^+] / [\text{Cu}^{2+}] [\text{G}_n^-]$	5,5	5,4	5,3
K_{1a}	$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_1\text{G}_n)] [\text{H}^+] / [\text{Cu}^{\text{II}}\text{G}_n^+]$	-5,4	-5,5	-6,1
K_{1b}	$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_n^-) [\text{H}^+] / [\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_1\text{G}_n)]$	-6,6	-6,8	-7,0
K_{1c}	$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_n)\text{OH}^{2-}] [\text{H}^+] / [\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_n^-)]$	-10,9		
K_{1c}	$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_n)^{2-}] [\text{H}^+] / [\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_n^-)]$		-9,2	-8,1

O sinal subscrito negativo no H na fórmula indica a perda de n (1, 2 ou 3) prótons do ligante neutro requerida para formar o complexo.

A partir das constantes de equilíbrio (*Tabela 1*), o diagrama de distribuição para os complexos cobre(II)/ligante (1:1) pôde ser calculado em função do pH, conforme *Figura 18*.

Figura 18 - Diagramas de distribuição dos complexos de Cu(II)/ligante (1:1): A = Cu^{2+} , B = $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{G}_n]^+$, C = $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_1\text{G}_n)]$, D = $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_n)]$ e E = $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_3)\text{OH}]^{2-}$ (I) ou $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_n)]^{2-}$ (II e III). I = triglicina ($n=3$), II = tetraglicina ($n=4$) e III = pentaglicina ($n=5$).

Assim sendo, meios alcalinos favorecem a formação de complexos com ligantes dupla e/ou triplamente desprotonados, ou seja, a espécie $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_n)]^-$ e/ou $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_n)]^{2-}$, respectivamente.

Na ausência de ligantes específicos que coordenem o Cu(III), o Cu(II) se reduz a Cu^0 e quando inverte-se o sentido de varredura, observa-se a redissolução do Cu^0 , regenerando o cátion bivalente. Na presença de ligantes peptídicos, um comportamento diferente é observado em potenciais positivos. Portanto, experimentos foram realizados em diferentes valores de pH em uma faixa de 7,0 a 10,0 (Figura 19).

Figura 19 - Voltamogramas obtidos com eletrodo de carbono vítreo para soluções contendo eletrólito suporte e peptídeos em diferentes valores de pH antes (A) e depois da adição de Cu^{2+} ($C_{\text{final}} = 1\text{mmolL}^{-1}$). $v = 20\text{mVs}^{-1}$. I = triglicina, II = tetraglicina e III = pentaglicina.

Pode-se observar nos voltamogramas da Figura 19I a presença de uma única onda anódica, que corresponde à oxidação do $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_3)]^-$, espécie predominante nas condições de basicidade trabalhadas (Figura 18I). Nota-se que aumentando-se o pH há uma intensificação no sinal de corrente, a qual pode ser consequência do aumento da concentração da espécie duplamente desprotonada, ou seja, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_3)]^-$ e da diminuição da concentração da espécie mono desprotonada, ou seja, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_1\text{G}_3)]$. Também, observa-se o desaparecimento do componente catódico. Esse desaparecimento pode ser devido à rápida degradação da espécie $[\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{G}_3)]$ em meios mais alcalinos. Voltamogramas similares (pH = 10,0) foram

registrados em 500mVs^{-1} e baixa temperatura (10°C) e novamente nenhum componente catódico foi observado.

Quando a triglicina foi substituída por tetraglicina, um comportamento eletroquímico diferente foi observado. Os voltamogramas obtidos em solução contendo Cu(II) e tetraglicina mostram dois processos diferentes envolvendo oxidações em $\text{pH} = 7,0$ ($\sim 0,9\text{V}$) e $10,0$ ($\sim 0,5\text{V}$) (*Figura 19II*). Nos valores intermediários de pH , os voltamogramas apresentam os dois processos eletroquímicos, confirmando a participação das duas diferentes espécies de Cu(II) . Analisando o diagrama de distribuição de espécies (*Figura 18II*), pode-se dizer que a espécie predominante em $\text{pH} 8,0$ é $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_4)]^-$, mesmo assim duas outras espécies existem em solução em condições neutras e alcalinas. Os N(amida) desprotonados são ligantes doadores muito fortes, facilitando a retirada de elétrons dos íons metálicos em processos de oxidação. Sendo assim, quanto maior a quantidade desses nitrogênios coordenados ao cobre, menos positivo é o potencial de oxidação do par $\text{Cu(II)}/\text{Cu(III)}$ ^[55]. Portanto, o primeiro processo em torno de $0,5\text{V}$ corresponde à espécie complexada mais facilmente oxidada, ou seja, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^{2-}$ (*Figura 17* - estrutura VIII). A segunda onda ao redor de $0,9\text{V}$ está relacionada à oxidação do complexo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_4)]^-$ (*Figura 17* - estrutura VII). No complexo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_3)]^-$ (*Figura 17* - estrutura III), o Cu(II) é rodeado pelos mesmos átomos que no complexo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_4)]^{2-}$ (*Figura 17* - estrutura VII). Por serem quimicamente semelhantes estes complexos têm potenciais de oxidação próximos.

A *Figura 19III* apresenta os voltamogramas obtidos para as soluções de $\text{Cu(II)}/\text{pentaglicina}$. Uma prévia comparação dos complexos triplamente desprotonados $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^{2-}$ (*Figura 17* - estrutura VIII) e $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_5)]^{2-}$ (*Figura 17* - estrutura IX) mostra que os centros de coordenação envolvidos na formação do anel quelato são os mesmos para ambos, apresentando

quatro átomos de nitrogênios doadores ligados ao metal em um arranjo quadrado planar, sugerindo um comportamento redox similar. Portanto, o processo anódico em potenciais menos positivos corresponde à oxidação da espécie triplamente desprotonada, ou seja, $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_5)]^{2-}$ e a oxidação da espécie $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_5)]^-$ é responsável pela onda em potenciais mais positivos.

4.3. ESTUDOS COULOMÉTRICOS E ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Estudos espectrofotométricos relacionados à formação química do complexo de Cu(III)/tetraglicina e sua degradação em certas condições já foram reportados na literatura^[32]. Com intuito de investigar a estabilidade do Cu(III) gerado eletroquimicamente, experimentos preliminares foram feitos. Para tanto, estudos coulométricos foram realizados em uma solução contendo Cu(II) em meio de tetraglicina (pH = 10,0) (*Figura 20*).

Figura 20 - Voltamogramas obtidos com microeletrodo de fibra de carbono ($r = 25\mu\text{m}$) para Cu(II)/tetraglicina 1mmolL^{-1} em eletrólito suporte (pH = 10,0) antes (A) e depois de 30 minutos de eletrólise em 0,6V (B). $v = 20\text{mVs}^{-1}$. Espectro UV-vis registrado antes (A) e imediatamente depois da eletrólise (B). Curvas C e D representam o espectro da solução resultante após 30 e 60 minutos, respectivamente.

Na *Figura 20*, curva A, observa-se o registro do voltamograma da solução inicial obtido com microeletrodo de fibra de carbono com um perfil sigmoidal característico devido ao efeito da difusão radial. Depois de 30 minutos de eletrólise obtém-se uma solução amarela com comportamento voltamétrico apresentado na curva B, *Figura 20*. Há um decréscimo significativo no sinal de corrente anódica e um pequeno aumento no componente catódico, indicando que a fração do material eletroquimicamente gerado pode ter sido consumido pela reação química durante o tempo de eletrólise.

Espectros simultâneos foram obtidos para as soluções (antes e depois da eletrólise). No espectro B da *Figura 20* observa-se, após a eletrólise, o aparecimento de um pico em 365nm, característico da formação de $\text{Cu(III)}^{[39]}$. A perda do sinal em 365nm em função do tempo (curvas C e D) é uma evidência que o complexo se decompõe na escala de tempo do experimento coulométrico^[32,33,56]. Observa-se também que o pico em 515nm, característico do complexo de Cu(II) /tetraglicina não sofre alteração significativa durante o experimento reportado. Isso deve-se, possivelmente, à grande diferença nos valores das absorvidades molares dos complexos de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^{2-}$ e $[\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^-$ ($140\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 515nm^[49,57] e $7200\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 365nm^[34,36,55], respectivamente).

Um experimento similar também foi realizado utilizando a triglicina como ligante. Neste caso, a ausência de ambos o sinal catódico e do pico característico do complexo de Cu(III) em 365nm após a eletrólise prova que esta espécie não permanece em solução por muito tempo, provavelmente porque alguma reação com o ligante acontece como é sugerido na literatura^[33] (*Figura 21*).

Figura 21 - Voltamogramas obtidos com microeletrodo de fibra de carbono ($r = 25\mu\text{m}$) em eletrólito suporte + triglicina ($\text{pH} = 8,0$) antes (A) e após (B) a adição de Cu(II) ($C_{\text{final}} = 1\text{mmolL}^{-1}$). A curva C representa o voltamograma da solução resultante após 60 minutos de eletrólise ($E = 0,9\text{V}$). $\nu = 20\text{mVs}^{-1}$. Os espectros respectivos também são mostrados.

A ausência do processo faradaico no voltamograma C, da Figura 21, assim como o desaparecimento do pico em 552nm (característico da espécie de $\text{Cu(II)}/\text{triglicina}^{[57]}$) após a eletrólise indica que não há ligante em solução para complexar os íons cobre como consequência da decomposição da triglicina. Comparando ambos os ligantes pode-se concluir que a degradação do complexo de $\text{Cu(III)}/\text{triglicina}$ é relativamente rápida e produz fragmentos incapazes de coordenar o cobre no estado trivalente. Todavia, a reação de decomposição envolvendo $\text{Cu(III)}/\text{tetraglicina}$ em meio alcalino ocorre de maneira diferente. Neste caso, a reação de decomposição resulta na formação de Cu(II) , acompanhada da oxidação do peptídeo^[32]. A

análise cromatográfica dos produtos de decomposição encontrada na literatura^[32,33] revelou que pequenos fragmentos como glicilglicinamida e glioxilglicina (provenientes da hidrólise do desidropeptídeo), glicilglicina e glicinamida são formados e uma quantidade significativa de tetraglicina permanece ainda intacta em solução.

4.4. EXPERIMENTOS COM ELETRODO ROTATIVO DISCO-ANEL E CRONOAMPEROMÉTRICOS

Trabalhos anteriores demonstraram que a oxidação do complexo de Cu(II)/tetraglicina em pH = 10,0 envolve a formação do complexo de Cu(III) e degradação química dessa espécie^[42,58], caracterizando um mecanismo EC (existência de etapa química associada ao processo eletródico posterior à transferência eletrônica). Com intuito de investigar esse fato, experimentos voltamétricos com eletrodo rotativo na configuração disco-anel foram realizados para esse sistema (*Figura 23*) e estendidos para a triglicina (*Figura 22*) e pentaglicina (*Figura 24*). Além disso, investigou-se a influência da temperatura no processo de degradação dos complexos de Cu(III).

As *Figuras 22, 23 e 24* apresentam voltamogramas obtidos em solução contendo Cu(II)/ligante em diferentes condições. Experimentos foram realizados variando-se a velocidade de rotação, varrendo-se o potencial no disco para gerar Cu(III), que, por sua vez, é coletado no anel, no qual o potencial é mantido em 0,1V.

→ $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{G}_3)]^-$, espécie predominante em $\text{pH} = 8,0$:

Figura 22 - Voltamogramas obtidos para uma solução de $\text{Cu}(\text{II})/\text{triglicina } 1\text{mmolL}^{-1}$. Eletrodo rotativo disco-anel. $\text{pH} = 8,0$. $E_{\text{anel}} = 0,1\text{V}$. $v = 20\text{mVs}^{-1}$. A: $\omega = 100\text{rpm}$, B: $\omega = 400\text{rpm}$ e C: $\omega = 900\text{rpm}$. $T = 25^\circ\text{C}$.

→ $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^{2-}$, espécie predominante em $\text{pH} = 10,0$:

Figura 23 - Voltamogramas obtidos para uma solução de $\text{Cu}(\text{II})/\text{tetraglicina } 1\text{mmolL}^{-1}$. Eletrodo rotativo disco-anel. $\text{pH} = 10,0$. $E_{\text{anel}} = 0,1\text{V}$. $v = 20\text{mVs}^{-1}$. A: $\omega = 100\text{rpm}$, B: $\omega = 400\text{rpm}$ e C: $\omega = 900\text{rpm}$. $T = 25^\circ\text{C}$.

→ $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_5)]^{2-}$, espécie predominante em pH = 9,0 e 10,0:

Figura 24 - Voltamogramas obtidos para uma solução de $\text{Cu}(\text{II})/\text{pentaglicina}$ 1mmolL^{-1} . Eletrodo rotativo disco-anel. I: pH = 9,0 e II: pH = 10,0. $E_{\text{anel}} = 0,1\text{V}$. $v = 20\text{mVs}^{-1}$. A: $\omega = 100\text{rpm}$, B: $\omega = 400\text{rpm}$ e C: $\omega = 900\text{rpm}$. $T = 25^\circ\text{C}$.

As equações responsáveis pelos sinais são:

Pode-se notar nas Figuras 22, 23 e 24 que o sinal de corrente de redução no anel ocorre simultaneamente ao aparecimento do sinal de oxidação no disco, onde ocorre a geração de $\text{Cu}(\text{III})$ (equação 14). Observa-se, também, que o aumento na velocidade de rotação ocasiona um aumento nos sinais de corrente do disco e do anel devido à maior convecção.

Com o desenvolvimento dos estudos eletroquímicos sobre o sistema $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{III})$ em etapas anteriores, e utilizando para tanto o eletrodo disco-anel de carbono vítreo como sistema gerador-coletor, tornou-se possível averiguar a degradação do complexo de $\text{Cu}(\text{III})$ eletroquimicamente gerado, através da determinação dos fatores de coleta, ou seja, das razões

$I_{\text{anel}}/I_{\text{disco}}$. Portanto, através dos experimentos realizados em diferentes velocidades de rotação (Figuras 22, 23 e 24) determinou-se os fatores de coleta para diferentes temperaturas (10°C, 25°C e 40°C).

A Figura 25 apresenta a dependência da corrente limite com a raiz quadrada da velocidade de rotação do eletrodo para os três sistemas anteriores em diferentes temperaturas.

Figura 25 - Dependência da corrente limite com a raiz quadrada da velocidade de rotação do eletrodo para os três sistemas: I: $[Cu^{II}(H_2G_3)]/[Cu^{III}(H_2G_3)]$ (pH = 8,0), II: $[Cu^{II}(H_3G_4)]\dot{F}^-/[Cu^{III}(H_3G_4)]$ (pH = 10), III: $[Cu^{II}(H_3G_5)]\dot{F}^-/[Cu^{III}(H_3G_5)]$ (pH = 9,0) e IV: $[Cu^{II}(H_3G_5)]\dot{F}^-/[Cu^{III}(H_3G_5)]$ (pH = 10,0) onde A: $T = 40^\circ C$, B: $T = 25^\circ C$ e C: $T = 10^\circ C$.

A Figura 26 apresenta a dependência dos fatores de coleta com as velocidades de rotação do eletrodo para os três sistemas anteriores em diferentes temperaturas.

Figura 26 - Dependência dos fatores de coleta com as velocidades de rotação do eletrodo para os três sistemas I: $[Cu^{II}(H_2G_3)]/[Cu^{III}(H_2G_3)]$ ($pH = 8,0$), II: $[Cu^{II}(H_3G_4)]^{2-}/[Cu^{III}(H_3G_4)]$ ($pH = 10$), III: $[Cu^{II}(H_3G_5)]^{2-}/[Cu^{III}(H_3G_5)]$ ($pH = 9,0$) e IV: $[Cu^{II}(H_3G_5)]^{2-}/[Cu^{III}(H_3G_5)]$ ($pH = 10,0$) onde A: $T = 40^\circ C$, B: $T = 25^\circ C$ e C: $T = 10^\circ C$.

Para o sistema $[Fe(CN)_6]^{4-} / [Fe(CN)_6]^{3-}$, um processo reversível e controlado pelo transporte de massa, o valor determinado para o fator de coleta é de 0,38 (item 4.1.). Os valores de fator de coleta obtidos para a maioria dos casos foram menores do que esse valor, demonstrando, portanto, que ocorre degradação do complexo de Cu(III) (gerado no disco) nestas condições.

Na *Figura 26* observa-se que aumentando a velocidade de rotação há um aumento nos fatores de coleta para as três temperaturas (10°C, 25°C e 40°C). Além disso, os fatores de coleta diminuem com o aumento da temperatura, demonstrando assim uma degradação mais acentuada em temperaturas mais altas.

No caso do complexo $[\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{G}_5)]^-$, pode-se dizer que sua degradação é mais evidenciada em pH 10,0 do que em pH 9,0, pois os seus fatores de coleta obtidos são menores, comprovando que a decomposição do Cu(III)/pentaglicina tem sua cinética mais rápida quanto maior a basicidade do meio.

Os valores de fator de coleta para os complexos de Cu(III)/tetraglicina e Cu(III)/pentaglicina foram mais próximos de 0,38, demonstrando assim uma decomposição mais lenta comparada com o complexo de Cu(III)/triglicina.

4.5. ESTUDOS ELETROANALÍTICOS SOBRE O SISTEMA Cu(III)/Cu(II)

O oxigênio molecular reage espontaneamente com o Cu(II)/tetraglicina em meio de pH na faixa de 7 a 9, sendo esta reação autocatalítica (equação 18). Mas esta é muito lenta e poderia ser acelerada na presença de sulfito^[43], via mecanismo radicalar^[42] (equações 19 a 27), levando à rápida oxidação de Cu(II) a Cu(III).

Iniciação:

Autocatálise: *Reação global:*

No entanto, a reação do oxigênio molecular com o Cu(II)/tetraglicina não é acelerada na presença somente de sulfito, mas sim na presença de sulfito e traços de Ni(II) (ordem de 10^{-5}molL^{-1}) essa reação (equação 27) é fortemente acelerada^[44] pois, o Ni(II) também reage com o oxigênio gerando Ni(III) (equação 28) e este por sua vez reage com o sulfito formando o radical $\text{SO}_3^{\bullet-}$ (equação 29), que participa então do mecanismo anterior.

Os experimentos eletroquímicos anteriores demonstraram que o complexo de Cu(III)/tetraglicina é eletroativo na faixa de potencial compreendendo a região de 0,1 a 0,3V, onde ocorre o processo de redução a Cu(II). Com intuito de comprovar a importância do Ni(II) na reação global (equação 27), experimentos monitorando-se o complexo de Cu(III) com microeletrodo de fibra de carbono ($r = 25\mu\text{m}$) em 0V, potencial onde a

redução do Cu(II) é controlada por transporte de massa, foram realizados na ausência (A) e na presença (B) de Ni(II) após adição de S(IV).

Figura 27 - Monitoramento do complexo de Cu(III) em 0V com microeletrodo de fibra de carbono ($r = 25\mu\text{m}$) na ausência (A) e na presença (B) de Ni(II) ($C_{\text{final}} = 10^{-5}\text{molL}^{-1}$) após adição de S(IV) ($C_{\text{final}} = 0,2\text{mmolL}^{-1}$).

O monitoramento do complexo de Cu(III) confirmou que a oxidação espontânea do complexo pelo oxigênio dissolvido e S(IV) (equação 27) é muito lenta (Curva A - Figura 27) ao contrário do que ocorre quando há traços de Ni(II) (Curva B - Figura 27). Observa-se também que após algum tempo o sinal de corrente tende a cair como resultado da degradação da espécie quimicamente gerada.

Para a caracterização eletroquímica da formação do complexo de Cu(III), voltamogramas em solução de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^{2-}$ (pH = 10,0) em meio contendo níquel e oxigênio antes (A) e após a adição de S(IV) (B) foram registrados com eletrodo rotativo e também com microeletrodo de fibra de carbono (Figura 28).

Figura 28 - Voltamogramas obtidos em solução de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^{2-}$ ($\text{pH} = 10,0$) 1mmolL^{-1} e $\text{Ni}(\text{II})$ 10^{-5}molL^{-1} antes (A) e após (B) a adição de sulfito ($C_{\text{final}} = 0,2\text{mmolL}^{-1}$). $\omega = 400\text{rpm}$ (I) ou $r = 25\mu\text{m}$ (II) e $v = 20\text{mVs}^{-1}$. Os espectros respectivos também são mostrados (III).

Pode-se observar que após a adição de S(IV) ocorre uma queda na intensidade do sinal anódico e um aparecimento de um componente catódico. Tal fato demonstra haver formação química de Cu(III) com a adição de sulfito à solução, justificando o aparecimento do sinal catódico relativo à redução da espécie $[\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{G}_4)]^-$ e diminuição no sinal de oxidação do complexo de Cu(II), além do aparecimento da banda em 365nm, característica do complexo de Cu(III).

Então, pode-se dizer que a quantidade quimicamente formada de Cu(III) é diretamente proporcional à concentração de sulfito em solução (quando oxigênio está em excesso), indicando a potencialidade de emprego

do sistema Cu(II)/Cu(III) no desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação desse substrato.

Nos estudos de otimização das variáveis do método para a determinação de sulfito, as faixas de investigação de cada parâmetro foram escolhidas em função de estudos anteriores e existentes na literatura.

O primeiro passo para otimizar as condições de análise foi a realização de experimentos voltamétricos em diferentes valores de pH (entre 7,0 e 10,0) de modo a averiguar a sua influência na geração química de Cu(III) (*Tabela 2*).

Tabela 2 - Dependência do sinal catódico (geração química de Cu(III)) em função do pH.

pH	- Corrente / nA
7,0	0,00
8,0	0,77
9,0	0,81
10,0	0,75

Na *Tabela 2* pode-se observar que geração química de Cu(III) é mais pronunciada em meio mais alcalino, onde prevalece a espécie triplamente desprotonada. Portanto, os trabalhos foram executados em pH = 9,0.

4.6. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA POR FIA COM SISTEMA DE DIFUSÃO GASOSA

Como é reportado na literatura^[58], a determinação indireta de sulfito usando o monitoramento do Cu(III) possui interferentes, por isso, a injeção direta de amostras não é possível. Uma alternativa para esse problema foi a construção de uma célula em fluxo com sistema adequado para separação de

gases, conforme a *Figura 14* de forma a extrair o sulfito da amostra pela acidificação com H_2SO_4 1molL^{-1} gerando SO_2 , que difunde através da membrana hidrofóbica, reagindo com o complexo de Cu(II) que está do outro lado da membrana, gerando o complexo de Cu(III).

4.6.1. Voltametria hidrodinâmica

A escolha do potencial de trabalho para a determinação de sulfito em amostras reais foi baseada no voltamograma hidrodinâmico de solução de sulfito 10^{-4}molL^{-1} . O potencial aplicado foi variado de -0,10V a 0,45V em intervalos de 0,05V. Para a construção dos voltamogramas hidrodinâmicos foram consideradas as respostas médias de 3 injeções consecutivas em cada potencial aplicado.

A *Figura 29* apresenta o voltamograma hidrodinâmico. Pode-se observar que a curva do voltamograma apresenta um patamar. O potencial escolhido para a determinação de Cu(III) (ou sulfito) foi de 0V.

Figura 29 - Voltamograma hidrodinâmico da solução de sulfito 10^{-4}molL^{-1} .

4.6.2. Estudo de vazão

O efeito da vazão também foi estudado na faixa de 0,7 a 1,7 mLmin⁻¹ e encontra-se na *Figura 30*. Neste estudo o potencial foi mantido em 0V vs Ag/AgCl (sat. NaCl).

Figura 30 - Estudo da vazão de uma solução de SO_3^{2-} $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $E_{\text{apl.}} = 0\text{V}$. Alça de amostragem = $100 \mu\text{L}$.

Os resultados observados neste estudo de vazão mostram um decréscimo na corrente após a vazão de 1,1 mLmin⁻¹ (*Figura 30*), provavelmente devido à difusão do SO_2 pela membrana ser relativamente baixa.

4.6.3. Repetibilidade e frequência analítica

Com intuito de estabelecer a repetibilidade das determinações realizadas usando o método proposto, uma solução de sulfito $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em água foi utilizada.

Ensaio de repetibilidade (*Figura 31*) do método analítico proposto para a determinação de sulfito apresentaram um desvio padrão de 4,9% ($n =$

38), valor superior aos encontrados na literatura para determinações de sulfito em vinho por FIA com detecção amperométrica indireta (1-4,6%), e com uma frequência analítica de 40h^{-1} , valor coerente com os dos outros métodos amperométricos.

Figura 31 - Repetibilidade para a determinação de $\text{SO}_3^{2-} 10^{-4}\text{molL}^{-1}$ utilizando a membrana hidrofóbica para a separação do analito da matriz. Vazão: $1,1\text{mLmin}^{-1}$. $E_{\text{apl.}} = 0\text{V}$.

4.6.4. Linearidade

Em $\text{pH} = 9,0$ e fluxo de $1,1\text{mLmin}^{-1}$, obteve-se uma boa linearidade (coeficiente angular = $1,3\mu\text{A}/\text{mmolL}^{-1}$ e $R^2 = 0,999$) para a concentração de S(IV) na faixa de $20\text{-}100\mu\text{molL}^{-1}$. A linearidade estendeu-se até $0,4\text{mmolL}^{-1}$ (necessidade do oxigênio estar em excesso em relação ao sulfito) e o limite de detecção foi de $2\mu\text{molL}^{-1}$ ($S/N = 3$). O limite de quantificação foi de $5\mu\text{molL}^{-1}$, que é satisfatório para a determinação da quantidade encontrada

em amostras de vinhos e sucos levando em conta os limites permitidos pela legislação.

4.6.5. Determinação de sulfito em vinhos e sucos utilizando análise por injeção em fluxo

O método amperométrico proposto foi aplicado na análise de sulfito em algumas amostras alcoólicas e não alcoólicas (3 vinhos e 2 sucos de fruta concentrados).

Como a membrana não é eficiente na restrição da difusão do etanol^[47] e este está presente em grande quantidade nos vinhos (aproximadamente 10% v/v), experimentos preliminares, na ausência de membrana, foram realizados a fim de averiguar a influência do etanol na reação química envolvendo a geração de Cu(III) (Diagrama D - *Figura 32*). Na presença de etanol, nenhuma diferença foi notada, indicando que este não interfere no método proposto para a determinação de S(IV).

Experimentos similares foram realizados para investigar o efeito do acetaldeído e formaldeído (Diagramas A e C, respectivamente - *Figura 32*). Ambos os compostos podem existir em concentrações apreciáveis nas amostras de vinhos e estes interagem com o S(IV) em determinadas condições de pH formando adutos muito estáveis. Nota-se uma redução de 85% no sinal da corrente na presença de formaldeído e uma perda de sinal menos efetiva na presença de acetaldeído (35%). O acetaldeído é menos eficiente na estabilização do S(IV) graças ao grupo $-CH_3$ que apresenta maior característica eletrodoadora que o $-H$.

Figura 32 - Diagrama de possíveis interferentes. Injeção de soluções de: A: SO_3^{2-} $0,1\text{mmolL}^{-1}$ + acetaldeído 1mmolL^{-1} , B: SO_3^{2-} $0,1\text{mmolL}^{-1}$, C: SO_3^{2-} $0,1\text{mmolL}^{-1}$ + formaldeído 1mmolL^{-1} e D: SO_3^{2-} $0,1\text{mmolL}^{-1}$ + etanol 10%. Vazão: $1,6\text{mLmin}^{-1}$. $E_{\text{apl.}} = 0\text{V}$.

As amostras foram diluídas de modo que o sinal de corrente correspondente fosse detectável na faixa de concentração trabalhada (se necessária) e a Figura 33 apresenta o diagrama obtido pelo método proposto para essas amostras (vinhos e sucos).

Figura 33 - Fiograma de determinação de sulfito em vinhos e sucos. SO_3^{2-} : (A) $0,02\text{mmolL}^{-1}$, (B) $0,04\text{mmolL}^{-1}$, (C) $0,06\text{mmolL}^{-1}$, (D) $0,08\text{mmolL}^{-1}$ e (E) $0,10\text{mmolL}^{-1}$; Amostras: (F) vinho 1 diluído 20x, (G) vinho 2 diluído 10x, (H) vinho 3 diluído 10x, (I) suco de abacaxi diluído 100x e (J) suco de uva diluído 10x. Vazão: $1,1\text{mLmin}^{-1}$. Alça de amostragem: $100\text{ }\mu\text{L}$. $E_{\text{apl}} = 0\text{V}$.

A comparação entre os resultados obtidos para a determinação de sulfito em vinhos e sucos pelos métodos FIA e destilação Monier-Williams é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos para a determinação de sulfito em vinhos e sucos para método proposto e para o método padrão (destilação de Monier-Williams)^[21]

Amostras	Métodos (95% de confiança)		Erro relativo
	<i>FIA / mmolL⁻¹</i>	<i>Monier-Williams / mmolL⁻¹</i>	
Vinho 1	(0,76±0,01)	(0,83±0,02)	8,4%
Vinho 2	(0,28±0,01)	(0,21±0,01)	33%
Vinho 3	(0,26±0,01)	(0,23±0,01)	13%
Suco de abacaxi	(2,67±0,08)	(2,58±0,03)	3,5%
Suco de uva	(0,40±0,01)	(0,43±0,01)	7,0%

Os resultados obtidos para a determinação de sulfito em vinhos e sucos pelos métodos FIA e destilação Monier-Williams foram concordantes (coeficiente de correlação = 0,998). Observa-se na *Tabela 3* valores de erros relativamente altos demonstrando que os resultados comparados com aqueles obtidos utilizando-se o método padrão não são exatos, mas precisos (desvios baixos).

Experimentos de recuperação também foram realizados adicionando-se às amostras de vinho ou suco solução de concentração conhecida de sulfito e registrando-se o sinal total do analito. Os valores de recuperação variaram de 92 a 98% para os vinhos e de 98 a 100% para os sucos conforme a *Tabela 4*. Daqui, pode-se concluir que o método proposto para a determinação de sulfito é eficiente.

Tabela 4 - Recuperação do sulfito adicionado.

Amostras	Diluição	- Sinal da amostra / nA	- Sinal da amostra + 0,1mmol ⁻¹ SO ₃ ²⁻ / nA	% Recuperação
Vinho 1	20x	47,9	158,1	92
Vinho 2	10x	33,7	154,5	98
Vinho 3	10x	32,3	148,5	95
Juice de abacaxi	100x	36,7	160,7	100
Suco de uva	10x	50,8	171,3	98

CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA DETERMINAÇÃO DE SULFITO

Concentração de Cu(II)	1mmolL ⁻¹
Concentração de ligante (tetraglicina)	1,3mmolL ⁻¹
Concentração de H ₂ SO ₄	1molL ⁻¹
Eletrólito suporte	borato 0,02molL ⁻¹ + perclorato de sódio 0,06molL ⁻¹
Volume da alça de amostragem	100μL
Vazão da bomba peristáltica	1,1mLmin ⁻¹
Comprimento da bobina	30cm
Potencial aplicado	0V

5. CONCLUSÕES

Os complexos formados pelo Cu(II) e os ligantes (G_3 , G_4 e G_5) apresentam diversos equilíbrios ácido-base. Meios mais alcalinos favorecem a formação de complexos com ligantes duplamente ou triplamente desprotonados. A análise de voltamogramas obtidos em soluções de Cu(II)/triglicina em diferentes valores de pH indicaram que somente uma espécie complexada de Cu(II) é eletroativa, provavelmente a $[Cu^{II}(H_2G_3)]^-$. Entretanto, a análise de voltamogramas obtidos em soluções de Cu(II)/tetraglicina e Cu(II)/pentaglicina em diferentes valores de pH indicaram que pelo menos duas espécies diferentes participam do processo eletródico. Experimentos com eletrodo rotativo disco-anel, coulométricos e espectrofométricos demonstraram que a espécie de Cu(III) eletroquimicamente gerada sofre um processo de degradação, sendo afetado pela temperatura. A triglicina é menos efetiva como ligante para o Cu(III) e a decomposição do complexo de Cu(III) é mais evidenciada em valores de pH maiores.

Estudos eletroanalíticos demonstraram a potencialidade de se empregar o sistema Cu(II)/Cu(III) no desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de sulfito. Experimentos eletroquímicos demonstraram que o complexo de Cu(III)/tetraglicina é eletroativo na faixa de potencial compreendendo a região de 0 a 0,2V, onde ocorre o processo de redução a Cu(II). Uma vez que a quantidade de Cu(III) formado na reação química é função direta da concentração de sulfito (quando oxigênio está em excesso e na presença de traços de Ni(II), acelera a reação do complexo de Cu(II) com oxigênio dissolvido e sulfito), pode-se quantificar sulfito monitorando-se a corrente no potencial apropriado. Neste contexto,

um método amperométrico indireto para a determinação de sulfito em fluxo utilizando uma célula em fluxo com sistema adequado para separação de gases foi proposto neste trabalho.

As principais vantagens associadas a esta detecção indireta estão intimamente relacionadas ao fato de que a oxidação eletroquímica de sulfito é irreversível e ocorre em potenciais mais positivos do que 0,1 ou 0,2 V, de maneira que interferências devido a outras substâncias eletroativas eventualmente presentes em matrizes reais poderiam comprometer o método analítico.

Suas vantagens perante os outros métodos tradicionais são sua simplicidade, o pouco consumo de reagentes e a sua alta frequência analítica.

O método proposto também aponta uma outra vantagem em relação ao método oficial, pois para a análise de S(IV) total não há necessidade de destilação. O método pode ser aplicado no caso de amostras complexas (onde há interferência da matriz), já que a membrana de difusão evita a passagem de espécies interferentes grandes. Além disso, o trabalho em potenciais menos positivos minimiza problemas associados com possíveis moléculas pequenas que são capazes de difundir pela membrana.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Todos experimentos envolvendo sulfito foram realizados com o ligante tetraglicina. Um dos objetivos era também realizar estes estudos com outros ligantes: a triglicina e a pentaglicina. Um estudo preliminar com o complexo de Cu(II)/triglicina mostrou que também é possível gerar quimicamente o Cu(III) (surgimento de uma banda próximo a 365nm, característica do complexo de Cu(III)). Um próximo passo seria comprovar tal fato realizando outros experimentos como registrar voltamogramas na ausência e presença de sulfito. Também poderia-se realizar os mesmos estudos do sulfito com a pentaglicina e por fim compará-los para averiguar a melhor eficiência dos ligantes com relação à determinação de sulfito.

Perspectivas futuras poderiam envolver também estudos eletroquímicos de outros metais no meio desses ligantes. Estudos eletroquímicos preliminares em soluções de Ni(II)/tetraglicina foram realizados e demonstraram que o complexo de Ni(III)/tetraglicina é eletroativo na faixa de potencial compreendendo a região de 0V a 0,4V, onde ocorre o processo de redução a Ni(II).

Estudos de interferentes (principalmente metais) mais detalhados também podem ser feitos.