UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS MODIFICADOS E MÉTODOS ANALÍTICOS

CARLA MARIA NUNES AZEVEDO
Tese de Doutorado

PROF. DR. LÚCIO ANGNES
Orientador

São Paulo
1999

"Desenvolvimento de Eletrodos Modificados e Métodos Analíticos".

CARLA MARIA NUNES AZEVEDO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Prof. Dr. LÚCIO ANGNES
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. SILVIA HELENA PIRES SERRANO
IQ - USP

Prof. Dr. KOITI ARAKI
IQ – USP

Prof. Dr. ÉDER TADEU GOMES CAVALHEIRO
IQ - UFSCar

Profa. Dra. ORLINEY MACIEL GUIMARÃES
UFPR

SÃO PAULO
16 DE ABRIL DE 1999.

Aos meus pais, Sílvia e Osmar, e ao meu irmão Cristiano, que nunca mediram esforços para que os meus sonhos se realizassem.

Ao meu filho Vinícius, por iluminar a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Lúcio Angnes pela orientação e amizade.

Aos profs. Drs. Henrique Toma e Koiti Araki pela valiosa colaboração neste trabalho.

Ao prof. Dr. Renato Jardim por contribuir fornecendo o óxido $NdNiO_3$.

A todos os colegas do laboratório, Renato, Márcio, William, Valberes, Patrícia, Carolina, Robinson, Jairo, José Alberto, Dosil, Ana Beatriz, Marco Antônio, Flávio, Pillar, Lair, Vítor, Adriana, Daniela, Carlos, José Geraldo, Fabiano, Adelaine, Eric, Érica, Ana, Marcelinho, Eduardo e Rogério, pela amizade e pelos bons momentos.

Aos profs. Drs. Claudimir do Lago e Ivano Gutz, pela descontraída e estimulante convivência.

Aos colegas da Química Analítica, Auxiliadora, Paulo César, Vânia, Cristiane, Andréia, Margareth, Milton, Gisele e Gilberto, pela amizade e momentos de descontração.

Aos professores Drs. Sílvia Serrano, Mauro Bertotti, Jaim Lichtig, Roberto Tokoro, Jorge Masini e Koshun Iha, pelo incentivo e conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do xerox, Francisco e Jailton, pelo capricho e bom humor com que realizam o seu trabalho.

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

Especial agradecimento à Carmem, Alexandre, Maria da Graça, Claudinei, Solange, Rudimar, Rude, Lourdes (*in memorian*), Otacílio e Otília (*in memorian*), pelo constante apoio ao longo desta caminhada.

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

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos eletrodos modificados e procedimentos para a sua utilização na determinação de diversas espécies químicas de interesse analítico, dentre as quais sulfito, ácido ascórbico, nitrito, dopamina, NADH e peróxido de hidrogênio.

Foram realizados estudos envolvendo eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes contendo uma única metaloporfirina tetrarrutenada (catiônica) e aplicações analíticas destes sensores associando-os à análise por injeção em fluxo (FIA). Estes eletrodos apresentaram efeitos catalíticos sobre a oxidação de vários analitos, intensificando o sinal de corrente e deslocando seus picos de oxidação para a região de oxidação dos átomos de Ru(II) à Ru(III), sítios ativos das porfirinas. Contudo, para a obtenção de sensores estáveis, foi necessária a utilização de uma elevada concentração do contra-íon trifluorometanossulfonato em solução, prevenindo a gradual solubilização do filme modificador.

Tal dificuldade foi contornada recobrindo-se os eletrodos com filmes laminares contendo simultaneamente pares de porfirinas catiônicas e aniônicas. Estes sensores apresentaram ação catalítica igual aos eletrodos recobertos por uma única porfirina, uma vez que os sítios ativos continuaram sendo os átomos de rutênio. Esta nova geração de eletrodos modificados exibiu excelente desempenho tanto em análises de amostras sintéticas, quanto de amostras reais (sulfitos em vinhos e ácido ascórbico em sucos e medicamentos). Os sensores modificados com metaloporfirinas apresentaram excelente sensibilidade (limites de detecção entre 10^{-8} e 10^{-6} mol L^{-1}) e minimizaram os efeitos de envenenamento da superfície, além de serem de fácil preparo.

No presente trabalho também foram realizados estudos preliminares envolvendo eletrodos de pasta de carbono dopados com o óxido misto de $NdNiO_3$. Estes destacaram-se, principalmente, por antecipar a oxidação de peróxido de hidrogênio para 0,00 V em meio alcalino. Análises utilizando o sistema BIA (*Batch Injection Analysis*) possibilitaram a detecção de H_2O_2 em concentrações da ordem de 10^{-6} mol L^{-1}.

ABSTRACT

In this work modified electrodes were developed and proceedings for their utilization in the detection of a variety of species with analytical importance, such as sulfite, ascorbic acid, nitrite, dopamine, NADH and hydrogen peroxide were investigated.

During the studies, modified electrodes with films containing one porphyrin were developed and analytical applications with these sensors were done in association with flow injection analysis (FIA). These electrodes presented interesting catalytic properties for the oxidation of many species, increasing the current signal and changing the oxidation peaks of the analytes to the Ru(II)/(III) oxidation region. In these studies, it was necessary high concentrations of trifluormethanesulfonate in solution to avoid the gradual solubilization of the film from the electrode surface .

This difficulty was surpassed by developing of modified electrodes with laminar films containing simultaneously two porphyrins, one cationic and other anionic. This new geration of modified electrodes exhibited excellent performance for analysis of the synthetic samples as much as real samples (sulfites in wines and ascorbic acid in juices and medicaments). The metalloporphyrins modified electrodes presented very high sensitivity (detection limit between 10^{-8} and 10^{-6} mol L^{-1}), were able to minimize the poisoning effects of the sensor and are very easy to prepare.

In this work were also performed some preliminary studies involving carbon paste electrodes doped with $NdNiO_3$ oxide, which stand out specially due to anticipate the oxidation of hydrogen peroxide to 0.00 V in alkaline media. Analysis using batch injection analysis (BIA) makes possible the detection of H_2O_2 in the 10^{-6} mol L^{-1} level.

ÍNDICE

1 - Objetivos 1

2 - Introdução 2

2.1 - Eletrodos Modificados 3

2.2 - Porfirinas 8

2.3 - Considerações Sobre Voltametria Cíclica, FIA e BIA 14

3 - Parte Experimental 23

3.1 - Reagentes 23

3.2 - Voltametria Cíclica 23

3.3 - Sistema FIA 24

3.4 - Módulo de Difusão de Gás 25

3.5 - Sistema BIA 27

3.6 - Preparo dos Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados 28

3.7 - Preparo dos Eletrodos de Pasta de Carbono 29

3.8 - Determinação de Ácido Ascórbico em Sistema FIA Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ (Método Diferencial) 29

3.9 - Determinação de SO_2 em Sistema FIA Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 30

3.10 - Determinação de SO_2 Utilizando Titulação Iodométrica 31

4 - Resultados e Discussão 33

4.1-Considerações Sobre Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com

$[MTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{n+}$ 33

4.1.2 - Estabilidade de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 35

4.1.3 - Determinações de Sulfito e Nitrito Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 36

4.1.4 - Determinações de Dopamina, Ácido Ascórbico e NADH Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 42

4.1.5 - Considerações Sobre Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ e Acetato de Celulose ou Nafion® 51

4.2 - Considerações Sobre Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 53

4.2.1 - Estabilidade de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 54

4.2.2 - Prevenção de Envenenamento de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 56

4.2.3 - Determinações de Sulfito e Nitrito Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 59

4.2.4 - Determinações de Dopamina, Ácido Ascórbico e NADH Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 61

4.3 - Determinação de Ácido Ascórbico em Sucos e Medicamentos Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ 62

4.4 - Determinação de SO_2 em Amostras de Vinho Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 69

4.4.1 - Otimização das Variáveis FIA para a Determinação de SO_2 em Amostras de Vinho 70

4.4.2 - Determinação de SO_2 Livre e Total em Amostras de Vinho 75

4.5 - Estudos Preliminares Envolvendo Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ 80

4.6 - Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados com $NdNiO_3$ Associados a Sistema BIA 83

5 - Conclusões 87

5.1 - Considerações Sobre o Desenvolvimento de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados por Filmes Contendo uma Única Metaloporfirina e por Filmes de Porfirinas Íon Pareadas 87

5.2 - Considerações Sobre a Aplicação de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados por Filmes de Porfirinas Íon Pareadas na Análise de Amostras Reais 89

5.3 - Considerações Sobre a Aplicação de Eletrodos Pasta de Carbono Modificados com Óxidos Mistos de $NdNiO_3$ 91

6 - Perspectivas Futuras 92

7 - Referências Bibliográficas 94

8 - Anexos 110

8.1 - Curriculum Vitae 110

8.2 - Principais Publicações 114

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - Representação de uma Oxidação Mediada por Átomos de Ru^{2+} 3

Fig. 2 - Estrutura do Nafion® 4

Fig. 3 - Representação Esquemática do Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Filmes de Nafion®/Acetato de Celulose 5

Fig. 4 - Representação Esquemática do Preparo da Superfície do Eletrodo de Pt Modificado com Ferroceno via Silanização 6

Fig. 5 - Representação Esquemática do Preparo de Eletrodos Impressos 8

Fig. 6 - Estruturas do Anel Básico da Porfirina, Meso-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina, Meso-tetrakis(p-aminofenil)porfirina, Meso-tetrakis[2,2](p-ciclofenil)porfirina e Hemina 9

Fig. 7 - Estrutura de μ-{meso-tetra(piridil)porfirinato}tetrakis{bis(bipiridina)(cloro) rutênio} 12

Fig. 8 - Estrutura de μ-{meso-tetra(piridil)porfirinato}tetrakis{bis(clorofenantrolina) (cloro)rutênio} 13

Fig. 9 - Estrutura de Meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfirinato 14

Fig. 10 - Representação Esquemática de um Experimento de Voltametria Cíclica 15

Fig. 11 - Cálculo da Quantidade de Agente Modificador na Superfície do Eletrodo Obtido a Partir de um Voltamograma Cíclico 16

Fig. 12 - Princípio Básico de um Sistema FIA 17

Fig. 13 - Representação Esquemática do Coeficiente de Dispersão (D) de um Sistema FIA 18

Fig. 14 - Geometria dos Reatores de Mistura mais Freqüentemente Utilizados em Sistemas FIA 19

Fig. 15 - Efeito de Reatores de Mistura Sobre a Dispersão da Amostra em Sistema FIA..... 20

Fig. 16 – Etapas na Operação BIA..... 22

Fig. 17 – Representação Esquemática da Célula Voltamétrica..... 24

Fig. 18 – Representação Esquemática de Sistema FIA..... 24

Fig. 19 – Representação Esquemática do Detector Amperométrico Acoplado ao Sistema FIA..... 25

Fig. 20 – Sistema FIA Acoplado ao Módulo de Difusão e Bobina de Mistura Utilizado para Análises de SO_2..... 26

Fig. 21 – Módulo de Difusão de Gás Associado a Sistema FIA..... 26

Fig. 22 – Representação Esquemática do Sistema BIA..... 27

Fig. 23 - Voltamograma Cíclico de Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$..... 33

Fig. 24 – Análise por Injeção em Fluxo de Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ para Injeções Consecutivas de Nitrito 1 x 10^{-5} mol L^{-1} (Estudo de Estabilidade)..... 35

Fig. 25 - Voltamogramas Cíclicos de Solução de Sulfito 3 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo não Modificado e com Concentrações Variando de 0,5 a 3,4 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando o Eletrodo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$.... 36

Fig. 26 – Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Sulfito com Concentrações de 2 x 10^{-6} a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$..... 37

Fig. 27 - Voltamogramas Cíclicos de Solução de Nitrito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo não Modificado e de Soluções com Concentrações Variando entre 0,1 e 0,9 x 10^{-3} mol L^{-1} Usando o Eletrodo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$..... 38

Fig. 28 – Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Nitrito com Concentrações entre 2 e 8 x 10^{-7} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 39

Fig. 29 - Representação Esquemática de Mecanismos de Transferência de Elétrons via Esfera Externa e Interna 41

Fig. 30 – Voltamogramas Cíclicos de Soluções de Dopamina com Concentrações Crescentes de Dopamina de 0,5 a 1,7 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo não Modificado e com Concentrações Variando de 0,2 a 1,9 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando o Eletrodo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 43

Fig. 31 – Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Dopamina com Concentrações de 2 a 8 x 10^{-7} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 44

Fig. 32 – Voltamogramas Cíclicos de Soluções de Ácido Ascórbico com Concentrações Crescentes de 0,5 a 2,1 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Não Modificado e com Concentrações Variando de 0,5 a 5,7 x 10^{-4} mol L^{-1} Utilizando o Eletrodo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 45

Fig. 33 – Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Ácido Ascórbico de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 46

Fig. 34 – Voltamogramas Cíclicos de Soluções de NADH com Concentrações de 0,5 a 2,1 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Não Modificado e com Concentrações Variando de 0,5 a 3,3 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando o Eletrodo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 48

Fig. 35 – Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de NADH de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ 49

Fig. 36 – Voltamogramas Cíclicos de Soluções de Nitrito com Concentrações de 0,2 a 1,2 x 10^{-3} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/Acetato de Celulose e $[NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/Nafion®.. 52

Fig. 37 – Formação do Filme Laminar de $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/$[ZnTPPS]^{4-}$ Acompanhado Espectrofotometricamente em Função do Número de "Bicamadas", Sobre Superfície de ITO..... 53

Fig. 38 – Registros dos 1º, 10º, 20º, 30º, 40º e 50º Voltamogramas Cíclicos de Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado por $CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/$[ZnTPPS]^{4-}$ (Estudo de Estabilidade)..... 55

Fig. 39 – Análise por Injeção em Fluxo de Solução de Nitrito 1 x 10^{-5} mol L^{-1} Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/$[ZnTPPS]^{4-}$ e Voltamogramas Cíclicos do Mesmo Eletrodo em Presença do Eletrólito Suporte Antes e Após 1 Hora da Análise FIA (Estudo de Estabilidade)..... 55

Fig. 40 – Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Fenol 1 x 10^{-5} e 1 x 10^{-4} mol L^{-1} Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/ $[ZnTPPS]^{4-}$ e Não Modificado (Estudo de Prevenção de Envenenamento)..... 57

Fig. 41 - Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Sulfito com Concentrações de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} e de Soluções de Nitrito Variando de 2 a 8 x 10^{-7} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/$[ZnTPPS]^{4-}$.... 60

Fig. 42 - Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Ácido Ascórbico com Concentrações de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}, de Dopamina de 2 a 8 x 10^{-7} mol L^{-1} e de NADH Variando de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ /$[ZnTPPS]^{4-}$..... 61

Fig.43 - Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de Ácido Ascórbico com Concentrações Variando de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}$/$[FeTPPS]^{4-}$ e Voltamogramas Cíclicos do Mesmo Eletrodo em Tampão HAc/Ac^- pH = 4,7 (0,1 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,2 mol L^{-1}

e em Ácido Ascórbico 1 x 10^{-3} mol L^{-1} 63

Fig. 44 - Análise por Injeção em Fluxo de Ácido Ascórbico em Amostra de Aspirina^{+}C Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ Aplicando Tratamento na Amostra com Pedaços de Pepino e Ascorbato Oxidase Comercial 65

Fig. 45 - Análise por Injeção em Fluxo de Ácido Ascórbico em Amostra de Cebion Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ Aplicando Tratamento na Amostra com Pedaços de Pepino e Ascorbato Oxidase Comercial 66

Fig. 46 - Análise por Injeção em Fluxo de Ácido Ascórbico em Amostra de Suco de Laranja Parmalat Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ Aplicando Tratamento na Amostra com Pedaços de Pepino e Ascorbato Oxidase Comercial 67

Fig. 47 - Análise por Injeção em Fluxo Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$. Injeções Consecutivas de Solução de Sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} em Diferentes Concentrações de H_2SO_4 e Utilizando Diferentes Volumes de Amostra 71

Fig. 48 - Análise por Injeção em Fluxo Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$. Injeções de Solução de Sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} Empregando Diferentes Comprimentos de Bobina e Vazões..... 71

Fig. 49 - Análise por Injeção em Fluxo de SO_2 Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ Aplicando Método de Adição de Padrão em Amostra de Vinho Branco Forestier 73

Fig. 50 - Diagrama de Distribuição de Espécies para Sulfito em Função do pH..... 74

Fig. 51 - Análise por Injeção em Fluxo Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ Comparando Injeções

Consecutivas de Soluções de Bissulfito de Sódio 1 x 10^{-3} mol L^{-1} com as de Sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} 74

Fig. 52 - Análise por Injeção em Fluxo de Amostra de Vinho Tinto Caseiro Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ 75

Fig. 53 - Análise por Injeção em Fluxo de SO_2 Livre e Total em Vinho Branco Seco Forestier Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ e Módulo de Difusão de Gases 76

Fig. 54 - Análise por Injeção em Fluxo de SO_2 Livre e Total em Vinho Branco Suave Château Duvalier Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ e Módulo de Difusão de Gases 77

Fig. 55 - Análise por Injeção em Fluxo de SO_2 Livre e Total em Amostra de Vinho Tinto Seco Château Duvalier Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ e Módulo de Difusão de Gases 78

Fig. 56 – Análise por Injeção em Fluxo de Soluções de NADH de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ e Voltamograma Cíclico do Mesmo Eletrodo em Eletrólito Suporte e em Presença NADH 1 x 10^{-3} mol L^{-1} 81

Fig. 57 - Voltamogramas Cíclicos de Eletrodos de Carbono Vítreo Não Modificado e Modificado com $FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ em Tampão HAc/Ac^- pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} e em Presença de Norefedrina 2 x 10^{-3} mol L^{-1} 82

Fig. 58 - Voltamogramas Cíclicos de Eletrodos de Carbono Vítreo não Modificado e Modificado com $FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ em Tampão HAc/Ac^- pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} e em Presença de Solução de Hidrazina 2 x 10^{-3} mol L^{-1} 82

Fig. 59 - Voltamogramas Cíclicos de Eletrodos de Carbono Vítreo não Modificado e Modificado com $FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ em Tampão HAc/Ac^-

pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} e em Presença de Peróxido de Cálcio 2 x 10^{-3} mol L^{-1} 83

Fig. 60 – Voltamogramas Cíclicos de Eletrodos de Pasta de Carbono Não Modificado e Modificado com 10 % de $NdNiO_3$ em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13) e em Presença de Hidrazina 8,33 x 10^{-3} mol L^{-1} 84

Fig. 61 – Voltamogramas Cíclicos de Eletrodos de Pasta de Carbono Não Modificado e Modificado com 10 % de $NdNiO_3$ em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13) e em Presença de H_2O_2 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} 85

Fig. 62 – Curva Analítica de Eletrodo de Pasta de Carbono Modificado com 10 % de $NdNiO_3$ Utilizando Sistema BIA com Injeções de Soluções de H_2O_2 com Concentrações Variando de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} 86

ÍNDICE DE TABELAS

Tab. 1- Potenciais de Oxidação para Determinação de Sulfito e Nitrito Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo não Modificado e Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ e Faixas de Concentração Mínimas Exploradas, nas Quais Foram Obtidas Respostas Lineares (com o Eletrodo Modificado)..... 40

Tab. 2- Potenciais de Oxidação dos Analitos Investigados Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo não Modificado e Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ e Faixas de Concentração Mínimas Exploradas, nas Quais Foram Obtidas Respostas Lineares (com o eEletrodo Modificado)..... 50

Tabela 3 - Teor de Ácido Ascórbico Encontrado em Amostras de Cebion, Aspirina^{+}C e Suco de Laranja Parmalat em Análises FIA Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$..... 68

Tab. 4 - Teores de SO_2 Livre e Total Obtidos em Amostras de Vinhos Comerciais pelo Método FIA Proposto e por Titulação Iodométrica..... 79

Tab. 5 - Resumo dos Resultados Obtidos com Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados por Filmes Contendo uma Única Porfirina Tetrarrutenada e por Filmes Contendo as "Bicamadas" de Porfirinas..... 87

Tab. 6- Resumo dos Resultados Obtidos com Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com Metaloporfirinas Utilizados na Análise de Medicamentos, Sucos e Vinhos..... 89

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES

$MTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{n+}$	μ-{mesotetra(piridil)porfirinato}tetrakis{bis(bipiridina)(cloro)rutênio}.
$[MTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{n+}$	μ-{meso-tetra(piridil)porfirinato}tetrakis{bis(clorofenantrolina)(cloro)rutênio}.
$[MTPPS]^{n-}$	Meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfirinato.
NaTFMS	Trifluorometanossulfonato de Sódio.
BIA	Análise por Injeção "em Banho" (*Batch Injection Analysis*)
FIA	Análise por Injeção em Fluxo (*Flow Injection Analysis*)
Γ	Quantidade de Agente Modificador que Recobre a Superfície do Eletrodo.
D	Coeficiente de Dispersão.
ITO	Óxido de Índio e Estanho (*Indium Tin Oxide*)
$NdNiO_3$	Óxido Misto de Neodímio e Níquel.
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo - Forma Reduzida.
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos (*Association of Official Analytical Chemists*).
ϕ	Diâmetro Interno.
STM	Microscopia de Varredura por Tunelamento (*Scanning Tunneling Microscopy*).
AFM	Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy*)
DMF	Dimetilformamida.

PVP..... Polivinilpiridina.

PVC..... Cloreto de Polivinila.

i_{pa}..... Corrente de Pico Anódica

i_{pc}..... Corrente de Pico Catódica

E_{pa}..... Potencial de Pico Anódico.

E_{pc}..... Potencial de Pico Catódico.

E_{ox}..... Potencial de Oxidação.

ΔE..... Variação do Potencial de Oxidação Antes e Após a Modificação do Eletrodo.

A.A..... Ácido Ascórbico.

Q..... Quantidade de Carga Elétrica.

F..... Constante de Faraday.

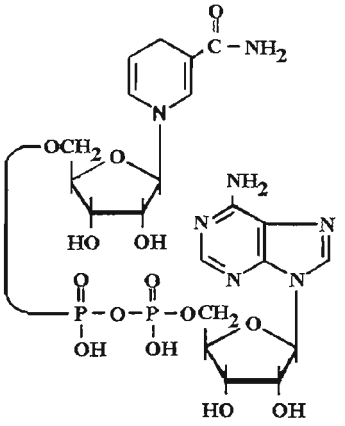
DPR..... Desvio Padrão Relativo.

A..... Área do Eletrodo.

Ac^-/HAc..... Tampão Acetato/Ácido Acético.

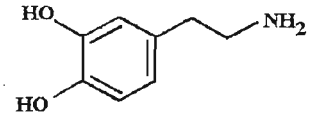
n..... Número de Elétrons.

RELAÇÃO DOS ANALITOS ESTUDADOS

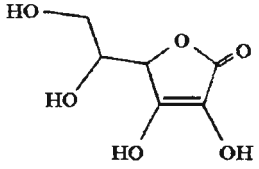


NADH

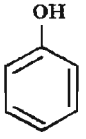
(Nicotinamida-adenina-dinucleótide - forma reduzida)



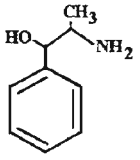
Dopamina



Ácido Ascórbico



Fenol



Norefedrina

NO_2^- **Nitrito**

SO_3^{2-} **Sulfito**

H_2O_2 **Peróxido de Hidrogênio**

N_2H_4 **Hidrazina**

CaO_2 **Peróxido de Cálcio**

1 - Objetivos

Esta tese tem por objetivo relatar e discutir o desenvolvimento de eletrodos modificados e de metodologias analíticas associadas aos mesmos.

Pretende-se demonstrar a aplicabilidade de eletrodos de carbono vítreo modificados com metaloporfirinas na análise por injeção em fluxo (FIA) de amostras sintéticas e reais, bem como evidenciar a potencialidade de eletrodos de pasta de carbono dopados com o óxido misto de $NdNiO_3$ na elaboração de sensores utilizados em análises por injeção em banho (BIA).

Com o desenvolvimento destes eletrodos modificados deseja-se obter sensores que apresentem elevada estabilidade, principalmente no que se refere às determinações em sistemas em fluxo e, adicionalmente, que possuam a propriedade de previnir o envenenamento da sua superfície durante as análises. Com as modificações espera-se propiciar a catálise, facilitando-se o processo de oxidação de espécies de interesse biológico ou ambiental tais como o sulfito, o nitrito, o NADH, o ácido ascórbico, o peróxido de hidrogênio e a hidrazina, entre outras.

Deseja-se, ainda, avaliar as características dos eletrodos modificados utilizando voltametria cíclica e realizar as determinações em amostras sintéticas e reais com auxílio de sistemas de análise FIA ou BIA.

2 – Introdução

Dentre os múltiplos métodos de análises, os eletroanalíticos destacam-se pela ampla faixa de concentração que permitem analisar e pela elevada sensibilidade proporcionada. As principais limitações são a baixa seletividade e as interferências de espécies que têm afinidade pela superfície do eletrodo (promovendo o bloqueio do sinal analítico ou o aparecimento de sinais indesejados).

Historicamente, as primeiras aplicações eletroanalíticas foram feitas com eletrodos gotejantes de mercúrio que, por terem sua superfície renovada rapidamente, eram considerados ideais. Entretanto, suas características permitiam que praticamente só se trabalhasse na região catódica, onde o processo de oxidação da maioria das espécies orgânicas não ocorre. Já na década de 50, pesquisadores passaram a explorar a utilização de eletrodos sólidos, dentre os quais os de grafite, ouro, platina e, a seguir, os de carbono vítreo. Tais eletrodos possibilitaram que se trabalhasse em uma faixa anódica mais ampla.

Paralelamente, a instrumentação e o desenvolvimento de novos métodos eletroanalíticos ampliaram os limites de detecção de forma significativa. Já os sensores passaram a ser modificados, o que proporcionou a catálise de reações eletroquímicas, bem como a obtenção de seletividade.

Para a modificação de eletrodos as possibilidades são praticamente infinitas. Atualmente fazem parte deste "arsenal" de tecnologias, a utilização de filmes poliméricos, metais eletrodepositados, óxidos, porfirinas, espécies orgânicas adsorvidas, DNA, enzimas, anticorpos e uma variedade de outras espécies.

O desenvolvimento no campo de eletrodos modificados tem sido bastante expressivo e nos próximos anos deverá ter continuidade. Ao longo desta tese desenvolveu-se uma série de estudos utilizando porfirinas supramoleculares tetrarrutenadas, cujas características de catálise em reações de oxidação de espécies redutoras são altamente promissoras. Foram realizados, ainda, estudos preliminares envolvendo eletrodos de pasta de carbono dopados com o óxido misto de $NdNiO_3$, que apresentaram efeito catalítico favorável para a oxidação de espécies pequenas como a hidrazina e, mais acentuadamente, o peróxido de hidrogênio.

2.1 – Eletrodos Modificados

A alteração intencional das características da superfície de um eletrodo, pela imobilização de um agente adequado, faz com que este sensor ofereça maiores recursos para análises eletroanalíticas. A habilidade de manipular as propriedades dos eletrodos pode levar a uma variedade de efeitos atrativos dentre os quais a eletrocatálise, a prevenção de envenenamento da superfície, a seletividade e a pré-concentração [1-3].

Numerosos compostos, como o sulfito [4], possuem cinética de reação lenta sobre a superfície dos eletrodos comumente utilizados (platina e carbono) fazendo com que a oxidação ou redução ocorra em potencial muito elevado e, muitas vezes, promovendo um sinal de corrente pouco intenso. Existem também espécies ou produtos de reação que adsorvem fortemente sobre a superfície de alguns eletrodos sólidos, levando à passivação da superfície, como relatado para o NADH [5-8] e o fenol [9], entre outros.

A imobilização de mediadores catalíticos sobre a superfície do eletrodo (como ilustrado na Figura 1) pode facilitar a transferência de elétrons favorecendo o processo redox, fazendo com que o potencial de oxidação ou redução seja deslocado para valores menos extremos e promovendo um aumento no sinal amperométrico [10]. Um acréscimo na corrente também pode ocorrer em função da regeneração de uma espécie envolvida no processo [11], ou mesmo, por um aumento da área superficial após a modificação [12].

$$Ru^{+2} \rightleftharpoons Ru^{+3} + e$$

$$Analito_{red} + Ru^{+3} \rightarrow Analito_{ox} + Ru^{+2}$$

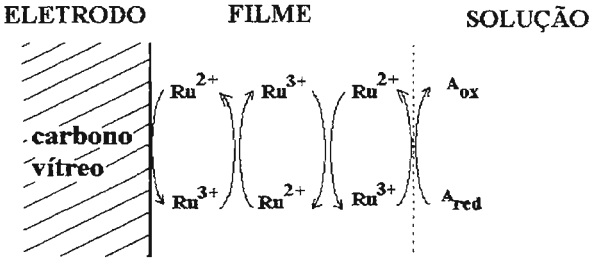


Fig. 1 - Representação de uma oxidação mediada por átomos de Ru^{2+}. Ao aplicar-se potencial suficiente sobre o eletrodo de trabalho provoca-se oxidação da população de Ru^{2+} adjacente à superfície do eletrodo, desencadeando a condução eletrônica ao longo do filme e promovendo a oxidação do analito.

Eletrodos modificados associando a imobilização de camadas contendo enzimas, anticorpos e filmes com mediadores redox também têm recebido crescente atenção, por combinarem a especificidade dos componentes biológicos com as vantagens da catálise [13-17]. Adicionalmente, pela alteração adequada do senso, pode-se obter a minimização ou eliminação do envenenamento da superfície do eletrodo.

Outro caminho que busca-se ao modificar eletrodos é o aumento de seletividade, principalmente quando refere-se à análise de amostras reais que, em geral, são matrizes bastante complexas. Existem filmes poliméricos que conferem ao eletrodo propriedades discriminativas baseadas, por exemplo, no tamanho (acetato de celulose) [18] ou carga (Nafion®) [19] do analito.

O Nafion®, cuja estrutura está ilustrada na Figura 2, consiste de cadeias compostas por carbono-fluor juntamente com sítios aniônicos contendo grupos sulfônicos que têm tendência a repelir espécies aniônicas e oferece grande afinidade por cátions.

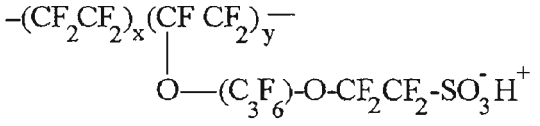


Fig. 2 – Estrutura do Nafion®

Já o acetato de celulose forma um filme cuja porosidade permite a passagem de espécies com baixa massa molecular, atuando como barreira para as demais. Estudos mostram que os poros do filme de acetato de celulose podem ser dilatados através de hidrólise em meio alcalino [20], sendo que graus variados de permeabilidades são obtidos pelo uso de diferentes tempos de hidrólise.

Os eletrodos também podem ser modificados pela associação de filmes com diferentes propriedades [21], como apresentado na Figura 3. Neste caso, a camada externa de acetato de celulose permite que apenas a dopamina (espécie de interesse) difunda para o filme de Nafion®. Desta forma, espécies maiores como a epinefrina e a norepinefrina (neurotransmissores interferentes que não são repelidos pelo Nafion®), são excluídas.

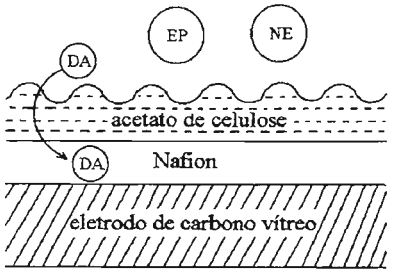


Fig. 3 - Representação esquemática do eletrodo de carbono vítreo modificado com uma "bicamada" de Nafion/acetato de celulose. DA = dopamina, NE = norepinefrina e EP = epinefrina [18].

A utilização de sensores modificados possibilita, ainda, a pré-concentração de espécies de interesse na superfície do eletrodo de forma a aumentar a sensibilidade da análise. O analito é "extraído" da solução diluída e acumulado na superfície do eletrodo, via processo de adsorção [22]. Posteriormente é oxidado ou reduzido, obtendo-se o sinal referente a este fenômeno. Os principais requisitos para realizar esta rota de análise é que o processo de pré-concentração seja seletivo para o analito de interesse e que a superfície seja facilmente renovável. Estudos mostram ser possível remover o níquel central de filmes poliméricos de tetrakis(3-metoxi-4-hidroxifenil)porfirina em solução de HCl 0,1 mol L^{-1}, fazendo-os apresentarem forte afinidade por Ni(II). Os eletrodos assim modificados são colocados na solução a ser analisada para pré-concentrar o íon metálico que, a seguir, é quantificado em solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} acompanhando-se a corrente de oxidação do Ni(II) a Ni(III) [23,24].

A inclusão de agentes modificadores nos eletrodos pode ser realizada diretamente na matriz do eletrodo ou sobre sua superfície [25]. Uma das formas mais comuns de construir eletrodos modificados é a utilização de pasta de carbono [26-28], na qual o modificador é adicionado a uma mistura de grafite e um óleo mineral inerte como o Nujol. A pasta é acomodada na cavidade interna de um tubo (vidro, Teflon® ou PVC, com diâmetro típico de 1 a 3 mm) e o contato pode ser feito com um fio metálico. É desejável que o modificador seja pouco solúvel no eletrólito utilizado. Estes eletrodos são de baixo custo e de preparo simples, além de sua superfície ser facilmente renovável.

Uma dificuldade deste tipo de eletrodo é a "lavagem" (lixiviação) do agente modificador da superfície do eletrodo. É possível minimizar este efeito utilizando recursos como o recobrimento da superfície com filmes poliméricos como o Nafion® [29] que também confere características de pré-concentração e/ou seletivas ao eletrodo. Estudos em

fluxo de biossensores utilizados na determinação de catecol, em cuja a matriz adicionou-se DNA para preservação da atividade da enzima (tirosinase), relatam que os sensores recobertos com membrana de hemodiálise (Cuprofan®) apresentam uma boa estabilidade [30].

Outra maneira de incorporação é através da imobilização do modificador sobre a superfície do eletrodo [31]. Um caminho bastante utilizado é a adsorção física. O procedimento é bastante simples e consiste em dissolver um modificador em um solvente volátil e, logo após, transferir determinada quantidade desta solução para a superfície do eletrodo, onde ocorrerá a evaporação do solvente. Neste caso, também é imprescindível que o modificador seja insolúvel no eletrólito. A espécie imobilizada permanece sobre o eletrodo por dois efeitos: forte afinidade pela superfície do eletrodo, geralmente de carbono ou platina, e a insolubilidade do modificador no eletrólito suporte. Este procedimento foi utilizado para imobilização, sobre a superfície de carbono vítreo, de metaloporfirinas contendo quatro grupamentos $[Ru(bipy)_2Cl_2]$ [4,5], em que bipy é bipiridina, ou filmes de polivinilpiridina (PVP) impregnados com mediadores redox como $[Os(bipy)_2Cl_2]$ [32] sobre carbono vítreo ou eletrodos de fibra de carbono [33].

Outro procedimento de modificação da superfície do eletrodo é através de ligações covalentes com grupos funcionais que atuam como "âncoras". Estes ataques, em geral, são realizados sobre superfícies de carbono, platina e óxidos metálicos como SnO_2. O eletrodo de platina, quando oxidado, forma uma camada de óxido com grupos terminais hidroxila na interfase eletrodo-solução. Esta superfície pode ser silanizada fazendo ligações metal-oxigênio-silício (Fig.4), que posteriormente imobilizarão determinada espécie de interesse como, por exemplo, um derivado do ferrocianeto [34].

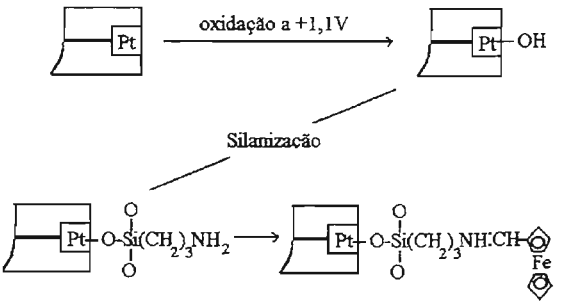


Fig. 4 – Representação esquemática do preparo da superfície do eletrodo de Pt modificado com ferroceno via silanização [34].

O carbono pode ser oxidado produzindo alta densidade de grupamentos carboxílicos, que são úteis na imobilização de espécies eletroativas como as aminas através de ligações com cloreto de tionila [35]. Este tipo de imobilização leva a eletrodos mais estáveis do que os métodos anteriores.

Outra estratégia é a eletropolimerização, que requer uma instrumentação simples, capaz de aplicar um potencial ou corrente constante. Em geral, um monômero solúvel é oxidado ou reduzido até formar um polímero insolúvel sobre a superfície do eletrodo e a espessura do filme é controlada pelo tempo de deposição. Vários tipos de polímeros podem ser imobilizados por este método [36-39]; o próprio polímero pode ser eletroativo ou espécies eletroativas podem ser incorporadas ao polímero [40]. Polimerização química, foto ou plasma-induzidas também tem sido utilizadas [31,41]. De maneira análoga a eletropolimerização, soluções contendo íons metálicos podem ser utilizadas para a deposição de metais ou óxidos metálicos sobre a superfície do eletrodo, empregando-se potencial e meio adequados à deposição [42-44].

Uma outra categoria de materiais bastante úteis na construção de eletrodos modificados são as zeólitas e argilas, que possuem estruturas tridimensionais bem definidas contendo poros e canais, os quais podem ser impregnados por exemplo, por mediadores redox. Eletrodos modificados por zeólitas podem proporcionar determinações seletivas ou ainda a pré-concentração de espécies em quantidades em nível de traços [3].

Um procedimento mais recente é a confecção de eletrodos impressos quimicamente modificados [45-48]. O processo consiste em forçar uma emulsão contendo material condutor (geralmente denominado de tinta) a passar por uma tela para ser depositada sobre um substrato plano e inerte. A tela funciona como um molde, cujos espaços livres dão formato aos eletrodos (Fig. 5).

A composição das tintas consiste basicamente de um material inerte de condutividade elevada (como o grafite), um aglutinante como o acetato de celulose e um sistema de solventes como ciclohexanona-acetona. Existem tintas comerciais que são utilizadas na confecção de circuitos impressos, cujos principais componentes são vidros ligantes (como borossilicatos), solventes, etilcelulose e aditivos, dependendo da aplicação desejada. Também são disponíveis tintas a base de carbono (usadas na produção de resistores) e tintas de elevada condutividade contendo pó de metais como Pd, Au e Pt

(usadas em contatos elétricos) [49].

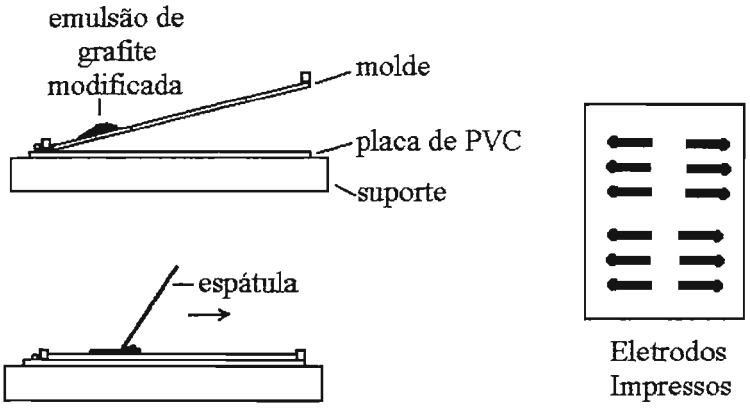


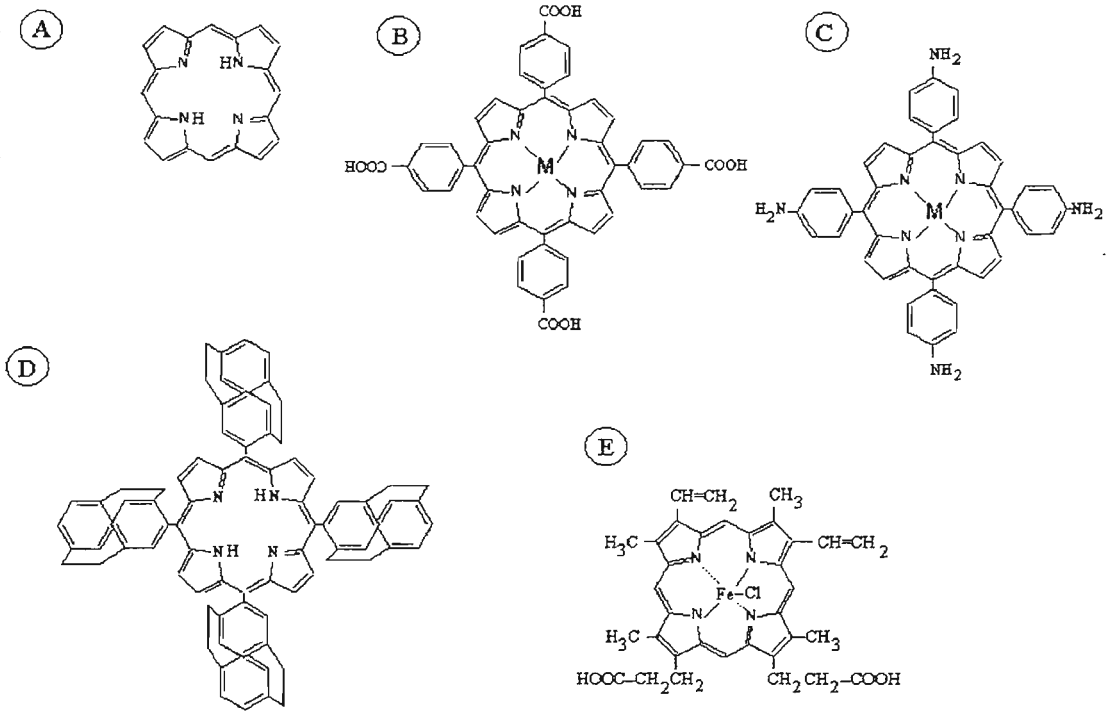
Fig. 5 – Representação esquemática do preparo de eletrodos impressos.

Dentre os diversos agentes modificantes disponíveis, as metaloporfirinas têm se destacado, principalmente por sua ação catalítica. No presente trabalho, a investigação da atividade catalítica de filmes de metaloporfirinas tetrarrutenadas na oxidação de vários analitos se constituiu em tema principal. Na próxima seção serão abordados alguns aspectos e aplicações eletroanalíticas de sensores modificados por porfirinas.

2.2 – Porfirinas

As metaloporfirinas constituem uma classe importante de moléculas. Elas são sítios ativos de numerosas proteínas cujas funções abrangem transporte e estocagem de oxigênio (hemoglobina, mioglobina), transporte de elétrons (citocromo c, citocromo oxidase) e conversão de energia (clorofila). Também são de relevância em avaliações geoquímicas, em que a partir da identificação de metaloporfirinas em petróleos e xistos, foi iniciado todo um ramo da ciência conhecido como Geoquímica Orgânica [50]. Adicionalmente, as porfirinas têm se destacado por serem eficientes sensibilizadores e catalisadores em numerosos sistemas químicos e fotoquímicos [51]. Por estas razões a síntese, a caracterização e os estudos sobre as propriedades destas macromoléculas são de grande interesse [52-62].

Metaloporfirinas são moléculas coloridas com forte absorção na região do visível devido ao cromóforo cíclico conjugado de tetrapirrol. A figura a seguir apresenta as estruturas de um anel porfirínico básico (A) e de sistemas derivados deste (B-E).



M = Co, Cu, Zn, etc

Fig. 6 – Estruturas do anel básico da porfirina (A), meso-tetrakis(4-carboxifenil)porfirina (B), meso-tetrakis(p-aminofenil)porfirina (C), meso-tetrakis[2,2](p-ciclofenil)porfirina (D) e Hemina (E).

As várias aplicações de eletrodos modificados por metaloporfirinas em eletrocatálise têm levado estes compostos a utilizações promissoras em sensores eletroquímicos. A incorporação de metaloporfirinas em membranas de cloreto de polivinila (PVC) têm sido empregada na construção de eletrodos de membrana seletivos a ânions de importância analítica como o nitrito e tiocianato ou ânions constituintes de fármacos de ação terapêutica como salicilato e hidroxibenzohidroximato [63-66].

Algumas investigações discutem os efeitos de ferro meso-tetrakis(4-sulfonatofenil) porfirina, manganês tetrakis(N-metil-4-piridil)porfirina [67] e cobalto tetrakis(N-metil-2-piridil)porfirina [68], (todas solúveis em água) na oxidação eletrocatalítica da forma

reduzida da glutationa (necessária para manter o ferro da hemoglobina no seu estado reduzido, mantendo a estrutura das células vermelhas do sangue) e de L-cisteína. O estudo de reações envolvendo a cisteína recebe atenção crescente em função do importante papel fisiológico que esta espécie desempenha na vida das células [67].

Outra abordagem consiste na incorporação eletroquímica de porfirinas aniônicas dopando uma matriz condutora, como o polipirrol [69-73], para a modificação de eletrodos aplicados em várias reações. Dentre estas destaca-se a redução catalítica de oxigênio molecular [69], reação de importância tecnológica para o desenvolvimento de células combustíveis. O rendimento máximo nestas células ocorre quando a molécula de oxigênio sofre redução tetraeletrônica a água, sem formação de intermediários; daí a relevância de se encontrar catalisadores adequados.

Outros estudos sobre a redução de oxigênio também investigam os efeitos catalíticos de hemina [74], meso-tetrakis[2,2]-p-ciclofenil-metaloporfirina [75], metalo-tetrafenilporfirinas e metalo-tetraminofenilporfirinas [76-80] ferro tetra(aminofenil) porfirina e ferro (hidroxietil)(piridil)porfirina [81], imobilizadas sobre a superfície do eletrodo por adsorção (física ou química), sublimação sob pressão, polimerização, amidização ou esterificação.

Utilizando como rota para a imobilização de porfirinas a sua incorporação em polímeros condutores, tiofeno foi funcionalizado com resíduos destas macromoléculas para a detecção de Ni (II), a partir da habilidade de complexação do eletrodo assim modificado [82].

Devido a propensão de anilina, pirrol e fenol a formarem filmes poliméricos eletroativos, um outro caminho de interesse é a utilização de amino-, pirrol- e hidroxi-porfirinas eletropolimerizadas sobre a superfície de eletrodos [70]. Desta forma, sensores modificados por cobalto tetrafenilporfirinas contendo um grupamento pirrol substituído foram utilizados na catálise da redução de ácido tricloroacético [83], visando um controle da poluição ambiental, uma vez que alguns pesticidas são derivados deste composto. Níquel tetrakis(3-metoxi-4-hidroxifenil)porfirina [84] e cobalto tetakis(o-aminofenil)porfirina [85] foram polimerizadas sobre carbono vítreo para construção de sensores sensíveis a óxido nítrico (importante por estar envolvido em alguns processos fisiológicos) e seletivo a ânions (com limite de detecção sub-micromolar e boa seletividade), respectivamente.

Em estudos explorando a versatilidade que os compostos porfirínicos oferecem quanto ao modo de recobrimento do sensor por polimerização, três diferentes ferro porfirinas foram imobilizadas por este método utilizando rotas distintas [86]. Estas rotas se constituem em: eletrodos modificados por polimerização de ferro porfirina contendo grupamento vinil, por ferro porfirina catiônica fixada em um filme pré-eletropolimerizado de polipirrol e por uma ferro porfirina aniônica incorporada em um filme de polipirrol durante a sua eletropolimerização. Tais sensores foram utilizados para a detecção de nitrito e óxido nítrico.

Eletrodos de grafite pirolítico modificados com cobalto protoporfirina [87] apresentaram elevada atividade catalítica na oxidação de H_2O_2, enquanto que ferro octaetilporfirina contendo grupamento pirrol ligado ao ferro central (filme adsorvido sobre carbono vítreo) apresentou efeito catalítico na redução de H_2O_2 [88]. O monitoramento de peróxido de hidrogênio é bastante relevante, uma vez que é utilizado para a esterilização de equipamentos industriais ou mesmo como bactericida em alguns produtos farmacêuticos, entre outras aplicações.

Um dos fatores atraentes na utilização de eletrodos na detecção de neurotransmissores como a dopamina e epinefrina é a possibilidade de construção de sensores extremamente pequenos e com rápido tempo de resposta, cuja implantação em organismos vivos levem ao monitoramento de neurotransmissores em tempo real [89]. Entretanto, a maior dificuldade deste procedimento é a presença, em sistemas vivos, de elevados níveis de ácido ascórbico e ácido úrico, que sofrem oxidação em potenciais próximos aos dos neurotransmissores. Eletrodos de grafite recobertos com protoporfirinas não metaladas ou possuindo zinco ou ferro, minimizaram a interferência do ácido ascórbico durante a determinação de dopamina, sem comprometer o tempo de resposta do sensor [90].

A literatura relata que cobalto-tetrafenilporfirina (bem como algumas moléculas que não apresentam voltamogramas cíclicos bem definidos quando adsorvidas sobre grafite), podem apresentar uma melhora significativa nos respectivos sinais de resposta, quando dissolvidas da superfície do eletrodo para uma fina camada de solvente orgânico imiscível, que é disposto entre o eletrólito suporte aquoso e a superfície do eletrodo [91]. Estas finas camadas de solventes orgânicos também podem ser utilizadas para concentrar analitos por

extração de soluções aquosas diluídas, levando a uma maior sensibilidade em aplicações eletroanalíticas.

A interação de porfirinas e metaloporfirinas solúveis em água com DNA tem recebido considerável atenção, pois os modos de interação entre estas espécies podem ser utilizados como modelos para as ligações de DNA com agentes antineoplásicos. Estudos apresentam o comportamento eletroquímico de algumas metaloporfirinas interagindo com DNA [92, 93]. Porfirinas aniônicas possuem dificuldade para interagir com o DNA devido a repulsão eletrostática entre os grupamentos substituintes aniônicos e o grupo fosfato da cadeia molecular do DNA. A capacidade de porfirinas catiônicas de reagir, depende do tamanho do grupamento substituinte e do íon metálico situado no plano central da porfirina.

No presente trabalho, investigou-se a atividade catalítica de eletrodos de carbono vítreo recobertos por filmes de metaloporfirinas tetrarrutenadas na oxidação de diversos compostos. Estas porfirinas consistem em macromoléculas obtidas pela coordenação de quatro grupos $[Ru(bipy)_2Cl]^+$ (bipy= 2,2′-bipiridina) com resíduos piridina de meso-[5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirinato]M, em que M = Ni^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, Co^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{3+} ou $2H^+$ (sem o íon metálico coordenado), como ilustrado na Figura 7. Estes compostos tiveram a síntese, caracterização, estudos de propriedades eletroquímicas e fotoquímicas realizados previamente pelo grupo dos professores Henrique E. Toma e Koiti Araki [53, 55, 94, 95].

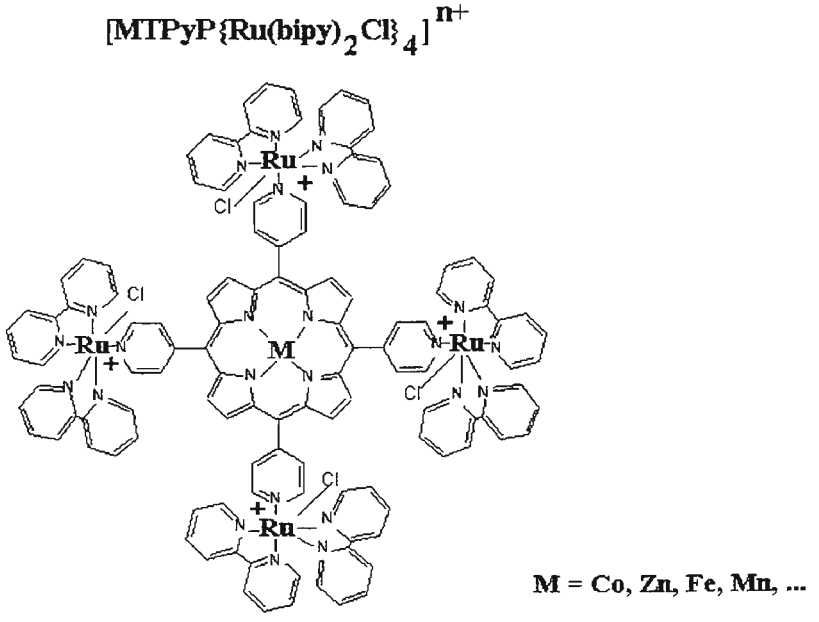


Fig. 7 – Estrutura de μ-{meso-tetra(piridil)porfirinato}tetrakis{bis(bipiridina)(cloro)rutênio}

Estas moléculas são solúveis em solventes orgânicos como metanol, dimetilformamida (DMF) e acetonitrila e pouco solúveis em meio aquoso. A solubilização em meio aquoso é praticamente eliminada pela adição de trifluorometanossulfonato de sódio (NaTFMS) [4,5]. O $TFMS^-$ é utilizado para precipitar as porfirinas em sua síntese e, quando em solução, minimiza a solubilização do filme que recobre a superfície do eletrodo.

O uso de "bicamadas" [96,97] imobilizadas sobre a superfície do eletrodo permite a associação de diversos agentes modificadores, proporcionando características interessantes ao sensor. A partir de estudos prévios [98], aperfeiçoou-se a modificação dos eletrodos pelo uso de filmes laminares contendo porfirinas íon-pareadas, isto é, filmes laminares (layer-by-layer) contendo simultaneamente pares de porfirinas carregadas negativa e positivamente [99]. Por este procedimento também foram estudadas moléculas semelhantes às anteriores, porém contendo quatro grupos $[Ru(Clphen)_2Cl]$ (phen = fenantrolina) no lugar de $[Ru(bipy)_2Cl]$ (Fig. 8).

$$[MTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{n+}$$

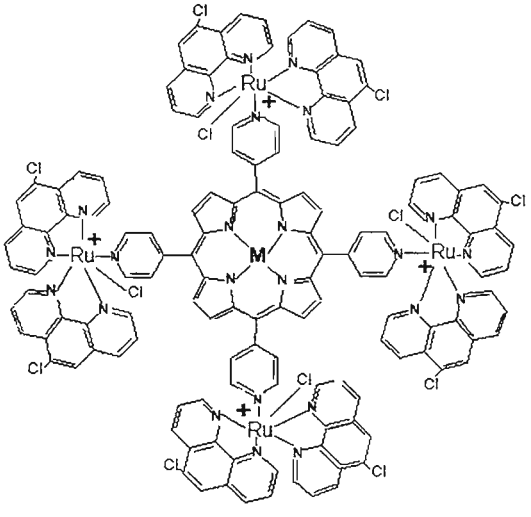


Fig. 8–Estrutura de μ-{meso-tetra(piridil)porfirinato}tetrakis{bis(clorofenantrolina)(cloro)rutênio}

Ambas as porfirinas foram utilizadas para formar filmes mistos com uma porfirina aniônica, a meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfirinato (Fig. 9).

$[MTPPS]^{n-}$

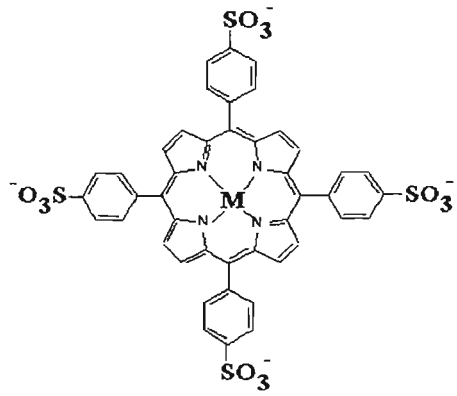


Fig. 9 – Estrutura de meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfirinato.

O desenvolvimento de eletrodos modificados com filmes laminares possibilitou a obtenção de sensores com excelente estabilidade, mesmo na ausência de $TFMS^-$, tornando viável sua aplicação nas análises de amostras reais em sistema em fluxo, como será demonstrado mais adiante.

2.3 – Considerações Sobre Voltametria Cíclica, FIA e BIA

Uma técnica eletroquímica bastante adequada para avaliar o desempenho e as características de eletrodos modificados é a voltametria cíclica [100-102]. Os parâmetros experimentais são controlados por um potenciostato, sendo que uma célula convencional é composta por um sistema de três eletrodos: um de trabalho, um de referência e um auxiliar, imersos em uma solução mantida em condição estacionária.

O potenciostato aplica o potencial desejado entre o eletrodo de trabalho e o de referência. O eletrodo de trabalho é aquele em que ocorre a reação de interesse e a corrente necessária para sustentar a reação provém do eletrodo auxiliar. Desta forma previne-se que elevadas correntes percorram o eletrodo de referência, alterando o potencial aplicado. Em casos em que o oxigênio dissolvido interfere, este pode ser eliminado por borbulhamento com um gás inerte antes das análises.

Nesta técnica, o potencial aplicado no eletrodo de trabalho é variado linearmente com o tempo, a partir de um potencial inicial até um potencial final, a partir do qual, a varredura é invertida até retornar ao potencial de partida. O resultado é um registro de corrente em função do potencial aplicado, cujo pico anódico representa um processo de oxidação e o catódico de redução (Fig.10).

Os parâmetros importantes na voltametria cíclica são as magnitudes das correntes de picos anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}), bem como os respectivos potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}). Com esta técnica é possível observar diversos aspectos, dentre os quais a intensificação e antecipação dos picos correspondentes aos processos redox dos analitos em presença dos eletrocatalisadores.

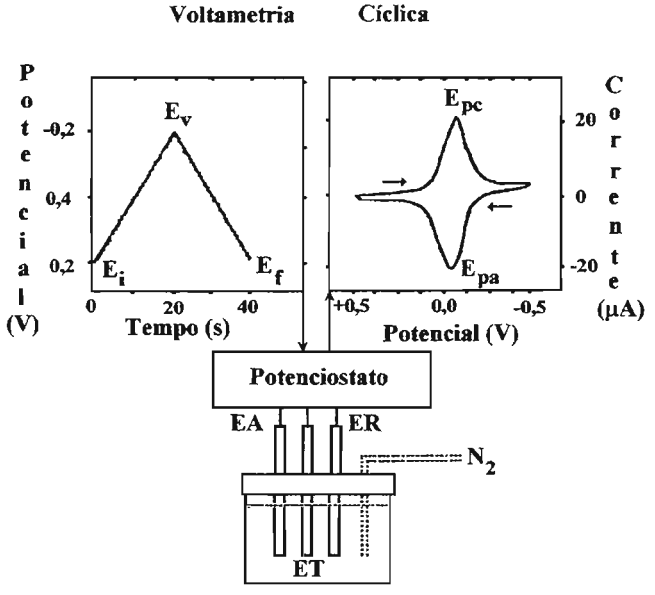


Fig. 10 – Representação esquemática de um experimento de voltametria cíclica, no qual E_i e E_f indicam os potenciais inicial e final aplicados e E_v, o potencial a partir do qual a varredura é invertida. A célula voltamétrica é composta de eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA). Os picos catódico e anódico estão indicados por E_{pc} e E_{pa}, respectivamente [99].

A voltametria também 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. Para pares redox idealmente reversíveis não haveria

diferença entre os potenciais de pico e as magnitudes das correntes de pico seriam iguais ($i_{pc}/i_{pa} = 1$), uma vez que os coeficientes de difusão seriam iguais.

Para eletrodos modificados, pode-se estimar a quantidade de agente modificador que recobre a sua superfície a partir da integração da área sob o pico de oxidação ou redução, obtidos em um voltamograma do sensor modificado (em eletrólito suporte), como ilustrado na Figura 11.

O recobrimento da superfície (Γ) é dado por

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}$$

em que, Q é a carga, n o número de elétrons envolvidos no processo, F é a constante de Faraday e A a área do eletrodo.

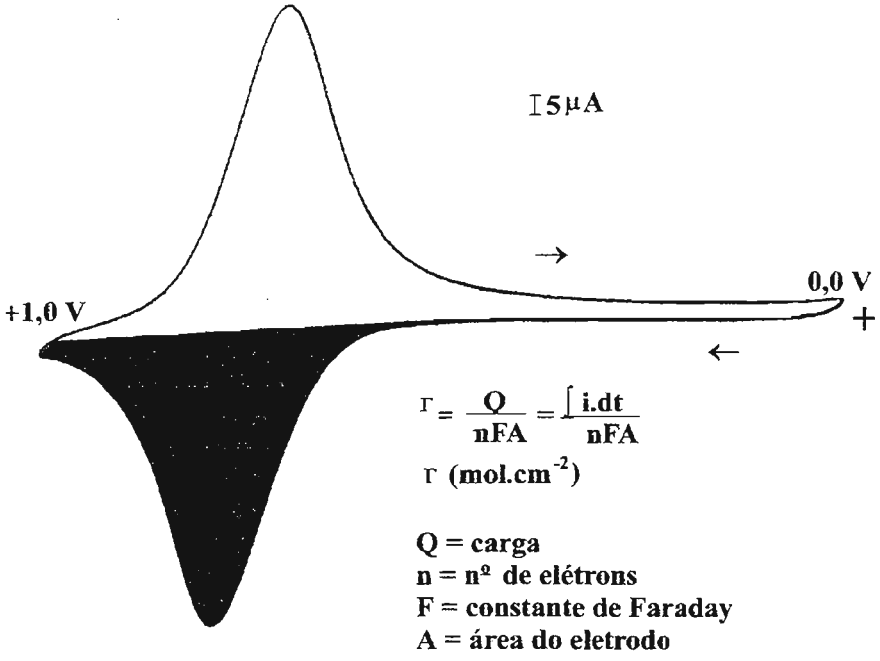


Fig. 11 – Cálculo da quantidade de agente modificador na superfície do eletrodo obtido a partir de um voltamograma cíclico.

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.

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. Destacam-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 e possibilidade de realização da maioria das etapas comumente realizadas em "batelada" (como pré-separação, pré-concentração, precipitações, etc) "on-line" [103-106].

O princípio básico de um sistema FIA está representado na Figura 12. O sistema baseia-se na injeção de solução amostra em um fluxo de um carregador. A amostra injetada forma um zona que é transportada até o detector. Este registra continuamente um sinal de corrente, absorbância ou outro parâmetro de interesse, que sofre alteração quando a amostra passa pelo detector.

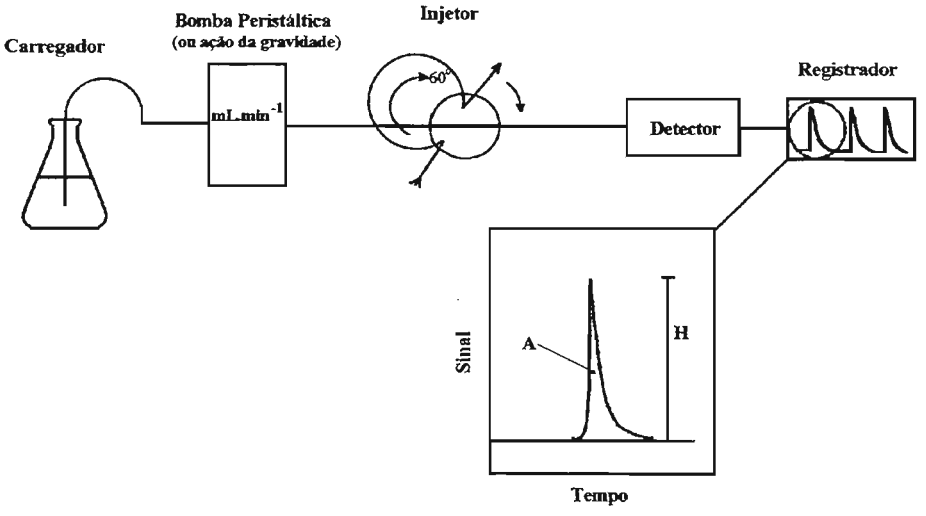


Fig. 12 – Princípio básico de um sistema FIA, cujo registro típico é um pico do qual a área (A) ou a altura (H) são diretamente proporcionais à concentração da amostra.

O registro típico é um pico cuja área ou altura são diretamente proporcionais à concentração da amostra. Por uma questão de facilidade geralmente trabalha-se com a altura do pico. A(s) solução(ões) carregadora(s) pode(m) ser impulsionada(s) pela ação da gravidade ou por uma bomba peristáltica 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. 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 13.

Desta forma, o coeficiente de dispersão (D) refere-se à razão entre a concentração da amostra antes e após o processo de dispersão.

$$D = \frac{C^0}{C^{máx}}$$

A literatura [104] classifica que valores de coeficiente de dispersão abaixo de 3 indicam sistemas com baixas dispersões, de 3 a 10 com médias e maiores do que 10 com elevadas.

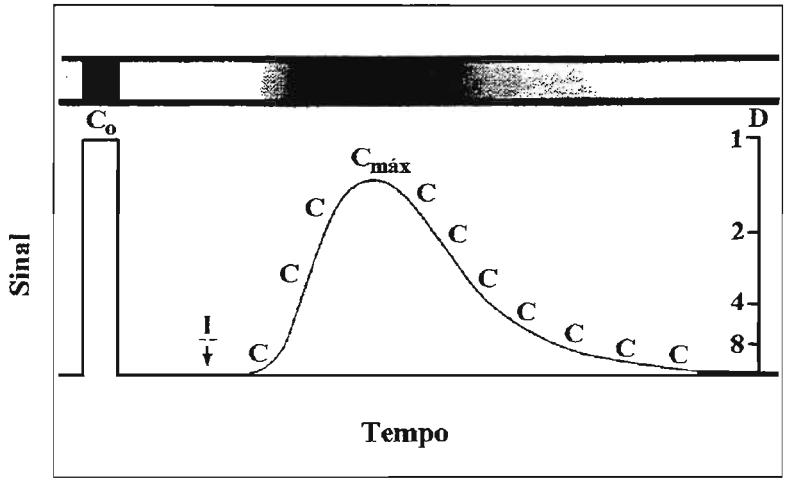


Fig. 13 – Representação esquemática do coeficiente de dispersão (D) de um sistema FIA. A zona de amostra original se dispersa durante o movimento em um reator tubular (no topo da figura), originando o perfil da curva (no centro da figura), no qual a concentração original, C^0, evolui para um gradiente de concentração com valor máximo, $C^{máx}$, no ápice do pico [105].

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 viscosidade [104]. Sob condições normais, os dois últimos fatores têm efeito bastante limitado sobre a dispersão e, na maioria dos casos, podem ser negligenciados.

Os efeitos da geometria dos canais condutores dos sistemas em fluxo sobre o

coeficiente de dispersão são mais complexos. A geometria dos reatores comumente utilizados em sistemas FIA estão apresentados na figura a seguir.

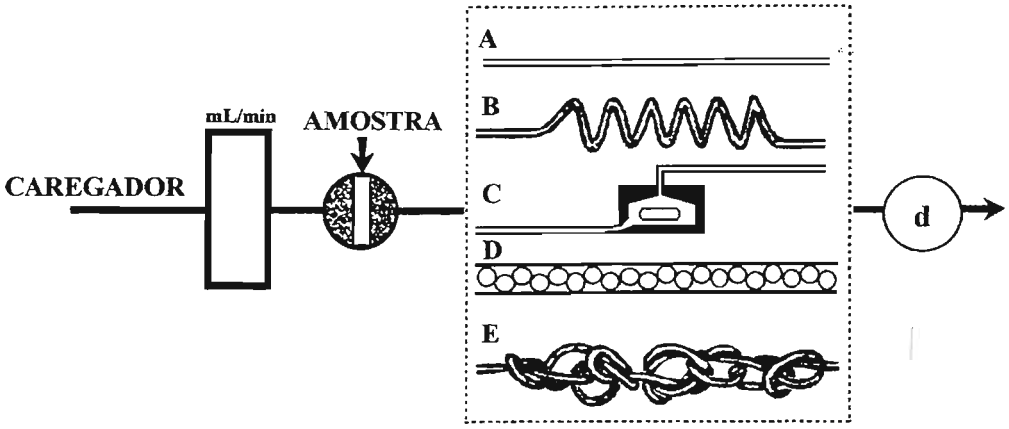


Fig. 14 - Geometria dos reatores de mistura mais freqüentemente utilizados em sistemas FIA: tubo linear (A), tubo em espiral (B), câmara de mistura (C), reator contendo uma fileira de esferas (D) e reator em formato de malha (E). O detector é indicado por (d) [104].

Segundo Ruzicka e Hansen [104] a dispersão da zona da amostra aumenta com a raiz quadrada da distância percorrida através do conduto tubular. Contudo, isto é válido quando o conduto é linear (A), no caso de configurações espirais (B), 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 mesmas dimensões.

As câmaras de mistura (C) aumentam significantemente a dispersão do sistema, diminuindo a altura do pico (sinal de resposta), alargando-o. Este tipo de módulo de mistura é desaconselhável para sistemas em que a elevada freqüência de amostragem é prioritária. O reator cujo tubo é preenchido por pequenas esferas (D) é bastante útil, pois também promove uma mistura radial no reator tubular. Outra vantagem deste tipo de aparato é que a relação superfície/líquido é maior do que no reator linear. Isto é vantajoso quando uma elevada interação superfície/líquido é desejada, como quando utiliza-se reagentes e enzimas imobilizadas, reatores empacotados, etc. Uma desvantagem é que bolhas de ar e partículas

sólidas podem se acumular no reator.

O reator em configuração de malha (E) também promove uma dispersão radial, resultante do movimento caótico do fluxo através do conduto espacialmente desordenado. A Figura 15 ilustra o efeito das configurações dos reatores A, B, D e E sobre a dispersão da amostra.

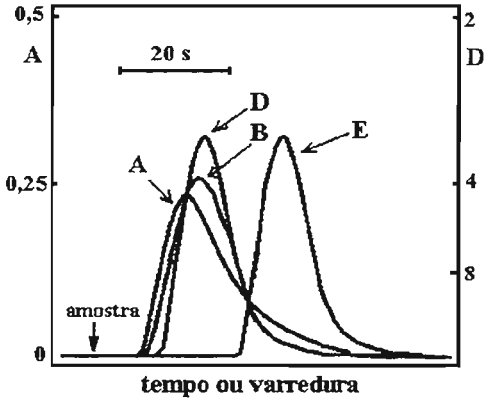


Fig. 15 - Efeito de reatores de mistura sobre a dispersão da amostra em sistema FIA: tubo linear (A), tubo em espiral (B), reator contendo uma fileira de esferas (D) e reator em formato de malha (E) [104].

Estudos sobre a influência do diâmetro interno do tubo sobre a dispersão concluíram que em uma faixa entre 0,35 e 0,9 mm, a contribuição não é crítica, levando a variações no valor do coeficiente de dispersão entre 3,0 e 3,8 [104]. Já em relação a vazão, pode-se afirmar que a dispersão diminui com o aumento das vazões do sistema em fluxo. Porém esta afirmação somente é correta para vazões baixas, em que a velocidade de difusão aproxima-se a velocidade de convecção gerada pelo fluxo.

Por fim, a variação do volume de amostra injetado é um caminho muito conveniente para manipular a dispersão da amostra no sistema e é um dos fatores estudados freqüentemente. O decréscimo da dispersão em função do aumento do volume injetado é bem documentado [104]. 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 μL. 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 μL.

Dentre as diversas técnicas eletroquímicas, a amperometria associada a processo FIA [107] é bastante atraente. Baseia-se na medida de corrente a potencial constante e os resultados obtidos são picos de corrente em função do tempo. É realizada uma medida diferencial entre o sinal (corrente) de fundo produzida pelo carregador (geralmente baixa, oriunda de pequenas quantidades de impurezas) e os picos produzidos pela passagem do analito no detector. Nesta modalidade de análise, estudos voltamétricos prévios são imprescindíveis para selecionar o potencial de oxidação ou redução adequado ao trabalho.

Uma grande vantagem da técnica a potencial constante é a obtenção de um baixo sinal de corrente residual, pois mantendo o potencial do eletrodo fixo em um mesmo valor, a corrente capacitiva (resultante do carregamento da dupla camada elétrica do eletrodo) torna-se constante, virtualmente igual a zero. Via de regra, é recomendável que se utilize uma concentração relativamente elevada de eletrólito inerte, que deverá ser igual no carregador e na amostra a ser analisada, de forma que a amostra ao ser injetada provoque variações pouco significativas na carga da dupla camada elétrica, garantindo que o sinal transiente registrado possa ser atribuído ao sinal faradaico.

Uma dificuldade ao utilizar esta técnica é que em potenciais elevados, tanto positivos quanto negativos, provoca-se a oxidação ou redução de todas as espécies eletroativas cujos potenciais são mais baixos do que o valor fixado. Portanto, para atingir maior seletividade, é preciso trabalhar no potencial menos extremo possível.

No decorrer dos anos, várias alterações têm sido propostas na configuração básica do sistema FIA com o objetivo de obter recursos que aumentem o desempenho do método e solucionem problemas analíticos. Uma das técnicas derivadas do FIA é o BIA (do inglês *Batch Injection Analysis*) [108-110].

Neste tipo de análise, os aparatos dos sistemas FIA são dispensados e um pequeno volume de amostra é injetado diretamente sobre o detector [111]. Registra-se o sinal analítico referente às repetitivas injeções de microlitros da amostra sobre a superfície do detector, imerso em um grande volume de eletrólito suporte. Os primeiros experimentos BIA foram realizados com micropipetas (de Eppendorf) comuns. A obtenção de bons resultados requeria um bom treinamento do analista, que precisava realizar a injeção da amostra de forma altamente reprodutível. Posteriormente, as micropipetas motorizadas passaram a ser utilizadas com sucesso.

À semelhança do sistema FIA, o BIA é uma técnica de sinal transiente, onde a informação analítica é comumente baseada nas medidas das alturas dos picos, como representado na figura abaixo.

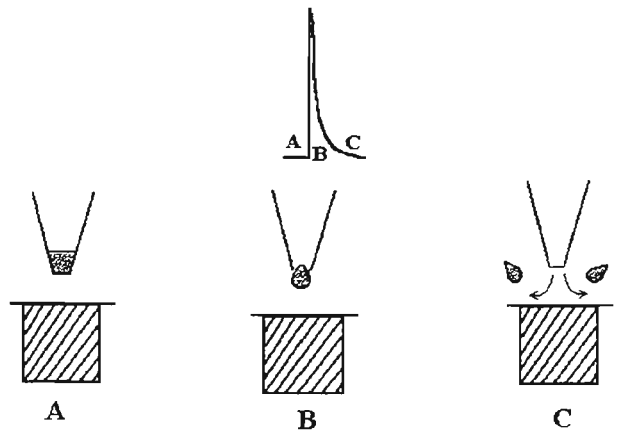


Fig. 16 – Etapas na operação BIA: injeção (A), transporte (B) e dispersão (C) da amostra [111].

A amostra injetada forma uma zona que dispersa a caminho do detector. Para obter sucesso em processos BIA, é fundamental que a dispersão seja controlada (em espaço e tempo). O coeficiente de dispersão está relacionado com o volume de amostra injetado e com a distância entre a ponta da pipeta e o detector; um bom desempenho geralmente é obtido com 20-50 μL e 1-3 mm, respectivamente. A grande dispersão da amostra após a detecção está associada a sua rápida diluição na solução contida na célula.

A potencialidade da técnica BIA tem sido explorada associando-a não somente com a detecção amperométrica, mas também com a voltamétrica [108, 111]. Dentre as principais vantagens do sistema BIA destacam-se o uso de pequenos volumes de amostras, o fato de dispensar os aparatos do fluxo como as bombas e válvulas, a minimização da "lixiviação" de alguns eletrodos modificados, a elevada sensibilidade e repetibilidade dos resultados. O pequeno tempo de contato entre o eletrodo e a amostra é outro benefício na análise de matrizes complexas que, muitas vezes, têm a tendência a envenenar a superfície do eletrodo.

3- Parte Experimental

3.1 – Reagentes

As porfirinas foram sintetizadas e caracterizadas pelo grupo dos professores Henrique E. Toma e Koiti Araki [53, 54, 94, 95]. Foram utilizadas: μ-{meso-tetra (piridil)porfirinato}-tetrakis{bis(bipiridina)(cloro)rutênio} contendo como metal central cobalto ou ferro ($[MTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{n+}$), meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfirinato contendo no centro zinco ou ferro ($[MTPPS]^{n-}$) e μ-meso-tetra(piridil)porfirinato} tetrakis{bis(clorofenantrolina)(cloro)rutênio} contendo ferro como metal central, ($[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}$).

O óxido misto $NdNiO_3$ foi sintetizado pelo grupo do professor Renato Jardim do Instituto de Física-USP [112]. O grafite em pó foi adquirido da Fisher (Acheson 38).

A solução de acetato de celulose 0,5 % (Aldrich) foi preparada em ciclohexanona e acetona (1:1) e a solução de Nafion® 0,5 % (Aldrich) em etanol absoluto. Ascorbato oxidase (EC 1.10.3.3, 1300 U/mg proteína, de curcubitácea) foi obtida da Merck. As demais soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico e utilizando água 18 MΩ provinda de sistema milli-Q.

As soluções padrões foram preparadas momentos antes das análises a partir das massas dos reagentes, com posteriores diluições adequadas. As amostras de vinho branco seco Forestier, vinho branco suave Château Duvalier, vinho tinto seco Château Duvalier, Cebion, Aspirina$^+$C e suco de laranja Parmalat foram adquiridas no comércio e abertas momentos antes das análises. As soluções destas amostras foram preparadas com eletrólito previamente desaerado com nitrogênio por 15 minutos.

3.2 – Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica foi realizada em um sistema constituído por Potenciostato/Galvanostato Princeton Applied Research (PAR) 273 e registrador X-Y PARC modelo RE 0089. Os experimentos utilizaram um sistema convencional de três eletrodos: eletrodo trabalho de carbono vítreo ou pasta de carbono (modificado ou não),

auxiliar de platina e referência de $Ag/AgCl_{sat}$, acomodados em uma célula de vidro com tampa de Teflon®, como apresentado na Figura 17. Os estudos voltamétricos envolvendo as porfirinas foram realizados na faixa de potencial de 0,00 V a +1,00 V, em tampão acetato/ácido acético pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} (ou + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}). Já as investigações sobre o óxido de $NiNdO_3$ foram realizados numa janela de potencial de –0,2 0V a +0,20 V, em NaOH 0,10 mol L^{-1} (pH 13).

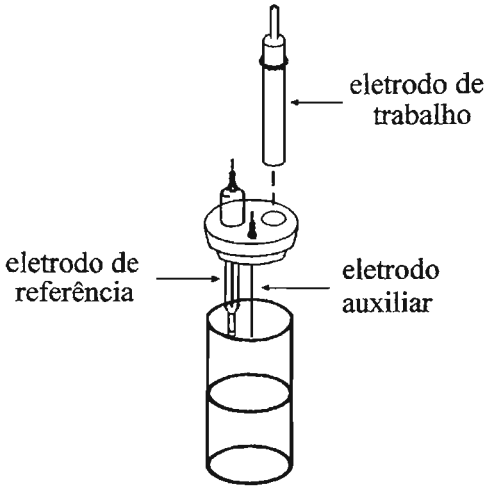


Fig. 17 – Representação esquemática da célula voltamétrica.

3.3 – Sistema FIA

Para o sistema FIA, apresentado na Figura 18, foi utilizado Potenciostato/ Galvanostato PAR 264 e registrador Y-t Linseis L6512.

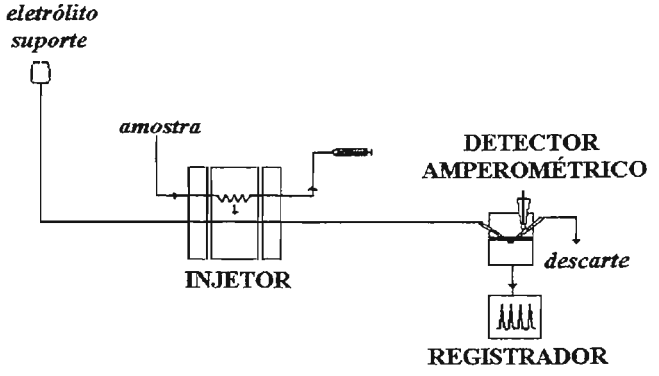


Fig. 18 – Representação esquemática de sistema FIA.

A detecção amperométrica foi realizada com auxílio de uma célula de camada delgada, melhor detalhada na Figura 19, constituída por um bloco de acrílico contendo canais de entrada e saída (confeccionado pela própria pós-graduanda), pressionado contra um outro bloco contendo o eletrodo de carbono vítreo no centro (modelo TL-5, Bioanalytical System). No sistema de saída da célula foram posicionados um eletrodo de referência $Ag/AgCl_{sat}$ miniaturizado [113] e um eletrodo auxilar (tubo de aço inoxidável). Entre os blocos situa-se um espaçador de Teflon, com espessura de 250 μm.

As amostras foram inseridas no fluxo de solução carregadora, com auxílio de um injetor manual, cujo volume de amostra (alça de amostra) selecionado variou de 130 μL a 200 μL. Um reservatório foi colocado em uma altura suficiente para promover, por gravidade, o fluxo do eletrólito carregador, tampão acetato/ácido acético pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} (ou + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}). Os fluxos foram impulsionados por ação da gravidade em todos os estudos FIA realizados. Todos os potenciais indicados ao longo do presente trabalho referem-se a um eletrodo de Ag/AgCl em meio de KCl saturado.

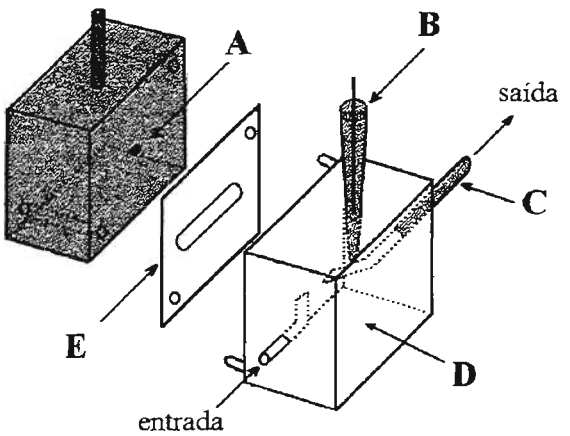


Fig. 19 – Representação esquemática do detector amperométrico acoplado ao sistema FIA. Eletrodo de carbono vítreo (A), eletrodo de referência $Ag/AgCl_{sat}$ (B), tubo de aço inoxidável (C), bloco de resina acrílica (D) e espaçador de Teflon (E).

3.4 – Módulo de Difusão de Gás

Para a análise de SO_2 em amostras de vinhos, foi necessária a confecção de um módulo de difusão de gás e de uma bobina de mistura no sistema FIA (Fig. 20). O módulo

é utilizado para transferir compostos gasosos (ou voláteis) de um fluxo doador para um fluxo receptor, sendo que ambos são separados por uma membrana semipermeável [114]. A principal vantagem da célula construída é o fato de ser possível transferir o analito de interesse para outro meio, de forma a eliminar ou minimizar os problemas de interferências.

A bobina de mistura (construída com tubos de 30 cm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro interno) foi enrolada em espiral, de forma a favorecer a homogeneização da mistura.

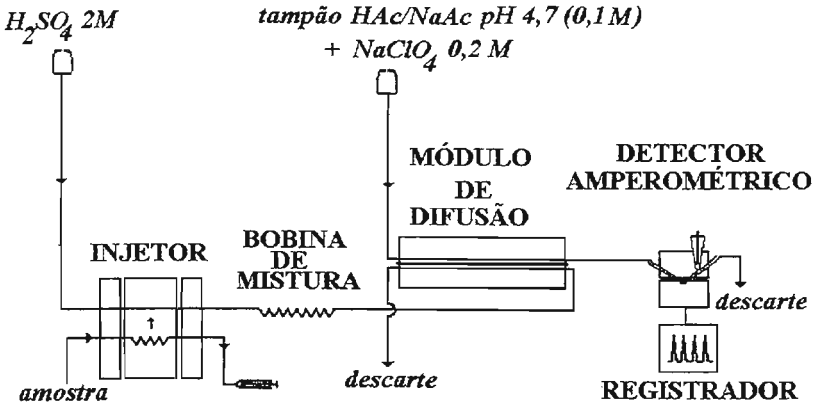


Fig. 20 – Sistema FIA acoplado ao módulo de difusão e bobina de mistura utilizado para análises de SO_2.

O módulo de difusão de gás, apresentado com mais detalhes na Figura 21, é constituído por dois blocos de acrílico retangulares (16,5 mm de espessura, 36 mm de largura e 135 mm de comprimento) separados por duas lâminas de borracha de 0,7 mm de espessura.

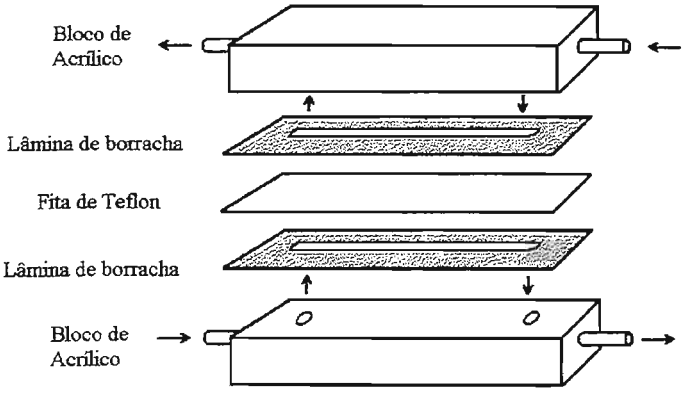


Fig. 21 – Módulo de difusão de gás associado a sistema FIA.

Cada lâmina contém um canal central com 110 mm de comprimento e 2,6 mm de largura, no qual estão conectadas as entradas e saídas dos fluxos. Foi utilizada uma fita de Teflon com 18 mm de largura (marca Fiplon – comercialmente disponível como fita "veda-rosca"), como membrana de difusão. A área da membrana de Teflon exposta é de 286 mm^2 e o volume da célula de difusão é de 2,0 mL.

A célula foi montada na posição horizontal com as soluções se deslocando em contra-fluxo. O eletrólito receptor foi conectado no canal superior. O carregador da amostra, constituído de uma solução fortemente ácida (H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}), e a solução receptora, formada por um tampão acetato/ácido acético pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}, foram impulsionadas com uma vazão constante de 1,5 mL min^{-1}.

3.5 – Sistema BIA

O sistema BIA, consiste de potenciostato PAR 264 conectado a registrador Y-t Linseis 6512B acoplado a uma célula BIA (apresentada na Figura 22) constituída por três eletrodos (semelhante à célula voltamétrica) e micropipeta motorizada EDP PLUS EP-100 RAINNIN INSTRUMENT, com capacidade máxima de 100 µL (utilizada para a injeção controlada de amostras).

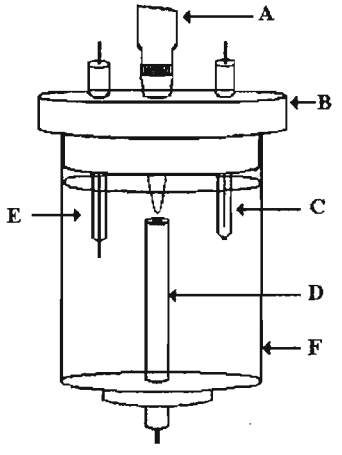


Fig. 22 – Representação esquemática do sistema BIA constituído por micropipeta motorizada (A), tampa de nylon (B), eletrodo de referência de $Ag/AgCl_{sat}$ (C), eletrodo trabalho de pasta de carbono (D), eletrodo auxiliar de platina (E) e célula de vidro (F).

O volume de amostra injetado foi tipicamente de 30 μL, permitindo assim que as injeções fossem realizadas em triplicatas, sem a remoção da pipeta. A distância entre a ponta da pipeta e a superfície do eletrodo foi de 3 mm e a velocidade de injeção da amostra foi de 75,3 μL s^{-1}, condições nas quais obteve-se melhor desempenho do sensor (maior sinal de corrente). O volume de eletrólito suporte, NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13), contido na célula foi de 60 mL.

3.6– Preparo dos Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados

Antes do procedimento de modificação, as superfícies dos eletrodos de carbono vítreo (com diâmetros de 3 ou 5 mm) foram polidas com alumina (0,30 e 0,05 μm) e, a seguir, lavadas com água e etanol. Os eletrodos foram submetidos a banho ultra-sônico por 2 minutos e secados à temperatura ambiente.

A modificação dos eletrodos contendo somente um tipo de porfirina foi realizada de acordo com o seguinte procedimento: 1 mg de porfirina foi dissolvido em 5 mL de metanol. A solução foi então transferida para a superfície limpa do eletrodo com auxílio de um capilar pequeno (volume = 1 μL) e o solvente posteriormente evaporado. Este procedimento foi repetido até obter-se a quantidade de porfirina desejada sobre a superfície do eletrodo (tipicamente três vezes).

Para a modificação dos eletrodos com metaloporfirinas e acetato de celulose ou Nafion®, o procedimento inicial para a imobilização foi igual ao citado no parágrafo anterior. Após a imobilização dos filmes de porfirinas sobre o eletrodo, a solução de Nafion® 0,5 % (em etanol absoluto) ou acetato de celulose 0,5 % (em ciclohexanona/acetona 1:1), foi transferida para a sua superfície.

Os eletrodos modificados por filmes contendo duas porfirinas, uma catiônica e outra aniônica, foram preparados de acordo com o seguinte procedimento: 1 mg de porfirina catiônica foi dissolvido em 5 mL de metanol e 1 mg de porfirina aniônica em 5 mL de água. Para formar os filmes laminares, a porfirina carregada positivamente foi transferida para a superfície limpa do eletrodo (volume = 1 μL) e o solvente foi posteriormente evaporado. Na segunda etapa, a porfirina aniônica foi transferida sobre a primeira camada e o solvente evaporado. O eletrodo foi, então, lavado com água (para retirar o excesso de

$[MTPPS]^{n-}$) e secado a temperatura ambiente. Repetiu-se o procedimento até obter-se número de "bicamadas" desejado (tipicamente três bicamadas).

3.7 – Preparo dos Eletrodos de Pasta de Carbono

Os eletrodos de pasta de carbono não modificados foram preparados preenchendo-se a base de um tubo de vidro de 3 mm de diâmetro com uma pasta constituída por 0,50 g de grafite finamente dividido, aquecido previamente a 110° C por 4 horas, misturado com 0,25 g de óleo mineral. Este tratamento térmico gera sítios reativos como grupamentos fenólicos e carboxílicos, entre outros, que favorecem o acoplamento químico. O contato elétrico foi feito pela outra extremidade com um fio de níquel-cromo.

A pasta modificada foi preparada de maneira semelhante; 75 mg do óxido de $NdNiO_3$ foi homogeneizado com o grafite em pó a seco, sendo a seguir misturado com o óleo mineral (nas mesmas proporções citadas no parágrafo anterior). Todos os estudos com estes eletrodos foram realizados em meio de NaOH 0,10 mol L^{-1} (pH 13), condições em que o óxido misto apresenta ação catalítica.

3.8 - Determinação de Ácido Ascórbico em Sistema FIA Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ (Método Diferencial)

O ácido ascórbico foi quantificado em amostras de Aspirina^{+}C, Cebion e suco de laranja Parmalat com auxílio de eletrodos modificados com filmes laminares de $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$. Devido a presença de interferentes (especialmente no caso do suco de laranja), as determinações foram feitas por método diferencial, com tratamento de alíquotas das amostras com a enzima ascorbato oxidase contida em tecido de pepino. Os resultados alcançados com este procedimento foram comparados com os obtidos com enzimas purificadas (Merck) e com os valores apresentados nos rótulos das amostras.

As amostras (abertas momentos antes das análises) foram dissolvidas, quando necessário, adequadamente diluídas e tratadas das seguintes maneiras para as análises:

A – Alíquotas das amostras foram misturadas com 2 g de pedaços de pepino ou com ascorbato oxidase (500 a 1000 unidades enzimáticas) em 2 mL solução tampão fosfato pH 7,0 (0,05 mol L^{-1}) e agitadas por 5 minutos. Após, realizou-se aquecimento a 40 °C por 10 minutos, seguido pela diluição das soluções com tampão acetato pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}. Alíquotas das amostras tratadas receberam adição de padrão de ácido ascórbico na faixa de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}.

O mesmo procedimento foi repetido para "soluções branco" de pepino e os pequenos sinais obtidos (referentes aos interferentes) foram descontados nas análises. Experimentos preliminares foram realizados para verificar a inativação das enzimas sob as condições trabalhadas. As enzimas, após serem aquecidas a 40 °C por 10 minutos, foram adicionadas em soluções de ácido ascórbico previamente preparadas e foram mantidas sob agitação por 5 minutos. O sinal referente a oxidação do ácido ascórbico manteve-se o mesmo antes e após o tratamento com as enzimas inativadas, (o sinal amperométrico desaparece quando enzimas não submetidas ao aquecimento são adicionadas).

B – Alíquotas das amostras receberam adição de padrão de ácido ascórbico na faixa de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}.

As soluções foram preparadas com eletrólito ou água deionizada purgados com nitrogênio por 15 minutos. A quantidade de ácido ascórbico nas amostras foi obtida por diferença entre as análises ***A*** e ***B***.

3.9 - Determinação de SO_2 em Sistema FIA Utilizando Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$

Os dióxidos de enxofre livre e total foram quantificados em amostras de vinhos comerciais branco seco Forestier, branco suave Château Duvalier e tinto seco Château Duvalier, com auxílio de eletrodos modificados com filmes laminares de $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$. Devido a presença de numerosos interferentes

presentes no vinho, as determinações foram feitas utilizando um módulo de difusão de gás. Os resultados alcançados com este procedimento foram comparados com os obtidos por titulação iodométrica, método utilizado industrialmente.

Para a determinação de SO_2 livre no sistema em fluxo proposto, a amostra não sofreu pré-tratamento. Adotou-se o método da adição de padrões na faixa de de 2 a 8 x 10^{-4} mol L^{-1}. As soluções foram preparadas com água deionizada e desaerada por borbulhamento com nitrogênio. As soluções carregadoras também foram previamente desaeradas com N_2.

Para a determinação de SO_2 total no sistema FIA, as amostras foram tratadas previamente com hidróxido de sódio, como segue. Adicionou-se a 50,00 mL de amostra de vinho, 10 mL de NaOH 25% (v/v), aguardando-se por 15 minutos. Após, alíquotas destas amostras tratadas receberam adições adequadas de solução padrão de sulfito na faixa de 2 a 8 x 10^{-4} mol L^{-1}.

Como a amostra tratada com hidróxido possui pH acima de 13, foi realizado um teste para verificar se haveria necessidade de baixar o valor de pH (com adição de H_2SO_4 2,50 mol L^{-1}) antes de injetar a amostra no sistema. Como não houve diferença significativa nos sinais obtidos nas duas situações, as determinações de SO_2 total das amostras foram realizadas sem ajuste prévio do pH. Esta foi uma vantagem adicional verificada no sistema desenvolvido no presente trabalho.

3.10 – Determinação de SO_2 Utilizando Titulação Iodométrica

Para a análise de SO_2 livre em vinho por iodometria foram utilizadas amostras recém abertas adotando-se o seguinte procedimento [115, 116]:

A - Pipetou-se 50,00 mL de amostra e 5 mL de H_2SO_4 (1+3); adicionou-se cerca de 0,5 g de Na_2CO_3 para remover o ar dissolvido na solução. Acrescentou-se 2,5 mL de solução de amido 1 %, titulando rapidamente com solução de iodo 2,19 x 10^{-3} mol L^{-1} (padronizada com tiossulfato de sódio) até a solução permanecer azul por alguns instantes. O tiossulfato foi previamente padronizado com dicromato de potássio padrão.

As reações envolvidas nesta determinação são apresentadas a seguir:

$$(I_2 + I^- \leftrightarrow I_3^-) \qquad (1)$$

$$SO_3^{2-} + I_3^- + H_2O \leftrightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 3I^- \quad (2)$$

$$HSO_3^- + I_3^- + H_2O \leftrightarrow SO_4^{2-} + 3H^+ + 3I^- \quad (3)$$

Padronização do $S_2O_3^{2-}$ com $Cr_2O_7^{2-}$:

$$Cr_2O_7^{2-} + 9I^- \text{ (excesso)} + 14H^+ \leftrightarrow 3I_3^- + 2Cr^{3+} + 7H_2O \quad (4)$$

$$2S_2O_3^{2-} + I_3^- \leftrightarrow S_4O_6^{2-} + 3I^- \quad (5)$$

Padronização do I_2 (em I^-) com $S_2O_3^{2-}$:

$$2S_2O_3^{2-} + I_3^- \leftrightarrow S_4O_6^{2-} + 3I^- \quad (6)$$

B - Pipetou-se 50,00 mL da amostra, adicionou-se 10 mL de formaldeído 2 % (v/v), aguardando por 15 minutos, para a formação do aducto $^-O\text{-}CH_2\text{-}SO_3^-$ (eq. 7). Foi seguido, então, o procedimento A.

$$CH_2O + SO_3^{2-} \leftrightarrow {}^-O\text{-}CH_2\text{-}SO_3^- \quad (7)$$

O teor de SO_2 livre é dado pela diferença entre as titulações dos itens ***A*** e ***B***.

OBSERVAÇÃO: Na amostra de vinho tinto considerou-se como ponto de viragem a mudança na tonalidade da cor da amostra de avermelhada (cor assumida quando tratada com ácido e amido) para azulada, uma vez que a intenção era de se comparar o método proposto com o usualmente utilizado na análise de vinhos.

Para a quantificação de sulfito total, a amostra foi previamente tratada com hidróxido de sódio da seguinte forma:

C - Pipetou-se 25,00 mL de amostra e adicionou-se 5 mL de NaOH 25 %, aguardando por 10 minutos. Após, adicionou-se 10 mL de H_2SO_4 (1+3) e cerca de 0,5 g de Na_2CO_3. Procedeu-se à titulação com solução de iodo utilizando amido como indicador até a solução tornar-se azul.

D - Pipetou-se 25,00 mL de amostra e adicionou-se 5 mL de NaOH 25 %, aguardando por 10 min. Adicionou-se 10 mL de H_2SO_4 (1+3) e 5 mL de formaldeído 2 % (v/v), aguardando por 15 min. Foi seguido, então, o procedimento ***A***.

O teor de SO_2 total é dado pela diferença entre as titulações ***C*** e ***D***.

4 - Resultados e Discussão

4.1 – Considerações Sobre Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[MTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{n+}$

A eletroquímica da molécula de porfirina polimetalada é muito rica devido a presença de múltiplos grupamentos eletroativos [94, 117, 118]. Os complexos de rutênio(II) com 2,2-bipiridina podem ser oxidados aos correspondentes complexos de rutênio(III), enquanto que os ligantes bipiridina podem ser reduzidos por sucessiva adição de elétrons. O anel porfirínico pode ser oxidado ou reduzido gerando o cátion radical porfirina e o respectivo dicátion ou o ânion radical e o correspondente diânion. O metal central também é eletroquimicamente ativo. Estes processos redox são altamente dependentes das características do solvente utilizado e da faixa de potencial em que se trabalha.

Nas condições utilizadas neste estudo, ou seja, em solução aquosa e numa faixa de potencial de trabalho de 0,00 a +1,00 V, os sítios ativos da macromolécula que atuaram na eletrocatálise das reações de oxidação investigadas foram o pares redox Ru(II)/(III). O voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo modificado com cobalto porfirina exibe somente um par de ondas bem definidas atribuídas a estes sítios ativos periféricos, conforme apresentado na figura abaixo.

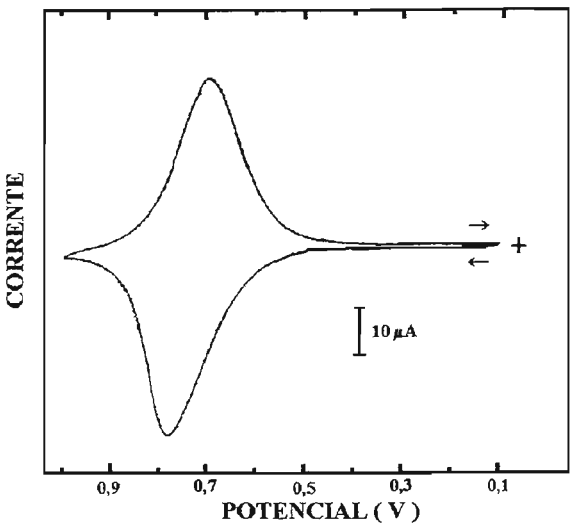


Fig. 23 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1}. $\Gamma = 2,1 \times 10^{-9}$ mol cm^{-2} e área do eletrodo = 0,196 cm^2.

A ocorrência de uma onda simples e intensa (proporcional ao número de sítios equivalentes) é consistente com uma fraca interação entre os quatro grupamentos $[Ru^{II/III}(bipy)_2Cl]$, como discutido em estudos anteriores [94].

O eletrólito empregado nos estudos com as porfirinas, tampão acetato/ácido acético pH 4,7, foi selecionado em função de investigações prévias [53, 54, 94, 95]. Contudo, ensaios por voltametria cíclica utilizando eletrólitos com valores de pH 8 e 9 apresentaram respostas similares aos obtidos com pH 4,7. Desta forma, observou-se que estas porfirinas podem ser aplicadas em condições diversas.

Os voltamogramas com níquel, manganês e ferro porfirinas, realizados nas mesmas condições, exibem perfil de resposta semelhante a de cobalto, isto é, apenas com um par de ondas redox referentes aos Ru(II)/(III) periféricos.

A quantidade de porfirina imobilizada sobre a superfície do eletrodo (Γ) foi estimada a partir da carga referente à área do pico de oxidação do Ru(II) a Ru(III). Geralmente, o valor estimado de Γ situou-se entre 1 e 3 x 10^{-9} mol cm^{-2}, assumindo que todos os quatro átomos de rutênio do filme são eletroquimicamente ativos.

A quantidade de porfirina foi calculada utilizando a relação:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}$$

onde:

n = 4 elétrons.

F = 96487 C mol^{-1} e^{-1}.

A = 0,071 cm^2 ou 0,196 cm^2 (diâmetros = 0,5 cm ou 0,3 cm, respectivamente).

Na prática, a área sob o pico de oxidação foi estimada apenas com razoável precisão (com auxílio de papel milimetrado). De posse do valor da área (cm^2), da velocidade de varredura (V s^{-1}) e da sensibilidade de corrente utilizada no registro do voltamograma (A cm^{-1}), obteve-se a carga correspondente (C), tomando-se o cuidado de descontar a pequena contribuição capacitiva (estimada com o eletrodo não modificado).

A seguir serão apresentados os resultados do desempenho do eletrodo assim modificado, na oxidação de espécies como nitrito, sulfito, dopamina, ácido ascórbico e NADH.

4.1.2 – Estabilidade de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$

Quando a solução alcoólica de cobalto porfirina é transferida para a superfície do carbono vítreo, um filme aderente é formado após a evaporação do solvente. Apesar deste filme ser pouco solúvel, para aplicações analíticas esta baixa solubilidade é indesejável. Este problema foi contornado inicialmente com a presença do contra-íon trifluorometanossulfonato ($TFMS^-$), na forma do sal sódico. O $TFMS^-$ é utilizado após a síntese da porfirina para a sua precipitação. A presença deste ânion em solução minimiza a solubilização do filme depositado sobre o eletrodo.

A estabilidade dos eletrodos de carbono vítreo modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ foi verificada em ensaio em fluxo utilizando eletrólito suporte contendo $TFMS^-$. A figura abaixo ilustra os resultados obtidos para uma série de injeções de solução de nitrito 1×10^{-5} mol L^{-1}.

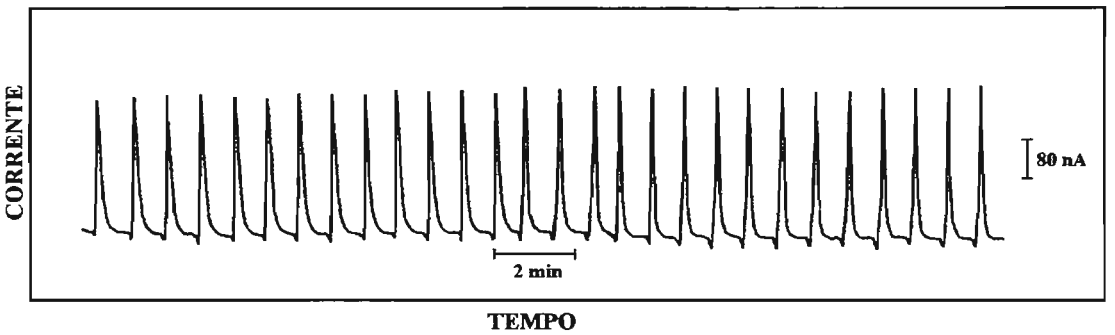


Fig. 24 – Análise por injeção em fluxo utilizando carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ para injeções consecutivas de nitrito 1×10^{-5} mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Vazão= 0,8mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 130 µL. Área do eletrodo = 0,071cm^2 e $\Gamma = 1,91 \times 10^{-9}$ mol cm^{-2}.

Uma elevada repetibilidade é expressa pela média de 278,4 nA com um desvio de 9,6 nA (desvio padrão relativo = 3,4 %), para uma série de 28 injeções. Os sensores modificados com as porfirinas tetrarrutenadas proporcionaram respostas lineares e estáveis, quando utilizados em presença do $TFMS^-$, como apresentados nas seções 4.1.3 e 4.1.4. Estudos mais exaustivos sobre a vida útil do eletrodo modificado, utilizado nestas condições, não foram realizados em função do elevado custo do NaTFMS e da sua não disponibilidade na época, dificultando aplicações de rotina.

4.1.3 – Determinações de Sulfito e Nitrito Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$

O sulfito é amplamente utilizado como anti-oxidante e inibidor do crescimento bacteriológico na indústria farmacêutica e de alimentos. Métodos para a determinação rápida de sulfito têm sido desenvolvidos recentemente, sendo que a análise por injeção em fluxo vêm sendo amplamente difundida nas rotinas de diversos laboratórios [119-123].

A determinação direta de sulfito usando eletrodos convencionais não é uma operação muito simples. A oxidação de sulfito apresenta uma cinética de reação lenta e, consequentemente, o potencial é geralmente bastante elevado. Como é demonstrado na Figura 25A, o sinal gerado por 3 x 10^{-3} mol L^{-1} de sulfito oxidado sobre eletrodo de carbono vítreo não modificado é muito pequeno e ocorre nas imediações de + 1,0 V.

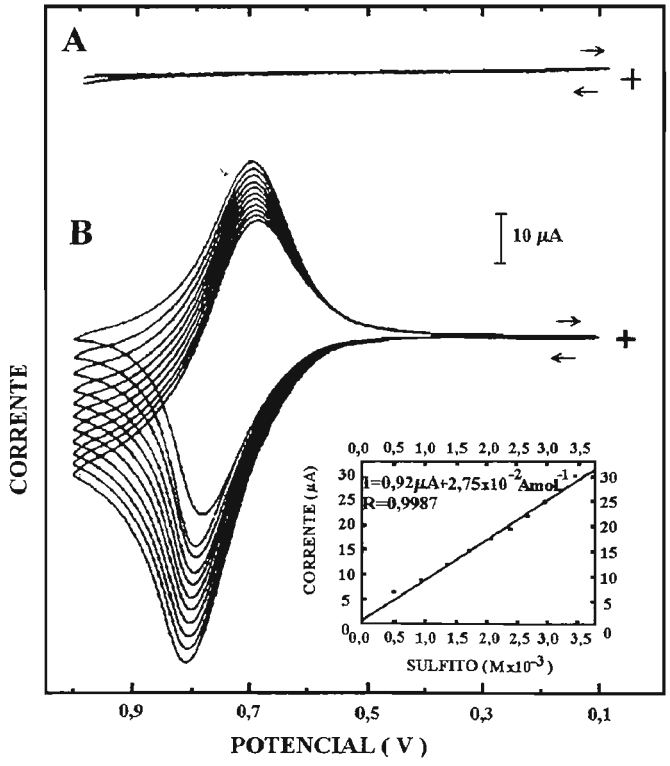


Fig. 25 - Voltamogramas cíclicos de solução de sulfito 3 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado (A) e de soluções de sulfito com concentrações crescentes (0,5 a 3,4 x 10^{-3} mol L^{-1}) utilizando o eletrodo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ (B). Em ambos os casos, o primeiro voltamograma refere-se ao eletrodo somente em eletrólito suporte. Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

Como pode ser visto na Figura 25B, ao utilizar-se o eletrodo de carbono vítreo modificado com cobalto porfirina promove-se um expressivo aumento na corrente de oxidação e um deslocamento do pico de oxidação do sulfito para a região do par mediador Ru(II)/(III). Estes eventos comprovam a oxidação catalítica do sulfito. Os valores de corrente obtidos nos voltamogramas do eletrodo modificado e utilizados para a construção do gráfico apresentado na Figura 25 foram medidos no potencial de + 0,80 V.

Também foi realizada para o sulfito a análise por injeção em fluxo (Fig. 26). Os dados de corrente-tempo para soluções de sulfito em concentrações crescentes, 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}, apresentaram boa linearidade com uma sensibilidade de 0,15 A mol^{-1} cm^{-2}.

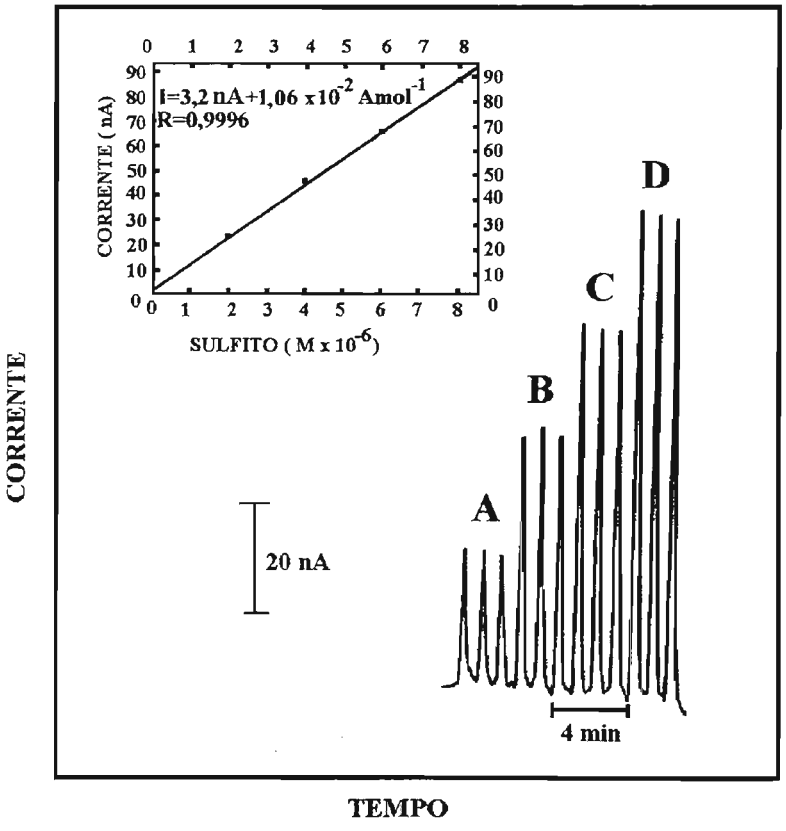


Fig. 26 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Injeções consecutivas de soluções de sulfito com concentrações de 2 x 10^{-6} (A), 4 x 10^{-6} (B), 6 x 10^{-6} (C) e 8 x 10^{-6} mol L^{-1} (D). E = + 0,85 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Vazão = 0,8 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 130 µL. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

A determinação da concentração de nitrito é de grande relevância em diversas áreas, podendo ser destacados o monitoramento ambiental e a análise de alimentos. Diversos estudos têm sido realizados buscando-se a determinação eletroquímica do nitrito [124-128]. Entretanto, a eletroanálise desta espécie apresenta algumas dificuldades como a passivação do eletrodo, provocada provavelmente por acúmulo de produtos da reação [44, 126] e o potencial de oxidação bastante elevado quando utilizados eletrodos convencionais. Como pode ser visto na Figura 27, o pico de oxidação obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado, na presença de nitrito 1 x 10^{-3} mol L^{-1}, é mais favorável para propósitos analíticos do que com o eletrodo não modificado.

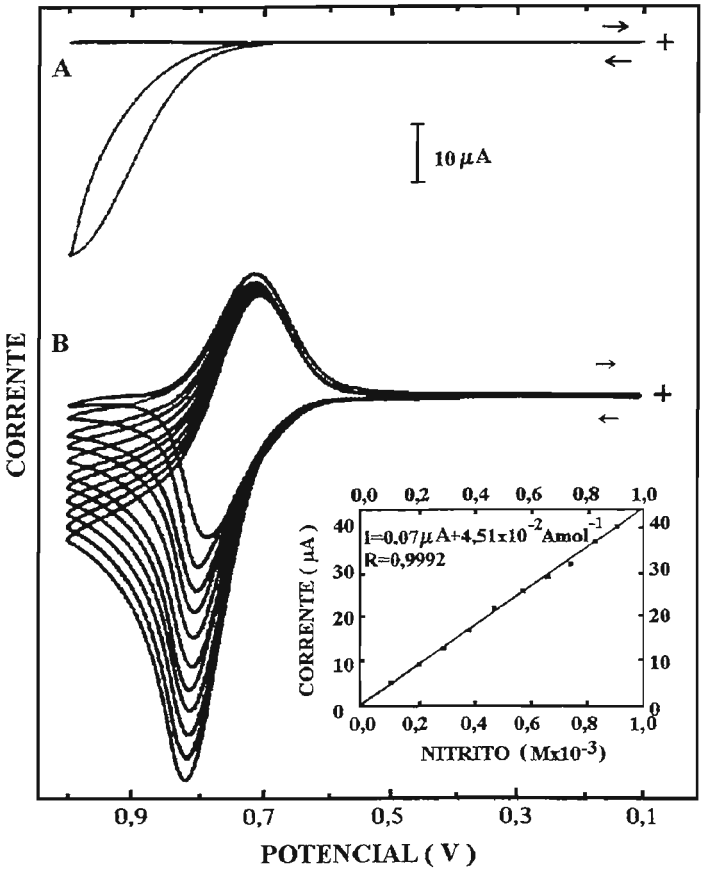


Fig. 27 - Voltamogramas cíclicos de solução de nitrito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado (A) e de soluções com concentrações crescentes de nitrito (0,1 a 0,9 x 10^{-3} mol L^{-1}) usando o eletrodo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ (B). Em ambos os casos, o primeiro voltamograma refere-se ao eletrodo somente em eletrólito suporte. Velocidade de varredura = 100 mVs^{-1} em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

Os valores de corrente obtidos nos voltamogramas do eletrodo modificado e utilizados para a construção do gráfico apresentado na Figura 27 foram medidos no potencial de + 0,81 V.

Com a modificação, o potencial de pico da oxidação do nitrito foi deslocado para potenciais menos positivos e o sinal de corrente intensificado por um fator de ~ 1,2. Este aumento no sinal é semelhante ao relatado na literatura para eletrodo de carbono vítreo modificado com filme polimérico eletrodepositado a partir do complexo $[Ru(bpy)_2(vpy)_2]^{2+}$ [44].

Como conseqüência das propriedades eletrocatalíticas do eletrodo modificado, a onda de oxidação do nitrito foi deslocada para potencial menos positivo (região de oxidação do Ru(II)/(III)).

Já na análise FIA (Fig. 28), sinais mais sensíveis são obtidos. A boa linearidade alcançada na faixa de 2 a 8 x 10^{-7} mol L^{-1} permite estimar limite de detecção na ordem de sub-ppb.

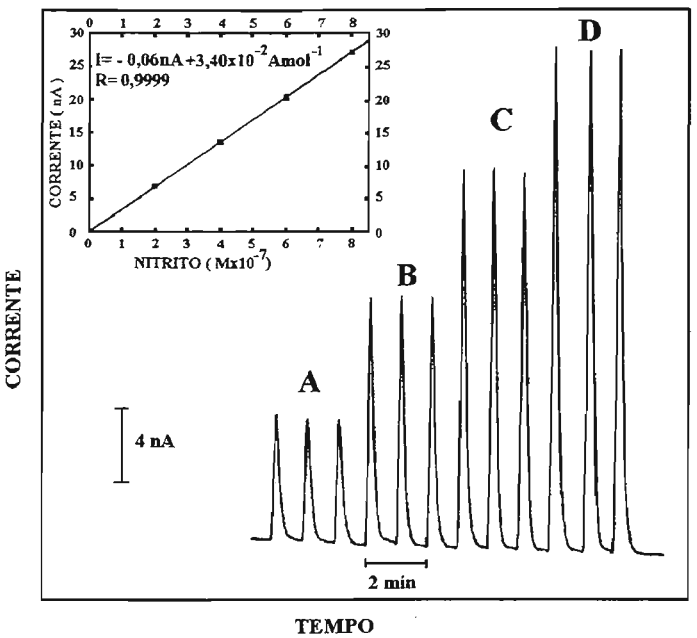


Fig. 28 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Injeções consecutivas de soluções de nitrito com concentrações de 2 x 10^{-7}(A), 4 x 10^{-7} (B), 6 x 10^{-7} (C) e 8 x 10^{-7} mol L^{-1} (D). E = + 0,85 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Vazão = 0,8 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 130 µL. Área do eletrodo = 0,071cm^2.

A tabela a seguir apresenta os potenciais de oxidação do sulfito e nitrito antes e após a modificação do eletrodo de carbono vítreo, bem como as faixas de concentrações nas quais obteve-se resposta linear de corrente.

Tab. 1- Potenciais de oxidação para determinação de sulfito e nitrito utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado e modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ e faixas de concentração mínimas exploradas, nas quais foram obtidas respostas lineares (com o eletrodo modificado).

	E_{ox} sobre eletrodo não modificado (V)	E_{ox} sobre eletrodo modificado (V)	ΔE_{ox}* (V)	Resposta linear utilizando eletrodo modificado – menor faixa de conc. explorada (mol L^{-1})
Sulfito	> + 1,00	+ 0,80	> 0,20	2 a 8 x 10^{-6}
Nitrito	~ 1,00	+ 0,81	~ 0,19	2 a 8 x 10^{-7}

*$\Delta E_{ox} = E_{ox}$ após a modificação – E_{ox} antes da modificação.

A partir dos resultados obtidos percebe-se que o nitrito e o sulfito são oxidados, sobre carbono vítreo, em potencial em torno de 1 V ou acima. Na presença da porfirina, os potenciais de oxidação destas espécies sofreram uma antecipação para a região de potencial do par Ru(II)/(III). Isto é um indicativo de que a oxidação destas espécies é mediada pelo rutênio eletroativo. O efeito da catálise é reforçado pelo aumento na corrente anódica, principalmente no caso do sulfito.

Consideremos, simplificadamente, que a catálise se processe como representado a seguir:

$$Ru^{2+} \leftrightarrow Ru^{3+} + e^- \qquad (8)$$

$$Analito_{red} + Ru^{3+} \rightarrow Analito_{ox} + Ru^{2+} \qquad (9)$$

Como o Ru^{2+} é regenerado pela oxidação do analito, a corrente anódica aumenta. Por esta mesma razão, ao longo dos voltamogramas cíclicos, o pico catódico é menor na presença do analito, pois o Ru^{2+} é produzido simultaneamente nas duas etapas, a exemplo do observado para outros mediadores redox [11].

Embora muitos estudos sobre os efeitos catalíticos de porfirinas e moléculas afins negligenciem a ocorrência de uma transferência complexa de carga entre os pares redox e o substrato, algumas investigações especulam que haja a formação de um tipo de conduto entre o mediador e o analito que facilita a transferência de elétrons.

De acordo com a extensão da interação entre o doador e receptor de elétrons, as transferências de elétrons podem ser classificadas como de esfera externa ou interna [129]. Nos mecanismos de esfera externa, as esferas de coordenação (como didaticamente representado por círculos na Figura 29) sofrem pouca perturbação permanecendo como pares doador-receptor durante o estado de transição [129]. Neste caso, a teoria de Marcus tem sido aplicada para caracterização da natureza da transferência de elétrons.

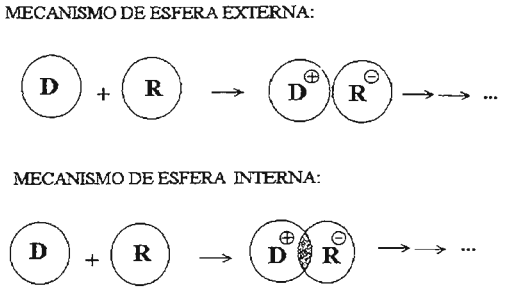


Fig. 29 - Representação esquemática de mecanismos de transferência de elétrons via esfera externa e interna, na qual os círculos contendo D e R representam esferas de coordenação da espécies doadora e receptora, respectivamente.

Em contraste, a interpretação de esferas de coordenação de pares doador-receptor em mecanismos de esfera interna apresentam um estado de transição mais compacto. Na Figura 29, a área hachurada representa a possibilidade de distorções estruturais e nas ligações como contribuições adicionais, que no caso de mecanismos de esfera externa são irrelevantes [129].

Os mecanismos de transferência de elétrons que ocorrem nas reações envolvendo as porfirinas estudadas na presente tese são de esfera externa, comportamento similar ao relatado para complexos contendo rutênio e fenantrolina [129].

Para processos catalíticos que ocorrem via esfera interna, é de se esperar uma maior eficiência, tanto em termos de velocidade de reação quanto de seletividade. Alguns relatos sugerem que as porfirinas não reagem com o analito somente através de transferência periférica de elétrons, mas que elas mantém transientemente o substrato dentro de sua esfera de coordenação [60]. Discussões a respeito da redução catalítica da artemisinina via mediação por hemina [102], presumem que a coordenação do ferro da hemina com o oxigênio da artemisinina atue como uma forma de conduto para a transferência de elétrons. Na ausência de ferro, a redução se processa de forma extremamente lenta.

Em outro estudo sobre a redução catalítica de ácido tricloroacético utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com polipirrol-cobaltoporfirina, embora os autores considerem a possibilidade do processo catalítico ocorrer por mecanismos de esfera interna ou externa, é proposto como mais provável o mecanismo de esfera interna, em função do grande deslocamento do potencial de redução do ácido tricloroacético após a modificação do eletrodo (~ 1 V) [83].

A partir dos resultados obtidos no presente estudo ficou claro haver uma melhora no desempenho do eletrodo, após a modificação da sua superfície, devido a um aumento na cinética de eletrodo. É provável que os complexos de rutênio estejam dispostos sobre a superfície do eletrodo de forma a atuarem como "fios condutores moleculares" entre o eletrodo e a solução. Investigações anteriores sobre os filmes de porfirinas tetrarrutenadas indicam que os poros destes filmes são suficientemente pequenos para bloquear o acesso dos íons em solução até a superfície do eletrodo [95]. Não seria possível, desta forma, a transferência direta de elétrons entre analito e o eletrodo, ocorrendo a condução eletrônica através do filme.

Também encontram-se na literatura estudos que consideram que os sítios ativos de filmes redox podem ser reduzidos ou oxidados por uma sucessão de transferências eletrônicas de "auto-troca" (self-exchange) entre os sítios vizinhos [95]. Supondo-se que, inicialmente, todos os sítios ativos do mediador estejam reduzidos, ao aplicar-se potencial suficiente, provoca-se a oxidação dos sítios próximos à superfície do eletrodo, desencadeando, desta forma, a condução eletrônica ao longo do filme.

Na próxima seção serão discutidos os efeitos do eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ sobre a oxidação de dopamina, NADH e ácido ascórbico.

4.1.4 - Determinações de Dopamina, Ácido Ascórbico e NADH Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$

A dopamina é um importante neurotransmissor e sua determinação em fluido extra-celular do sistema nervoso central tem recebido crescente atenção. Estudos vêm sendo realizados no sentido de aumentar a seletividade na sua detecção, evitando a interferência

das demais espécies eletroativas (como ácido ascórbico) presentes nos sistemas biológicos [130-133].

Foram iniciados estudos para verificar o efeito do eletrodo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ sobre a oxidação de dopamina. A Figura 30 traz os voltamogramas cíclicos de carbono vítreo não modificado (A) e modificado (B), respectivamente.

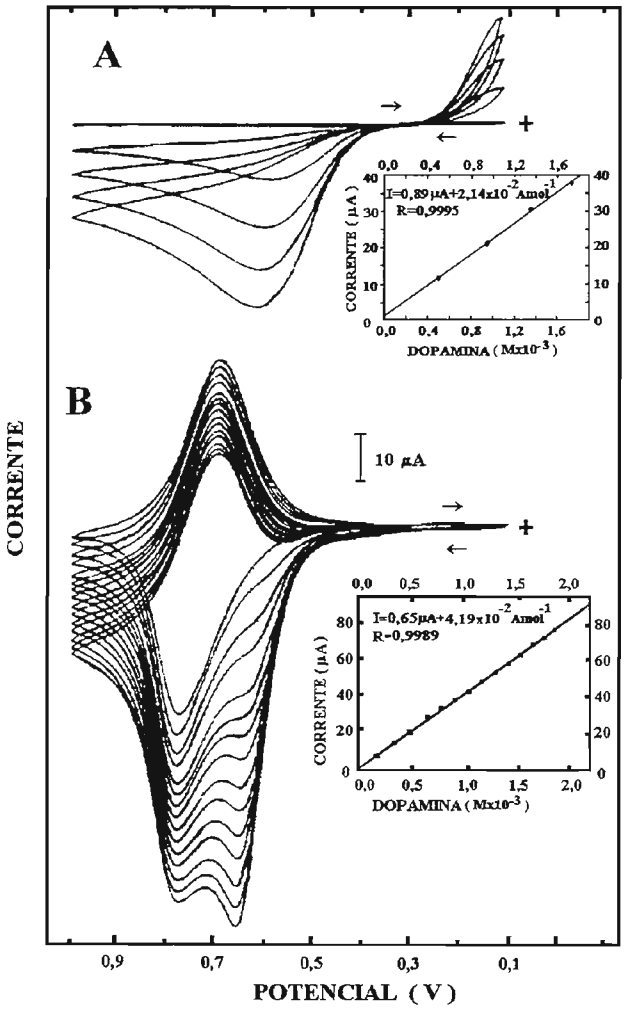


Fig. 30 – Voltamogramas cíclicos de soluções com concentrações crescentes de dopamina de 0,5 a 1,7 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado (A) e de soluções de dopamina com concentrações variando de 0,2 a 1,9 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando o eletrodo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ (B). Em ambos os casos, o primeiro voltamograma refere-se ao eletrodo somente em eletrólito suporte. Velocidade de varredura = 100mV s^{-1} em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

A presença da porfirina na superfície do eletrodo produz um pico anódico bastante acentuado e melhor definido, quando comparado com o caso (A), enquanto que o pico catódico (~ + 0,1 V) é "bloqueado".

Comportamento similar já havia sido observado no caso de analitos tipicamente reversíveis como o $[Fe(CN)_6]^{3-}$ [95], quando foi discutido que este efeito estaria relacionado com uma transferência unidirecional de elétrons [134, 135], característica deste tipo de filme. O processo eletroquímico seria mediado pelo filme através do fluxo de elétrons da solução para o eletrodo. Este comportamento é semelhante ao observado para bicamadas de polímeros redox em que o filme externo contendo espécies eletroativas possui potencial mais negativo do que o filme interno, mas a transferência eletrônica é mediada pelas espécies redox da camada interna [96]. No caso presente, as espécies redox externas estão em solução.

Os valores de corrente obtidos nos voltamogramas dos eletrodos não modificado e modificado pela porfirina (utilizados nos gráficos exibidos na Figura 30) foram medidos nos potenciais de + 0,61 V e + 0,65 V, respectivamente. A sensibilidade é bastante aumentada pelo uso de amperometria em fluxo, conforme observa-se na Figura 31.

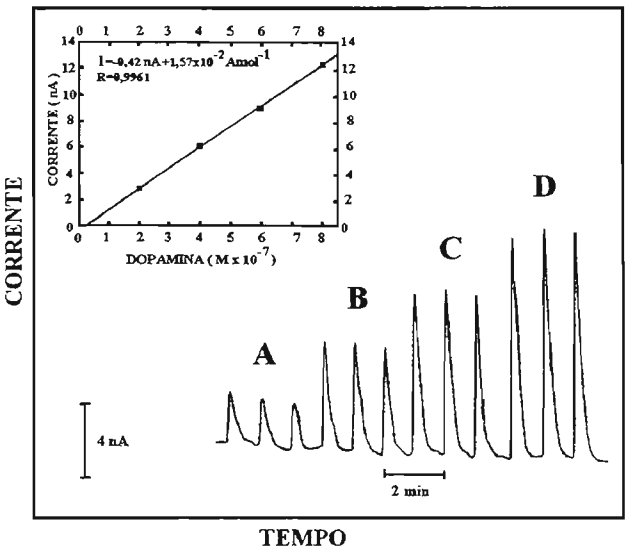


Fig. 31 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Injeções consecutivas de soluções de dopamina 2 x 10^{-7} (A), 4 x 10^{-7} (B), 6 x 10^{-7} (C) e 8 x 10^{-7} mol L^{-1} (D). E = + 0,85 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Vazão = 0,8 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 130 µL. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

A série de picos obtida pela adição de dopamina, na faixa de 2 a 8 x 10^{-7} mol L^{-1}, exibe uma dependência linear com a concentração do analito. A boa relação sinal/ruído permite prever um limite de detecção da ordem de ppb, com uma freqüência de análise de uma amostra por minuto.

No estudo voltamétrico para verificação do desempenho do eletrodo modificado sobre a oxidação de ácido ascórbico, observa-se que há um aumento no sinal de corrente e uma antecipação do pico de oxidação do analito para + 0,60 V em presença da porfirina (Fig. 32).

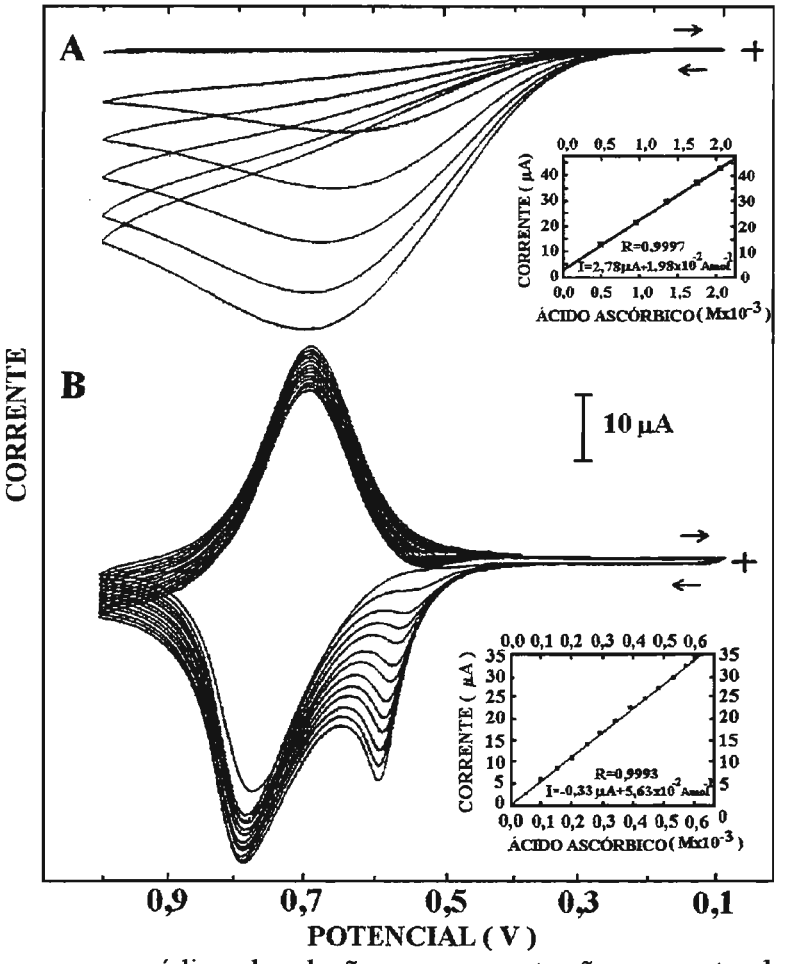


Fig. 32 – Voltamogramas cíclicos de soluções com concentrações crescentes de ácido ascórbico de 0,5 a 2,1 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado (A) e de soluções ácido ascórbico com concentrações variando de 0,5 a 5,7 x 10^{-4} mol L^{-1} utilizando o eletrodo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ (B). Em ambos os casos, o primeiro voltamograma refere-se ao eletrodo somente em eletrólito suporte. Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

Os valores de corrente obtidos nos voltamogramas dos eletrodos não modificado e recoberto pela porfirina (utilizados nos gráficos apresentados na Figura 32) foram medidos nos potenciais de + 0,68 V e + 0,59 V, respectivamente.

Embora sejam evidentes as propriedades catalíticas da porfirina sobre a oxidação do ácido ascórbico, o valor para o qual o potencial foi antecipado está muito próximo do obtido para a dopamina, utilizando o mesmo eletrodo. Portanto, nas condições trabalhadas, o sensor (contendo apenas esta porfirina) não apresenta propriedade seletiva adequada para determinação de uma das duas espécies sem a interferência da outra.

No estudo em fluxo (Fig. 33), uma boa linearidade de resposta é expressa por um coeficiente de correlação de 0,9999 numa faixa de concentração entre 2 e 8 x 10^{-6} mol L^{-1}. Ao contrário do observado para a dopamina, no caso do ácido ascórbico não se obtém uma estabilidade tão boa de linha base e o limite de detecção é menor, podendo ser estimado da ordem de 5 x 10^{-7} mol L^{-1}.

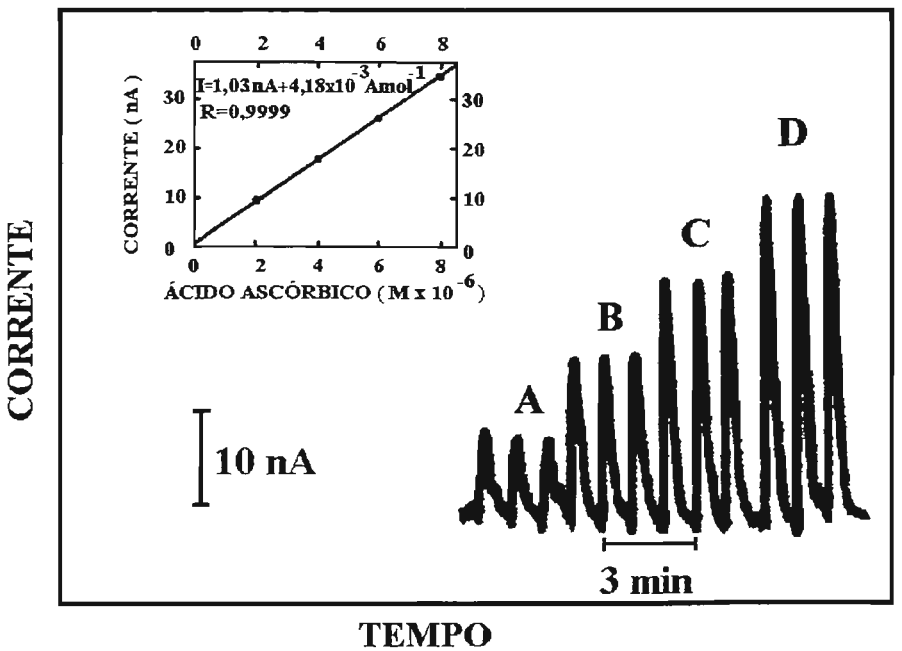


Fig. 33 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Injeções consecutivas de soluções de ácido ascórbico 2 x 10^{-6} (A), 4 x 10^{-6} (B), 6 x 10^{-6} (C) e 8 x 10^{-6} mol L^{-1} (D). E = + 0,85 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Vazão = 0,8 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 130 μL. Área do eletrodo = 0,071cm^2.

Outro grupo de analitos de grande importância na área biológica são as nicotinamidas. Estas coenzimas exercem importante papel em processos celulares catalisados por enzimas desidrogenases, sendo amplamente encontradas na maioria dos tecidos vivos. O grande número de desidrogenases existentes comercialmente oferece boas perspectivas para a construção de sensores úteis em análise clínica, de alimentos e de amostras de interesse ambiental.

Enzimas redox NADH-dependentes catalisam a redução do NAD^+ a NADH com concomitante oxidação seletiva de importantes substratos como glicose, álcool e lactose, entre outros. Estas reações são altamente seletivas, razão pela qual são exploradas na construção de biossensores [136-141], embora existam problemas inerentes à sua operação, dentre os quais, elevados potenciais de trabalho, gradual passivação da superfície do eletrodo e solubilidade dos co-fatores [136].

Eletrodos de carbono vítreo modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ também levaram a resultados bastante interessantes em relação a oxidação de NADH, como pode ser observado na Figura 34. Quando o potencial aplicado aproxima-se do valor E^o do par Ru(II)/(III), uma elevada corrente é observada (Fig. 34B).

Observa-se também, que em presença da porfirina o pico de oxidação do NADH foi antecipado para potencial menos positivo em ~ 100 mV, evidenciando o efeito catalítico da porfirina, que atua como um mediador no processo de oxidação do NADH.

Assim, como foi observado para a dopamina, sucessivas adições de NADH levam a respostas de corrente crescentes e lineares com o aumento da concentração, tanto para o eletrodo não modificado quanto modificado. Contudo, uma resposta corrente/concentração mais favorável foi obtida com a modificação do sensor.

Os valores de corrente obtidos nos voltamogramas dos eletrodos não modificado e recoberto pela porfirina (utilizados nos gráficos exibidos na Figura 34) foram medidos nos potenciais de + 0,73 V e + 0,63 V, respectivamente.

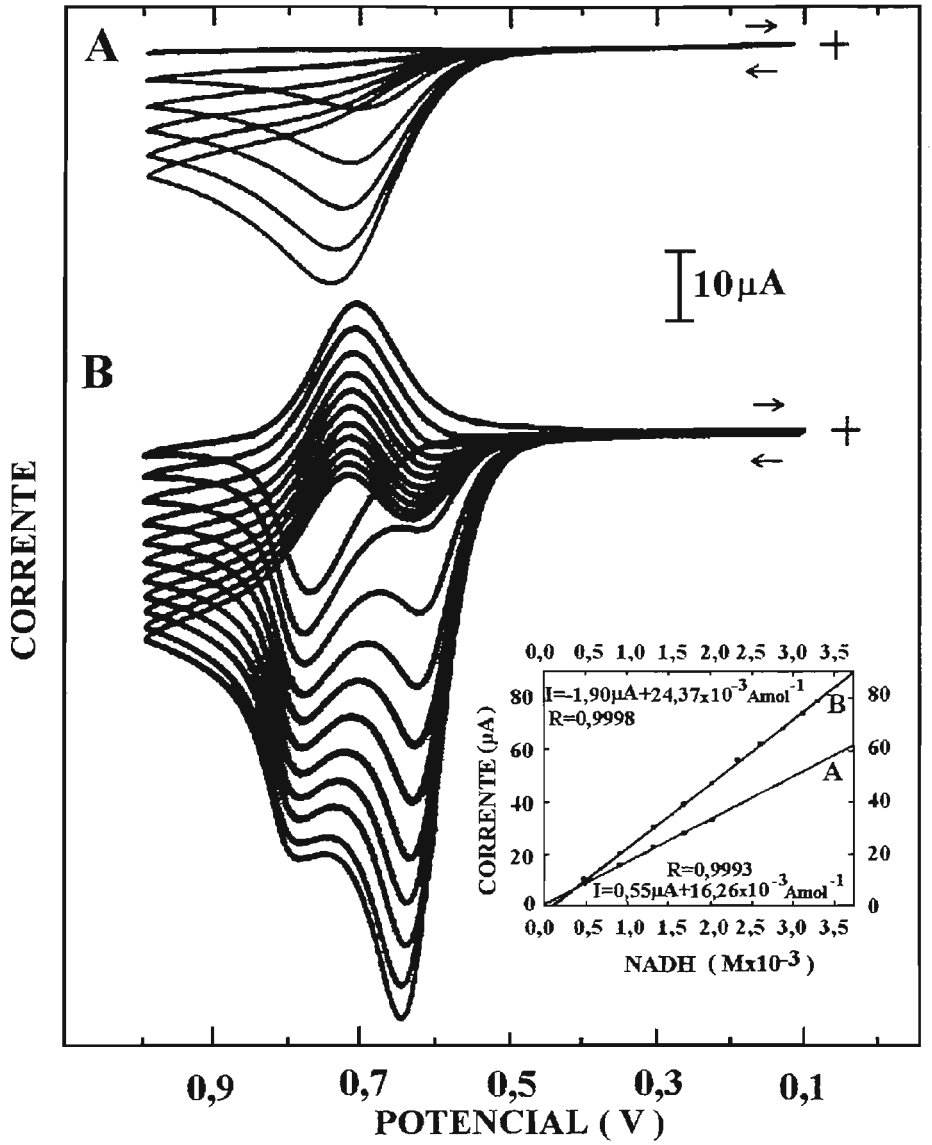


Fig. 34 – Voltamogramas cíclicos de soluções com concentrações crescentes de NADH de 0,5 a 2,1 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado (A) e de soluções de NADH com concentrações variando de 0,5 a 3,3 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando o eletrodo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ (B). Em ambos os casos, o primeiro voltamograma refere-se ao eletrodo somente em eletrólito suporte Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1} em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

A próxima figura exibe um resultado FIA típico para injeções de soluções de NADH com concentrações variando de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}, com resposta de corrente apresentando uma dependência linear com a concentração do bioanalito e uma boa

estabilidade. Uma freqüência de análise de uma amostra por minuto também foi obtida neste caso.

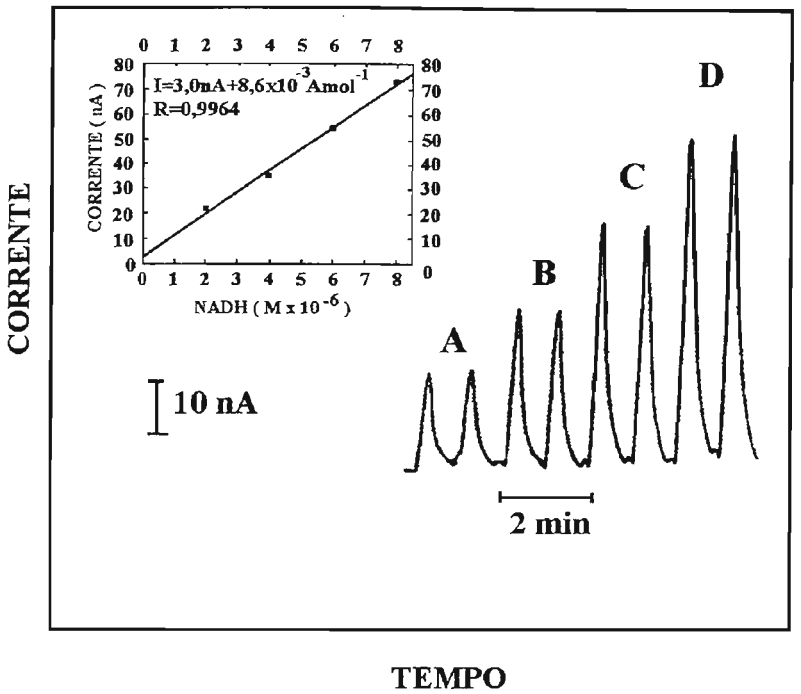


Fig. 35 – Análise em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Injeções consecutivas de soluções de NADH 2 x 10^{-6} (A), 4 x 10^{-6} (B), 6 x 10^{-6} (C) e 8 x 10^{-6} mol L^{-1} (D). E = + 0,85 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,05 mol L^{-1}) + NaTFMS 0,25 mol L^{-1}. Vazão = 0,8 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 130 µL. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Investigações sobre a dependência da resposta de corrente com o potencial aplicado, utilizando o eletrodo modificado, foram realizadas com repetitivas injeções dos analitos no modo de detecção em fluxo a potencial constante. As melhores respostas em termos de estabilidade de linha base associada a sensibilidade foram obtidas na faixa de potencial entre + 0,80 V e + 0,90 V. Os estudos em fluxo apresentados até o momento foram realizados no potencial de + 0,85 V, contudo, no caso de análises de amostras reais, para cada caso deve-se buscar o melhor compromisso entre a sensibilidade e a seletividade (potencial de trabalho menor). Mais adiante, serão apresentados resultados de análises de amostras reais com detecção de ácido ascórbico no potencial de + 0,60 V e determinação de SO_2 em vinhos em + 0,90 V.

Para prevenir que durante os ensaios ocorressem as auto-oxidações dos analitos (como nos casos do ácido ascórbico e da dopamina), as diluições das soluções foram realizadas momentos antes de serem injetadas no sistema em fluxo. Além disto, foram utilizados eletrólitos desaerados.

A tabela a seguir apresenta os potenciais de oxidação dos três analitos apresentados nesta seção, antes e após a modificação do eletrodo de carbono vítreo, bem como as faixas de concentrações nas quais obteve-se resposta linear de corrente.

Tab. 2 - Potenciais de oxidação dos analitos investigados utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado e modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ e faixas de concentração mínimas exploradas, nas quais foram obtidas respostas lineares (com o eletrodo modificado).

	E_{ox} sobre eletrodo não modificado (V)	E_{ox} sobre eletrodo modificado (V)	ΔE_{ox} * (V)	Resposta linear utilizando eletrodo modificado – menor faixa de conc. explorada (mol L^{-1})
Dopamina	+ 0,60	+ 0,65	- 0,05	2 a 8 x 10^{-7}
Ácido Ascórbico	+ 0,71	+ 0,59	0,12	2 a 8 x 10^{-6}
NADH	+ 0,73	+ 0,63	0,10	2 a 8 x 10^{-6}

* $\Delta E_{ox} = E_{ox}$ após a modificação – E_{ox} antes da modificação.

Com base nos sinais obtidos observa-se que a dopamina, o ácido ascórbico e o NADH que já possuíam picos de oxidação anteriores ao do par Ru(II)/(III), continuaram a apresentar pré-ondas (antes do potencial referente à oxidação do rutênio). Para o ácido ascórbico e NADH houve uma antecipação no pico, enquanto que no caso da dopamina, chegou a haver um deslocamento para potencial mais positivo, aproximando-se do potencial de oxidação do Ru(II) a Ru(III). Este comportamento é condizente com a característica destes filmes de porfirinas de atuarem como condutores redox, ou seja, somente ocorre condução de elétrons através do filme, quando os átomos de Ru(II) começam a se oxidar.

Comportamento similar ao da dopamina é relatado para compostos fenólicos como fenol, cresol e clorofenol [142]. Pequenas variações nos potenciais de oxidação destas espécies para valores mais positivos foram observadas após a modificação do eletrodo de carbono vítreo com cobalto ftalocianina. No referido trabalho, os autores consideram que

este comportamento pode refletir a formação de algum aducto entre a ftalocianina adsorvida e os compostos fenólicos. Ainda que os potenciais tenham sidos deslocados para valores sensivelmente mais positivos, a evidência de incrementos nas correntes de oxidação dos analitos levou os autores a sugerirem a ocorrência de reações com transferências de elétrons entre os fenóis e as ftalocianinas.

Embora tenha ocorrido um evidente aumento na magnitude da corrente de oxidação das três espécies estudadas no presente trabalho, verifica-se que a oxidação de cada analito sobre os eletrodos modificados com filmes de porfirinas ocorre em diferentes potenciais. Isto sugere que o processo catalítico não envolve uma simples mediação por transferência de carga, mas também interações específicas entre os analitos e o filme de cobalto porfirina [11, 42].

4.1.5 – Considerações Sobre Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ e Acetato de Celulose ou Nafion®

Procurando-se uma maneira de tornar os eletrodos de carbono vítreo modificados com $[MTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{n+}$ mais estáveis, minimizando a solubilização dos filmes de porfirinas para a solução, experimentou-se recobri-los com filmes de acetato de celulose ou Nafion®. Com estes procedimentos buscava-se, também, atribuir características seletivas aos eletrodos.

A próxima figura apresenta os voltamogramas do eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/acetato de celulose (A) e $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/Nafion® (B) para soluções de nitrito com concentrações na faixa de 0,3 a 1,2 x 10^{-3} mol L^{-1}. Como pode-se perceber, nos dois casos a linearidade das respostas obtidas não foi satisfatória. Estudos similares com solução de nitrito com concentrações variando entre 0,5 e 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} também não produziram resultados lineares.

Deve-se considerar que o acetato de celulose e o Nafion® são solubilizados em solventes orgânicos, portanto, quando o filme de porfirina é recoberto pelos filmes poliméricos deve haver a solubilização parcial da porfirina, que mistura-se ao material polimérico, tornando o filme irregular. Este fato possivelmente contribua para a

irregularidade dos sinais obtidos. Da mesma forma, a provável presença de moléculas de porfirinas misturadas ao filmes poliméricos (inclusive na camada externa do filme modificador), justifica o aparecimento pronunciado de sinal referente a oxidação de nitrito mesmo com a utilização de Nafion® (Fig. 36B).

Na mesma época foi desenvolvido pelo prof. Koiti um novo procedimento para a modificação dos eletrodos baseado na imobilização simultânea de porfirinas catiônicas e aniônicas [98]. Desta forma, obteve-se sensores estáveis para utilização em análises por injeção em fluxo, como será discutido nas seções seguintes. A abertura de tal perspectiva e os bons resultados obtidos com a nova forma de construção de tais filmes, fez com que não insistíssemos na utilização destes filmes poliméricos.

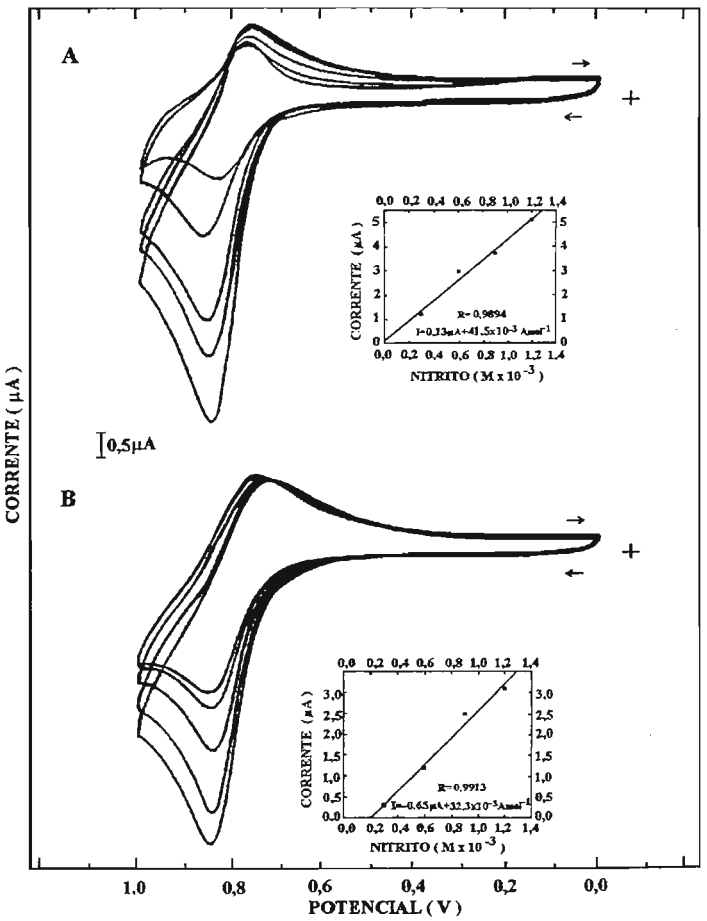


Fig. 36 – Voltamogramas cíclicos de soluções com concentrações crescentes de nitrito de 0,3 a 1,2 x 10^{-3} mol L^{-1} utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ /acetato de celulose (A) e $[NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/Nafion® (B). Em ambos os casos, o primeiro voltamograma refere-se ao eletrodo somente em eletrólito suporte. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,05 mol L^{-1}). Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

4.2 – Considerações Sobre Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$

Como foi visto, eletrodos modificados com as metaloporfirinas tetrarrutenadas exibem ação catalítica na oxidação de diversas espécies. No entanto, os filmes moleculares são relativamente solúveis em meio aquoso, exigindo a presença do contra-íon $TFMS^-$ para minimizar a lavagem do filme de porfirina da superfície dos eletrodos. O NaTFMS é um reagente de custo elevado, tornando pouco favorável sua utilização em análises de rotina. Procurando contornar esta dificuldade, partiu-se para o estudo de uma nova maneira de imobilização, que dispensasse o uso do contra-íon e proporcionasse a construção de sensores estáveis para as análises em fluxo.

A nova forma de modificação consiste na formação de filmes laminares (layer-by-layer) contendo camadas de porfirinas íon pareadas. O voltamograma cíclico do eletrodo modificado em eletrólito suporte (como será visto nas Figuras 38 e 39B) registra um par de ondas redox referentes ao Ru(II)/(III); comportamento similar ao encontrado anteriormente para os filmes de $[MTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{n+}$. Os picos anódico e catódico possuem a mesma intensidade e são separados por ~ 70 mV, sugerindo que o processo eletroquímico é reversível. Com esta nova forma de imobilização os sítios ativos continuam sendo os átomos de rutênio.

Estudos espectrofotométricos de $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ sobre superfície de ITO (vidro revestido com óxidos de índio e de estanho), demonstraram a formação altamente organizada das "bicamadas", como acompanhado pela Figura 37.

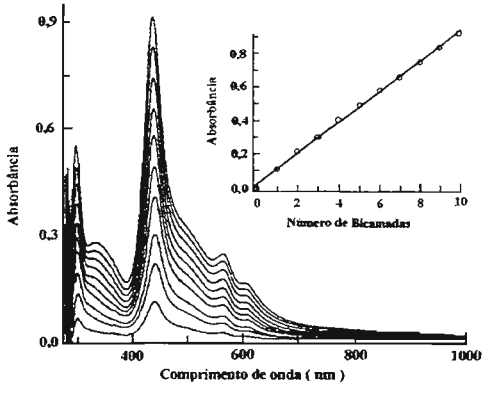


Fig. 37 – Formação do filme laminar de $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ acompanhado espectrofotometricamente em função do número de "bicamadas", sobre superfície de ITO [22].

O espectro apresenta bandas de absorção do centro porfirínico a 435, 566 e 606 nm, do $[Ru(bipy)_2Cl]^+$ a 300 nm e bandas de absorção a 500 nm referentes a transferência de carga Ru(II) $\rightarrow$ bipy [9, 98].

Num esforço para tentar substituir a adição de NaTFMS por um reagente mais acessível, passou-se a experimentar o uso de $NaClO_4$, contra-íon também utilizado para a precipitação de algumas porfirinas (durante suas sínteses).

Embora o perclorato não tenha proporcionado resultados tão satisfatórios quanto o trifluorometanossulfonato, constatou-se que sua presença tornou o perfil de resposta voltamétrica das porfirinas, inclusive das imobilizadas pelo procedimento das "bicamadas", melhor definido. Isto provavelmente deve-se a um aumento da condutividade da solução com a adição do $NaClO_4$.

Estudos mostram que eletrodos modificados com filmes de poli(pirrol-níquel-tetrafenilporfirina) apresentam o par de picos redox melhor definidos e com menor diferença entre os potenciais de pico anódico e catódico, quando imersos em um meio mais condutor (substituindo a adição de CH_3CN por CH_2Cl_2 no eletrólito) [37].

Os próximos experimentos foram conduzidos adicionando-se ClO_4^- no eletrólito suporte, mesmo utilizando-se os filmes laminares de porfirinas.

4.2.1 – Estabilidade de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$

A estabilidade de eletrodos modificados simultaneamente com duas porfirinas é superior aos filmes contendo uma única porfirina e pôde ser verificada em diferentes situações. O eletrodo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ é estável e pode ser ciclado por mais de uma centena de vezes numa faixa de potencial de 0,0 V a 0,9 V sem alterações significativas nas respostas voltamétricas, como apresentado na Figura 38.

Os filmes também mostraram-se duráveis sob as rigorosas condições hidrodinâmicas da análise por injeção em fluxo. Em estudo FIA, o carbono vítreo modificado foi submetido a consecutivas injeções de solução de nitrito 1×10^{-5} mol L^{-1} (Fig. 39), que acarretou em mais de uma hora de uso contínuo, sob fluxo de solução.

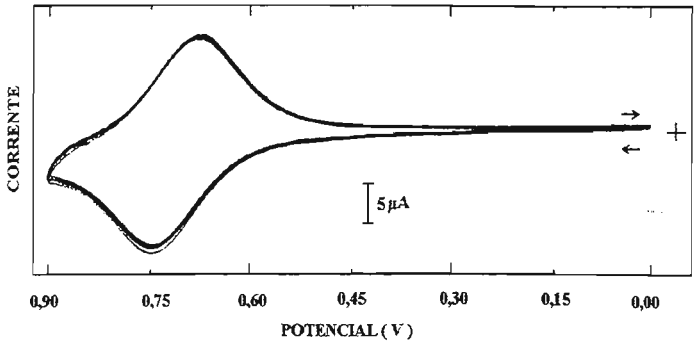


Fig. 38 – Registros dos 1º, 10º, 20º, 30º, 40º e 50º voltamogramas cíclicos de carbono vítreo modificado por $CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$, em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}. Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

Um conjunto de 28 picos aparece na Figura 39A, enquanto que os voltamogramas cíclicos do eletrodo antes e após a série de injeções podem ser observados na Figura 39B.

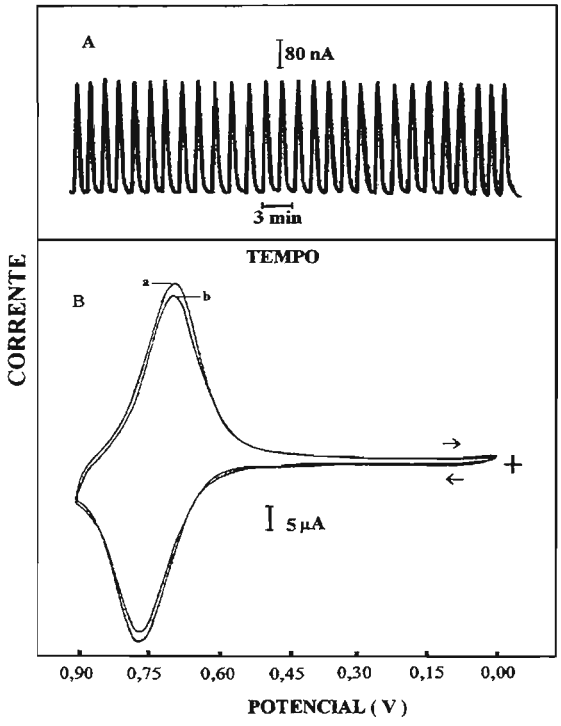


Fig. 39 – Análise FIA utilizando carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ para injeções consecutivas de nitrito 1 x 10^{-5} mol L^{-1} (A) e voltamogramas cíclicos (B) do eletrodo modificado em presença do eletrólito suporte antes (a) e após 1 hora de determinações FIA (b). Condições para FIA: E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 molL^{-1}. Vazão = 0,8 mLmin^{-1} e volume de amostra injetado = 130 μL; voltamogramas (B): velocidade de varredura = 100 mVs^{-1}. Área do eletrodo = 0,071 cm^2 e Γ = 2,2 x 10^{-9} mol cm^{-2}.

Uma elevada repetibilidade das respostas FIA é reforçada pelo desvio padrão de 3,2 nA para a média de 319,7 nA (Desvio padrão relativo, DPR, de 1%), correspondente as 28 injeções de solução de nitrito (fig. 39A), resultado superior ao exibido pelos eletrodos modificados por apenas uma porfirina. A estabilidade do eletrodo assim modificado foi tal, que o mesmo eletrodo pôde ser utilizado por mais de uma semana em análises sucessivas com pequena alteração em seu desempenho.

A estabilidade obtida com eletrodos de carbono vítreo recobertos com filmes laminares de porfirinas foi comparável ao obtido com carbono vítreo modificado com filmes eletropolimerizados contendo rutênio [40]. Neste último caso, em uma hora de análise FIA de nitrito foi obtido um desvio padrão relativo em torno de 1 % e o eletrodo também pôde ser utilizado por vários dias sem queda significativa na sensibilidade. Eletrodos de fibra de carbono modificados por polímeros de $[Os(bipy)_2(PVP)_{20}Cl]Cl$ adsorvidos fisicamente [33] apresentaram um desvio padrão relativo de 2,15 %, para uma série de 20 injeções consecutivas de soluções de nitrito, estabilidade inferior a obtida com os eletrodos contendo as porfirinas íon pareadas. Já carbono vítreo recoberto por espécies de óxidos de manganês geradas eletroquimicamente [43] exibiram um DPR de aproximadamente 1 % para 50 injeções de soluções de hidrazina e peróxido de hidrogênio.

De maneira geral, os eletrodos de carbono vítreo recobertos pelas bicamadas de porfirinas apresentam estabilidade superior a outros eletrodos modificados por adsorção física e estabilidade comparável às obtidas por eletrodos cujas superfícies foram modificadas por procedimentos eletroquímicos (eletrodeposição ou eletropolimerização).

4.2.2 –Prevenção de Envenenamento de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$

Uma dificuldade ao se trabalhar com eletrodos sólidos em sucessivas análises em fluxo com detecção amperométrica é a eventual diminuição de sinal analítico em função de um gradual envenenamento da superfície. Várias abordagens são propostas para contornar este problema, em geral, realizando-se renovação da superfície do eletrodo, empregando cobertura de filmes poliméricos com características seletivas ou pelo uso de eletrodos modificados.

Um problema típico é o rápido envenenamento de eletrodo de carbono vítreo utilizado em determinações amperométricas de compostos como o fenol [143-146], cujo monitoramento tem recebido crescente atenção em função da sua abundância, toxicidade e persistência no ambiente [147-149]. O acúmulo de produtos da oxidação sobre a superfície do eletrodo leva a uma queda no sinal de resposta.

Estudos relatam que a adição do surfactante Triton X-100 previne a adsorção de fenóis em eletrodos de pasta de carbono. Porém, sua adição foi prejudicial à composição da pasta, resultando no desprendimento de pequenos blocos de pasta de carbono na solução [150].

O efeito do envenenamento de eletrodo de carbono vítreo pode ser observado na Figura 40, onde a resposta de corrente obtida sobre o eletrodo não modificado para injeções sucessivas de soluções de fenol 1 x 10^{-5} (A) e 1 x 10^{-4} mol L^{-1} (B) é comparada com o mesmo eletrodo modificado com$[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$.

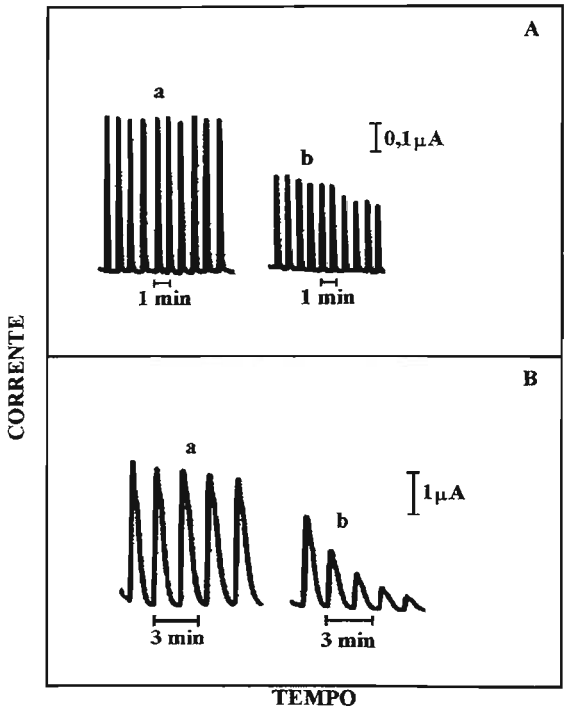


Fig. 40 – Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica para injeções consecutivas de fenol de 1 x 10^{-5} mol L^{-1} (A) e 1 x 10^{-4} mol L^{-1} (B) utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ (a) e não modificado (b). E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}. Vazão = 0,8 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 130 μL. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Alguns estudos sugerem que a reação de oxidação do fenol produz como intermediário o radical fenoxil (equação 10), que é adsorvido sobre a superfície do eletrodo [147, 151-153]. A forte interação entre os radicais adsorvidos, levando a formação de dímeros, oligômeros e polímeros, também é considerada [152].

$$C_6H_5OH \leftrightarrow C_6H_5O^{\bullet} + H^{+} + e \quad (10)$$

Alguns mecanismos para a oxidação primária de fenol têm sido propostos. Geralmente, assume-se que a molécula de fenol é diretamente oxidada sobre o eletrodo produzindo radicais fenoxil, que posteriormente são oxidados até formarem quinonas, ou ainda, acoplam-se seguidos por rearranjos intra-moleculares resultando em produtos diméricos eletroativos ou longas cadeias poliméricas [142, 151, 152].

Outros autores consideram que durante a oxidação eletroquímica do fenol em solução aquosa, os radicais fenoxil possam ser formados a partir do ataque de radicais hidroxila (provenientes da descarga das moléculas de água junto a superfície do anodo), sobre a molécula de fenol [154], como a seguir:

$$C_6H_5OH + OH^{\bullet} \rightarrow C_6H_5O^{\bullet} + H_2O \quad (11)$$

Esta reação somente ocorre com o desprendimento simultâneo de oxigênio [154]. Os radicais fenoxil adsorvidos podem sofrer uma subsequente oxidação para formar os cátions fenoxônios (eq. 12), que tanto reagem com a água formando quinonas (eq. 13), como com o fenol produzindo dímeros e por fim, polímeros (eq. 14) [152, 154].

$$C_6H_5O^{\bullet} \rightarrow C_6H_5O^{\bullet +} + e \quad (12)$$

$$C_6H_5O^{\bullet +} + H_2O \rightarrow C_6H_4(OH)_2 + H^{+} \quad (13)$$

$$C_6H_5O^{\bullet} + C_6H_5O^{\bullet} \rightarrow \text{dímeros (polímeros)} \quad (14)$$

O aumento da concentração inicial de fenol favorece o acoplamento dos radicais intermediários, promovendo a formação de um filme sobre a superfície do eletrodo que inibe a transferência de elétrons [152, 154]. Portanto, esta inibição é tanto mais forte, quanto maior a concentração inicial de fenol, como pode-se verificar na Figura 40.

O decréscimo no envenenamento do eletrodo de carbono vítreo provocado por compostos fenólicos já havia sido observado após a modificação com cobalto ftalocianinas, macromoléculas semelhantes às porfirinas [142]. O eletrodo assim modificado inibe a formação dos produtos de oxidação diméricos ou poliméricos, tornando o sensor mais estável, quando comparado com o eletrodo não modificado. Os autores sugerem que este

decréscimo no envenenamento pode ser atribuído a algum impedimento espacial causado pelas ftalocianinas, minimizando a adsorção dos produtos da reação sobre o eletrodo modificado.

É provável que, ao modificar o eletrodo com filmes de porfirinas, ocorra um comportamento semelhante ao relatado na literatura para as ftalocianinas.

As determinações de sulfito [121], nitrito [44] e NADH [6] sobre eletrodos de carbono também são relacionadas ao decréscimo gradativo de sinal com o tempo de utilização do eletrodo e a concentração do analito, provavelmente devido a processos de adsorção dos produtos das reações. Os eletrodos modificados com porfirinas, nestes casos também mostraram prevenir a passivação da superfície, produzindo respostas estáveis e lineares, como apresentado nas seções 4.1.3 e 4.1.4.

4.2.3 – Determinações de Sulfito e Nitrito Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$

Para explorar as propriedades eletrocatalíticas dos eletrodos modificados por filmes laminares de porfirinas realizou-se inicialmente a análise por injeção em fluxo de sulfito e nitrito. O comportamento eletroquímico, observado por voltametria cíclica, dos "novos" eletrodos modificados é similar ao previamente discutido para eletrodos recobertos com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Os analitos têm a onda de oxidação deslocada para a região de oxidação do Ru(II) a Ru(III) [9]. Para o sulfito, caso em que ocorre maior favorecimento, há ainda um incremento intenso no sinal de corrente.

A próxima figura exibe os resultados obtidos, utilizando análise em fluxo, na determinação de sulfito (Fig. 41A) e nitrito (Fig. 41B). Observa-se que são obtidas respostas lineares com concentrações da ordem de 10^{-6} mol L^{-1} para o sulfito e 10^{-7} mol L^{-1} para o nitrito.

A exemplo do que já foi observado para eletrodos não modificados ou modificados com filmes contendo apenas $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ [4], para os filmes laminares

constituídos por porfirinas catiônicas e aniônicas simultaneamente, também observa-se uma maior sensibilidade em relação ao nitrito.

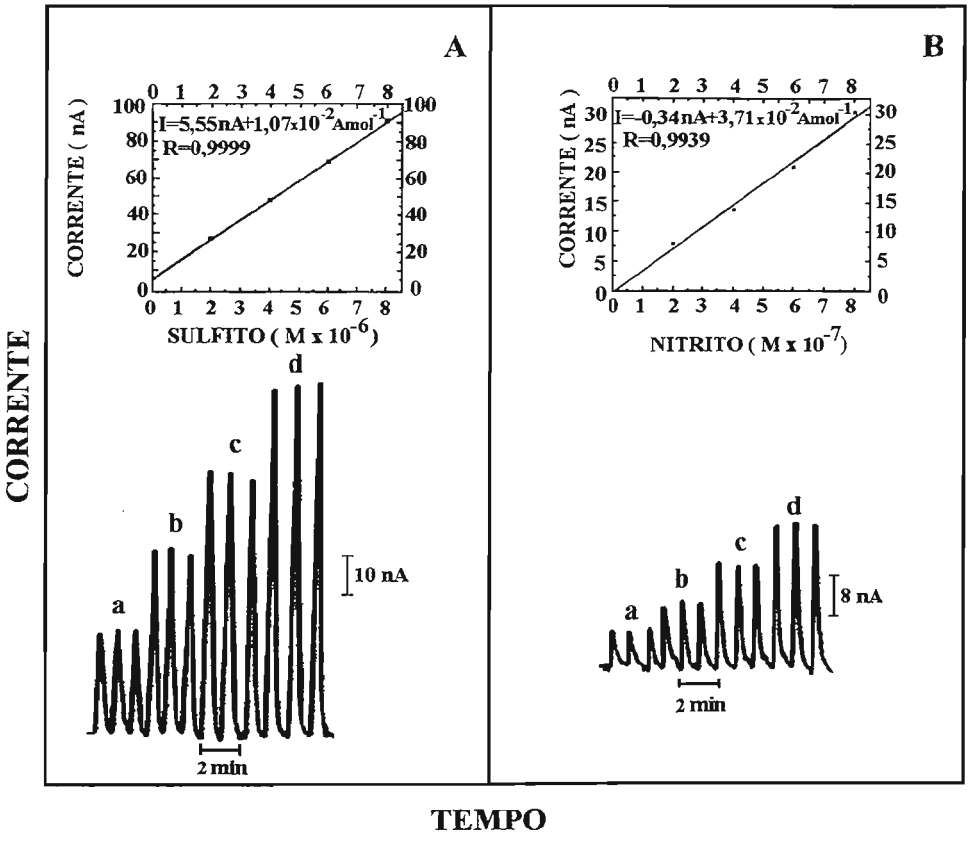


Fig. 41 - Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ para determinação de soluções de sulfito (A) com concentrações de $2x10^{-6}$ (a), $4x10^{-6}$ (b), $6x10^{-6}$ (c) e $8x10^{-6}$ mol L^{-1} (d) e de soluções de nitrito (B) contendo $2x10^{-7}$ (a), $4x10^{-7}$ (b), $6x10^{-7}$ (c) e $8x10^{-7}$ mol L^{-1} (d). E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}. Vazão = 1,0 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 150 μL. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

A comparação dos resultados apresentados nesta seção com os obtidos utilizando carbono vítreo modificado com apenas uma porfirina (Figuras 26 e 28 da seção 4.1.3), revela resultados idênticos em termos de faixa linear de resposta. Tais resultados vêm ao encontro da premissa de que há formação de camadas homogêneas para cada uma das porfirinas (layer-by-layer), pois caso houvesse intercalação da $[ZnTPPS]^{4-}$, o número de centros ativos (isto é, pares redox Ru(II)/(III)) seria menor.

4.2.4 – Determinações de Dopamina, Ácido Ascórbico e NADH Utilizando Carbono Vítreo Modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$

As respostas catalíticas do eletrodo recoberto por $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/ZnTPPS^{4-}$ nas oxidações de dopamina, ácido ascórbico e NADH, observadas por voltametria cíclica, não diferem das obtidas com o eletrodo recoberto somente com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Desta forma realizou-se ensaios em fluxo (Figura 42) para confirmar a estabilidade dos novos sensores e a faixa mínima em que se poderia trabalhar com linearidade nas respostas de corrente.

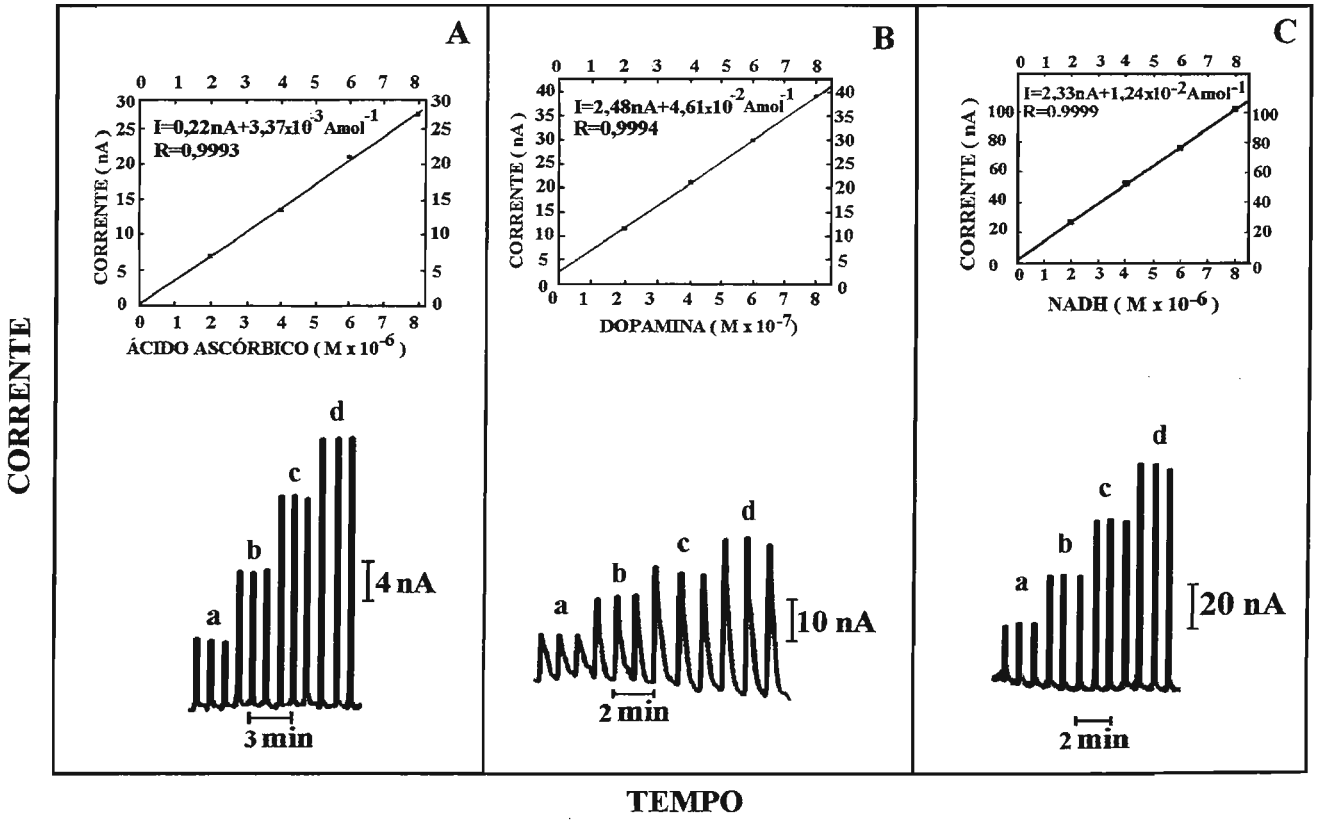


Fig. 42 - Análise em fluxo com detecção amperométrica utilizando carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ para determinação de soluções de ácido ascórbico (A) com concentrações de $2x10^{-6}$ (a), $4x10^{-6}$ (b), $6x10^{-6}$ (c) e $8x10^{-6}$ mol L^{-1} (d), de soluções de dopamina (B) contendo $2x10^{-7}$ (a), $4x10^{-7}$ (b), $6x10^{-7}$ (c) e $8x10^{-7}$ mol L^{-1} (d) e de NADH (C) com concentrações de $2x10^{-6}$ (a), $4x10^{-6}$ (b), $6x10^{-6}$ (c) e $8x10^{-6}$ mol L^{-1} (d). E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}. Vazão = 1,0 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 150 µL. Áreas dos eletrodos = 0,071 cm^2 (A) e 0,196 cm^2 (B).

Obteve-se resposta linear para o ácido ascórbico e NADH na faixa concentração de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} e para a dopamina de 2 a 8 x 10^{-7} mol L^{-1}, sendo que para este último caso a linha base apresentou-se menos estável.

Para os analitos apresentados nesta seção também obteve-se resultados compatíveis com os obtidos por análise em fluxo utilizando os eletrodos de carbono vítreo modificados somente com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$ (Figuras 31, 33 e 35 da seção 4.1.4). As concentrações nas quais obteve-se resposta linear de corrente são as mesmas obtidas anteriormente.

4.3 – Determinação de Ácido Ascórbico em Sucos e Medicamentos Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$

A determinação do teor de ácido ascórbico é de grande importância em medicamentos e alimentos. A ingestão regular de ácido ascórbico é necessária à saúde humana, uma vez que o organismo humano não é capaz de sintetizá-lo [155]. Embora ocorra naturalmente em frutas e outros alimentos, muitos produtos, como os sucos, recebem quantidades adicionais deste analito. Como aditivo, sua função é de também atuar como antioxidante. Como é facilmente oxidável, sua quantificação torna-se necessária em numerosas ocasiões.

Dentre os métodos eletroanalíticos para a determinação de ácido ascórbico destacam-se a polarografia de pulso normal [156], a voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo [157], a voltametria cíclica com eletrodo de platina modificado por poli-naftilamina [158] ou carbono vítreo revestido com filme polimérico [159], a amperometria com carbono vítreo modificado por 3,4-di-hidroxibenzaldeído [160], a amperometria com eletrodo de ouro [161] ou célula de Clark [162] e a amperometria com eletrodo composto por grafite-epóxi modificado com ftalocianina [163] ou com microeletrodos de ouro modificados com paládio [164].

No presente trabalho apresenta-se um método de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica, utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filmes

laminares contendo pares iônicos de duas ferro porfirinas: $[FeTPPS]^{4-}$ e $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}$. Os eletrodos assim modificados permitem detectar ácido ascórbico no potencial de + 0,60 V. As determinações foram realizadas com adição de padrão, na faixa de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}, em amostras de Aspirina^{+}C, Cebion e suco de laranja Parmalat. Foi utilizado o método diferencial, com tratamento de alíquotas das amostras com a enzima ascorbato oxidase contida em tecido de pepino (a enzima promove a oxidação do analito). Este procedimento foi comparado com o uso da enzima purificada (Merck) e com os valores indicados nos rótulos das amostras, como já descrito na parte experimental (seção 2.8).

A figura a seguir apresenta o sinal registrado para o eletrodo de carbono vítreo recoberto por $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ na detecção de ácido ascórbico.

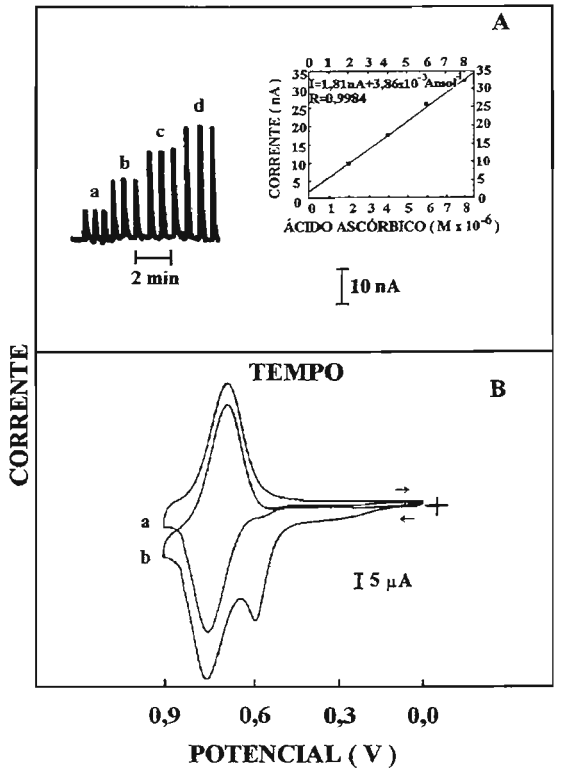


Fig.43 - Análise FIA (A) utilizando carbono vítreo modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ para determinação de soluções de ácido ascórbico 2 x 10^{-6} (a), 4 x 10^{-6} (b), 6 x 10^{-6} (c) e 8 x 10^{-6} mol L^{-1} (d). Voltamogramas cíclicos (B) do mesmo eletrodo em tampão Ac^{-}/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} (a) e solução de ácido ascórbico 1 x 10^{-3} mol L^{-1} no mesmo eletrólito (b). Para FIA: E = + 0,60 V, Vazão = 1,0 mL min^{-1} e volume de amostra injetado = 150 µL. Para voltametria: velocidade de varredura = 100 mV s^{-1}. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

O resultado é consistente com as determinações feitas anteriormente, com eletrodos modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$. Como já foi verificado, com o eletrodo modificado ocorre um pico de oxidação bem definido para o ácido ascórbico no potencial de + 0,60 V (Fig. 43Bb). Uma resposta de corrente linear em função da concentração foi obtida nos experimentos em fluxo (Fig. 43A) na faixa de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}.

Nas próximas figuras observam-se os resultados da determinação de ácido ascórbico em amostras de Aspirina^{+}C (Fig. 44), Cebion (Fig. 45) e de suco de laranja Parmalat (Fig. 46) usando tecido de pepino (B) e enzima ascorbato oxidase purificada (D), trabalhando-se com a amostra e amostra mais adições de padrão de ácido ascórbico com concentrações variando de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1} (a - e). Nas figuras, A e C referem-se à adição de padrão na amostra não tratada enzimaticamente, enquanto que B e D à adição de padrão na amostra tratada com pepino e enzima purificada, respectivamente.

As diferenças entre B e A, e D e C indicam o conteúdo de ácido ascórbico na amostra, obtida por cada um os dois métodos. Também foram realizadas as determinações das "soluções branco" de pepino e os pequenos sinais obtidos foram descontados nas análises.

Para garantir a realização adequada da adição de padrão, não havendo "consumo" do padrão adicionado de ácido ascórbico (pela ação da enzima excedente, purificada ou contida no pepino), as amostras foram aquecidas a 40 °C por 10 minutos (sob agitação) antes que as soluções padrões fossem adicionadas.

Experimentos preliminares com amostras sintéticas de ácido ascórbico foram realizados para verificar a inativação das enzimas sob estas condições. As enzimas foram aquecidas a 40 °C por 10 minutos em volume mínimo de solução tampão, quantidade suficiente apenas para obter um veículo para realização do aquecimento. Após, foram adicionadas em soluções de ácido ascórbico previamente preparadas e agitadas por 5 minutos. O sinal referente à oxidação do ácido ascórbico manteve-se o mesmo antes e após o tratamento com as enzimas inativadas (não obteve-se sinal ao utilizar enzimas não submetidas ao aquecimento).

Cada ponto nos gráficos de adição de padrão representa a média de três injeções consecutivas, como apresentado nas próximas três figuras.

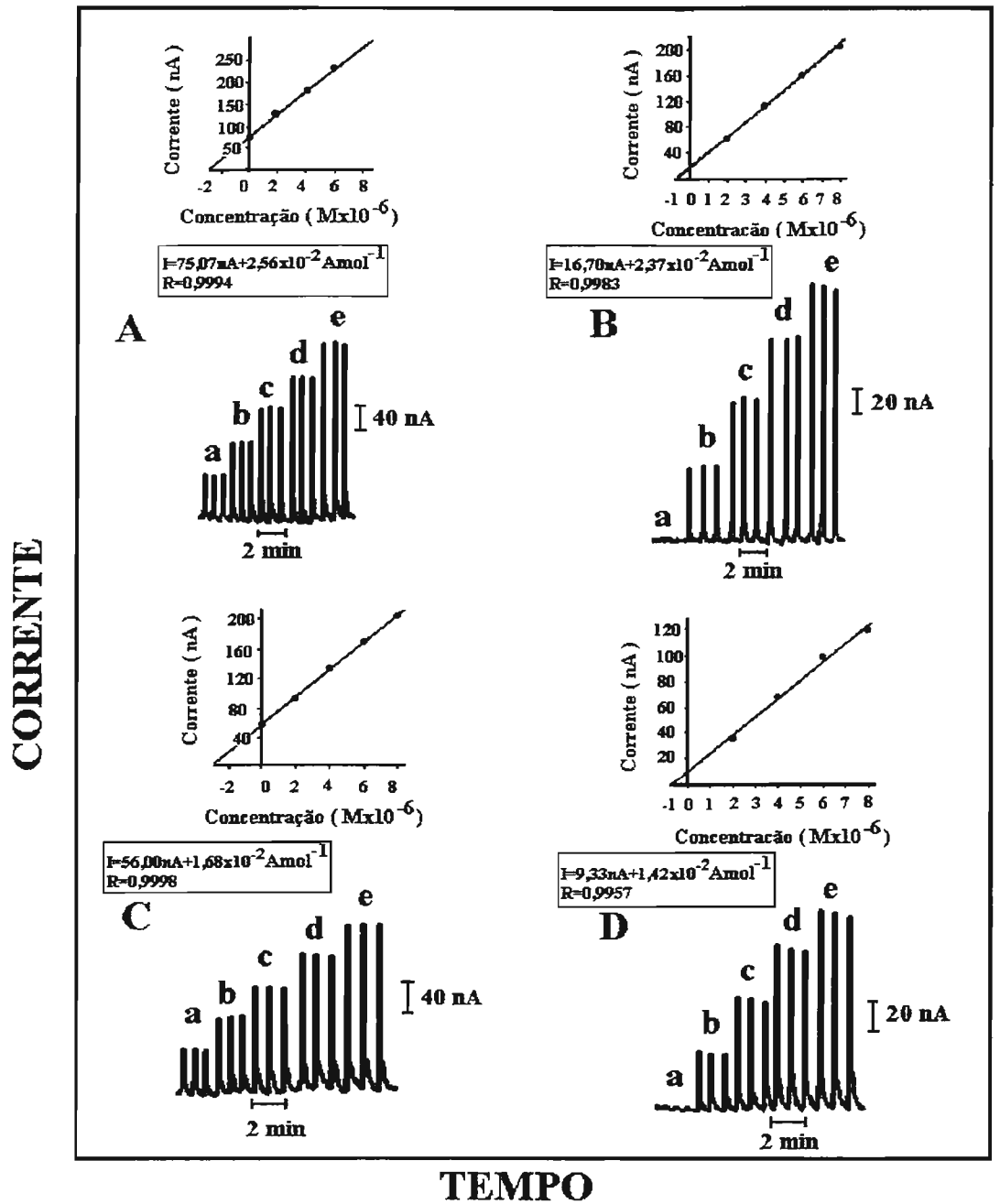


Fig. 44 - Determinação em fluxo de ácido ascórbico utilizando carbono vítreo modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ com adição de padrão em amostra de Aspirina$^+$C não tratada (A) e (C) e tratada com pepino (B) e ascorbato oxidase (D). Alíquotas da amostra receberam a adição de ácido ascórbico 2 x 10^{-6} (b), 4 x 10^{-6} (c), 6 x 10^{-6} (d) e 8 x 10^{-6} mol L^{-1} (e). As primeiras séries de injeções correspondem a amostra sem adição de padrão (Aa, Ca) e "solução branco" de pepino (Ba) e de ascorbato oxidase (Da). E = + 0,60 V, vazão = 0,8 mLmin^{-1}, volume de amostra injetado = 150 µL e carregador = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

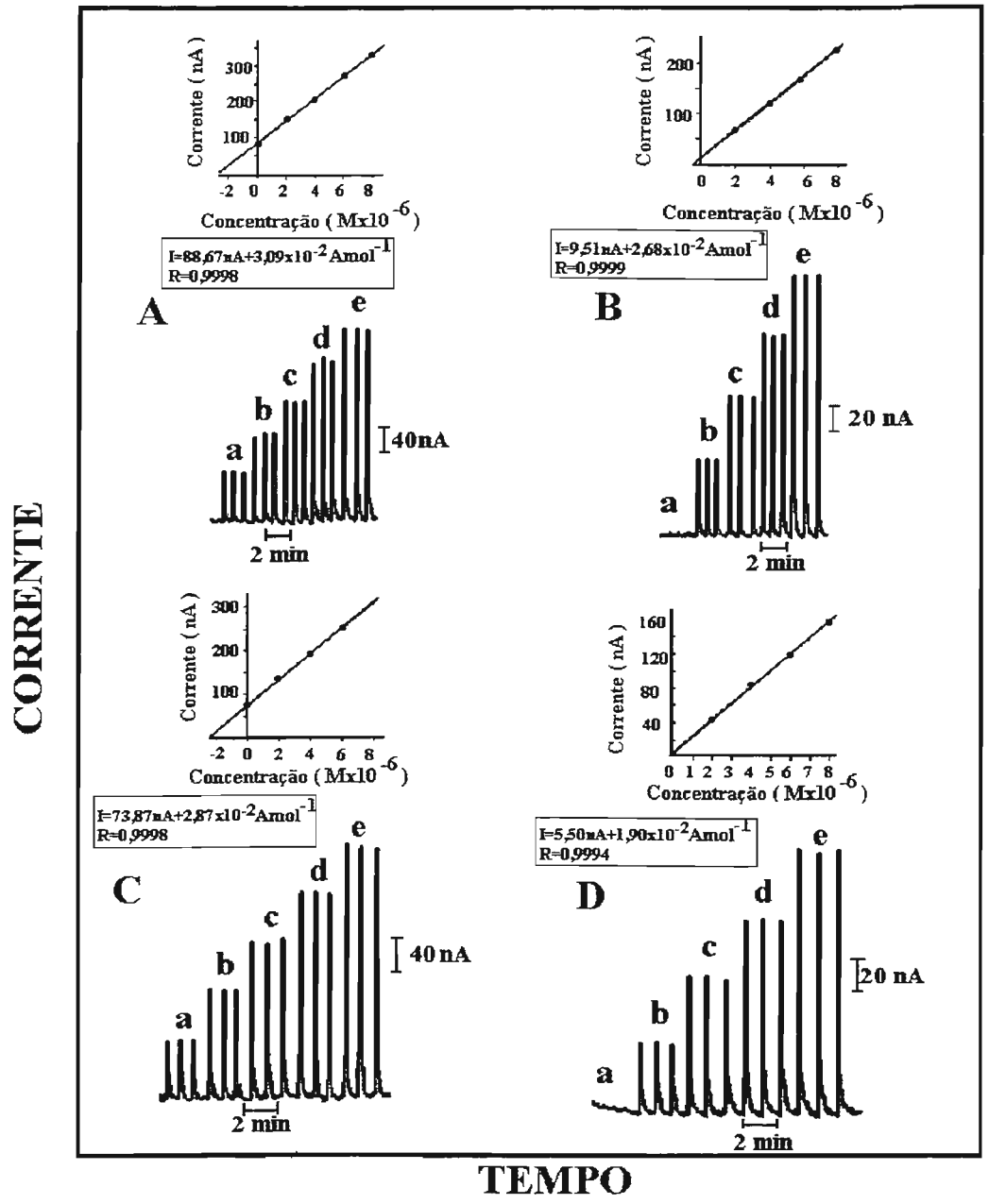


Fig. 45 - Determinação em fluxo de ácido ascórbico utilizando carbono vítreo modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ com adição de padrão em amostra de Cebion não tratada (A) e (C) e tratada com pepino (B) e ascorbato oxidase (D). Alíquotas da amostra receberam a adição de ácido ascórbico 2 x 10^{-6} (b), 4 x 10^{-6} (c), 6 x 10^{-6} (d) e 8 x 10^{-6} mol L^{-1} (e). As primeiras séries de injeções correspondem a amostra sem adição de padrão (Aa, Ca) e "solução branco" de pepino (Ba) e de ascorbato oxidase (Da). E = + 0,60 V, vazão = 0,8 mL min^{-1}, volume de amostra injetado = 150 µL e carregador = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

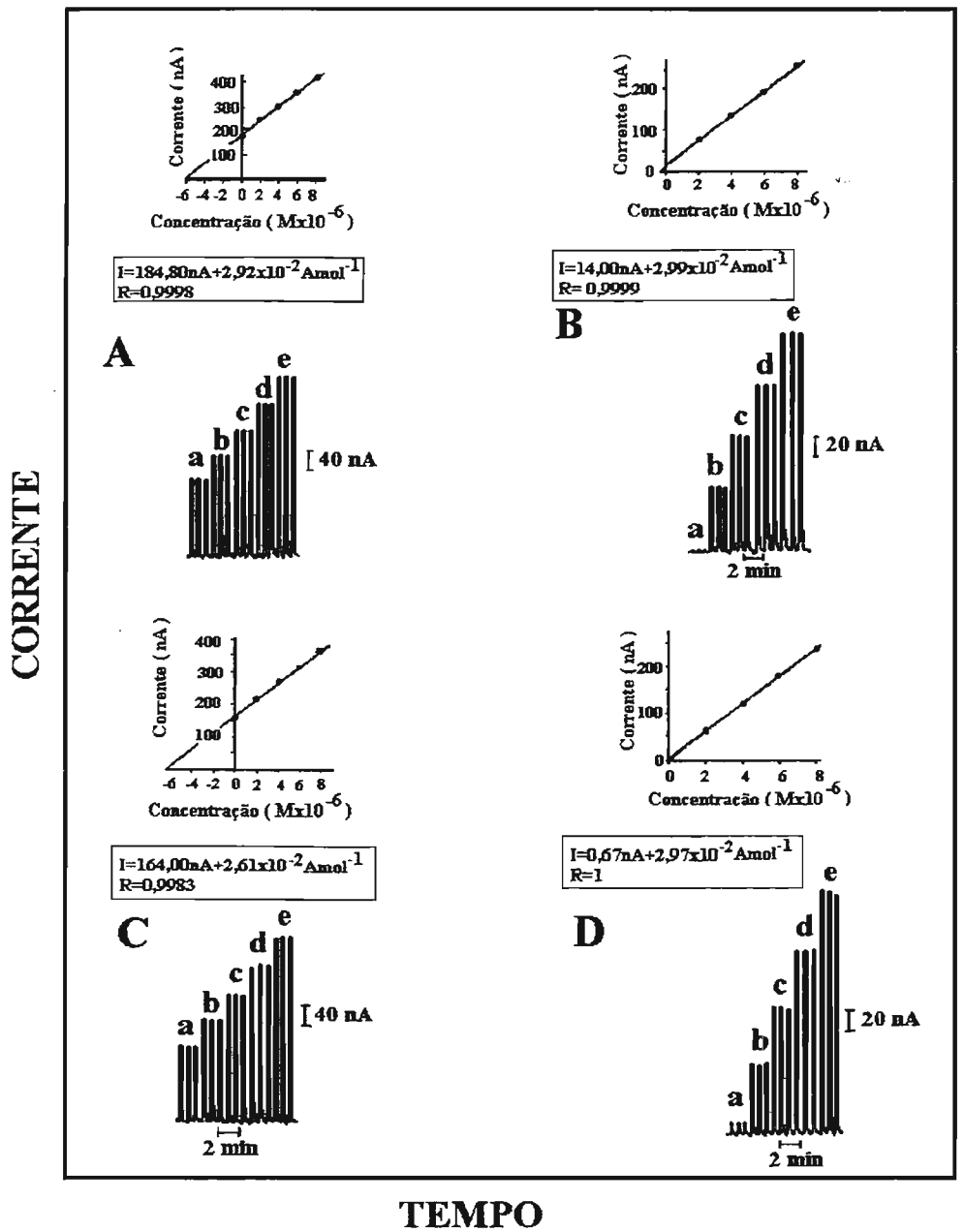


Fig. 46 - Determinação FIA de ácido ascórbico utilizando carbono vítreo modificado com $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ com adição de padrão em amostra de suco de laranja Parmalat não tratada (A) e (C) e tratada com pepino (B) e ascorbato oxidase (D). Alíquotas da amostra receberam a adição de ácido ascórbico 2×10^{-6} (b), 4×10^{-6} (c), 6×10^{-6} (d) e 8×10^{-6} mol L^{-1} (e). As primeiras séries de injeções correspondem a amostra sem adição de padrão (Aa, Ca) e "solução branco" de pepino (Ba) e de ascorbato oxidase (Da). E = + 0,60 V, vazão = 0,8 mL min^{-1}, volume de amostra injetado = 150 µL e carregador = tampão acetato pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}.

Os resultados obtidos nas determinações descritas nas páginas anteriores estão resumidos na tabela a seguir:

Tabela 3 - Teor de ácido ascórbico (A.A.) encontrado em amostras de Cebion, Aspirina^{+}C e suco de laranja Parmalat em análises FIA utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[FeTPPS]^{4-}$ e $[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}$.

Amostra	Conteúdo de A.A. encontrado com enzima (mg)	Conteúdo de A.A. encontrado com pepino (mg)	Conteúdo de A.A. indicado na embalagem (mg)
Cebion	900 ± 31 *	990 ± 32 *	1000 *
Aspirina^{+}C	270 ± 7 *	240 ± 6 *	240 *
Suco de Laranja Parmalat	55 ± 3 **	52 ± 1 **	38 **

* Massa de ácido ascórbico contida em uma pastilha.
** Massa de ácido ascórbico contida em 100 mL.

Como pode ser visto, os resultados obtidos são bastante concordantes entre os dois métodos e com os valores indicados nos rótulos das amostras, exceto os obtidos para o suco de laranja. Vale lembrar que o fabricante deve encomendar grandes lotes de embalagens e as cargas da fruta que recebe são de produtores diferentes e de regiões distintas, fazendo que o teor de ácido ascórbico varie significantemente. O valor encontrado na embalagem possivelmente corresponde ao valor mínimo que certamente estará presente no suco.

Outro fato observado é que os valores dos coeficientes lineares resultantes do tratamento com pepino (Figuras 44 a 46) são superiores aos obtidos com a enzima comercial. Isto indica que o tecido de pepino contém outras substâncias eletroativas além do ácido ascórbico, mas que não comprometem as medidas por ser a ascorbato oxidase seletiva ao ácido ascórbico.

Com a determinação de ácido ascórbico em sucos e em fármacos, comprova-se a aplicabilidade dos eletrodos modificados associados à análise em fluxo para a aplicação em amostras reais. Para viabilizar ainda mais a sua utilização em análise de rotina, poderia ser implementado o uso de um reator enzimático (enzimas imobilizadas ou mesmo tecido vegetal), possibilitando a realização de numerosas análises por hora.

A comparação do procedimento realizado com algum outro método (como por exemplo com a coulometria) é sugerido como proposta de continuidade do trabalho.

4.4 – Determinação de SO_2 em Amostras de Vinho Utilizando Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/ $[ZnTPPS]^{4-}$

Sulfito, dióxido de enxofre e metabissulfito de sódio são comumente utilizados na indústria de alimentos como conservantes. Seu uso é permitido na produção de vários alimentos como vinhos, sucos e frutas desidratadas. Sua função é atuar como anti-oxidante, prevenir o crescimento bacteriológico e o descoloramento ou escurecimento dos alimentos.

No vinho, o SO_2 é encontrado ligado principalmente a aldeídos e pigmentos fenólicos ou na forma livre, como SO_2, HSO_3^- e SO_3^{2-}, sendo o SO_2 responsável pelas propriedades anti-sépticas [165, 166]. O controle da quantidade de conservante adicionado ao vinho é importante, pois um excesso pode afetar o aroma e sabor da bebida, além de provocar danos a saúde humana levando a alergias, irritações no estômago, vômitos e diarréia [167].

Algumas regulamentações governamentais limitam apenas o teor de SO_2 total em alimentos, como a soma das formas ligada e livre. Entretanto, para os enologistas o principal interesse é quantificar o SO_2 livre, pois a combinação desta espécie com aldeídos ou pigmentos reduz o poder bactericida e anti-oxidante do SO_2.

O método oficial da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para determinação de dióxido de enxofre em vinhos é o método da destilação de Monier-Williams que quantifica o SO_2 total [168]. A análise consiste na destilação do SO_2 liberado em meio ácido sob atmosfera inerte (arraste com nitrogênio) e posterior oxidação a íon sulfato com H_2O_2 (solução coletora). A determinação do conteúdo de SO_2 é diretamente relacionada com o H_2SO_4 gerado, que é determinado por titulação com solução de NaOH padronizada ou, alternativamente, gravimetricamente como $BaSO_4$. O procedimento de Monier-Williams é bastante trabalhoso e consome um tempo elevado de análise.

Mesmo sujeito a algumas fontes de erros, a titulação iodométrica é um método comumente utilizado em muitos países e tem sido aceito como um bom método de análise industrial [169]. O método, mais rápido do que o de Monier-Williams, permite a determinação de ambos, SO_2 livre e total, sendo a análise de vinhos tintos sujeita a maiores fontes de erros. Uma grande dificuldade para se obter resultados precisos por este

procedimento deve-se a diferenças na interpretação visual do ponto final, principalmente em amostras escuras.

O método desenvolvido nesta tese para a determinação de sulfito em vinhos se constitui em alternativa interessante. Baseia-se na injeção da amostra em um fluxo fortemente ácido, com posterior separação do SO_2 liberado da solução em um módulo de difusão de gás. O analito é coletado no fluxo de eletrólito suporte e quantificado com auxílio de um eletrodo de carbono vítreo modificado com $CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/ $[ZnTPPS]^{4-}$. Para efeito de comparação, o teor de SO_2 livre e total das amostras de vinhos também foram determinados por titulação iodométrica.

A seguir serão apresentados os principais aspectos explorados para a otimização do sistema em fluxo utilizado para a quantificação de SO_2 em vinhos.

4.4.1 – Otimização das Variáveis FIA para a Determinação de SO_2 em Amostras de Vinho

Nos estudos de otimização das variáveis do sistema FIA para a determinação de SO_2, as faixas de investigação de cada parâmetro foram escolhidas em função de estudos existentes na literatura [170-175].

No módulo de difusão em fluxo, o dióxido de enxofre é gerado pelo contato da solução amostra com um fluxo carregador de ácido sulfúrico. A concentração de ácido na qual obteve-se um sinal máximo de corrente (conversão de sulfito a SO_2) foi de 2,0 mol L^{-1} (Fig. 47A). O sinal analítico para injeções consecutivas de sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} aumentou proporcionalmente com o volume injetado, 50, 100 e 150 μL (Fig. 47B).

O efeito do comprimento da bobina de mistura também foi avaliado. Um decréscimo no sinal foi observado quando o comprimento do tubo (ϕ = 0,7 mm), utilizado para fazer a bobina, foi gradualmente aumentado de 20 a 80 cm, refletindo uma proporcional dispersão da zona da amostra. O uso de 20 cm de comprimento de bobina levou a um sinal mais elevado de corrente, entretanto a resposta foi muito instável (Fig. 48A). Um bom compromisso entre a intensidade do sinal de corrente e a estabilidade foi obtido pelo ajuste do comprimento para 30 cm.

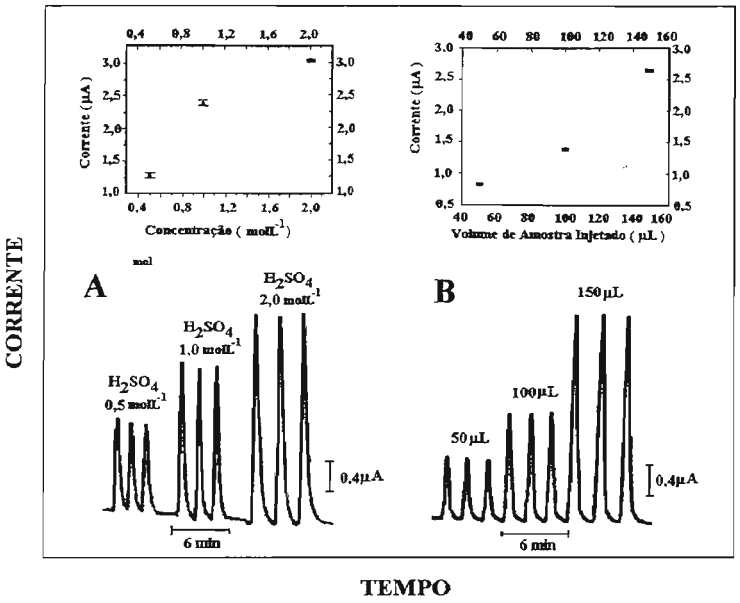


Fig. 47 - Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$. Injeções consecutivas de solução de sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} em diferentes concentrações de H_2SO_4 (A) e utilizando diferentes volumes de amostra (B). E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}, vazões = 1,5 $mLmin^{-1}$ e comprimento da bobina = 30 cm (ϕ=0,7 mm). Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

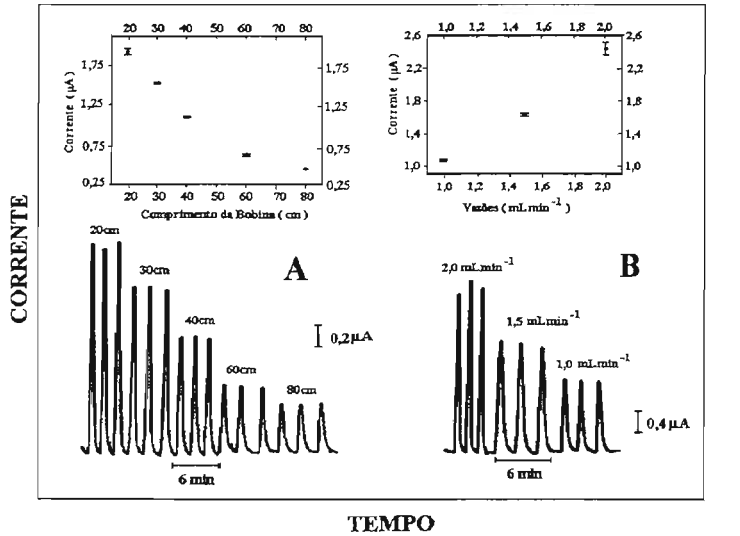


Fig. 48 - Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$. Injeções consecutivas de solução de sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} empregando diferentes comprimentos de bobina (A). Variações nas vazões também foram testadas (B). E = + 0,90 V, eletrólito = tampão acetato pH = 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Analogamente, aumentando-se simultaneamente as vazões em ambos os canais, variando de 1,0 a 2,0 mL min^{-1}, obteve-se um aumento no sinal, mas um decréscimo na repetibilidade, como apresentado na Figura 48B. O melhor compromisso foi obtido a 1,5 mL min^{-1}. Em experimentos preliminares observou-se uma maior eficiência na resposta do sistema empregando-se a mesma vazão em ambos os canais (carregador e receptor).

O sistema otimizado levou às seguintes condições:

- concentração de H_2SO_4 = 2,0 mol L^{-1}
- volume de amostra injetado = 150 μL
- comprimento da bobina = 30 cm
- fluxo dos carregadores = 1,5 mL min^{-1}

Um parâmetro adicional verificado foi a repetibilidade do sistema. Para uma série de dez injeções de uma solução de sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} obteve-se um valor médio de corrente de 750,9 nA com um desvio padrão de 14,3 nA (desvio padrão relativo de 1,9 %).

Outros fatores estudados foram o coeficiente de dispersão deste sistema (D) e o limite de detecção. O valor de D foi estimado utilizando-se, primeiramente, uma solução de sulfito 1 x 10^{-3} mol L^{-1} (em H_2SO_4 2 mol L^{-1}) como solução carregadora, que ficava fluindo continuamente no sistema. Desta forma, obteve-se um sinal contínuo de corrente (C^0). Após, utilizou-se uma solução de sulfito na mesma concentração (em água), que foi consecutivamente injetada no fluxo de solução carregadora H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}, obtendo-se picos de corrente ($C^{máx}$). O valor obtido para o sistema foi de 1,3, indicando uma baixa dispersão da amostra. O limite de detecção calculado foi de 3 x 10^{-6} mol L^{-1}, correspondendo à quantidade de analito que gera uma corrente 3 vezes maior do que o sinal de fundo (ruído).

Com o sistema otimizado passou-se para a determinação de SO_2 em amostras de vinho. A análise de vinho branco seco (Forestier) foi realizada usando tanto o método da curva analítica como da adição de padrão. Os resultados obtidos para o teor de SO_2 foram muito próximos, 16,4 mg L^{-1} com curva analítica e 17,0 mg L^{-1} com auxílio da adição de padrão. Comparando-se as duas metodologias, a linearidade obtida para a adição de padrão foi um pouco melhor, o que justificou o uso deste método no decorrer dos estudos. A próxima figura contém um conjunto típico de picos obtidos quando o método de adição de padrão foi utilizado. Provavelmente, erros de ordem experimental comprometeram um

pouco a linearidade da curva analítica frente ao outro método, mas em análise de rotina seria possível a sua utilização.

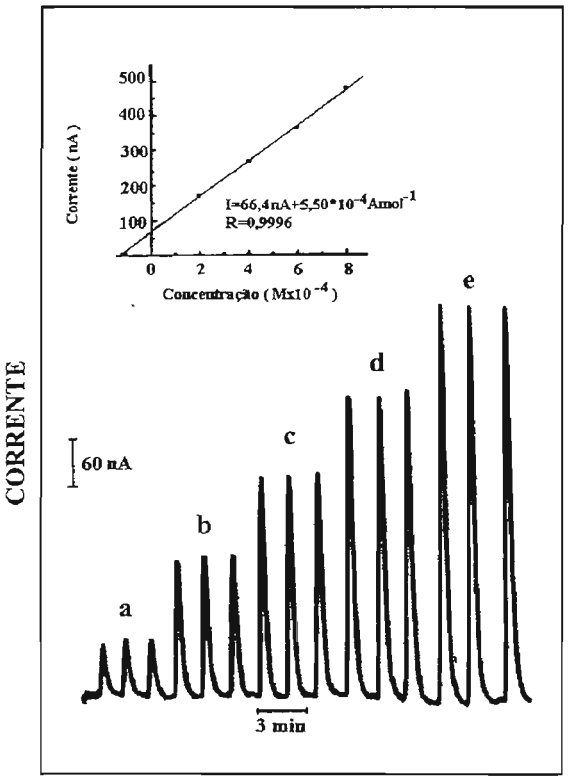
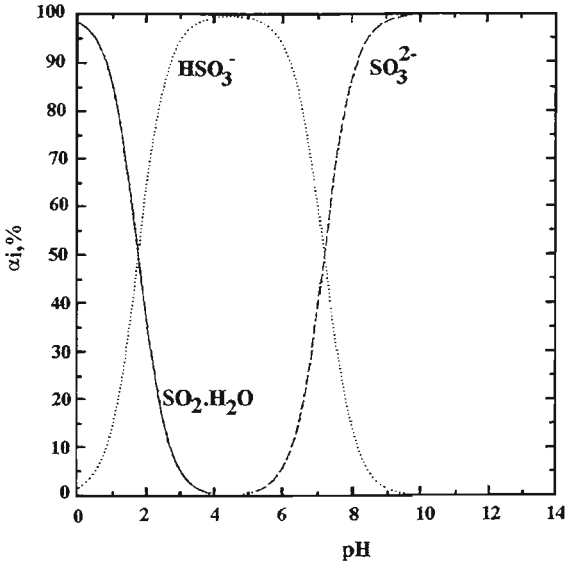


Fig. 49 - Determinações em fluxo de SO_2 utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ aplicando método de adição de padrão em amostra de vinho branco Forestier. A seqüência de picos indica injeções da amostra (a) e de amostras que receberam adições de solução 2×10^{-4} (b), 4×10^{-4} (c), 6×10^{-4} (d) e 8×10^{-4} mol L^{-1} (e) de sulfito. E = + 0,9 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc (0,10 mol L^{-1}) pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}, carregador da amostra = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}, vazão = 1,5 mL min^{-1}, volume de amostra = 150 μL e comprimento da bobina = 30 cm (ϕ= 0,7 mm). Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Nos estudos envolvendo a determinação de SO_2 em vinhos foram utilizados padrões de sulfito. No valor de pH utilizado no eletrólito para a detecção (pH 4,7), o analito encontra-se principalmente na forma de bissulfito, como pode ser visto no diagrama de distribuição de espécies em função do pH (Fig. 50). Para confirmar que não haveria diferenças entre a utilização de sulfito ou bissulfito de sódio, foram realizadas análises FIA usando os dois reagentes na mesma concentração, como apresentado na Figura 51.

Observa-se, por esta figura, que nos dois casos foram obtidos sinais de mesma grandeza, o que justifica o uso de solução de sulfito como padrão.



$SO_{2(g)} + H_2O \leftrightarrow SO_2.H_2O$

$SO_2.H_2O \leftrightarrow H^+ + HSO_3^-$ $\quad K_{a1} = 1,3 \times 10^{-2}$

$HSO_3^- \leftrightarrow H^+ + SO_3^{2-}$ $\quad K_{a2} = 5,6 \times 10^{-8}$

Fig. 50 - Diagrama de distribuição de espécies para sulfito em função do pH.

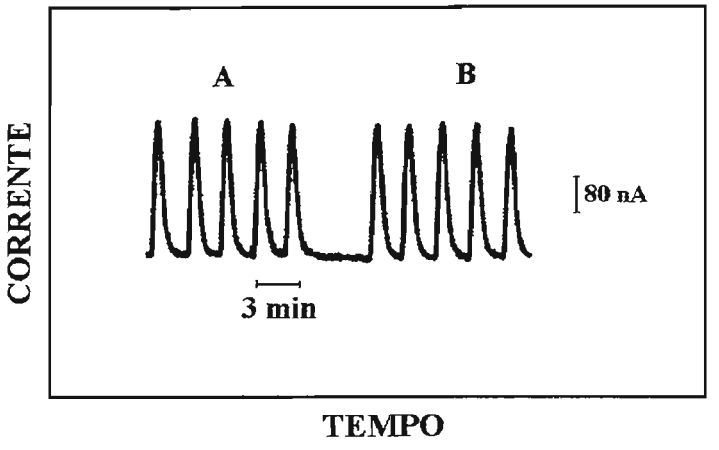


Fig. 51 - Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl]_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$. Injeções consecutivas de soluções de bissulfito de sódio 1×10^{-3} mol L^{-1} (A) e sulfito 1×10^{-3} mol L^{-1} (B) . E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc (0,10 mol L^{-1}) pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume de amostra injetado = 150 μL e vazões de 1,5 mL min^{-1} . Comprimento das bobinas = 30 cm (ϕ = 0,7 mm). Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Para verificar se haveria a influência da matriz do vinho na determinação de SO_2 utilizando-se o sistema FIA, realizou-se a análise de uma amostra de vinho caseiro, o qual não continha nenhum tipo de conservante (Fig. 52). Não se obteve nenhum sinal, o que sugere que o sistema de difusão de gás associado ao sistema FIA é suficientemente seletivo, minimizando a interferência de outros componentes desta amostra durante a detecção.

Finalizados os estudos de otimização dos parâmetros do sistema, partiu-se para a determinação de SO_2 livre e total em amostras de vinhos comercialmente disponíveis. Na próxima seção serão apresentados os resultados obtidos nestas análises.

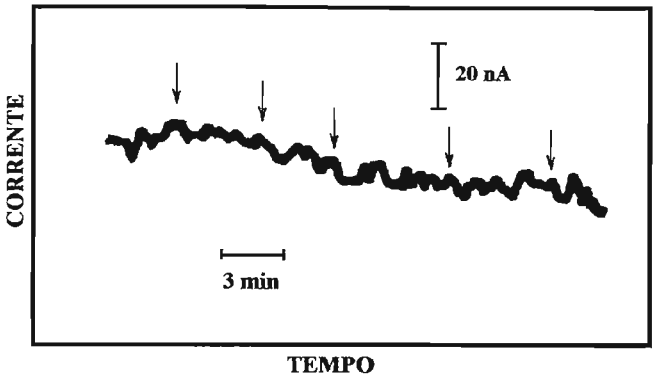


Fig. 52 - Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica utilizando carbono vítreo modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$. Injeções consecutivas de 150 μL de amostra de vinho tinto caseiro. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc (0,10 mol L^{-1}) pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}, vazões de 1,5 mL min^{-1} e comprimento das bobinas = 30 cm (ϕ = 0,7 mm). Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

4.4.2 – Determinação de SO_2 Livre e Total em Amostras de Vinho

Para avaliar o método proposto na determinação de SO_2 foram utilizados diferentes tipos de vinhos com variadas composições e cores. A determinação de SO_2 livre foi realizada utilizando o método da adição de padrão de sulfito sobre alíquotas das amostras. Neste caso, as amostras não sofreram tratamento prévio. A determinação de SO_2 total também foi realizada com auxílio de adição de padrão, porém as amostras foram submetidas previamente à hidrólise alcalina (promovendo a liberação do SO_2 que encontra-se ligado a aldeídos e/ou derivados fenólicos [165, 166]). Todas as determinações foram

realizadas na faixa de 2 a 8 x 10^{-4} mol L^{-1}, sendo que diferentes alíquotas das distintas amostras receberam as adições de padrão, em função dos teores de SO_2 contidos nas mesmas.

A seguir serão ilustrados os resultados da determinação em fluxo de SO_2 livre (A) e total (B) em vinhos branco seco Forestier (Fig. 53), branco suave Château Duvalier (Fig. 54) e tinto seco Château Duvalier (Fig. 55).

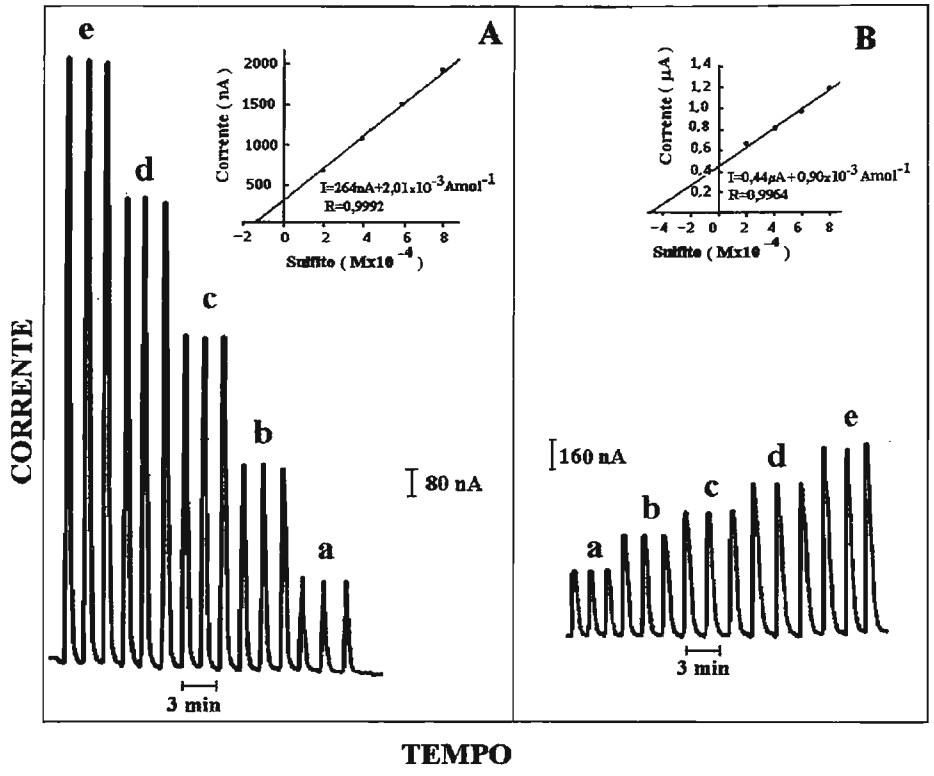


Fig. 53– Determinações em fluxo de SO_2 livre (A) e total (B) em vinho branco seco Forestier usando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{4-}$ utilizando o método de adição de padrão na amostra. As séries de injeções referem-se à amostra (a) e amostras contendo adições de sulfito de 2 x10^{-4} (b), 4 x10^{-4} (c), 6 x10^{-4} (d) e 8 x10^{-4} mol L^{-1} (e). E= + 0,9 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc (0,10 mol L^{-1}) pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,2 mol L^{-1}, carregador da amostra = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}, vazões = 1,5 mL min^{-1}. Volume de amostra = 150 µL e comprimento da bobina de 30 cm (ϕ = 0,7 mm). Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Cabe salientar que, para obter os teores de SO_2 contidos nas amostras, os valores obtidos nos gráficos devem ser corrigidos em função das diferentes diluições que cada amostra sofreu.

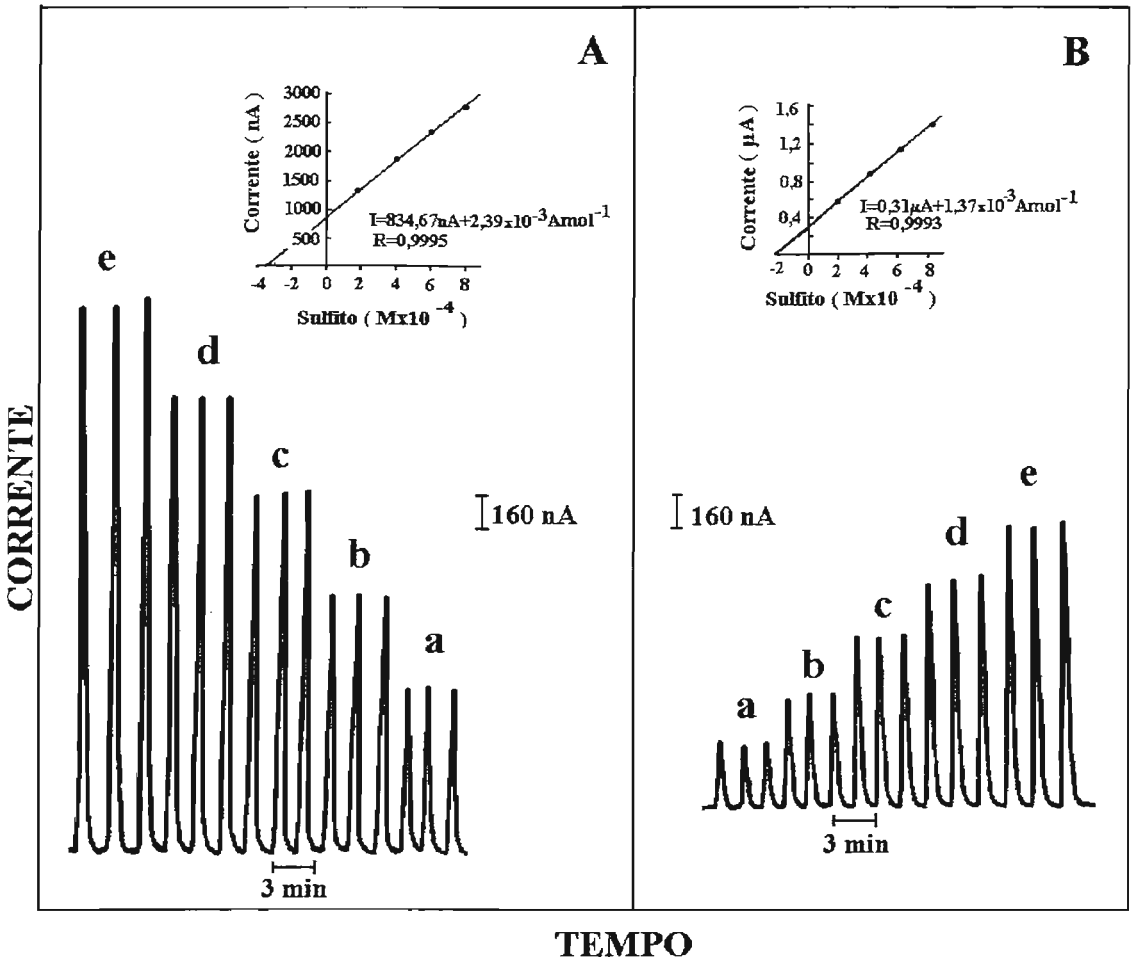


Fig. 54 - Determinações em fluxo de SO_2 livre (A) e total (B) em vinho branco suave Château Duvalier usando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{3-}$ utilizando o método de adição de padrão na amostra. As séries de injeções referem-se à amostra (a) e amostras contendo adições de sulfito 2 $x10^{-4}$ (b), 4 $x10^{-4}$ (c), 6 $x10^{-4}$ (d) e 8 $x10^{-4}$ mol L^{-1} (e). E = + 0,9 V, eletrólito = tampão acetato (0,10 mol L^{-1}) pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}, carregador da amostra = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}, vazões = 1,5 mL min^{-1}. Volume de amostra = 150 µL e comprimento da bobina de 30 cm (ϕ = 0,7 mm). Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Nas figuras apresentando as análises de vinhos, cada ponto nos gráficos de adição de padrão representa a média de três injeções consecutivas.

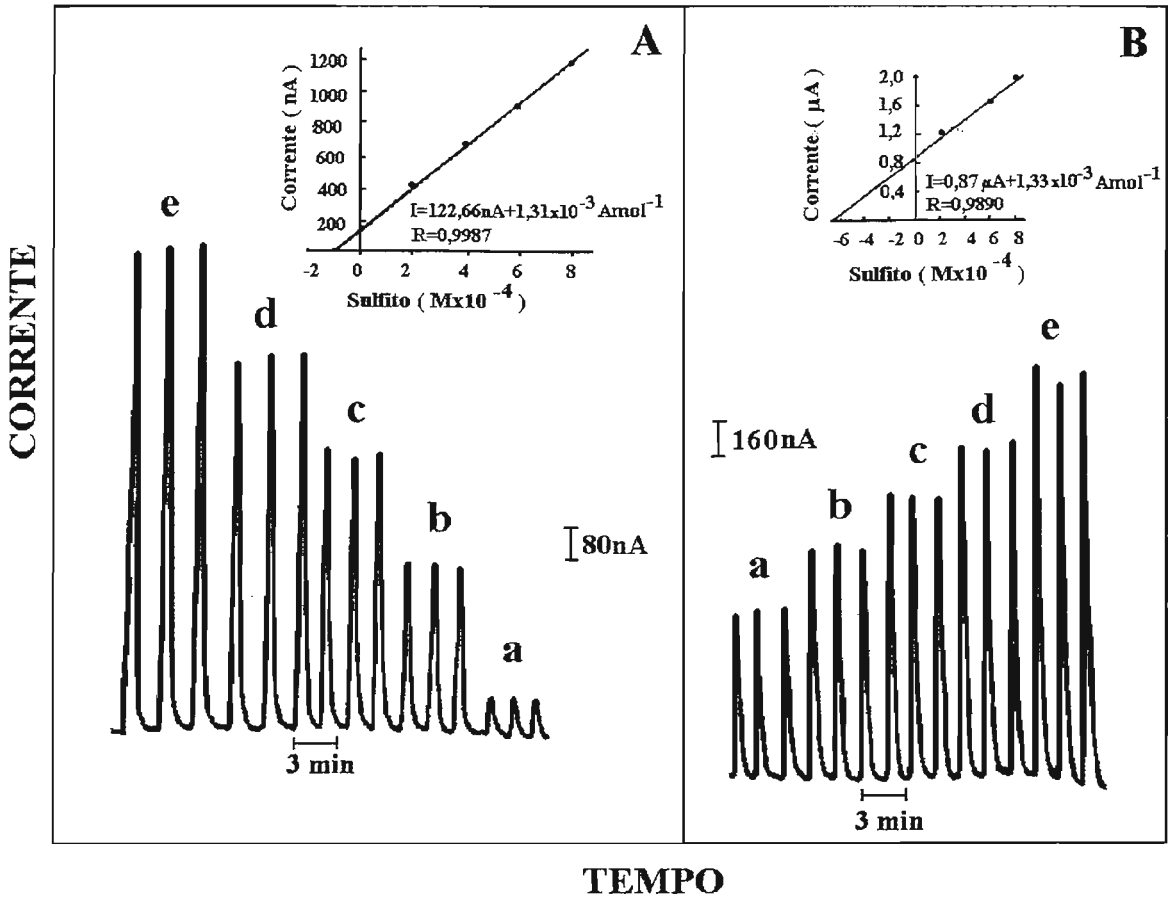


Fig. 55 - Determinações em fluxo de SO_2 livre (A) e total (B) em amostra de vinho tinto seco Château Duvalier usando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[CoTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[ZnTPPS]^{3-}$ utilizando adição de padrão na amostra. As séries de injeções referem-se à amostra (a) e amostras contendo adições de sulfito 2 $x10^{-4}$ (b), 4 $x10^{-4}$ (c), 6 $x10^{-4}$ (d) e 8 $x10^{-4}$ mol L^{-1} (e). E = + 0,9 V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc (0,10 mol L^{-1}) pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1}, carregador da amostra = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}, vazões = 1,5 mL min^{-1}. Volume de amostra = 150 µL e comprimento da bobina de 30 cm (ϕ = 0,7 mm). Área do eletrodo = 0,071 cm^2.

Durante estes estudos, tomou-se o cuidado de realizar algumas injeções das soluções mais concentradas, seguidas das mais diluídas (e vice-versa) para comprovar que não há "memória de sinal" no sistema.

Para efeito de comparação, os teores de SO_2 livre e total também foram determinados por titulação iodométrica, método comumente utilizado em análise industrial,

conforme procedimento detalhado na parte experimental (3.10). Os resultados obtidos utilizando ambos os métodos estão resumidos na tabela a seguir.

Tab. 4 - Teores de SO_2 livre e total obtidos em amostras de vinhos comerciais pelo método FIA proposto e por titulação iodométrica.

Amostra	SO_2 livre (mg L^{-1})		SO_2 total (mg L^{-1})	
	FIA	Iodometria	FIA	Iodometria
Vinho Branco Seco Forestier	16,8 ± 0,2	18,9 ± 0,7	62,6 ± 0,9	60,0 ± 6,2
Vinho Branco Suave Château Duvalier	44,7 ± 0,5	46,4 ± 1,5	70,9 ± 1,6	69,9 ± 9,7
Vinho Tinto Seco Château Duvalier	12,0 ± 0,3	12,9 ± 0,9	83,7 ± 1,6	82,1 ± 7,7

Os resultados obtidos entre os dois procedimentos possuem uma razoável concordância. Comparando-se os valores obtidos por sistema FIA com um método convencional para a análise de vinhos, percebe-se que os teores de SO_2 livre foram um pouco mais baixos do que os obtidos por titulação. Tal fato pode ter ocorrido em função das discrepâncias inerentes à titulação. A análise iodométrica realizada seguiu procedimento descrito na literatura [115, 116], presumindo-se serem estas as melhores condições de trabalho. Por ser um método diferencial, é provável que as condições em que foram realizados os tratamentos com formaldeído não tenham sido eficientes, levando a um valor de SO_2 livre superior ao "real".

Já nos casos da quantificação de SO_2 total, os valores obtidos por FIA são menores do que os obtidos por iodometria. Aqui, o procedimento da titulação apresenta eventuais fontes de erros. É possível que o tratamento com hidróxido e posteriormente com formaldeído sugeridos pela literatura não estejam otimizados. Por exemplo, sugere-se adicionar 10 mL de NaOH 25 % a 50 mL de amostra para obtenção de SO_2 total. Logo após, acrescentar 10 mL do aldeído e prosseguir com a titulação. Porém, sabe-se que em meio fortemente alcalino, é favorecida a decomposição do aducto formado com o sulfito.

Nas análises realizadas, procurou-se contornar o problema adicionando à amostra alcalinizada, 10 mL de H_2SO_4 (1+3) antes de acrescentar o formaldeído. Talvez estas condições não sejam, ainda, as mais adequadas. Isto explicaria a obtenção de valores um pouco inferiores na titulação, comparando com os alcançados com o método em fluxo, que permite a determinação direta do sulfito contido na amostra (neste caso não se trata de um método diferencial).

Para todas as amostras analisadas, os resultados obtidos demonstram que o teor de dióxido de enxofre encontra-se dentro do limite permitido, ou seja, SO_2 livre abaixo de 0,005 % m/m (50 ppm) e SO_2 total de 0,04 % m/m (400 ppm).

Como pôde ser visto, o método proposto pode ser facilmente aplicado a um elevado número de amostras. Ele apresenta vantagens em relação aos procedimentos titulométricos convencionais, que consomem tempo e apresentam dificuldades associadas a detecção do ponto final (especialmente no caso de vinhos tintos).

4.5 – Estudos Preliminares Envolvendo Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados com $[FeTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$

Dando continuidade aos estudos de sensores contendo filmes laminares de porfirinas, foi iniciada investigação utilizando eletrodos modificados com $[FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$. Primeiramente realizou-se experimentos com NADH, analito que já havia sido estudado anteriormente. A Figura 56 mostra os resultados das determinações em fluxo obtidos para soluções de NADH na faixa de 2 a 8 x 10^{-6} mol L^{-1}, no potencial de + 0,75 V. O item B da figura ilustra o comportamento voltamétrico do eletrodo modificado em eletrólito suporte (a) e em solução de NADH 1 x 10^{-3} mol L^{-1} (b).

Observa-se que os efeitos catalíticos desta nova combinação de porfirinas é semelhante ao das demais já testadas anteriormente, confirmando que os sítios ativos destas moléculas são os átomos de rutênio. Partiu-se, então, para o estudo de novos analitos e foram obtidos resultados satisfatórios para a oxidação de norefedrina, hidrazina e peróxido de cálcio, como apresentados nas Figuras 57, 58 e 59, respectivamente.

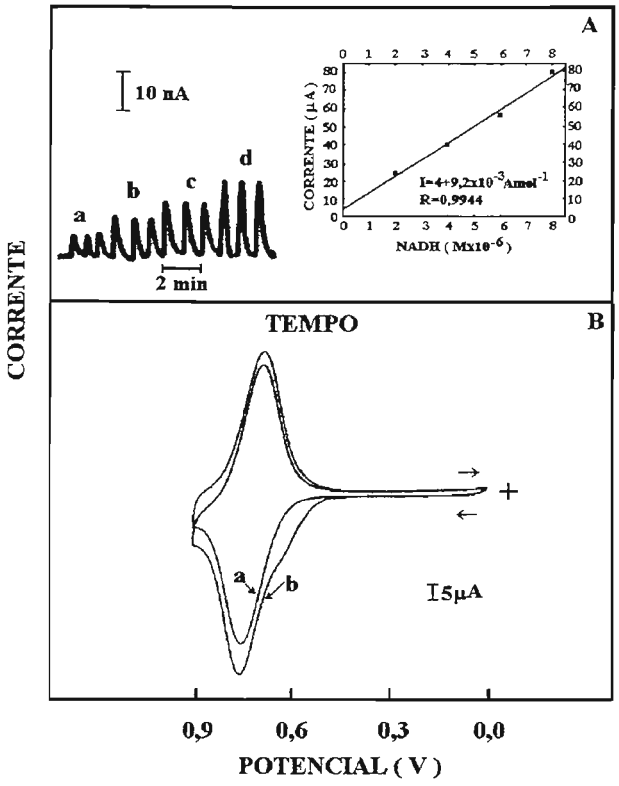


Fig. 56 – Análises por injeção em fluxo (A) usando eletrodo de carbono vítreo modificado com $[FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ com injeções de soluções de NADH 2×10^{-6} (a), 4×10^{-6} (b), 6×10^{-6} (c) e 8×10^{-6} mol L^{-1} (d). E = + 0,75V, eletrólito = tampão Ac^-/HAc (0,10 mol L^{-1}) pH 4,7 + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} com vazão de 1,5 mL min^{-1}. Volume de amostra injetado = 150 μL. Voltamograma cíclico do eletrodo modificado (B) no eletrólito suporte (a) e no mesmo eletrólito em presença de NADH 1×10^{-3} mol L^{-1} (b), velocidade de varredura = 100mV s^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

A norefedrina (de nome comercial propadrina) é um derivado da efedrina, cuja ação fisiológica assemelha-se a da adrenalina [176]. Já a hidrazina, além de importância ambiental, também é utilizada em células combustíveis, enquanto que o CaO_2 possui ação anti-séptica e pode ser encontrado, por exemplo, em creme dental. Daí o interesse na análise destes compostos.

Como pode ser notado, o efeito catalítico da porfirina sobre as oxidações dos analitos foi bastante acentuada. Em todos os três casos houve intensificação da corrente de oxidação e, também, uma antecipação dos picos anódicos para a região do par mediador Ru(II)/(III).

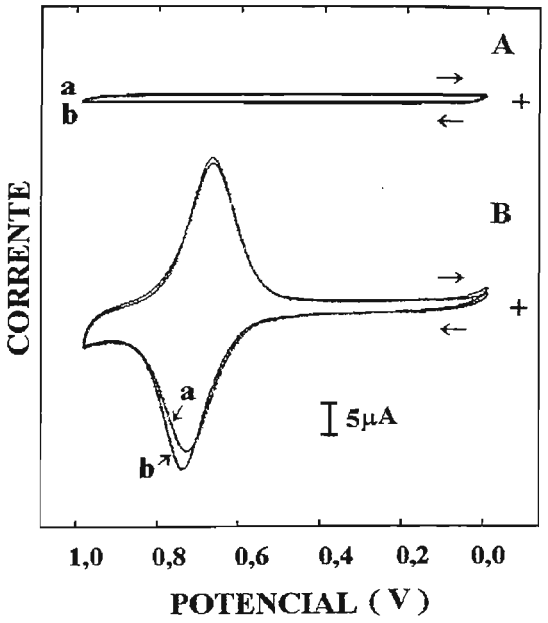


Fig. 57 - Voltamogramas cíclicos de carbono vítreo não modificado (A) e modificado com $FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ (B) em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} (a) e no mesmo eletrólito em presença de 2 x 10^{-3} mol L^{-1} de norefedrina (b). Velocidade de varredura = 100mV s^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

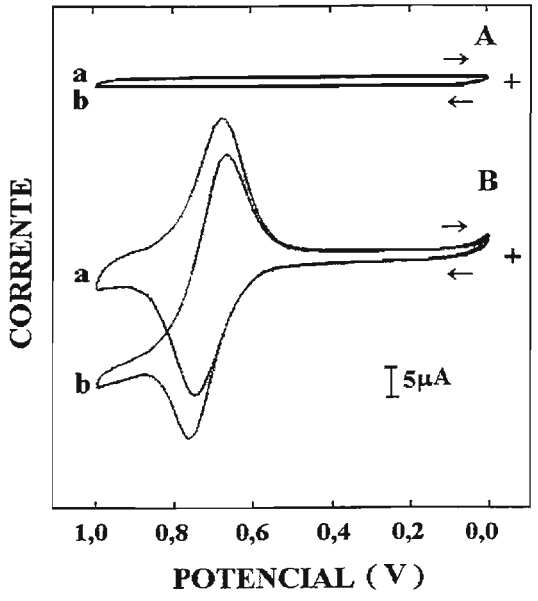


Fig. 58 - Voltamogramas cíclicos de carbono vítreo não modificado (A) e modificado com $FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ (B) em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) + $NaClO_4$ 0,2 mol L^{-1} (a) e no mesmo eletrólito em presença de 2 x 10^{-3} mol L^{-1} de hidrazina (b). Velocidade de varredura = 100mV s^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

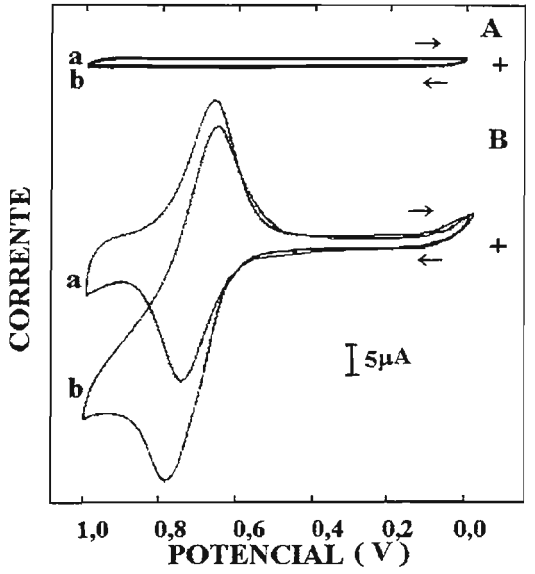


Fig. 59 - Voltamogramas cíclicos de carbono vítreo não modificado (A) e modificado com $FeTPyP[Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}/[FeTPPS]^{4-}$ (B) em tampão Ac^-/HAc pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) +$NaClO_4$ 0,20 mol L^{-1} (a) e no mesmo eletrólito em presença de 2 x 10^{-3} mol L^{-1} de peróxido de cálcio (b). Velocidade de varredura = 100mV s^{-1}. Área do eletrodo = 0,196 cm^2.

Em todos os três casos não se observa processo oxidativo sobre os eletrodos de carbono vítreo não modificados, ao passo que na presença do filme porfirínico ocorre o aparecimento do processo de oxidação e de forma significativa.

Em função dos resultados promissores, como continuidade do trabalho sugere-se a realização de estudos em fluxo para a detecção destas espécies.

4.6 – Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados com $NdNiO_3$ Associados à Sistema BIA

A incorporação de óxidos capazes de catalisar reações eletroquímicas se constitui em outra forma bastante interessante de modificar eletrodos [177-181]. Paralelamente ao estudo de eletrodos de carbono vítreo modificados com porfirinas, foram desenvolvidas investigações iniciais envolvendo um sistema BIA utilizando como eletrodo de trabalho uma pasta de carbono modificada com $NdNiO_3$. Este óxido apresentou característica favorável na catálise da oxidação de peróxido de hidrogênio e hidrazina. O H_2O_2 é de

elevada relevância em numerosas áreas, dentre as quais a ambiental, a farmacêutica e na indústria de alimentos.

Os estudos realizados indicaram que eletrodos modificados com $NdNiO_3$ são bastante seletivos, uma vez que não catalisam as reações eletroquímicas de diversos analitos testados, entre eles, ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e álcoois. De fato, eletrodos modificados apresentam efeitos catalíticos principalmente para espécies pequenas como hidrazina e, mais acentuadamente, peróxido de hidrogênio, sugerindo certa seletividade baseada no tamanho molecular. Ao longo desta tese não houve tempo hábil para um estudo mais amplo do tema, mas as perspectivas para explorar este tipo de sensor são promissoras.

Em estudos preliminares, observou-se que utilizando eletrólitos com valores baixos de pH, o eletrodo modificado não apresenta efeito catalítico. Portanto, os estudos envolvendo os eletrodos de pasta de carbono modificados com $NdNiO_3$ foram realizados em pH 13. Na literatura encontram-se vários trabalhos sobre eletrodos modificados por óxidos também realizados em meio alcalino [12, 43, 180].

Na Figura 60 apresenta-se a comparação entre os eletrodos de pasta de carbono não modificado (A) e dopado com o 10% de $NdNiO_3$ (B), utilizados na determinação de hidrazina 8,33 x 10^{-3} mol L^{-1}.

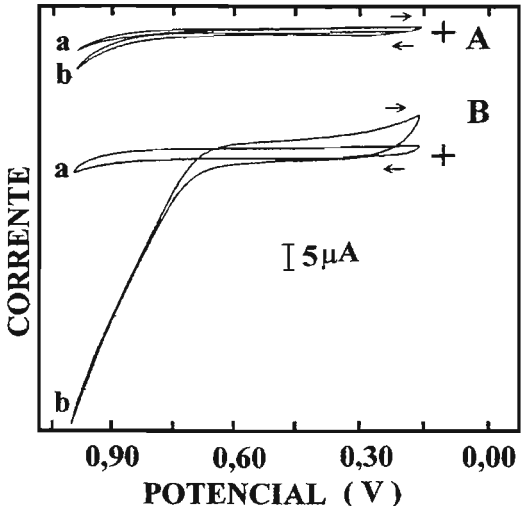


Fig. 60 – Voltamogramas cíclicos de eletrodos de pasta de carbono não modificado (A) e modificado com 10 % de $NdNiO_3$ (B), em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13) (a) e no mesmo eletrólito em presença de hidrazina 8,33 x 10^{-3} mol L^{-1} (b). Velocidade de varredura = 100 mV s^{-1}. Diâmetro do eletrodo = 3 mm.

Observa-se um efeito catalítico do eletrodo após a modificação, traduzido por um aumento de corrente e deslocamento do pico de oxidação da hidrazina para potencial menos positivo.

Já a figura abaixo apresenta a comparação entre voltamogramas cíclicos de eletrodos de pasta de carbono, antes (A) e após (B) a modificação utilizados para a determinação de H_2O_2 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} e percebe-se que o $NdNiO_3$ intensifica e antecipa de forma significativa o pico correspondente à oxidação do peróxido de hidrogênio. É possível detectar o H_2O_2 em potencial bastante favorável, inferior a 0,00 V.

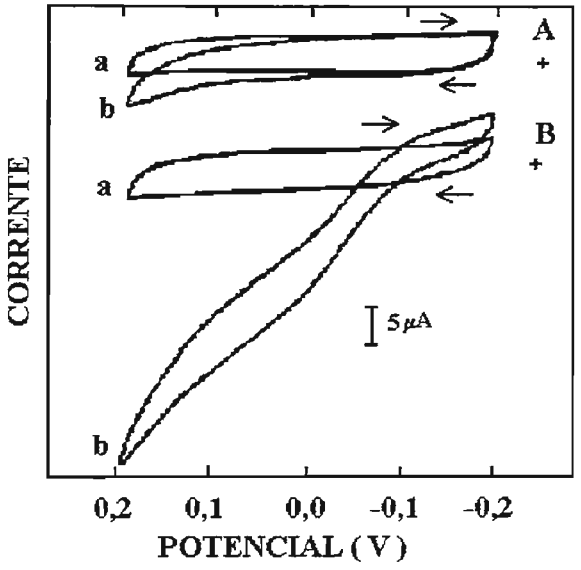


Fig. 61 – Voltamogramas cíclicos de eletrodos de pasta de carbono não modificado (A) e modificado com 10 % de $NdNiO_3$ (B), em NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13) (a) e no mesmo eletrólito em presença de H_2O_2 2,5 x 10^{-3} mol L^{-1} (b). Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1}. Diâmetro do eletrodo = 3 mm.

Foram realizadas análises utilizando o sistema BIA para a determinação de H_2O_2, caso mais favorável em função do baixo valor de potencial de oxidação obtido após a modificação do eletrodo. A figura 62 contém os sinais obtidos na faixa de concentração variando entre 2 e 8 x 10^{-6} mol L^{-1}. As respostas obtidas no sistema BIA revelam comportamento linear e sugerem um limite detecção da ordem de 5 x 10^{-7} mol L^{-1}.

A partir de testes preliminares foram selecionados um volume de 30 μL como volume de amostra injetado e uma distância de 3 mm entre a ponta da pipeta e o eletrodo,

pois nestas condições o sistema forneceu um sinal de resposta superior. Cada ponto no gráfico da Figura 62 representa a média de três injeções consecutivas de 30 μL de soluções de peróxido de hidrogênio, sem remoção da pipeta (capacidade da pipeta é de 100 μL). A pipeta foi retirada da célula BIA a cada novo carregamento de amostra.

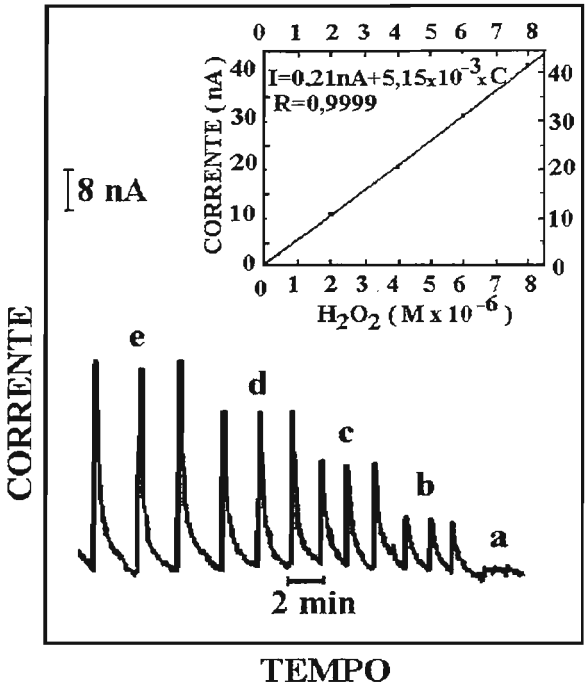


Fig. 62 – Curva analítica de eletrodo de pasta de carbono modificado com 10 % de $NdNiO_3$. Injeção em sistema BIA de solução de NaOH 0,1 mol dm^{-3} (a) e soluções de H_2O_2 com concentrações de 2×10^{-6} (b), 4×10^{-6} (c), 6×10^{-6} (d) e 8×10^{-6} mol L^{-1} (e). Volume de amostra = 30 μL, eletrólito = NaOH 0,1 mol L^{-1} (pH 13) e potencial de trabalho = 0,0 V. Diâmetro do eletrodo = 3 mm.

Este tema foi explorado de forma bastante preliminar e merece, no futuro, ser melhor investigado. Dentre as possibilidades que podem ser previstas, destaca-se a sua utilização no monitoramento de H_2O_2 e hidrazina em aplicações ambientais e em processos industriais. Na área dos biossensores, a seletividade oferecida por este óxido (para H_2O_2) também é atraente, uma vez que o peróxido de hidrogênio é gerado em diversas reações enzimáticas. Neste caso, a reação enzimática deve ocorrer no pH mais favorável à enzima, para a seguir ocorrer a alcalinização (pH 13) e, então, a quantificação eletroquímica. Esta aplicação pode ser implementada em batelada ou mesmo em fluxo.

5 – Conclusões

O desenvolvimento do presente trabalho nos permite fazer algumas considerações a respeito de eletrodos modificados com metaloporfirinas e óxido misto de $NdNiO_3$, como relacionado a seguir.

5.1 - Considerações Sobre o Desenvolvimento de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados por Filmes Contendo uma Única Metaloporfirina e por Filmes de Porfirinas Íon Pareadas

A tabela a seguir resume os resultados obtidos com eletrodos de carbono vítreo recobertos com filmes de cobalto porfirina tetrarrutenada (em presença de NaTFMS) e de filmes contendo "bicamadas" de cobalto e zinco porfirinas (contendo cargas opostas).

Tab. 5 - Resumo dos resultados obtidos com eletrodos de carbono vítreo modificados por filmes contendo uma única porfirina tetrarrutenada e de filmes contendo as "bicamadas" de porfirinas.

Agente modificador (sobre carbono vítreo)	Analito	Resposta linear utilizando eletrodo modificado – menor faixa de conc. explorada (mol L^{-1})	ΔE_{ox} * (V)	Estabilidade para 28 injeções em fluxo
$[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$	SULFITO	2 a 8 x 10^{-6}	> 0,20	278,4 nA ± 9,6 nA (DPR = 3,4)**
	NITRITO	2 a 8 x 10^{-7}	~ 0,19	
	ÁCIDO ASCÓRBICO	2 a 8 x 10^{-6}	- 0,05	
	DOPAMINA	2 a 8 x 10^{-7}	0,12	
	NADH	2 a 8 x 10^{-6}	0,10	
$[CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/ $[ZnTPPS]^{4-}$	SULFITO	2 a 8 x 10^{-6}	> 0,20	319,7 nA ± 3,2nA (DPR =1 %)**
	NITRITO	2 a 8 x 10^{-7}	~ 0,19	
	ÁCIDO ASCÓRBICO	2 a 8 x 10^{-6}	- 0,05	
	DOPAMINA	2 a 8 x 10^{-7}	0,12	
	NADH	2 a 8 x 10^{-6}	0,10	

* ΔE_{ox} = E_{ox} depois – E_{ox} antes da modificação.
** DPR = Desvio Padrão Relativo.

A partir dos resultados obtidos ao longo do trabalho, pode-se fazer as seguintes afirmações:

a) Os filmes de porfirinas tetrarrutenadas comportam-se como condutores redox. As oxidações dos analitos ocorrem somente quando os sítios redox ($Ru^{II/III}$), responsáveis pelo transporte de elétrons no filme, são oxidados.

b) As porfirinas tetrarrutenadas apresentam interessantes características catalíticas na oxidação de diversos compostos dentre os quais sulfito, nitrito, ácido ascórbico, dopamina e NADH, intensificando o sinal de corrente e deslocando os picos de oxidação dos analitos para a região de oxidação dos átomos de Ru(II).

c) Voltamogramas com níquel, manganês e ferro porfirinas, realizados nas mesmas condições, isto é, em tampão acetato/ácido acético pH 4,7 (0,10 mol L^{-1}) e numa faixa de potencial de 0,00 a +1,00 V *vs* $Ag/AgCl_{sat}$, exibem perfil de resposta semelhante a de cobalto-porfirina, apresentando apenas um par de ondas redox referentes aos Ru(II)/(III) periféricos. Ensaios com porfirinas contendo diferentes metais centrais utilizadas na análise de um mesmo analito, produziram resultados similares. Isto reforça o fato de que, nas condições utilizadas, o metal central não é o sítio ativo da molécula e sim os átomos de rutênio localizados na parte externa do anel porfirínico.

d) Os eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes contendo uma única metaloporfirina, quando utilizados em eletrólito suporte contendo $TFMS^-$, possuem uma boa estabilidade. Porém, a necessidade do contra-íon, diminui a viabilidade do seu uso em estudos de rotina, principalmente em sistema em fluxo.

e) Os eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes laminares contendo pares de porfirinas carregadas negativa e positivamente exibem excelentes características nas análises em sistemas em fluxo. Possuem uma estabilidade superior aos filmes contendo uma única porfirina, com a vantagem adicional de dispensar o uso do contra-íon $TFMS^-$. Também mantém a boa sensibilidade e, em alguns casos, a capacidade de minimizar os efeitos de envenenamento na superfície do sensor.

f) A simplicidade para a modificação da superfície do eletrodo é uma vantagem adicional, uma vez que a formação de filmes reprodutíveis não oferece grande dificuldade. A estabilidade apresentada pelos filmes de porfirinas íon pareadas é comparável a obtida por alguns eletrodos cujos agentes modificadores foram imobilizados eletroquimicamente.

5.2 - Considerações Sobre a Aplicação de Eletrodos de Carbono Vítreo Modificados por Filmes de Porfirinas Íon Pareadas na Análise de Amostras Reais

A tabela 6 exibe um resumo dos resultados obtidos utilizando-se os eletrodos de carbono vítreo modificados por camadas de metaloporfirinas íon pareadas na análise de amostras de vinhos sucos e medicamentos.

Tab. 6- Resumo dos resultados obtidos com eletrodos de carbono vítreo modificados com metaloporfirinas utilizados na análise de medicamentos, sucos e vinhos.

Agente Modificador (sobre carbono vítreo)	Analito	Amostra	Valores obtidos por método FIA com os eletrodos modificados	Valores indicados nos rótulos (a) ou obtidos por titulação iodométrica (b)
$[FeTPyP\{Ru(Clphen)_2Cl\}_4]^{5+}$/ $[FeTPPS]^{4-}$	Teor de A.A obtido com enzima	Cebion	900 ± 31 mg pastilha^{-1}	1000 mg pastilha^{-1}(a)
		Aspirina^{+}C	270 ± 7 mg pastilha^{-1}	240 mg pastilha^{-1} (a)
		Suco de Laranja Parmalat	55 ± 3 mg 100mL^{-1}	38 mg 100mL^{-1} (a)
	Teor de A.A obtido com pepino	Cebion	900 ± 32 mg pastilha^{-1}	1000 mg pastilha^{-1} (a)
		Aspirina+C	240 ± 6 mg pastilha^{-1}	240 mg pastilha^{-1} (a)
		Suco de Laranja Parmalat	52 ± 1 mg 100mL^{-1}	38 mg 100mL^{-1} (a)
$CoTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]^{5+}$/ $[ZnTPPS]^{4-}$	SO_2 Livre	Vinho Branco Seco Forestier	16,8 ± 0,2 mg L^{-1}	18,9 ± 0,7 mg L^{-1} (b)
		Vinho Branco Suave Château Duvalier	44,7 ± 0,5 mg L^{-1}	46,4 ± 1,5 mg L^{-1} (b)
		Vinho Tinto Seco Château Duvalier	12,0 ± 0,3 mg L^{-1}	12,9 ± 0,9 mg L^{-1} (b)
	SO_2 Total	Vinho Branco Seco Forestier	62,6 ± 0,9 mg L^{-1}	60,0 ± 6,2 mg L^{-1} (b)
		Vinho Branco Suave Château Duvalier	70,9 ± 1,6 mg L^{-1}	69,9 ± 9,7 mg L^{-1} (b)
		Vinho Tinto Seco Château Duvalier	83,7 ± 1,6 mg L^{-1}	82,1 ± 7,7 mg L^{-1} (b)

A partir dos resultados obtidos durante o desenvolvimento desta tese, pode-se fazer as seguintes considerações:

a) Ficou demonstrada a aplicabilidade dos sistemas propostos para a análise em fluxo de amostras reais. Os resultados bastante satisfatórios obtidos na determinação de ácido ascórbico em medicamentos e sucos, e SO_2 em vinhos comerciais atestam sua utilidade.

b) Os resultados obtidos na determinação de ácido ascórbico em suco e medicamentos são bastante concordantes entre os dois métodos (utilizando pepino e ascorbato oxidase comercial) e com os valores indicados nos rótulos das amostras, exceto os obtidos para o suco de laranja. Neste caso, o teor de ácido ascórbico encontrado foi superior ao indicado na embalagem, provavelmente pelo fato do fabricante de sucos receber laranjas de produtores diferentes e de regiões distintas, fazendo que o teor de ácido ascórbico varie. Possivelmente, o valor encontrado na embalagem corresponde ao valor mínimo que certamente estará presente no produto.

c) Para utilização dos eletrodos modificados na determinação de ácido ascórbico em análise de rotina, é adequado o desenvolvimento de um sistema em fluxo incorporando um reator com enzimas imobilizadas. Desta forma, substitui-se o tratamento enzimático das amostras em batelada por tratamento *on line*, agilizando as análises.

d) A análise de SO_2 livre e total em vinhos utilizando sistema FIA acoplado a módulo de difusão de gás apresentou-se bastante eficiente, pois elimina a interferência de muitos componentes presentes na matriz.

e) Adicionalmente, o método em fluxo utilizado para a determinação de dióxido de enxofre, permite a análise de vinhos tinto e *rosé* com maior simplicidade e rapidez do que os métodos convencionais.

5.3 - Considerações Sobre a Aplicação de Eletrodos Pasta de Carbono Modificados com Óxidos Mistos de $NdNiO_3$

Quanto aos estudos de eletrodos de pasta de carbono modificados por óxidos mistos de $NdNiO_3$, pode-se considerar:

a) Os estudos realizados indicaram que eletrodos modificados com $NdNiO_3$ são bastante seletivos, apresentando efeitos catalíticos principalmente para espécies pequenas como a hidrazina e, mais acentuadamente, o peróxido de hidrogênio, sugerindo certa seletividade baseada no tamanho molecular.

b) O eletrodo modificado com $NdNiO_3$ não apresenta efeito catalítico em meio ácido. Os estudos envolvendo estes eletrodos foram realizados utilizando como eletrólito suporte soluções de NaOH 0,1 mol L^{-1}, pH 13.

c) Os estudos preliminares envolvendo eletrodos de pasta de carbono modificados com $NdNiO_3$ demonstram a potencialidade deste tipo de sensor para a construção de transdutores com elevada seletividade e capacidade catalítica. Na área dos biossensores, a seletividade oferecida por este óxido para H_2O_2 é bastante interessante, uma vez que o peróxido de hidrogênio é gerado em diversas reações enzimáticas. Neste caso, a reação enzimática deve ocorrer no pH mais favorável à enzima, para a seguir ocorrer a alcalinização (pH 13) e, então, a quantificação eletroquímica.

d) Embora os resultados obtidos associando os eletrodos de pasta de carbono com sistema BIA tenham sido bastante satisfatórios, apresentando boa sensibilidade e estabilidade, estes sensores também podem ser implementados em sistemas em fluxo. Desta forma, pode-se dispor de recursos que facilitam a adaptação do material ao desenvolvimento de biossensores, trabalhando-se, por exemplo, com fluxos com valores de pH distintos, necessários a reação enzimática e a detecção eletroquímica.

6 - Perspectivas Futuras

O presente trabalho abriu diversas perspectivas de estudos. Pode-se visualizar a continuidade dos assuntos desenvolvidos, bem como a abordagem de novos temas derivados dos tópicos aqui iniciados. As principais linhas que poderão ser abordadas são:

- Desenvolvimento de novos sensores com filmes laminares associando diversas porfirinas polimetaladas (já sintetizadas ou com síntese em andamento no grupo de Química Inorgânica), visando novas aplicações analíticas.

- Construção de sensores miniaturizados (microssensores) modificados por porfirinas com a finalidade de explorar suas vantagens com relação aos sensores de tamanho convencional.

- Exploração das características dos filmes de porfirinas (especialmente pelos constituídos por pares de cargas opostas), com auxílio de microscopia de tunelamento (STM) ou de força atômica (AFM), buscando visualizar os arranjos formados pelos agentes modificadores.

- Investigação das propriedades fotoquímicas das porfirinas. Estudos preliminares evidenciaram que filmes das porfirinas tetrarrutenadas são fotoquimicamente ativos [95] e estas propriedades poderão ser exploradas em associação com métodos eletroquímicos.

- Comparação do procedimento desenvolvido para a quantificação de ácido ascórbico utilizando o método diferencial em fluxo com outra técnica, como a coulometria. Um outro aspecto interessante é o desenvolvimento de um sistema em fluxo incorporando reator com enzimas imobilizadas, agilizando ainda mais a realização das análise e possibilitando a realização de novas aplicações.

- Desenvolvimento de novas metodologias para a construção de sensores incorporando as porfirinas. A construção de eletrodos de epoxi/pó de grafite impregnado com porfirinas permite construir sensores robustos. Estes deverão ser explorados para o monitoramento de amostras reais, dentre as quais águas residuais e de abastecimento.

- Exploração da elevada seletividade observada para os sensores contendo óxidos mistos. O desenvolvimento de metodologia para a determinação de peróxido de hidrogênio oriundo de reações enzimáticas é altamente atrativo. Adicionalmente, diferentes óxidos poderão ser estudados, uma vez que o grupo do IFUSP desenvolve estudos neste campo, havendo um grande número de compostos já sintetizados e outros com sínteses em andamento.

7 – Referências Bibliográficas

1 - Murray, R. W., Ewing, A. G., Durrst, R. A., "Chemically Modified Electrodes Molecular Design for Electroanalysis", *Anal. Chem.*, **59(5)** , 1987, 379A-390A.

2 - Bard, A. J., "Chemical Modification of Electrodes", *J. Chem. Education,* **60(4)**, 1983, 302-304.

3 - Cox, J. A., Jaworski, R.K., Kulesza, P. J., "Electroanalysis With Electrodes Modified by Inorganic Films", *Electroanalysis*, **3,** 1991, 869-877.

4 - Araki, K., Angnes, L., Azevedo, C. M. N., Toma, H. E., "Electrochemistry of a Tetraruthenated Cobalt Porphyrin and its Use in Modified Electrodes as Sensors of Reducing Analytes", *J. Electoctroanal. Chem.*, **397,** 1995, 205-210.

5 - Angnes, L., Azevedo, C. M. N. Araki, K., Toma, H. E., "Electrochemical Detection of NADH and Dopamine in Flow Analysis Based on Tetraruthenated Porphyrin Modified Electrodes", *Anal. Chim. Acta*, **329**, 1996, 91-96.

6 - Gründig, B., Wittstock, G., Rüdel, U., Strehlitz, B., "Mediador-Modified Electrodes for Electrocatalytic Oxidation of NADH", *J. Electroanal. Chem.*, **395**, 1995, 143-157.

7 - Wang, J., Angnes, L., Martinez, T., "Scanning Tunneling Microscopic Probing of Surface Fouling During the Oxidation of Nicotinamida Coenzymes", *Bioelectrochem. Bioenergetics*, **29**, 1992, 215-221.

8 - Arnold, M. A., Meyerhoff, M. E., "Recent Advances in the Development and Analytical Applications of Biosensing Probes", *CRC Critical Reviews in Anaytical Chemistry*, **29(3)**, 1988, 148-196.

9 - Azevedo, C. M. N., Angnes, L., Araki, K., Toma, H. E.,"Electrostatically Assembled Films for Improving the Properties of Tetraruthenated Porphyrins Modified Electrodes", *Electroanalysis,* **10(7),** 1998, 467-471.

10 - Wang, J., Golden, T., "Metalloporphyrin Chemically Modified Glassy Carbon Electrodes as Catalytic Voltammetric Sensors", *Anal. Chim. Acta,* **217**, 1989, 343-351.

11 - Jaegfeidt, H., Torstensson, B. C., Gorton, L. G. O., Johansson, G., "Catalytic Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide by Graphite Electrodes Modified With Adsorbed Aromatics Containing Catechol Funcionalities", *Anal. Chem.*, **53,** 1981, 1979-1982.

12 - Castro, E. B., Gervasi, C. A., Vilche, J. R., "Oxygen Evolution on Electrodeposited Cobalt Oxides", *J. Appl. Electrochem.*, **28**, 1998, 835-841.

13 - Oyama, N., Ohsaka, T., Mizunuma, M., Kobayashi, M., "Electropolimerized Cobalt(o-aminophenyl)porphyrin Film Mediated Enzime Electrode for Amperometric Determination of Glucose", *Anal. Chem.*, **60**, 1988, 2534-2536.

14 - Atanasov, P., Gamburzev, S., Wilkins E., "Needle-Type Glucose Biosensors Based on a Pyrolyzed Cobalt-Tetramethoxy-Phenylporphyrin Catalytic Electrode", *Electroanalysis*, **8(2)**, 1996, 158-164.

15 - Deng, Q., Dong, S., "Acetylcholinesterase Amperometric Detection System Based on a Cobalt(II) Tetraphenylporphyrin-Modified Electrode", *Analyst*, **121**, 1996, 1123-1126.

16 - Gilmartin, M. A. T., Hart, J. P., "Sensing With Chemically and Biologically Modified Carbon Electrodes", *Analyst*, **120,** 1995, 1029-1045.

17 - Scheller, F., *et all.*, "Research and Development of Biosensors. A Review", *Analyst*, **114**, 1989, 653-662.

18 - Sittampalam G., Wilson, G. S., "Surface-Modified Electrochemical Detector for Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, **55(9)**, 1983, 1608-1610.

19 - Garcia, O., Kaifer, A. E., "Electrodes Modified With Nafion Films Incorporating Amphiphilic Ferrocene Derivatives", *J. Electroanal. Chem.*, **279**, 1990, 79-94.

20 - Wang, J., Hutchins, L. D., "Thin-layer Electrochemical Detector With a Glassy Carbon Electrode Coated With a Base-Hidrolized Cellulosic Film", *Anal. Chem.*, **57(8)**, 1985, 1536-1541.

21 - Wang, J., Tuzhi, P., "Selectivity and Sensitivity Improvements at Perfluorinated Ionomer/Cellulose Acetate Bilayer Electrodes", *Anal. Chem.*, **58** , 1986, 3257-3261.

22 - Kalcher, K., "A New Method for the Voltammetric Determination of Nitrite", *Talanta*, **33(6)**, 1986, 489-494.

23- Malinski, T., Ciszewski, A., Fish, J. R., Czuchajowski, L., "Conductive Polymeric Tetrakis(3-methoxi-4-hydroxyphenyl)porphyrin Film Electrode for Trace Determination of Nickel", *Anal. Chem,*. **62**, 1990, 909-914.

24 - Bailey, F., Malinski, T., Kiechle, F, "Carbon-Fiber Ultramicroelectrodes Modified With Conductive Polymeric Tetrakis(3-methoxy-4-hydroxyphenyl) Porphyrin for Determination of Nickel in Single Biological Cells", *Anal. Chem.*, **63**, 1991, 395-398.

25 - Widrig, C. A., Porter, M. D., Ryan, M. D., Strein, T. G., Ewing, A. G., "Dynamic Electrochemistry: Methodology and Application", *Anal. Chem.*, **62**, 1990, 1R-20R.

26 - Bard, A. J., *Electroanalytical Chemistry : A Series of Advances*, vol. 17, Marcel Dekker INC., New York, 1991.

27 - Santos, L. M., Baldwin, R. P., Electrochemistry and Chromatographyc Detection of Monosaccharides, Disaccharides and Related Compounds at an Electrocatalytic Chemically Modified Electrode", *Anal. Chim. Acta*, **206,** 1988, 85-96.

28 - Cookeas, E. G., Efstathiou, C. E., "Flow Injection Amperometric Determination of Thiocyanate and Selenocyanate at a Cobalt Phthalocyanine Modified Carbon Paste Electrode", *Analyst*, **119**, 1994, 1607-1612.

29 - Boyd. D., Rodriguez, J. R. B., Ordieres, A. J. M., Blanco, P. T., Smyth, M. R., "Voltammetric Study of Salbutamol, Fenoterol and Metaproterenol at Unmodified and Nafion-Modified Carbon Paste Electrodes", *Analyst*, **119**, 1994, 1979-1984.

30 - Dantoni, P., Serrano, S. H. P., Brett, A. M. O., Gutz, I. G. R., "Flow Injection Determination of Catechol With a New Tyrosinase/NADH Biosensor", *Anal. Chim.* Acta, **366**, 1998, 137-145.

31 - Murray, R.W., *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances*, vol. 13, M. Dekker, New York, 1994.

32 - Doherty, A.P., Forster, R.J., Smyth, M.R., Vos, J.G., "Development of a Sensor for the Detection of Nitrite Using a Glassy Carbon Electrode Modified With the Electrocatalyst $[Os(bipy)_2(PVP)_{10}Cl]Cl$", *Anal. Chim. Acta*, **255,** 1991, 45-52.

33 - Malone, M. M., Doherty, A. P., Smyth, M. R., Vos, J. G., "Flow Injection Amperometric Determination of Nitrite at a Carbon Fibre Electrode Modified With the Polymer $[Os(bipy)_2(PVP)_{20}CL]Cl$", *Analyst*, **117**, 1992, 1259-1263.

34 - Sharp, M., Petersson, M., Edström, K., "A Comparison of the Charge Transfer Kinetics Between Platinum and Ferrocene in Solution and in the Surface Attached State", *Electroanal. Chem.*, **109**, 1980, 271-288.

35 - Rocklin, R. D., Murray, R. W., "Kinetics of Electrocatalysis of Dibromoalkyl Reductions Using Electrodes With Covalently Immobilized Metallotetraphenyl Porphyrins", *J. Phys. Chem.*, **85**, 1991, 2104-2112.

36 - Deronzier, A., Devaux, R., Limosin, D., Latour, J., "Poly(Pyrrol-Metallo tetraphenylporphyrin)-Modified Electrodes", *J. Electroanal. Chem.*, **324,** 1992, 325-337.

37 - Ikeda, T., Schmehl, R., Denisevich, P., Willman, K., Murray, R. W., "Permeation of Elecroative Solutes Through Ultrathin Polymeric Films on Electrode Surface", *J. Am. Chem. Soc.*, **104(10)**, 1982, 2683-2691.

38 - Allen, J. R., Florido, A., Young, S. D., Daunert, S., Bachas, L. G., "Nitrite-Selective Electrode Based on an Electropolymerized Cobalt Phthalocyanine", *Electroanalysis,* **7(8)**, 1995, 710-713.

39 - Barisci, J. N., Wallace, G. G., "Detection of Nitrite Using Electrodes Modified With an Electrodeposited Ruthenium-Containing Polymer", *Analytical Letters*, **24(11),** 1991, 2059-2073.

40 - Geno, P. W., Ravichandran, K., Baldwin, R.P., "Chemically Modified Carbon Paste Electrodes. Part IV. Electrostatic Binding and Electrocatalysis at Poly(4-vinylpyridine)-Containing Electrodes", *J. Electroanal. Chem.*, **183,** 1985, 155-166.

41 - Nowak, R. J., Schultz, F. A., Umaña, M., Lam, R., Murray, W., "Chemically Modified Electrodes. Radiofrequency Plasma Polymerization of Vinylferrocene on Glassy Carbon and Platinum Electrodes", *Anal. Chem.*, **52**, 1980, 315-321.

42 - Cataldi, T. R. I., Centonze, D., Guerrieri, A., "Mixed-Valent Ruthenium Oxide-Ruthenium Cyanide Inorganic Film on Glassy Carbon Electrodes as an Amperometric Sensor of Aliphatic Alcohols", *Anal. Chem.* **67**, 1995, 101- 107.

43 - Taha, Z., Wang, J., "Electrocatalysis and Flow Detection at a Glassy Carbon Electrode Modified With a Thin Film of Oxymanganese Species", *Electroanalysis*, **3**, 1991, 243-247.

44 - O'Connel, P. J., O'Sullivan, C. K., Guilbault, G. G., "Electrochemical Metallisation of Carbon Electrodes", *Anal. chim. Acta*, **373**, 1998, 261-270.

45 - Wring, S. A., Hart, J. P., Bracey, L., Birch, B. J., "Development of Screen-Printed Carbon Electrodes, Chemically Modified With Cobalt Phthalocyanine, for Electrochemical Sensor Applications", *Anal. Chim. Acta*, **231**, 1990, 203-212.

46 - Wring, S. A., Hart, J. P., Birch, B. J., "Voltammertic Behavior of Screen-Printed Carbon Electrodes, Chemically Modified With Selected Mediators, and Their Application as Sensors for the Determination of Reduced Glutathione", *Analyst*, **116**, 1991, 123-129.

47 - Wring, S. A., Hart, J. P., Chemically Modified, Screen-Printed Carbon Electrodes", *Analyst*, **117,** 1992, 1281-1286.

48 - Sprules, S. D., Hart, J. P., Wring, S. A., Pittson, R., "Development of a Disposable Amperometric Sensor for Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Based on a Chemically Modified Screen-Printed Carbon Electrode", *Analyst,* **119,** 1994, 253-257.

49 - Nascimento, V. B., Angnes, L., "Eletrodos Fabricados por *Silk-Screen*", *Química Nova*, **21(5),** 1998, 1-16.

50 - Machado, S. P., Herrera, J. O. M., Cardoso, J. N., "Avaliação do Estado de Maturação e Estabilidade Relativa de Compostos Geoquímicos Através da Mecânica Molecular", *Química Nova*, **17(2),** 1994, 152-158.

51-Kalyanasundaram, K., *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*, Chapter 12, Academic Press, London, 1992.

52 - Kadish, K. M., Cornillon, J. L., Yao, C. L., Malinski, T., Gritzner, G., "Solvent Effect on Electrode Potentials of Metalloporphyrins", J. *Electroanal. Chem.*, **235,** 1987, 189-207.

53 - Araki, K., Toma, H. E., "Spectroelectrochemical Analysis of Overlapping Redox Processes in a Tetrametallated Iron Porphyrin", *J. Electroanal. Chem.*, **297,** 1991, 301-307.

54 - Araki, K., Toma, H. E., "Synthesis and Electrochemical Behavior of a Tetrametallated Cobalt Porphyrin", *Inorg. Chim. Acta*, **179,** 1991, 293-296.

55 - Araki, K., Toma, H. E., "Spectroelectrochemistry and Electrocatalytic Properties of a Tetraruthenated Nickel Porphyrin", *J. Chem. Res.(S),* 1994, 290.

56 - Marsh, D. F., Mink, L. M., "Microscale Synthesis and Eletronic Absorption Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin H_2(TPP) and Metalloporphyrins Zn^{II}(TPP) and Ni^{II}(TPP)", *J. Chem. Educ.*, **73(12),** 1996, 1188-1190.

57 - Choi, I. K., Liu, Y., Wei, Z., Ryan, M. D., "Reactions of Hydroxylamine With Metal Porphyrins", *Inorg. Chem.*, **36,** 1997, 3113-3118.

58 - Mink, L. M., Neittzel, M. L., Bellomy, L. M., Falvo, R. E., Boggess, R. K., Trainum, B. T., Yeaman, P., "Platinum(II) andd Platinum(IV) Porphyrin Complexes: Synthesis, Characterization, and Electrochesmistry", *Polyhedron*, **16(16)**, 1997, 2809-2817.

59 - Liu, Y., DeSilva, C., Ryan, M. D., "Electrochesmistry of Nitrite Reductase Model Compounds 6. Voltammetric and Spectroelectrochemical Studies of Iron(II) Nitrosyl

Complexes With Porphyrins, Hydroporphyrins and Porphinones", *Inorg. Chim. Acta*, **258**, 1997, 247-255.

60 - Grass, V., Lexa, D., Momenteau, M., Savéant, J. M., "Reductive Electrochesmistry of Rhodium Porphyrins. Disproportionation of Intermediary Oxidation States", *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1997, 3536-3542.

61 - Borek, V., Morra, M. J., "Cyclic Voltammetric of Aquocobalamin on Clay-Modified Electrodes", *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1998, 2149-2153.

62 - Fukuzumi, S., Miyamoto, K., Suenobu, T., Caemelbecke, Kadish, K. M., "Electron Transfer Mechanism of Organocobalt Porphyrins. Site of Electron Transfer, Migration of Organic Groups, and Cobalt-Carbon Bond Energies in Different Oxidation States", *J. Am. Chem. Soc.*, **120,** 1998, 2880-2889.

63 - Li, X., Harrison, J., "Measurement of Concentration Profiles Inside a Nitrite Ion Selective Electrode Membrane", *Anal. Chem.*, **63(19),** 1991, 2668-2174.

64 - Gao, D., Li, J., Yu, R., Zheng, G., "Metalloporphyrin Derivatives as Carriers for PVC Membrane Electrodes", *Anal. Chem.*, **66,** 1994, 2245-2249.

65 - Chaniotakis, N. A., Park, S. B., Meyerhoff, M. E., "Salicylate-Selective Membrane Electrode Based on Tin(IV) Tetraphenylporphyrin", *Anal. Chem.*, **61,** 1989, 566-570.

66 - Badr, I. H. A., Meyerhoff, M. E., Hassan, S. S. M., "Metalloporphyrin-Based Polymer Membrane Electrode With High Selective for 2-Hydroxybenzhydroxamate", *Anal. Chim. Acta*, **321**, 1996, 11-19.

67 - Chen, S., "The Electrocatalytic Reactions of Cysteine and Cystine by Water-Soluble Iron Porphyrin, Manganese Porphyrin and Iron(II) Phenanthrolines", *Electrochim. Acta,* **42(11)**, 1997, 1663-1673.

68 - Chen, S. M., "Reversible Electrocatalytic Reactions of Sulfur Oxoanions and Sulfides by One Catalyst of Water-Soluble Cobalt Porphyrin", *J. Electroanal. Chem.*, **432,** 1997, 101-109.

69 - Ikeda, O., Okabayashi, K., Yoshida, N., Tamura, H., "Spectroelectrochemical Study of Oxygen Reduction at Metalloporphyrin-Doped Polypyrrole Film Electrode", *J. Electroanal. Chem.*, **191**, 1985, 157-174.

70 - Bedioui, F., Bongars, C., Devynck, J., Bied-Charreton, C., Hinnen, C., "Metalloporphyrin-Polypyrrole Film Electrode: Characterization and Catalytic

Application", *J. Electroanal. Chem.*, **207**, 1986, 87-99.

71 - Bettelheim, A., White, B. A., Raybuck, S. A., Murray, R. W., "Electrochemical Polymerization of Amino-, Pyrrole-, and Hydroxy-Substituted Tetraphenylporphyrins", *Inorg. Chem.*, **26**, 1987, 1009-1017.

72 - Gutierrez-Granados, S., Bedioui, F., Devynck, J., "Electrochemical Study of the Activaion of Dioxigen in Acetonitrile Solution by Manganese Porphyrin Films Deposited onto Carbon Electrodes", *Electrochim. Acta*, **38(13)**, 1993, 1747-1751.

73 - Gregori, I., Carrier, M., Deronzier, A., Moutet, J. C., Bediioui, F., Devynck, J., "Incorporation of Anionic Cobalt Porphyrin by Anion Exchange into Polypyrrole Films Containing Alkylammonium Groups", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **88(11)**, 1992, 1567-1572.

74 - Khanova, L. A., "Adsorption and the Electrochemical Behavior of Adsorbed Hemin on the Amalgamated Platinum Electrode", *Russian J. Electrochem.*, **33(4),** 1997, 410-417.

75 - Bennett, J. E., Burewicz, A., Wheeler, D. E., Eliezer, I., Czuchajowski, L., Malinski, T., "Conductive Polymeric Films of Meso-tetrakis[2,2]-para-cyclophanyl-Metalloporphyrins - Spectroelectrochemistry and Catalytic Properties", *Inorg. Chim. Acta,* **271,** 1998, 167-173.

76 - Ikeda, O., Kojima, T., Tamura, H., "Effect of Axial Ligands on the Catalytic Activity of Meso-tetraphenylporphyrinatomanganese(III) Halides in the Cathodic Reduction of Oxigen", *J. Electroanal. Chem.*, **200**, 1986, 323-332.

77 - Widelöv, A., "Pyrolysis of Iron and Cobalt Porphyrins Sublimated onto the Surface of Carbon Black as a Method to Prepare Catalysts for O_2 Reduction", *Electrochim. Acta,* **38(17)**, 1993, 2493-2502.

78 - Widelöv, A., Larsson, R., "ESCA and Elecrochemical Studies on Pyrolysed Iron and Cobalt Tetraphenylporphyrins", *Electrochim. Acta,* **37(2)**, 1992, 187-197.

79 - Bettelheim, A., White, B. A., Murray, R. W., "Electrocatalysis of Dioxigen Reduction in Aqueous Acid and Base by Multimolecular Layer Films of Electropolymerized Cobalt Tetra(o-aminophenyl)porphyrins", *J. Electroanal. Chem.*, **217,** 1987, 271-286.

80 - Bettelheim, A., Ozer, D., Hart, R., Murray, R. W., "Redox and Electrocatalytic Properties Towards Dioxygen Reduction of Ruthenium Tetra(o-aminophenyl) Porphyrins Complexes With Various Axial Ligands", *J. Electroanal. Chem.*, **246,** 1988, 139-154.

81 - Bettelheim, A., Chan, R. J. H., Kuwana, T., "Electroanalysis of Oxigen Reduction. Part III. Selective Reduction to Hydrogen Peroxide or Water Using Polymeric Attachment of Metalloporphyrins", *J. Electroanal. Chem.*, **110**, 1980, 93-102.

82 - Ballarin, B., Masiero, S., Seeber, R., Tonelli, D., "Modification of Electrodes With Porphyrin-Functionalised Conductive Polymers", *J. Electroanal. Chem.*, **449**, 1998, 173-180.

83 - Vilchez-Aguado, F., Gutierrez-Granados, S., Sucar-Succar, S., Bied-Charreton, C., Bedioui, F., "Electrocatalysis of the Reduction of Trichloroacetic Acid by Polypyrrole-Cobalt Porphyrin Modified Electrodes", *New J. Chem.*, **21,** 1997, 1009-1013.

84 - Ciszewski, A., Kubaszewski, E., Lozynski, M., "The Role of Nickel as Central Metal in Conductive Polymeric Porphyrin Film Electrocatalytic Oxidation of Nitric Oxide", *Electroanalysis,* **8(3)**, 1996, 293-295.

85 - Daunert, S., Wallace, S., Florido, A., Bachas, L. G., "Anion-Selective Electrodes Based on Electropolymerized porphyrin Films", *Anal. Chem.*, **63**, 1991, 1676-1679.

86 - Bedioui, F., Trevin, S., Albin, V., Villegas, M. G. G., Devynck, G., "Design and Characterizattion of Chemically Modified Electrodes With Iron Porphyrinic-Based Polymers: Study of Their Reactivity Toward Nitrites and Nitric Oxide in Aqueous Solution", *Anal. Chim. Acta*, **341,** 1997, 177-185.

87 - Jiang, R., Dong, S., "Electrocalytic Oxidation of H_2O_2 at a Cobalt Protoporphyrin Modified Electrode and its Application in Analysis", *J. Electroanal. Chem.*, **291**, 1990, 11-22.

88 - Dong, S., Liu, B., Liu, J., Tabard, A., Guilard, R., "Kinetic Study of Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide at Iron(III) Porphyrin Modified Glassy Carbon Electrode in Alkaline Medium Using The Rotation-Scan Method" *Electroanalysis*, **7(6)**, 1995, 537-541.

89 - Pantano, P., Kuhr, W. G., "Enzyme-Modified Microelectrodes for In Vivo Neurochemical Measurements", *Electroanalysis*, **7(5),** 1995, 405-416.

90 - Duong, B., Arechabaleta, R., Tao, N. J., "In Situ AFM/STM Characterization of Porphyrin Electrode Films for Electrochemical Detection of Neurotransmitters", *J. Electroanal. Chem,*. **447,** 1998, 63-69.

91 - Shi, C., Anson, F. C., "A Simple Method for Examining the Electrochemistry of Metalloporphyrins and Other Hydrophobic Reactants in Thin Layers of Organic Solvents Interposed Between Graphite Electrodes and Aqueous Solutions", *Anal. Chem.*, **70**, 1998, 3114-3118.

92 - Qu, F., Li, N. Q., "Comparison of Metalloporphyrins Interacting With DNA", *Electroanalysis*, **9(17)**, 1997, 1348-1352.

93 - Feng, Q., Nan-Qiang, L., Yu-Yang, J., "Electrochemical Studies of Porphyrin Interacting With DNA and Determination of DNA", *Anal. Chim. Acta*, **344**, 1997, 97-104.

94 - Araki, K., *"Propriedades Supramoleculares de Porfirinas Polinucleadas"*-IQ-USP, São Paulo (1994) [Tese de Doutoramento].

95 - Araki, K., Angnes, L., Toma, H. E., "Rectifying Properties and Photoconductivity of Tetraruthenated Nickel Porphyrin Films", *Advanced Materials*, **7(6)**, 1995, 554-559.

96 - Denisevich, P., Willman, K. W., Murray, R. W., "Unidirecional Current Flow and Charge State Trapping at Redox Polymer Interfaces on Bilayer Electrodes: Principles, Experimental Demonstration, and Theory", *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1981, 4727-4737.

97 - Pickup, P. G., Kutner, W., Leidner, C. R., Murray, R. W., "Redox Conduction in Single and Bilayer Films of Redox Polymer", *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1984, 1991-1998.

98 - Araki, K., Wagner, M. J., Wrighton, M. S., "Layer-by-Layer Growth of Electrostatically Assembled Multilayer Porphyrin Films", *Langmuir*, **12(22)**, 1996, 5393-5398.

99 - Azevedo, C. M. N., Araki, K., Toma, H. E., Angnes, L, "Determination of Sulfur Dioxide in Wines by Gas-Diffusion Flow Injection Analysis Utilizing Modified Electrodes With Electrostatically Assembled Films of Tetraruthenated Porphyrin", *Anal. Chim. Acta*, 387, 1999, 175-180.

100 - Mabbott, G. A., "An Introduction to Cyclic Voltammetry", *J. Chem. Education*, **60(9)**, 1983, 697-701.

101 - Kissinger, P. T., Helneman, W. R., "Cyclic Voltammetry", *J. Chem. Education*, **60(9)**, 1983, 702-706.

102 - Gosser, D. K., *Cyclic Voltammetry – Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*, VCH Publishers, Inc., N.Y., 1993.

103 - Ruzicka, J., Hansen, E. H., "The First Decade of Flow Injection Analysis: from Serial Assay to Diagnostic Tool", *Anal. Chim. Acta*, **179**, 1986, 1-58.

104 - Hansen, E. H., "Flow-Injection Analysis: Leaving its Teen-years and Maturing. A Personal Reminiscence of its Conception and Early Development", *Anal. Chim. Acta*, **308**, 1995, 3-13.

104 - Ruzicka, J., Hansen, E. H., *Flow Injection Analysis (Chemical Analysis)*, v. 62, John Wiley &Sons, Inc, 2nd ed., NY, 1988.

105 - Wang, J., "Modified Electrodes for Electrochemical Detection in Flowing Streams", *Anal. Chim. Acta*, **234**, 1990, 41-48.

106 - Rucki, R., "Electrochemical Detectors for Flowing Liquid Systems", *Talanta*, **27**, 1980, 147-156.

107 - Brett, C. M. A., Brett, A. M. O., Mitoseriu, L. C., "Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection Analysis", *Anal. Chem.*, **66**, 1994, 3145-3150.

108 - Brett, C. M. A., Brett, A. M. O., Tugulea, L., "Batch Injection Analysis With Adsorptive Stripping Voltammetry for the Determination of Traces of Nickel and Cobalt", *Electroanalysis*, **8(7)**, 1996, 639-642.

109 - Brett, C. M. A., Brett, A. M. O., Mitoseriu, L.C., "Amperometric Batch Injection Analysis: Theoretical Aspects of Current Transients and Comparison With Wall-Jet Electrodes in Continuous Flow", *Electroanalysis*, **7(3)**, 1995, 225-229.

110 - Wang, J., Injection Analysis - From Flow-Injection Analysis to Batch-Injection Analysis", *Microchemical Journal*, **45**, 1992, 219-224.

111 - Brett, C. M. A., Brett, A. M. O., Tugulea, L., "Anodic Stripping Voltammetry of Trace Metals by Batch Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta*, **322**, 1996, 151-157.

112 - Azevedo, C. M. N., Escote, M. T., Jardim, R. F., "Eletrodos Modificados com Óxidos de Ni^{3+} para a Determinação de Peróxido de Hidrogênio", *20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, 1997, Livro de Resumos, EQ-33.

113 - Pedrotti, J. J., Angnes, L., Gutz, I. G. R., "Miniaturized Reference Electrodes With Microporous Polymer Junctions", *Electroanalysis*, **8(7)**, 1996, 673-675.

114 - Kuban, V., "Gas Diffusion/Permeation Flow Injection Analysis. Part I. Principles and Instrumentation", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **23(5)**, 1992, 323354.

115 - Vahl, J. M., Converse, J. E., "Ripper Procedure for Determining Sulfur Dioxide in Wine: Collaborative Study", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63(2),** 1980, 194-199.

116 - *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, vol. 1, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, 1976.

117 - Sullivan, B. P., Conrad, D., Meyer, T. J., "Chemistry of Highly Reduced Polypyridyl-Metal Complexes. Anion Substitution Induced by Ligang-Based Reduction", *Inorg. Chem.*, **24**, 1985, 3640-3645.

118 - Fajer, J., Borg, D. C., Forman, A., Dolphin, D., Felton, R. H., "π-Cation Radicals and Dications of Metalloporphyrins", *J. Amer. Chem. Soc.*, **92(11),** 1970, 3451-3459.

119 - MacLaurin, P., Parker, K. S., Townshend, A., Worsfold, P. J., Barnett, N. W., Crane, M., "On-Line Determination of Sulphite in Brine by Flow-Injection Analysis". *Anal. Chim. Acta*, **238**, 1990, 171-175.

120 - Fatibello-Filho, O., Vieira, I. C., "Flow Injection Spectrophotometric Determination of Sulfite Using a Crude Extract of Sweet Potato Root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as a Source of Polyphenol Oxidades", *Anal. Chim. Acta*, **354**, 1997, 51-57.

121 - Gasella, I. G., Marchese, R., "Sulfite Oxidation at a Platinum Glassy Carbon Electrode. Determination of Sulfite by Ion Exclusion Chromatography With Amperometric Detection", *Anal. Chim. Acta*, **311,** 1995, 199-210.

122 - Masoom, M., Townshend, A., "Flow-Injection Determination of Sulphite and Assay of Sulphite Oxidase", *Anal. Chim. Acta*, 1986, 399-405.

123 - Fogg, A. G., Fernandez-Arciniega, M. A., Alonso, R. M., "Oxidative Amperometric Flow Injection Determination of Sulphite at an Electrochemically Pre-Treated Glassy Carbon Electrode", *Analyst*, **110**, 1985, 851-853.

124 - Newberg, J. E., Pilar, M., Haddad, L., "Amperometric Determination of Nitrite by Oxidation at a Glassy Carbon Electrode", *Analyst*, **110**, 1985, 81-82.

125 - Van DenBerg, C. M. G., Li, H., "The Determination of Nanomolar Levels of Nitrite in Fresh and Sea Water by Cathodic Stripping Voltammetriy", *Anal. Chim. Acta*, **212**, 1988, 31-41.

126 - Cox, J. A., Kulkarni, K. R., "Flow Injection Determination of Nitrite by Amperometric Detection at a Modified Electrode", *Analyst*, **111**, 1986, 1219-1220.

127 - Trojanowicz, M., Matuszewski, W., Szostek, "Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate in Water Using Flow-Injection Biamperometry", *Anal. Chim. Acta*, **261**, 1992, 391-398.

128 - Strehlitz, B., Grundig, B., Schumacher, W., Kroneck, P. M. H., Vorlop, K. Kotte, H., "A Nitrite Sensor Based on a Highly Sensitive Nitrite Reductase Mediator-Coupled Amperometric Detection", *Anal. Chem.*, **68**, 1996, 807-816.

129 - Kochi, J. K., "Electron Transfer and Change Transfer: Twin Themes in Unifying the Mechanisms of Organic and Organometallic Reactions", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1988, 1227-1266.

130 - Downard, A. J., Roddicki, A. D., Bond, A. M., "Covalent Modification of Carbon Electrodes for Voltammetric Differentiation of Dopamine and Ascorbic Acid", *Anal. Chim. Acta,* **317**, 1995, 303-310.

131 - Zen, J., Chen, I., "Voltammetric Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid at a Chemically Modified Electrode", *Electroanalysis,* **9(7)**, 1997, 537-540.

132 - Gao, Z., Ivaska, A., "Electrochemical Behaviour of Dopamine and Ascorbic Acid at Overoxidized Polypyrrole(dodecyl sulphate) Film-Coated Electrodes", *Anal. Chim. Acta,* **284**, 1993, 393-404.

133 - O'Neill, R. D., "Microvoltammetric Techniques and Sensors for Monitoring Neurochemical Dynamics In Vivo", *Analyst*, **119**, 1994, 767-779.

134 - Wang, B., Li, X., Dong, S., "Unidirectional Current Flow of Reversible Redox Couples on a MoO_3 Film-Modified Micoelectrode", *J. Electroanal. Chem.*, **435,** 1997, 23-30.

135 - Abruña, H. D., Denisevich, P., Meyer, T. J., Murray, R. W., "Rectifying Interfaces Using Two-Layer Films of Electrochemically Polymerized Vinylpyridine and Vinylbipyridine Complexes of Ruthenium and Iron on Electrodes", *J. Am. Chem. Soc.,* **103(1)**, 1981, 1-5.

136 - Wang, J., Liu, J., "Fumed-Silica Containing Carbon-Paste Dehydrogenase Biosensors", *Anal. Chim. Acta,* 284, 1993, 385-391.

137 - Blaedel, W.J., Jenkins, R. A., "Study of the Electrochemical Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide", *Anal. Chem.*, **47(8)**, 1975, 1337-1343.

138 - Huck, H., Schelter-Graf, A., Danzer, J., Kirch, P., Schmidt, H. L, "Bioelectrochemical Detection System for Substrates of Dehydrogenases", *Analyst*, **109**, 1984, 147-150.

139 - Dominguez, E., Marko-Varga, G., Hahn-Hägerdal, B. Gorton, L., "Activity of Immobilized Yeast Aldehyde Dehydrogenase in a Flow-Injection System", *Anal. Chim. Acta*, **249**, 1991, 145-154.

140 - Kuhr, W. G., Barret, V. L., Gagnon, M. R., Hopper, P., Pantano, P., "Dehydrogenase-Modified Carbon-Fiber Microelectrodes for the Measurement of Neurotransmitter Dynamics. 1. NADH Voltammetry", *Anal. Chem.*, **65**, 1993, 617-622.

141 - Boujtita, M., Murr, N. J., "Biosensors for Analysis of Ethanol in Food: Effecct of the Pasting Liquid", *Anal. Chim. Acta*, **319**, 1996, 91-96.

142 - Mafatle, T., Nyokong, T., "Use of Cobalt(II) Phthalocyanine to Improve the Sensitivity and Stability of Glassy Carbon Electrodes for the Detection of Cresol, Chlorophenols and Phenol", *Anal. Chim. Acta*, **354,** 1997, 307-314.

143 - Richard, K. M., Gewirth, A. A., "Observation of Electrode Poisoning During the Electro-Oxidation of Aromatic Alcohols on (111)Au", *J. Electrochem. Soc.*, **143(7),** 1996, 2088-2092.

144 - Christophersen, M. J., Cardwell, T. J., "Determination of Total Phenols in Waters and Wastewaters Using Flow Injection With Electrochemical Detection; an Alternative to the Standard Colorimetric Procedure", *Anal. Chim. Acta*, **323**, 1996, 39-46.

145 - Yaropolov, A. I., Kharybin, A. N., Emnéus, J., Marko-Varga, G., Gorton, L., "Flow-Injection Analysis of Phenols at a Graphite Electrode Modified With Co-Immobilised Laccase and Tyrosinase", *Anal. Chim. Acta*, **308**, 1995, 137-144.

146 - Christie, I. M., Vadgama, P., "Modification of Electrode Surfaces With Oxidised Phenols to Confer Selectivity to Amperometric Biosensors for Glucose Determination", *Anal. Chim. Acta*, **274**, 1993, 191-199.

147 - Li, J., Chia, L. S., Goh, N. K., Tan, S. N., "Silica Sol-gel Immobilized Amperometric Biosensor for the Determination of Phenolic Compounds", *Anal. Chim. Acta*, **362**, 1998, 203-211.

148 - Lindgren, A., Ruzgas, T., Emneus, J., Csoregi, E., Gorton, L., Marko-Varga, G., "Flow Injection Analysis of Phenolic Compounds With Carbon Paste Electrodes Modified

With Tyrosinase Purchased from Different Companies", *Anal. Letters*, **29(7),** 1996, 1055-1068.

149 - Kotte, H., Grundig, B., Vorlop, K., Strehlitz, B., Stottmeister, "Methylphenazonium-Modified Enzime Sensor Based on Polymer Thick Films for Subnanomolar Detection of Phenols", *Anal. Chem.*,**1995**, 67, 65-70.

150 - Ruzgas, T., Emnéus, J., Gorton, L., Marko-Varga, G., "The Development of a Peroxidase Biosensor for Monitoring Phenol and Related Aromatic Compounds", *Anal. Chim. Acta*, **311** 1995, 245-253.

151 - Hedenburg, J. F., Freiser, H., " Anodic Voltammetry of Phenols", *Anal. Chem.*, **25(9),** 1953, 1355-1358.

152 - Koile, R. C., Johnson, D. C., "Electrochemical Removal of Phenolic Films from a Platinum Anode", *Anal. Chem.*, **51(6),** 1979, 741-744.

153 - Chiavari, C., Concialini, V., Galletti, G. C., "Electrochemical Detection in the High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Plant Phenolics", *Analyst*, **13**, 1988, 91-94.

154 - Tahar, N. B., Savall, A., "Mechanistic Aspects of Phenol Electrochemical Degradation by Oxidation on a Ta/PbO_2 Anode", *J. Electrochem Soc.*, **145(10),** 1998, 3427-3434.

155 - Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S, *Food Additives*, Marcel Dekker, Inc., NY, 1989.

156 - Pedrotti, J. J., "*Desenvolvimento, Avaliação e Aplicação de um Analisador Polarográfico de Pulso, Manual com Saída Digital*"-IQ-USP, São Paulo (1987) [Dissertação de Mestrado].

157 - Fung, Y., Mo, S., "Application of Square-Wave Voltammetry for the Determination of Ascorbic Acid in Soft Drinks and Fruit Juices Using a Flow-Injection System", *Anal. Chim. Acta*, **261**, 1992, 375-380.

158 - Huang, S., Lin, H., Yu, R., "Electrocatalysis of a Chemically Modified Poly(1-naphthylamine) Film Electrode", *Anal. Chim. Acta*, **262**, 1992, 331-337.

159 - Sun, Y., Ye, B., Zhang, W., Zhou, X., "Simultaneous Determination of Dopamine and Ascorbic Acid at Poly(neutral red) Modified Electrodes", *Anal. Chim. Acta*, **363,** 1998, 75-80.

160 - Gao, Z., Siow, K. S., Ng, A., Zhang, Y., "Determination of Ascorbic Acid in a Mixture of Ascorbic Acid and Uric Acid at a Chemically Modified Electrode", *Anal. Chim. Acta*, **343**, 1997, 49-57.

161 - Uchiyama, S., Tofuku, Y., Suzuki, S., "Flow-Injection Determination of L-Ascorbate With Cucumber Juice as Carrier", *Anal. Chim. Acta*, **208**, 1988, 291- 294.

162 - Uchiyama, S., Umetsu, Y., "Concentration-Step Amperometric Sensor of L-Ascorbic Acid Using Cucumber Juice", *Anal. Chim. Acta*, **255**, 1991, 53-57.

163 - Wring, S. A., Hart, J. P., Birch, B. J., "Voltammetric Behaviour of Ascorbic Acid at a Graphite-Epoxy Composite Electrode Chemically Modified With Cobalt Phthalocyanine and its Amperometric Determination in Multivitamin Preparations", *Anal. Chim. Acta*, **229**, 1990, 63-70.

164 - Matos, R. C., Augelli, M. A., Pedrotti, J. J., Lago, C. L., Angnes, L., "Amperometric Differential Determination of Ascorbic Acid in Beverages and Vitamin C Tablets Using a Flow Cell Containing an Array of Gold Microelectrodes Modified With Palladium", *Electroanalysis*, **10(13)**, 1998, 887-890.

165 - Ough, C. S., "Determination of Sulfur Dioxide in Grapes and Wines", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69(1)**, 1986, 5-7.

166 - Lázaro, F., Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., "Doubly Stopped Flow: A New Alternative to Simultaneous Kinetic Multideterminations in Unsegmented Flow Systems", *Anal. Chem.*, **59(7)**, 1987, 950-954.

167 - Olga, S., *Fundamentos de Toxicologia, Parte 5: Toxicologia de Alimentos,* Ateneu Editora de São Paulo, SP, 1996.

168 - *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 15th edn., Ed. K. Helrich, Association of official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, 1990.

169 - Ough, C. S., *Tratado Básico de Enologia*, Ed. Acribia, Zaragoza, 1992.

170 - Cardwell, T. J., Cattrall, R. W., Chen, G. N., Scollary, G. R., Hamilton, I. C., "Determination of Sulphur Dioxide in Red Wine by Alternating Current Voltammetry", *Analyst*, **116**, 1991, 253-256.

171 - Linares, P., Luque de Castro, Valcárcel, M., "Simultaneous Determination of Carbon Dioxide and Sulphur Dioxide in Wine by Wine by Gas-Diffusion/Flow-Injection Analysis", *Anal. Chim. Acta*, **225**, 1989, 443-448.

172 - Decnop-Weever, L.G., Kraak, J.C., "Determination of Sulphite in Wines by Gas-Diffusion Flow Injection Analysis Utilizing Spectrophotometric pH-Detection", *Anal. Chim. Acta*, **337**, 1997, 125-131.

173 - Granados, M., Maspoch, S., Blanco, M., "Determination of Sulphur Dioxide by Flow Injection Analysis with Amperometric Detection", *Anal. Chim. Acta*, **179**, 1986, 445-451.

174 - Araújo, A.N., Couto, C.M.C.M., Lima J.L.F.C., Montenegro, M.C.B.S.M., "Determination of SO_2 in Wines Using a Flow Injection Analysis System With Potentiomeric Detection", *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 168-172.

175 - Silva, R.L.G.N.P., Silva, C.S., Nóbrega, J.A., Neves, E.A., "Flow Injection Spectrophotometric Determination of Free and Total Sulfite in Wines Based on the Induced Oxidation of Manganese(II)", *Analytical Letters*, **31(13)**, 1998, 2195-2208.

176 - Mingoia, Q., *Química Farmacêutica*, Ed. Melhoramentos, SP, 1967.

177 - Mishima, Y., Motonaka, J., Marruyama, K., Ikeda, S., "Determination of Hydrogen Peroxide Using a Potassium Hexacyanoferrate(III) Modified Titanium Dioxide Electrode", *Anal. Chim. Acta*, **358**, 1998, 291-296.

178 - Cataldi, T.R.I., Guerrieri, A., Gasella, I.G., Desimoni, E., "Study of a Cobalt-Based Surface Modified Glassy Carbon Electrode: Electrocatalytic Oxidation of Sugars and Alditols", *Electroanalysis*, **7(4)**, 1995, 305-311.

179 - Somasundrum, M., Kirtikara, K., Tanticharoen, M., "Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide by Direct and Catalytic Reduction at a Copper Electrode", *Anal. Chim. Acta*, **319**, 1996, 59-70.

180 - Franklin, T.C., Nnodimele, R., Kerimo, J., "Electrochemical Oxidations of Several Organic Compounds in Aqueous Surfactant Suspensions Using Higher Valence Oxides as Intermediates", *J. Electrochem. Soc.* **140(8)**, 1993, 2145-2150.

181 - Reim, R.E, Van Effen, R.M., "Determination of Carbohydrates by Liquid Chromatography With Oxidation at a Nickel (III) Oxide Electrode", *Anal. Chem.*, **58**, 1986, 3203-3207.