



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E
DE AMINAS BIOGÊNICAS EM ALIMENTOS**

Daniel Jackson Estevam da Costa

**João Pessoa – PB – Brasil
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E
DE AMINAS BIOGÊNICAS EM ALIMENTOS**

Daniel Jackson Estevam da Costa*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

Co-Orientador: Prof. Dr. Williame Farias Ribeiro

*** Bolsista CNPq**

*João Pessoa – PB – Brasil
2017*

C838d Costa, Daniel Jackson Estevam da.

Determinação voltamétrica de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e de aminas biogênicas em alimentos / Daniel Jackson Estevam da Costa. - João Pessoa, 2017.

100 f. : il.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.

Coorientação: Williame Farias Ribeiro.

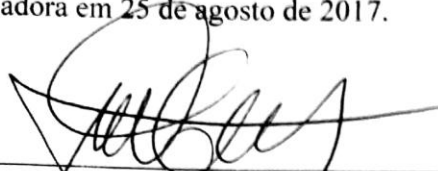
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Aminas biogênicas. 3. Alimentos. 4. Voltametria. I. Araújo, Mário César Ugulino de. II. Ribeiro, Williame Farias. III. Título.

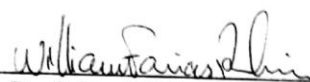
UFPB/CCEN

Determinação voltamétrica de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e de aminas biogênicas em alimentos.

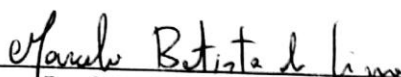
Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Daniel Jackson Estevam da Costa e aprovada pela banca examinadora em 25 de agosto de 2017.



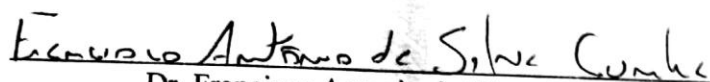
Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



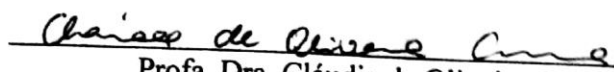
Prof. Dr. Williane Farias Ribeiro
2º. Orientador



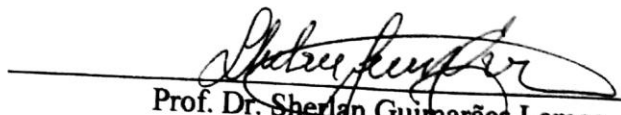
Prof. Dr. Marcelo Batista de Lima
Examinador



Dr. Francisco Antonio da Silva Cunha
Examinador



Profa. Dra. Cláudia de Oliveira Cunha
Examinadora



Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Examinador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Mailson e Izaura, pelo carinho, amor, compreensão e por serem exemplos em minha vida.

AGRADECIMENTOS

- *Primeiramente a Deus por ter me dado forças, sabedoria e inteligência para enfrentar todos os obstáculos que apareceram nessa caminhada;*
- *A minha família, meu pai, minha mãe e minha irmã Danielly que apoiaram incondicionalmente;*
- *Aos professores Mário e Williame por toda ajuda e orientação;*
- *Ao professor Dr. Giancarlo (UNIT) por ter cedido o eletrodo de diamante dopado com boro;*
- *A Universidad del Sur, em especial a Ana Martínez por toda ajuda com as amins biogênicas;*
- *Ao Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA), local onde realizei minha pesquisa, por toda estrutura e ajuda, e especialmente a Fátima, Larissa, Camila, Rhayane, Janete, Arquimedes, Renato e Francisco;*
- *Aos amigos da célula Aline, Jonathan, Diego, Jéssica, Neto, Wendell, Yonara, Bruna, Marisa e Laelson;*
- *Aos amigos que conquistei durante todos esses anos em João Pessoa e na UFPB que me ajudaram direta ou indiretamente Camylla, Érika, Yasmine, Josy, Rafael, Cristiano, Willins, Fernando, Leandro, Carol, Caio, Durval, Erik, Jéssica, Roberta, Marcelle, Eline, Jéssica Mirelly, Soledade, Vanusa e Mariano;*
- *Aos amigos do técnico em meio ambiente que sempre me apoiaram, em especial a Ana, Lanne, Jullyenny, Raquel, Jonathas, Rodrigo, Suyama, Clécia, Neto, Índia, Maryanna e Lindinalva;*
- *A todos os professores e funcionários do Departamento de Química.*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	3

CAPÍTULO 2 – HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	6
2.0.1 Toxicidade dos HPAs	7
2.0.2 Incidência de HPAs em alimentos e legislação	9
2.0.3 Métodos de análises para os HPAs	10
2.0.4 Métodos eletroanalíticos	11
2.1 EXPERIMENTAL	20
2.1.1 Reagentes e soluções	20
2.1.2 Equipamentos	20
2.1.3 Eletrodo de trabalho	20
2.1.4 Procedimentos experimentais	22
2.1.5 Efeito de memória	22
2.1.6 Tratamento dos dados voltamétricos	23
2.1.7 Parâmetros De Desempenho Analítico	23
2.1.8 Preparação das amostras de cachaças	24
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
2.2.1 Comportamento eletroquímico dos HPAs em ECV	25
2.2.2 Uso de surfactante	33
2.2.3 Determinação analítica dos HPAs por VPD usando surfactante em ECV	36
2.2.4 Determinação analítica dos HPAs em VPD usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono	40
2.2.5 Determinação analítica dos HPAs em VPD usando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianinas metálicas	42
2.2.6 Estudo dos parâmetros em VPD usando um EPC modificado com ftalocianina de Zn	43

CAPÍTULO 3 – AMINAS BIOGÊNICAS

3. AMINAS BIOGÊNICAS	49
3.0.1 Importância	49
3.0.2 Toxicidade e legislação	50
3.0.3 Métodos de análises para as aminas biogênicas	51
3.1 EXPERIMENTAL	53

3.1.1 Reagentes e soluções	53
3.1.2 Equipamentos	53
3.1.3 Eletrodo de trabalho.....	53
3.2.4 Procedimentos experimentais	54
3.2.5 Efeito de memória.....	55
3.2.6 Tratamento dos dados voltamétricos	55
3.2.7 Parâmetros De Desempenho Analítico.....	55
3.2.8 Preparação das amostras	55
3.3 RESULTADOS DAS AMINAS BIOGÊNICAS	57
3.3.1 Estudo eletroquímico das aminas biogênicas no ECV	57
3.3.2 Comportamento eletroquímico da triptamina	57
3.3.3 Estudo do pH da triptamina	59
3.3.4 Determinação analítica da triptamina por VOQ	62
3.3.5 Determinação analítica das aminas biogênicas no EDDB	67
3.3.6 Determinação analítica.....	71
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	
4. CONCLUSÕES	77
4.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	77
4.2 Aminas biogênicas	77
REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os 16 HPAs considerados preocupantes segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana.	8
Figura 2 - Sinal de excitação proveniente da técnica VC (i), voltamograma cíclico esquemático para um processo redox de um sistema reversível (ii), quase-reversível (iii) e irreversível (iv) (adaptado de BRETT e BRETT, 1996).	13
Figura 3 – Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).	14
Figura 4 – Sinal de excitação proveniente da técnica VPD (A) e voltamograma típico da VPD (B) (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996).	15
Figura 5 – Voltamogramas cíclicos dos HPAs. A) Benzo(a)pireno; B) Pireno; C) Fluoranteno. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (...) Branco, (—) 1ª varredura, (—) 2ª varredura e (---) 3ª varredura.	25
Figura 6 – A) Voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o pico P1 de uma solução de $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=4,0): na (...) ausência e (—) presença. Influência das correntes de pico I_{p1} com a v (B) e a $v^{1/2}$ (C). D) Gráfico do $\log I_{p1}$ vs $\log v$	27
Figura 7 – A) Voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o pico P1 de uma solução de $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pireno em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=4,0): na (...) ausência e (—) presença. Influência das correntes de pico I_{p1} com a v (B) e a $v^{1/2}$ (C). D) Gráfico do $\log I_{p1}$ vs $\log v$	27
Figura 8 – A) Voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o picos P1 de uma solução de $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de fluoranteno em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH=4,0): na (...) ausência e (—) presença. Influência das correntes de pico I_{p1} com a v (B) e a $v^{1/2}$ (C). D) Gráfico do $\log I_{p1}$ vs $\log v$	28
Figura 9 – Benzo(a)pireno: A) 3D dos voltamosgramas de pulso diferencial em diferentes valores de pH. B) I_p vs pH. C) E_p vs pH.	29
Figura 10 – Pireno: A) 3D dos voltamosgramas de pulso diferencial em diferentes valores de pH. B) I_p vs pH. C) E_p vs pH.	30
Figura 11 – Fluoranteno: A) 3D dos voltamosgramas de pulso diferencial em diferentes valores de pH. B) I_p vs pH. C) E_p vs pH.	31
Figura 12 – Curva analítica dos HPAs. Concentrações em mol L^{-1} : (—) $4,98 \times 10^{-6}$; (—) $9,90 \times 10^{-6}$; (—) $1,48 \times 10^{-5}$; (—) $2,28 \times 10^{-5}$; (—) $3,07 \times 10^{-5}$	33
Figura 13 – Voltamogramas de pulso diferencial da análise de solução $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno, na presença e ausência do surfactante. A) CTAB e B) DSS. (—) Benzo(a)pireno	

sem surfactante; (—) eletrólito suporte mais o surfactante; (—) benzo(a)pireno na presença do surfactante.34

Figura 14 – Estudo de diferentes volumes do surfactante DSS 5,0% em uma solução do HPA benzo(a)pireno $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0). A) Voltamogramas de pulso diferencial da resposta analítica do HPA em diferentes volumes do surfactante. B) gráfico I_p vs V.36

Figura 15 – Curvas individuais em VPD dos HPAs em ECV. A) benzo(a)pireno B) pireno C) Fluoranteno.38

Figura 16 – Efeito de memória dos HPAs em VPD usando ECV. (—) benzo(a)pireno (—) pireno (—) fluoranteno.....39

Figura 17 – Voltamogramas de pulso diferencial do HPA benzo(a)pireno da análise de solução $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno. A) ECV modificado com nanotubos funcionalizados. B) ECV modificados com nanotubos não funcionalizados. (—) ECV sem modificação (—) ECV modificado com os nanotubos.41

Figura 18 – Curvas individuais obtidos em VPD dos HPAs em EPC modificados com ftalocianinas de Zn.45

Figura 19 – Efeito de memória. (—) Benzo(a)pireno (—) pireno (—) fluoranteno.....46

Figura 20 – Voltamogramas de onda quadrada das ABs. A) Cadaverina; B) 2-feniletilamina; C) Histamina; D) Putrescina; E) Triptamina. (...) eletrólito suporte tampão acetato (pH 5,0) e (—) ABs.57

Figura 21 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de triptamina em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato (pH 5,0): (•••) Branco (apenas no eletrólito suporte), (—) 1^a , (—) 2^a , e (---) 3^a varreduras; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$58

Figura 22 - (A) Influência da velocidade de varredura ($\blacksquare$) I_{p1} vs $\nu^{1/2}$ por VVL. Inserção: voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o pico P_1 de uma solução de triptamina $1,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato (pH 5,0). (B) Influência de $\log I$ vs. $\log \nu$59

Figura 23 – Voltamogramas de pulso diferencial de uma solução de triptamina $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes solução tampão. (A) Gráfico em 3D da primeira varredura de potencial dos voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em diferentes eletrólito suporte em função do pH (B) Influência do pH sobre os potenciais de pico.....61

Figura 24 – Mecanismo da oxidação da triptamina61

Figura 25 – Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes soluções tampão. A) 3D dos voltamogramas de onda quadrada em diferentes soluções tampão em função do pH. B) I_p vs pH.....62

Figura 26 – A) Efeito de memória em VOQ usando uma solução $3,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ nos tempos de (a) 0 e (b) 10s. B) Curva analítica de triptamina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) usando VOQ, e a inserção dos voltamogramas64

Figura 27 – Voltamogramas de pulso diferencial das ABs. A) Triptamina; B) Cadaverina; C) Putrescina; D) 2-feniletilamina; E) Histamina; (...) eletrólito suporte tampão acetato (pH 5,0) e (—) ABs.....68

Figura 28 – Estudo de pH da triptamina A) pH vs I B) pH vs E.....69

Figura 29 – Estudo de pH da histamina A) pH vs I B) pH vs E.....70

Figura 30 – Estudo de pH da 2-feniletilamina A) pH vs I B) pH vs E.....71

Figura 31 – Voltamogramas de pulso diferencial das curvas individuais das ABs. A) triptamina B) histamina. C) 2-feniletilamina.73

Figura 32 – Efeito de memória das ABs. (—) triptamina (—) histamina (—) 2-feniletilamina.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação dos HPAs.	32
Tabela 2 - Resposta analítica de uma solução $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno em diferentes concentrações e volumes do surfactante DSS.	35
Tabela 3 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação dos HPAs usando surfactante DSS.....	37
Tabela 4 – Figuras de mérito dos HPAs em VPD usando um ECV.....	39
Tabela 5 – Estudo de recuperação dos HPAs em amostras de cachaça.....	40
Tabela 6 – Determinação do HPA benzo(a)pireno $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0) em VPD utilizando EPC modificados com ftalocianinas metálicas em diferentes proporções na presença e ausência do surfactante DSS.	42
Tabela 7 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação dos HPAs usando o EPC modificado com ftalocianina de Zn 5%.....	44
Tabela 8 – Figuras de mérito dos HPAs em VPD usando o EPC modificado com ftalocianina de zinco.....	45
Tabela 9 – Estudo de recuperação dos HPAs em amostras de cachaça.....	47
Tabela 10 - Os parâmetros investigados e seus valores ótimos para a determinação de triptamina por VOQ.	63
Tabela 11 - Comparação dos resultados para a determinação de triptamina (literatura) e este trabalho.	65
Tabela 12 - Resultados eletroquímicos e analíticos da triptamina em amostras de alimentos....	66
Tabela 13 - Estudo de recuperação da triptamina em amostras de alimentos.....	67
Tabela 14 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação das ABs..	72
Tabela 15 – Estudo de recuperação da triptamina em amostras de alimentos.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
ABs	Aminas biogênicas
CE	Comissão Europeia
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
CTAB	Cetiltrimetilamônio
DSS	Dodecil sulfato de sódio
CMC	Concentração Micelar Crítica
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
EPC	Eletrodo de Pasta de Carbono
EDDB	Eletrodo de Diamante Dopado com Boro
VC	Voltametria cíclica
VVL	Voltametria de varredura linear
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
f	Frequência
A	Amplitude de potencial
IT	Intervalo de tempo
TM	Tempo de modulação
v	Velocidade de varredura
ΔE_s	Incremento de potencial
$W_{1/2}$	Largura de pico a meia altura
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
E_p	Potencial de pico
t_d	Tempo de deposição

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias tóxicas, sendo consideradas mutagênicas e carcinogênicas. Dentre as várias técnicas analíticas desenvolvidas para o monitoramento desses analitos, se destaca a cromatografia. De forma alternativa, neste trabalho foi empregado métodos voltamétricos para a determinação dos HPAs benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno, utilizando o eletrodo de carbono vítreo (ECV) com e sem modificação de nanotubos de carbono e eletrodos de pasta de carbono (EPC) modificados com ftalocianinas metálicas em tampão acetato (pH 4,0). O estudo eletroquímico mostrou que esses HPAs apresentam apenas um processo oxidativo, em potenciais diferentes $E_{P(\text{benzo(a)pireno})} \approx 0,95\text{V}$, $E_{P(\text{pireno})} \approx 1,03\text{V}$ e $E_{P(\text{fluoranteno})} \approx 1,35\text{V}$. Logo, foi desenvolvido métodos em voltametria de pulso diferencial (VPD) para determinação simultânea dos HPAs através do uso do surfactante dodecil sulfato de sódio (DSS) o que facilitou uma maior interação entre os eletrodos e o analito. Outros compostos orgânicos tóxicos encontrados em alimentos são as aminas biogênicas (ABs), esses compostos são naturalmente encontrados nos seres humanos e muitos são importantes para o bom funcionamento do organismo, todavia, o consumo diário desses compostos causam graves efeitos toxicológicos, indesejáveis para a saúde humana, sendo constatado que alguns podem reagir com outros compostos e tornar-se carcinogênicos. Semelhantemente aos HPAs, a principal técnica empregada é a cromatografia. Na segunda parte deste trabalho, foi utilizado os métodos voltamétricos para a determinação das ABs (triptamina, histamina, putrescina, cadaverina e 2-feniletilamina) em ECV e no eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB). Porém, a triptamina no ECV, foi a única que apresentou uma resposta eletroquímica, sendo então desenvolvido uma metodologia voltamétrica para a determinação dessa AB em alimentos. A triptamina apresenta dois processos oxidativos $E_{P1} \approx 0,85\text{V}$ e $E_{P2} \approx 1,25\text{V}$, sendo o P_1 mais sensível e sua resposta foi utilizada para a construção de um método eletroanalítico utilizando a voltametria de onda quadrada (VOQ) em tampão acetato apresentando uma faixa de resposta linear de $(4,7 \text{ a } 54,5) \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, baixo limite de detecção ($0,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) e limite de quantificação ($2,7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$), o teor de triptamina foi determinado em bananas, tomates, queijo (muçarela e gorgonzola) e embutidos (salsicha de frango e calabresa), obtendo recuperações acima de 90%. No EDDB, as ABs apresentaram resposta eletroquímica, em potenciais diferentes, resultando em sua determinação simultânea em VPD usando tampão acetato (pH 5,0), o método foi aplicado satisfatoriamente nos alimentos: banana, tomate e queijo muçarela, obtendo recuperações acima de 90%.

Palavras chave: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, Aminas biogênicas, Alimentos, Voltametria.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are toxic substances and are considered mutagenic and carcinogenic. Among the several analytical techniques developed for the monitoring of these analytes, the chromatography stands out. In this work, voltammetric methods were used for the determination of benzo (a) pyrene, pyrene and fluoranthene HPAs, using the carbon glass electrode (CGE) with and without modification of carbon nanotubes and carbon paste electrodes (CPE) modified with metal phthalocyanines in acetate buffer (pH 4.0). The electrochemical study showed that these HPAs present only one oxidative process, in different potentials $EP_{(\text{benzo(a)pyrene})} \approx 0.95\text{V}$, $EP_{(\text{pyrene})} \approx 1.03\text{V}$ and $EP_{(\text{fluoranthene})} \approx 1.35\text{V}$. Therefore, differential pulse voltammetry (DPV) methods were developed for the simultaneous determination of PAHs using surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS), which facilitated a better interaction between the electrodes and the analyte. Other toxic organic compounds found in foods are biogenic amines (BAs), these compounds are naturally found in humans and many are important for the proper functioning of the body, however, daily consumption of these compounds cause serious toxicological effects, undesirable for health it is found that some may react with other compounds and become carcinogenic. Similar to PAHs, the main technique used is chromatography. In the second part of this work, voltammetric methods were used to determine the ABs (tryptamine, histamine, putrescine, cadaverine and 2-phenylethylamine) in GCE and the boron doped diamond electrode (BDDE). However, tryptamine in GCE was the only one that presented an electrochemical response, and a voltammetric methodology was developed to determine this BA in food. Tryptamine presents two oxidative processes $E_{P1} \approx 0.85\text{V}$ and $E_{P2} \approx 1.25\text{V}$, with P_1 being the most sensitive and its response was used for the construction of an electroanalytical method using square wave voltammetry (SWV) in acetate buffer showing a linear response range of $(4.7 \text{ to } 54.5) \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, low limit of detection ($0.8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) and limit of quantification ($2.7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$), the tryptamine content was determined in bananas, tomatoes, gorgonzola) and sausages (chicken sausage and calabresa), obtaining recoveries above 90%. In the BDDE, the BAs presented electrochemical response, at different potentials, resulting in their simultaneous determination in DPV using acetate buffer (pH 5.0), the method was applied satisfactorily in food: banana, tomato and cheese muzzarela, obtaining recoveries above 90 %.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Biogenic amines, Food, Voltametry.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos estão diretamente ligados na formação e manutenção dos organismos vivos, sejam eles originados de forma natural ou antropogênica, tais como: aminoácidos, proteínas, vitaminas, ácidos nucleicos, vacinas, e fertilizantes. Os avanços tecnológicos proporcionaram a diversos países um aumento considerável das indústrias e no forte desenvolvimento econômico. Entretanto, ao longo das últimas décadas, há uma crescente preocupação entre a comunidade científica em garantir o equilíbrio do desenvolvimento econômico e a preservação dos ecossistemas. Sendo que, a prioridade muitas vezes é dada ao crescimento econômico e a preservação do ambiente torna-se negligenciada. Desse modo, o aparecimento de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente estão cada vez mais presentes em nosso cotidiano ([SPEIGHT, 2016](#)).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), por exemplo, são emitidos por fontes naturais (erupções vulcânicas, incêndios florestais) ou antropogênicas (derramamento de petróleo, queima de combustíveis, resíduos industriais, etc.) e muitos processos térmicos dão origem a essas substâncias ([PURCARO; MORET e CONTE, 2016](#)). Após a emissão, os HPAs, que são substâncias lipofílicas e podem ter grande persistência no meio ambiente, distribuem-se nos compartimentos ambientais em proporções que dependem de suas propriedades físico-químicas e das características de cada compartimento ambiental ([CHEN et al., 2017](#)).

Os HPAs e seus derivados são associados ao aumento da incidência de diversos tipos de câncer no homem. Muitas dessas substâncias comportam-se como potenciais carcinogênicos e eficientes mutagênicos, sejam reagindo diretamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA), ou após sofrerem transformações metabólicas. Os alimentos e bebidas são uma das maiores fontes de exposição humana aos HPAs. A ocorrência destes nos alimentos é influenciada pelas mesmas características físico-químicas que determinam sua absorção e distribuição em humanos. Diversos estudos têm sido realizados comprovando a presença destes compostos em vários alimentos brutos ou processados ([TFOUNI et al., 2014; SINGH; VARSHNEY e AGARWAL, 2016](#)). Dessa maneira, o monitoramento dos seus níveis, o conhecimento das suas vias de assimilação pelo organismo e a avaliação precoce de seus efeitos biológicos, são fundamentais para o entendimento e o conhecimento dos níveis seguros de exposição humana a esses compostos ([NETTO et al., 2000](#)).

Em relação às questões de saúde pública, as preocupações têm sido principalmente voltadas às contaminações dos alimentos de origem microbiológica. Por outro lado, diversos são os perigos de natureza química que podem estar presentes nos alimentos e, alguns têm sido descritos como inerentes ao próprio processo de transformação de matéria-prima em produto, como é o caso das aminas biogênicas (ABs) (GIROTO; MASSON; HARACEMIV, 2010).

As ABs em alimentos está diretamente envolvida com a qualidade do alimento e a saúde do consumidor. Questões relacionadas à saúde envolvem, em particular, a intoxicação histamínica, com sintomatologia variada de acordo com a quantidade ingerida e a sensibilidade do indivíduo. Em casos graves, em curto espaço de tempo, podem ocorrer dores torácicas e distúrbios respiratórios. Na presença de nitritos, as aminas podem formar N-nitrosaminas, as quais têm ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica (CUNHA et al., 2012).

Tanto os HPAs quanto as ABs são compostos orgânicos que causam graves problemas a saúde humana e ao meio ambiente, logo, o desenvolvimentos de métodos e técnicas precisas para a identificação e a quantificação dessas substâncias é de grande importância acadêmica e industrial. Tradicionalmente, os métodos cromatográficos são as mais empregadas na investigação e análise dessas substâncias. De forma alternativa, as técnicas eletroanalíticas, sobretudo a voltametria, são promissoras para a determinação dessas substâncias, pois oferecem uma série de vantagens tais como: seletividade e especificidade das determinações resultante do comportamento redox das espécies analíticas de interesse em um potencial aplicado específico; seletividade decorrente dos processos de oxiredução do analito em eletrodo de trabalho feito com material específico; grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultante das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal que proporciona ambiente com baixo sinal de fundo (BRETT; BRETT, 1998).

Portanto, este trabalho propõe a investigação eletroquímica de HPAs e das ABs, além do desenvolvimento de metodologias voltamétricas para a análise dessas substâncias.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Empregar técnicas voltamétricas para determinar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos benzo(a)pireno, pireno, fluoranteno e as aminas biogênicas triptamina, histamina e 2-feniletilamina em alimentos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar as propriedades eletroquímicas dos HPAs (benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno) e das ABs (triptamina, histamina e 2-feniletilamina), utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ);
- Verificar suas respostas eletroquímicas nos eletrodos de trabalho de interesse: eletrodo de carbono vítreo (ECV), com e sem modificação com nanotubos de carbono, eletrodo de pasta de carbono (EPC), com e sem modificação com ftalocianinas e o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB);
- Propor o mecanismo de oxidação dos HPAs e das ABs estudados;
- Estabelecer as melhores condições experimentais e parâmetros instrumentais para o desenvolvimento de um método analítico por meio das técnicas voltamétricas para a determinação dos compostos de interesse;
- Aplicar as metodologias desenvolvidas para determinar o teor dos HPAs (benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno) e das ABs (triptamina, histamina e 2-feniletilamina) em diferentes matrizes de alimentos.

CAPÍTULO 2
HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

HPAs são compostos aromáticos formados por dois ou mais anéis aromáticos condensados, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio, organizados sob forma linear, angular ou agrupada. A formação desses compostos tem sua origem na combustão incompleta da matéria orgânica, origem essa influenciada principalmente por fatores como temperatura e pressão que direcionam o perfil constituinte dos mesmos (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007; NETTO et al., 2000).

No ambiente, a emissão dos HPAs é proveniente de fontes naturais e antropogênicos. A contribuição das fontes naturais na emissão dos HPAs é, geralmente, negligenciável, limitando-se praticamente as erupções vulcânicas e incêndios florestais naturais. Por outro lado, os principais responsáveis pela emissão destes compostos são provenientes das ações antropogênicas, dentre elas podemos citar: os processos industriais como produção de combustíveis (refinarias), alumínio, coque, ferro e aço, etc; as atividades domésticas como aquecimento a gás ou outro combustível, cozimento de alimentos (frituras e assados, churrasco); à combustão de motores a diesel e gasolina; queimadas agrícolas e florestais; incinerações, fumaça de cigarro, etc. Após sua emissão na natureza, os HPAs apresentam ampla mobilidade e persistência no meio ambiente, com distribuição e deposição nos principais compartimentos ambientais (ar, água e solo), isto ocorre devido sua ubiquidade resultante da semi-volatilidade e seu caráter lipofílico (DELEUZE, 2004; NETTO et al., 2000; ORGANIZATION, 2004; PERERA et al., 2005).

São sólidos à temperatura ambiente, solúveis em solventes orgânicos, altamente lipofílicos e quimicamente estáveis, sendo biodegradados lentamente sob condições aeróbicas e dificilmente hidrolisados no meio ambiente (FIALA et al., 1999; SAMANTA; SINGH; JAIN, 2002). A volatilidade diminui com o aumento do peso molecular assim, podem ser encontrados tanto na fase gasosa quanto adsorvidos a partículas atmosféricas e do solo. Por causa de sua baixa hidrossolubilidade e alta afinidade por material particulado, geralmente se depositam em sedimentos quando lançados na água. Estão, portanto, presentes como contaminantes do ar, alimentos, solo e água (RÉ-POPPI; SANTIAGO-SILVA, 2005; US EPA, 1985). Devido à sua grande distribuição ambiental e ao seu caráter lipofílico, a contaminação humana por essas substâncias pode ocorrer por absorção pela pele, ingestão ou inalação, sendo rapidamente distribuídas pelo organismo (NETTO et al., 2000).

2.0.1 Toxicidade dos HPAs

Os estudos iniciais acerca dos HPAs, originou-se em 1931 com o isolamento do benzo(a)pireno a partir do carvão e sua síntese no mesmo ano. Os primeiros dados referentes aos seus riscos ocupacionais foram obtidos em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem eram carcinogênicos em animais, sendo comprovado através de estudos epidemiológicos (BOFFETTA; JOURENKOVA; GUSTAVSSON, 1997; CARUSO; ALABURDA, 2008; RÉ-POPPI; SANTIAGO-SILVA, 2005). Pesquisas mostraram que determinados HPAs podem provocar câncer se inalados, ingeridos e mesmo após contato com a pele. Imunossupressão, hipertrofia hepática e alterações no crescimento de outros tecidos também foram relatados em cobaias de laboratório (ATSDR, 1995). A evidência da carcinogenicidade em humanos vem de estudos ocupacionais em trabalhadores expostos a conhecidas fontes de HPAs, como refino de óleo, trabalho em carvoarias, fornos e chaminés (ATSDR, 1995; WHO, 2006).

Muitos dos HPAs são considerados compostos tóxicos, mesmo em pequenas concentrações, sendo que os compostos de menor massa molecular formados por dois ou três anéis (como naftaleno, fenantreno e antraceno) possuem elevada toxicidade aguda, mas baixo ou nenhum potencial carcinogênico, enquanto os compostos de maior massa molecular contendo quatro, cinco ou seis anéis (como benzo(a)pireno) possuem baixa toxicidade aguda, mas um maior potencial carcinogênico (MEIRE, AZERERDO e TORRES, 2007). Os efeitos agudos atingem, principalmente, o rim e fígado, levando a inflamações cutâneas, hiperqueratose e ulcerações. São relatadas, ainda, alterações nos linfonodos e indução de efeitos imunossupressores (CCME, 2008). A ação exercida pelos HPAs é ativada durante o seu processo metabólico, visando à formação de compostos hidrossolúveis para facilitar a sua excreção. O mecanismo de eliminação envolve a formação de epóxidos, seguidos de compostos polihidroxilados, os quais são mais solúveis em água, viabilizando a sua eliminação pela via urinária. Um destes intermediários pode reagir com a guanina do DNA e formar um aduto dando origem a processos de tumoração (CARUSO e ALABURDA, 2008).

Além do benzo(a)pireno, o benzo(b)fluoranteno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e dibenzo(a,h)antraceno são apontados como HPAs carcinogênicos em testes com animais de laboratório. Existem outros mecanismos que também explicam a ativação de HPAs em sistemas biológicos, como a produção de radicais catiônicos, a formação de ésteres benzílicos e a produção de quinonas (NETTO

[et al. 2000](#)). Acredita-se que a elevada produção de adutos de DNA nas células implique em potenciais efeitos mutagênicos. Um desses indícios está na mutação da proteína p53 que é responsável pelo controle da proliferação celular em mamíferos ([MEIRE, AZERERDO e TORRES, 2007](#)).

Devido à preocupação constante com os efeitos adversos que estes compostos podem provocar nos seres humanos, a Agência de Proteção Ambiental Americana identificou atualmente mais de 500 HPAs e classificou 16 HPAs, **Figura 1**, como sendo poluentes prioritários. São eles: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno e dibenzo(a,h)antraceno. Muitos são capazes de reagir após transformações metabólicas, com o DNA tornando-se carcinogênicos e potenciais mutagênicos. Sendo o benzo(a)pireno considerado o melhor marcador para medir o nível de risco e a exposição às misturas de HPAs ([EPA, 1998; RAMALHOSA, et al., 2011](#)).

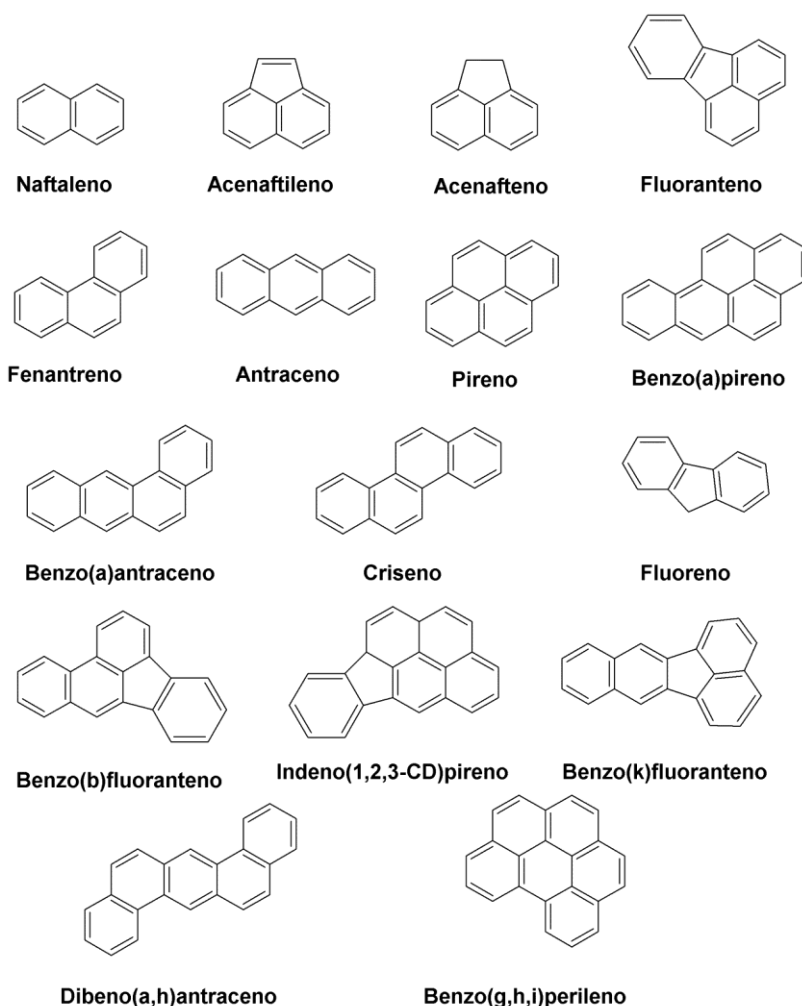


Figura 1 - Os 16 HPAs considerados preocupantes segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana.

2.0.2 Incidência de HPAs em alimentos e legislação

Os alimentos são uma das maiores fontes de contaminação de HPAs nos seres humanos. A ocorrência destes nos alimentos é influenciada pelas mesmas características físico-químicas que determinam sua absorção e distribuição em humanos. Diversos estudos têm sido realizados comprovando a presença destes compostos em vários alimentos brutos ou processados, além de bebidas e águas (EUROPEAN COMMISSION, 2002; CARUSO e ALABURDA, 2008).

Os alimentos podem ser contaminados a partir de HPAs disseminados no meio ambiente (ar, solo ou água) ou durante o processamento e cozimento. As principais etapas de processamento são secagem e defumação e as de cozimento são as que utilizam altas temperaturas, tais como aquelas que envolvem ações de grelhar, assar e fritar. Em áreas distantes dos centros urbanos e industriais, os teores de HPAs presentes nos alimentos, que não são processados, refletem a contaminação ambiental (WANG et al, 1999; NETTO et al 2000; CARUSO e ALABURDA, 2008). A literatura aborda os principais alimentos onde maior ocorrência de HPAs: óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos defumados, chás, café, leite e produtos lácteos, cereais, frutas, vegetais, carnes, peixes e frutos do mar, entre outros (CARUSO e ALABURDA, 2008).

No Brasil, a ingestão diária de HPAs foi estimada com base em valores médios de consumo per capita de alimentos e em dados analíticos dos níveis de HPAs totais e carcinogênicos. Os principais grupos de alimentos que se destacaram foram os óleos, gorduras e carnes (CARUSO e ALABURDA, 2008).

Em fevereiro de 2005 a Comissão da Comunidade Europeia (CE), através do Regulamento do CE nº 208 de 04 de fevereiro de 2005, estabeleceu níveis máximos para benzo(a)pireno em alguns alimentos, tais como: peixes, óleos e gorduras ($2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$); crustáceos, carnes e peixes defumados ($5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e moluscos bivalves ($10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). No Brasil, a legislação vigente somente determina que os alimentos defumados não poderão fornecer mais de $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ de benzo(a)pireno no alimento final e estabelece limite máximo de $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de benzo(a)pireno em águas potáveis (WHO, 1988).

2.0.3 Métodos de análises para os HPAs

Os efeitos causados pela exposição dos HPAs sobre o organismo humano despertou atenção para o desenvolvimento de metodologias analíticas para identificação e determinação desses contaminantes em nível de traços em diversas matrizes.

A cromatografia é uma das técnicas mais utilizada para análise dos HPAs. Na literatura são encontrados diversos trabalhos utilizando essa técnica.

Wu et al., (2017) desenvolveram um método para a determinação de HPAs em musgos utilizando a cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa obtendo limites de detecção de 0,1 a 2,0 ng/mL.

Zachara, Galkowska e Juszczak, (2017a, 2017b) determinaram o teor de 4 HPAs (benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno em amostras de carnes defumadas, peixe e óleos vegetais usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector de fluorescência.

Brum, Cassella e Pereira Netto, (2008) determinação de 15 HPAs em amostras de águas de rio por HPLC com detector de fluorescência por meio de uma otimização multivariada de um procedimento de extração líquido-líquido, apresentando recuperações que variaram entre 80,9 e 106%, com um valor médio de $97,1 \pm 6,8\%$.

Miège, Dugay e Hennion (2003) analisaram 16 HPAs em amostras de lama seca por meio da cromatografia líquida com detecção de fluorescência e UV onde conseguiram quantificar uma faixa de 0,09 a 0,9 mg/kg.

Gimeno et al., (2003) desenvolveram um método baseado na extração de solvente seguido de separação cromatográfica com detecção de arranjos de diodos para determinar HPAs em amostras de sedimentos marinhos.

Foan e Simon (2012) fizeram uma otimização da extração líquida pressurizada usando uma abordagem quimiométrica multivariada para a determinação de HPAs em musgos, plantas utilizadas como biomonitorios de poluição do ar, utilizando HPLC com detector de fluorescência.

Surma, Sadowska-Rociek e Cieřlik (2014) desenvolveram um método para a determinação de HPAs em alimentos de origem animal por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa, onde mostraram recuperações na faixa de 72,4-110,8%.

Imunoensaios têm sido utilizados para a análise dos HPAs e de seus metabólitos em matrizes biológicas, especialmente, na determinação de adutos de HPA-DNA com

utilização de anticorpos específicos, sendo os tipos mais utilizados são o ELISA e os radioimunoensaios (SANTELLA, 1988; SCHEEPERS et al., 1994; SCHEEPERS; BEENAKKERS; BOS, 1992).

No entanto, essas técnicas são dispendiosas, envolvem diversas etapas para preparação das amostras, além de equipamentos sofisticados e caros. Alternativamente, os métodos eletroanalíticos, tais como a voltametria vem ganhando destaque na determinação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos, além de várias vantagens quando comparado a outras técnicas, podendo chegar a limites de detecção comparáveis com os métodos cromatográficos. Na literatura são encontrados trabalhos para a determinação de HPAs nessa técnica envolvendo diversos tipos de sensores.

2.0.4 Métodos eletroanalíticos

A Eletroanalítica, também conhecida como Eletroanálise, está na interface entre ciência analítica e eletroquímica. Trata-se do desenvolvimento, caracterização, entendimento e aplicação de métodos de análise química empregando fenômenos eletroquímicos. Neste contexto, teve seu grande reconhecimento em 1922 quando Jaroslav Heyrovský (1890-1967) desenvolveu a técnica de polarografia usando um eletrodo gotejador de mercúrio capaz de monitorar reações eletroquímicas envolvendo metais, compostos orgânicos e organometálicos. Em 1959 teve seu trabalho reconhecido pela grande contribuição na área da Eletroanalítica e foi laureado com o prêmio Nobel. Em 1975, Royce W. Murray introduziu um novo enfoque na Eletroanalítica quando propôs que a imobilização ou incorporação de grupos químicos específicos ou microestruturas na superfície ou no corpo do eletrodo de trabalho pode gerar eletrodos modificados com maior aplicabilidade analítica por melhorarem a detectabilidade, a seletividade e interação analito/eletrodo. Estes dispositivos têm contribuído para o entendimento de vários processos eletroquímicos (catálise, inibição e transferência de carga), fotoeletroquímicos e determinações analíticas (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

A Eletroanalítica tem papel importante no desenvolvimento de novos métodos de análise, sensores químicos, dispositivos e sistemas capazes de identificar, monitorar e quantificar os mais diversos tipos de analitos nas mais diferentes matrizes, tais como fluídos biológicos, matrizes ambientais, microsistemas e outros universos que requerem avanços tecnológicos para resoluções de problemas cada vez mais complexos.

2.0.4.1 Voltametria

Entre os métodos eletroanalíticos estão os métodos voltamétricos. A voltametria compreende um grupo de técnicas eletroquímicas, nas quais as informações sobre o analito se baseiam na medição da corrente resultante de uma oxidação ou redução na superfície de um eletrodo indicador ou de trabalho, durante a aplicação de uma diferença de potencial na célula eletroquímica (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003; BRETT e BRETT, 1996).

Dentre as técnicas voltamétricas mais aplicadas em estudos eletroquímicos e desenvolvimento de métodos eletroanalíticos, destacam-se a voltametria cíclica e as voltametrias de pulso, como a voltametria de pulso diferencial.

Voltametria Cíclica

A VC é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Nesta técnica realiza-se a varredura de potencial direta e inversa em vários ciclos sucessivos observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (WANG, 2006).

Nessa técnica, o potencial aplicado ao eletrodo varia numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, numa velocidade constante. A resposta obtida a essa perturbação, por exemplo, um par de picos, catódico e anódico, para processos reversíveis ou quase-reversíveis, possibilitam identificar os seguintes parâmetros eletroquímicos necessários à caracterização do processo eletródico ocorrido: potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} e I_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) (BRETT e BRETT, 1996). A ilustração do sinal de excitação e os voltamogramas cíclicos registrados, caracterizando a reversibilidade dos processos eletroquímicos, encontram-se na **Figura 2**. Para um sistema irreversível nenhum pico reverso aparece ao inverter a direção da varredura. Quando o processo eletroquímico é irreversível, comumente usa-se a

voltametria de varredura linear ou a voltametria de escada (staircase) para o estudo da velocidade.

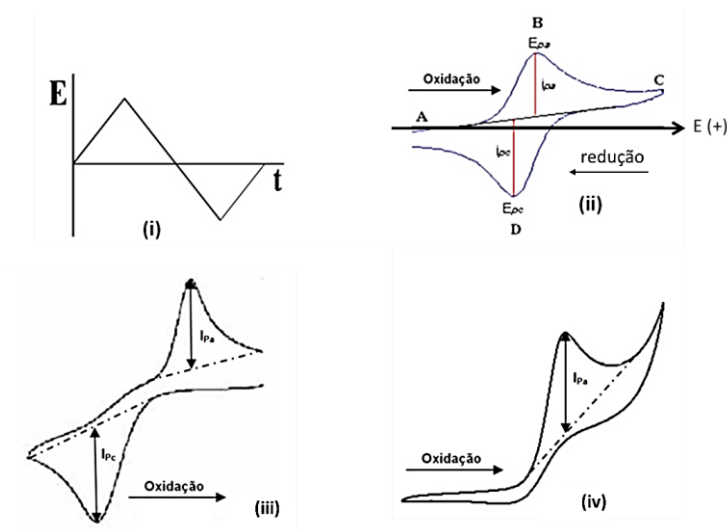


Figura 2 - Sinal de excitação proveniente da técnica VC (i), voltamograma cíclico esquemático para um processo redox de um sistema reversível (ii), quase-reversível (iii) e irreversível (iv) (adaptado de [BRETT e BRETT, 1996](#)).

Os testes diagnósticos da VC são baseados na dependência do potencial de pico e da corrente de pico em função do estudo da variação da velocidade de varredura e permitem obter, principalmente, informações acerca da reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência de elétrons e da presença de reações químicas acopladas. Os testes diagnósticos para caracterização de cada tipo de processo redox estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Teste de diagnósticos de processos redox utilizando a VC (Adaptado de [BRETT e BRETT, 1996](#); [BARD e FAULKNER, 2001](#)).

REVERSÍVEL	QUASE REVERSÍVEL	IRREVERSÍVEL
$I_p \propto v^{1/2}$	I_p aumenta com v	$I_p \propto v^{1/2}$
$ I_{pa}/I_{pc} = 1$	$ I_{pa}/I_{pc} = 1$ se $\alpha' = 0,5$	Ausência de pico reverso
$E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ (mV)	$E_p > 59/n$ (mV) e aumenta com v	$ dE_p/d\log v = 29,6/(\alpha n')$ (mV)
$ E_p - E_{p/2} = 56,6/n$ (mV)	-	$ E_p - E_{p/2} = 47,7/(\alpha n')$ (mV)
E_p independe de v	E_p desloca negativamente com o aumento de v	E_p depende de v

I_p : corrente de pico (“a” anódico e “c” catódico)
 v : velocidade de varredura
 E_p : potencial de pico (“a” anódico e “c” catódico)

α : proporcional
 α' : coeficiente de transferência de carga
 n : números de elétrons

As técnicas de pulso são amplamente adotadas em Química Analítica devido às altas sensibilidades obtidas, particularmente na presença de correntes de fundo, tal como aquelas que podem resultar da redução do oxigênio dissolvido. Nestas técnicas, a corrente capacitiva é proporcional a $e^{-t/RC}$, onde t é o tempo, R a resistência da solução e C a capacitância da dupla camada elétrica e a corrente faradaica é aproximadamente proporcional a $t^{-1/2}$. O decaimento da corrente capacitiva, após a aplicação do pulso de potencial, é muito mais rápido que o da faradaica, pois ao se aplicar o pulso, ocorre um aumento da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradaica, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradaica diminui linearmente, assim, escolhendo um tempo apropriado para se fazer a segunda leitura, faz-se a leitura da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva pode ser desconsiderada. (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). Assim, as medidas de corrente somente são realizadas após a contribuição da corrente capacitiva ter sido minimizada, como pode ser observado na **Figura 3**.

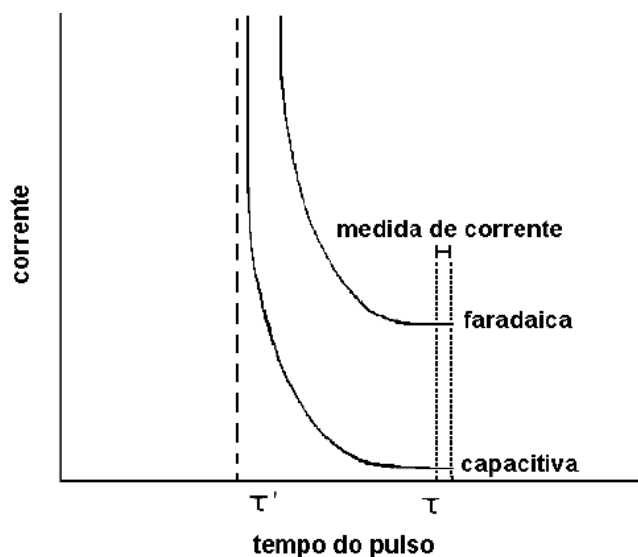


Figura 3 – Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

Na VPD, pulsos de potencial sucessivos de igual amplitude (ΔE_p) são aplicados sobre uma rampa linear ou escada de potencial com incremento (ΔE_s) em intervalos de tempo e a corrente é medida antes do pulso ser aplicado (I_1) e logo no final do pulso (I_2), **Figura 4A**. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira é principalmente a contribuição da corrente capacitiva e a segunda a contribuição da corrente faradaica, e

então registradas contra o potencial, gerando o voltamograma de pulso diferencial, **Figura 4B**, (BRETT e BRETT, 1996; BARD e FAULKNER, 2001).

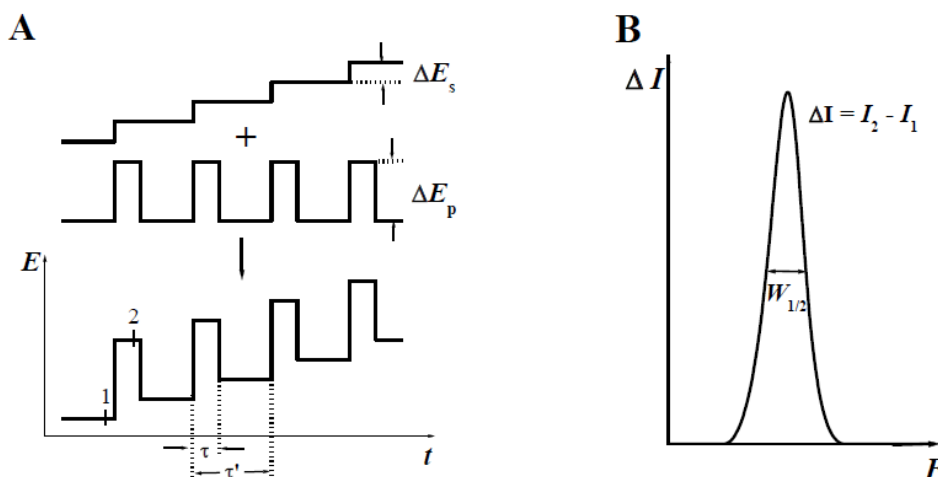


Figura 4 – Sinal de excitação proveniente da técnica VPD (A) e voltamograma típico da VPD (B) (Adaptado de BRETT e BRETT, 1996).

O tempo τ durante o qual o pulso de potencial é aplicado define a largura do pulso. O tempo τ' é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de pulso, e determina conjuntamente com o valor de ΔE_s e a velocidade de varredura $v = \tau \Delta E_s$. Em VPD, a v varia normalmente entre 1 e 10 mV s⁻¹ (BRETT e BRETT, 1996).

2.0.4.2 Uso de surfactantes em análises eletroquímicas

Surfactantes são compostos que apresentam duas regiões de polaridades distintas, em uma das extremidades da estrutura há uma parte polar hidrofílica (cabeça) e na outra extremidade uma parte hidrofóbica (cauda), geralmente uma cadeia de hidrocarbonetos. Consequentemente, eles podem interagir com interfaces polares e apolares, alterando as suas propriedades superficiais. A classificação dos surfactantes é feita levando-se em consideração a existência e a natureza dos grupos carregados em sua estrutura, sendo classificados em quatro categorias. O surfactante catiônico possui carga positiva em sua estrutura, o surfactante aniônico apresenta carga negativa, os denominados não iônicos não apresentam cargas em sua estrutura e os zwitteriônicos possuem cargas negativas e positivas na mesma molécula (SILVA, 2014).

O primeiro uso de surfactantes em eletroquímica foi como supressor de máximos polarográficos. Neste caso, o surfactante foi empregado em concentração muito baixa,

abaixo da sua concentração micelar crítica (CMC). O primeiro uso de soluções de surfactante em concentrações mais altas foi em 1952, onde o papel do surfactante foi o de solubilizar compostos orgânicos para posterior medição eletroquímica (SILVA, 2014).

2.0.4.3 Eletrodos de trabalho

Eletrodo de carbono vítreo

Associada à versatilidade das técnicas eletroanalíticas, a condutividade elétrica é um fator determinante para a escolha do material do eletrodo. Os eletrodos à base de carbono, a exemplo dos eletrodos de carbono vítreo (CV), apresentam diversas vantagens como ampla janela de potencial, baixas correntes de fundo e inércia química, quando comparados aos eletrodos de metais nobres, como o ouro e a platina. Contudo, estes últimos apresentam elevadas taxas de transferências de elétrons frente aos eletrodos de carbono, além de possibilitarem a formação de óxidos de ouro e platina na região de potenciais positivos, comprometendo a detecção de espécies que oxidam concomitante à formação desses óxidos (USLU e OZKAN, 2007).

Eletrodo de pasta de carbono

EPC são usados frequentemente até hoje para determinações eletroanalíticas, com aplicações em constante expansão a partir da disponibilidade de materiais para confecção de eletrodos quimicamente modificados. As principais vantagens são baixa corrente de fundo, baixo ruído e, principalmente, baixo custo, facilidade de renovação da superfície e confecção no próprio laboratório. A pasta de carbono é uma mistura homogênea de grafite em pó e um líquido orgânico hidrofóbico (óleo mineral, óleo de parafina, óleo de silicone etc.), utilizado para aglomerar e fixar a pasta, preencher as cavidades entre as partículas de grafite e isolar a pasta, tanto quanto possível, do contato com soluções aquosas (PEREIRA et al., 2002). Além disso, esse tipo de eletrodo tem mostrado significativa vantagem em relação aos eletrodos sólidos, porque possibilitam uma modificação de todo o material eletródico mediante a mistura controlada de diferentes materiais ao grafite e óleo mineral, enquanto que essa modificação acontece apenas na superfície de eletrodos sólidos (PEREIRA et al., 2002). Ainda, modificações realizadas

sobre a superfície de eletrodos sólidos, demandam etapas de deposição e secagem do material modificante, as quais requerem longo tempo.

Os nanotubos de carbono têm sido muito usados como material modificante em eletrodos, por apresentarem como principal característica a alta condutividade, propriedade fundamental em eletroanálises. São capazes de transpor correntes superiores a 10^9 A cm^{-2} , superando inclusive eletrodos metálicos, que apresentam valores de aproximadamente 10^5 A cm^{-2} , facilitando assim o transporte de elétrons e, consequentemente, melhorando sensibilidade analítica.

Além disso, a estrutura de NTC ainda pode ser funcionalizada com diferentes grupos químicos, como os carboxílicos. Neste caso, a reação de carboxilação promove a ligação do átomo de carbono do grupo -COOH covalentemente a átomos de carbono da estrutura do nanotubo. Os nanotubos funcionalizados podem ter propriedades eletrônicas e mecânicas bem diferentes de nanotubos não funcionalizados, podendo facilitar a interação com diversas substâncias químicas, especialmente moléculas orgânicas e, dessa forma, promover ganhos em seletividade e sensibilidade com eletrodos desse tipo (SOUZA FILHO, 2007).

As ftalocianinas metálicas são compostos versáteis que se adsorvem muito fortemente sobre as superfícies de carbono e grafite em níveis de monocamadas. Esses eletrodos modificados exibem atividade eletrocatalítica para uma grande variedade de reações eletroquímicas de interesse prático, como as reações de redução de oxigênio e peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e oxidações de mercaptanas, hidrazina, cisteína, íons nitrito e óxido nítrico.

A atividade catalítica está relacionada com a natureza do metal central na ftalocianina onde os orbitais moleculares externos da molécula reagente interagem com os orbitais externos localizados no metal central, facilitando a transferência de elétrons entre as moléculas. A atividade catalítica da ftalocianina adsorvida pode, então, ser correlacionada com a densidade de elétrons localizados no metal central e com o potencial formal dos pares redox correspondentes (MOSER e THOMAS, 1983).

2.0.4.4 Determinação dos HPAs usando técnicas voltamétricas

Ni *et al.*, (2014), modificaram um eletrodo de carbono vítreo com hemina/nafion-grafeno/DNA, esse novo tipo de biossensor de DNA foi construído para análise do HPA

benzo(a)pireno. Esse biossensor foi montado em camada por camada e, foi caracterizado utilizando voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia de força atômica. Após a caracterização do biossensor foi desenvolvido um método analítico utilizando a voltametria de pulso diferencial, a resposta obtida era proveniente do sinal do dano oxidativo no DNA causado pelo benzo(a)pireno, logo a sua determinação foi realizada de forma indireta.

O HPA 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno vem sendo amplamente estudado devido ao seu poder carcinogênico, neste trabalho **Yardim et al., (2010)** estudaram esse HPA eletroquimicamente. Inicialmente, através de um eletrodo de grafite em meios não aquosos foi estudado esse composto por voltametria, onde uma resposta voltamétrica bem definida em tampão acetato, pH 4,8, apresentando um potencial de + 1,15V (vs.Ag/AgCl) foi obtido, apresentando baixo limite de detecção ($49,7 \text{ ng L}^{-1}$), sendo aplicado em urina humana. Em seguida, foi estudado esse HPA através do modificação do eletrodo de grafite com dsDNA de espermatozoides de peixe. Os resultados mostraram que o biossensor foi capaz de interagir com o HPA, sendo monitorado pela diminuição do sinal da adenina, além de todas as vantagens do uso do biossensor como ser sensível, rápido e simples, esse método pode ser utilizado para o biomonitoramento desse HPA.

Yardim et al., (2011) desenvolveram um método voltamétrico, em tampão Britton-Robison (pH 2,0) para a determinação de benzo(a)pireno em amostras de águas, utilizando o EDDB como eletrodo de trabalho na presença do surfactante dodecil sulfato de sódio (DSS). O que resultou numa faixa de concentração de 16-200 nM ($4,04\text{-}50,46 \text{ ng mL}^{-1}$), com um limite de detecção de $2,86 \text{ nM}$ ($0,72 \text{ ng mL}^{-1}$).

Yosypchuk, Barek e Vyskočil (2012) utilizaram o EDDB para a determinação de derivados do HPA pireno (1-nitropireno e o 1-hidroxipireno) utilizando a VPD em uma mistura metanol mais o tampão Britton-Robinson (pH 3,0) na proporção 70:30, obtendo uma faixa linear de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Sehatnia et al (2014) desenvolveram um sensor eletroquímico baseado supramolécula 25,27-(3-tiopropoxi)-p-terc-butil-4-cálixareno. Os calixarenos foram imobilizados em nanopartículas magnéticas Fe_3O_4 . Em seguida, interagiram o sensor com os pontos quânticos CdSe, tornando-o sensível para a determinação dos HPAs antraceno e naftaleno em VOQ. A diminuição do sinal dos pontos quânticos foi proporcional ao aumento da concentração dos HPAs, no qual apresentou uma faixa de concentração $2,1 \times 10^{-7}$ a $1,4 \times 10^{-5}$ e $1,5 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $20,1 \text{ ng mL}^{-1}$ e $105,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para o antraceno e naftaleno, respectivamente.

2.1 EXPERIMENTAL

2.1.1 Reagentes e soluções

Soluções estoque de concentração $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ dos HPAs benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno e demais diluições foram preparadas em acetonitrila devido sua baixa solubilidade em água ($0,0028$, $0,14$ e $0,26 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente a 25°C).

Os eletrólitos suporte utilizados nas medidas voltamétricas, foram soluções tamponadas utilizando o procedimento adaptado de [Oliveira et al. \(2007\)](#): HCl/KCl (pH 1,0 e 2,0); ácido acético/acetato de sódio (pH 3,0; 4,0 e 5,0); $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,0; 7,0 e 8,0); bórax/NaOH (pH 9,0 e 10,0). Com exceção dos HPAs, todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida através de sistema Millipore Milli-Q System (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Os surfactantes brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e dodecil sulfato de sódio (DSS), foram utilizados nos experimentos eletroquímicos.

Todos reagentes utilizados nesse trabalho são de grau analítico, adquiridos pela Sigma-Aldrich.

2.1.2 Equipamentos

As medidas voltamétrica foram realizadas em potenciostato/galvanostato Eco Chemie, $\mu\text{Autolab}^{\text{®}}$ Tipo II, acoplado a um módulo polarográfico Metrohm, 663 VA Stand[®], funcionando no modo potenciostático, interfaciado a um microcomputador.

A célula eletroquímica era equipada com três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl – KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Os eletrodos de trabalho utilizados nesse estudo foram: Eletrodo de Carbono Vítreo (com e sem modificação) e o Eletrodo de Pasta de Carbono (com e sem modificação por ftalocianinas metálicas). As medidas de pH dos eletrólitos suporte utilizados foram realizadas em medidor de pH modelo 713 – Metrohm.

2.1.3 Eletrodo de trabalho

2.1.3.1 Eletrodo de carbono vítreo

O ECV, adquirido da Metrohm, foi polido mecanicamente sob um papel de filtro umedecido com spray de diamante (1 μm) da Kemet International Ltda, UK. Após o polimento, o eletrodo foi lavado abundantemente com jatos de água ultrapura sobre sua superfície. Posteriormente, o eletrodo foi condicionados em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ mediante 10 voltamogramas cíclicos, numa janela de 0 a +1,4 V com velocidade de 50 mV s⁻¹.

2.1.3.2 Preparação do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (funcionalizados ou não) foram dispersos em água ultrapura (1mg/mL), em seguida sonificados por 2h a temperatura ambiente até obter uma suspensão dos nanotubos (RIBEIRO et al 2011).

No eletrodo de carbono vítreo, previamente polido, foi adicionado em sua superfície 20 μL da suspensão dos nanotubos, em seguida, o eletrodo foi colocado em uma estufa (50°C por 30 minutos) onde houve uma completa evaporação do solvente (técnica de *casting*), obtendo-se um filme homogêneo e uniforme. Ao esfriar a superfície eletródica modificada e realizar a ativação em eletrólito puro, as medidas voltamétricas foram executadas (RIBEIRO et al 2011).

A remoção dos nanotubos da superfície do eletrodo de carbono vítreo consistiu em colocá-lo em um sonificador por alguns segundos, seguido de um polimento.

2.1.3.3 Eletrodo de pasta de carbono

Os eletrodos de pasta de carbono modificados com as ftalocianinas metálicas (Co, Cu, Zn e Ni) foram preparados pela mistura de pó de grafite, óleo mineral e as ftalocianinas nas seguintes proporções em massa (m/m):

- 0% ftalocianina, 75% pó de grafite e 25% óleo mineral;
- 5% ftalocianina, 70% pó de grafite e 25% óleo mineral;
- 10% ftalocianina, 65% pó de grafite e 25% óleo mineral;
- 15% ftalocianina, 60% pó de grafite e 25% óleo mineral.

As misturas foram homogeneizadas em almofariz por 20 minutos para a preparação da pasta. Em seguida, os eletrodos foram confeccionados preenchendo tubos de vidro com as pastas e introduzindo uma haste de cobre para o contato elétrico.

Os eletrodos foram polidos em papel manteiga e posteriormente lavados com água ultrapura, este procedimento foi realizado entre as medidas, quando necessário. O eletrodo foi

submetido a um condicionamento em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , empregando 50 varreduras sucessivas em voltametria cíclica abrangendo uma janela de potencial de $-1,2$ a $1,4$ V, com velocidade de $1,0 \text{ V s}^{-1}$. Esse tratamento foi repetido entre os experimentos para garantir a limpeza da superfície do eletrodo.

2.1.4 Procedimentos experimentais

As medições voltamétricas foram realizadas à temperatura ambiente em eletrólito de suporte. Para evitar contaminação, foram utilizadas duas células eletroquímicas: uma para o eletrólito de suporte (branco) e outra para eletrólito de suporte + alíquota do analito.

2.1.4.1 Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas

Os parâmetros experimentais para as medidas eletroquímicas foram: incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV e velocidade de varredura (v) de 50 mV s^{-1} para voltametria cíclica (VC); tempo de modulação (TM) de 70 ms, intervalo de tempo (IT) de 0,2 s, incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV, amplitude de pulso (a) de 50 mV e velocidade de varredura (v) de 10 mV s^{-1} para voltametria de pulso diferencial (VPD); e frequência de pulso (f) de 25 s^{-1} , ΔE_s de 2 mV e a de 50 mV para voltametria de onda quadrada (VOQ). Além disso, a influência do pH foi analisada numa faixa de 1,0 a 12,0, empregando as soluções tampão como eletrólito de suporte para as ABs e uma faixa de pH de 1,0 a 10,0 para os HPAs. A janela de potencial estudada foi de 0 a $+1,4\text{V}$ para os eletrodos de trabalho estudados, podendo ser estendido um pouco mais dependendo da análise e de 0 a $+1,8 \text{ V}$ para o eletrodo DDB.

2.1.5 Efeito de memória

O efeito de memória dos HPAs foi investigado usando solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0) como eletrólito suporte e uma solução diluída do padrão analítico do analito. Em seguida, foram realizadas medidas alternadas (sem e com tempo de acumulação) e sucessivas (ou seja, sem remoção do eletrodo de trabalho de dentro da solução eletrólito-analito) a fim de verificar se houve alteração do sinal analítico (intensidade de corrente elétrica).

2.1.6 Tratamento dos dados voltamétricos

Os voltamogramas de pulso diferencial apresentados foram suavizados através da função *Savitsky-Golay smooth* nível 4, visando a eliminação do ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico. Em seguida, era corrigido a linha de base através da função *moving average* com um *step window* de 2 mV, ambas disponíveis no software GPES versão 4.9. Através desse tratamento matemático realizado nos voltamogramas, melhorou a visualização e identificação dos processos oxidativos dos analitos. Além desse software, também foi utilizado o Origin® 5.0 para tratamento dos dados.

2.1.7 Parâmetros De Desempenho Analítico

De acordo com a literatura, a eficiência de uma metodologia analítica é estimada pelas variáveis de desempenho analítico, tais como sensibilidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade).

A sensibilidade de um método mede a sua capacidade em distinguir entre pequenas diferenças na concentração de um analito. Ela foi avaliada através dos valores de LD e LQ, calculados conforme as **Equações 1** e **2**. Dez medidas realizadas em eletrólito puro (brancos) foram usadas para estimar o desvio-padrão da média do sinal analítico, que representa o nível de ruído da técnica.

$$LD = 3S_b / b \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LQ = 10S_b / b \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

S_b = desvio-padrão da média do sinal do branco em eletrólito puro

b = sensibilidade da curva analítica (coeficiente angular da reta).

A precisão do método foi estimada através dos testes de repetibilidade e da reprodutibilidade calculada em termos de coeficiente de variação (CV), também chamada de desvio padrão relativo, conforme **Equação 3**. A repetibilidade é definida como a diferença máxima aceitável entre as repetições dos voltamogramas em um mesmo nível de concentração da amostra, já a reprodutibilidade é a diferença máxima aceitável entre

os resultados obtidos para o registro do voltamograma em amostras diferentes. A repetibilidade foi estimada a partir de 10 medidas sucessivas de uma solução do HPA. As medidas de reprodutibilidade foram realizadas em 5 dias e com soluções diferentes de mesma concentração para estimar a reprodutibilidade. Para os dois testes, foi utilizada uma solução dos HPAs de concentração $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

$$\%CV = (S / \bar{x}) \times 100\% \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

S = desvio padrão do conjunto de medidas

$\bar{x}$ = média do conjunto de medidas

2.1.8 Preparação das amostras de cachaças

As sete amostras de cachaças foram adquiridas dos estabelecimentos comerciais da cidade de João Pessoa-PB. Foram retiradas uma alíquota de 30 mL e aquecidas a 100°C numa placa aquecedora até a evaporação de mais da metade do volume retirado da cachaça, em seguida, era resfriada e adicionada 20 mL de acetonitrila. A solução era então deixada em banho ultrassônico por 10 minutos.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Comportamento eletroquímico dos HPAs em ECV

A eletroatividade dos HPAs benzo(a)pireno ($1,64 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), pireno ($8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e fluoranteno ($8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foi inicialmente estudada por VC em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) em uma janela de potencial de 0 a +1,4 V vs. $E_{\text{Ag/AgCl}}$, para o benzo(a)pireno e pireno e até +1,5V para o fluoranteno, com $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$, **Figura 5**.

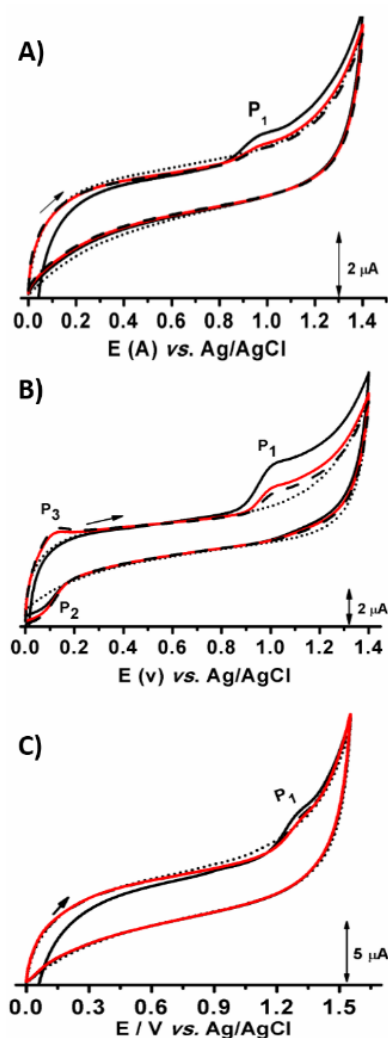


Figura 5 – Voltamogramas cíclicos dos HPAs. A) Benzo(a)pireno; B) Pireno; C) Fluoranteno. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (...) Branco, (—) 1ª varredura, (---) 2ª varredura e (---) 3ª varredura.

Os HPAs benzo(a)pireno e fluoranteno, apresentaram um processo oxidativo ($E_p \approx +0,95V$ e $E_p \approx +1,35V$ respectivamente, **Figura 5A e 5C**). Invertendo a varredura de potencial não foi evidenciada processos redutivos, podendo ser um indicativo de um sistema irreversível, e sem a presença de produtos oxidativos ao ser realizados ciclos sucessivos. O HPA pireno apresentou um processo oxidativo em $E_p \approx 1,03V$, ao inverter a varredura de potencial foi observado um indicativo de sistema irreversível, tais como os outros HPAs estudados, contudo foi evidenciado um processo oxidativo reversível na varredura de potencial $E_p \approx 0,13V$ (anódico) e $E_p \approx 0,07V$ (catódico), **Figura 5B**. A diminuição da corrente do pico visualizada nas segunda e terceira varreduras ocorreu devido à adsorção dos HPAs e/ou seus produtos de oxidação não-eletoativos na superfície do eletrodo. Contudo, se tratando do pireno sua diminuição pode estar relacionada também aos produtos oxidativos eletroativos formados.

O efeito da velocidade de varredura sobre a corrente do primeiro processo oxidativo foi estudado em uma solução recém-preparada dos HPAs, nas mesmas concentrações usadas na VC, em tampão acetato pH 4,0, utilizado a técnica voltametria de varredura linear (VVL). Os voltamogramas foram registrados em diferentes velocidades de varredura, entre 25 e 500 $mV s^{-1}$. Sendo a dependência da corrente de pico uma função linear com a velocidade de varredura descrita pela equação $I_p = kv^x$, valores de x iguais a 1,0 e 0,5 são esperados para processos de eletrodos governados por adsorção e difusão, respectivamente (**ERK, 2003**). A literatura reporta que a natureza do transporte eletrônico de massa também pode ser indicada considerando os valores do coeficiente angular para o gráfico $\log I_p$ vs $\log v$ iguais a 0,50 e 1,0 para processos difusionais e adsortivos, respectivamente (**GOSSER Jr., 1993**). As **Figuras 6, 7 e 8** mostram os estudos de velocidades dos HPAs pela VVL.

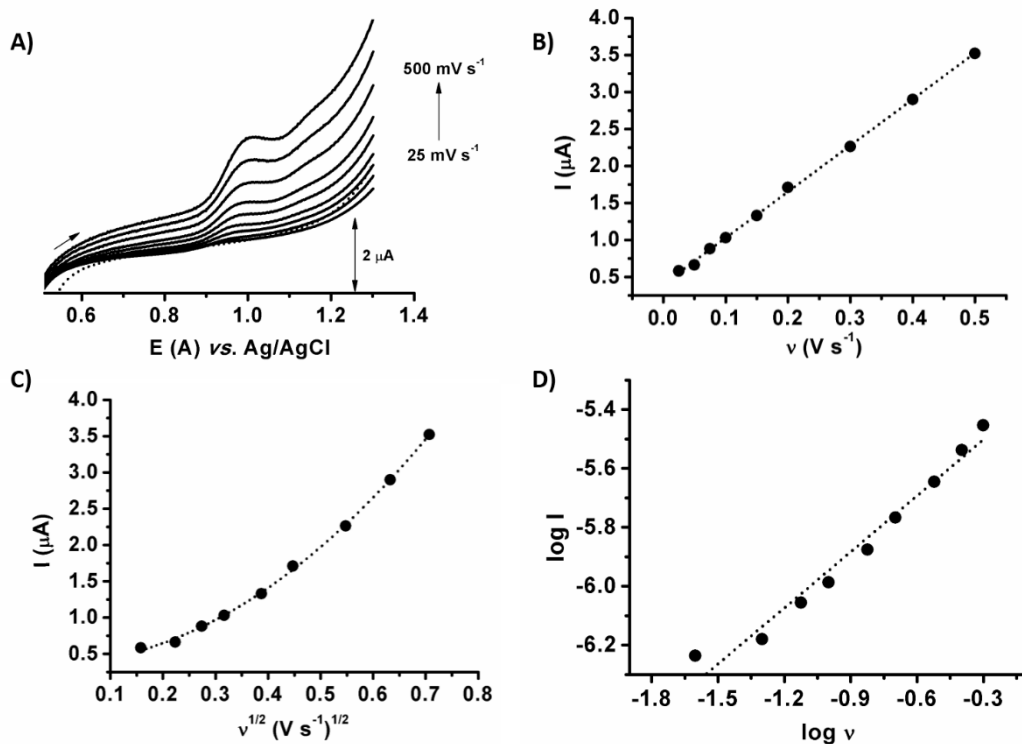


Figura 6 – A) Voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o pico P₁ de uma solução de $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de benzo(a)pireno em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH=4,0): na (...) ausência e (—) presença. Influência das correntes de pico I_{p1} com a v (B) e a v^{1/2} (C). D) Gráfico do log I_{p1} vs log v.

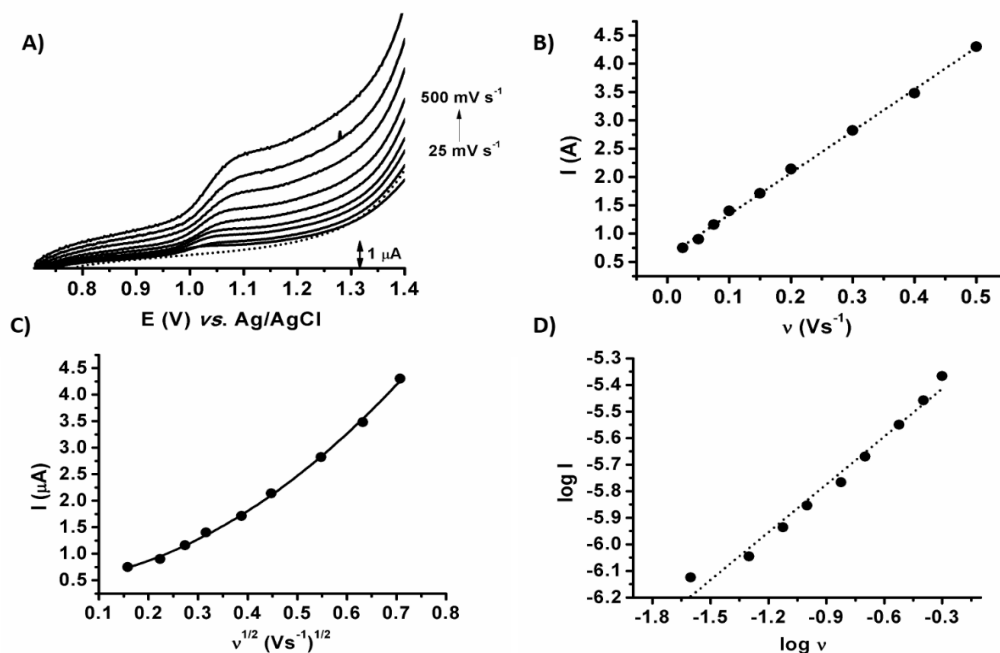


Figura 7 – A) Voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o pico P₁ de uma solução de $8,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de pireno em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH=4,0): na (...)

ausência e (—) presença. Influência das correntes de pico I_{p1} com a v (B) e a $v^{1/2}$ (C). D) Gráfico do $\log I_{p1}$ vs $\log v$.

Os estudos de velocidades dos HPAs benzo(a)pireno e pireno, **Figuras 6A e 7A**, apresentaram um comportamento similar em termo de resposta de seus resultados, ambos mostraram um gráfico I_p vs v linear (**Figuras 6B e 7B**) e um gráfico I_p vs $v^{1/2}$ não linear (**Figuras 6C e 7C**) indicando uma transferência eletrônica de massa governada por adsorção, como foi abordado anteriormente. A transferência eletrônica de massa também foi estudada em função do $\log I_p$ vs $\log v$ (**Figuras 6D e 7D**), onde o coeficiente angular resultante da reta resultante do gráfico foi de 0,63 e 0,60 respectivamente, o mostra que esses HPAs apresentam uma transferência de massa governada predominantemente por adsorção, corroborando com os estudos apresentados. Já o HPA fluoranteno (**Figura 8A**), apresentou um comportamento diferente, se comparado com os outros HPAs em estudo, os gráficos I_p vs v (**Figura 8B**) e I_p vs $v^{1/2}$ (**Figura 8C**) mostraram em seus gráficos e uma não-linearidade e uma linearidade, respectivamente, indicando uma transferência eletrônica de massa governada por difusão. Aplicando o logaritmo nos valores de corrente e velocidade, como realizado nos estudos dos outros HPAs, o gráfico do $\log I_p$ vs $\log v$, (**Figura 8D**), apresentou um valor de inclinação de 0,53, indicando uma transferência eletrônica de massa governada predominantemente por difusão.

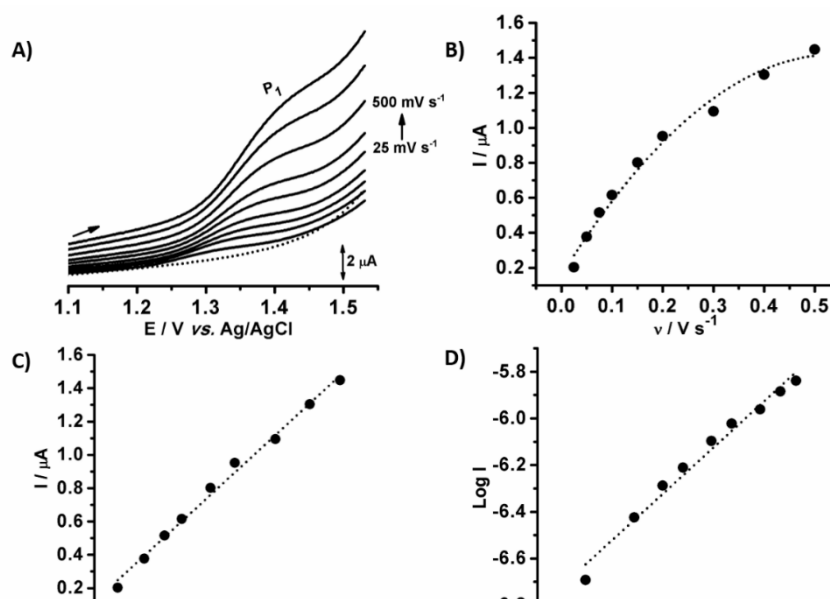


Figura 8 – A) Voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o picos P₁ de uma solução de $8,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de fluoranteno em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH=4,0); na (...) ausência e (—) presença. Influência das correntes de pico I_{p1} com a v (B) e a $v^{1/2}$ (C). D) Gráfico do $\log I_{p1}$ vs $\log v$.

2.2.1.1 Estudo de pH dos HPAs

Voltamogramas de pulso diferencial dos HPAs em estudo foram registrados em diferentes eletrólitos, com valores de pH variando de 1,0 a 10,0. Os estudos envolvendo a análise da primeira varredura de potencial para a oxidação dos HPAs em VPD evidenciaram a presença de apenas um processo oxidativo, pico P₁ (**Figuras 9, 10 e 11**). Os HPAs em estudo não apresentaram sinal nos pHs 1,0 e 2,0 no nível de concentração utilizada.

Uma solução de $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno foi utilizada para os estudos de pH, utilizando diferentes eletrólitos suporte em VPD, apresentando um processo oxidativo P₁. Os valores de $3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$ apresentou um valor de potencial de pico P₁ ($E_{P1} \approx 0,81 \text{ V}$), onde obteve uma maior sensibilidade em termos de corrente no pH 3,0 (**Figura 9B**). O processo oxidativo praticamente independe do pH, sendo encontrada uma inclinação de -16 mV/pH , sugerindo que o mecanismo de reação envolve apenas a transferência de elétrons. Experimentalmente, um valor de 80 mV foi obtido para a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$), sugerindo que o processo de oxidação irreversível envolve a transferência de apenas 1 elétron, estando em concordância com o previsto teoricamente pela relação $90/n$, ou seja, 90 e 45 mV para reações eletroquímicas governadas pela transferência de 1 e 2 elétrons, respectivamente (**BRETT e BRETT, 1996**).

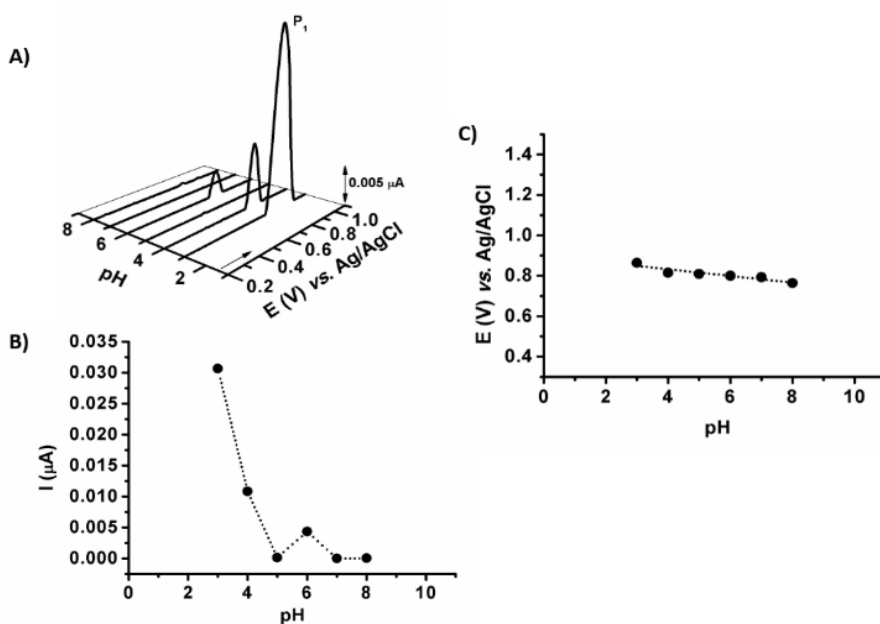


Figura 9 – Benzo(a)pireno: A) 3D dos voltamogramas de pulso diferencial em diferentes valores de pH. B) I_p vs pH. C) E_p vs pH.

Uma solução de $4,98 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de pireno foi utilizada para os estudos de pH em diferentes eletrólitos suporte usando a técnica VPD, apresentando um processo oxidativo P_1 . Os valores de $3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$ apresentaram um potencial de pico P_1 ($E_{P1} \approx 1,01\text{V}$), onde obteve uma maior sensibilidade em termos de corrente no pH 4,0 (**Figura 10B**). O processo oxidativo praticamente independe do pH, sendo encontrada uma inclinação de -30 mV/pH , sugerindo que o número de prótons corresponde à metade do número de elétrons transferidos neste processo (**GARRIDO et al., 2010**). Contudo, considerando um valor da $W_{1/2} = 96 \text{ mV}$ a transferência eletrônica envolve a participação de 1 elétron. Como só 1 elétron está envolvido no mecanismo e o número de prótons corresponderia a sua metade, como discutido anteriormente, foi utilizado uma aproximação, em que o mecanismo de oxidação para o pireno envolve $1e^-/1H^+$ (**BRETT e BRETT, 1998**).

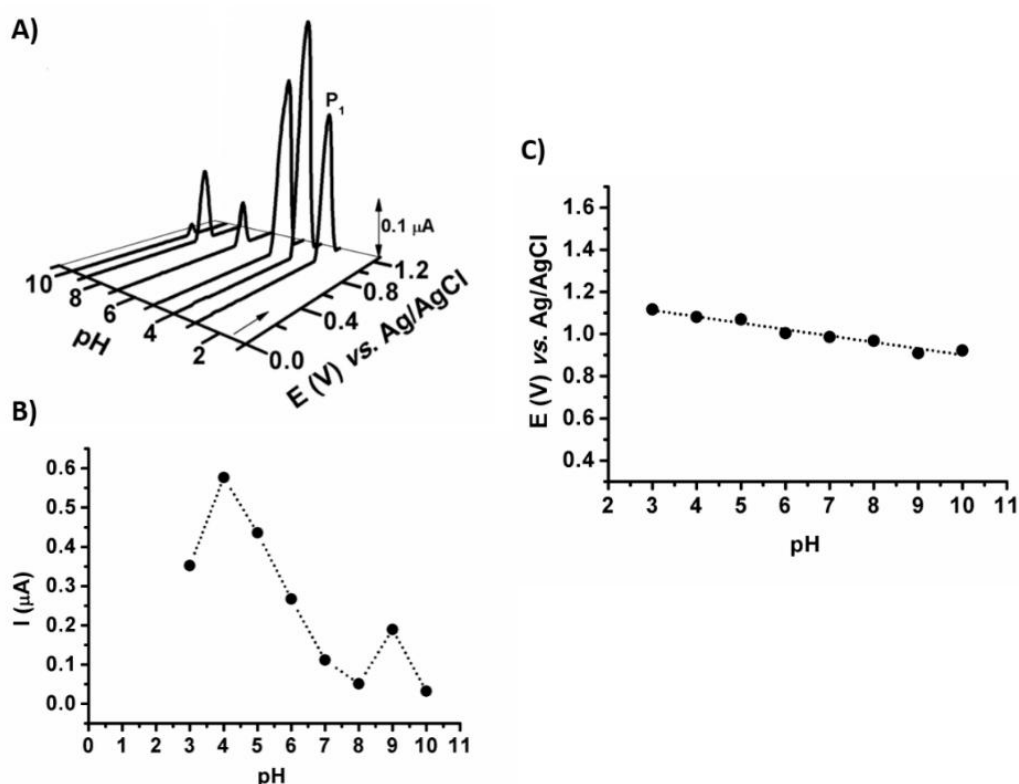


Figura 10 – Pireno: A) 3D dos voltamosgramas de pulso diferencial em diferentes valores de pH. B) I_p vs pH. C) E_p vs pH.

Uma solução de $4,98 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de fluoranteno foi utilizada para os estudos de pH, em diferentes eletrólitos por VPD, apresentando um processo oxidativo P_1 . Os valores de $3,0 \leq \text{pH} \leq 9,0$ o potencial de pico P_1 ($E_{P1} \approx 1,24\text{V}$), onde obteve uma maior

sensibilidade em termos de corrente no pH 4,0 (**Figura 11B**). O processo oxidativo praticamente independe do pH, sendo encontrada uma inclinação de -13 mV/pH, sugerindo que o mecanismo de reação envolve apenas a transferência de elétrons. O valor de 74 mV foi obtido experimentalmente pelo $W_{1/2}$, sugerindo que o processo de oxidação irreversível envolve a transferência de apenas 1 elétron (**BRETT e BRETT, 1998**).

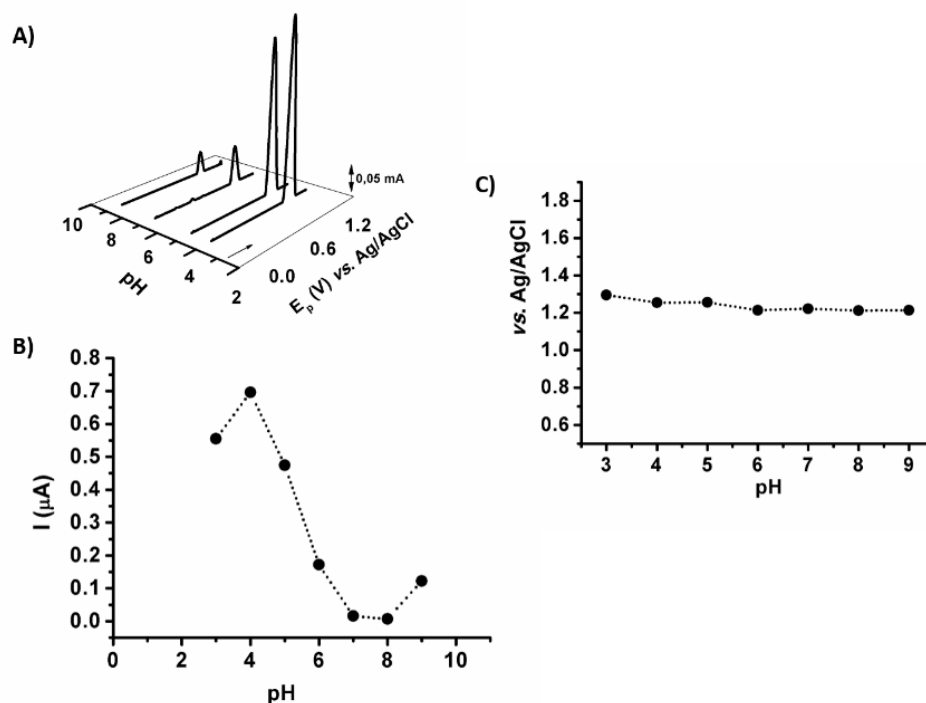


Figura 11 – Fluoranteno: A) 3D dos voltamosgramas de pulso diferencial em diferentes valores de pH. B) I_p vs pH. C) E_p vs pH.

O estudo de pH dos HPAs, forneceu informações importantes a cerca do mecanismo oxidativo do analitos (número de prótons e elétrons), o potencial dos HPAs nos diferentes tipos de pHs e sua sensibilidade em termos de corrente. Logo, uma determinação simultânea desses HPAs se torna viável em VPD utilizando como eletrólito suporte o tampão acetato (pH 4,0) que apresentou para a maioria dos HPAs maior corrente de pico.

2.2.1.2 Determinação analítica dos HPAs por VPD

Estudo dos parâmetros e curva analítica

A VPD foi utilizada para desenvolver o método de determinação dos HPAs, sendo selecionado as melhores condições experimentais e parâmetros instrumentais. Assim, o efeito de cada um destes parâmetros sobre o potencial de pico e a intensidade de corrente de pico para os HPAs foram estudados e selecionados de forma univariada utilizando uma solução mista $1,64 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ dos HPAs em solução tampão acetato (pH 4,0), como apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 1 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação dos HPAs.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Amplitude (mV)	10 – 100	50
Velocidade de varredura (mV s^{-1})	10 – 35	15
Tempo de deposição (s)*	0 – 300	60

*Circuito aberto

Após a otimização dos parâmetros em VPD uma curva analítica (**Figura 12**) foi construída pela adição de alíquotas da solução mista dos padrões dos HPAs ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Ao adicionar a primeira alíquota da solução mista, o HPA benzo(a)pireno não apresentou resposta, contudo, na segunda adição em diante houve o aparecimento do sinal dos processos oxidativos dos três HPAs. Porém, houve deslocamento de potencial dos HPAs a cada vez que era adicionado a solução mista, de tal forma que houve um crescimento analítico apenas para o HPA pireno, sendo que seu deslocamento de potencial foi de aproximadamente 100 mV. O benzo(a)pireno não apresentou crescimento analítico, e houve descolamento de potencial da mesma forma que o pireno (aproximadamente 100 mV). O fluoranteno apresentou um crescimento de sinal até a quarta adição da alíquota, apresentando uma saturação de seu sinal na adição da última alíquota e um deslocamento de potencial de quase 200 mV. Logo, os HPAs em estudo

tornaram-se fortes interferentes entre si, prejudicando sua análise simultânea, havendo deslocando dos seus potenciais tornando inviável estimar seus limites de detecção e quantificação. Embora a técnica VPD demonstrasse ser viável a análise simultânea dos HPAs nos estudos individuais, ao adicionar todos, por meio de uma solução mista, não foi viável a determinação dos três, demonstrando uma não seletividade e sensibilidade, necessitando de melhorias na análise.

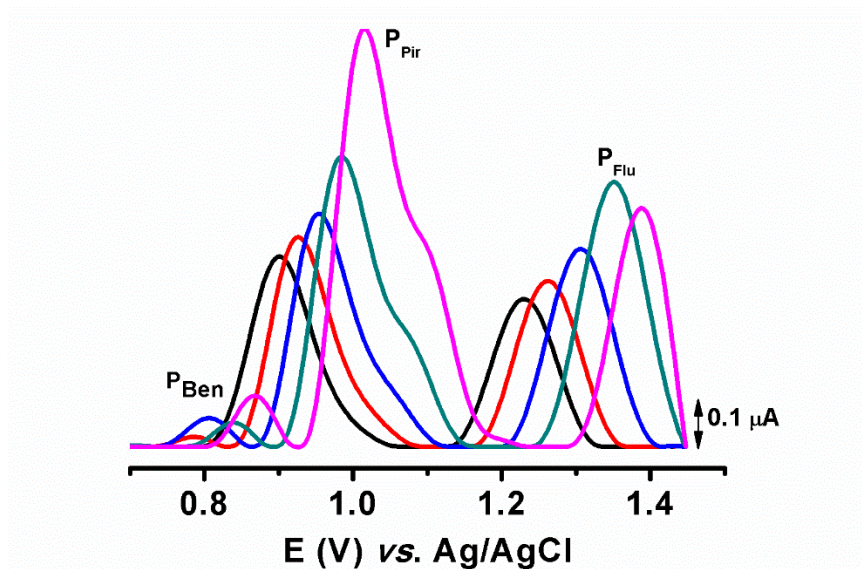


Figura 12 – Curva analítica dos HPAs. Concentrações em mol L⁻¹: (—) $4,98 \times 10^{-6}$; (—) $9,90 \times 10^{-6}$; (—) $1,48 \times 10^{-5}$; (—) $2,28 \times 10^{-5}$; (—) $3,07 \times 10^{-5}$.

2.2.2 Uso de surfactante

O uso de surfactante nas análises voltamétricas é bastante empregado na literatura de modo a facilitar uma maior interação entre o eletrodo e o analito, melhorando sua solubilidade no meio, sua sensibilidade e seletividade.

Neste trabalho foi utilizado dois surfactantes o CTAB 2% (m/v) e o DSS 2% (m/v) na análise dos HPAs visando melhorias nas análises na técnica VPD. Por apresentar uma baixa sensibilidade entre os HPAs (no estudo anterior), o benzo(a)pireno foi escolhido para fazer as análises com os surfactantes.

Uma solução $8,26 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de benzo(a)pireno foi empregado para os testes com os surfactantes. Inicialmente, foi realizado a análise do HPA sem a presença do surfactante, e depois na presença do surfactante para ter um comparativo do ganho ou não de sensibilidade na análise. A célula eletroquímica tinha um volume total de 3 mL do

eletrólito suporte (volume ótimo empregado pelo fato dos eletrodos ficarem com sua superfície submersa de forma eficiente para a análise), na análise com os surfactantes, para manter a mesma padronização, foi adicionado 2,9 mL do eletrólito suporte, tampão acetato (pH 4,0) e em seguida, adicionado 0,1 mL do surfactante, para então ser feito a medida voltamétrica com o HPA, as condições experimentais utilizadas foram as mesmas da curva analítica, **Figura 13**.

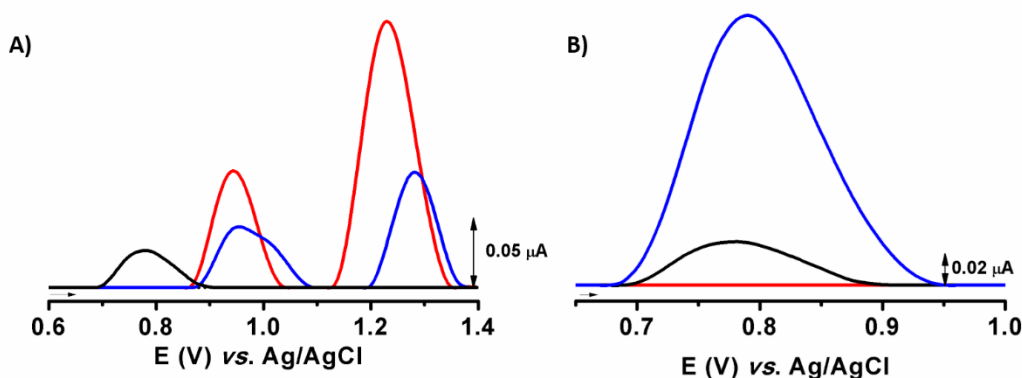


Figura 13 – Voltamogramas de pulso diferencial da análise de solução $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno, na presença e ausência do surfactante. A) CTAB e B) DSS. (—) Benzo(a)pireno sem surfactante; (—) eletrólito suporte mais o surfactante; (—) benzo(a)pireno na presença do surfactante.

O surfactante CTAB apresentou dois processos oxidativos, contudo, esse surfactante inibiu o sinal proveniente do benzo(a)pireno não sendo portanto, indicado para sua análise. O uso do surfactante DSS, não apresentou nenhum processo oxidativo e possibilitou um ganho de sensibilidade do benzo(a)pireno, indicando ser viável para a sua determinação analítica. Visando aumentar a sensibilidade do benzo(a)pireno foram feitos estudos da concentração do surfactante (0,5 a 10%) e o volume de surfactante utilizado na célula eletroquímica (250, 500 e 1000 μL), os resultados dos estudos realizados encontra-se na **Tabela 3**.

A utilização de 250 μL do surfactante DSS 5,0% apresentou melhor resposta em termos de corrente para a solução $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno em VPD. Contudo, um novo teste para a determinação do volume foi realizada, objetivando alcançar a concentração micelar crítica (CMC) do surfactante para esse HPA, haja vista, que no experimento realizado com apenas 3 volumes em diferentes concentrações, pode-se observar que em determinados volumes houve uma diminuição do sinal do benzo(a)pireno, indicando que o volume utilizado foi superior ao CMC, consequentemente, tornando o surfactante um interferente na análise. Uma solução do

benzo(a)pireno $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0) foi utilizada nesse estudo variando o volume do surfactante DSS 5,0% de 0 a 1000 μL , **Figura 14**.

O volume de 500 μL apresentou melhor interação entre o analito e o eletrodo, ocasionando maior sensibilidade em termos de corrente, o qual indica que esse volume não ultrapassou a CMC, sendo este utilizado para as análises de determinação dos HPAs.

Tabela 2 - Resposta analítica de uma solução $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno em diferentes concentrações e volumes do surfactante DSS.

Concentração do surfactante DSS % (m/v)	Volume do surfactante (μL)	Corrente (A)
0,5	100	$1,05 \times 10^{-10}$
	250	$8,67 \times 10^{-8}$
	1000	$1,10 \times 10^{-7}$
1,0	100	$3,72 \times 10^{-9}$
	250	$1,31 \times 10^{-7}$
	1000	$1,05 \times 10^{-7}$
2,0	100	$4,88 \times 10^{-8}$
	250	$1,80 \times 10^{-7}$
	1000	$2,12 \times 10^{-7}$
5,0	100	$1,23 \times 10^{-7}$
	250	$6,10 \times 10^{-7}$
	1000	$2,99 \times 10^{-7}$
7,0	100	$1,95 \times 10^{-7}$
	250	$3,00 \times 10^{-7}$
	1000	$3,06 \times 10^{-7}$
10,0	100	$8,67 \times 10^{-8}$
	250	$2,77 \times 10^{-7}$
	1000	$5,75 \times 10^{-7}$

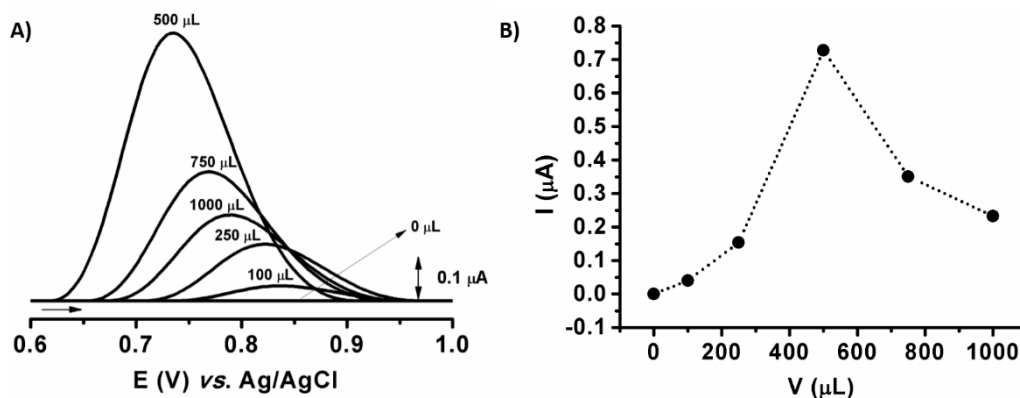


Figura 14 – Estudo de diferentes volumes do surfactante DSS 5,0% em uma solução do HPA benzo(a)pireno $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0). A) Voltamogramas de pulso diferencial da resposta analítica do HPA em diferentes volumes do surfactante. B) gráfico I_p vs V.

2.2.3 Determinação analítica dos HPAs por VPD usando surfactante em ECV

O uso do surfactante DSS proporcionou uma melhor resposta eletroquímica em termos de sensibilidade para o benzo(a)pireno, possibilitando obter resultados mais satisfatórios para os HPAs. Visando uma determinação simultânea dos HPAs estudados, foi realizado um novo estudo dos parâmetros em VPD, como pode ser observado na Tabela 3. Contudo, esse estudo foi realizado utilizando apenas o HPA benzo(a)pireno $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0).

Os parâmetros estudados em DPV foram os mesmos da Tabela 1: a velocidade de varredura (v), amplitude de pulso (a) e tempo de deposição (t_d). O tempo de modulação foi ajustado em 70 ms apresentando uma boa resolução para a largura do pico. Inicialmente v foi investigado numa faixa de 5 a 35 mV s^{-1} , obtendo um aumento de corrente significativo usando 25 mV s^{-1} . A influência de a foi investigada de 10 a 100 mV, onde 60 mV apresentou uma melhor resposta de sinal em termos de intensidade da corrente de pico. O t_d foi estudado na faixa de 0 a 300 s com uma corrente de pico máxima em 120 s, (**Tabela 4**).

Tabela 3 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação dos HPAs usando surfactante DSS.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Amplitude (mV)	10 – 100	60
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	10 – 35	25
Tempo de deposição (s)*	0 – 300	120

*Circuito aberto

2.2.3.1 Curva e parâmetros de desempenho analítico

Na curva analítica anterior, **Figura 12**, foi observado uma forte interferência entre os HPAs estudados. Com isso, antes da curva analítica propriamente dita, foram feitas curvas individuais (mantendo dois HPAs com concentração fixa e aumentando um único HPA com a adição de algumas alíquotas) foram realizadas visando observar seu comportamento de modo a garantir um método analítico satisfatório. A **Figura 15** mostra as curvas individuais de cada HPA: benzo(a)pireno (**Figura 15 A**), pireno (**Figura 15 B**) e fluoranteno (**Figura 15 C**). Inicialmente foi adicionado na célula eletroquímica um mix dos HPAs de concentração $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em seguida adicionado mais duas alíquotas de 100 µL do padrão analítico do HPA correspondente de concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como pode ser observado, não houve interferência significativa entre os analitos estudados, logo uma determinação simultânea desses HPAs pode ser realizada. A **Tabela 5** apresenta as informações referente as figuras de mérito dos HPAs.

A curva analítica do benzo(a)pireno apresentou uma significativa relação linear na faixa de $(0,5 - 33,6) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 22$ e R^2 igual a 0,9954, apresentando a seguinte equação de regressão linear:

$$I_p/A = 1,28 \times 10^{-8} (\pm 1,24 \times 10^{-8}) + 4,70 \times 10^{-2} (\pm 6,98 \times 10^{-4}) [\text{Benzo(a)pireno}]/\text{mol L}^{-1}$$

A curva analítica do pireno apresentou uma significativa relação linear na faixa de $(0,5 - 33,6) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 22$ e R^2 igual a 0,9963, apresentando a seguinte equação de regressão linear:

$$I_p/A = 1,39 \times 10^{-8} (\pm 1,15 \times 10^{-8}) + 4,90 \times 10^{-2} (\pm 6,50 \times 10^{-4}) [\text{pireno}]/\text{mol L}^{-1}$$

A curva analítica do pireno apresentou uma significativa relação linear na faixa de $(2,5 - 98,4) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 15$ e R^2 igual a 0,9927, apresentando a seguinte equação de regressão linear:

$$I_p/A = -6,03 \times 10^{-8} (\pm 1,36 \times 10^{-8}) + 1,10 \times 10^{-2} (\pm 2,71 \times 10^{-4}) [\text{Fluoranteno}]/\text{mol L}^{-1}$$

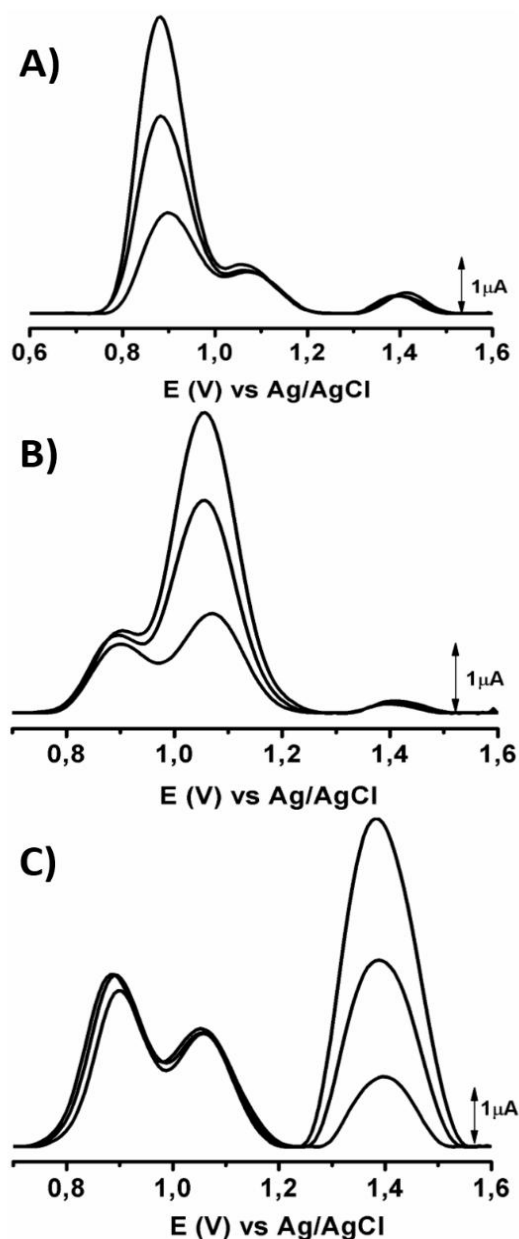


Figura 15 – Curvas individuais em VPD dos HPAs em ECV. A) benzo(a)pireno B) pireno C) Fluoranteno.

Tabela 4 – Figuras de mérito dos HPAs em VPD usando um ECV.

Figuras de mérito	HPAs		
	Benzo(a)pireno	Pireno	Fluoranteno
Faixa de Concentração ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	0,50 – 33,6	0,50 – 33,6	2,50 – 98,4
R ²	0,9954	0,9963	0,9927
LD ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	0,03	0,02	0,42
LQ ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)	0,10	0,06	1,38
Repetibilidade	2,9	3,3	2,5
Reprodutibilidade	3,7	4,3	4,7

Os limite de detecção (LD) de 0,03; 0,02 e 0,42 mol L⁻¹ e quantificação (LQ) 0,10; 0,06 e 1,38 $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foram estimados segundo o procedimento descrito por Mocak et al. Para os HPAs benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno, respectivamente. A precisão do método proposto em VPD foi determinado em termos de repetibilidade (2,9, 3,3 e 2,5%, para 15 varreduras sucessivas) e reprodutibilidade (3,7, 4,3 e 4,7%, para 5 diferentes medidas) para uma concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ dos HPAs benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno, respectivamente.

O efeito de memória foi verificado para um concentração dos HPAs $4,98 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão acetato (pH 4,0) realizando vários voltamogramas consecutivos alternando-se entre os tempos de deposição, do material eletroativo, 0 e 120 s. Como pode ser verificado na **Figura 16**, nenhum efeito de memória foi observado, indicando a plena regeneração da atividade do sensor.

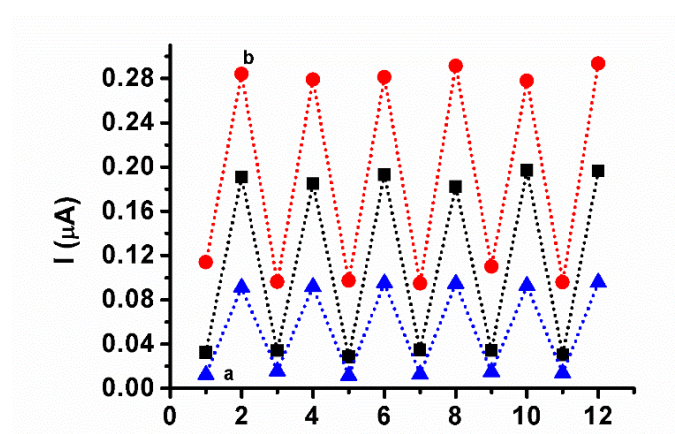


Figura 16 – Efeito de memória dos HPAs em VPD usando ECV. (—) benzo(a)pireno (—) pireno (—) fluoranteno

A exatidão do método foi avaliada por meio de um teste de recuperação em cinco amostras de cachaças paraibana. Para todas as amostras, o ECV respondeu eficientemente para as duas faixa de concentração dos HPAs $3,61$ e $4,76 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de recuperação ficaram acima de 89% nas amostras estudadas (**Tabela 6**). De acordo com AOAC-I, uma recuperação aceitável é uma função tanto da concentração quanto da finalidade da análise. Limites de recuperação de 75-120% são esperados para a concentração na ordem de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (AOAC-I, 2012). Assim, o método permitiu a obtenção de valores de recuperação aceitáveis para os HPAs na faixa de concentração estudada.

Tabela 5 – Estudo de recuperação dos HPAs em amostras de cachaça.

Cachaça	Adicionado ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	Recuperado (a) ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	%	Recuperado (b) ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	%	Recuperado (c) ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	%
1	3,61	3,22	$89,2 \pm 1,53$	3,37	$93,4 \pm 2,31$	3,18	$88,1 \pm 1,35$
	4,76	4,34	$91,2 \pm 1,24$	4,66	$97,9 \pm 2,44$	4,28	$89,9 \pm 1,11$
2	3,61	3,40	$94,2 \pm 0,83$	3,50	$97,0 \pm 3,40$	3,29	$91,1 \pm 0,89$
	4,76	4,55	$95,6 \pm 0,77$	4,73	$99,4 \pm 2,54$	4,47	$93,9 \pm 0,45$
3	3,61	3,15	$87,3 \pm 1,57$	3,49	$96,7 \pm 1,12$	3,24	$89,8 \pm 2,33$
	4,76	4,30	$90,3 \pm 1,33$	4,65	$97,7 \pm 0,97$	4,45	$93,5 \pm 2,12$
4	3,61	3,24	$89,8 \pm 3,17$	3,20	$88,6 \pm 4,45$	3,33	$92,2 \pm 1,98$
	4,76	4,45	$93,5 \pm 2,08$	4,31	$90,5 \pm 4,22$	4,57	$96,0 \pm 1,86$
5	3,61	3,07	$89,0 \pm 3,47$	3,32	$92,0 \pm 0,87$	3,43	$95,0 \pm 1,33$
	4,76	4,21	$93,4 \pm 2,98$	4,55	$95,6 \pm 0,52$	4,58	$96,2 \pm 1,17$

2.2.4 Determinação analítica dos HPAs em VPD usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono

O ECV foi modificado com nanotubos funcionalizados e não-funcionalizados, como demonstrado na seção 2.1.3.2 do experimental, objetivando melhores resultados para os HPAs em termo de sensibilidade, visto que houve uma boa resposta eletroquímica com a superfície do eletrodo nua. Inicialmente, a investigação foi realizada utilizando o benzo(a)pireno na concentração $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0), os

parâmetros VPD utilizado foram os mesmos da curva dos HPAs com o ECV, sem o auxílio do surfactante, seção 2.2.1.2, ($\nu = 15 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $t_d = 60 \text{ s}$). Visto a eficiência do surfactante na análise dos HPAs o eletrodos modificados foram estudas com e sem a presença do surfactante DSS 5%. Os resultados dos experimentos são mostrados na **Figura 17**.

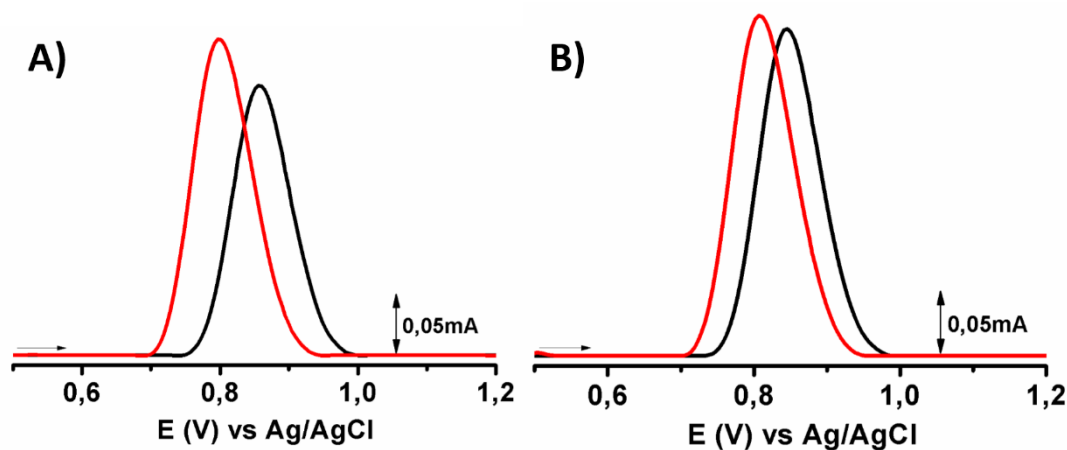


Figura 17 – Voltamogramas de pulso diferencial do HPA benzo(a)pireno da análise de solução $8,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de benzo(a)pireno. A) ECV modificado com nanotubos funcionalizados. B) ECV modificados com nanotubos não funcionalizados. (—) ECV sem modificação (—) ECV modificado com os nanotubos.

Os resultados indicaram que o ECV modificados com os nanotubos (funcionalizados ou não) não apresentaram diferença significativa em termos de corrente de pico para a determinação do benzo(a)pireno, no eletrólito puro. Contudo, ao adicionar o DSS 5% ao eletrólito e (2,5 mL do eletrólito + 0,5 mL do surfactante) e realizando o branco da análise do ECV modificado, camada de nanotubo que estava na superfície do eletrodo reagia com o surfactante, desfazendo a modificação, no qual os nanotubos ficavam imersos na solução. Isto se deve porque a região hidrofóbica das moléculas do surfactante interage com a superfície dos nanotubos destruindo a interface hidrofóbica dos nanotubos com a água e a interação tubo-tubo (van der Waals), essa interação se deve à formação de micelas do surfactante que encapsulam os nanotubos de carbono formando dispersões estáveis em meio aquoso.

2.2.5 Determinação analítica dos HPAs em VPD usando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianinas metálicas

Eletrodos de pasta de carbono com e sem modificação com ftalocianinas metálicas (Co, Ni, Cu e Zn) foram construídos (seção 2.1.3.3 do experimental) para a determinação dos HPAs. Os parâmetros utilizados inicialmente foram os mesmos do ECV seção 2.2.3 ($v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $t_d = 120 \text{ s}$), com e sem a presença do surfactante DSS 5%. O HPA benzo(a)pireno na concentração $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0) foi utilizado para a realização desse estudo e os resultados obtidos encontram na **Tabela 7**.

Tabela 6 – Determinação do HPA benzo(a)pireno $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0) em VPD utilizando EPC modificados com ftalocianinas metálicas em diferentes proporções na presença e ausência do surfactante DSS.

Eletrodos		I (A) na ausência de surfactante	I (A) na presença do surfactante
EPC		$2,30 \times 10^{-8}$	$1,77 \times 10^{-7}$
EPC com ftalocianina de Cu	5%	$1,02 \times 10^{-7}$	Inter.
	10%	$2,05 \times 10^{-7}$	Inter.
	15%	$1,87 \times 10^{-7}$	Inter.
EPC com ftalocianina de Co	5%	ND	$3,77 \times 10^{-7}$
	10%	ND	$6,63 \times 10^{-7}$
	15%	ND	$9,57 \times 10^{-7}$
EPC com ftalocianina de Zn	5%	ND	$2,24 \times 10^{-6}$
	10%	ND	$1,46 \times 10^{-6}$
	15%	ND	$1,19 \times 10^{-6}$
EPC com ftalocianina de Ni	5%	ND	$2,02 \times 10^{-6}$
	10%	ND	$1,98 \times 10^{-6}$
	15%	ND	$1,77 \times 10^{-6}$

ND = Não Detectado; Inter. = Interferência

O EPC modificado com ftalocianina de Cu conseguiu detectar um processo oxidativo do benzo(a)pireno ($E_p \approx 0,874V$) sem a presença de surfactante obtendo valores de corrente na ordem de 10^{-7} A. A presença do surfactante no entanto, tornou-se um interferente, pois apresentou um processo oxidativo no potencial onde sai o processo oxidativo do benzo(a)pireno. Os demais EPC modificado com as ftalocianinas metálicas na ausência do surfactante não conseguiu detectar o benzo(a)pireno na concentração estudada.

O EPC puro na presença/ausência do surfactante DSS 5%, apresenta um processo oxidativo correspondente do benzo(a)pireno, no entanto, com valores de corrente mais baixas do que com as modificadas.

O EPC modificado com 5% de ftalocianina de Zn foi o que apresentou maior sensibilidade em termos de corrente na determinação do benzo(a)pireno, sendo este eletrodo utilizado na determinação analítica dos HPAs. O EPC modificado com ftalocianina de Ni apresentou valores de corrente próximo ao do Zn, contudo, outros processos oxidativos foram observados, próximo ao do benzo(a)pireno o que poderia comprometer na análise dos demais HPAs.

2.2.6 Estudo dos parâmetros em VPD usando um EPC modificado com ftalocianina de Zn

Definido o eletrodo de trabalho (EPC modificado com 5% de ftalocianina de Zn) e o surfactante (DSS 5%), foi realizado o estudo dos parâmetros em VPD de forma univariada, para uma concentração $4,98 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de benzo(a)pireno em tampão acetato (pH 4,0). Os parâmetros analisados são os da técnica (α , v) e também o t_d . A faixa de concentração estudada foram as mesmas utilizadas pelo ECV. A **Tabela 8**, apresenta os parâmetros e os valores ótimos obtidos.

Tabela 7 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação dos HPAs usando o EPC modificado com ftalocianina de Zn 5%.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Amplitude (mV)	10 – 100	60
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	10 – 35	35
Tempo de deposição (s)*	0 – 300	240

*Circuito aberto

Os parâmetros estudados em DPV foram a velocidade de varredura (v), amplitude de pulso (a) e tempo de deposição (t_d). O tempo de modulação foi ajustado em 70 ms apresentando uma boa resolução para a largura do pico. Inicialmente v foi investigado numa faixa de 5 a 35 mV s⁻¹, obtendo um aumento de corrente significativo usando 35 mV s⁻¹. A influência de a foi investigada de 10 a 100 mV, onde 60 mV apresentou uma melhor resposta de sinal em termos de intensidade da corrente de pico. O t_d foi estudado na faixa de 0 a 300 s com uma corrente de pico máxima em 240 s.

2.2.6.1 Curva analítica

Antes da realização da curva analítica, foi realizado um estudo das curvas individuais (como realizado para o ECV), visando saber se os HPAs estudados, possam ser interferentes entre si. Na **Figura 18** estão apresentadas curvas dos HPAs, após adições crescentes da concentração de um único HPA enquanto os outros tinham uma concentração fixa, para verificar se há interferência significativa entre os analitos de interesse. A **Figura 18** mostra as curvas individuais de cada HPA: benzo(a)pireno (**Figura 18 A**), pireno (**Figura 18 B**) e fluoranteno (**Figura 18 C**). Inicialmente foi adicionado na célula eletroquímica um mix dos HPAs de concentração $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, em seguida adicionado mais quatro alíquotas de 100 µL do padrão analítico do HPA correspondente de concentração $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Como pode ser observado, não houve interferência significativa entre os analitos estudados, logo uma determinação simultânea desses HPAs pode ser realizada. A **Tabela 9** apresenta as informações referente as figuras de mérito dos HPAs.

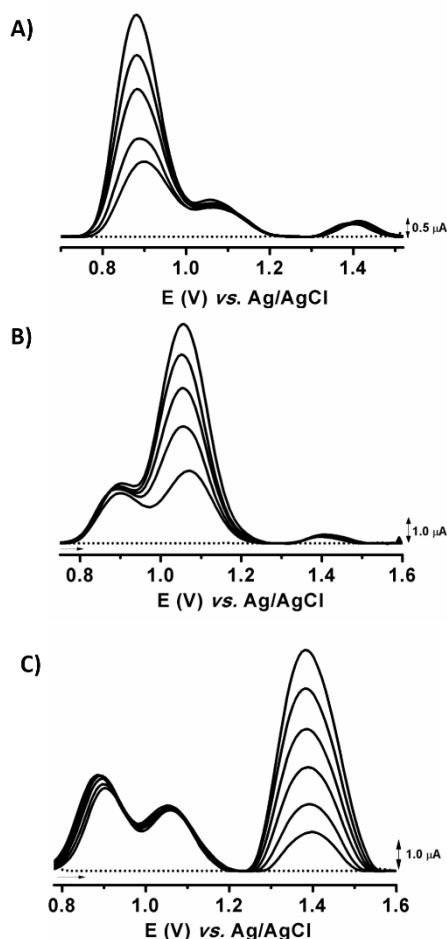


Figura 18 – Curvas individuais obtidos em VPD dos HPAs em EPC modificados com ftalocianinas de Zn.

Tabela 8 – Figuras de mérito dos HPAs em VPD usando o EPC modificado com ftalocianina de zinco.

Figuras de mérito	HPAs		
	Benzo(a)pireno	Pireno	Fluoranteno
Faixa de Concentração (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	0,50 – 31,7	0,25 – 15,8	0,75 – 47,5
R ²	0,9942	0,9941	0,9946
LD (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	0,12	0,03	0,14
LQ (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	0,40	0,09	0,46
Repetibilidade (%)	3,5	4,1	2,7
Reprodutibilidade (%)	4,7	4,9	3,1

A curva analítica dos HPAs apresentaram uma significativa relação linear, apresentando as seguinte equações de regressão linear:

$$I_p/A = 2,64 \times 10^{-8} (\pm 4,66 \times 10^{-9}) + 1,37 \times 10^{-2} (\pm 2,89 \times 10^{-4}) [\text{Benzo(a)pireno}]/\text{mol L}^{-1}$$

Apresentando uma faixa de concentração de $(0,5 - 31,7) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 14$ e R^2 igual a 0,9942, um $LD = 1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um $LQ = 4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

$$I_p/A = 3,78 \times 10^{-8} (\pm 7,90 \times 10^{-9}) + 4,66 \times 10^{-2} (\pm 9,79 \times 10^{-4}) [\text{pireno}]/\text{mol L}^{-1}$$

Apresentando uma faixa de concentração de $(0,25 - 15,8) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 14$ e R^2 igual a 0,9941, um $LD = 3,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e um $LQ = 9,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

$$I_p/A = 1,55 \times 10^{-9} (\pm 3,92 \times 10^{-9}) + 7,93 \times 10^{-2} (\pm 1,62 \times 10^{-4}) [\text{Fluoranteno}]/\text{mol L}^{-1}$$

Apresentando uma faixa de concentração de $(0,75 - 47,5) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 14$ e R^2 igual a 0,9946, um $LD = 1,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um $LQ = 4,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

A precisão do método proposto em VPD foi determinado em termos de repetibilidade (2,9, 3,3 e 2,5%, para 15 varreduras sucessivas) e reprodutibilidade (3,7, 4,3 e 4,7%, para 5 diferentes medidas) para uma concentração de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ dos HPAs benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno, respectivamente.

O efeito de memória foi verificado para um concentração dos HPAs $4,98 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato (pH 4,0) realizando vários voltamogramas consecutivos alternando-se entre os tempos de deposição, do material eletroativo, 0 e 240 s. Conforme pode ser verificado na **Figura 19**, nenhum efeito de memória foi observado, indicando a plena regeneração da atividade do sensor.

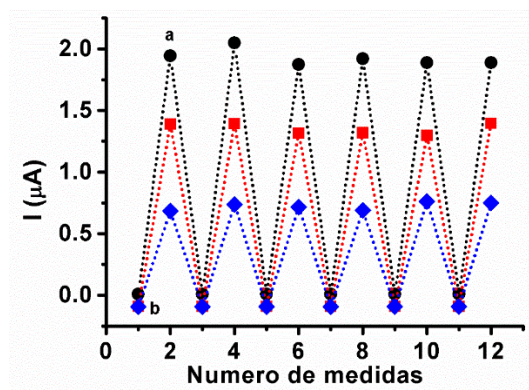


Figura 19 – Efeito de memória. (—) Benzo(a)pireno (—) pireno (—) fluoranteno.

A exatidão do método foi avaliada por meio de um teste de recuperação em cinco amostras de cachaças paraibana. Para todas as amostras, o ECV respondeu eficientemente para as duas faixa de concentração dos HPAs $5,96$ e $8,81 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de

recuperação ficaram acima de 89% nas amostras estudadas (**Tabela 10**). De acordo com AOAC-I, uma recuperação aceitável é uma função tanto da concentração quanto da finalidade da análise. Limites de recuperação de 75-120% são esperados para a concentração na ordem de 10^{-6} mol L⁻¹) (AOAC-I, 2012). Assim, o método permitiu a obtenção de valores de recuperação aceitáveis para os HPAs na faixa de concentração estudada.

Tabela 9 – Estudo de recuperação dos HPAs em amostras de cachaça.

Cachaça	Adicionado (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	Recuperado (a) (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	%	Recuperado (b) (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	%	Recuperado (c) (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	%
1	5,96 8,81	5,33 8,35	89,4±1,97 94,8±4,99	5,79 8,77	97,1±4,05 99,5±3,85	5,54 8,44	93,0±3,21 95,8±3,13
2	5,96 8,81	5,45 8,55	91,4±5,24 97,0±3,17	5,37 8,28	90,1±2,87 94,0±2,77	5,32 8,25	89,3±4,88 93,6±2,67
3	5,96 8,81	5,57 8,66	93,5±2,07 98,3±1,99	5,66 8,47	95,0±3,12 96,1±5,07	5,31 8,17	89,1±5,17 92,7±3,99

CAPÍTULO 3
AMINAS BIOGÊNICAS

3. AMINAS BIOGÊNICAS

Os compostos nitrogenados possuem uma importante função metabólica nas células, sendo essenciais para a formação das proteínas presentes no organismo humano. A degradação destes compostos através de enzimas ocorre naturalmente em humanos e esta reação dará origem às aminas biogênicas ([GOMES et al 2014](#)).

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular, de importância biológica em vegetais, animais e células microbianas, formadas principalmente por descarboxilação microbiana de aminoácidos e transaminação de aldeídos e cetonas ([CUNHA et al. 2012](#)).

3.0.1 Importância

As aminas biogênicas são amplamente distribuídas na natureza, estando presentes nas células e nos tecidos como compostos essenciais ao crescimento, renovação e metabolismo. A espermina e espermidina, por exemplo, são componentes indispensáveis de todas as células vivas. Essas possuem várias interações eletrostáticas com macromoléculas, especialmente DNA, RNA (ácido ribonucléico) e proteínas, e estão envolvidas na regulação e estimulação de suas sínteses. Estimulam a diferenciação celular, interagindo e moldando vários sistemas intracelulares. São importantes na permeabilidade e estabilidade das membranas celulares e reduzem a permeabilidade da mucosa a macromoléculas e proteínas alergênicas, prevenindo alergias alimentares ([BARDÓCZ, 1995](#); [DROLET et al., 1986](#); [LÖSER 2000](#)). De acordo com [DROLET et al. \(1986\)](#) e [BARDÓCZ \(1995\)](#), a espermina e espermidina, assim como as diaminas putrescina e cadaverina, são eficientes sequestradoras de radicais livres em numerosos sistemas enzimáticos, químicos e in vitro; podem inibir peroxidação de lipídeos e prevenir a senescência.

Nos vegetais participam da floração, do desenvolvimento do fruto (do surgimento à senescência), da resposta ao estresse e da síntese de metabólitos secundários, podendo, portanto, ser encontradas naturalmente em alimentos como frutas e hortaliças ([HUI e NOLLET, 2005](#)). Podem ser usadas como fonte de nitrogênio orgânico e desempenhar um papel crítico em diversos processos, entre eles, crescimento da raiz, controle do pH intracelular, desenvolvimento de flor e fruto e resposta ao estresse abiótico, como por exemplo, deficiência de potássio, choque osmótico, estiagem e infecção patogênica.

Poliaminas são também importantes na síntese de metabólitos secundários de interesse biológico, como por exemplo, nicotina e alcalóides (FLORES et al., 1989; WALTERS, 2003). Estão associadas com a parede celular e membranas; regulam a pectinesterase e a ligação com pectina, atrasando o amolecimento do fruto e seu envelhecimento (LEITING e WICKER, 1997). O efeito firmador das poliaminas é similar ao do cloreto de cálcio e pode estar relacionado à sua habilidade de ligação entre a parede celular e membranas, estabilizando-as, ou por tornar a parede celular menos acessível a enzimas responsáveis pelo amadurecimento (BOUCHEREAU et al., 1999).

Embora as ABs tenham papel importante para as plantas e até mesmo para o organismo humano, o estudo dessas aminas em alimentos diretamente relacionada com a qualidade da matriz alimentar e a saúde do consumidor.

3.0.2 Toxicidade e legislação

As ABs presentes em vários alimentos são amplamente estudadas em função de seu potencial efeito tóxico em seres humanos. A Tiramina e a β -feniletilamina têm sido associadas a crises hipertensivas, traduzidas pelo aumento da pressão sanguínea podendo levar a falhas no coração ou até mesmo a hemorragia cerebral (KALAC, 2009; GOMES et al 2014).

A amina, histamina, age como um neurotransmissor e um vasodilatador no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular. É considerada a agente responsável por alguns episódios de envenenamento alimentar, que se manifestam por reações alérgicas, caracterizadas pela dificuldade de respirar, prurido, erupção, vômito, febre e hipertensão. As pessoas que possuem o mecanismo de detoxificação das ABs naturalmente deficientes por razões genéticas ou devido à inibição do mecanismo pelo uso de medicamentos (inibidores de monoamina oxidase) são mais susceptíveis ao envenenamento por histamina (NAILA et al 2010; GOMES et al 2014).

A triptamina tem efeitos tóxicos nos seres humanos promovendo o aumento da pressão arterial, entretanto, não existe um quantitativo máximo de consumo dessa AB relacionado com o efeito tóxico. As poliaminas como a putrescina, espermina, espermidina e cadaverina estão naturalmente presentes em alimentos, envolvidas com o crescimento e a proliferação celular, porém, não foram associadas a efeitos adversos no organismo humano, mas podem reagir com o nitrito e formar as nitrosaminas

carcinogênicas, agindo então, como um possível precursor mutagênico (GOMES et al 2014).

No continente Europeu existem legislações específicas, que determinam uma concentração máxima de AB em alguns tipos de alimentos. Os níveis limite de histamina para pescado fresco é de 100 mg/Kg e para produtos curados de 400 mg/Kg. A americana *Food and Drug Administration* (FDA) considera que o nível de histamina igual a 500 mg/Kg. No Brasil há apenas uma legislação sobre concentrações máximas permitidas de histamina e ela trata sobre pescados frescos e seus derivados. Embora essas regulamentações sejam válidas, elas apenas tratam da histamina, enquanto os alimentos podem carrear outras aminas biogênicas, tão perigosas quanto esta (GOMES et al 2014).

3.0.3 Métodos de análises para as aminas biogênicas

A concentração de aminas nos alimentos depende dos microrganismos presentes, da atividade enzimática nos aminoácidos específicos e da favorabilidade das condições enzimáticas. Uma vez que as aminas biogênicas formadas, são difíceis de destruir por pasteurização ou cozimento. A determinação de ABs em produtos alimentares tem recebido atenção em todo o mundo por causa do seu efeito perigoso em seres humanos. O teor das ABs é um marcador de qualidade alimentar (JIANG et al. 2014). Vários métodos foram desenvolvidos para analisar ABs empregando técnicas cromatográficas.

Pinto et al (2015) determinaram 5 ABs em peixes usando o HPLC com um detector de arranjo de diodos (DAD) e quimiometria. As concentrações de ABs em amostras de peixes variaram de 7,82 a 29,41 $\mu\text{g g}^{-1}$, 8,68 a 25,95 $\mu\text{g g}^{-1}$, 4,76 a 28,54 $\mu\text{g g}^{-1}$, 5,18 a 39,95 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 1,45 a 52,62 $\mu\text{g g}^{-1}$ para triptamina, 2-feniletilamina, putrescina, cadaverina e histamina, respectivamente.

Lee, Yoo e Shin (2015) determinaram simultaneamente 9 ABs em vinho de arroz utilizando a Ultra-HPLC acoplado com um detector de espectrometria de massa com ionização eletrospray. Apresentando uma curva linear na faixa de 0,5 a 500 ng mL^{-1} e recuperações acima de 83%.

Cai et al (2016) analisaram ABs em vinho de arroz utilizando o HPLC acoplado com espectrometria de massas obtendo recuperações de 94,9% a 104,5%.

Estas metodologias geralmente empregam reagentes tóxicos, agentes de derivatização e geram resíduos perigosos.

Outros métodos como eletroforese para a determinação de ABs em amostras de alimentos também são bastante utilizados.

Kvasnička e Voldřich (2006) desenvolveram um método para a determinação de 6 ABs em alimentos utilizando eletroforese capilar com detecção condutimétrica, apresentando uma faixa linear de 0 – 100 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ e recuperações de 86 a 107%.

An et al (2015) estudaram as alterações nas concentrações de putrescina, histamina, tiramina, feniletilamina e espermidina pelo método de eletroforese capilar acoplado à eletroquimioluminescência durante o armazenamento de ostras a duas temperaturas diferentes (0°C e 4°C). Quando as ostras foram armazenadas a 0°C, a concentração de espermidina aumentou de 45,6 mg/kg para 68,5 mg / kg e a putrescina aumentou de 18,6 mg / kg para 28,3 mg / kg. Quando a temperatura de armazenamento foi controlada a 4°C, a concentração de espermidina aumentou de 46,7 mg/kg para 119,7 mg/ kg e a putrescina aumentou de 19,4 mg/kg para 136,8 mg/kg, respectivamente. Em contraste, os níveis de histamina, tiramina e feniletilamina aumentaram ligeiramente ao longo do período de armazenamento para todas as condições experimentais.

As principais desvantagens de tais metodologias (cromatografia e eletroforese) são que elas requerem instrumentação cara, várias etapas gerais para a preparação da amostra, entre outros. Como alternativa, os métodos eletroquímicos, como a voltametria, apresentam diversas vantagens como, o custo da instrumentação é relativamente baixa, oferece informações sobre atividade de uma espécie química em vez de sua concentração, entre outros.

Stojanović et al (2016) desenvolveram um método em VPD, usando um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono de parede simples em tampão fosfato (pH 6,0), para a determinação de histamina em amostras de cervejas e vinhos. Apresentando uma concentração na faixa de 4,5 a 720 $\mu\text{mol L}^{-1}$, um limite de detecção e um limite de quantificação de 1,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 3,78 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Kochana et al (2016) desenvolveram um biossensor voltamétrico para a determinação da AB tiramina em amostras de produtos alimentares. A faixa de concentração obtida foi de 6 a 130 μM e o seu limite de detecção foi de 1,5 μM .

Yilmaz e Inan (2015) quantificaram histamina em várias amostras de peixes usando a VOQ com um tempo de acumulação de 10s, utilizando o eletrólito suporte o tampão Britton-Robison (pH 10). Duas curvas de calibração foram obtidas com apresentando como coeficientes angulares os valores 0,078 ($\mu\text{M}/\mu\text{A}$) e 0,014 ($\mu\text{M}/\mu\text{A}$), respectivamente.

3.1 EXPERIMENTAL

3.1.1 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos das ABs (triptamina, histamina, putrescina, cadaverina e 2-feniletilamina) e os demais reagentes são de grau analítico, adquiridos pela Sigma-Aldrich. As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida através de sistema Millipore Milli-Q System (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Os eletrólitos suporte utilizados nas medidas voltamétricas, foram soluções tamponadas utilizando o procedimento adaptado de [Oliveira et al. \(2007\)](#): HCl/KCl (pH 1,0 e 2,0); ácido acético/acetato de sódio (pH 3,0; 4,0 e 5,0); $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,0; 7,0 e 8,0); bórax/NaOH (pH 9,0 e 10,0) e NaOH/KCl (pH 11,0 e 12,0).

Para os experimentos eletroquímicos, preparou-se uma solução estoque das ABs $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em água purificada. Solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada na etapa de polarização do eletrodo de DDB.

3.1.2 Equipamentos

As medidas voltamétrica foram realizadas em potenciostato/galvanostato Eco Chemie, $\mu\text{Autolab}^{\text{®}}$ Tipo II, acoplado a um módulo polarográfico Metrohm, 663 VA Stand[®], funcionando no modo potenciostático, interfaciado a um microcomputador.

A célula eletroquímica era equipada com três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl – KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$), um fio de platina como eletrodo auxiliar e como eletrodo de trabalho foram utilizados o ECV ($\phi = 3 \text{ mm}$) e o EDDB. As medidas de pH dos eletrólitos suporte utilizados foram realizadas em medidor de pH modelo 713 – Metrohm.

3.1.3 Eletrodo de trabalho

3.1.3.1 Eletrodo de carbono vítreo

O ECV, adquirido da Metrohm, foi polido mecanicamente sob um papel de filtro umedecido com spray de diamante ($1 \mu\text{m}$) da Kemet International Ltda, UK. Após o polimento, o eletrodo foi lavado abundantemente com jatos de água ultrapura sobre sua superfície. Posteriormente, o eletrodo foi condicionados em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

mediante 10 voltamogramas cíclicos, numa janela de 0 a +1,4 V com velocidade de 0,1 V s⁻¹.

3.2.3.2 Eletrodo de diamante dopado com boro

O eletrodo DDB, cedido gentilmente pelo Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade de Tiradentes, antes da realização das medidas eletroquímicas, era sempre submetido a dois procedimentos eletroquímicos em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹: uma polarização anódica (aplicação de um potencial de +3,0 V por 15 s) seguida de uma polarização catódica (aplicação de um potencial de -3,0 V por 30 s), seguido de uma lavagem com água ultrapura em sua superfície. Esse procedimento foi realizado em células diferentes da célula de medida com o analito sob investigação, usando as etapas de pré-tratamento disponível na janela de execução das técnicas VOQ e VPD (localizado no programa GPES), sem agitação da solução durante a polarização. O procedimento foi realizado antes do início das medidas voltamétricas, sendo repetido quando necessário (SALAZAR-BANDA et al., 2010).

3.2.4 Procedimentos experimentais

As medições voltamétricas foram realizadas à temperatura ambiente em eletrólito de suporte. Para evitar contaminação, foram utilizadas duas células eletroquímicas: uma para o eletrólito de suporte (branco) e outra para eletrólito de suporte + alíquota do analito.

Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas

Os parâmetros experimentais para as medidas eletroquímicas foram: incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV e velocidade de varredura (v) de 50 mV s⁻¹ para voltametria cíclica (VC); tempo de modulação (TM) de 70 ms, intervalo de tempo (IT) de 0,2 s, incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV, amplitude de pulso (a) de 50 mV e velocidade de varredura (v) de 10 mV s⁻¹ para voltametria de pulso diferencial (VPD); e frequência de pulso (f) de 25 s⁻¹, ΔE_s de 2 mV e a de 50 mV para voltametria de onda quadrada (VOQ). Além disso, a influência do pH foi analisada numa faixa de 1,0 a 12,0, empregando as soluções tampão como eletrólito de suporte.

3.2.5 Efeito de memória

O efeito de memória dos ABs foi investigado usando solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) como eletrólito suporte e uma solução diluída do padrão analítico do analito. Em seguida, foram realizadas medidas alternadas (sem e com tempo de acumulação) e sucessivas (ou seja, sem remoção do eletrodo de trabalho de dentro da solução eletrólito-analito) a fim de verificar se houve alteração do sinal analítico (intensidade de corrente elétrica).

3.2.6 Tratamento dos dados voltamétricos

Os voltamogramas de pulso diferencial e os de onda quadrada (exceto os voltamogramas de reversibilidade em VOQ) apresentados foram suavizados através da função *Savitsky-Golay smooth* nível 4, visando a eliminação do ruído de fundo sobreposto ao sinal voltamétrico. Em seguida, era corrigido a linha de base através da função *moving average* com um *step window* de 2 mV, ambas disponíveis no software GPES versão 4.9. Através desse tratamento matemático realizado nos voltamogramas, melhorou a visualização e identificação dos processos oxidativos dos analitos. Além desse software, também foi utilizado o Origin[®] 5.0 para tratamento dos dados.

3.2.7 Parâmetros De Desempenho Analítico

Idem seção 2.1.7.

3.2.8 Preparação das amostras

As amostras analisadas foram duas variedades de queijos (gorgonzola e muçarela), salsicha de frango, calabresa, banana e tomate. Essas amostras foram adquiridas de mercados locais de João Pessoa-PB.

Preparação das amostras de queijo, salsicha de frango e calabresa

Foram pesadas 10,0 g de gorgonzola, muçarela, salsicha de frango e calabresa, em seguida foram adicionados 16 mL de uma mistura de metanol e 0,4 mol L⁻¹ de ácido clorídrico (3:1, v/v) e aquecidas a 60°C sob agitação durante 15 min. Após resfriamento

até à temperatura ambiente, diluiu-se a mistura adicionando 100 mL de água ultrapura. As soluções foram centrifugadas e filtradas através de um papel de filtro quantitativo (faixa preta). Os extratos foram armazenados a 4°C até à análise (COSTA et al., 2016).

Preparação de amostras de banana e tomates

As amostras de bananas e tomates foram testadas utilizando um método de digestão simples. Aproximadamente 15,0 g destas amostras foram pesados e misturados com 25 mL de HCl 0,4 mol L⁻¹ e filtrados através de um papel de filtro quantitativo (faixa preta). As amostras foram mantidas a 4°C até análise laboratorial (COSTA et al., 2016).

3.3 RESULTADOS DAS AMINAS BIOGÊNICAS

3.3.1 Estudo eletroquímico das aminas biogênicas no ECV

O Estudo da oxidação eletroquímica das ABs foi realizada em VOQ numa janela de potencial de -0,5 a +1,4V, em tampão acetato (pH 5,0), utilizando uma solução $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ das ABs, **Figura 20**.

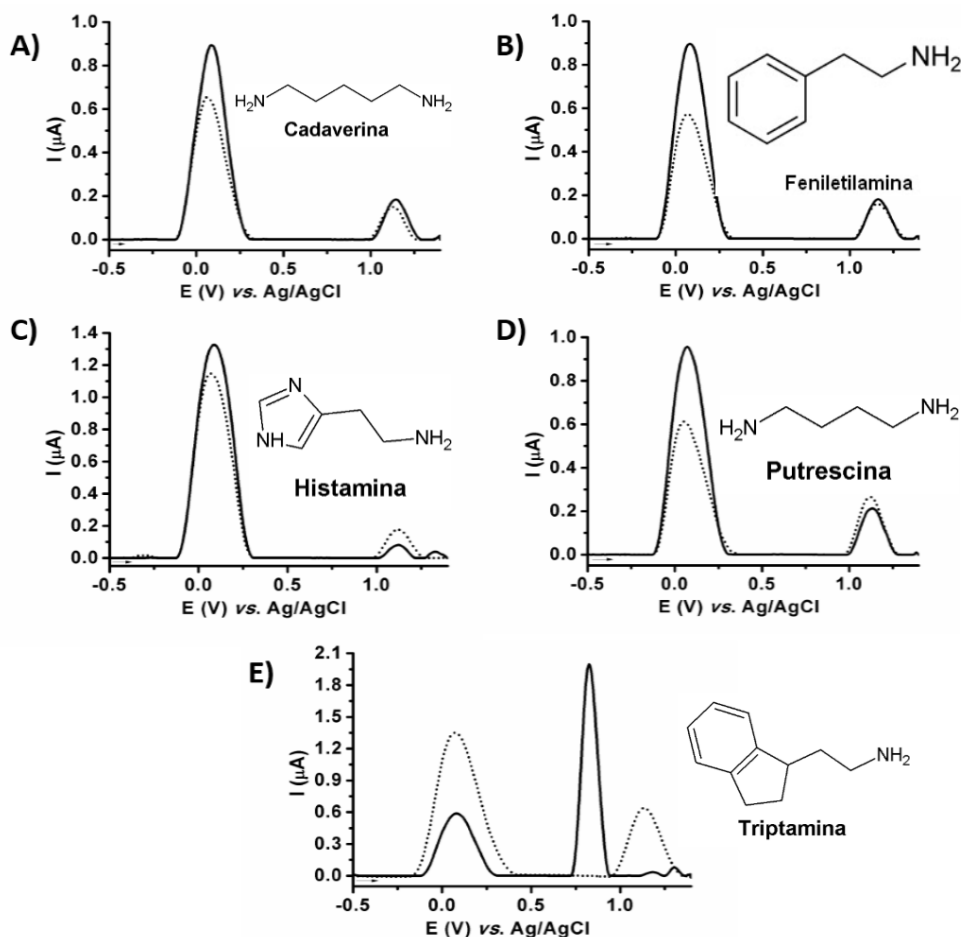


Figura 20 – Voltamogramas de onda quadrada das ABs. A) Cadaverina; B) 2-feniletilamina; C) Histamina; D) Putrescina; E) Triptamina. (...) eletrólito suporte tampão acetato (pH 5,0) e (—) ABs.

A triptamina foi a única AB que apresentou uma resposta oxidativa no ECV, portanto, as análises eletroquímica e eletroanalíticas nesse trabalho vai ser a respeito desse composto.

3.3.2 Comportamento eletroquímico da triptamina

Inicialmente, a oxidação eletroquímica de uma solução $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de triptamina foi estudada em voltametria cíclica em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) usando um ECV, numa janela de potencial de 0 a +1,4V (vs. $E_{\text{Ag/AgCl}}$) e velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , **Figura 21**.

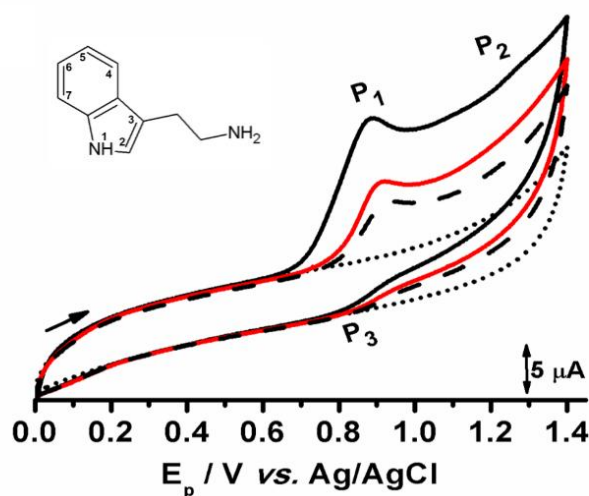


Figura 21 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de triptamina em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato (pH 5,0): (•••) Branco (apenas no eletrólito suporte), (—) 1ª, (—) 2ª, e (---) 3ª varreduras; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Dois processos oxidativos foram observados na região anódica, P_1 ($E_{p1} \approx +0,85\text{V}$) e P_2 ($E_{p2} \approx +1,25\text{V}$). Um comportamento semelhante da triptamina foi observado por [Enache e Oliveira-Brett \(2011\)](#) usando uma solução $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pela técnica VPD em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e ECV. Invertendo a direção da varredura do potencial observou-se a presença de um processo redutivo, P_3 ($E_{p3} \approx +0,82\text{V}$) correspondendo à redução dos produtos de oxidação formados na superfície do eletrodo ECV.

A diminuição observada na corrente para os picos P_1 e P_2 , registrados em varreduras sucessivas (**Figura 21**), deve-se a adsorção e/ou incrustação no eletrodo que provoca a inativação da área de superfície disponível no eletrodo, se ocorrer adsorção reversível no ECV, a resposta observada pode ser utilizada como um passo de pré-concentração eletroanalítica para a determinação de triptamina. Os picos voltamétricos mostrados na **Figura 21** refletem uma transferência de elétrons quase-reversível para um sistema redox representado pelos pares de picos P_1 - P_3 e uma reação irreversível para o pico P_2 .

Considerando o pico P_1 sozinho (P_1 é mais sensível do que o pico P_2), uma análise desse processo oxidativo por VVL utilizando uma solução $1,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de triptamina

foi estudada variando as velocidades de varredura de 25 a 200 mV s⁻¹ em tampão acetato pH 5,0 resultando uma relação linear I_{p1} vs. $v^{1/2}$ (mostrado na **Figura 22A**) mostrando a seguinte equação $I_{p1} \text{ (A)} = 1,2 \times 10^{-6} + 6,4 \times 10^{-6} v^{1/2} \text{ (V s}^{-1})^{1/2}$), sugerindo que a oxidação eletroquímica da triptamina pode ser controlada predominantemente por difusão. O log I_{p1} vs. log v obteve como resultado do coeficiente angular um valor de 0,30 para o pico P₁ (**Figura 22B**), confirmando que a natureza do processo de transferência de massa é predominantemente controlada por difusão, uma vez que a inclinação deve ser igual a 0,50 se controlada pela difusão, e se aproxima de 1,0 para processos controlados por adsorção ([GOSSER JR, 1993](#)).

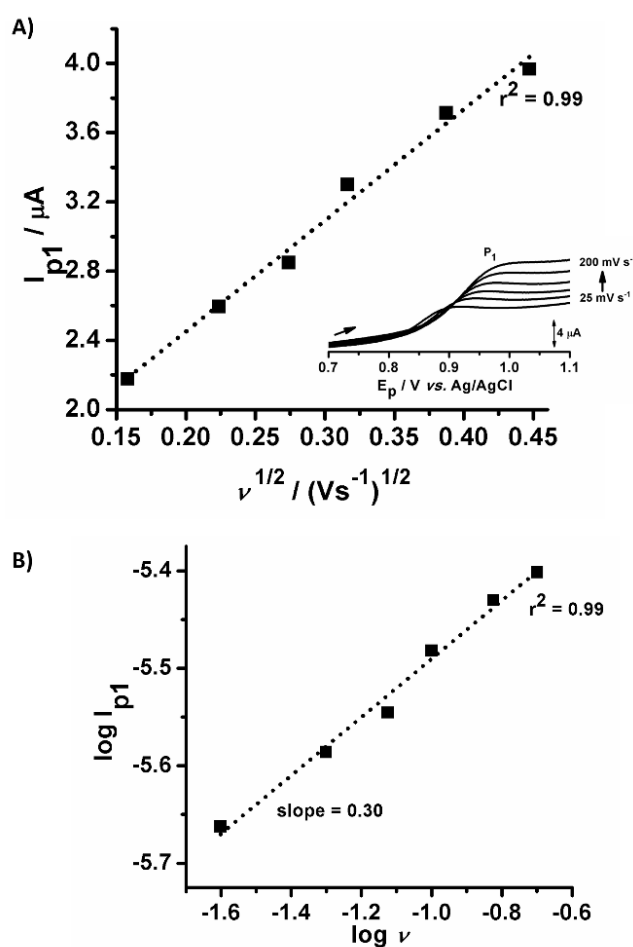


Figura 22 - (A) Influência da velocidade de varredura (■) I_{p1} vs $v^{1/2}$ por VVL. Inserção: voltamogramas de varredura linear em diferentes velocidades de varredura para o pico P₁ de uma solução de triptamina $1,70 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato (pH 5,0). (B) Influência de log I vs. log v .

3.3.3 Estudo do pH da triptamina

Os voltamogramas de pulso diferencial (**Figura 23A**) foram realizados para avaliar o efeito do pH (de 1,0 a 12,0) sobre o potencial de oxidação da triptamina utilizando uma solução $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A primeira varredura de potencial da oxidação de triptamina mostrou dois processos (picos P_1 e P_2). O potencial de pico P_1 é independente do pH (isto é, o mecanismo deste processo de oxidação envolve apenas elétrons) para $1,0 \leq \text{pH} \leq 4,0$ e apresenta uma dependência linear com um valor de inclinação de $-0,056 \text{ V pH}^{-1}$ (**Figura 23B**, uma relação linear: $E_{p1} (\text{V}) = 1,1 - 0,056/\text{pH}$; $r^2 = 0,9950$) para $4,0 \leq \text{pH} \leq 12,0$. O pico P_2 apresenta uma dependência linear em $5,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$, com um valor de inclinação de $-0,067 \text{ V/pH}$ (**Figura 23B**, uma relação linear: $E_{p2} (\text{V}) = 1,6 - 0,067 \text{ pH}$; $r^2 = 0,9823$). Os valores de inclinação foram em torno de $-0,059 \text{ V/pH}$ como esperado para uma reação monoeletrônica/monoprotônica (**LUZ et al 2004**). Isto indica um mecanismo de reação que envolve o mesmo número de prótons e elétrons nos processos (**SMITH, 2006**). Considerando a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$), os números de prótons e elétrons transferidos foram calculados para $1\text{H}^+/1\text{e}^-$ para P_1 ($4,0 \leq \text{pH} \leq 12,0$; $W_{1/2} \approx 139 \text{ mV}$) e P_2 ($5,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$, $W_{1/2} \approx 106 \text{ mV}$), enquanto que em meios muito ácidos, $1,0 \leq \text{pH} \leq 4,0$, para o pico P_1 o processo oxidativo envolve a transferência de 1 elétron. Os resultados concordam com o valor teórico ($W_{1/2}$ de $90,0 \text{ mV}$) para o mecanismo de reação envolvendo um elétron transferido (**BRETT e BRETT, 1998**).

A oxidação eletroquímica da triptamina, um derivado indólico com a substituinte na posição C3, apresenta um centro eletroativo para o indol. O mecanismo da oxidação da triptamina para os processos P_1 e P_2 em ECV foi proposto com base nos resultados obtidos, **Figura 24**, é similar ao reportado por **Enache e Oliveira-Brett (2011)** para compostos indólicos. Os resultados eletroquímicos obtidos mostra claramente que a primeira etapa (pico P_1) na oxidação da triptamina (**1**) ocorre na posição C2 no anel pirrol com um mecanismo $1\text{H}^+/1\text{e}^-$ com o ataque nucleofílico da água, produzindo o produto radical hidroxil-indol (**2**), enquanto que a segunda etapa (pico P_2) ocorre na posição C7 no benzeno com a transferência de um elétron, seguido da desprotonação (1H^+) produzindo um radical (**3**), que é estabilizado por ataque nucleofílico direto por água, com hidroxilação no benzeno na posição C7, gerando o composto (**4**).

A oxidação eletroquímica de uma solução $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de triptamina também foi estudada por VOQ (**Figura 25A**) em um ECV na mesma faixa de pH dos eletrólitos suporte usados nas experiências DPV (**Figura 23A**). As condições experimentais usando o modo direto VOQ são apresentadas na Seção 3.2.4 e foram usadas para investigar a influência da corrente de pico em função do valor do pH (**Figura 25B**), que apresentou

uma corrente de pico com maior sensibilidade no pH 5,0, justificando o uso para análises analíticas em VOQ.

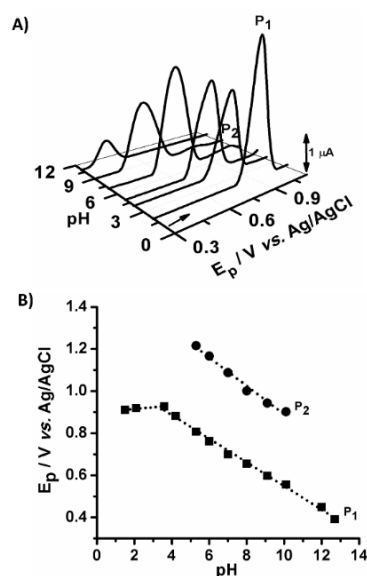


Figura 23 – Voltamogramas de pulso diferencial de uma solução de triptamina $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes solução tampão. (A) Gráfico em 3D da primeira varredura de potencial dos voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em diferentes eletrólito suporte em função do pH (B) Influência do pH sobre os potenciais de pico.

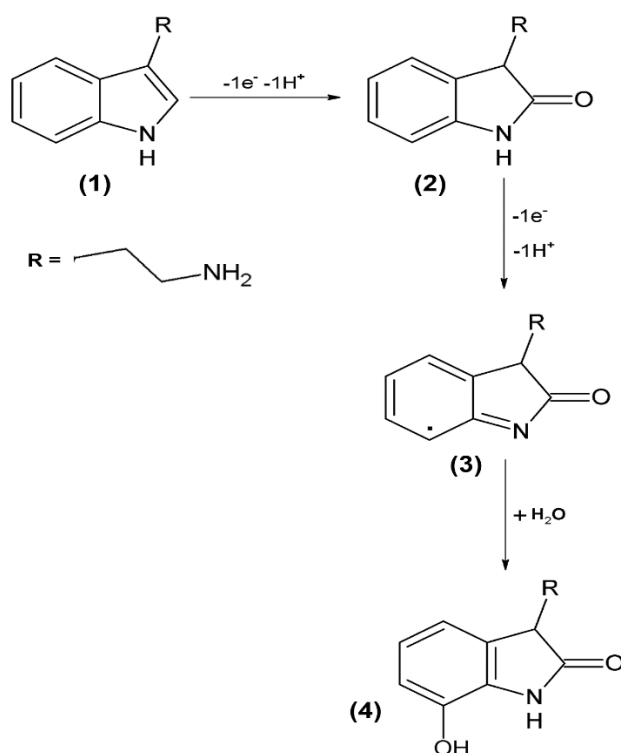


Figura 24 – Mecanismo da oxidação da triptamina

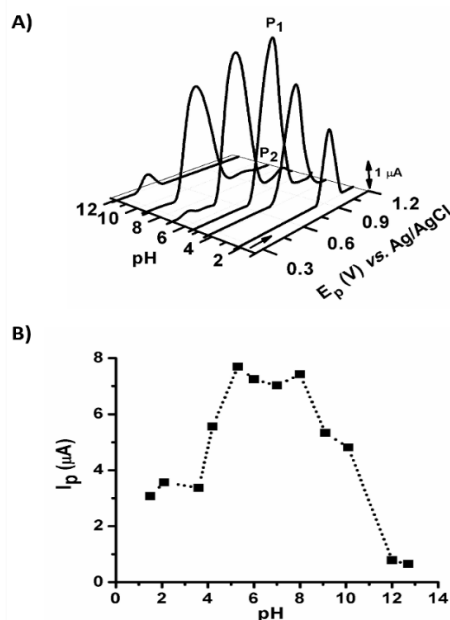


Figura 25 – Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes soluções tampão. A) 3D dos voltamogramas de onda quadrada em diferentes soluções tampão em função do pH. B) I_p vs pH.

3.3.4 Determinação analítica da triptamina por VOQ

3.3.4.1 Otimização das condições de VOQ

Geralmente, os parâmetros da VOQ f , ΔE_s e a influenciam fortemente a corrente de pico (intensidade) e a seletividade (largura de meia-pico), determinando assim a sensibilidade da técnica. Para se obterem as melhores condições de análise em termos de potencial de pico e corrente máxima, os parâmetros de varredura para VOQ foram investigados em estudos univariados realizados para as condições iniciais dos experimentos (Seção 5.4.1), utilizando-se uma solução de triptamina $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão de acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,3). Os valores otimizados dos parâmetros VOQ obtidos para a determinação da triptamina são apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Os parâmetros investigados e seus valores ótimos para a determinação de triptamina por VOQ.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor ótimo
Frequência (s ⁻¹)	10 – 150	150
Incremento de varredura (mV)	1 – 10	6
Amplitude de pulso (mV)	10 – 100	50
Tempo de deposição ^a (s)	0 – 300	10

^a Circuito aberto

Usando o tempo de deposição (t_d) em circuito aberto para o passo de pré-concentração, pode influenciar fortemente a intensidade de pico nas medições de VOQ. Foi avaliado no intervalo t_d 0 a 300 s (**Tabela 10**), a adsorção de triptamina no ECV permitiu estudos de pré-concentração. O comportamento de atração/repulsão eletrostática foi estudado entre a superfície do ECV e a solução de triptamina, a corrente de pico aumentou gradualmente até 10s e depois diminuiu. Isto pode ser devido à saturação da superfície do eletrodo e ao bloqueio por produtos formados na superfície. Assim, foi utilizado um curto tempo de acumulação de 10s para as medições quantitativas da triptamina em baixas concentrações em amostras reais utilizando a técnica VOQ.

3.3.4.2 Curva analítica

Utilizando tempos de acumulação de 0 e 10s, foram obtidos varreduras de VOQ sequenciais de uma solução contendo $3,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de triptamina para avaliar os efeitos de memória, **Figura 26A**. A resposta observada sugeriu que a pré-concentração pode ser utilizada na determinação eletroanalítica da triptamina, pois não houve evidência que o sensor utilizado guarde memória dos resultados anteriores por meio de resíduos que possam ter interagido com a superfície do eletrodo.

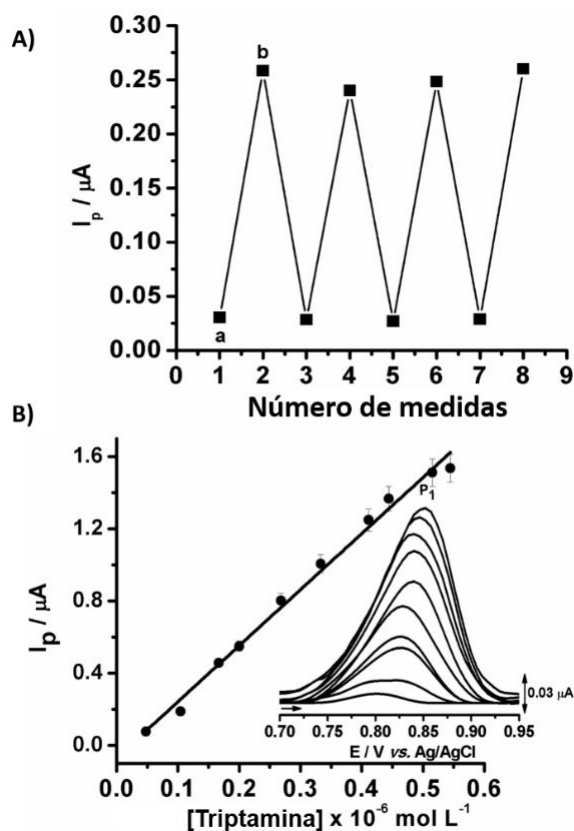


Figura 26 – A) Efeito de memória em VOQ usando uma solução $3,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ nos tempos de (a) 0 e (b) 10s. B) Curva analítica de triptamina em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) usando VOQ, e a inserção dos voltamogramas

A **Figura 26B** apresenta a curva analítica para o pico de triptamina do método VOQ. Uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração foi verificada para as faixas de concentrações de $4,7 \times 10^{-8}$ até $54,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($I_{p1}/A = -6,9 \times 10^{-8} (\pm 3,4 \times 10^{-8}) + 3,1 (\pm 0,1) [Tryptamina]/\text{mol L}^{-1}$; $r^2 = 0,9911$ para $n = 10$). Foram estimados um limite de detecção (LD) de $0,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (0,13 ppb) e um limite de quantificação (LQ) de $2,7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (0,43 ppb) seguindo o procedimento descrito por (MOCÁK et al. 1997). Na **Tabela 11**, mostra um comparativo entre os valores de LD do método em voltametria outras técnicas analíticas. O método VOQ apresentou ser mais sensível do que outros métodos da literatura sendo comparável aos métodos cromatográfico e cronoamperométrico (utilizando um sensor eletroquímico modificado) (XING et al, 2012). A viabilidade da metodologia desenvolvida para a determinação de triptamina em amostras de alimentos por VOQ usando um ECV sem modificação superficial demonstrou um baixo LD, associada a alta sensibilidade, simplicidade, tempo curto e análise de baixo custo, característica da técnica.

Tabela 11 - Comparação dos resultados para a determinação de triptamina (literatura) e este trabalho.

Técnica	Amostras	FL ^a (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Ref.
HPLC	Peixe	$(0.3-125) \times 10^{-6}$	1.2×10^{-6}	(PINTO et al, 2015)
Eletroforese capilar	Bebidas e alimentos	$(5-100) \times 10^{-6}$	5.0×10^{-6}	(KVASNIČKA e VOLDŘICH, 2006)
HPLC	Vinho de arroz	$(1-1000) \times 10^{-6}$	2.3×10^{-7}	(CAI et al, 2016)
Cromatografia líquida micelar	Vinho	$(6.2-624) \times 10^{-7}$	6.2×10^{-8}	(GIL-AGUSTI et al, 2007)
Cronoamperometria	Queijos e bebidas	$(9-7000) \times 10^{-8}$	7.4×10^{-8}	(XING et al, 2012)
UHPLC	Vinho de arroz	$(3.1-156) \times 10^{-8}$	5.6×10^{-9}	(LEE, YOO e SHIN, 2015)
VOQ	Alimentos	$(4.7-54.5) \times 10^{-8}$	0.8×10^{-9}	Este Trabalho

^aFL: Faixa linear.

A precisão do método VOQ proposto foi avaliada em termos de repetibilidade e reprodutibilidade através da medida de uma solução $3,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de triptamina. Os resultados apresentaram 3,6% para repetibilidade (em 20 medidas sucessivas) e 3,8% de reprodutibilidade (para 5 medidas diferentes).

3.3.4.3 Efeito dos interferentes e aplicação prática

A triptamina, bem como a histamina, cadaverina, a 2-feniletilamina e a putrescina são aminas biogénicas encontradas numa variedade de alimentos e bebidas, especialmente em alimentos ricos em proteínas (peixe e carne) e em alimentos fermentados (queijo, salame); Em bebidas (vinho, cerveja), frutas, vegetais e sucos cítricos, chocolates, molhos de peixe e salsichas. Estas substâncias são possíveis interferentes na determinação voltamétrica de triptamina em frutas, legumes, queijo e amostras incrustadas.

Utilizando as condições otimizadas de VOQ, foram adicionadas soluções padrão das ABs (cadaverina, histamina, putrescina e 2-feniletilamina) na concentração de $1,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ no eletrólito suporte tampão acetato pH 5,0 e analisou-se a interferências desses compostos numa solução de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de triptamina. Não sendo observado interferência significativa das ABs na análise da triptamina.

O método descrito foi aplicado na determinação de triptamina em amostras de alimentos, as quais foram previamente tratadas como descrito na seção 3.2.6. Como mostrado na **Tabela 12**, um processo oxidativo aparece no potencial $\approx +0,78$ V (média das triplicatas) revela a presença de triptamina nas amostras de alimento.

Tabela 12 - Resultados eletroquímicos e analíticos da triptamina em amostras de alimentos.

Amostras	Potencial de pico (V)	Concentração média ($\times 10^{-8}$ mol L ⁻¹) ^a	RSD (%)
Banana	0,78	2,40	6,93
Tomate	0,78	1,26	6,87
Queijo Gorgonzola	0,79	2,19	7,09
Queijo Muçarela	0,80	0,98	0,66
Salsicha de frango	0,77	0,57	5,88
Calabresa	0,78	0,39	4,46

^a n = 3.

Sendo encontradas quantidades de triptamina em baixas concentrações. A presença de triptamina também foi confirmada utilizando curvas de recuperação obtidas a partir de amostras com cinco alíquotas de 150 μ L de solução de triptamina $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, por método de adição padrão. Para todas as amostras, o ECV respondeu eficientemente aos incrementos de triptamina. Foram determinados a recuperação percentual e os desvios-padrão relativos; Os resultados são apresentados na **Tabela 13**. Os resultados mostrados revelam a possibilidade de utilizar o método analítico proposto para a determinação de triptamina no controle da qualidade nas amostras de alimentos.

Tabela 13 - Estudo de recuperação da triptamina em amostras de alimentos.

Amostras	Triptamina ($\times 10^{-7}$ mol L ⁻¹)		Recuperação ^b (%)	RSD ^a (%)
	Adicionado	Encontrado ^a		
Banana	1,25	1,01	80,8	1,66
Tomate	1,25	1,12	89,9	0,77
Queijo Muçarela	1,25	1,15	92,1	0,06
Salsicha de frango	1,25	1,19	95,4	0,26
Queijo Gorgonzola	1,25	1,03	82,5	1,52
Calabresa	1,25	1,21	96,9	0,16
Banana	1,60	1,36	85,0	1,20
Tomate	1,60	1,47	92,1	0,62
Queijo Muçarela	1,60	1,50	93,9	0,06
Salsicha de frango	1,60	1,54	96,4	0,26
Queijo Gorgonzola	1,60	1,38	86,3	1,10
Calabresa	1,60	1,56	97,5	0,16
Banana	1,92	1,68	87,5	0,97
Tomate	1,92	1,80	93,4	0,49
Queijo Muçarela	1,92	1,82	94,9	0,01
Salsicha de frango	1,92	1,87	97,0	0,16
Queijo Gorgonzola	1,92	1,70	88,6	0,90
Calabresa	1,92	1,88	98,0	0,10

^a $n = 3$; ^b $(100 \times \text{Encontrado/Adicionado})$

3.3.5 Determinação analítica das aminas biogênicas no EDDB

O Estudo da oxidação eletroquímica das ABs foi realizada em VPD em EDDB numa janela de potencial de -0,5 a +1,8V, em tampão acetato (pH 5,0), utilizando uma solução $8,26 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ das ABs, **Figura 27**.

A triptamina ($E_p \approx 0,815$ V), histamina ($E_p \approx 1,355$ V) e 2-feniletilamina ($E_p \approx 1,746$ V) apresentaram uma resposta oxidativa no EDDB, logo as análises eletroanalíticas foram realizadas para essas ABs. Enquanto que a cadaverina e putrescina não apresentaram resposta eletroquímica.

Visando uma determinação simultânea entre as ABs triptamina, e 2-feniletilamina um estudo de pH foi realizado, objetivando um melhor perfil voltamétrico, sensibilidade e seletividade entre as aminas estudadas.

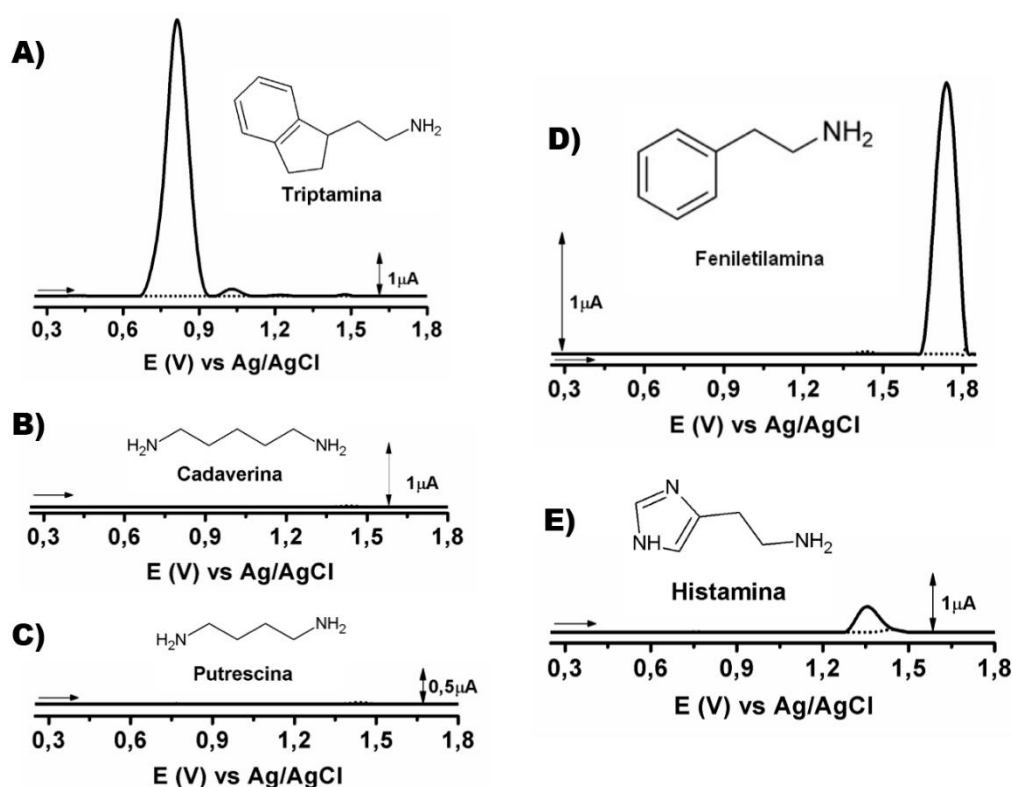


Figura 27 – Voltamogramas de pulso diferencial das ABs. A) Triptamina; B) Cadaverina; C) Putrescina; D) 2-feniletilamina; E) Histamina; (...) eletrólito suporte tampão acetato (pH 5,0) e (—) ABs.

3.3.5.1 triptamina

Os voltamogramas de pulso diferencial foram realizados para avaliar o efeito do pH (de 1,0 a 10,0) sobre o potencial de oxidação da triptamina utilizando uma solução $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A primeira varredura de potencial da oxidação de triptamina mostrou dois processos (picos P_1 e P_2), mostrando resultados semelhantes como os do ECV. O pico P_1 apresentou maior sensibilidade, sendo este o utilizado para as determinações analíticas, o tampão fosfato (pH 8) foi onde o analito apresentou maior corrente de pico, e nos tampões de pH 1 e 2, não apresentaram processos oxidativos, **Figura 28A**.

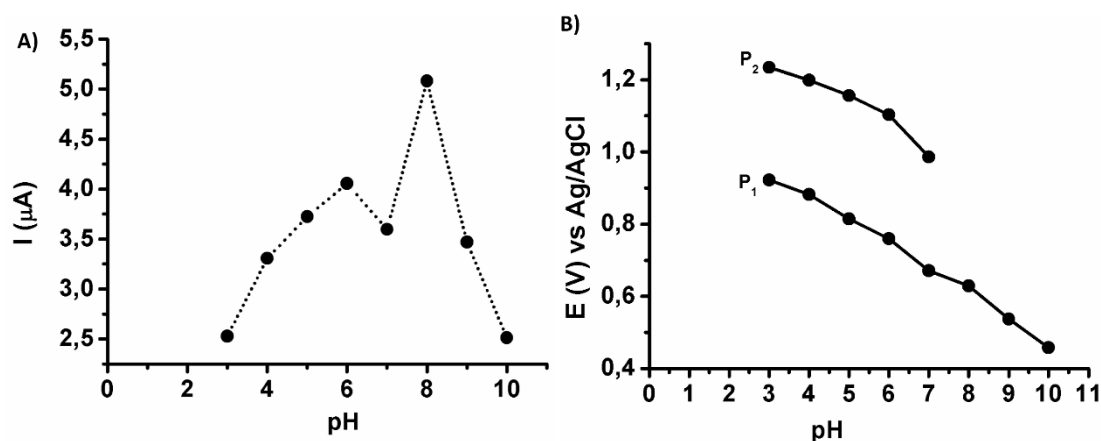


Figura 28 – Estudo de pH da triptamina A) pH vs I B) pH vs E.

O potencial de pico P_1 de $3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$ apresenta uma dependência linear com um valor de inclinação de $-0,067 \text{ V pH}^{-1}$ (**Figura 28B**, uma relação linear: $E_{p1} (\text{V}) = 1,1 - 0,067/\text{pH}$; $r^2 = 0,9904$). O pico P_2 apresenta uma dependência linear em $3,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$, com um valor de inclinação de $-0,059 \text{ V/pH}$ (**Figura 28B**, uma relação linear: $E_{p2} (\text{V}) = 1,4 - 0,059 \text{ pH}$; $r^2 = 0,9107$). Os valores de inclinação foram em torno de $-0,059 \text{ V/pH}$ como esperado para uma reação monoeletrônica/monoprotônica (**LUZ et al 2004**). Isto indica um mecanismo de reação que envolve o mesmo número de prótons e elétrons nos processos (**SMITH, 2006**). Considerando a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$), os números de prótons e elétrons transferidos foram calculados para $1\text{H}^+/1\text{e}^-$ para P_1 ($3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$; $W_{1/2} \approx 111 \text{ mV}$) e P_2 $3,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$ $W_{1/2} \approx 87 \text{ mV}$. Os resultados concordam com o valor teórico ($W_{1/2}$ de $90,0 \text{ mV}$) para o mecanismo de reação envolvendo um elétron transferido (**BRETT e BRETT, 1998**).

3.3.5.2 Estudo do pH da histamina

Os voltamogramas de pulso diferencial (**Figura 29A**) foram realizados para avaliar o efeito do pH (de 1,0 a 10,0) sobre o potencial de oxidação da histamina utilizando uma solução $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A primeira varredura de potencial da oxidação da histamina mostrou um processo pico P_1 , onde apresentou maior sensibilidade em termos de corrente de pico no pH 8,0 (tampão fosfato), não sendo evidenciado processos oxidativos nos pHs 1 e 2. O potencial de pico P_1 apresenta uma dependência linear com um valor de inclinação de $-0,088 \text{ V pH}^{-1}$ (**Figura 29B**, uma relação linear: $E_{p1} (\text{V}) = 1,7$

- 0,088/pH; $r^2 = 0,9742$) para $3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$. Os valores de inclinação foram em torno de -0,059 V/pH como esperado para uma reação monoeletrônica/monoprotônica (LUZ et al 2004). Isto indica um mecanismo de reação que envolve o mesmo número de prótons e elétrons nos processos (SMITH, 2006). Considerando a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$), os números de prótons e elétrons transferidos foram calculados para $1\text{H}^+/1\text{e}^-$ para P_1 ($3,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$; $W_{1/2} \approx 117$ mV). Os resultados concordam com o valor teórico ($W_{1/2}$ de 90,0 mV) para o mecanismo de reação envolvendo um elétron transferido (BRETT e BRETT, 1998).

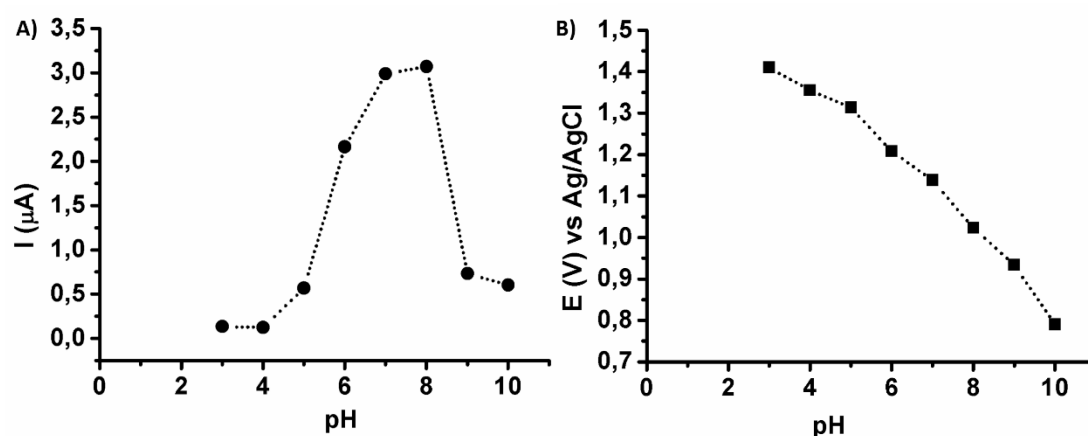


Figura 29 – Estudo de pH da histamina A) pH vs I B) pH vs E.

3.3.5.3 2-feniletilamina

Os voltamogramas de pulso diferencial (**Figura 30A**) foram realizados para avaliar o efeito do pH (de 1,0 a 10,0) sobre o potencial de oxidação do 2-feniletilamina utilizando uma solução $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A primeira varredura de potencial da oxidação dessa AB mostrou um processo oxidativo, onde a maior corrente de pico ocorreu no pH 6,0 (tampão fosfato). Em pHs muito ácidos (pH 1 e 2) ou muito básicos (pH 9 e 10) não foram evidenciados sinais de processos oxidativos desse analito. O potencial de pico P_1 é independente do pH (isto é, o mecanismo deste processo de oxidação envolve apenas elétrons) para $3,0 \leq \text{pH} \leq 4,0$ e apresenta uma dependência linear com um valor de inclinação de $-0,065 \text{ V pH}^{-1}$ (**Figura 30B**, uma relação linear: $E_{\text{p1}} (\text{V}) = 2,02 - 0,067/\text{pH}$; $r^2 = 0,9571$) para $4,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$. Os valores de inclinação foram em torno de -0,059 V/pH como esperado para uma reação monoeletrônica/monoprotônica (LUZ et al 2004). Isto indica um mecanismo de reação que envolve o mesmo número de prótons e elétrons nos processos (SMITH, 2006). Considerando a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$), os

números de prótons e elétrons transferidos foram calculados para $1\text{H}^+/1\text{e}^-$ para P_1 ($4,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$, $W_{1/2} \approx 99 \text{ mV}$), enquanto que em meios ácidos, $3,0 \leq \text{pH} \leq 4,0$, para o pico P_1 o processo oxidativo envolve a transferência de 1 elétron. Os resultados concordam com o valor teórico ($W_{1/2}$ de $90,0 \text{ mV}$) para o mecanismo de reação envolvendo um elétron transferido (BRETT e BRETT, 1998).

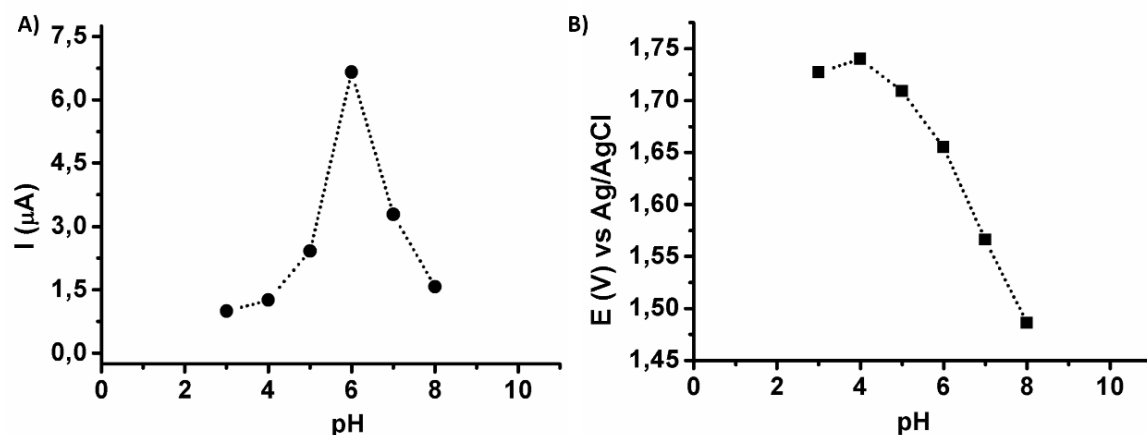


Figura 30 – Estudo de pH da 2-feniletilamina A) pH vs I B) pH vs E .

3.3.6 Determinação analítica

As ABs estudadas, apresentaram processos oxidativos em diferentes valores de potencial, independente do pH, logo uma determinação simultânea dessas aminas em VPD, torna-se viável. Como foi observado no estudo anterior, o tampão fosfato, especialmente no pH 8,0 foi que apresentou maior sensibilidade, contudo, o próprio tampão apresentava processos oxidativos nesse meio o que acabou gerando interferência nas medidas dos analitos, sendo então necessário substituir o meio, logo, os estudos foram realizados no eletrólito suporte tampão acetato (pH 5,0).

Geralmente, os parâmetros da VPD (TM, v , a) podem influenciar fortemente a corrente de pico (intensidade) e a seletividade (largura de meia-pico), determinando assim a sensibilidade da técnica. As melhores condições de análise em termos de potencial de pico e corrente máxima foram investigados em estudos univariados realizados para as condições iniciais dos experimentos (Seção 3.2.7). Dá mesma forma que os estudos de determinação simultânea para os HPAs, foi utilizado um analito e ajustado os parâmetros com base nesse analito. Logo uma solução de triptamina $8,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão de

acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) foi utilizada para determinação dos melhores parâmetros da técnica VPD. Os valores otimizados são apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 144 - Parâmetros VPD estudados e valores selecionados para a determinação das ABs

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Amplitude (mV)	10 – 100	100
Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	10 – 35	35
Tempo de deposição (s)*	0 – 300	30

*Circuito aberto

Usando o tempo de deposição (t_d) em circuito aberto para o passo de pré-concentração, pode influenciar fortemente a intensidade de pico nas medições de VPD. Logo, foi avaliado no intervalo t_d 0 a 300 s (**Tabela 14**). Assim, um curto tempo de acumulação de 30s para as medições quantitativas foi utilizada a técnica VPD.

3.3.6.1 Curva analítica

Inicialmente, curvas individuais foram construídas com o intuito de observar possíveis interferências entre as aminas estudadas (**Figura 31**). Com isso, antes da curva analítica propriamente dita, foram feitas curvas individuais (mantendo duas ABs com concentração fixa e aumentando uma única AB com a adição de algumas alíquotas) foram realizadas visando observar seu comportamento de modo a garantir um método analítico satisfatório. A **Figura 31** mostra as curvas individuais de cada AB: triptamina (**Figura 31 A**), histamina (**Figura 31 B**) e 2-feniletilamina (**Figura 31 C**). Inicialmente foi adicionado na célula eletroquímica um mix dos ABs de concentração $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, em seguida adicionado mais quatro alíquotas de 100 µL do padrão analítico das ABs correspondente de concentração $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Como pode ser observado, não houve interferência significativa entre os analitos estudados, logo uma determinação simultânea desses analitos pode ser realizada.

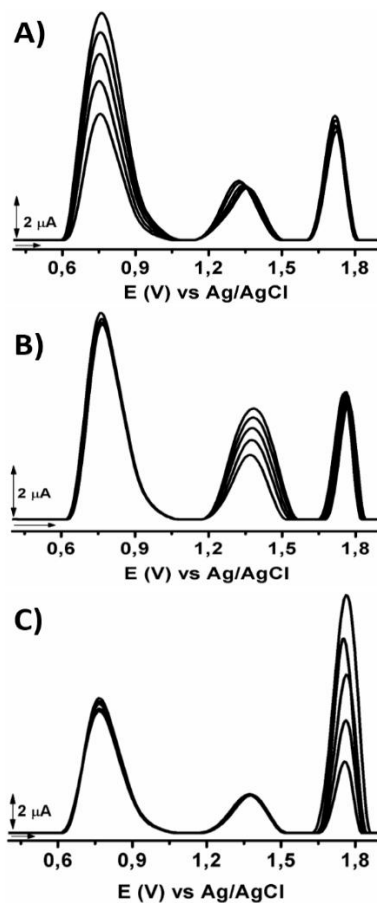


Figura 31 – Voltamogramas de pulso diferencial das curvas individuais das ABs. A) triptamina B) histamina. C) 2-feniletilamina.

Utilizando tempos de acumulação de 0 e 30s, foram obtidos varreduras de VPD sequenciais de uma solução contendo $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ das ABs para avaliar os efeitos de memória, **Figura 32**. A resposta observada sugeri que a pré-concentração pode ser utilizada na determinação eletroanalítica, pois não houve evidência que o sensor utilizado guarde memória dos resultados anteriores por meio de resíduos que possam ter interagidos com a superfície do eletrodo.

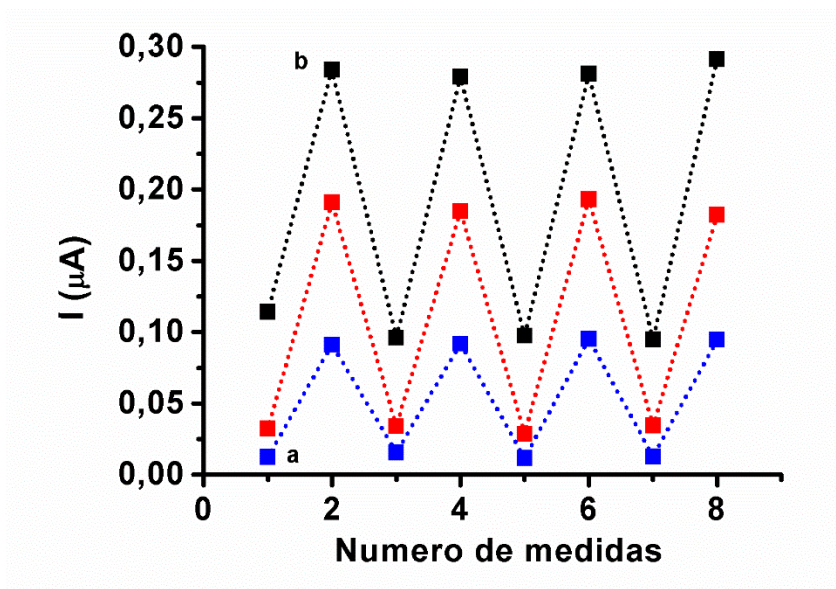


Figura 32 – Efeito de memória das ABs. (—) triptamina (—) histamina (—) 2-feniletilamina.

A curva analítica das ABs apresentaram uma significativa relação linear, apresentando as seguinte equações de regressão linear:

$$I_p/A = 1,89 \times 10^{-8} (\pm 5,66 \times 10^{-9}) + 1,42 \times 10^{-2} (\pm 1,24 \times 10^{-4}) [\text{triptamina}]/\text{mol L}^{-1}$$

Apresentando uma faixa de concentração de $(0,99 - 31,7) \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 14$ e R^2 igual a 0,9953, um $LD = 2,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e um $LQ = 7,3 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

$$I_p/A = 5,69 \times 10^{-8} (\pm 1,89 \times 10^{-9}) + 2,93 \times 10^{-2} (\pm 1,68 \times 10^{-4}) [\text{histamina}]/\text{mol L}^{-1}$$

Apresentando uma faixa de concentração de $(1,98 - 35,2) \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 10$ e R^2 igual a 0,9924, um $LD = 3,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e um $LQ = 1,1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

$$I_p/A = 1,28 \times 10^{-8} (\pm 4,98 \times 10^{-9}) + 6,77 \times 10^{-2} (\pm 2,53 \times 10^{-4}) [2\text{-feniletilamina}]/\text{mol L}^{-1}$$

Apresentando uma faixa de concentração de $(1,98 - 41,7) \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ com $N = 11$ e R^2 igual a 0,9936, um $LD = 4,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um $LQ = 1, \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

A precisão do método proposto em VPD foi determinado em termos de repetibilidade (1,8, 3,7 e 4,5%, para 15 varreduras sucessivas) e reprodutibilidade (2,9, 4,1 e 4,9%, para 5 diferentes medidas) para uma concentração de $2,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ das ABs triptamina, histamina e 2-feniletilamina, respectivamente.

3.3.6.2 Aplicação em amostras reais

O método descrito foi aplicado na determinação de triptamina em amostras de alimentos, as quais foram previamente tratadas como descrito na seção 3.2.6. A presença das ABs foi confirmada utilizando curvas de recuperação obtidas a partir de amostras com cinco alíquotas de 150 µL de uma solução $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ das ABs, por método de adição padrão. Para todas as amostras, o EDDB respondeu eficientemente aos incrementos. Foram determinados a recuperação percentual e os desvios-padrão relativos; Os resultados são apresentados na **Tabela 16**. Os resultados mostrados revelam a possibilidade de utilizar o método analítico proposto para a determinação das ABs no controle da qualidade nas amostras de alimentos.

Tabela 155 – Estudo de recuperação da triptamina em amostras de alimentos.

Amostras	Triptamina ($\times 10^{-7}$ mol L ⁻¹)		Recuperação ^b (%)	RSD ^a (%)
	Adicionado	Encontrado ^a		
Banana	1,25	1,13	90,4	1,66
Tomate	1,25	1,17	93,6	0,77
Queijo Muçarela	1,25	1,18	94,4	0,06
Banana	1,60	1,50	93,7	1,20
Tomate	1,60	1,53	95,6	0,62
Queijo Muçarela	1,60	1,52	95,0	0,06
Banana	1,92	1,88	97,9	0,97
Tomate	1,92	1,85	96,4	0,49
Queijo Muçarela	1,92	1,89	98,4	0,01

^a $n = 3$; ^b $(100 \times \text{Encontrado}/\text{Adicionado})$

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

4.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os HPAs estudados apresentaram apenas um processo oxidativo $E_p \approx +0,95V$, $E_p \approx +1,03$ e $E_p \approx +1,35V$, para o benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno, respectivamente. Uma metodologia para a determinação simultânea desses HPAs em VPD foi desenvolvida, usando o eletrólito suporte tampão acetato (pH 4,0) no ECV e na presença do surfactante DSS, apresentando curvas analíticas $(0,50 - 33,6, 0,50 - 33,6$ e $2,50 - 98,4) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, LD de 0,03, 0,02 e 0,42 e LQ de 0,10, 0,06 0,42 para o benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno, respectivamente. E recuperações acima de 87% para duas concentrações dos HPAs em amostras de cachaças.

Não houve diferença significativa, em termos de corrente de pico, ao modificar o ECV com nanotubos de carbonos (funcionalizados ou não) na ausência do surfactante DSS. Na presença do surfactante, houve uma interação surfactante-nanotubos, desfazendo a modificação da superfície do eletrodo, impossibilitando a determinação dos HPAs.

A determinação dos HPAs também foi possível utilizando um EPC modificados com ftalocianinas metálicas (Co, Ni, Cu e Zn), no qual o Zn com 5% de modificação na pasta foi o que apresentou maior sensibilidade, em termos de corrente de pico, sendo este eletrodo utilizado para a determinação analítica dos HPAs. Apresentando curvas analíticas $(0,50 - 31,7, 0,25 - 15,8$ e $0,75 - 47,5) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, LD de 0,12, 0,03 e 0,14 e LQ de 0,40, 0,09 0,46 para o benzo(a)pireno, pireno e fluoranteno, respectivamente. E recuperações acima de 89% para duas concentrações dos HPAs em amostras de cachaças.

4.2 Aminas biogênicas

A oxidação eletroquímica de triptamina utilizando diferentes técnicas voltamétricas sobre GCE, demonstrando uma transferência de elétrons quase reversível para o sistema redox representado por um par de picos P_1 - P_3 e uma reação irreversível para P_2 pico. O pico P_1 é um processo controlado por transporte eletrônico de massa controlado predominantemente por difusão, e é a resposta analítica mais seletiva e

sensível (solução tampão de acetato pH 5,0). Nessa condição, um método VOQ foi desenvolvido e foi aplicado com sucesso para a determinação de triptamina em amostras de alimentos com recuperações médias superiores a 90%. Além disso, esse método é simples, sensível, seletivo, rápido e preciso, apresenta instrumentação de baixo custo e representa uma boa alternativa para a análise laboratorial de rotina.

Um método em VPD sobre o EDDB foi desenvolvido para a determinação simultânea das ABs triptamina ($E_p \approx +0,83V$), histamina ($E_p \approx +1,35V$) e 2-feniletilamina ($E_p \approx +1,72V$). Onde apresentaram curvas analíticas na ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, baixos limites de detecção e quantificação e valores de recuperação acima de 90%, para três concentrações dos HPAs em amostras de alimentos (banana, tomate e queijo muçarela).

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, L. M.; SITTON, M.; RIBEIRO, F.A.L. Estudo polarográfico sobre a determinação de Fe(III) utilizando-se a técnica da polarografia de pulso diferencial. *Química Nova*, 24 (2001) 790.
- AN, D.; CHEN, Z.; ZHENG, J.; CHEN, S.; WANG, L.; HUANG, Z.; WENG, L. Determination of biogenic amines in oysters by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence, *Food Chem.* 168 (2015) 1.
- ATSDR, A. FOR T. S. AND D. R. **Toxicological Profile: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2017.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends of Food Science and Technology*, 6 (1995) 341.
- BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer causes & control: CCC**, v. 8, n. 3, p. 444–472, maio 1997.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140 (1999) 103.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica princípios, métodos, e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1998.
- BRUM, D. M.; CASSELLA, R. J.; PEREIRA NETTO, A. D. Multivariate optimization of a liquid–liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. **Talanta**, v. 74, n. 5, p. 1392–1399, 15 fev. 2008.
- CAI, Y.; SUN, Z.; CHEN, G.; LIU, X.; YOU, J.; ZHANG, C. Rapid analysis of biogenic amines from rice wine with isotope-coded derivatization followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chemistry* 192 (2016) 388–394.
- CAO, H.; XIAO, J. B.; ZHOU, C. S. and ZHANG, Y. W. Comparison of GC-MS analysis in different extract parts of *Marchantia convoluta* and study of partial biologic activity. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 26, 2005, 1.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 67, n. 1, p. 1–27, abr. 2008.
- CHEN, B. G.; WANG, S. M.; LIU, R. H. GC-MS analysis of multiply derivatized opioids in urine. *Journal of Mass Spectrometry JMS*, 42 (8), 2007, 1012.

CHEN, B.; HE, R.; YUAN, K.; CHEN, E.; LIN, L.; CHEN, X.; SHA, S. ZHONG, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enriching antibiotic resistance genes (ARGs) in the soils. *Environmental Pollution* 220 (2017) 1005e1013

CCME. (Canadian Council of Ministers of the Environment). Carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental and human health effects. PN 1401, 2008, 229 p.

COSTA, D.J.E.; MARTÍNEZ, A.M.; RIBEIRO, W.F.; BICHINHO, K.M.; DI NEZIO, M.S.; PISTONESI, M.F.; ARAÚJO, M.C.U. Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry. **Talanta**. 154(2016)134–140

CUNHA, F. L. et al. Determination of biogenic amines in different types of cheese by high-performance liquid chromatography. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 1, p. 69–75, 2012.

DELEUZE, M. S. Valence One-Electron and Shake-Up Ionization Bands of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. III. Coronene, 1,2,6,7-Dibenzopyrene, 1,12-Benzoperylene, Anthanthrene. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 42, p. 9244–9259, 1 out. 2004.

DROLET, G., DUMBROFF, E.B.; LEGGE, R.L.; THOMPSON, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, 25 (1986) 367.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds, *Electroanalysis* 23 (2011) 1337.

ERK, N. Differential pulse anodic voltammetric determination of pantoprazole in pharmaceutical dosage forms and human plasma using glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*, 323 (2003) 48.

EUROPEAN COMMISSION. Health and Consumer Protection Directorate-General. Polycyclic aromatic hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects. SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final. Brussels, 2002.

FAN, S.; ZHAO, L.; LIN, J. Flocculation-ultrasonic assisted extraction and solid phase clean-up for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water rich in colloidal particulate with high performance liquid chromatography and ultraviolet-fluorescence detection. *Talanta*, 72 (2007) 1618.

FIALA, Z. et al. [Polycyclic aromatic hydrocarbons. I. Environmental contamination and environmental exposure]. **Acta medica (Hradec Kralove). Supplementum**, v. 42, n. 2, p. 77–89, 1999.

FOAN, L.; SIMON, V. Optimization of pressurized liquid extraction using a multivariate chemometric approach and comparison of solid-phase extraction cleanup steps for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mosses. **Journal of Chromatography A**, v. 1256, p. 22–31, 21 set. 2012.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Química Nova*, 29 (2006) 105.

GARRIDO, E. M. P. J.; GARRIDO, J. M. P. J.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical oxidation of amphetamine-like drugs and application to electroanalysis of ecstasy in human serum. *Bioelectrochemistry*, 79 (2010) 77.

GIMENO, R. A. et al. Second-order bilinear calibration for determining polycyclic aromatic compounds in marine sediments by solvent extraction and liquid chromatography with diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 498, n. 1, p. 47–53, 28 nov. 2003.

GIROTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, S. M. C. Biogenic amines in sausages and other foods. v. 13, p. 1–10, 2010.

GOMES, M. B.; PIRES, B.A.D.; FRACALANZZA, S.A.P.; MARIN, V.A. The risk of biogenic amines in food. *Ciências & Saúde Coletiva*, 19 (2014) 1123.

GOSSER JR., D. K. Cyclic voltammetry: simulations and analysis of a reaction mechanisms, Wiley-VHC, New York, 1993.

HSIEH, Y.N.; HUANG, P.C.; SUN, I.W.; WHANG, T.J.; HSU, C.Y.; HUANG, H.H.; KUEI, C.H. Nafion membrane-supported ionic liquid-solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAH's in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 557 (2006) 321.

HUI, H.; NOLLET, L. L.; Handbook of Food Science, Technology and Engineering, Marcel Dekker INC: New York, 2005.

JIANG, W.; XU, Y.; LI, C.; DONG, X.; WANG, D. Biogenic amines in commercially produced Yulu, a Chinese fermented fish sauce, *Food Addit. Contam.: Part B7* (2014) 25–29.

KALAC, P. Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine* 7 (2009) 65.

KVASNIČKA, F.; VOLDŘICH, M. Determination of biogenic amines by capillary zone Electrophoresis with conductometric detection, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 145.

LEE S.; YOO, M.; SHIN, D. The identification and quantification of biogenic amines in Korean turbid rice wine, *Makgeolliby HPLC with mass spectrometry detection*, *Food Sci. Technol.* 62 (2015) 350.

LEITING, V.A.; WICKER, L. Inorganic cations and polyamines moderate pectinesterase activity. *Journal of Food Science*, 62 (1997) 253.

LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. *British Journal of Nutrition*, 84 (2000) 55.

LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; BECK, J.; KUBOTA, L. T. Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a lithium tetracyanoethylenide (LiTCNE) modified glassy carbon electrode, *Talanta* 64 (2004) 935.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. v. 11, p. 188–201, 2007.

MIÈGE, C.; DUGAY, J.; HENNION, M. C. Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 995, n. 1, p. 87–97, 2 maio 2003.

MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G., A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. *Pure and Applied Chemistry*, 69 (1997) 297.

MOSER, H. F.; THOMAS, A. L. **The phthalocyanines**: properties. Flórida: Boca Raton, v. 1, p. 45-57, 1983.

NAILA, A.; FLINT, S.; FLETCHER, G.; BREMER, P.; MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *J. Food Sci.*, 75 (2010) 139.

NETTO, P. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765–773, dez. 2000.

NI, Y.; WANG, P.; SONG.; LIN, X.; KOKOT, S. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion-graphene biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 821 (2014) 34

OLIVEIRA, S.C.B.; DICULESCU, V.C.; PALLESCHI, G. COMPAGNONE, D.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. Electrochemical oxidation of ochratoxin A at a glassy carbon electrode and in situ evaluation of the interaction with deoxyribonucleic acid using an electrochemical deoxyribonucleic acid-biosensor, *Anal. Chim. Acta* 588 (2007) 283.

ORGANIZATION, W. H. **Guidelines for Drinking-water Quality: Recommendations**. [s.l.] World Health Organization, 2004.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Rev. Virtual Química*, 5 (2013) 516.

PEREIRA, A. C. et al. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, 25 (6), 1012-1021, 2002.

PERERA, F. P. et al. Relationships among Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–DNA Adducts, Proximity to the World Trade Center, and Effects on Fetal Growth.

Environmental Health Perspectives, v. 113, n. 8, p. 1062–1067, ago. 2005.

PINTO, L.; DÍAZ NIETO, C.H.; ZÓN, M.A.; FERNÁNDEZ, H.; ARAUJO, M. C. U. Handling time misalignment and rank deficiency in liquid chromatography by multivariate curve resolution: quantitation of five biogenic amines in fish, *Anal. Chim. Acta* 902 (2015) 59.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons.

Encyclopedia of food and Health. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00550-X>. 2016.

RAMALHOSA, M. J.; MORAIS, S.; DELEREU-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and seafood safety. Porto: Jaroslava Scarc-Gajiae. 2011.

RÉ-POPPI, N.; SANTIAGO-SILVA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and other selected organic compounds in ambient air of Campo Grande City, Brazil.

Atmospheric Environment, v. 39, n. 16, p. 2839–2850, 1 maio 2005.

RIBEIRO, W.F.; SELVA, T.M.G.; LOPES, I.C.; COELHO, E.C.S.; LEMOS, S.G.; ABREU, F.C.; NASCIMENTO, V.B.; ARAUJO, M.C.U. Electroanalytical determination of carbendazim by square wave adsorptive stripping voltammetry with a multiwalled carbon nanotubes modified electrode. *Anal. Methods*, 2011, 3, 1202-1206.

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 243–248, 1 jun. 2002.

SANTELLA, R. M. Application of new techniques for the detection of carcinogen adducts to human population monitoring. **Mutation Research**, v. 205, n. 1–4, p. 271–282, ago. 1988.

SCHEEPERS, P. T. et al. Assessment of occupational exposure to diesel exhaust. The use of an immunoassay for the determination of urinary metabolites of nitroarenes and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology Letters**, v. 72, n. 1–3, p. 191–198, jun. 1994.

SCHEEPERS, P. T. J.; BEENAKKERS, M. F. M.; BOS, R. P. 107 Competitive ELISA for the metabolites of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 343, n. 1, p. 169–170, 1 jan. 1992.

SEHATNIA, B.; SABZI, R.E.; KHEIRI, F.; NIKOO, A. Sensitive molecular determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on thiolated Calix[4]arene and CdSe quantum dots (QDs). *J. of Applied Electrochemistry*. 44 (2014) 727–733.

SILVA, C.P. Eletrodo modificado com surfactante zwitteriônico para detecção de antioxidantes. Dissertação. UFSC. Florianópolis-SC. 2014

SISINNO, C.L.S.; NETTO, A.D.P.; REGO, E.C.P.; LIMA, G.S.V. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Cad. Saúde Pública*, 19 (2003) 671

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A., *Princípios de análise Instrumental*. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos teóricos. *Química Nova* 26 (2003) 81.

SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. *Química Nova* 27 (2004) 790.

SOUZA FILHO, A. G. e FAGAN, S. B. Funcionalização de Nanotubos de Carbono. *Química Nova*, 30 (7), 1695-1703, 2007.

SPEIGHT, J. *Environmental Organic Chemistry for Engineers*. 1ed.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804492-6.00009-5>. 2017

SISINNO, C. L. S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial solid waste: a preliminary evaluation of the potential risk of environmental and human contamination in waste disposal areas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 671–676, abr. 2003.

SMITH, E. T. Examination of $n = 2$ reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 259.

SURMA, M.; SADOWSKA-RODZIK, A.; CIEŚLIK, E. The application of d-SPE in the QuEChERS method for the determination of PAHs in food of animal origin with GC–MS detection. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 6, p. 1029–1036, 1 jun. 2014.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Solid Electrodes in electroanalytical chemistry: present applications and prospects for high throughput screening of drug compounds. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **10**: 495, 2007.

US EPA, N. C. FOR E. **EVALUATION AND ESTIMATION OF POTENTIAL CARCINOGENIC RISKS OF POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS (PAH)**. Reports & Assessments. Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=37956>>. Acesso em: 5 ago. 2017.

VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; MASSAROPI, M. R. C.; AVACA, L. A.; Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente 6 (1996) 55.

WALTERS, D.R. Polyamines and plant disease. Photochemistry, 64 (2003) 97.

WANG, J.; Analytical Electrochemistry, VCH Publishers: New York, 1994.

WANG, G.; LEE, A.S.; LEWIS, M.; KAMATH, B.; ARCHER, R.K. Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. J Agric Food Chem., 47 (1999) 1062.

WU, R. et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mosses by Ultrasonic-Assisted Extraction and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 50, n. 1, p. 243–257, 2 jan. 2017.

XING, X.; LIU, S.; YU, J.; LIAN, W.; HUANG, J. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted film at polypyrrole-sulfonated graphene/hyaluronic acid-multiwalled carbon nanotubes modified electrode for determination of tryptamine, Biosensors and Bioelectronics 31 (2012) 277–283.

YARDIM, Y.; KESKIN, E.; LEVENT, A.; ÖZSÖZ, M.; ŞENTÜRK, Z. Voltammetric studies on the potent carcinogen, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: adsorptive stripping voltammetric determination in bulk aqueous forms and human urine samples and detection of DNA interaction on pencil graphite electrode. Talanta, 80 (2010) 1347

ZACHARA, A.; GAŁKOWSKA, D.; JUSZCZAK, L. Method Validation and Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vegetable Oils by HPLC-FLD. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 4, p. 1078–1086, 1 abr. 2017a.

ZACHARA, A.; GAŁKOWSKA, D.; JUSZCZAK, L. Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Food Control**, v. 80, p. 45–51, 1 out. 2017b.



Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry



Daniel J.E. Costa^a, Ana M. Martínez^b, Willame F. Ribeiro^c, Kátia M. Bichinho^a,
 María Susana Di Nezio^b, Marcelo F. Pistonesi^b, Mario C.U. Araujo^{a,*}

^a Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Química, Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/Quimiometria, Caixa Postal 5093, CEP 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil

^b Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, INQUISUR (UNS-CONICET), Av. Alem 1253, B8000CPB Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

^c Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Fundamentais e Sociais, 58397-000 Areia, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2015

Received in revised form

19 March 2016

Accepted 19 March 2016

Available online 21 March 2016

Keywords:

Tryptamine

Adsorptive Stripping Voltammetry

Food analysis

ABSTRACT

Tryptamine, a biogenic amine, is an indole derivative with an electrophilic substituent at the C3 position of the pyrrole ring of the indole moiety. The electrochemical oxidation of tryptamine was investigated using glassy carbon electrode (GCE), and focusing on trace level determination in food products by square wave adsorptive stripping voltammetry (SWAdSV). The electrochemical responses of tryptamine were evaluated using differing voltammetric techniques over a wide pH range, a quasi-reversible electron-transfer to redox system represented by coupled peaks P_1 – P_3 , and an irreversible reaction for peak P_2 were demonstrated. The proton and electron counts associated with the oxidation reactions were estimated. The nature of the mass transfer process was predominantly diffusion-limited for the oxidation process of P_1 , the most selective and sensitive analytical response (acetate buffer solution pH 5.3), being used for the development of SWAdSV method, under optimum conditions. The excellent response allowed the development of an electroanalytical method with a linear response range of from 4.7 – $54.5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, low detection limit ($0.8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$), and quantification limit ($2.7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$), and acceptable levels of repeatability (3.6%), and reproducibility (3.8%). Tryptamine content was determined in bananas, tomatoes, cheese (mozzarella and gorgonzola), and cold meats (chicken sausage and pepperoni sausage), yielding recoveries above 90%, with excellent analytical performance using simple and low cost instrumentation.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.