



**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 ácidos orgânicos em sucos  
utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado  
com ftalocianina de cobalto (II) associado à calibração de  
segunda ordem**

**Amanda Cecília da Silva**

**SAPIENTIA EDIFICAT**

**João Pessoa – PB – Brasil**  
**Fevereiro/2019**



**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 ácidos orgânicos em sucos utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II) associado à calibração de segunda ordem**

**Amanda Cecília da Silva\***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: **Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo**

\* Bolsista:



**João Pessoa – PB – Brasil**  
**Fevereiro/2019**

S586d Silva, Amanda Cecília da.

Determinação voltamétrica de ácidos orgânicos em sucos utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II) associado à calibração de segunda ordem / Amanda Cecília da Silva. - João Pessoa, 2019.

109 f.

Orientação: Mário César Ugulino de Araújo.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Ácidos orgânicos. 2. Sucos. 3. CoPC-CPE. 4. Voltametria de onda quadrada. 5. Calibração multivias.  
I. Araújo, Mário César Ugulino de. II. Título.

UFPB/CCEN

# **Determinação voltamétrica de ácidos orgânicos em sucos utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocinina de cobalto (II) associado à calibração de segunda ordem.**

Tese de Doutorado apresentada pela aluna Amanda Cecília da Silva e aprovada pela banca examinadora em 15 de fevereiro de 2019.



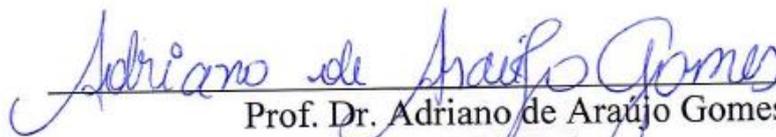
---

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



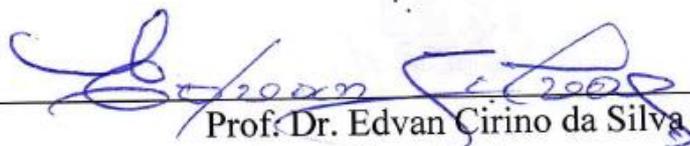
---

Prof. Dr. Williane Farias Ribeiro  
Examinador



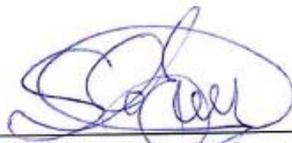
---

Prof. Dr. Adriano de Araújo Gomes  
Examinador



---

Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva  
Examinador



---

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos  
Examinador

**DEDICO A DEUS, SENHOR DE TODAS AS COISAS; A MINHA MÃE, QUE TANTO AMO E ADMIRO E A TODAS AS PESSOAS QUE DIRETA OU INDIRETAMENTE ME DERAM FORÇA PARA SEGUIR NESTA JORNADA.**

*“Bendito o Deus e pai de nosso Senhor Jesus Cristo, o qual nos abençoou com todas as bênçãos espirituais nos lugares celestiais em Cristo”.*

*(Efésios 1. 3)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre a meu lado me protegendo e me abençoando todos os dias da minha vida.

À minha família, em especial, minha mãe, Ana Lúcia, por todo incentivo, por todos os sacrifícios que ela fez e tem feito por mim, pela educação, mas principalmente, por todo amor.

A meu orientador, Prof. Dr. Mário Ugulino, pela orientação e apoio.

Agradecimento muito especial a Anabel Santos Lourenço pela amizade, carinho e companheirismo. Mas além disso, por todos os ensinamentos, os conselhos e a valiosa e fundamental contribuição para o desenvolvimento deste trabalho; a você, meu sincero e eterno agradecimento.

A todos que fazem parte do grupo LAQA (Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria), Mayara, Emanuella, David, Valber, Wellington, Paulinho, Adriano, Licarion, Stefani, Sofacles, Edilene, Welma, Willy, Matheus, Socorro, Amália, Osmundo, Lucas, Chicote, Flaviano, Flaviana, Kelly, Kevla, enfim a todos os “laqueanos”.

Aos meus amigos, Felix e Cícero, por todos os momentos de descontração, pelo apoio e grande amizade.

À minha orientadora na graduação, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alessandra de Figueirêdo, por sempre me incentivar, pelos conselhos e ensinamentos não só profissionais, mas também pessoais.

Aos Professores do PPGQ-UFPB pelos ensinamentos no âmbito acadêmico e da docência. Em especial aos Profs. do LAQA.

A banca de qualificação (Prof. Dr. Sherlan Lemos e Prof. Dr. Edvan Cirino) pelas contribuições significativas.

Ao PPGQ-UFPB e a CAPES pela bolsa concedida.

E a todos que me ajudaram, apoiaram e sempre torceram por mim em mais essa etapa da minha vida acadêmica.

Meu eterno agradecimento.

**Sumário**

Lista de figuras .....	IV
Lista de tabelas .....	VI
Lista de equações.....	VII
Lista de siglas e abreviaturas .....	VII
Resumo .....	VIII
Abstract.....	IX
<b>1. Introdução</b> .....	<b>2</b>
1.1. Caracterização geral da proposta .....	2
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo geral.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
<b>2. Fundamentação teórica</b> .....	<b>6</b>
2.1. Ácidos orgânicos .....	6
2.1.1. Ácido cítrico.....	7
2.1.2. Ácido láctico .....	7
2.1.3. Ácido málico .....	8
2.1.4. Ácido tartárico.....	8
2.2. Importância dos ácidos orgânicos na indústria de bebidas .....	9
2.3. Métodos analíticos aplicados à determinação de ácidos orgânicos .....	10
2.4. Técnicas eletroanalíticas .....	11
2.4.1. Voltametria.....	11
2.4.1.1. Voltametria cíclica.....	12
2.4.1.2. Técnicas pulsadas .....	14
2.4.1.2.1. Voltametria de onda quadrada .....	15
2.5. Eletrodos quimicamente modificados.....	16
2.5.1. Eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II). 17	
2.6. Quimiometria .....	19
2.6.1. Calibração em química analítica .....	19
2.6.1.1. Métodos de calibração multivias .....	20
2.6.1.1.1. U-PLS/RBL .....	21
2.6.1.1.2. MCR-ALS.....	23
2.6.2. Pré-processamento para dados voltamétricos de segunda ordem .....	25
2.6.2.1. Regressão Spline dos Mínimos Quadrados Assimétricos .....	25
2.6.2.2. Alinhamento por Correção Otimizada.....	26

2.6.3.	Parâmetros de desempenho analítico .....	27
2.6.3.1.	Sensibilidade ( <i>SEN</i> ).....	27
2.6.3.2.	Sensibilidade analítica ( $\gamma$ ).....	28
2.6.3.3.	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	28
<b>3.</b>	<b>Revisão da literatura</b> .....	<b>31</b>
<b>4.</b>	<b>Experimental</b> .....	<b>36</b>
4.1.	Reagentes e soluções .....	36
4.2.	Instrumentação.....	36
4.3.	Preparação do eletrodo de pasta de carbono.....	37
4.4.	Procedimento eletroquímico .....	37
4.5.	Conjuntos de calibração.....	38
4.6.	Conjunto de validação .....	38
4.7.	Amostras de sucos de frutas .....	39
4.8.	Método de referência .....	40
4.9.	Software e análise de dados .....	40
<b>5.</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>43</b>
5.1.	CoPC-CPE: Comportamento eletroquímico. ....	43
5.2.	Resposta eletrocatalítica dos ácidos orgânicos .....	43
5.3.	Influência do pH sobre a resposta voltamétrica dos ácidos orgânicos .....	44
5.4.	Influência da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica dos AO ...	46
5.5.	Comportamento voltamétrico dos ácidos orgânicos no CoPC-CPE.....	49
5.6.	Influência da frequência sobre a resposta voltamétrica dos ácidos orgânicos....	49
5.7.	Calibração univariada .....	52
5.8.	Calibração multivias .....	53
5.8.1.	Pré-tratamento dos dados .....	53
5.8.2.	Modelo U-PLS/RBL .....	55
5.8.2.1.	Calibração.....	56
5.8.2.2.	Validação .....	59
5.8.2.3.	Análise dos sucos de frutas.....	63
5.8.3.	Modelo MCR-ALS.....	66
5.8.3.1.	Calibração.....	67
5.8.3.2.	Validação .....	67
5.8.3.3.	Análise dos sucos de frutas.....	73
<b>6.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>Apêndice</b> .....	<b>95</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos ácidos orgânicos.....	2
<b>Figura 2.</b> Sinal de excitação para CV.....	13
<b>Figura 3.</b> CV para um sistema reversível (a), quase-reversível (b) e irreversível (c)....	13
<b>Figura 4.</b> Variação das correntes faradaicas e capacitivas. ....	14
<b>Figura 5.</b> Sinal de excitação para SWV.....	15
<b>Figura 6.</b> SWV para um sistema reversível (a) e um sistema irreversível (b).....	15
<b>Figura 7.</b> Estrutura da ftalocianina. ....	18
<b>Figura 8.</b> Esquema para o desdobramento do tensor no método U-PLS.....	22
<b>Figura 9.</b> Esquema de uma matriz aumentada no modo coluna pelo MCR. ....	23
<b>Figura 10.</b> Imagem do potenciostato/galvanostato Eco Chemie/Autolab. ....	36
<b>Figura 11.</b> Ilustração do eletrodo de pasta de carbono. ....	37
<b>Figura 12.</b> Interface gráfica MVC2. ....	41
<b>Figura 13.</b> Comportamento eletroquímico do CoPC-CPE em SWV. ....	43
<b>Figura 14.</b> CV para CPE (—) e CoPC–CPE (—) para os AO.....	44
<b>Figura 15.</b> Estudo de pH.....	45
<b>Figura 16.</b> Estudo de velocidade para o ácido cítrico.....	46
<b>Figura 17.</b> Estudo de velocidade para o ácido láctico. ....	47
<b>Figura 18.</b> Estudo de velocidade para o ácido málico. ....	47
<b>Figura 19.</b> Estudo de velocidade para o ácido tartárico.....	48
<b>Figura 20.</b> Estudo de interferentes.....	49
<b>Figura 21.</b> Estudo da frequência.....	51
<b>Figura 22.</b> Curvas analíticas dos ácidos orgânicos no CoPC-CPE.....	52
<b>Figura 23.</b> Pré-tratamento dos dados de SWV. ....	54
<b>Figura 24.</b> SWV em 3D para os conjuntos de calibração.....	56
<b>Figura 25.</b> Gráfico de PRESS versus número de fatores no U-PLS.....	57
<b>Figura 26.</b> EJCR e concentração predita x nominal para os AO.....	58
<b>Figura 27.</b> Fatores RBL para o conjunto de validação.. ....	59
<b>Figura 28.</b> EJCR e concentração predita x nominal para os AO.....	62
<b>Figura 29.</b> Superfície de contorno para as medidas SWV das amostras de sucos.....	63
<b>Figura 30.</b> Fatores RBL para as amostras de sucos de frutas.. ....	64
<b>Figura 31.</b> EJCR para o modelo U-PLS/RBL dos AO nas amostras de sucos.....	66
<b>Figura 32.</b> Aproximações iniciais obtidas pelo método "pure". ....	69

**Figura 33.** Perfis recuperados pelo MRC-ALS para os AO. .... 70

**Figura 34.** EJCR e concentração predita x nominal para os AO. .... 72

**Figura 35.** Perfis recuperados pelo MCR-ALS para os AO nos sucos..... 74

**Figura 36.** EJCR para o modelo MCR-ALS dos AO nas amostras de sucos. .... 75

---

**Lista de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Testes diagnósticos para processos redox usando CV.....	13
<b>Tabela 2.</b> Valores de concentração das misturas do conjunto de validação baseado no planejamento Taguchi.....	39
<b>Tabela 3.</b> Coeficientes de regressão linear referente as curvas analíticas dos ácidos orgânicos em CoPC-CPE. ....	53
<b>Tabela 4.</b> Resultados da validação cruzada nos conjuntos de calibração no U-PLS.....	57
<b>Tabela 5.</b> Concentrações preditas e nominais ( $10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> ) de AC, AL, AM e AT no conjunto de validação por U-PLS/RBL.....	61
<b>Tabela 6.</b> Figuras de mérito para a predição das amostras do conjunto de validação por U-PLS/RBL. ....	63
<b>Tabela 7.</b> Valores de concentração dos ácidos orgânicos obtidos para as amostras dos sucos de frutas pelo método proposto (modelo U-PLS/RBL) e o de referência. ....	65
<b>Tabela 8.</b> Figuras de mérito para a predição das amostras de sucos de frutas por U-PLS/RBL. ....	66
<b>Tabela 9.</b> Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas nos conjuntos de calibração por MCR-ALS.....	67
<b>Tabela 10.</b> Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas no conjunto de validação por MCR-ALS.....	68
<b>Tabela 11.</b> Concentrações preditas e nominais ( $10^{-6}$ mol L <sup>-1</sup> ) de AC, AL, AM e AT no conjunto de validação por MCR-ALS.....	71
<b>Tabela 12.</b> Figuras de mérito para a predição das amostras do conjunto de validação por MCR-ALS. ....	72
<b>Tabela 13.</b> Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas nas amostras de sucos de frutas por MCR-ALS.....	73
<b>Tabela 14.</b> Valores de concentração dos ácidos orgânicos obtidos para as amostras dos sucos de frutas pelo método proposto (modelo MCR-ALS) e o de referência.....	74
<b>Tabela 15.</b> Figuras de mérito para a predição dos ácidos orgânicos nas amostras dos sucos de frutas por MCR-ALS. ....	75

**Lista de equações**

**Eq. 1**  $\Delta i = i_d - i_r$  ..... 15

**Eq. 2**  $y_n = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v}$  ..... 22

**Eq. 3**  $\mathbf{E}_u = \mathbf{X}_u - \mathbf{P} \cdot \mathbf{t}_u$  ..... 22

**Eq. 4**  $\mathbf{S}_{int} = \mathbf{B}_{int} \mathbf{G}_{int} (\mathbf{C}_{int})^T = \mathbf{SVD}(\mathbf{E}_u)$  ..... 22

**Eq. 5**  $\text{vec} \mathbf{X}_u = \mathbf{P} \cdot \mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{B}_{int} \mathbf{G}_{int} \mathbf{C}_{int}]^T + \mathbf{S}_u$  ..... 23

**Eq. 6**  $\mathbf{X} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{S}^T + \mathbf{E}$  ..... 24

**Eq. 7**  $Q = \sum_i v_i (y_i - f_i)^2 + \lambda \sum_i (\Delta^2 f_i)^2$  ..... 25

**Eq. 8**  $SEN = m_n [J (\mathbf{C}^T \mathbf{C})_{nn}^{-1}]^{-1/2}$  ..... 27

**Eq. 9**  $\mathbf{C} = [\mathbf{C}_{exp} \mid \mathbf{C}_{unx}]$  ..... 27

**Eq. 10**  $SEN = \{ \mathbf{g}_n^T [\mathbf{Z}_{exp}^T \mathbf{I} - \mathbf{Z}_{unx} \mathbf{Z}_{unx} + \mathbf{Z}_{exp}]^{-1} \mathbf{g}_n \}^{-1/2}$  ..... 27

**Eq. 11**  $\gamma = SEN / \sigma_x$  ..... 28

**Eq. 12**  $LOD = 3,3 (SEN^{-2} \sigma_x^2 + h_0 SEN^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_y^2)^{1/2}$  ..... 29

**Eq. 13**  $LOQ = 10 (SEN^{-2} \sigma_x^2 + h_0 SEN^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_y^2)^{1/2}$  ..... 29

## Lista de siglas e abreviaturas

***a*** – Amplitude de pulso.

**AC** – Ácido Cítrico.

**AL** – Ácido Lático.

**ALS** – Mínimos Quadrados Alternados (do inglês: “*Alternative Least Square*”).

**AM** – Ácido Málico.

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**AO** – Ácidos Orgânicos.

**AOAC** – Associação Oficial de Química Analítica (do inglês: “*Association of Official Analytical Chemists*”).

**AS** – Ácido Succínico.

**AsLSSR** – Regressão Spline dos Mínimos Quadrados Assimétricos (do inglês: “*Asymmetric Least Squares Spline Regression*”).

**AT** – Ácido Tartárico.

**CV** – Voltametria cíclica (do inglês “*Cyclic Voltammetry*”).

**CoPC** – Ftalocianina de cobalto (II) (do inglês: “*Cobalt (II)-Phthalocyanine*”).

**CoPC-CPE** – Eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Ftalocianina de Cobalto (II) (do inglês: “*Cobalt (II)-Phthalocyanine modified Carbon Paste Electrode*”).

**COW** – Alinhamento por Correção Otimizada (do inglês: “*Correlation Optimized Warping*”).

**CPE** – Eletrodo de Pasta de Carbono (do inglês: “*Carbon Paste Electrode*”).

**E** – Potencial.

**EJCR** – Região elíptica de confiança conjunta (do inglês: “*Elliptical Joint Confidence Region*”).

***E<sub>p</sub>*** – Potencial de pico.

***f*** – Frequência de aplicação de pulso.

***i*** – Corrente elétrica.

***i<sub>a</sub>*** – Corrente direta.

***i<sub>r</sub>*** – Corrente reversa.

**LOD** – Limite de Detecção (do inglês: “*Limit Of Detection*”).

**LOQ** – Limite de Quantificação (do inglês: “*Limit Of Quantitation*”).

- MCR** – Resolução Multivariada de Curvas (do inglês: “*Multivariate Curve Resolution*”).
- MCR-ALS** – Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (do inglês: “*Resolution of Multivariate Curves with Alternating Least Squares*”).
- MVC2** – Calibração Multivariada 2 (do inglês: “*Multivariate Calibration 2*”).
- NIR** – Infravermelho Próximo (do inglês: “*Near Infra Red*”).
- PC** – Componentes Principais (do inglês: “*Principal Component*”).
- pH** – Potencial Hidrogênico.
- PLS** – Mínimos Quadrados Parciais (do inglês: “*Partial Least Square*”).
- PRESS** – Soma Quadrática dos Erros de Predição (do inglês: “*Prediction Errors Sum of Squares*”).
- RBL** – Bilinearização Residual (do inglês: “*Residual Bilinearization*”).
- REP** – Erro Relativo de Predição (do inglês, “*Relative Error of Prediction*”).
- RMSEV** – Raiz quadrada dos Erros Médios Quadráticos de Validação (do inglês: “*Root Mean Squares Errors of Validation*”).
- SEN** – Sensibilidade.
- SIMPLISMA** - Análise de mistura auto modelável iterativa simples de usar (do inglês: “*Simple to use interactive self modeling mixture analysis*”).
- SVD** – Decomposição de Valores Singulares (do inglês: “*Singular Value Decomposition*”).
- SWV** – Voltametria de onda quadrada (do inglês “*Square Wave Voltammetry*”).
- U-PLS** – Mínimos Quadrados Parciais desdobrados (do inglês: “*Unfolded Partial Least Square*”).
- U-PLS/RBL** – Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados com Bilinearização Residual (do inglês: “*Partial Least Squares Unfolded with Residual Bilinearization*”).
- v** – Velocidade de varredura.
- $\gamma$**  – Sensibilidade Analítica.
- $\Delta E$**  – Incremento de potencial.
- $\Delta E_p$**  – Pulsos de potencial.
- $\Delta E_s$**  – Altura de potencial.
- $\Delta i$**  – Corrente resultante.

## Resumo

Os ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como o cítrico, láctico, málico e tartárico são frequentemente utilizados na indústria alimentícia e de bebidas devido as suas propriedades antioxidantes e acidulantes. Por esta razão, geralmente são usados para manter o sabor das bebidas, regular o pH, mascarar o gosto desagradável de alguns compostos, neutralizar o paladar doce e/ou acidificar o sabor. Portanto, o desenvolvimento de metodologias analíticas robustas, rápidas e com a mínima geração de resíduos para o monitoramento desses ácidos em bebidas é de grande importância, pois eles influenciam drasticamente nas propriedades organolépticas, estabilidade e características microbiológicas desses produtos. Este trabalho demonstra a oxidação eletrocatalítica dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico no eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II) - CoPC-CPE para o desenvolvimento de um método sensível e direto empregando voltametria de onda quadrada associado a técnicas de calibração multivias para contornar problemas de interferência encontrados nas amostras. Modelos de calibração foram construídos para cada analito usando mínimos quadrados parciais desdobrados com bilinearização residual (U-PLS/RBL) e resolução de curvas multivariadas com mínimos quadrados alternados (MCR-ALS). Os modelos foram avaliados usando um conjunto de validação (25 misturas) obtido a partir de um planejamento Taguchi. Um intervalo de resposta linear entre 10 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi utilizado para os modelos U-PLS/RBL e MCR-ALS, que apresentaram uma faixa de REP variando de 2,58% a 5,46% e 4,47% a 5,78% respectivamente. Finalmente, os modelos de calibração U-PLS/RBL e MCR-ALS foram aplicados em nove amostras de sucos de frutas. Os resultados obtidos, em ambos os modelos, alcançaram a vantagem de segunda ordem e demonstraram um ótimo desempenho analítico. Além disso, o teste *t* pareado foi realizado entre o método proposto e o método de referência (método 974.18 da AOAC), onde foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa, a um nível de confiança de 95%. Portanto, o método proposto é uma alternativa inédita, simples, rápida e com pouca geração de resíduo para determinação de ácidos orgânicos em sucos de frutas.

**Palavras-chave:** Ácidos orgânicos; Sucos; Eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II); Voltametria de onda quadrada; Calibração multivias.

## Abstract

Low molecular weight organic acids such as citric, lactic, malic and tartaric are often used in the food and beverage industry because of their antioxidant and acidulant properties. For this reason, they are generally used to maintain the flavor of the beverages, regulate the pH, mask the unpleasant taste of some compounds, neutralize the sweet taste and/or acidify the taste. Therefore, the development of robust analytical methodologies, fast and with minimal waste generation for the monitoring of these acids in beverages is of great importance because they influence drastically the organoleptic properties, stability and microbiological characteristics of these products. This work demonstrates the electrocatalytic oxidation of citric, lactic, malic, succinic and tartaric acids in the cobalt (II)-phthalocyanine modified carbon paste electrode - CoPC-CPE for the development of a sensitive and direct method employing square wave voltammetry associated with multivias calibration techniques to circumvent interference problems found in the samples. Calibration models were constructed for each analyte by using partial least squares unfolded with residual bilinearization (U-PLS/RBL) and resolution of multivariate curves with alternating least squares (MCR-ALS). The models were evaluated by using the validation set (25 mixtures) obtained with the Taguchi design. A linear response range between 10 and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  was used to U-PLS/RBL and MCR-ALS models which presented REP range varying from 2.58% to 5.46% and 4.47% to 5.78%, respectively. Finally, the calibration models U-PLS/RBL and MCR-ALS were applied to nine samples of fruit juices. The results obtained in both models reached the second order advantage and demonstrated an excellent analytical performance. In addition, paired *t*-test was applying between the proposed and the reference methods (AOAC method 974.18) where it was possible to observe that there was no statistically significant difference at a confidence level of 95%. Therefore, the proposed method is an unprecedented alternative, simple, fast and with little residue generation for determination of organic acids in fruit juices.

**Keywords:** Organic acid; Fruit juice; Cobalt phthalocyanine modified carbon paste electrode; Square wave voltammetry; Multiway calibration.

---

---

Capítulo 1.  
**INTRODUÇÃO**

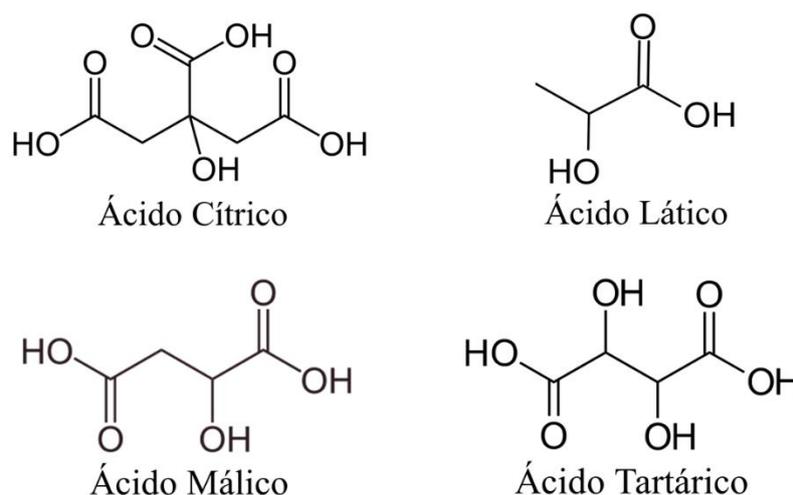
---

---

## 1. Introdução

### 1.1. Caracterização geral da proposta

Os ácidos orgânicos (AO) foram descobertos há mais de 400 anos pelo químico Carl Scheele. Alguns desses ácidos, especialmente o cítrico, láctico, málico e tartárico (**Fig. 1**), ocorrem naturalmente em frutas como resultado de processos metabólicos, bioquímicos, hidrólises e crescimento bacteriano [1-2].



**Figura 1.** Estrutura química dos ácidos orgânicos.

Esses ácidos desempenham um papel essencial na qualidade e valor nutricional dos alimentos e bebidas, contribuindo significativamente para as propriedades organolépticas, atuando como antioxidantes, emulsificantes e reguladores de acidez [3]. Em matrizes complexas como sucos industrializados, estes ácidos, provenientes das frutas e dos processos de fermentação alcoólica e malolática, contribuem com a cor, aroma, gosto, características, equilíbrio gustativo e estabilidade microbiológica e química dessas bebidas [3, 4, 5]. Por isso, a quantificação individual desses ácidos orgânicos nos sucos é muito importante para diferenciação, classificação, identificação de origem ou possível adulteração [6, 7].

Tendo em vista a importâncias deles para as matrizes que os contém, vários métodos analíticos foram desenvolvidos para quantificá-los tanto individualmente, quanto simultaneamente [4]. Dentre os principais métodos descritos na literatura, estão os métodos eletroforéticos [6, 8, 9], cromatográficos [1, 7, 10, 11], enzimático [12], espectrofotométricos [13] e o método descrito pela Associação Oficial de Química Analítica [14]. Alternativamente a esses métodos, destacam-se os métodos

eletroquímicos, que apresentam diversas vantagens, tais como: simplicidade, rapidez e sensibilidade e, em alguns casos, é possível ainda eliminar a etapa de preparo de amostra, como por exemplo: para amostras líquidas [15, 16]. Entretanto, os métodos eletroquímicos para determinação de AO são incomuns devido a sua não eletroatividade nos eletrodos convencionais de carbono.

Para superar essa não eletroatividade dos AO, alguns trabalhos têm sido propostos com base em eletrodos de carbono quimicamente modificados com mediadores de elétrons [11-12]. Dentre os mediadores de elétrons mais utilizados, destaca-se a ftalocianina de cobalto (II) - CoPC devido as suas propriedades eletrocatalíticas como catalisadores em processos redox que podem ocorrer rapidamente com um pequeno gasto de energia no íon de metal central ou no anel de ftalocianina [19, 20 - 25].

No entanto, as respostas eletrocatalíticas dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico no eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II) - CoPC-CPE aparecem em potenciais muito próximos, resultando em um alto grau de sobreposição/interferência dos sinais de resposta [17]. Esta sobreposição impede a determinação voltamétrica por calibração univariada quando mais de um ácido orgânico está presente na matriz. Tal comportamento representa uma limitação do sensor que, por sua vez, pode ser contornada com o uso de técnicas quimiométricas de calibração multivias que portem a “vantagem de segunda ordem”, que nada mais é do que, a capacidade de quantificar com exatidão e confiabilidade um ou mais analitos na presença de diversos interferentes que não foram modelados na etapa de calibração [26, 27]. Dentre os vários métodos de calibração multivias disponíveis na literatura para modelar dados voltamétricos, destacam-se a Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS) e os Mínimos Quadrados Parciais desdobrados (U-PLS/RBL) devido à flexibilidade desses algoritmos em modelar um conjunto dados onde ocorre a quebra da trilinearidade [28 – 30].

Neste trabalho uma metodologia analítica sensível, simples, rápida e sem preparo de amostra foi desenvolvida para determinar os ácidos cítrico (AC), láctico (LA), málico (MA) e tartárico (TA) em amostras de sucos, utilizando um CoPC-CPE e a técnica de voltametria de onda quadrada associada à calibração multivias.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia voltamétrica a partir da voltametria de onda quadrada e técnicas de calibração de segunda ordem para determinação do ácido cítrico, láctico, málico e tartárico em amostras de sucos, aplicando o CoPC–CPE.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Investigar o comportamento eletroquímico dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico frente ao CPE e ao CoPC–CPE por intermédio da voltametria cíclica e de onda quadrada;
- Construir modelos de calibração individual para cada analito empregando soluções padrão, seguido da modelagem dos dados com U-PLS/RBL e MCR-ALS;
- Testar os modelos de calibração por meio do conjunto de validação constituído da mistura simultânea dos ácidos cítrico, láctico, málico, tartárico (constituente calibrado) e um constituinte não calibrado (ácido succínico), para explorar a vantagem de segunda ordem;
- Aplicar os modelos validados na predição dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico em amostras de sucos;
- Utilizar as potencialidades analíticas do CoPC–CPE associados a ferramentas quimiométricas para eliminar o efeito de interferência nas amostras de sucos durante a quantificação dos ácidos orgânicos;
- Validar o método proposto através da comparação dos resultados com o método de referência (AOAC) aplicando o teste *t* pareado.

---

---

Capítulo 2.

**FUNDAMENTACÃO**

**TEÓRICA**

---

---

## 2. Fundamentação teórica

### 2.1. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos constituem um grupo de compostos químicos que diferem entre si quanto aos grupos carbonila, hidroxila e ligações duplas carbono-carbono nas suas moléculas. Eles são classificados com base no tipo de cadeia carbônica, saturado ou insaturado, substituído ou não substituído e pelos grupos funcionais. A acidez de um ácido orgânico é determinada principalmente pela estabilidade da base conjugada da molécula. Dentre os ácidos orgânicos mais comuns, estão os ácidos carboxílicos de baixo peso molecular, devido a sua ampla aplicação industrial [31 - 32].

Os ácidos carboxílicos de baixo peso molecular são geralmente ácidos fracos, cuja acidez está associada ao seu grupo carboxílico. Eles são encontrados naturalmente nos organismos e em algumas frutas, outros são sintetizados quimicamente e alguns são produtos de fermentação microbiana [9, 33].

Os ácidos orgânicos têm sido utilizados durante muito tempo como aditivos alimentares e conservantes, com o objetivo de prevenir a deterioração dos alimentos e prolongar a vida útil dos ingredientes alimentares perecíveis [31, 34]. Porém, há quem acredite que a adição de ácidos nos alimentos e bebidas é prejudicial à saúde humana, devido às propriedades corrosivas e tóxicas desta classe de compostos. Mas esta crença foi desconstruída partindo do princípio de que os ácidos orgânicos são substâncias encontradas naturalmente no organismo e participam das reações bioquímicas mais importantes do corpo humano [35].

Sendo assim, um consumo moderado de ácido orgânico é benéfico para a saúde humana, abrindo o apetite e ajudando na digestão, no entanto, o consumo excessivo é prejudicial [36]. Por isso, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) dispõe de normas que limitam a quantidade máxima permitida desses aditivos em cada tipo de alimentos e nas bebidas não alcoólicas [37], alcoólicas não fermentadas [38] e alcoólicas fermentadas [39].

Devido às suas propriedades bactericidas, os ácidos orgânicos também são usados como produtos antimicrobianos, desenvolvidos e avaliados para reduzir bactérias patogênicas transmitidas por alguns alimentos [40 - 41]. Além disso, a adição de ácidos orgânicos aos alimentos também transmite sabor e atividade antioxidante, mantendo as propriedades organolépticas dos produtos inalteradas durante longos períodos [42 - 43]. Portanto, uma série de aplicações industriais para os AO foram desenvolvidas levando

em consideração suas diferentes propriedades. Dentre os mais utilizados estão os ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico [9; 44].

### 2.1.1. Ácido cítrico

O ácido cítrico (AC) ou ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico pode ser encontrado naturalmente na maioria das frutas cítricas e foi extraído pela primeira vez em 1784 pelo químico sueco Carl Scheele. Devido à grande demanda pelo uso de AC na indústria, em 1892 ele passou a ser obtido industrialmente, a partir da fermentação da sacarose realizada pelo micro-organismo *Aspergillus niger* [45 - 46]. Sua fórmula química é  $C_6H_8O_7$  e sua acidez é consequência dos três grupos carboxilas (-COOH) que podem perder um próton em solução e formar o íon citrato, que por sua vez, é um bom controlador de pH [44 - 45].

É amplamente utilizado na indústria de bebidas e alimentos em geral, como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 330, dando um sabor ácido e refrescante aos produtos [39]. Além disso, também é utilizado para redução de pH, controle de crescimento microbiano, aromatizante, mascarar o gosto desagradável da sacarina e dá efeito acidificante sobre o sabor dos produtos [45 - 46]. É encontrado principalmente nos sucos industrializados e refrigerantes.

### 2.1.2. Ácido láctico

O ácido láctico (AL) ou ácido 2-hidróxiopropanóico pode ser obtido por síntese química (mistura racêmica na reação de acetaldeído com ácido hidrocianico) ou por fermentação natural utilizando *Streptococcus lactis* [44, 47]. O AL foi descoberto em 1780 no leite coalhado, pelo químico Carl Scheele e sua fórmula química molecular é  $C_3H_6O_3$ , apresentando isomeria óptica do tipo: dextrógiro (D-), levógiro (L-) e racêmico (DL-) [17, 47].

De cor cristalina e sabor sutil e suave, às vezes descrito como ligeiramente salino, é largamente utilizado na indústria como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 270 [39]. Na indústria alimentícia em geral, é utilizado apenas na forma L-, sendo um ingrediente importante nos produtos cárneos curados, iogurtes, sorvetes, maionese, bombons, recheios, conservas vegetais, leites fermentados, pickles e produtos marinados. Na indústria de bebidas, é aplicado principalmente em cervejas, sucos industrializados e refrigerantes [17; 47].

### 2.1.3. Ácido málico

O ácido málico (AM) ou ácido hidroxibutanodioico pode ser encontrado naturalmente em frutas, como maçã e pêra, ou pode ser obtido industrialmente a partir da hidratação dupla de anidrido maleico [35]. Ele foi extraído pela primeira vez do suco da maçã em 1785 pelo químico sueco Carl Scheele, com fórmula química  $C_4H_6O_5$ , apresentando duas formas estereoisoméricas (enantiômeros L e D). Vale ressaltar que o isômero L existe apenas em sua forma natural [48].

É um de gosto forte, com percepção não tão imediata, porém duradoura. É utilizado na indústria como agente tamponante, aditivo alimentar, aromatizante, para mascarar o gosto desagradável da sacarina e como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 296 [39]. Em comparação com o AC, o málico tem um maior potencial realçador do *flavour* nos alimentos, por isso, é aplicado como acidulante em pó para refrigerantes, sucos industrializados, cervejas e sobremesas, objetivando a redução dos custos [35, 49].

### 2.1.4. Ácido tartárico

O ácido tartárico (AT) ou ácido 2,3-di-hidroxibutanodioico pode ser encontrado naturalmente em frutas cítricas, principalmente nas uvas e foi extraído pela primeira vez em 1769 pelo químico sueco Carl Scheele, com fórmula química igual a  $C_4H_6O_6$  [35]. A ocorrência natural do AT é quiral e é conhecida por ácido L-tartárico. O seu enantiômero é o ácido D-tartárico com forma aquiral e pode ser produzida artificialmente por meio da reação química de anidrido maleico e peróxido de hidrogênio [50].

O ácido tartárico é um sólido incolor, facilmente dissolvido em água, tem sabor muito acentuado, embora sua percepção seja muito breve. Igualmente ao ácido fosfórico, é o que mais baixa o pH nas soluções. É utilizado principalmente como, agente tampão, agente de fermentação e como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 334 [51]. O AT não possui uma escala tão ampla de utilização quanto os ácidos cítrico e málico, porém tem grande importância na indústria alimentícia e de bebidas, principalmente nos produtos com sabor de uva, como por exemplo, sucos de uva e vinhos [35, 51].

Como características desfavoráveis, o AT é mais caro que a maioria dos acidulantes, inativa menos microrganismos e inibe menos o crescimento microbiano em comparação com a maioria dos outros ácidos orgânicos [35, 52].

## 2.2. Importância dos ácidos orgânicos na indústria de bebidas

Os ácidos orgânicos têm desempenhado um papel significativo em alimentos e bebidas há milhares de anos devido, primeiramente, à sua natureza antimicrobiana. Em regiões onde a qualidade da água é insalubre, práticas de adicionar pequenas quantidades de suco de limão ou vinho à água potável foram adotadas, com o objetivo de inativar bactérias ou sensibilizá-las para inativação subsequente no tratamento gastrointestinal [35, 43]. Este processo de acidificar bebidas a níveis de pH baixos é conhecido há muitos séculos atrás. Nas escrituras do Novo Testamento, por exemplo, há alusão a esta prática, onde o apóstolo Paulo se dirige ao jovem evangelista Timóteo: "Não beba mais água só, mas usa um pouco de vinho, por causa do seu estômago e das tuas frequentes enfermidades" (I Tim 5:23), essa afirmação refere-se ao efeito de purificação alcançado pela acidificação da água.

Atualmente na indústria de bebidas, os ácidos orgânicos exercem várias funções, sendo as principais delas: aromatizantes, reguladores de pH e agentes tamponantes [53].

A função de aromatizante é uma das principais aplicações dos AO, pois dão aos alimentos sabores ou aromas particulares. Sabe-se que cada ácido possui suas próprias características, que difere entre si, em termos de intensidade e duração do sabor. Portanto, essas características são levadas em consideração no momento de inclui-los às bebidas produzidas, para conseguir proporcionar ao consumidor produtos com mais qualidade e sabor mais próximo possível do pretendido [35, 53].

A função dos reguladores de pH é alterar e controlar a acidez ou alcalinidade a um nível específico importante para o processamento do produto em questão. O controle adequado do pH ajuda a manter a estabilidade do aroma, bem como da flora microbiana das bebidas, enquanto que o controle inadequado resulta no crescimento de bactérias indesejáveis, que podem ser um perigo à saúde. Numa regra geral, baixando o pH das bebidas, aumenta-se a eficiência dos conservantes [35, 53].

Os agentes tamponantes são utilizados para manter estabilizado o pH das bebidas e com isso evitar os efeitos adversos sobre o aroma, a cor e/ou a estabilidade microbiana do produto, que podem ser causados pela flutuação do pH. Esses agentes são comumente usados como combinações de ácido fraco/sal e essa relação pode ser ajustada para se conseguir diferentes faixas de pH. A capacidade tamponante aumenta à medida que a concentração molar da solução ácido/sal aumenta e, quanto mais perto o pH do tampão estiver do pKa do ácido, maior será a capacidade tamponante [35, 53].

Além da adição proposital dos AO nas bebidas, alguns deles são formados na etapa de fermentação do mosto, na qual o etanol e o gás carbônico são formados como compostos majoritários, por meio do metabolismo da sacarose pelas leveduras [54, 55]. Assim sendo, a acidez total deve ser levada em consideração para que as propriedades sensoriais e organolépticas estejam estáveis no produto final que chegará a mesa do consumidor.

### 2.3. Métodos analíticos aplicados à determinação de ácidos orgânicos

A demanda pelo uso dos AO nas industriais alimentícias e de bebidas aumenta gradativamente com o passar do tempo e com ela aumenta-se a preocupação dos consumidores quanto ao uso e/ou consumo excessivo desses compostos para a saúde. Por isso, o controle responsável desses ácidos é de grande importância para a sociedade, uma vez que, o uso demasiado pode trazer prejuízos à saúde humana, bem como prejudicar as propriedades organolépticas e gustativas dos produtos que os contém [36, 42, 43]. Sendo assim, a Associação Oficial de Química Analítica (AOAC) desenvolveu métodos analíticos oficiais para o controle dos AO em diversas matrizes, como por exemplo, em produtos derivados de frutas (sucos e refrigerantes) e cervejas [14].

Os métodos da AOAC para a determinação dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico em produtos de frutas e cervejas, podem ser realizados individualmente para cada ácido, sendo os procedimentos para cada um, baseados em etapas longas e exaustivas de precipitação, seguido de etapas de filtração, lavagem e secagem, para só então ser submetido a determinação por métodos de titulação, ou então, por meio de cromatografia de fase reversa para determinação simultânea [14]. Esses procedimentos oficiais duram em média 20 horas para realizar a determinação de um ácido por vez, em uma amostra, fatos que os tornam inviáveis para as análises de rotina devido aos longos tempos de análise, utilizando procedimentos bastante laboriosos, com muito gasto de reagentes e geração de resíduos [18, 56].

Por esta razão, na literatura são encontrados diversos trabalhos descrevendo métodos alternativos aos da AOAC para a determinação dos ácidos orgânicos que apresentam vantagens sobre os oficiais, tais como: (i) sensibilidade; (ii) seletividade; (iii) ganho de tempo e (iv) menor consumo de reagentes. Dentre as técnicas mais utilizadas, estão as espectrofotométricas [13; 57], enzimáticas [58, 59], cromatográficas [1, 7, 10], eletroforéticas [6, 8, 9] e eletroanalíticas [2, 18, 60].

## 2.4. Técnicas eletroanalíticas

As primeiras investigações eletroquímicas são datadas por meados da década de 1780, por Luigi Galvani (Itália) através de estudos realizados sobre as contrações dos membros posteriores de rãs quando se aplicava eletricidade estática. Nesse estudo Galvani concluiu que os nervos dos músculos animais continham um fluido semelhante, mas não igual, ao fluido elétrico e esse trabalho ficou conhecido como “eletricidade animal” [61]. As afirmações de Galvani inflamaram a pesquisa entre os cientistas da Europa, dando origem a muitas discussões, palestra e inspirando a primeira obra de ficção científica da história (Frankenstein) publicado no século XIX [60]. Em 1796 Alessandro Volta (Itália) refutou a “eletricidade animal” de Galvani, após desenvolver pela primeira vez uma bateria. Sua pilha voltaica foi uma invenção histórica e foi melhorada por uma série de desenvolvimentos ao longo do século XIX [62]. Mais tarde, com os avanços na pesquisa, parâmetros elétricos como condutividade, corrente elétrica e potencial, foram relacionados com as propriedades da solução analisada, dando origem as primeiras aplicações analíticas através das técnicas eletroquímicas [63].

Desde os primeiros estudos até os dias atuais, as técnicas eletroanalíticas são utilizados em diversas aplicações, como produtos farmacêuticos, alimentícios e amostras ambientais [64 - 66], por portarem vantagens como alta sensibilidade, seletividade, baixos limites de detecção e baixo custo instrumental e operacional [15].

As técnicas eletroanalíticas são baseadas em algumas propriedades elétricas (corrente, potencial e carga) mesuráveis do analito, quando este é submetido a uma diferença de potencial aplicada entre os eletrodos. A resposta dessa interação (sinal analítico) é relacionada com algum parâmetro químico do analito, como por exemplo, concentração [67, 68]. Dentre o conjunto das técnicas eletroanalíticas, destaca-se a voltametria, desenvolvida em 1922 pelo químico checo Jaroslav Heyrovský [62].

### 2.4.1. Voltametria

A voltametria é uma técnica baseada nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução [69]. Nessa técnica, a corrente elétrica ( $i$ ) é medida em função da aplicação de potencial ( $E$ ) e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução, é relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente, na célula eletroquímica [69, 70].

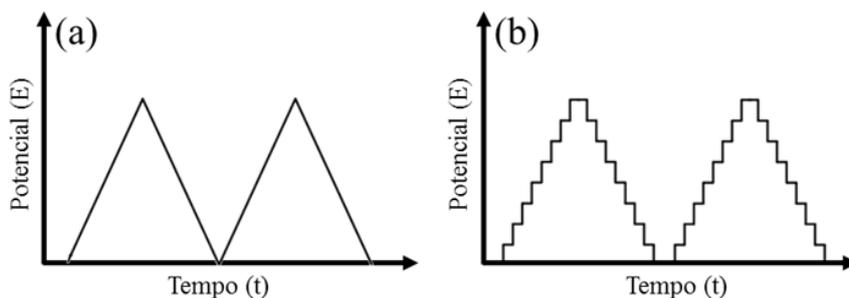
Na voltametria, as células eletroquímicas utilizadas podem ser compostas por dois ou três eletrodos, sendo o último mais utilizado, devido às vantagens no aumento da sensibilidade e precisão na resposta analítica [70]. Na célula eletroquímica composta por três eletrodos, tem-se: o eletrodo de trabalho, de referência e o auxiliar. Nesse sistema, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional, que atuará quando uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência for aplicada, fazendo a resistência do eletrodo de referência aumentar e a do eletrodo auxiliar diminuir, permitindo que a corrente de eletrólise flua apenas entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, garantindo que o potencial no eletrodo de referência permaneça constante, evitando assim que ocorram variações de potencial da reação redox [68 - 70].

Os processos de oxidação ou redução que ocorrem na interface eletrodo-solução acontecem a partir da transferência de massa (transferência da espécie química do corpo da solução para a superfície do eletrodo) e da transferência de carga (transferência de elétrons na superfície do eletrodo), seguido da volta do produto da reação formado na superfície eletródica para a solução [68].

Dentre as técnicas voltamétricas aplicadas em estudos eletroanalíticos, destacam-se, neste trabalho, a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada (técnica pulsada) [69].

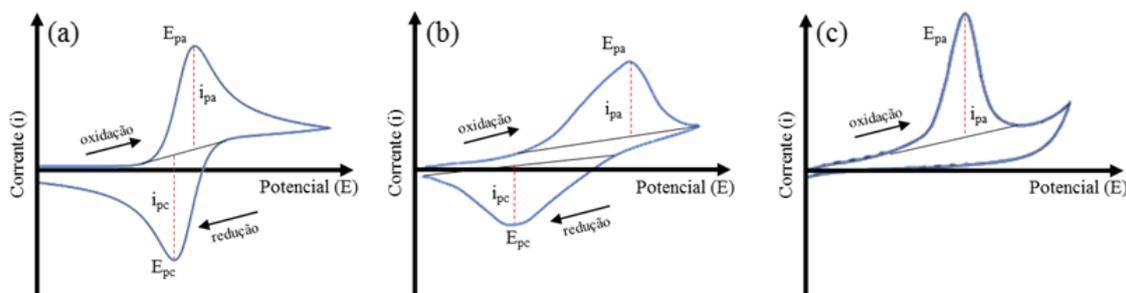
#### 2.4.1.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma técnica de varredura reversa, na qual as medidas são realizadas variando o potencial na forma de uma onda triangular (**Fig. 2a**) com velocidade conhecida, onde o potencial aplicado varia linearmente com o tempo e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao potencial inicial [67, 69 - 71]. Há ainda alguns casos no qual o potencial pode ser aplicado na forma de escada - *staircase* - (**Fig. 2b**), isto é, com degraus de potenciais na ordem de 10 mV, com pequenos tempos de duração (50 ms), onde a corrente é lida apenas no final deste intervalo. O objetivo desta variação é minimizar a contribuição da corrente capacitiva na corrente total [67, 69 - 71].



**Figura 2.** Sinal de excitação para CV.

De acordo com o sinal de excitação da CV picos catódicos e/ou anódicos podem ser obtidos, isso vai depender do tipo de mecanismo redox que a molécula do sofre no eletrodo. Por exemplo, se a reação for reversível (**Fig. 3a**) ou quase-reversível (**Fig. 3b**), um par de picos catódico ( $E_{pc}$ ) e anódico ( $E_{pa}$ ) será obtido, porém se a reação for irreversível (**Fig. 3c**) apenas um dos picos (catódico ou anódico) será observado [67, 69 - 71].



**Figura 3.** Voltamogramas de CV para um sistema reversível (a), quase-reversível (b) e irreversível (c).

Os testes diagnósticos da CV são baseados na dependência do potencial de pico e da corrente de pico em função do estudo da variação da velocidade de varredura. Nesses testes é possível obter informações acerca da reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência de elétrons e da presença de reações químicas acopladas [72]. Os testes diagnósticos para caracterização de cada tipo de processo redox estão descritos na **Tab. 1**.

**Tabela 1.** Testes diagnósticos para processos redox usando CV.

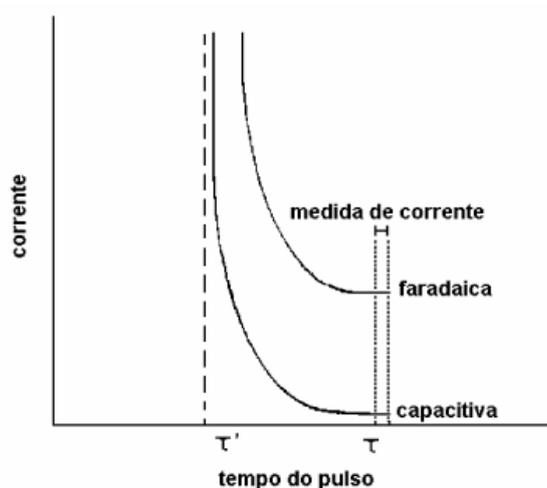
Reversível	Quase-Reversível	Irreversível
$i_p \propto v^{1/2}$	$i_{pc}$ aumenta com $v$	$i_{pc} \propto v^{1/2}$
$ i_{pa}/i_{pc}  = 1$	$ i_{pa}/i_{pc}  = 1$ se $\alpha = 0,5$	ausência de pico reverso
$\Delta E_p =  E_{pa} - E_{pc}  = 59/n$	$\Delta E_p > 59/n$ e aumenta com $v$	$ dE_p/d\log v  = 29,6/(\alpha n')$
$ E_p - E_{p/2}  = 56,6/n$	--	$ E_p - E_{p/2}  = 47,7/(\alpha n')$
$E_p$ independe de $v$	$E_{pc}$ desloca negativamente com o aumento de $v$	$E_p$ depende de $v$

A CV é a técnica mais utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos e dentre as principais vantagens da CV estão: (i) a característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons (mecanismos de reação redox) e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (ii) a possibilidade de investigar a reatividade química das mais diferentes espécies, assim como avaliar a reversibilidade dos processos eletroquímicos, favorecendo a realização de estudos exploratórios quando não se possui informações sobre a eletroatividade do analito.

#### 2.4.1.2. Técnicas pulsadas

As técnicas pulsadas surgiram em meados da década de 50 e são baseadas na medida da corrente elétrica em função do tempo no qual um determinado pulso de potencial é aplicado. Essas técnicas começaram a substituir as técnicas polarográficas clássicas na determinação de espécies eletroativas, devido ao ganho de sensibilidade [73 - 74].

Esse ganho de sensibilidade é consequência da largura do pulso e do degrau de potencial que é aplicado no eletrodo, pois quando uma diferença de potencial é aplicada ao sistema, as correntes faradaica e capacitiva decaem com o tempo, porém, a contribuição capacitiva, tende à zero muito mais rapidamente do que a contribuição faradaica (**Fig. 4**). Portanto, no instante em que a contribuição da corrente capacitiva é minimizada, a leitura é realizada, obtendo apenas a corrente faradaica, que é função da concentração do analito [73 - 74].



**Figura 4.** Variação das correntes faradaicas e capacitivas em função do tempo, nas técnicas de pulso.

Dentre as principais técnicas pulsadas destaca-se a voltametria de onda quadrada (SWV).

### 2.4.1.2.1. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada é uma técnica de pulso que surgiu em 1953 quando um grupo de cientistas liderados por Barker realizavam estudos/experimentos com o objetivo de minimizar a contribuição da corrente capacitiva residual obtida nas análises polarográficas [67, 69].

As medidas na SWV são realizadas variando o potencial na forma de escada (Fig. 5), onde os pulsos de potencial ( $\Delta E_p$ ) com mesma amplitude são sobrepostos a uma altura de potencial ( $\Delta E_s$ ) constantes e cada ciclo tem duração de  $2t_p$  (Período) [70, 75].

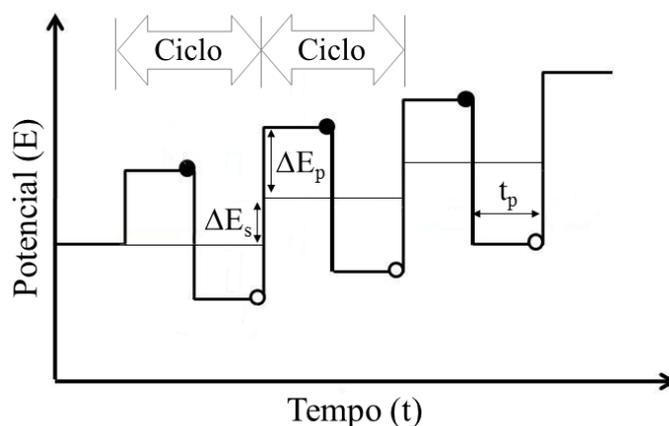


Figura 5. Sinal de excitação para SWV.

De acordo com o sinal de excitação da SWV duas correntes são adquiridas alternadamente (Fig. 6), sendo a corrente direta ( $i_d$ ), obtida no sentido direto da varredura e a corrente reversa ( $i_r$ ), obtida no sentido oposto da varredura [69 - 70]. Portanto, o sinal analítico da SWV é dado como a intensidade da corrente resultante ( $\Delta i$ ) obtida, de acordo com a Equação 1:

$$\Delta i = i_d - i_r \quad \text{Eq. 1}$$

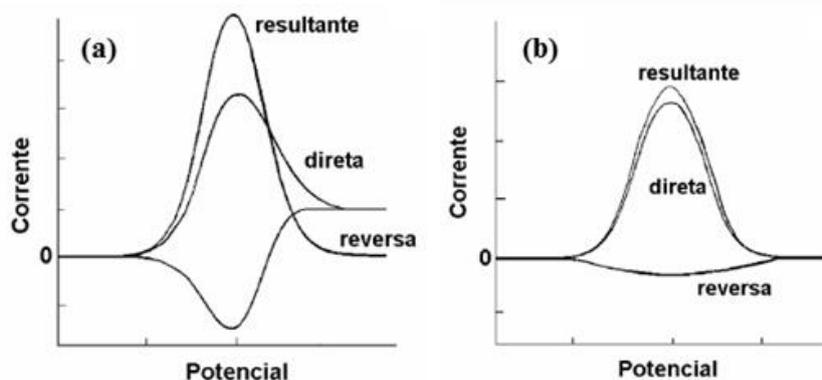


Figura 6. Voltamogramas de SWV para um sistema reversível (a) e um sistema irreversível (b).

Dentre as principais vantagens da SWV estão: (i) o ganho na sensibilidade, devido a excelente discriminação entre a corrente capacitiva e a faradaica, com possibilidade de alcançar baixos limites de detecção (ii) redução no tempo de medida, devido à capacidade da velocidade de varredura variar de 100 a 1000 mV s<sup>-1</sup> com uma frequência de até 100 ciclos/segundo [15, 76].

Entre os parâmetros importantes dessa técnica destacam-se a frequência da onda ( $f$ ), amplitude de pulso ( $a$ ) e o incremento de potencial, uma vez que, todos eles influenciam diretamente na intensidade dos sinais voltamétricos e, conseqüentemente, na sensibilidade [76, 77].

## 2.5. Eletrodos quimicamente modificados

Esse termo foi criado em 1975 por Murray e colaboradores e se refere aos eletrodos sólidos convencionais que possuem espécies quimicamente ativas imobilizadas em sua superfície. Os primeiros estudos acerca dos eletrodos quimicamente modificados surgiram no início da década de 70 com o objetivo de estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução e devido à necessidade de analisar compostos específicos que não eram eletroativos em eletrodos convencionais [78, 79].

A espécie química com propriedades para melhorar a sensibilidade, seletividade e estabilidade de um eletrodo sólido convencional é chamado de agente modificador e este, por sua vez, é escolhido de acordo com a necessidade de aplicação [80]. Dentre os mais utilizados pode-se citar: as enzimas, as espécies orgânicas, tais como: quinonas, tetratiofulvaleno, tetracianoquinodimetano, etc e compostos organometálicos, tais como: ferrocenos, óxidos de rutênio, metaloporfirinas, ftalocianinas, etc.

Os métodos mais utilizados para realizar a modificação são: adsorção (método simples e rápido no qual o agente modificador é dissolvido e o eletrodo é colocado em contato com a solução); ligação covalente (é a incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo); filmes poliméricos (imobilização de policamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo a partir do recobrimento com filmes poliméricos); ou materiais compósitos (modificação interna do material eletródico pela combinação de duas ou mais fases de diferentes naturezas) [81]. Geralmente, a camada de modificação é eletroativa e age como mediador de elétrons na interface eletrodo/solução [81].

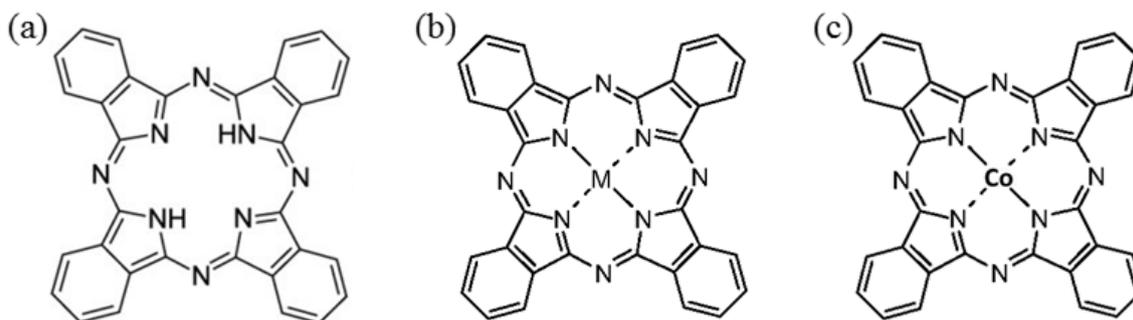
Outro aspecto importante a ser considerado é a escolha do substrato que será modificado, pois ele deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e ser adequado para o método de modificação escolhido. Dentre os substratos mais adequados estão o ouro, platina, carbono vítreo e pasta de carbono [82]. Entre esses, o material que mais se destaca é a pasta de carbono devido à facilidade de fabricação, sensibilidade, seletividade, ampla faixa de potencial de trabalho, superfície facilmente renovada e baixa corrente de fundo [82 - 83].

Os eletrodos quimicamente modificados apresentam vantagens como estabilidade, sensibilidade e seletividade. Além disso, podem diminuir o sobrepotencial que vários analitos necessitam para se oxidar ou se reduzir e também minimizar os problemas de interferentes [78, 79]. Por isso, os eletrodos quimicamente modificados são largamente aplicados na área ambiental, industrial e da saúde.

### 2.5.1. Eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II)

A ftalocianina foi sintetizada pela primeira vez, acidentalmente, em 1907 por Brun e Tcherniac ao realizarem um experimento com ftalimida e anidrido acético. Esses reagentes originaram o composto orto-cianobenzamida, que ao ser aquecido em alta temperatura, originou um produto de colocação azul-esverdeado [84, 85]. Porém, só em 1934 esse “novo” composto foi nomeado como ftalocianina, por ser originado do anidrido ftálico (*ftalo*) e apresentar a coloração azul-esverdeada (*ciano*) [86]. Dois anos mais tarde, os pesquisadores Linstead e Robertson conseguiram compreender e elucidar a estrutura molecular da ftalocianina, a partir de estudos realizados por difração de Raio-X [87].

Na **Figura 7** observa-se que a ftalocianina é um composto policíclico aromático com quatro unidades isoindol unidos através de átomos de nitrogênio. Os anéis aromáticos dão ao composto um arranjo planar com 18 elétrons  $\pi$ , resultando em uma alta densidade eletrônica, que por sua vez, é capaz de doar pares de elétrons. Portanto, a região central da molécula pode ser ocupada por um par de átomos de hidrogênio (**Fig. 7a**) ou por metais de transição (**Fig. 7b**) através de ligações de coordenação. Uma vez coordenadas por um centro metálico são denominadas de ftalocianinas metálicas [25].



**Figura 7.** Estrutura da ftalocianina na forma ácida (a) ftalocianina metálica (b) e ftalocianina de cobalto II (c).

A primeira síntese de uma ftalocianina metálica aconteceu também de forma acidental em 1927 quando Diesbach e Von Der Weid aqueceram uma mistura de orto-dibromobenzeno e cianida de cobre em piridina a 200°C. O produto dessa reação foi a ftalocianina de cobre [88]. Em 1928, químicos da Scottish Dyes Ltd. tentavam preparar ftalimida a partir da reação entre o anidrido ftálico e amônia usando um recipiente de ferro, e acidentalmente sintetizaram a ftalocianina de ferro. Anos depois, descobriu-se que a procedência do átomo de ferro foi devido ao recipiente usado para o meio reacional [89].

Logo após a sua identificação estrutural, as ftalocianinas foram amplamente utilizadas na indústria têxtil e de corantes, devido sua estabilidade química, térmica e fotoquímica [90]. Na eletroquímica, as ftalocianinas são muito utilizadas como mediadores de elétrons, pois quando imobilizadas na superfície dos eletrodos, são catalisadores ativos para uma ampla faixa de reações eletroquímicas, podendo sofrer processos redox rapidamente com um pequeno gasto de energia, facilitando a transferência de carga entre o analito e o eletrodo [25, 71, 91].

Dentre as ftalocianinas metálicas usadas como mediadores de elétrons destaca-se a ftalocianina de cobalto (II) (**Fig. 7c**) devido à atividade eletrocatalítica ser estável frente a diferentes reações, mesmo quando estão imobilizadas na superfície dos eletrodos [92, 93].

O comportamento eletrocatalítico da CoPC quando adsorvida no CPE está relacionada aos processos redox que ocorrem tanto no cobalto quanto no anel da ftalocianina [92, 94]. Então vejamos, no estado normal de oxidação o cobalto tem duas cargas positivas ( $\text{Co}^{2+}$ ) e a ftalocianina duas cargas negativas ( $\text{PC}^{2-}$ ). Nesse caso, os processos redox podem envolver os pares  $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$  (oxidação) e  $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{+}$  (redução), ao passo que os processos que ocorrem no anel da PC podem envolver os pares  $\text{PC}^{2-}/\text{PC}^{-1}$

(oxidação) e  $PC^{-2}/PC^{-3}$  (redução) [71, 95]. Neste trabalho verificou-se que a atividade electrocatalítica dos ácidos orgânicos no CoPC-CPE envolve a oxidação electroquímica de  $Co^{2+}$  indo a  $Co^{3+}$  seguida da redução química de  $Co^{3+}$  indo a  $Co^{2+}$  pelos ácidos orgânicos em solução, possibilitando o desenvolvimento de um novo método electroanalítico para determinação destes ácidos.

## 2.6. Quimiometria

A quimiometria é uma área da química que usa métodos matemáticos e estatísticos para fornecer o máximo de informações químicas através da análise dos dados [96]. Os primeiros registros de estudos quimiométricos surgiram na década de 70 pelos pesquisadores Svante Wold e Bruce R. Kowalski, quando os computadores se tornaram mais explorados para investigação científica [97].

Um dos principais motivos que levou os químicos analíticos, em particular, a desenvolverem métodos quimiométricos foi a complexidade de dados gerada pela instrumentação analítica moderna [98].

As técnicas quimiométricas são basicamente divididas em planejamento experimental, reconhecimento de padrão e calibração. O planejamento experimental é utilizado para otimizar as condições experimentais com o menor número de ensaios possíveis [99]; o reconhecimento de padrões realiza análises exploratórias nos dados buscando semelhanças no sistema químico analisado e tem por objetivo a classificação de objetos (padrões) em um número de categorias ou classes [100]; e na calibração utiliza-se modelos matemáticos capazes de correlacionar propriedades do(s) analito(s) com múltiplos sinais registrados no instrumento [101].

### 2.6.1. Calibração em química analítica

A calibração, na química analítica, é um conjunto de operações que relacionam o sinal analítico com a propriedade da amostra analisada [101, 102]. Existem dois tipos de calibração, a univariada e a multivariada.

A calibração univariada relaciona um único sinal analítico (como por exemplo medidas de pH) com a propriedade de apenas um analito na amostra [102, 103]. Apesar de muito consolidada na literatura, a presença de interferentes durante a análise, prejudica o desempenho dessa calibração. Isso significa dizer que, se houver interferente na amostra, o analista deverá realizar etapas prévias de extração e tratamento da amostra,

sendo necessário mais tempo e mais gasto de reagentes, para evitar resultados equivocados [104, 105].

Na calibração multivariada um conjunto de sinais analíticos (como por exemplo, espectros NIR) é relacionado com um ou mais analitos na amostra [102, 106]. A vantagem dessa calibração, sob a univariada, é a possibilidade de quantificar simultaneamente analitos na presença de outras substâncias, desde que esses tenham sido modelados na etapa de calibração [106, 108]. É importante destacar que, o analista deve tentar modelar o máximo de interferentes possíveis que podem vir a existir na amostra a ser analisada. Isso significa dizer que, em alguns casos, será necessário analisar grandes quantidades de amostras para garantir um modelo de calibração robusto [107]. Entretanto, quando se trabalha com amostras tão complexas como solos e bebidas, por exemplo, é muito difícil conseguir um conjunto de calibração com uma representatividade suficientemente eficaz para modelar todos os constituintes presentes, seja analito ou não [109, 110]. Portanto, para tentar contornar amostras tão complexas com redução de esforços, mantendo a precisão e confiabilidade do método, a calibração multivias foi desenvolvida [111 - 112].

Na calibração multivias um conjunto mais complexo de sinais analíticos (como por exemplo, fluorescência do tipo emissão e excitação em 3D, que gera uma matriz de dados por medida) é relacionado com o analito presente na amostra [113, 114]. A grande vantagem dessa calibração é a chamada “vantagem de segunda ordem”, que permite ao analista quantificar com exatidão e confiabilidade um ou mais analitos na presença de diversos interferentes que não foram modelados na etapa de calibração [26; 115]. Essa característica reduz o número de amostras necessárias para a modelagem, diminuindo consequentemente os esforços de bancada, os reagentes utilizados, o tempo e os gastos, além de aumentar consideravelmente a seletividade do método [26; 27]. A dificuldade é a complexidade estatística e matemática associadas aos métodos usados nesse tipo de calibração [27].

#### 2.6.1.1. Métodos de calibração multivias

Com o avanço da instrumentação analítica moderna houve um progresso na obtenção de sinais, sendo possível obter dados em função de mais de uma variável. Na calibração de segunda ordem, quando se mede mais de uma amostra, são obtidos dados de três vias, pois cada sinal é função de três fontes diferentes de variação (no caso de dados eletroquímicos: a amostra, a variação de potencial e a variação de frequência ou

pH, etc) [111, 116]. Dados dessa natureza são chamados de dados de segunda ordem e na literatura é possível encontrar uma grande variedade de algoritmos apropriados para modelá-los.

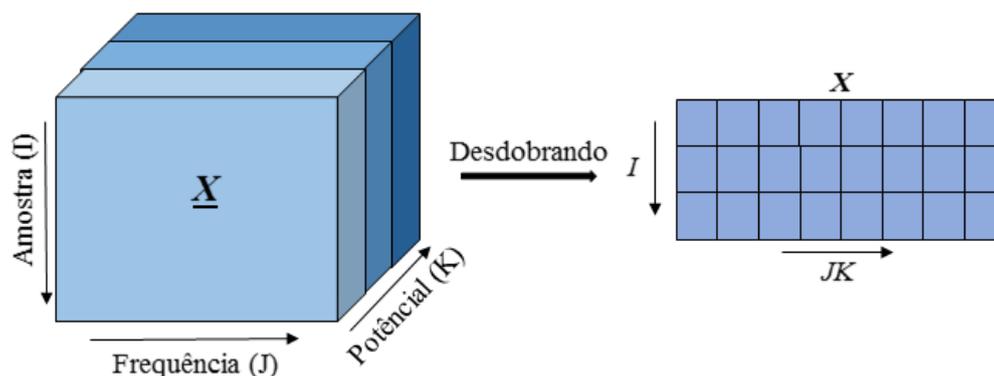
Do ponto de vista analítico, os dados de segunda ordem representam uma fonte rica de informações, porque muitos sinais são usados para descrever uma única amostra [116, 117]. No entanto a peculiaridade de cada conjunto de dados deve ser levada em consideração antes de selecionar um determinado método de calibração multivias, pois cada um desses algoritmos tem suas próprias ferramentas para contornar os problemas analíticos existentes [116, 118].

Dentre os vários métodos de calibração multivias disponíveis na literatura para modelar dados voltamétricos de segunda ordem se destacam os mínimos quadrados parciais desdobrado com bilinearização residual (U-PLS/RBL) e a resolução de curva multivariada com mínimos quadrados alternados (MCR-ALS), devido a flexibilidades desses algoritmos frente a quebra de trilinearidade dos dados [27 - 29].

A trilinearidade está associada ao conceito matemático de que uma função de resposta instrumental  $X(r_1, r_2, r_3)$  pode ser separada no produto de três funções independentes  $X_1(r_1)$ ,  $X_2(r_2)$  e  $X_3(r_3)$ ; na prática analítica, significa dizer que, cada espécie química analisada possui um único perfil instrumental invariável, que ao passar de amostra para amostra, varia apenas em intensidade e a aditividade de sinais é mantida [119].

#### 2.6.1.1.1. Mínimos Quadrados Parciais Desdobrados com Bilinearização Residual (U-PLS/RBL)

Mínimos quadrados parciais desdobrados (U-PLS) é uma extensão dos mínimos quadrados parciais (PLS) aplicado aos dados multivias desdobrados [120]. O desdobramento do tensor de dados ( $I \times J \times K$ ) em uma matriz bidimensional ( $I \times JK$ ) está representada na **Fig. 8**.



**Figura 8.** Esquema para o desdobramento do tensor no método U-PLS.

Assumindo que o tensor  $\underline{X}(I \times J \times K)$  corresponde a um conjunto de dados voltamétricos, a dimensão  $I$  é referente às amostras, a dimensão  $J$  está relacionada a variação da frequência (ou pH ou qualquer outro parâmetro voltamétrico) e a dimensão  $K$  é referente a variação de potencial. Desdobrando o tensor  $\underline{X}$  em uma matriz  $\mathbf{X}(I \times JK)$  a dimensão  $I$  (linhas) refere-se às amostras e a dimensão  $JK$  (colunas) correspondem aos voltamogramas medidos em  $J$  frequência [120].

Com o tensor desdobrado, estima-se o número de variáveis latentes ( $A$ ) para o conjunto de validação através da validação cruzada. Em seguida os parâmetros do modelo U-PLS para  $A$  variáveis latentes são estimados (matriz de pesos  $\mathbf{P}$  e  $\mathbf{W}$  e o vetor coeficientes de regressão  $\mathbf{v}$ ). Na sequência, o modelo é usado para prever a concentração ( $y_u$ ) de uma amostra desconhecida ( $\mathbf{X}_u$ ), de acordo com a **Equação 2** [120, 121].

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad \text{Eq. 2}$$

Na **Equação 2**,  $\mathbf{t}_u$  representa os escores de  $\mathbf{X}_u$ . O problema dessa equação é que se na amostra desconhecida houver algum constituinte não modelado, os escores  $\mathbf{t}_u$  não são suficientes para a predição apropriada de  $y_u$  e conseqüentemente a vantagem de segunda ordem não será alcançada. Para obter essa vantagem é necessário que a etapa de Bilinearização Residual (RBL) seja realizada na matriz de resíduos ( $\mathbf{E}_u$ ) da amostra  $\mathbf{X}_u$ , como descrito na **Equação 3** [120, 121].

$$\mathbf{E}_u = \mathbf{X}_u - \mathbf{P} \cdot \mathbf{t}_u \quad \text{Eq. 3}$$

No procedimento RBL a matriz  $\mathbf{E}_u$  é decomposta nos seus autovetores e valores singulares através da decomposição de valores singulares (SVD), como indicado na **Equação 4**.

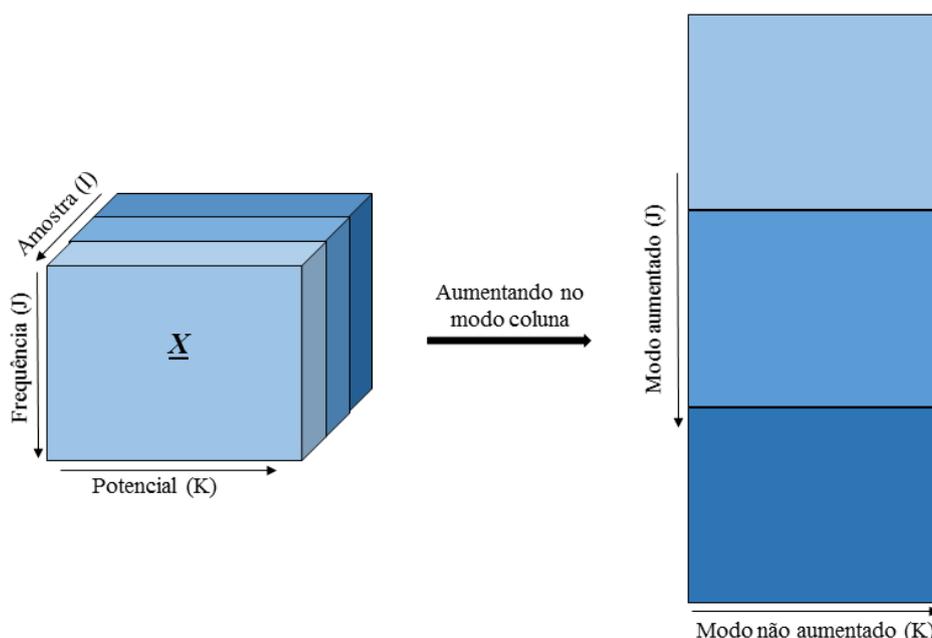
$$\mathbf{S}_{\text{int}} = \mathbf{B}_{\text{int}} \mathbf{G}_{\text{int}} (\mathbf{C}_{\text{int}})^T = \text{SVD}(\mathbf{E}_u) \quad \text{Eq. 4}$$

Onde  $\mathbf{S}_{\text{int}}$  corresponde ao perfil dos interferentes presentes em  $\mathbf{X}_u$ . O produto  $\mathbf{B}_{\text{int}}\mathbf{G}_{\text{int}}(\mathbf{C}_{\text{int}})^T$  é uma matriz truncada para  $N_i$  fatores, no qual  $N_i$  corresponde idealmente ao número de interferentes presentes na amostra. Portanto, mantém-se fixa a matriz de pesos ( $\mathbf{P}$ ) obtida na etapa de calibração e a informação contida na matriz truncada é usada para encontrar um valor de  $\mathbf{t}_u$  adequado para prever  $\mathbf{X}_u$ . A busca por um valor adequado de  $\mathbf{t}_u$  é conduzida minimizando  $\mathbf{E}_u$  através de um ajuste não linear do tipo Gauss-Newton, de acordo com a [Equação 5](#). Se o resíduo obtido para  $N_i$  fatores RBL ( $\mathbf{S}_u$ ) não estiver em concordância com o resíduo instrumental estimado para o conjunto de calibração ( $\mathbf{S}_{\text{cal}}$ ), o procedimento RBL deve ser conduzido para  $N_i + 1$  fator [120, 121].

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \cdot \mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{B}_{\text{int}}\mathbf{G}_{\text{int}}(\mathbf{C}_{\text{int}})^T] + \mathbf{S}_u \quad \text{Eq. 5}$$

### 2.6.1.1.2. Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS)

A Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternados é um algoritmo que permite extrair o perfil puro de cada constituinte presente na amostra desconhecida. Para aplicar o MCR aos dados de segunda ordem, inicialmente o tensor de dados deve ser decomposto em uma matriz. Isso é realizado aumentando a matriz, obtida na medida de cada amostra, em um dos modos, como mostrado na [Fig. 9](#). Vale ressaltar que o modo que deve ser aumentado é o referente a quebra da trilinearidade [122].



**Figura 9.** Esquema de uma matriz aumentada no modo coluna pelo MCR.

Com a matriz aumentada, o MCR-ALS decompõe os dados em duas outras matrizes que contêm informações sobre a concentração (**C**) e o perfil voltamétrico (**S**) dos constituintes presente na amostra analisada, mais uma matriz de resíduos (**E**), de acordo com a **Equação 6** [123, 124].

$$\mathbf{X} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 6}$$

Observando a **Equação 6**, nota-se que o produto de diversas matrizes pode resultar em uma matriz que sofre de ambiguidade rotacional, ou seja, o resultado desse produto matricial (perfis estimados para os constituintes) será combinações lineares dos perfis recuperados [28]. Na prática significa dizer que serão geradas várias soluções para o mesmo problema e isso dificulta a escolha do analista, diante desse “leque” de opções. Entretanto, existem maneiras de reduzir a grande quantidade de soluções geradas pela **Equação 6**, que é aplicando restrições durante a execução dos mínimos quadrados alternados (ALS) [125, 126].

As restrições são propriedades sistemáticas usadas para alcançar soluções quimicamente razoáveis (recuperar perfis), são o alicerce dos métodos iterativos porque conduzem ao processo de otimização do MCR às soluções finais. As principais restrições existentes no MCR são: a não negatividade (geralmente aplicada nas concentrações uma vez que concentração negativa não tem significado físico); e a unimodalidade (garante a presença de um único máximo) [28, 126].

O ALS é um cálculo iterativo que obtém as matrizes **C** e **S** a partir da estimativa inicial dos valores por meio de métodos conhecidos por seleção de variáveis puras, como por exemplo, o PURE que visa selecionar as linhas ou colunas mais diferentes contidas no conjunto de dados analisados, fornecendo estimativas iniciais através dos perfis recuperados. Baseado nas estimativas iniciais, o tensor **X** é reconstruído buscando minimizar a matriz de resíduos (**E**) [123, 124]. As etapas do ALS são: (1) definir o número de componentes; (2) inicializar **C** e **S**; (3) reconstruir **X**, ajustando **C** e **S** minimizando **E** e (4) repetir a etapa 3 até a convergência.

Em um modelo MCR, as informações dos diferentes analitos no conjunto de amostras analisadas são coletadas em perfis de concentração aumentadas. Essas informações são usadas para construir os modelos de calibração pseudo-univariados. Para isso, faz-se uma regressão usando os valores de intensidade dos perfis de concentração, para um determinado analito, nas amostras do conjunto de calibração, em relação aos valores de concentração de referência [123, 124].

Posteriormente, a curva de calibração construída pode ser usada para recuperar a concentração real do analito nas amostras desconhecidas (usando a intensidade de seus perfis de concentração relacionados). A intensidade de um perfil de concentração geralmente é expressa pela área integrada sob o perfil de concentração, onde a área na direção aumentada não normalizada é usada para construir modelos de calibração [123, 124].

### 2.6.2. Pré-processamento para dados voltamétricos de segunda ordem

Existem dois pré-processamentos para dados voltamétricos que devem ser realizados antes da aplicação de algoritmos de calibração multivias, são eles: correção de linha de base e alinhamento dos sinais voltamétricos.

Idealmente, a linha de base dos dados deveria ser plana, porém isso raramente acontece, pois na prática, observa-se algumas flutuações nos sinais decorrente de *background*. Portanto, a correção da linha de base deve ser realizada como uma etapa crítica para melhorar os sinais e reduzir a complexidade dos dados analíticos [28]. Para isso, o algoritmo mais utilizado na correção de linha de base em dados voltamétricos é fundamentado na abordagem de regressão de splines de mínimos quadrados assimétricos (AsLSSR) [127, 128].

Nos dados eletroanalíticos, é comum observar pequenos desvios da linearidade, como na presença de interações entre diferentes componentes individuais. Em geral, a não linearidade dos sinais dificulta fortemente a aplicação direta de modelos de dados lineares. Tais problemas tornam-se mais complicados quando os sinais gerados por sucessivos analitos ou interferências se sobrepõem e, para contornar esses problemas, o alinhamento dos dados voltamétricos é uma etapa importante a ser realizada [29]. O método mais utilizado para alinhar os voltamogramas é o alinhamento por correção otimizada (COW) [128, 129].

#### 2.6.2.1. Regressão Spline dos Mínimos Quadrados Assimétricos (AsLSSR)

O algoritmo AsLSSR foi desenvolvido por Eilers e colaboradores [127] para correção de linha de base, na qual a seguinte função de custo (**Equação 7**) é minimizada:

$$Q = \sum_i v_i (y_i - f_i)^2 + \lambda \sum_i (\Delta^2 f_i)^2 \quad \text{Eq. 7}$$

onde  $y$  é o sinal experimental,  $f$  é uma aproximação suave da tendência da linha de base ( $y$ ),  $\Delta$  é a derivada de  $f$ ,  $i$  denota valores sucessivos do sinal, o parâmetro positivo  $\lambda$

é um parâmetro de regularização que pesa o segundo termo, e  $\nu$  é o peso. Os desvios positivos da linha de base estimada (picos) têm valores baixos de  $\nu$ , enquanto os desvios negativos (linha de base) obtêm valores altos de  $\nu$  [29].

Para suavizar o sinal instrumental (o termo de penalidade na **Equação 7**), Eilers e colaboradores propuseram a abordagem baseada em splines, na extensão multidimensional do método de correção de linha de base [29, 127].

#### 2.6.2.2. Alinhamento por Correção Otimizada (COW)

O COW foi desenvolvido por Nielsen e colaboradores em 1998 [129] e até hoje é a técnica mais popular, robusta e eficiente para alinhamento de sinais instrumentais [130].

Esse algoritmo busca minimizar o número de sinais distintos entre os dados, utilizando um sinal de referência para o alinhamento dos demais sinais em relação a essa referência. Para isso, esse algoritmo realiza o alinhamento dividindo o pico em diversos segmentos que sofrem deformações lineares (sendo esticados ou contraídos) chamados de *warping*, em combinação com interpolações, otimizando os coeficientes de correlação entre os seguimentos correspondentes ao pico de referência e de amostra. A escolha do sinal de referência pode ser através da amostra mais representativa entre os dados ou pelo cálculo da média dos sinais de todos os dados que serão alinhados [131].

Inicialmente, deve-se definir o número de segmentos e a folga (*slack*) que cada segmento terá (o número de variáveis dos segmentos), tanto para os sinais desalinhados, quanto para o sinal de referência. Em seguida, cada segmento será comprimido e estirado, até que o algoritmo escolha as melhores deformações para cada segmento independentemente, de modo a obter a melhor interpolação entre os sinais desalinhados e a referência. Quanto maior a “folga” dos segmentos, melhor, pois o programa executará mais deformações; contudo, este aperfeiçoamento levará a um aumento considerável no tempo de avaliação, bem como a necessidade de um computador mais potente [132].

O sinal final alinhado será a combinação de cada segmento deformado, de modo a obter a máxima correlação entre os sinais desalinhados e de referência. Porém, apesar desse mecanismo ser útil, a distorção proporcionada por ele pode forçar que alguns picos relativos a substâncias diferentes fiquem alinhados podendo causar falsos positivos [131, 132].

### 2.6.3. Parâmetros de desempenho analítico

A qualidade de um método analítico pode ser expressada por parâmetros de desempenho analítico, que são valores numéricos que podem ser calculados em função da sensibilidade e do ruído instrumental. Sendo os principais parâmetros: a sensibilidade, a sensibilidade analítica, o limite de detecção, o limite de quantificação e o erro relativo de predição.

A forma com que a sensibilidade e o ruído instrumental são calculados, na calibração multivariada, ainda estão em desenvolvimento e depende do algoritmo utilizado. Entretanto, recentemente Olivieri e colaboradores propuseram uma forma de calcular a sensibilidade baseada na propagação da incerteza na calibração, que será descrita a seguir [105].

#### 2.6.3.1. Sensibilidade (SEN)

A **Equação 8** é usada para calcular a sensibilidade, correspondente ao algoritmo MCR-ALS:

$$SEN = m_n [J(\mathbf{C}^T \mathbf{C})_{nn}^{-1}]^{-1/2} \quad \text{Eq. 8}$$

onde,  $J$  é o número de pontos de dados em cada submatriz no modo aumentado, e  $m_n$  é a inclinação do gráfico pseudo-univariado MCR-ALS (plotando os scores do analito versus concentrações de calibração). Assumindo-se a decomposição da matriz aumentada ( $\mathbf{X}_{\text{aug}}$ ) em duas matrizes ( $\mathbf{B}_{\text{aug}}$  e  $\mathbf{C}$ ), contendo os perfis dos constituintes no modo aumentado e no modo não-aumentado, respectivamente, a sensibilidade depende dos perfis não-aumentados  $\mathbf{C}$ , que podem ser separados em  $\mathbf{C}_{\text{exp}}$  e  $\mathbf{C}_{\text{unx}}$ , contendo os perfis para os constituintes calibrados e não calibrados, respectivamente, como mostrado na

**Equação 9:**

$$\mathbf{C} = [\mathbf{C}_{\text{exp}} \mid \mathbf{C}_{\text{unx}}] \quad \text{Eq. 9}$$

Como cada matriz de dados tem dimensão  $J \times K$ , pressupõe-se que o aumento dado pela equação 8 foi realizado no modo coluna. Se o aumento for no modo linha,  $J$  deve ser substituído por  $K$  na **Equação 8**.

Para o U-PLS/RBL a sensibilidade é calculada de acordo com a **Equação 10:**

$$SEN = \{ \mathbf{g}_n^T [ \mathbf{Z}_{\text{exp}}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{unx}} \mathbf{Z}_{\text{unx}}^+) \mathbf{Z}_{\text{exp}} ]^{-1} \mathbf{g}_n \}^{-1/2} \quad \text{Eq. 10}$$

onde,  $\mathbf{Z}_{\text{exp}}$  são os loadings de calibração (representam o comportamento dos constituintes calibrados), o vetor  $\mathbf{g}_n$  seleciona ou combina adequadamente os loadings de uma maneira que reflete especificamente o comportamento do analito de interesse. É igual ao vetor de coeficientes de regressão específicos do analito, definidos no espaço das variáveis latentes. O fator  $(\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{unx}}\mathbf{Z}_{\text{unx}}^+)$  é a manifestação matemática da vantagem de segunda ordem, pois  $\mathbf{Z}_{\text{unx}}$  é uma matriz de blocos construída a partir dos perfis extraídos dos componentes não-calibrados. O propósito do fator  $(\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{unx}}\mathbf{Z}_{\text{unx}}^+)$  é corrigir a matriz dos constituintes calibrados ( $\mathbf{Z}_{\text{exp}}$ ), para o efeito de sobreposição dos perfis com os componentes não-calibrados, ou potenciais agentes interferentes [105].

### 2.6.3.2. Sensibilidade analítica ( $\gamma$ )

A sensibilidade analítica foi proposta como a razão entre sensibilidade e ruído instrumental (**Equação 11**).

$$\gamma = \text{SEN}/\sigma_x \quad \text{Eq. 11}$$

A sensibilidade analítica tem unidades de (concentração)<sup>-1</sup>, é independente do sinal medido e pode ser empregado para comparar diferentes metodologias. A sensibilidade analítica é interpretada como o inverso da diferença de concentração mínima que pode ser observada ao longo do intervalo analítico linear, porque ( $\gamma = \sigma_y^{-1}$ ). Onde  $\sigma_x$  e  $\sigma_y$  são as variâncias nos sinais instrumentais (ruído instrumental) e nas concentrações de calibração, respectivamente [105]. De modo geral, ao estimar a sensibilidade, uma medida do nível de ruído instrumental permite calcular a sensibilidade analítica através da **Equação 11**.

### 2.6.3.3. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção é a menor concentração de analito, presente em uma amostra, que pode ser detectada de forma confiável (geralmente com 95% de confiança), porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Em outras palavras, é a menor quantidade do analito capaz de gerar sinal analítico, distinguível do ruído instrumental [105]. O valor de LOD pode ser estimado de acordo com a **Equação 12**. Onde,  $h_0$  é a influência das medidas do branco (*leverage* do branco).

$$\text{LOD} = 3,3 (\text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_y^2)^{1/2} \quad \text{Eq. 12}$$

O limite de quantificação é a menor concentração do analito, em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas [105]. O LOQ, por sua vez, é estimado de maneira semelhante ao do LOD, porém a razão sinal/ruído deve ser superior a 10:1 (**Equação 13**), o que garante um erro relativo máximo de 10% na predição.

$$\text{LOQ} = 10 (\text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \text{SEN}^{-2} \sigma_x^2 + h_0 \sigma_y^2)^{1/2} \quad \text{Eq. 13}$$

---

---

Capítulo 3.

**REVISÃO DA LITERATURA**

---

---

### 3. Revisão da literatura

Neste capítulo será apresentado ao leitor uma breve discussão acerca dos métodos disponíveis na literatura para determinar/quantificar ácido(s) orgânico(s) em sucos de frutas, onde o objetivo principal é situar o leitor quanto aos avanços que vem ocorrendo, ao longo dos anos, no tema central deste trabalho.

Em 1995, Sacconi e colaboradores desenvolveram um método para determinar os ácidos cítrico, málico e tartárico em sucos de frutas, utilizando cromatografia de troca iônica. Todas as amostras de sucos passaram por um processo de extração que antecedeu a análise por cromatografia. A corrida cromatográfica em gradiente teve duração de 30 min e o limite de quantificação para os três ácidos foi de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Segundo os autores, o método mostrou uma alta sensibilidade e precisão satisfatória [133].

Um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) foi desenvolvido por Guanghou Shui e Lai Peng Leongpara, em 2002, para a determinação simultânea de dez ácidos orgânicos (ácido tartárico, quinino, oxálico, málico, ascórbico, láctico, acético, cítrico, fumárico e gálico) e vinte e um compostos fenólicos em sucos de frutas. A eluição dos compostos foi isocrática e teve duração de 80 min por corrida, sendo a detecção realizada a 215 nm. Antes da injeção no cromatógrafo, os sucos de frutas foram centrifugados a 5000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . O LOD variou de 0,02 a  $12,50 \text{ mg L}^{-1}$  e a recuperação foi obtida na faixa de 85 % a 106 % [134].

Três anos depois (2005), Chinnici e colaboradores desenvolveram um método usando cromatografia de exclusão iônica para a determinação de nove ácidos orgânicos (ácido oxálico, cítrico, málico, quínico, galacturônico, ascórbico, dehidroascórbico, succínico e fumárico) e três açúcares (sacarose, glicose e frutose) em sucos de frutas. As amostras foram pré-tratadas utilizando um cartucho SAX (3 mL/500 mg) que foi condicionado preliminarmente com metanol (3 mL) e água redestilada (3 mL). Em seguida, a amostra (0,5 mL) foi ajustada para pH 9 com NaOH, foi carregada e lentamente eluída (0,5 mL/min) através do cartucho. A eluição dos compostos no cromatógrafo foi isocrática e teve duração de 20 min por corrida, sendo a detecção realizada a 210 nm. O LOD variou de 0,5 a  $7,3 \text{ mg L}^{-1}$  e a recuperação foi obtida na faixa de 94,2 % a 101,2 %. Apesar das condições cromatográficas otimizadas, a quantificação de ácidos ascórbico e dehidroascórbico foi afetada, devido a degradação da coluna ao longo do tempo. Contudo,

segundo os autores, o método mostrou boa precisão e linearidade para todos os analitos [135].

No ano de 2007, Apichai Santalad e seus colaboradores, publicaram o desenvolvimento de um método utilizando a técnica de eletroforese capilar com detecção de arranjo fotodiodo para determinação simultânea de onze ácidos orgânicos (acético, láctico, succínico, málico, tartárico, oxálico, cítrico, malônico, subérico, glutárico e aconítico) em bebidas (incluindo sucos de frutas). Antes da análise por eletroforese capilar, as soluções padrão e amostras precisaram ser derivatizadas, realizando a mistura de 100 ml do estoque, 150 mL do 2-nitrofenilhidrazina (2-NPH) e 200 mL de Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC HCl), aquecidas a 70 °C durante 10 min. Após adição de 100 µL de KOH (100 g L<sup>-1</sup>), a mistura foi novamente aquecida a 70 °C durante 10 min e depois arrefecida, filtrada e enfim analisada por eletroforese. A separação de onze ácidos orgânicos foi alcançada em 12 min. Os limites de detecção variaram de 2 a 10 mg L<sup>-1</sup> e a recuperação foi de 81,7% a 89,4% [6].

Em 2009, Hasim Kelebek e colaboradores, desenvolveram um método de HPLC-DAD para identificar e quantificar três ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico e ascórbico) e três açúcares (sacarose, glicose e frutose) em sucos de laranja. As amostras de sucos foram centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min, o sobrenadante foi filtrado por filtros de membrana de 0,45 µm e mantidos à temperatura de -18 °C até a análise cromatográfica. A eluição dos compostos no cromatógrafo foi isocrática e teve duração de 50 min por corrida, sendo a detecção realizada a 210 nm. Os autores não comentam os LOD [136].

Beatriz Jurado-Sánchez, Evaristo Ballesteros e Mercedes Gallego, desenvolveram em 2011, um método baseado em extração em fase sólida contínua e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC - MS) para a determinação de vinte e nove ácidos orgânicos (dentre eles, estão os ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico) em alimentos e bebidas (incluindo sucos de frutas). A corrida cromatográfica teve duração de 30 min, o LOD foi obtido entre 0,1 e 2,0 µg Kg<sup>-1</sup> e as taxas de recuperações dos ácidos orgânicos variaram de 93% a 98% [7].

Rodrigo Scherer e colaboradores, em 2012, desenvolveram e validaram um método para determinação simultânea dos ácidos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em sucos de frutas utilizando HPLC-DAD, com fase reversa (coluna C18) e eluição isocrática com 10 min de duração. Antes da injeção no HPLC, uma alíquota (5 mL) da amostra foi adicionada à 40 mL de fase móvel (tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e filtrada através de uma membrana

de 0,45  $\mu\text{m}$ . A detecção foi realizada em 210 nm para os ácidos tartárico, málico e cítrico e 250 nm para o ácido ascórbico. O LOD foi obtido entre 0,03 e 3,31  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e as taxas de recuperação variaram de 82% a 110%, para dois níveis de concentração [137].

No ano seguinte (2013), Raphael F. do Nascimento e colaboradores, desenvolveram um método baseado na análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica para determinação do ácido cítrico em sucos de frutas, com base na sua oxidação em superfície de eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II). Antes da análise, alíquotas de 20 mL das amostras foram agitadas por 30 min em um recipiente de vidro contendo cerca de 8 g de fatias finas do mesocarpo de pepino (*Cucumis sativus*) e, após a limpeza, foram filtradas com um filtro de seringa com membranas porosas de 0,45  $\mu\text{m}$ . Em seguida, as amostras foram devidamente diluídas no eletrólito de suporte e analisadas. O limite de detecção estimado foi de 0,117  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os autores confrontaram os resultados obtidos com o método de referência e afirmaram não ter havido diferença estatisticamente significativa em um nível de 95% de confiança [18].

Em 2014, foi desenvolvido por Feng-Jie Liu e colaboradores, um método para quantificar cinco ácidos orgânicos (cítrico, salicílico, ascórbico, benzoico e sórbico) em sucos de frutas utilizando eletroforese capilar, com uma nanopartícula de sílica funcionalizada com o novo diamino e diâmetro de 110 nm, como fase pseudo-estacionária. Todas as amostras de sucos de frutas foram diluídas em tampão de fosfato, filtradas através de membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  e finalmente injetadas. De acordo com os autores, as condições experimentais permitiram a separação dos cinco ácidos orgânicos em 5 min e os limites de detecção obtidos foram de 0,15 a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  [8].

No ano de 2015, um método para a determinação de ácidos orgânicos (cítrico, málico, tartárico, fumárico e isocítrico) em sucos de frutas por eletroforese capilar com detecção UV-Vis foi desenvolvido por María Navarro-Pascual-Ahuir e colaboradores. As amostras de sucos de frutas, foram previamente refrigeradas a 5 °C, centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi diluído 1:5 (v/v) com água deionizada, e para fins de quantificação, o padrão interno (150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) também foi adicionado. Os ácidos orgânicos foram quantificados em 12 min usando um capilar de célula de bolha de sílica fundida revestida com álcool vinílico. O método obteve limites de detecção entre 0,1 e 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [138].

Por último, em 2018, Goosen e colaboradores desenvolveram um método para determinar fenóis, ácidos orgânicos (acético, cítrico, láctico, málico, pirúvico, succínico e

tartárico) e minerais no suco da fruta *sour plum*, uma bebida indígena africana, utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS). O suco foi obtido dos frutos, separando a pele e a porção carnuda do fruto das sementes através de meios físicos, homogeneizando a polpa e a casca do fruto em um processador de alimentos e filtrando a polpa resultante através de um pano de algodão. O suco filtrado obtido foi reunido e misturado para obter uma amostra homogênea e, em seguida, congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise. Os ácidos orgânicos foram determinados por derivatização enzimática seguida de detecção e quantificação espectrofotométrica. A análise para cada ácido orgânico foi realizada usando um kit de análise específico. Os autores não citam os limites de detecção, apenas citam a quantidade encontrada de cada ácido no suco, sendo: ácido cítrico ( $8,05\text{ g }100\text{ mL}^{-1}$ ), ácido tartárico ( $0,18\text{ g }100\text{ mL}^{-1}$ ), ácido málico ( $0,16\text{ g }100\text{ mL}^{-1}$ ) e ácido láctico ( $0,13\text{ g }100\text{ mL}^{-1}$ ). Os ácidos acético, pirúvico e succínico estavam abaixo dos níveis de detecção [139].

Diante do exposto, acredita-se que com o uso da calibração de ordem superior, com a vantagem de segunda ordem, o tempo de análise para a quantificação de cinco dos principais ácidos orgânicos presentes nos sucos de frutas pode ser reduzido, sem comprometer a exatidão da análise, pois os interferentes são resolvidos com a modelagem dos dados pelos algoritmos de calibração de segunda ordem, tais como o MCR-ALS e U-PLS/RBL.

---

Capítulo 4.

**EXPERIMENTAL**

---

## 4. Experimental

### 4.1. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados no preparo da solução do eletrólito suporte (tampão acetato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , ajustando os valores de pH para 3,5; 4,5 e 6,5) foram, ácido acético e acetato de sódio obtidos da J. T. Baker e da Sigma–Aldrich, respectivamente, preparado com água deionizada (Milli-Q Plus  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ). Para o preparo do eletrodo utilizou-se ftalocianina de cobalto (II) (97%), pó de grafite ( $\leq 20 \mu\text{m}$ ) e óleo mineral adquiridos da Sigma–Aldrich. A acetona (99,5%) foi obtida da Quemis. Padrões de alta pureza dos ácidos cítrico (99%), láctico (95%), málico (95%), tartárico (99%) e succínico (99%) foram adquiridos da VETEC. Soluções estoques dos ácidos foram preparadas na concentração de  $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$  no eletrólito suporte. Diluições subsequentes foram utilizadas para obter menores concentrações dos analitos na célula eletroquímica.

### 4.2. Instrumentação

Todos os ensaios voltamétricos foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato Eco Chemie/Autolab (Modelo PGSTAT302N) (Fig. 10) acoplado a um computador controlado pelo software NOVA versão 1.10.4. As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando uma célula convencional de 10 mL com um sistema de três eletrodos, sendo: eletrodo de referência, Ag/AgCl ( $\text{KCl}, 3 \text{ mol L}^{-1}$ ); eletrodo auxiliar, fio de platina e um eletrodo de pasta de carbono (modificado e não modificado), como eletrodo de trabalho.



**Figura 10.** Imagem do potenciostato/galvanostato Eco Chemie/Autolab (Modelo PGSTAT302N).

### 4.3. Preparação do eletrodo de pasta de carbono

As pastas de carbono (modificadas e não modificadas) foram preparadas como descrito na literatura [16, 18]. A pasta de carbono (não modificada) foi preparada por homogeneização de 60% de pó de grafite e 40% de óleo mineral. A pasta de carbono/ftalocianina (modificada), por sua vez, foi preparada por homogeneização de 57% de pó de carbono e 3% de CoPC. Em seguida, a mistura foi dispersada em acetona e colocada sob agitação até à completa evaporação do solvente. Posteriormente, adicionou-se 40% de óleo mineral à mistura (carbono/ftalocianina). Os eletrodos foram construídos por inserção destas pastas dentro de um tubo de vidro de diâmetro interno de 3 mm contendo um fio de cobre (contato fixo) para contato elétrico, como ilustrado na **Fig. 11**. Antes das medidas, a superfície do eletrodo foi sempre polida com papel manteiga.



**Figura 11.** Ilustração do eletrodo de pasta de carbono (modificado ou não modificado).

### 4.4. Procedimento eletroquímico

Para a obtenção dos dados, foi utilizada a voltametria de onda quadrada. Antes de cada medida, o CoPC-CPE foi submetido a um polimento mecânico em um papel manteiga realizando-se movimentos em forma circular. Em seguida foi submetido a um tratamento eletroquímico proposto por Lourenço [16] para assegurar um desempenho satisfatório do eletrodo, que se baseia em 10 varreduras sucessivas no eletrólito suporte.

As medidas SWV foram baseadas na literatura em que, após a adição de solução padrão ou amostra na célula eletroquímica, o sistema foi deixado durante 20s sob agitação em circuito aberto, seguido de um tempo de equilíbrio de 5s. Os parâmetros utilizados foram amplitude de pulso de 20 mV, velocidade de varredura de  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ , incremento de potencial de 5 mV e uma janela de potencial de 0,8 a 1,25 V [16, 18]. Para obter dados voltamétricos de segunda ordem a frequência foi alterada de 5 a 110 Hz (com incremento de 15 Hz), gerando uma matriz 8x90 (frequência x potencial) para cada solução padrão e amostra. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

#### 4.5. Conjuntos de calibração

Quatro conjuntos de calibração foram construídos, sendo um para cada analito. E cada conjunto continha apenas soluções padrões individuais de AC, AL, AM e AT, com dez níveis de concentrações variando de 10 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparadas em tampão acetato (pH 4,5) por diluição direta na célula eletroquímica.

#### 4.6. Conjunto de validação

Um conjunto de validação contendo vinte e cinco misturas de constituintes calibrados (analitos: CA, LA, MA e TA) e um constituinte não calibrado (ácido succínico - AS) foi preparado de acordo com um planejamento Taguchi (**Tab. 2**) com cinco níveis (concentrações) e cinco fatores (ácidos).

O AS foi adicionado como constituinte não calibrado no conjunto de validação para simular um possível cenário de interferência normalmente presente nas amostras comerciais e com isso avaliar se os modelos de calibração são capazes de quantificar os constituintes calibrados na presença de um constituinte não calibrado, explorando a vantagem de segunda ordem.

O planejamento Taguchi foi escolhido porque usa matrizes ortogonais de conjuntos especiais que permitem encontrar os melhores valores dos fatores controláveis com menor sensibilidade às variações nos fatores incontroláveis com um número reduzido de experimentos [140 – 142].

**Tabela 2.** Valores de concentração das misturas do conjunto de validação baseado no planejamento Taguchi.

Misturas	$(\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1})$				
	AT	AC	AS	AL	AM
1	15	15	15	15	15
2	15	35	35	35	35
3	15	55	55	55	55
4	15	75	75	75	75
5	15	95	95	95	95
6	35	15	35	55	75
7	35	35	55	75	95
8	35	55	75	95	15
9	35	75	95	15	35
10	35	95	15	35	55
11	55	15	55	95	35
12	55	35	75	15	55
13	55	55	95	35	75
14	55	75	15	55	95
15	55	95	35	75	15
16	75	15	75	35	95
17	75	35	95	55	15
18	75	55	15	75	35
19	75	75	35	95	55
20	75	95	55	15	75
21	95	15	95	75	55
22	95	35	15	95	75
23	95	55	35	15	95
24	95	75	55	35	15
25	95	95	75	55	35

#### 4.7. Amostras de sucos de frutas

Nove amostras de sucos de frutas (limão + laranja, caju, limão + laranja, goiaba, laranja, maracujá, cajá, acerola e açai + guaraná) previamente analisadas pelo método de

referência (AOAC, 1990) foram fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco - Base Física II - Laboratório de Análises Físico-Químicas de Bebidas e Vinagres (LABV/SFA/LANAGRO-PE).

Os seguintes volumes de cada suco de fruta foram adicionados a uma célula eletroquímica contendo 20 mL de tampão acetato (pH 4,5) e em seguida seus voltamogramas SW foram registrados: para os sucos de caju, maracujá, cajá e acerola 10  $\mu$ L foram adicionados; para os sucos de limão + laranja, laranja e goiaba 50  $\mu$ L foram adicionados e para o suco de açaí + guaraná 100  $\mu$ L foram adicionados.

Os diferentes volumes dos sucos foram escolhidos para garantir que o sinal voltamétrico máximo de cada amostra estivesse dentro da faixa de trabalho linear de AC, AL, AM e AT. Estas amostras foram analisadas sem qualquer tratamento prévio.

#### 4.8. Método de referência

O método 974.18 da AOAC foi usado como método de referência [14]. Ele é baseado na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa acoplada à detecção UV-Vis e requer as seguintes etapas: extração dos ácidos orgânicos com acetato de etila, decantação com sulfato de sódio anidro (duração de 30 min), evaporação para um volume < 25 mL em banho de vapor sob um fluxo suave de nitrogênio; arrefecimento até à temperatura ambiente, ajustando o volume para 25 mL com acetato de etilo, filtração através de um filtro de seringa (0,45  $\mu$ m) e finalmente a injeção da amostra no HPLC contendo duas colunas C18 posicionadas em série.

#### 4.9. Software e análise de dados

Todos os tratamentos quimiométricos foram realizados em um ambiente MATLAB 2010.

Para a correção de linha de base das curvas voltamétricas, empregou-se a rotina da Regressão Spline dos Mínimos Quadrados Assimétricos (AsLSSR) [127]. E os parâmetros utilizados foram o do default: onde a porcentagem de assimetria ( $p$ ) foi de 0,001 e a porcentagem de suavidade ( $\lambda$ ) foi de  $1 \times 10^7$  (ou  $1e7$ ). Quanto maior o valor do  $\lambda$ , mais suave será a curva resultante. Similarmente, maiores valores de  $p$ , se ajustam melhor à forma curva.

Em seguida, os sinais foram alinhados usando o Alinhamento por Correção Otimizada (COW) [129] com os seguintes parâmetros: O seguimento (segment) mínimo

e máximo foi, respectivamente, 10 e 15, e a folga (slack) mínima e máxima foi, respectivamente, 5 e 8. Para as outras opções foram utilizados o default [0 3 50 0,15] que representam, respectivamente, não plotar o gráfico resultante (trigger plot and progress text); começa a partir de três máximas na pesquisa da grade (number of optimizations from grid maxima); no máximo 50 etapas (maximum number of optimization steps) e desviar no máximo 15% do centro no alinhamento (Fraction of maximal deviation from center in COW alignment).

Por fim, utilizou-se a caixa de ferramentas MVC2 (Fig. 12) implementada por Olivieri e coautores [143] para construir os modelos U-PLS/RBL e MCR-ALS.

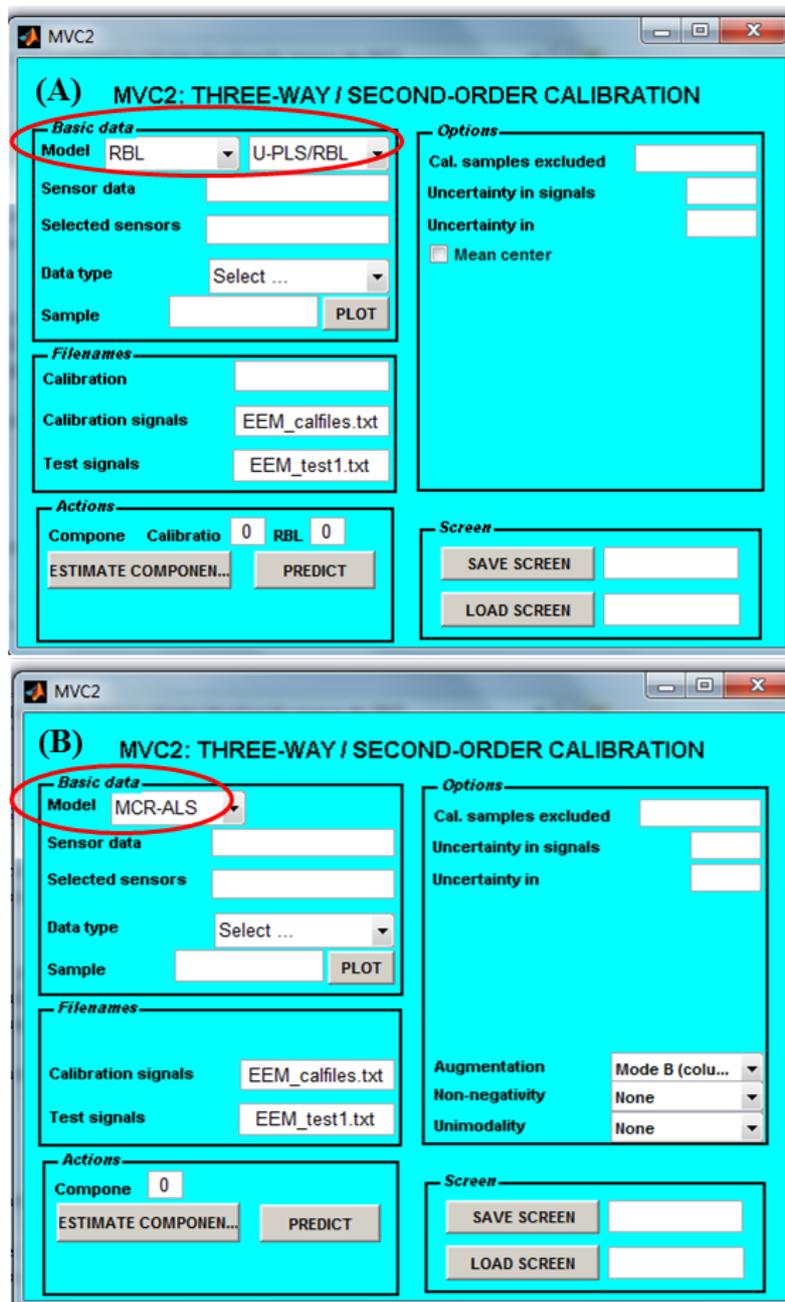


Figura 12. Interface gráfica MVC2.

---

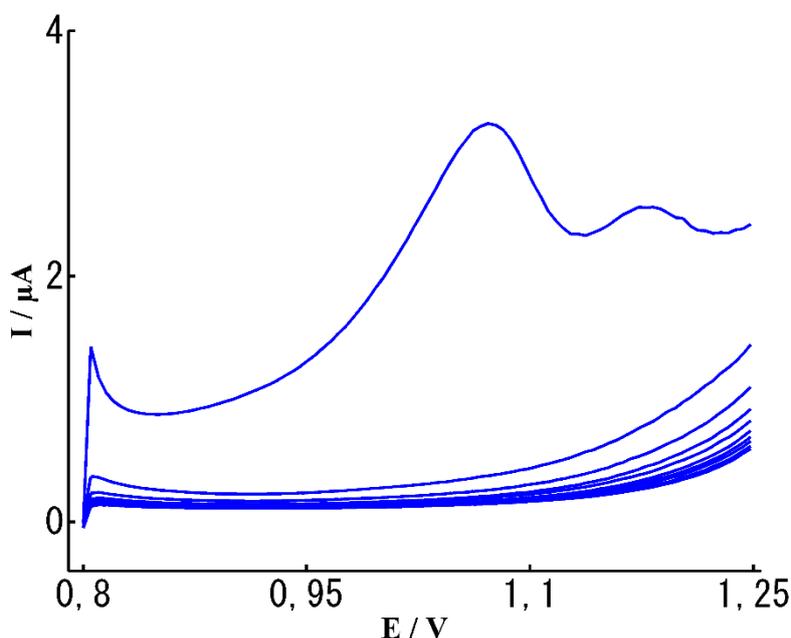
Capítulo 5.  
**RESULTADOS E  
DISCUSSÃO**

---

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. CoPC-CPE: Comportamento eletroquímico

Ao estudar o comportamento eletroquímico do CoPC-CPE, na faixa de potencial de trabalho (0,8 a 1,25 V), nota-se a existência de dois processos eletroquímicos (**Fig. 13**). De acordo com a literatura, o sinal em 1,10 V pode ser atribuído ao processo de oxidação Co(II)PC/Co(III)PC e o sinal em 1,15 V pode ser atribuído à oxidação do anel da ftalocianina [16, 71, 95].

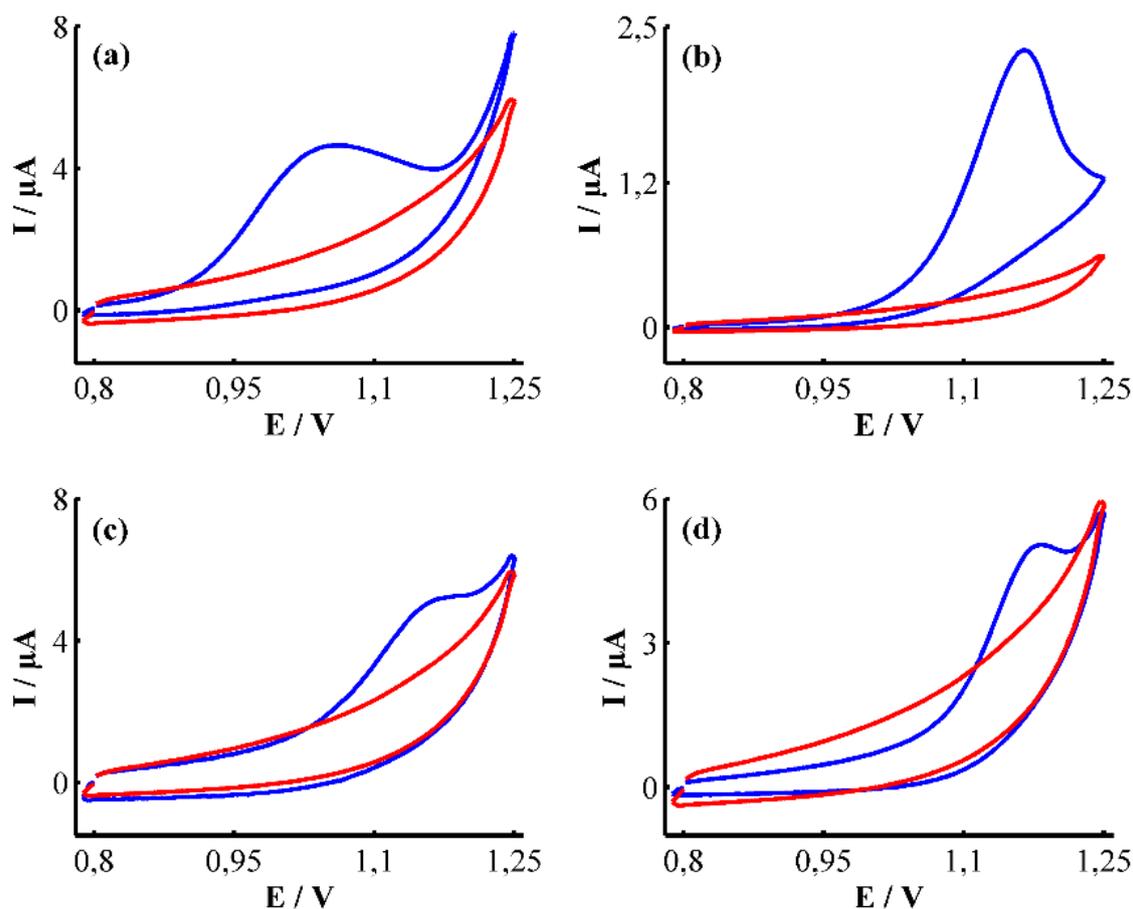


**Figura 13.** Comportamento eletroquímico do CoPC-CPE em SWV sucessivos na janela de potencial 0,8 a 1,25 V em tampão acetato (pH = 4,5),  $f = 20$  Hz, amplitude de pulso = 20 mV e  $\Delta E = 5$  mV.

Como pode ser observado, os dois sinais desaparecem completamente ao aplicar o tratamento eletroquímico proposto por Lourenço e colaboradores [16], que consiste em dez varreduras SWV sucessivas.

### 5.2. Resposta electrocatalítica dos ácidos orgânicos

Os estudos realizados acerca da eletroatividade dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, láctico e tartárico) em eletrodos de pasta de carbono sem modificação não apresentam sinal de oxidação na faixa de potencial estudada. Entretanto, esses mesmos ácidos orgânicos são eletroativos em eletrodos de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II), como mostrado na **Fig. 14**.

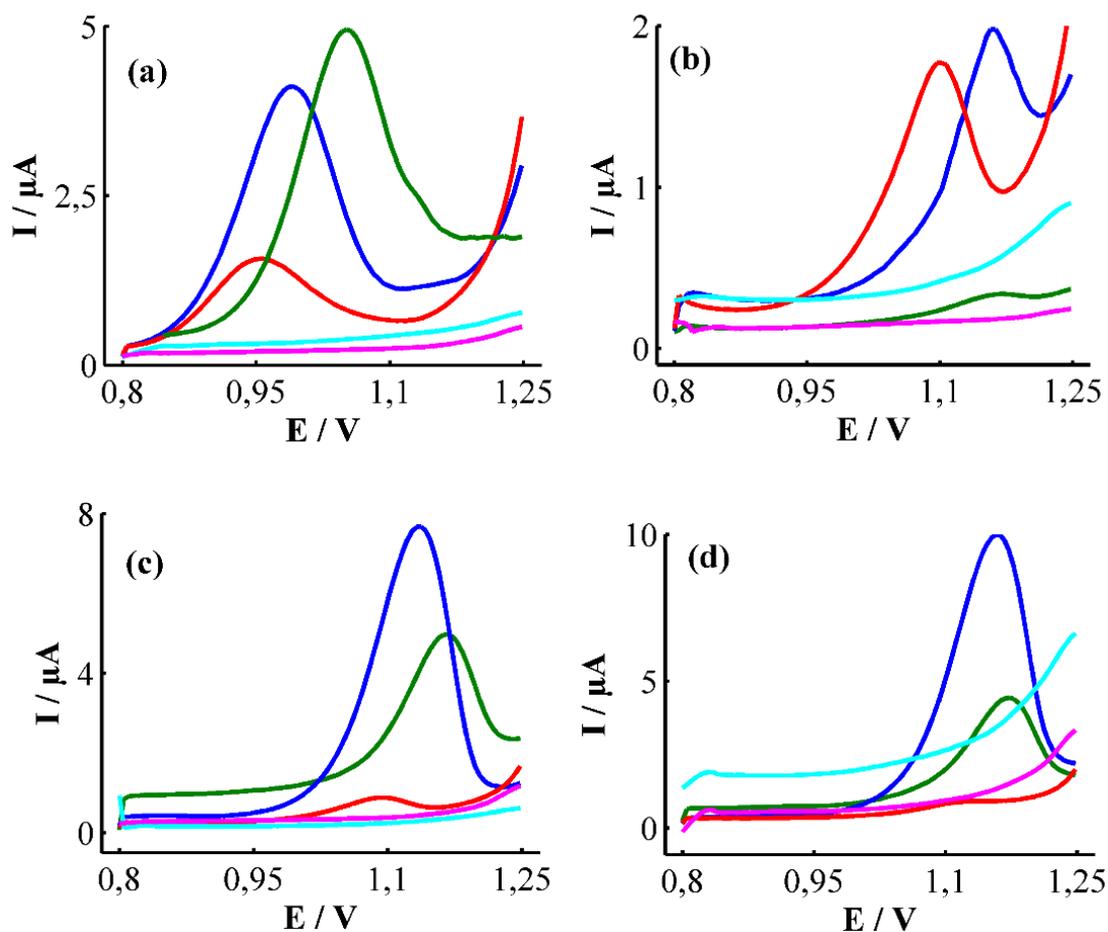


**Figura 14.** CV para CPE (—) e CoPC-CPE (—) na presença de  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos AO em tampão acetato (pH 4,5),  $\Delta E = 2 \text{ mV}$ ,  $\nu = 100 \text{ mV}$  e janela de potencial de 0,8 a 1,25 V. (a) ácido cítrico; (b) ácido láctico; (c) ácido málico; (d) ácido tartárico.

Os estudos no CoPC-CPE mostram uma onda voltamétrica bem definida por volta de 0,96 V, 1,14 V, 1,13 V e 1,15 V para os ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico, respectivamente. Esse comportamento faz com que a CoPC seja um importante mediador de elétrons para a eletrocatalise dos ácidos orgânicos de baixa massa molecular estudados no presente trabalho, abrindo possibilidades para o desenvolvimento de métodos voltamétricos para a sua determinação.

### 5.3. Influência do pH sobre a resposta voltamétrica dos ácidos orgânicos

Os voltamogramas de onda quadrada dos ácidos orgânicos foram todos registrados em tampão acetato e a influência do pH desses ácidos foi estudada na faixa de 2,5 a 8,5, como mostrado na **Fig. 15**.



**Figura 15.** Estudo de pH. SWV para o CoPC–CPE na presença de  $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$  dos AO em tampão acetato, pH 2,5 (—), pH 3,5 (—), pH 4,5 (—), pH 6,5 (—) e pH 8,5 (—).  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $A = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 5 \text{ mV}$  e janela de potencial de 0,8 a 1,25 V. (a) ácido cítrico; (b) ácido láctico; (c) ácido málico; (d) ácido tartárico.

Vale salientar que a influência do pH foi investigada predominantemente em meio ácido, tendo em vista que os estudos encontrados na literatura mostram que nessa faixa ( $\text{pH} \cong 3$  a 7) ocorre um aumento significativo na corrente de pico dos ácidos [16, 18].

Na **Fig. 15**, observa-se que o potencial do pico ( $E_P$ ) dos ácidos orgânicos é fortemente influenciado pela variação do pH do meio, visto que em todos os casos, à medida que o pH aumenta ocorre um deslocamento do  $E_P$  para potenciais menos positivos. Este fenômeno pode estar relacionado com a desprotonação dos ácidos orgânicos de acordo com os seus valores de  $\text{pK}_a$ : ácido cítrico (3,14; 4,77; 6,39), láctico (3,86), málico (3,40; 5,11) e tartárico (3,22; 4,82) [144].

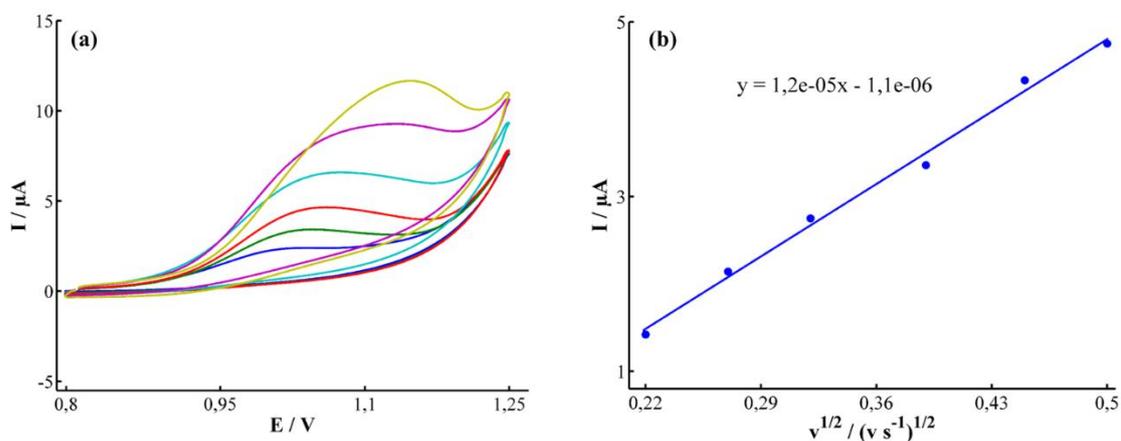
Paralelamente, verifica-se que nos pHs 2,5 e 8,5 não há resposta eletrocatalítica para nenhum dos AO. Entretanto, observa-se um aumento significativo na sensibilidade do sinal em  $\text{pH} = 4,5$  para os ácidos málico e tartárico. Já os ácidos cítrico e láctico apresentaram uma maior corrente de pico nos pHs 3,5 e 6,5, respectivamente. No entanto,

também houve uma boa resposta eletroquímica no pH = 4,5 para esses ácidos e, assim, o tampão acetato (pH 4,5) foi escolhido por representar uma ótima condição de compromisso com a sensibilidade para todos os quatro ácidos orgânicos estudados.

#### 5.4. Influência da velocidade de varredura sobre a resposta voltamétrica dos ácidos orgânicos

Utilizando soluções padrões de  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em tampão acetato (pH 4,5), dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico, estudos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 150, 200 e  $250 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) foram realizados para entender a natureza do transporte de massa do corpo da solução para a superfície do CPE-CoPC e o grau de reversibilidade da reação redox de cada analito (Fig. 16 - 19). Não houve polimento da superfície do eletrodo entre as medidas voltamétricas durante a realização do experimento.

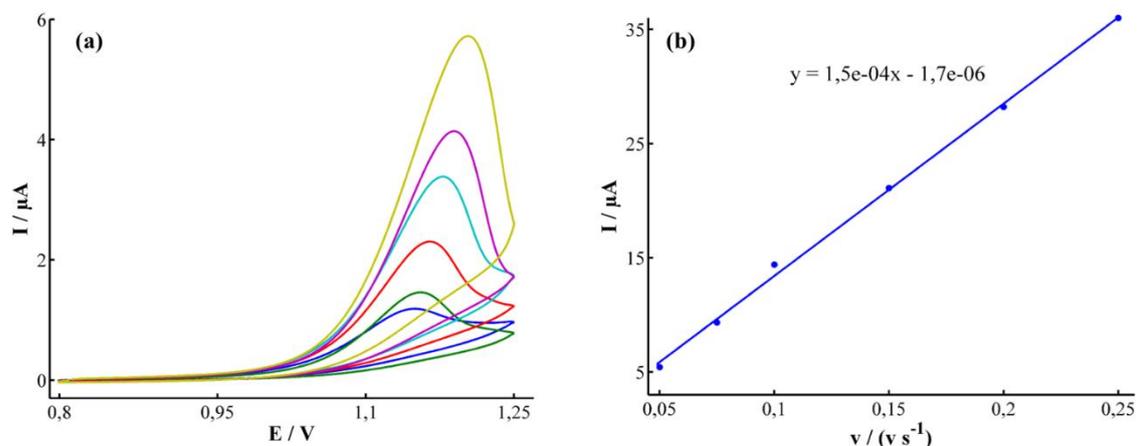
Como pode ser observado nas Figs. 16a, 17a, 18a e 19a, há uma dependência dos potenciais de pico com a velocidade de varredura, de modo que, à medida que a velocidade de varredura aumenta ocorre um pequeno deslocamento para potenciais mais positivos. Esse comportamento confirma a irreversibilidade no processo de oxidação do AC, AL, AM e AT, respectivamente [145].



**Figura 16.** Estudo de velocidade para o ácido cítrico ( $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em tampão acetato (pH 4,5). (a) Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 150, 200 e  $250 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ); (b) Relação de  $I_p$  vs.  $v^{1/2} (\text{v s}^{-1})^{1/2}$ .

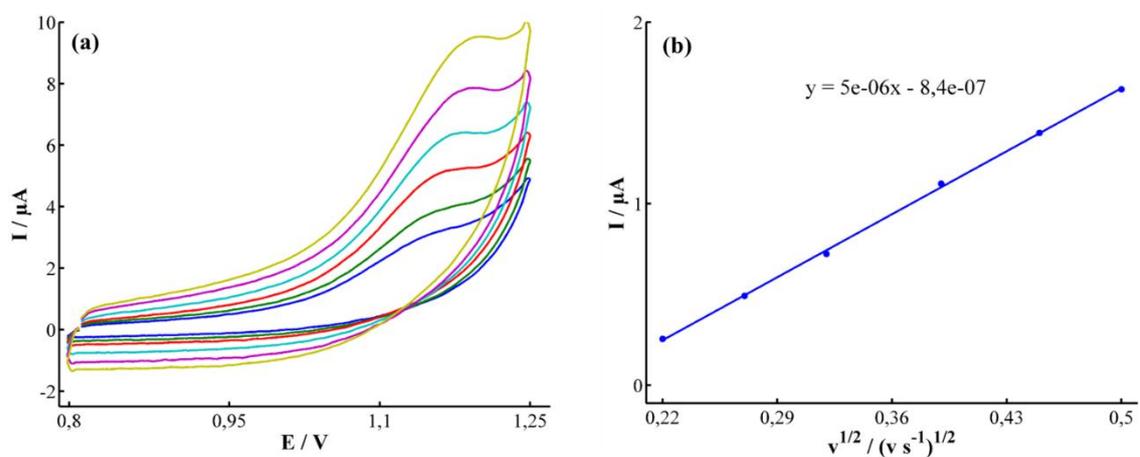
Na Fig. 16b nota-se uma relação linear entre a corrente de pico ( $I_p$ ) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ). Segundo a literatura, esse comportamento indica que o processo do transporte de massa do AC é controlado por difusão [146]. Além

disso, esse resultado corrobora com estudos já publicados na literatura para este analito, utilizando este mesmo sensor [18].



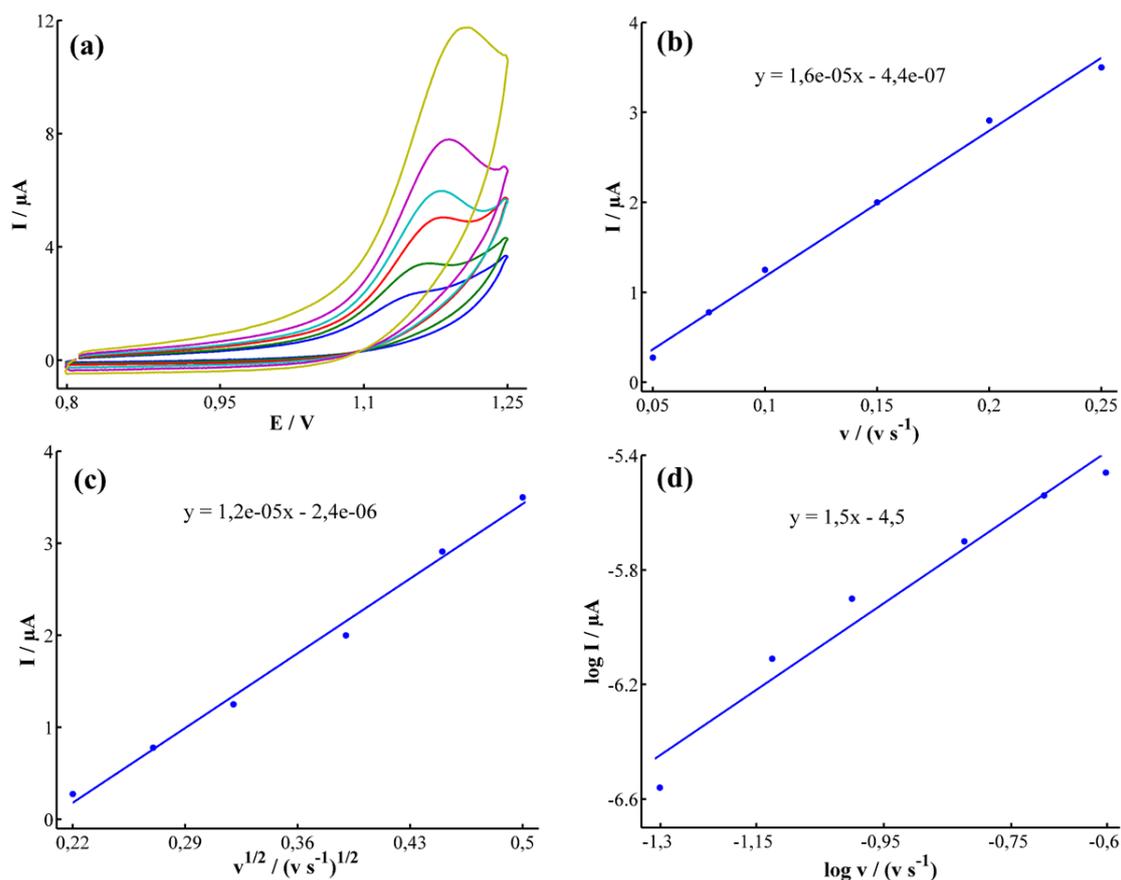
**Figura 17.** Estudo de velocidade para o ácido láctico ( $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em tampão acetato (pH 4,5). (a) Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 150, 200 e 250  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ); (b) Relação de  $I_p$  vs.  $v$  ( $\text{v s}^{-1}$ ).

Na **Fig. 17b** nota-se uma relação linear entre a corrente de pico ( $I_p$ ) *versus* a velocidade de varredura ( $v$ ), segundo a literatura, esse comportamento demonstra que o processo do transporte de massa do AL é controlado por adsorção [146].



**Figura 18.** Estudo de velocidade para o ácido málico ( $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), em tampão acetato (pH 4,5). (a) Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 150, 200 e 250  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ); (b) Relação de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  ( $\text{v s}^{-1}$ )<sup>1/2</sup>.

Na **Fig. 18b** nota-se uma relação linear entre a corrente de pico ( $I_p$ ) *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ), segundo a literatura, esse comportamento indica que o processo do transporte de massa do AM é controlado por difusão [146].



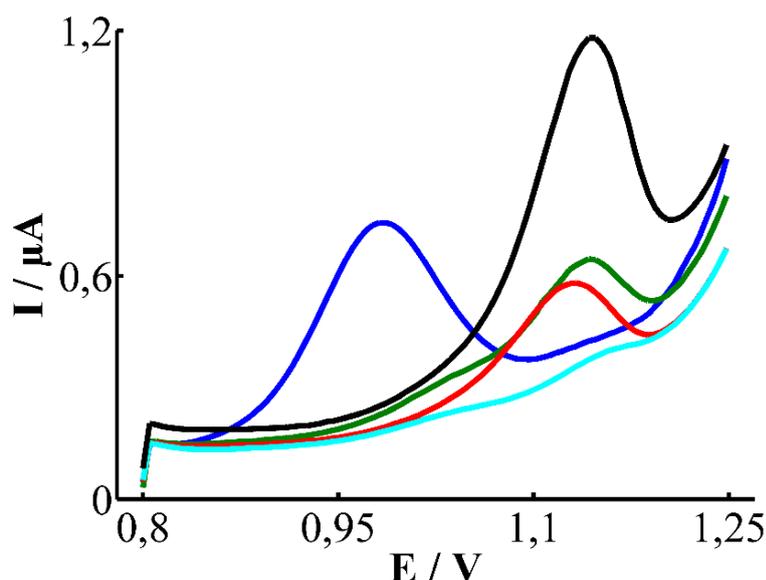
**Figura 19.** Estudo de velocidade para o ácido tartárico (150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em tampão acetato (pH 4,5). (a) Voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (50, 75, 100, 150, 200 e 250  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ); (b) Relação de  $I_p$  vs.  $v$  ( $\text{v s}^{-1}$ ); (c) Relação de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  ( $\text{v s}^{-1})^{1/2}$ ; e (d) Relação de  $\log$  de  $I_p$  vs.  $\log v$  ( $\text{v s}^{-1}$ ).

Na **Fig. 19b** nota-se uma relação linear entre a corrente de pico ( $I_p$ ) *versus* a velocidade de varredura ( $v$ ), indicando que o processo do transporte de massa do AT é controlado por adsorção. Em contrapartida, a **Fig. 19c**, mostram que também há uma relação linear entre a corrente de pico ( $I_p$ ) *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ), demonstrando que o processo de transporte para o analito é controlado por difusão.

Devido à divergência entre os dois primeiros diagnósticos, um gráfico da relação entre o  $\log I$  vs.  $\log v$  (**Fig. 19d**) foi obtido para AT. De acordo com a literatura, quando o coeficiente angular da relação linear entre o  $\log I$  vs.  $\log v$  for próximo a 1, o processo é controlado por adsorção e quando o coeficiente angular for próximo a 0,5 o processo é controlado por difusão [145, 146]. Como o coeficiente angular para o ácido tartárico foi 1,5 pode-se concluir que o processo do transporte de massa é governado por adsorção. Ou ainda, segundo Agyeman, o processo para a reação redox do AT é governado por difusão e adsorção, sendo este último o majoritário [147].

### 5.5. Comportamento voltamétrico dos ácidos orgânicos no CoPC–CPE

Os ácidos cítrico, láctico, málico, tartárico (constituintes calibrados) e succínico (constituintes não calibrados) estão presentes em uma grande variedade de matrizes importantes como sucos, frutas e vinhos. Assim, realizou-se um estudo para avaliar o comportamento voltamétrico desses ácidos no CoPC-CPE, como mostrado na **Fig. 20**.



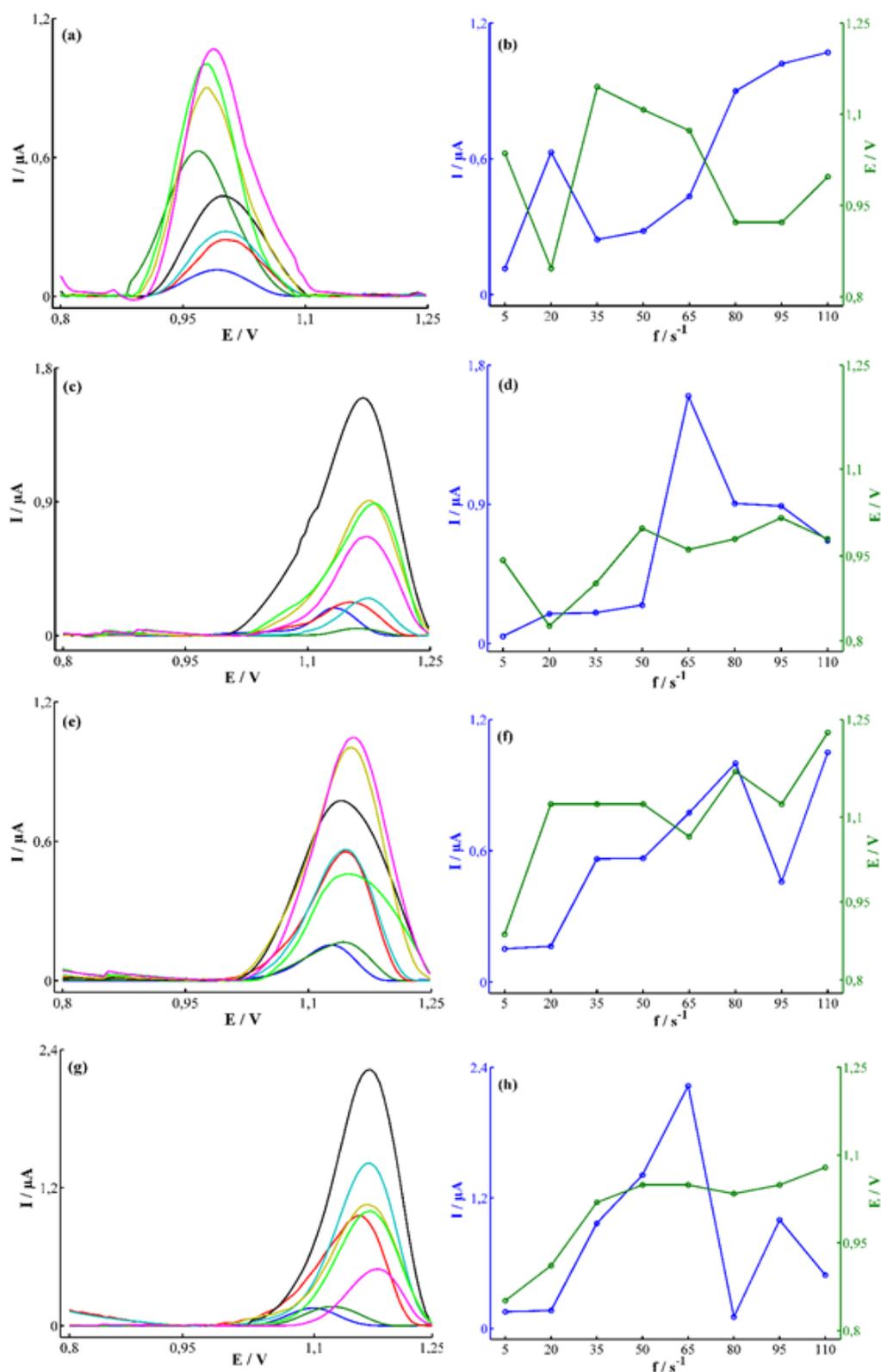
**Figura 20.** Estudo de interferentes. SWV para o CoPC–CPE na presença de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AC (—), AL (—), AM (—), AT (—) e AS (—) em tampão acetato (pH 4,5),  $f = 20 \text{ Hz}$ ,  $A = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 5 \text{ mV}$  e janela de potencial de 0,8 a 1,25.

Pode-se ver claramente na **Fig. 20** que esses ácidos apresentam resposta electrocatalítica no CoPC-CPE em potenciais muito próximos, apresentando um alto grau de sobreposição entre eles. Tal comportamento representa uma limitação do sensor, por exigir uma separação prévia destes ácidos antes de sua determinação analítica. Contudo, a baixa seletividade do CoPC-CPE abre uma importante perspectiva de aplicação com detector electroquímico para determinação simultânea destes ácidos em matrizes complexas, empregando técnicas quimiométricas capazes de identificar o(s) analito(s) na presença de interferências, como o AS (constituente não calibrado).

### 5.6. Influência da frequência sobre a resposta voltamétrica dos ácidos orgânicos

A frequência é um dos mais importantes parâmetros da SWV, pois ela influencia diretamente na intensidade dos sinais e, conseqüentemente, na sensibilidade do método. Além disso, o aumento da frequência, faz com que ocorra o deslocamento dos potenciais

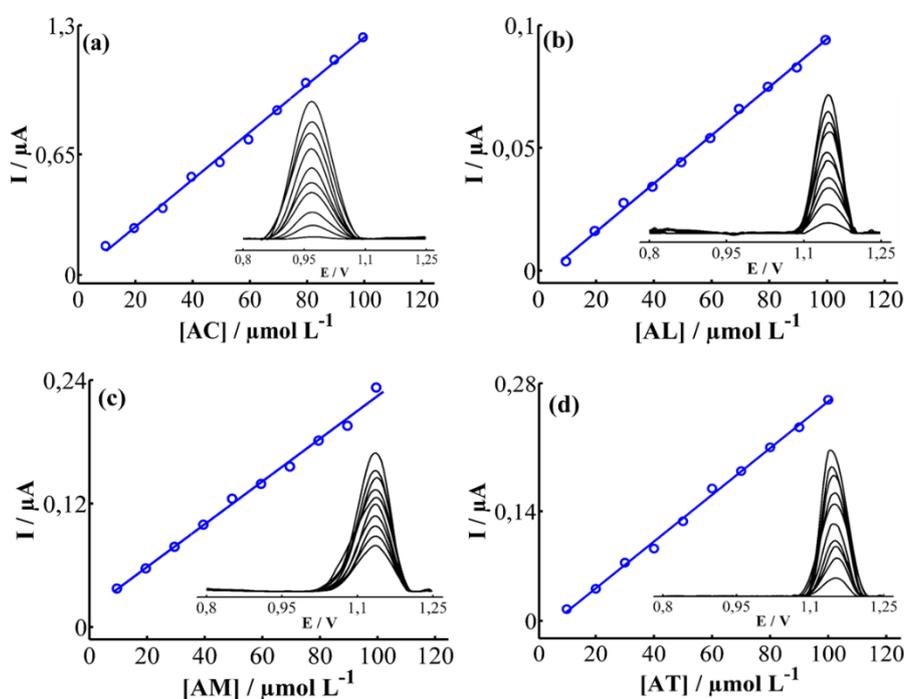
de pico [77, 148]. Portanto, a influência da frequência na resposta voltamétrica dos ácidos orgânicos, foi investigada por SWV na faixa de 5 a 110 Hz, como mostrado na **Fig. 21**, onde observa-se que a intensidade da corrente de pico e o deslocamento dos potenciais de pico dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico são influenciados de maneira diferente pelo aumento da frequência. Devido a esse comportamento causado pela influência da frequência nas respostas voltamétricas dos ácidos, os conjuntos de dados eletroquímicos de segunda ordem foram obtidos por meio da variação nos valores da frequência.



**Figura 21.** Estudo da frequência. SWV com linha de base corrigida para o CoPC-CPE na presença de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos AO em tampão acetato (pH 4,5).  $f = 5 \text{ Hz}$  (—),  $f = 20 \text{ Hz}$  (—),  $f = 35 \text{ Hz}$  (—),  $f = 50 \text{ Hz}$  (—),  $f = 65 \text{ Hz}$  (—),  $f = 80 \text{ Hz}$  (—),  $f = 95 \text{ Hz}$  (—),  $f = 110 \text{ Hz}$  (—),  $A = 20 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 5 \text{ mV}$  e janela de potencial de 0,8 a 1,25 V. (a) ácido cítrico; (c) ácido láctico; (e) ácido málico; (g) ácido tartárico. A intensidade de corrente (—) e potencial de pico (—) em função da variação da frequência para (b) ácido cítrico; (d) ácido láctico; (f) ácido málico; (h) ácido tartárico.

## 5.7. Calibração univariada

Estudos de calibração univariada foram realizados para verificar o intervalo de concentração linear de cada ácido isoladamente. Para alcançar esse objetivo, curvas de calibração foram construídas e ajustadas por regressão padrão de mínimos quadrados. A **Fig. 22** mostra as curvas analíticas e as respectivas respostas voltamétricas para cada analito nas condições experimentais otimizadas no CoPC–CPE, onde é possível observar que todos os ácidos mostraram uma excelente relação linear entre a corrente de pico e concentração no intervalo de 10 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os coeficientes de correlação (angular e linear) estão disponíveis na **Tab. 3**.



**Figura 22.** Curvas analíticas dos ácidos orgânicos no CoPC-CPE. Adições sucessivas de (a) ácido cítrico, (b) ácido láctico, (c) ácido málico e (d) ácido tartárico em tampão acetato ( $\text{pH} = 4,5$ ) nas concentrações de 10 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . SWV com linha de base corrigida registrados na  $f = 20$  Hz,  $A = 20$  mV,  $\Delta E = 5$  mV e janela de potencial de 0,8 V à 1,25 V.

Como pode ser observado na **Fig. 22**, os ácidos apresentam sensibilidades diferentes uns dos outros ( $\text{AC} > \text{AT} \geq \text{AM} > \text{AL}$ ). Esse comportamento pode estar relacionado com a desprotonação de cada ácido, de acordo com seus valores de  $\text{pK}_a$ : ácido cítrico ( $\text{pK}_{a1} = 3,14$ ;  $\text{pK}_{a2} = 4,77$ ,  $\text{pK}_{a3} = 6,39$ ); tartárico ( $\text{pK}_{a1} = 3,22$ ,  $\text{pK}_{a2} = 4,82$ ); málico ( $\text{pK}_{a1} = 3,40$ ,  $\text{pK}_{a2} = 5,11$ ) e láctico ( $\text{pK}_a = 3,86$ ) [144], que por sua vez, está associada às respectivas estruturas moleculares (**Fig. 1**). Quanto menor o  $\text{pK}_a$ , maior a desprotonação do ácido orgânico e, conseqüentemente, maior a facilidade do processo redox ocorrer.

**Tabela 3.** Coeficientes de regressão linear referente as curvas analíticas dos ácidos orgânicos em CoPC-CPE.

Analitos	Coefficiente de correlação (r)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente linear (a)
AC	0,9983	0,0140	2E-07
AL	0,9991	0,0010	4E-09
AM	0,9972	0,0018	6E-08
AT	0,9987	0,0026	4E-09

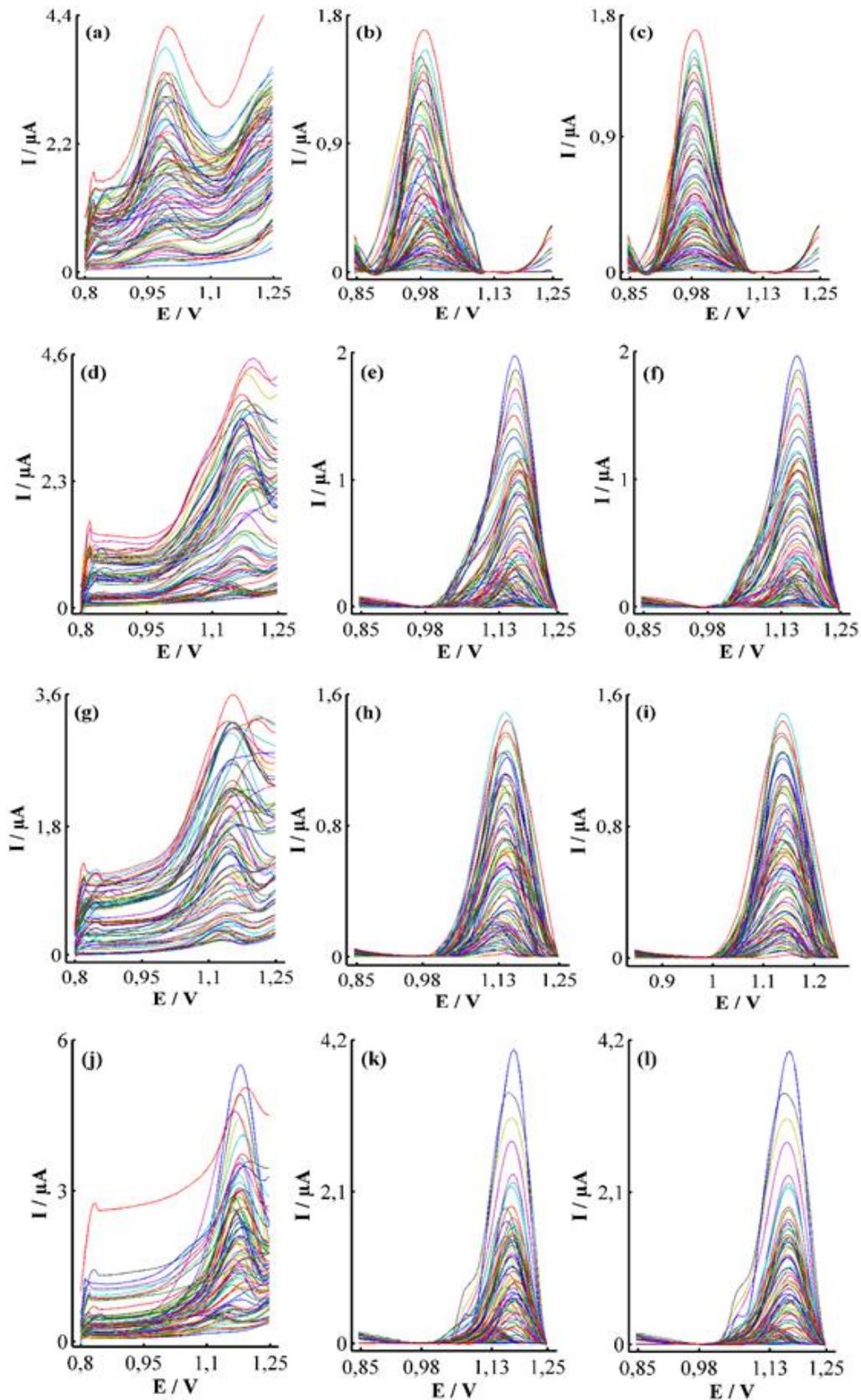
Apesar da excelente relação linear entre a corrente de pico e a concentração observada na **Fig. 22**, sabe-se que há uma forte sobreposição entre as respostas voltamétricas dos analitos (ver **Fig. 20**), dificultando a análise/quantificação simultânea desses ácidos através da calibração univariada. Em casos complexos como este, é necessário o uso de técnicas avançadas de calibração multivariada, como a calibração multivias, que resolve o problema de interferência a partir de procedimentos estatísticos e matemáticos proporcionando uma maior seletividade.

## 5.8. Calibração multivias

Como já discutido anteriormente, o alto grau de sobreposição entre os analitos, pode ser contornado com o uso da calibração multivias. Mas antes de construir os modelos de calibração de segunda ordem, os problemas com a variação de linha de base e deslocamento do potencial de pico, nos dados voltamétricos, precisam ser corrigidos, incluindo etapas de pré-processamento dos dados, como explicado na seção “*Pré-processamento para dados voltamétricos de segunda ordem*”.

### 5.8.1. Pré-tratamento dos dados

Inicialmente, o tensor (3D) dos dados brutos, de cada analito, foi transformado em uma matriz (2D), para posterior análise, como pode ser visto na **Fig. 23(a, d, g, j)**. Em seguida, esta matriz foi submetida a correção da linha de base (**Fig. 23b, e, h, k**) e correção do deslocamento de potencial de pico (**Fig. 23c, f, i, l**).

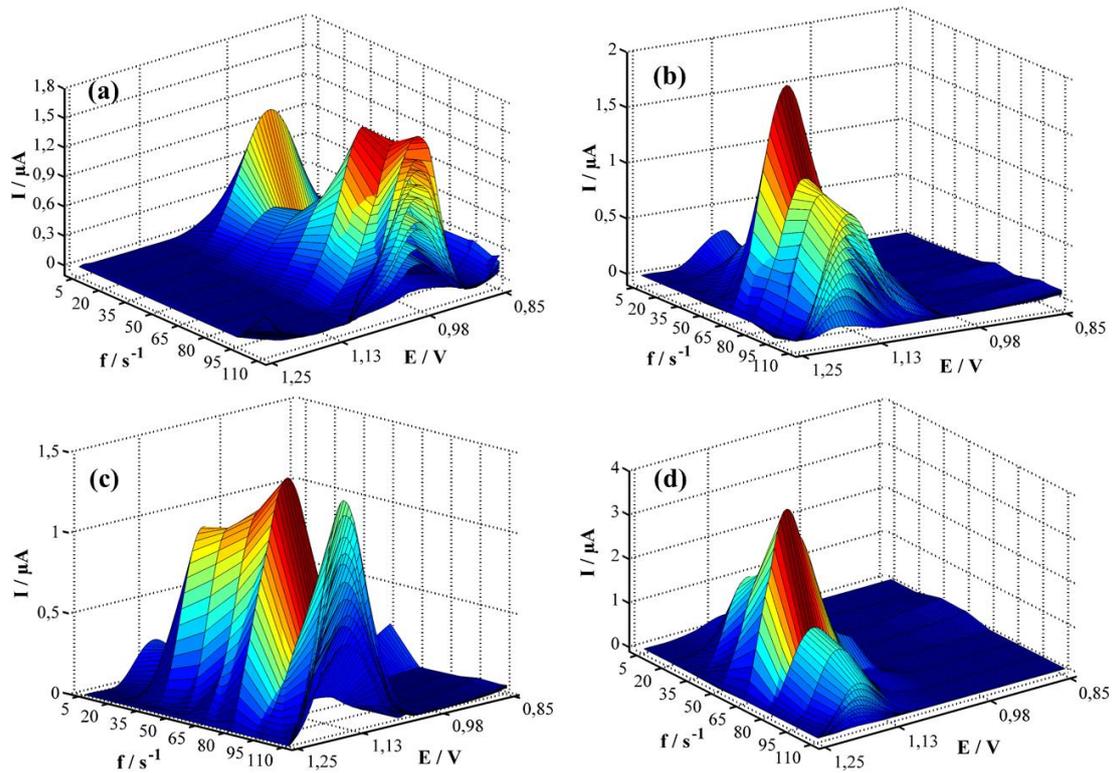


**Figura 23.** Pré-tratamento dos dados de SWV correspondentes aos conjuntos de calibração. (a, d, g, j) dados brutos referente ao AC, AL, AM e AT, respectivamente. (b, e, h, k) dados após correção de linha de base referente ao AC, AL, AM e AT, respectivamente e (c, f, i, l) dados após o ajuste dos potenciais de pico referente ao AC, AL, AM e AT, respectivamente.

Como pode ser visto na **Fig. 23(a, d, g, j)**, não há nenhuma informação no intervalo de potencial de 0,8 a 0,85 V, portanto esta região foi eliminada e todo o tratamento quimiométrico foi realizado utilizando o intervalo de potencial de 0,85 a 1,25 V. Ainda analisando essa Figura, é notável a grande variação de linha de base que existe entre os voltamogramas, entretanto esse problema foi solucionado ao aplicar a rotina AsLSSR nos dados brutos, onde nota-se claramente uma boa correção na linha de base, diminuindo as possíveis interferências causadas por variações de fundo, reduzindo a complexidade dos dados e melhorando a qualidade dos sinais voltamétricos. Apesar da variação com a linha de base ter sido solucionada, observa-se na **Fig. 23(b, e, h, k)**, o deslocamento dos potenciais de pico, que foi devidamente corrigido com o COW, melhorando significativamente a linearidade dos sinais (**Fig. 23(c, f, i, l)**), que é um passo importantíssimo para a aplicação de algoritmos de processamento de dados multivias. Finalmente, os dados pré-tratados foram então matematicamente montados usando comandos MATLAB para restaurar seu formato original (dados de três vias) e usados para os cálculos U-PLS/RBL e MCR/ALS.

### 5.8.2. Análise U-PLS/RBL

A primeira etapa da modelagem U-PLS/RBL foi desdobrar o tensor referente ao conjunto de calibração de cada ácido ( $10 \times 8 \times 81$ ), representados na **Fig. 24**, em uma matriz  $10 \times 648$ . Isso foi realizado convertendo as matrizes de cada medida em vetores. Essa flexibilidade de desdobrar a estrutura dos dados originais conduz a perda de interpretabilidade química dos componentes, porque as informações sobre os perfis dos componentes puros são perdidas durante a operação de desdobramento, mas, por outro lado, assegura uma quantificação confiável do(s) analito(s) na presença de interferente(s) [120].



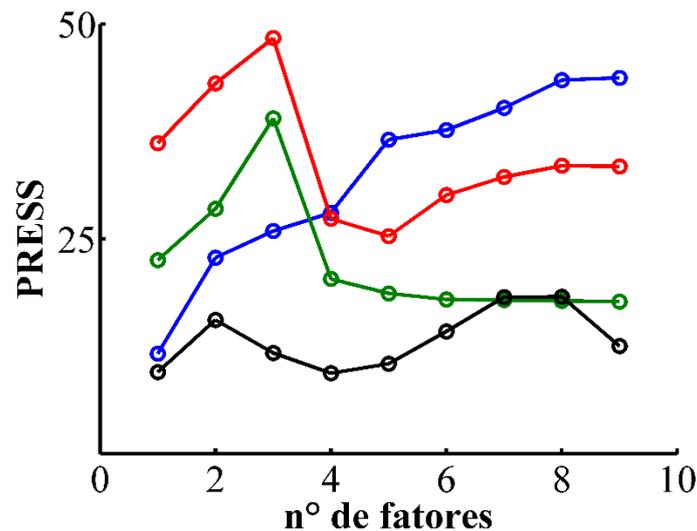
**Figura 24.** SWV em 3D para os conjuntos de calibração dos ácidos (a) cítrico, (b) láctico, (c) málico e (d) tartárico.

### 5.8.2.1. Calibração

Com os dados desdobrados, a etapa seguinte do U-PLS/RBL foi escolher o número ótimo de fatores usando apenas as soluções padrões dos conjuntos de calibração. Isso foi realizado a partir da análise do somatório quadrático dos erros de predição (PRESS) versus o número de fatores incluídos no modelo U-PLS obtido por validação cruzada.

Geralmente o valor do PRESS diminui com a adição de variáveis latentes, mas tende a aumentar porque os últimos fatores representam ruído em vez de informações químicas verdadeiras. Contudo, ao analisar a **Fig. 25** e a **Tab. 4**, observa-se que o PRESS aumenta à medida que o número de fatores é adicionado. Esse comportamento já era esperado uma vez que o presente estudo foi realizado utilizando apenas soluções padrão individuais do AC, AL, AM e AT e, portanto, o aumento no número de fatores, neste caso, representaria ruído.

Outro aspecto que pode ter contribuído para o bom desempenho desta ferramenta refere-se às etapas de pré-tratamento dos dados que diminuíram consideravelmente as contribuições de fundo, destacando apenas as contribuições referentes aos analitos.



**Figura 25.** Gráfico de PRESS versus número de fatores incluídos no modelo U-PLS obtido por validação cruzada para as amostras de calibração, sendo AC (—), AL (—), AM (—) e AT (—).

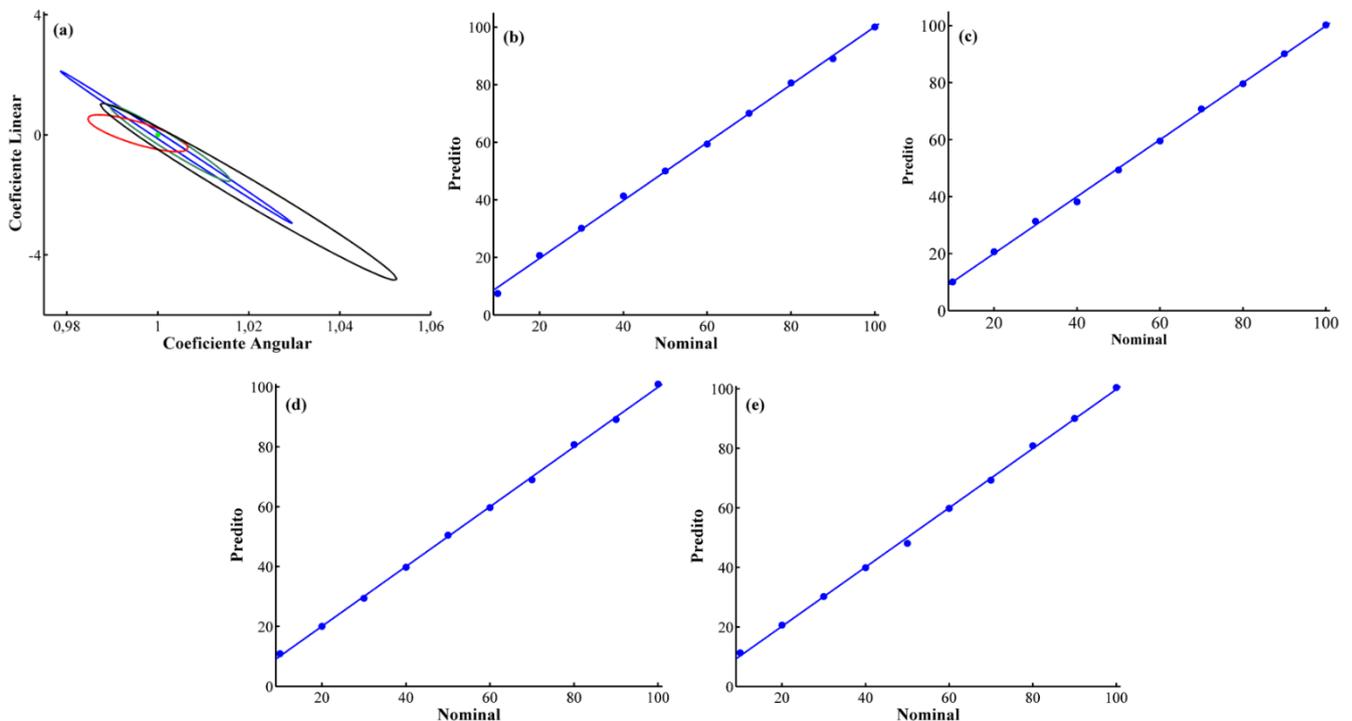
**Tabela 4.** Resultados da validação cruzada nos conjuntos de calibração no U-PLS.

		nº de fatores								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
	<b>PRESS</b>	11,65	22,82	25,91	28,03	36,53	37,66	40,24	43,47	43,73
<b>AC</b>	<b>F</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>P</b>	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>PRESS</b>	22,53	28,50	39,01	20,34	18,66	17,96	17,88	17,79	17,70
<b>AL</b>	<b>F</b>	1,27	1,61	2,20	1,15	1,05	1,01	1,01	1,01	1,00
	<b>P</b>	0,64	0,81	1,10	0,58	0,53	0,51	0,51	0,50	0,50
	<b>PRESS</b>	36,12	43,08	48,36	27,35	25,32	30,10	32,20	33,51	33,43
<b>AM</b>	<b>F</b>	1,43	1,70	1,91	1,08	1,00	-	-	-	-
	<b>P</b>	0,71	0,85	0,95	0,55	0,50	-	-	-	-
	<b>PRESS</b>	13,50	15,57	11,73	9,37	10,48	14,24	18,23	18,28	12,53
<b>AT</b>	<b>F</b>	1,44	1,66	1,25	1,00	-	-	-	-	-
	<b>P</b>	0,72	0,83	0,63	0,50	-	-	-	-	-

Como observado na tabela acima, o menor valor de PRESS para todos os analitos foi obtido com um único fator, ou seja, o número ótimo de fatores de calibração escolhido para construir os modelos U-PLS/RBL de cada analito foi igual a 1 (um), com uma probabilidade menor que 75% e  $F \geq 1$ . Como dito anteriormente, esse resultado já era esperado.

Utilizando então um único fator para cada analito, o gráfico de valores preditos versus os valores nominais foi avaliado, juntamente com as regiões elípticas de confiança conjunta (EJCR), para cada conjunto de calibração (**Fig. 26**), com o objetivo de observar se os modelos de calibração estavam sendo satisfatório e isento de bias.

Idealmente um modelo de calibração deve ter os valores preditos iguais aos valores nominais, isso significa dizer que, a reta ajustada por esses valores deve possuir o coeficiente angular e linear igual a um e zero, respectivamente. A EJCR é uma ferramenta que, com 95% de confiança, representa o intervalo obtido entre esses coeficientes de forma conjunta. Portanto, a área da elipse é um indicativo da exatidão do modelo e também, se na elipse estiver contido o ponto ideal, o modelo em questão não foi afetado por bias.



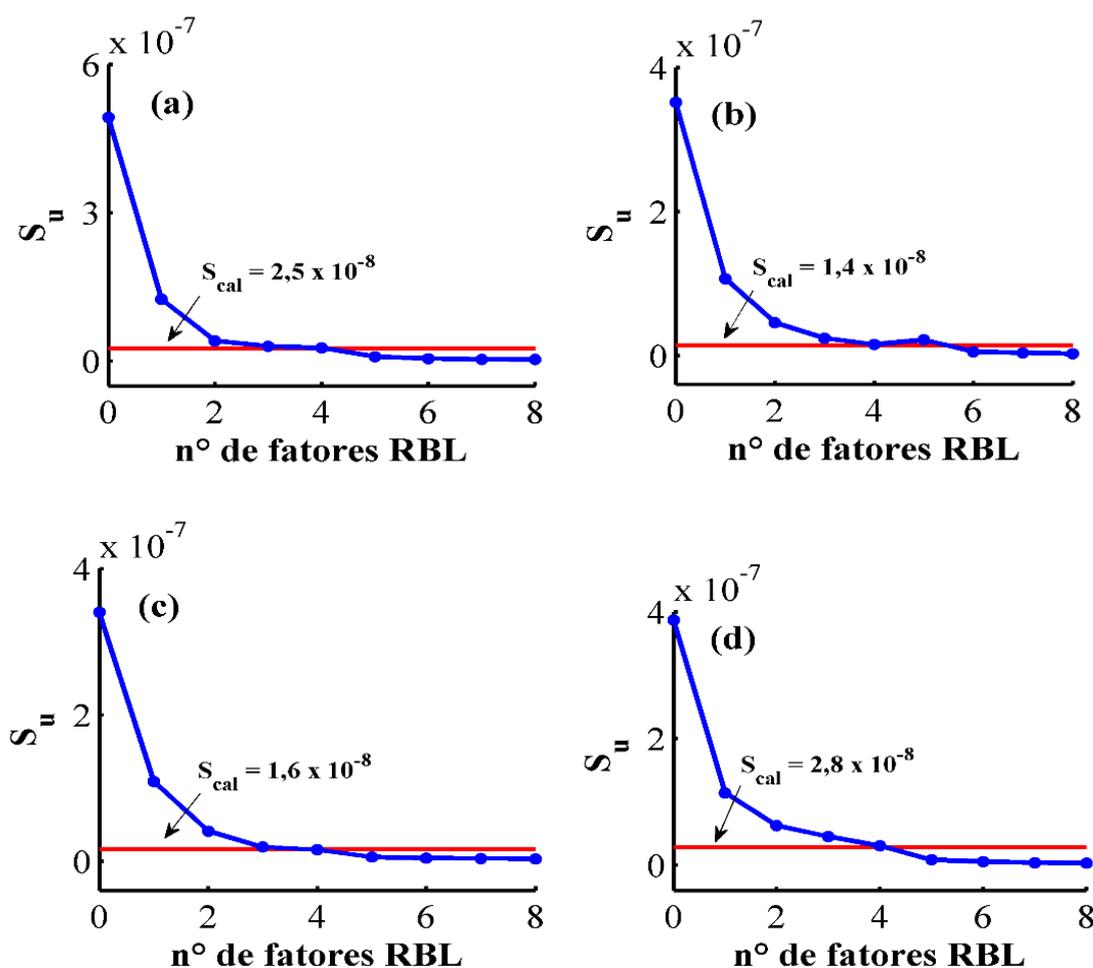
**Figura 26.** EJCR (a) para o modelo U-PLS/RBL do AC (—), AL (—), AM (—) e AT (—) e concentração predita x nominal para ácido cítrico (b); ácido láctico (c); ácido málico (d); ácido tartárico (e).

Portanto, como pode ser observado na **Fig. 26** um bom ajuste entre as concentrações previstas e nominais foi obtido para todos os analitos, assim como as EJCRs continham o ponto ideal indicando que a um nível de 95% de confiança estatística nenhum dos modelos de calibração sofrem com bias.

## 5.8.2.2. Validação

Após empregar um único fator para modelar adequadamente a relação entre o sinal analítico e a concentração nas amostras dos conjuntos de calibração, a próxima etapa foi estimar o número de espécies interferentes presentes no conjunto de validação. Para isso, usou-se o procedimento de bilinearização residual (RBL) no tensor referente ao conjunto de validação ( $25 \times 8 \times 81$ ) desdobrado em uma matriz  $25 \times 648$ .

Como já dito anteriormente, o RBL modela os resíduos de calibração ajustando-os para explicar a contribuição dos interferentes. Portanto, a escolha do número ótimo de fatores RBL, aplicadas ao conjunto de validação, foi realizada analisando a variação do ruído instrumental, da amostra de validação ( $S_u$ ), a cada fator RBL adicionada. Tendo como referência, o valor de ruído instrumental estimado para o conjunto de calibração ( $S_{cal}$ ), como ilustrado na **Fig. 27**.



**Figura 27.** Fatores RBL para o conjunto de validação. Variação de  $S_u$  (—) em função do nº de fatores RBL adicionadas para o (a) ácido cítrico; (b) ácido láctico; (c) ácido málico e (d) ácido tartárico, tendo como referência o  $S_{cal}$  (—).

Ao analisar a **Fig. 27**, observa-se que antes de adicionar a etapa de RBL o  $S_u$  tem valores muito superiores ao  $S_{cal}$ , indicando que nas amostras analisadas há constituintes que não foram modelados na calibração. A medida que os fatores de RBL são adicionadas, os valores de  $S_u$  sofrem uma redução se aproximando do valor de  $S_{cal}$ , indicando que a contribuição dos interferentes nas amostras de validação estão sendo explicadas. Contudo, o aumento excessivo de fatores RBL torna o  $S_u$  menor do que o  $S_{cal}$ , sugerindo um sobre ajuste no modelo. Assim, a estabilização residual em torno do  $S_{cal}$ , para o AC, AL, AM e AT, sugeriu três fatores de RBL para explicar os interferentes presentes nas amostras do conjunto de validação.

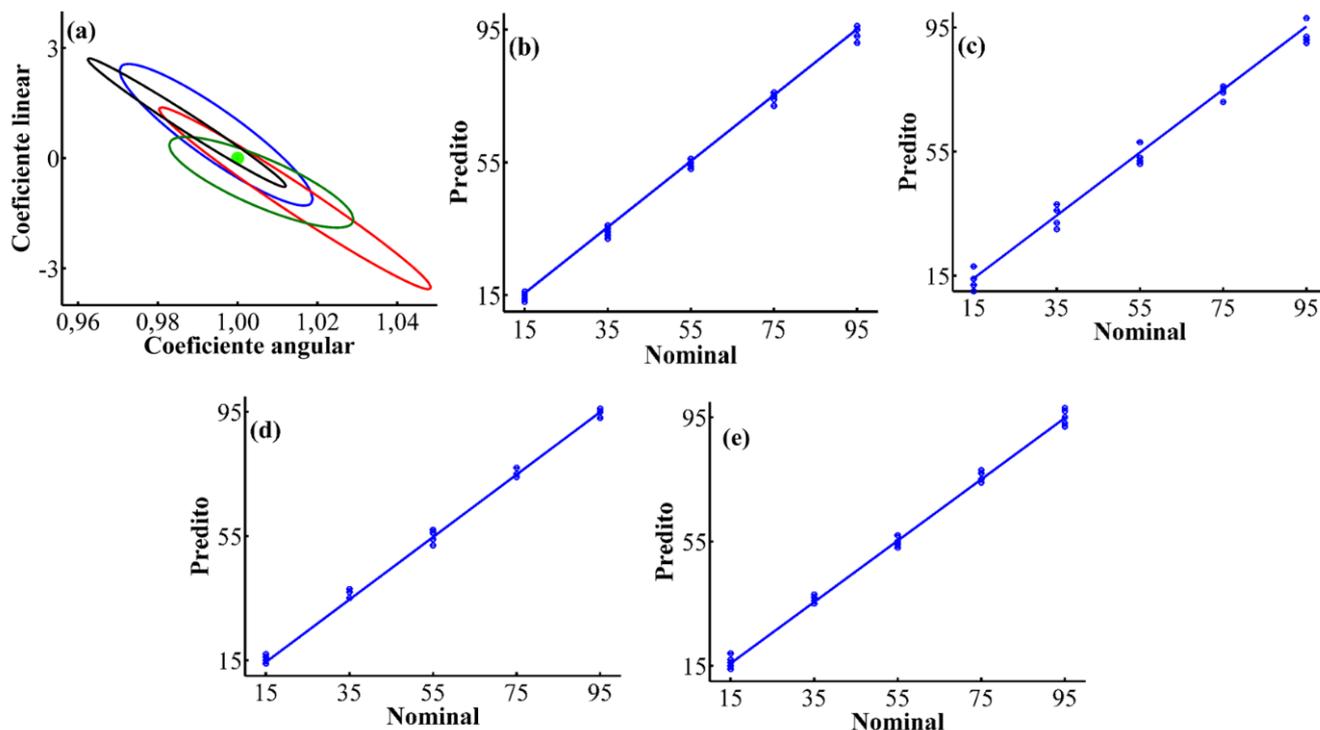
Utilizando um fator e o número de fatores RBL escolhidas para cada analito, os modelos U-PLS/RBL foram aplicados na predição dos analitos do conjunto de validação e a relação entre as concentrações previstas e nominais de AC, AL, AM e AT estão expostos na **Tab. 5**.

**Tabela 5.** Concentrações preditas e nominais ( $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) de AC, AL, AM e AT no conjunto de validação por U-PLS/RBL.

Amostras	AC			AL			AM			AT		
	Nominal	Predito	RSD (%)									
1	15	16,25	1,27	15	12,36	1,95	15	15,91	1,36	15	17,55	1,48
2	35	32,55	1,23	35	32,32	3,34	35	35,23	2,98	15	16,59	2,42
3	55	53,05	0,87	55	52,33	0,75	55	57,9	0,84	15	14,61	1,18
4	75	75,07	1,46	75	74,16	1,30	75	75,46	1,46	15	19,54	1,92
5	95	91,11	1,06	95	98,5	1,22	95	93,95	2,02	15	15,22	3,66
6	15	14,96	2,03	55	53,95	2,71	75	75,24	2,27	35	36,12	4,17
7	35	33,94	2,97	75	74,62	1,29	95	95,12	1,28	35	37,59	1,79
8	55	56,91	1,47	95	92,88	1,41	15	16,52	1,14	35	38,21	1,82
9	75	72,63	1,71	15	12,99	9,24	35	37,17	3,01	35	36,94	2,15
10	95	93,04	1,66	35	36,22	4,24	55	56,7	2,09	35	35,85	2,40
11	15	16,03	0,77	95	91,65	0,49	35	37,33	1,38	55	53,55	0,81
12	35	35,77	1,97	15	18,78	6,23	55	57,11	2,54	55	54,55	1,41
13	55	54,78	1,72	35	38,07	4,69	75	74,08	1,77	55	53,88	1,95
14	75	74,64	2,62	55	51,11	2,08	95	93,19	1,46	55	57,43	3,09
15	95	96,02	1,33	75	75,01	1,39	15	14,05	1,49	55	55,04	1,23
16	15	13,79	1,05	35	30,77	3,88	95	96,76	1,79	75	75,19	1,61
17	35	36,18	1,73	55	51,97	1,50	15	14,75	1,99	75	75,02	0,69
18	55	54,52	3,16	75	71,96	2,66	35	38,53	5,04	75	74,65	2,18
19	75	75,68	1,29	95	90,24	1,46	55	52,43	2,19	75	78,16	1,33
20	95	95,50	1,46	15	10,11	1,95	75	75,29	2,96	75	77,96	0,98
21	15	15,32	2,41	75	76,61	1,35	55	54,69	3,18	95	93,92	1,06
22	35	34,55	3,17	95	91,72	1,20	75	77,45	1,75	95	95,68	1,95
23	55	55,68	2,38	15	14,05	1,14	95	96,89	1,49	95	97,9	1,14
24	75	76,34	2,64	35	30,37	4,42	15	17,92	1,13	95	98,85	0,97
25	95	95,46	2,30	55	58,3	2,23	35	38,77	3,59	95	92,66	1,86

\*RSD= Desvio padrão relativo (n=3).

O bom ajuste entre as concentrações previstas e nominais dos analitos demonstra um ótimo desempenho para a quantificação do ácido cítrico, láctico, málico e tartárico na presença de constituintes não modelados na etapa de calibração. Isso pode ser atestado através da EJCR, obtida por regressão dos mínimos quadrados ordinários entre as concentrações nominal (de “referência”) e predita (**Fig. 28**).



**Figura 28.** EJCR (a) para o modelo U-PLS/RBL dos ácidos cítrico (—), láctico (—), málico (—) e tartárico (—) e concentração predita x nominal para ácido cítrico (b); ácido láctico (c); ácido málico (d); ácido tartárico (e).

Ao observar as EJCR's obtidas pela modelagem U-PLS/RBL, nota-se que todas contêm o ponto ideal (1 e 0), indicando que a um nível de confiança de 95% os modelos U-PLS/RBL construídos para cada analito não contém bias significativo. Esses resultados sugerem que a metodologia proposta alcançou boa precisão para a quantificação dos analitos na presença de quatro potenciais interferentes. Ademais, um modelo com bom ajuste permite o desenvolvimento de metodologias com características de desempenho (figuras de mérito) favoráveis, assim como os que estão expostos na **Tab. 6**.

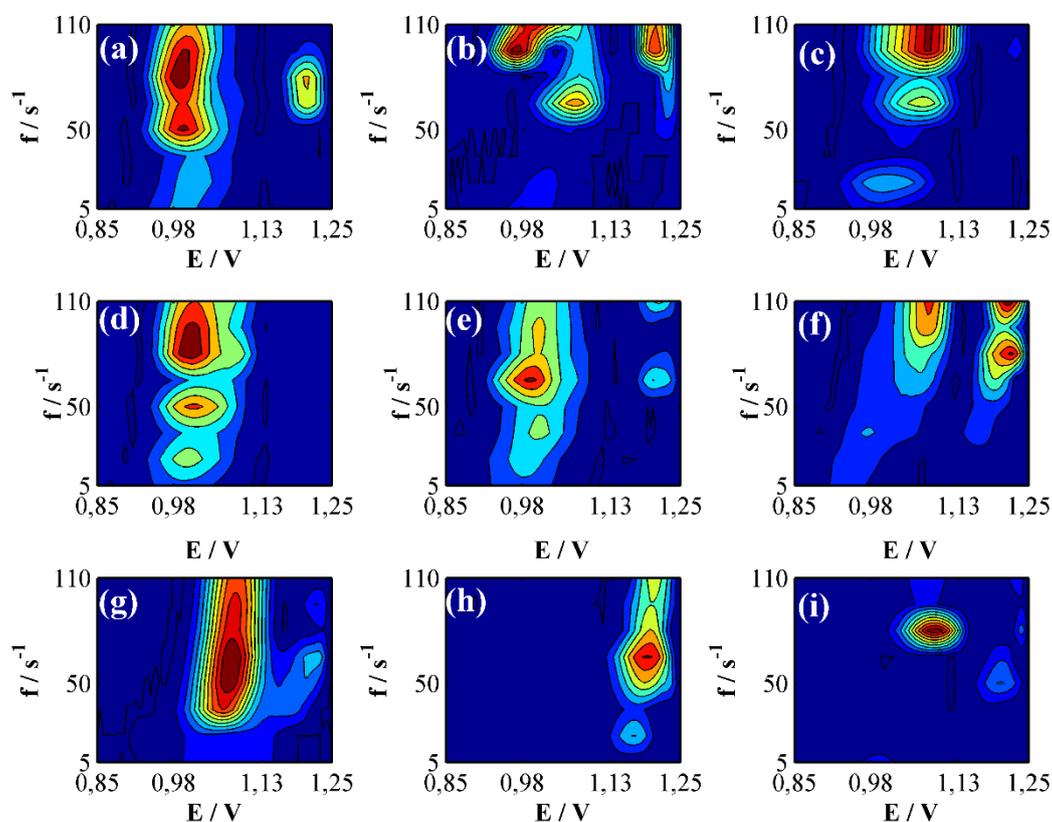
**Tabela 6.** Figuras de mérito para a predição das amostras do conjunto de validação por U-PLS/RBL.

	Analito			
	AC	AL	AM	AT
RMSEV	1,42	3,00	1,90	2,11
REP (%)	2,58	5,46	3,45	3,84
SEN	0,0152	0,0118	0,0126	0,0428
$\gamma^{-1}$	1,64	1,84	1,79	4,53
LOD	3,36	4,00	4,32	3,39
LOQ	10,07	11,99	12,83	10,17

Todos os valores, exceto o REP, estão em ( $10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ).

### 5.8.2.3. Análise dos sucos de frutas

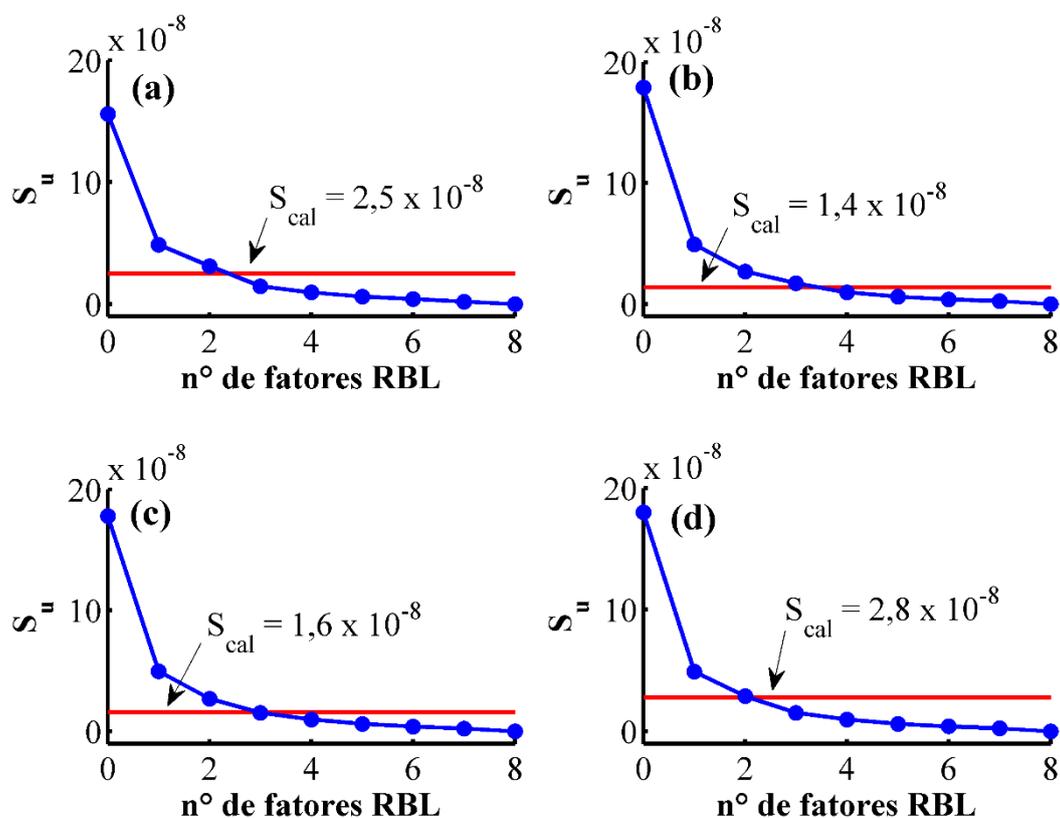
Os dados referentes as nove amostras de sucos de frutas (**Fig 29**) foram pré-tratados (correção de linha de base e alinhamento de potencial de pico) utilizando os mesmos algoritmos e parâmetros dos conjuntos de calibração e validação.



**Figura 29.** Superfície de contorno para as medidas SWV das nove amostras de sucos de frutas.

Na **Fig 29** são apresentadas as superfícies de contorno obtidas para as medidas SWV das nove amostras de sucos de frutas. Em cada uma das imagens podemos notar sinais sobrepostos uns aos outros e esse cenário, inviabilizaria a calibração univariada e/ou multivariada, a menos que uma etapa prévia de extração e/ou separação dos analitos fossem empregadas.

Os modelos U-PLS/RBL foram utilizados para a predição de AC, AL, AM e AT nas amostras de suco de frutas. Para isso, foi utilizado um fator para cada analito (como discutido na seção 4.6.2.1) e o número de fatores RBL, para as amostras de sucos, foi determinado avaliando a variação do ruído instrumental das amostras ( $S_u$ ), a cada etapa RBL adicionada, tendo como referência o  $S_{cal}$ , como ilustrado na **Fig. 30**.



**Figura 30.** Fatores RBL para as amostras de sucos de frutas. Variação de  $S_u$  (—) em função do nº de fatores RBL adicionadas para o (a) ácido cítrico; (b) ácido láctico; (c) ácido málico e (d) ácido tartárico, tendo como referência o  $S_{cal}$  (—).

De acordo com a **Fig. 30** a estabilização residual em torno do  $S_{cal}$ , para o AC, AM e AT, sugeriu duas fatores RBL para explicar os interferentes presentes nas amostras dos sucos, enquanto que para o AL, três fatores RBL foram necessárias.

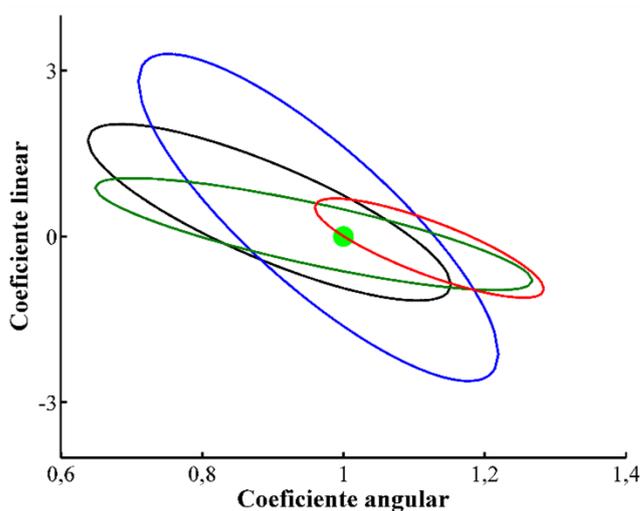
Os valores do AC, AL, AM e AT preditos pelos modelos U-PLS/RBL apresentaram concordância satisfatória com os valores do método de referência (**Tab. 7**), demonstrando a boa

capacidade do método proposto em superar fortes sobreposições de constituintes calibrado e não calibrados em amostras complexas, como sucos de frutas.

**Tabela 7.** Valores de concentração dos ácidos orgânicos obtidos para as amostras dos sucos de frutas pelo método proposto (modelo U-PLS/RBL) e o de referência.

Sucos de frutas	Método proposto (g L <sup>-1</sup> )				Método de referência (g L <sup>-1</sup> )			
	AC	AL	AM	AT	AC	AL	AM	AT
Limão + Laranja	6,42	1,83	2,82	3,68	6,11	1,80	2,67	3,56
Açaí + Guaraná	1,23	0,23	0,61	0,61	1,32	0,27	0,58	0,51
Cajú	8,20	2,33	5,95	6,22	9,82	2,71	4,77	5,51
Limão + Laranja	3,92	1,74	2,15	1,80	4,31	1,35	2,38	2,12
Maracujá	24,08	6,49	13,46	12,06	24,56	6,59	12,17	13,78
Laranja	11,72	2,07	3,32	3,60	8,74	2,27	3,05	4,24
Acerola	13,01	3,07	5,83	7,29	12,92	4,04	5,85	6,14
Cajá	12,16	4,75	6,58	6,55	13,27	4,17	5,97	6,54
Goiaba	6,20	1,28	3,31	3,00	5,91	1,24	3,51	3,28

Com os resultados obtidos pelo modelo U-PLS/RBL, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os métodos ao aplicar o teste-*t* pareado em um nível de confiança de 95%. Além disso, como pode ser visto na **Fig. 31**, a EJCR, para todos os analitos, exceto o AM, contém o ponto ideal (1 e 0), indicando que o método proposto não apresenta bias, considerando 95% de significância estatística.



**Figura 31.** EJC para o modelo U-PLS/RBL dos ácidos cítrico (—), láctico (—), málico (—) e tartárico (—) nas amostras de sucos de frutas.

Apesar de a EJC para o modelo U-PLS/RBL do AM não conter o ponto ideal (indicando um modelo afetado por bias), os resultados obtidos para a predição foram satisfatórios.

De modo complementar, a **Tab 8** apresenta as características de desempenho analítico satisfatórias obtidas pelos modelos U-PLS/RBL para a predição dos ácidos orgânicos nos sucos de frutas.

**Tabela 8.** Parâmetros de desempenho para a predição das amostras de sucos de frutas por U-PLS/RBL.

	Analito			
	AC	AL	AM	AT
SEN	0,0399	0,0348	0,0376	0,0828
$\gamma^{-1}$	1,84	2,66	1,55	3,45
LOD	4,25	4,87	4,74	3,99
LOQ	10,63	10,39	11,23	10,98

Todos os valores, exceto o REP, estão em ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

### 5.8.3. Análise MCR-ALS

A primeira etapa da modelagem MCR-ALS consistiu em transformar o tensor dos dados em uma matriz aumentada na dimensão correspondente a variação da frequência (que rompe com a trilinearidade). Isso foi feito colocando as matrizes adjacentes entre si, no modo coluna, para criar uma matriz aumentada (ver **Fig. 9**). Essa característica de preservar a propriedade

bilinear dos dados possibilita a recuperação dos perfis de cada constituinte (analito ou não) presentes na amostra analisada, além de quantificar os analitos na presença de interferentes.

### 5.8.3.1. Calibração

Com as matrizes aumentadas, a próxima etapa foi estimar o número ótimo de componentes a serem incluídos no MCR-ALS, levando em consideração a variância explicada e o ajuste residual em função do número de componentes aplicados ao modelo.

Aplicando o MCR-ALS apenas às amostras dos conjuntos de calibração (para avaliar o ajuste entre esses dados), nota-se (**Tab. 9**) que em todos os casos um componente foi necessário para obter uma alta variância explicada com o ajuste residual baixo, indicando que apenas um componente foi capaz de explicar toda a informação útil contida nas amostras analisadas, como era esperado, já que as amostras de calibração são compostas por padrões puros de cada analito.

**Tabela 9.** Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas nos conjuntos de calibração por MCR-ALS.

PC	AC		AL		AM		AT	
	Var. Exp. (%)	A. Res.*						
1	96,4470	0,0556	98,2530	0,0431	97,8640	0,0437	98,2650	0,0635
2	2,7471	0,0268	1,2019	0,0243	1,1509	0,0200	1,1363	0,0377
3	0,3512	0,0203	0,3665	0,0140	0,6191	0,0184	0,4316	0,0201
4	0,2944	0,0122	0,0933	0,0098	0,2373	0,0110	0,0661	0,0158
5	0,0844	0,0085	0,0369	0,0074	0,0986	0,0054	0,0441	0,0120
6	0,0362	0,0062	0,0182	0,0059	0,0119	0,0042	0,0255	0,0090
7	0,0197	0,0044	0,0126	0,0045	0,0052	0,0036	0,0159	0,0064
8	0,0093	0,0033	0,0053	0,0038	0,0038	0,0031	0,0086	0,0043
9	0,0039	0,0026	0,0032	0,0033	0,0032	0,0025	0,0032	0,0032
10	0,0016	0,0023	0,0021	0,0029	0,0016	0,0022	0,0011	0,0028

\*A. Res = Ajuste residual ( $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).

### 5.8.3.2. Validação

Para iniciar a etapa de validação do MCR-ALS é necessário estimar o número ótimo de componentes que serão capazes de modelar o analito nas amostras de validação, as quais contém compostos que não foram modelados na etapa de calibração. Para isso, utilizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA), que captura a maior variação possível nos

sucessivos componentes bilineares (entidades matemáticas abstratas sem propriedades fisicamente reconhecíveis) até um ponto em que elas (PCs) representem principalmente ruído [125]. Os resultados da variância explicada e do ajuste residual à medida que as PCs são adicionadas, são apresentados na **Tab. 10**.

**Tabela 10.** Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas no conjunto de validação por MCR-ALS.

PC	AC		AL		AM		AT	
	Var. Exp. (%)	A. Res.*						
1	78,6230	0,2523	81,1120	0,2247	79,9920	0,2238	80,0680	0,2447
2	16,5730	0,1099	12,2210	0,1088	11,9890	0,1131	12,0360	0,1184
3	3,5282	0,0642	3,5273	0,0612	3,9091	0,0599	3,7990	0,0633
4	1,2318	0,0586	2,6296	0,0513	2,6436	0,0392	2,4605	0,0403
5	0,2574	0,0256	1,3883	0,0232	1,3060	0,0232	1,4894	0,0236
6	0,0996	0,0181	0,0602	0,0146	0,0815	0,0164	0,0739	0,0168
7	0,0348	0,0146	0,0318	0,0102	0,0405	0,0116	0,0345	0,0123
8	0,0230	0,0116	0,0109	0,0082	0,0196	0,0082	0,0119	0,0103
9	0,0170	0,0087	0,0060	0,0068	0,0071	0,0066	0,0087	0,0086
10	0,0082	0,0069	0,0031	0,0060	0,0030	0,0057	0,0060	0,0071

\*A. Res = Ajuste residual ( $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).

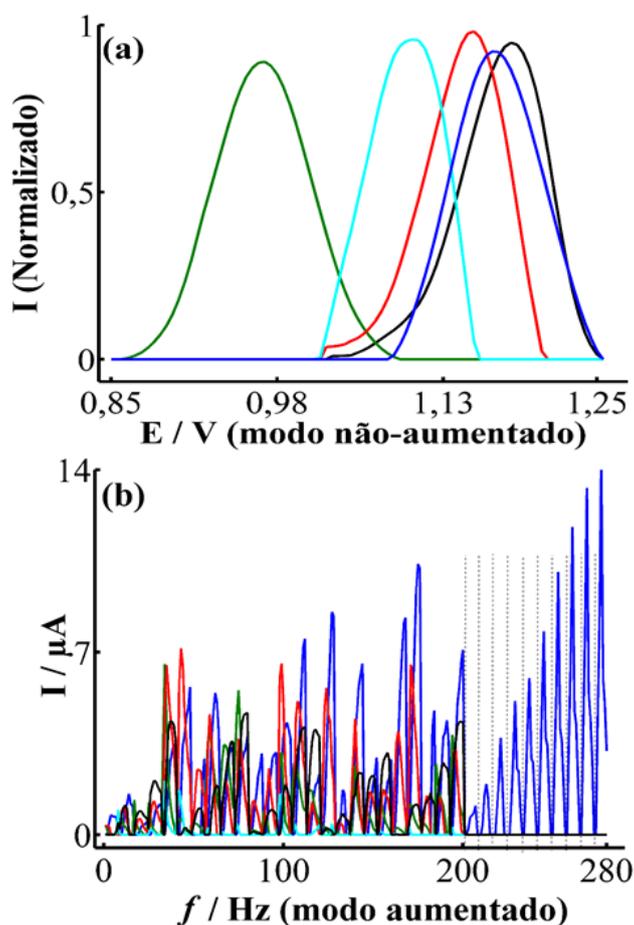
De acordo com a Tabela acima, pode-se concluir que ao usar o conjunto de calibração contendo apenas soluções padrões de ácido cítrico para modelar as amostras do conjunto de validação, quatro PCs são necessárias para explicar todas as informações relevantes (as que não são resíduos). Isso, porque essas quatro PCs representam mais de 99% do total enquanto que cada uma das outras PCs restantes explicam menos de 0,1% e o ajuste residual está próximo ao nível de ruído estimado neste sistema.

Levando em consideração que nas amostras do conjunto de validação estão presentes cinco constituintes, uma PC pode ser capaz de explicar dois compostos como combinação linear, tendo em vista que há grande semelhança entre alguns deles (ver **Fig. 21**). Usando os demais conjuntos de calibração (que contém soluções padrões de ácido láctico, málico e tartárico, respectivamente) cinco PCs foram necessárias para a modelagem e esse número está de acordo com a quantidade de constituintes presentes nas amostras analisadas.

Após estimar o número ótimo de PCs, a próxima etapa foi aplicar restrições aos dados. Conforme discutido anteriormente, na seção **2.6.1.1.2**, a aplicação de restrições é necessária

para alcançar soluções quimicamente razoáveis (recuperar perfis). Nesse caso, a restrição de não-negatividade foi aplicada aos modos aumentados (frequência) e não aumentados (potenciais), já que a correção de linha de base foi aplicada aos dados na etapa de pré-tratamento; a restrição de unimodalidade foi aplicada também ao modo não aumentados, uma vez que cada analito só apresenta um único sinal na faixa de potencial trabalhada.

Em seguida, a etapa de inicialização é requerida; é nesse processo que estimativas iniciais do(s) componente(s) puro(s) devem ser fornecidas para obter resultados mais próximos possíveis do real, evitando que o algoritmo converta para uma solução indesejada. Para ajudar o analista nessa etapa, foi usado o método PURE que recupera aproximações do(s) componente(s) presente(s) na matriz da amostra analisada, através de um gráfico da estimativa inicial com base nas variáveis mais puras, como mostrado na **Fig. 32**.

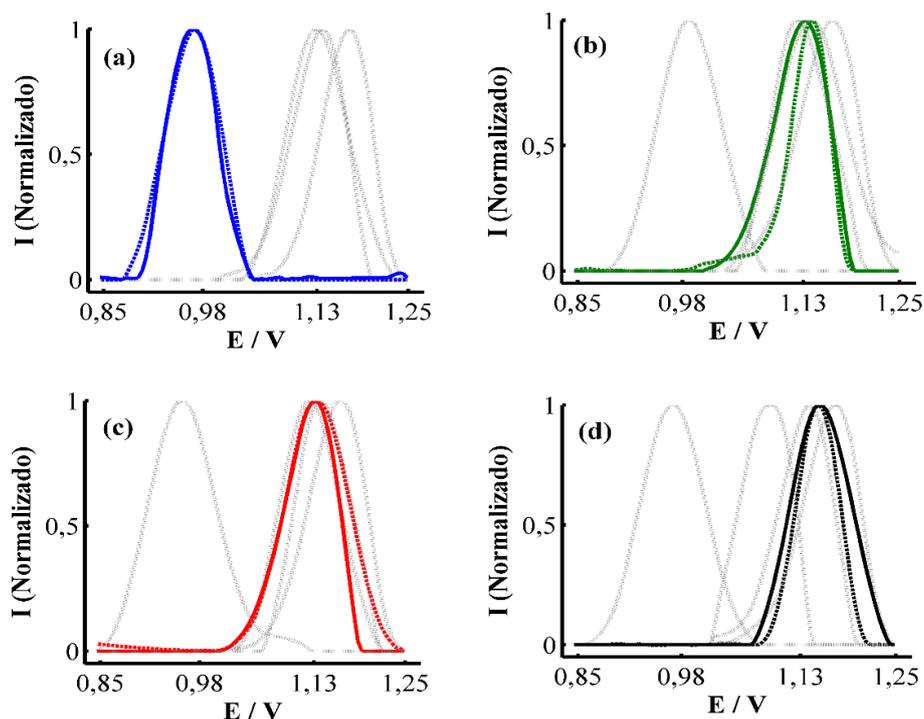


**Figura 32.** Aproximações iniciais obtidas pelo método "pure" com perfil 1 (—), perfil 2 (—), perfil 3 (—), perfil 4 (—) e perfil 5 (—). Perfis iniciais dos componentes (a) e soluções obtidas da matriz de dados aumentada (b).

A **Fig. 32a** mostra os perfis aproximados obtidos pelo SIMPLISMA referente a cada PC usada na modelagem das amostras de validação através do conjunto de calibração de ácido tartárico. O perfil azul obtido pela PC 1, que explica 80% da variância entre as amostras

analisadas, guarda grande semelhança com o perfil real do analito (ácido tartárico), esse fato direciona a conclusão de que as outras PCs estão explicando as contribuições dos interferentes e para atestar essa afirmação, a **Fig. 32b** apresenta os sinais das matrizes no modo aumentado justapostas de modo que  $X_{val} \mid X_{cal}$ . Como o modo referente à frequência tem 8 variáveis posicionadas uma ao lado da outra, o eixo x desta figura tem 280 variáveis ao total, sendo as 200 primeiras referentes as vinte e cinco amostras de  $X_{val}$  e as 80 últimas referentes as dez amostras de  $X_{cal}$ . Observando apenas a intensidade de corrente nas amostras de  $X_{cal}$ , nota-se que apenas a PC 1 apresenta sinal e de forma crescente, esse comportamento está de acordo com a composição do conjunto de calibração de AT (ver **Tab. 2**). Portanto, é seguro afirmar que as outras PCs não têm relação com o analito e assim a inicialização foi tomada com base na conclusão de que as PCs 2, 3, 4 e 5 estão relacionadas aos interferentes. Um procedimento análogo foi aplicado para a etapa de inicialização dos ácidos cítrico, láctico e málico.

Na etapa seguinte, o ALS é iniciado até a total convergência, onde são obtidos os perfis finais do analito e dos interferentes presentes nas amostras analisadas (**Fig. 33**).



**Figura 33.** Perfis recuperados pelo MRC-ALS para o AC (—), AL (—), AM (—) e AT (—).

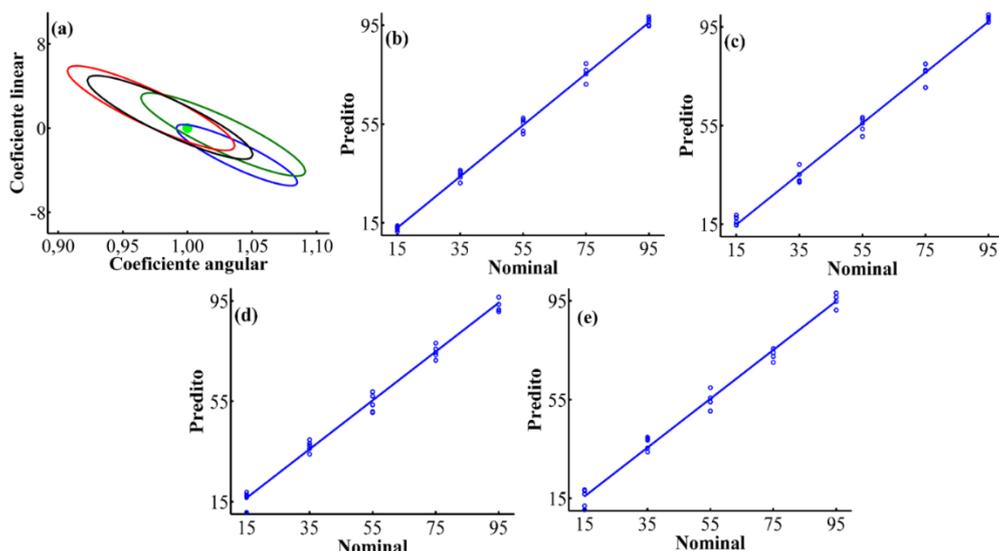
Ao comparar os perfis finais recuperados pelo modelo MCR-ALS com os perfis conhecidos de cada analito, pode-se observar que uma decomposição bem-sucedida foi realizada, alcançando sinais muito semelhantes entre si e com esses resultados a próxima etapa foi quantificar os analitos nas amostras de  $X_{val}$ . Os resultados da predição dessas amostras estão expostos na **Tab. 11**.

**Tabela 11.** Concentrações previstas e nominais ( $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) de AC, AL, AM e AT no conjunto de validação por MCR-ALS.

Amostras	AC			AL			AM			AT		
	Nominal	Predito	RSD (%)									
1	15	12,39	1,70	15	17,64	1,47	15	16,67	1,19	15	11,97	1,85
2	35	36,29	2,73	35	39,25	4,08	35	38,30	2,01	15	10,41	1,57
3	55	51,04	2,80	55	58,26	4,29	55	50,55	2,73	15	18,06	1,76
4	75	76,76	1,22	75	70,46	2,55	75	74,50	2,95	15	16,75	1,66
5	95	96,36	1,97	95	98,08	2,14	95	100,86	1,88	15	18,54	1,29
6	15	13,24	1,82	55	55,92	5,72	75	78,15	3,84	35	35,45	1,97
7	35	31,19	3,21	75	77,41	1,55	95	96,44	4,25	35	38,58	1,76
8	55	57,38	1,64	95	99,85	3,51	15	18,81	1,64	35	33,75	2,07
9	75	71,06	2,25	15	14,85	1,10	35	39,61	1,93	35	39,69	1,54
10	95	95,05	2,31	35	32,75	5,80	55	57,08	1,24	35	39,05	2,48
11	15	13,85	1,66	95	98,93	1,21	35	33,99	1,06	55	54,05	1,68
12	35	33,58	2,98	15	14,59	1,91	55	53,60	1,57	55	55,64	1,60
13	55	52,17	1,74	35	35,21	1,80	75	71,34	2,80	55	59,83	0,97
14	75	79,41	2,27	55	57,50	1,83	95	93,67	4,47	55	54,07	1,35
15	95	98,45	1,83	75	70,39	1,85	15	10,67	2,81	55	50,32	2,38
16	15	13,01	0,76	35	32,06	1,91	95	91,47	3,75	75	75,62	1,06
17	35	34,80	3,16	55	53,60	2,80	15	17,72	1,11	75	73,99	1,35
18	55	55,47	1,80	75	76,94	5,46	35	36,22	1,56	75	72,45	0,86
19	75	71,11	1,36	95	96,88	1,24	55	50,80	2,87	75	70,06	1,57
20	95	97,49	1,33	15	18,68	1,42	75	73,50	4,58	75	75,49	1,59
21	15	11,51	1,03	75	79,93	1,51	55	58,77	1,31	95	98,08	0,84
22	35	35,53	2,79	95	100,03	7,70	75	75,80	4,23	95	96,45	1,04
23	55	56,55	1,63	15	15,89	1,70	95	90,70	3,71	95	98,11	0,88
24	75	75,33	1,59	35	32,43	7,09	15	17,21	1,95	95	91,19	0,91
25	95	94,65	2,22	55	50,53	2,90	35	37,40	1,72	95	94,64	0,77

\*RSD= Desvio padrão relativo (n=3).

Como pode ser visto na **Tab. 11**, obteve-se uma excelente concordância entre as concentrações previstas e nominais de AC, AL, AM e AT, demonstrando um ótimo desempenho para a quantificação desses analitos na presença de interferentes. Para atestar esses resultados, a **Fig. 34** mostra as EJCR's obtidas pela modelagem MCR-ALS e os gráficos de concentração predita versus concentração nominal obtidas no conjunto de validação.



**Figura 34.** EJCR (a) para o modelo MCR-ALS do AC (—), AL (—), AM (—) e AT (—) e concentração predita x nominal para ácido cítrico (b); ácido lático (c); ácido málico (d); ácido tartárico (e).

A **Fig. 34a** mostra que todas as EJCR's contêm o ponto ideal, indicando que os modelos construídos não possuem tendência significativa, a um nível de confiança de 95%. Além disso, a **Fig. 34(b-e)** indicam modelos com bons ajustes, apresentando características de desempenho com valores muito satisfatórios, como pode ser visto na **Tab. 12**.

**Tabela 12.** Figuras de mérito para a predição das amostras do conjunto de validação por MCR-ALS.

	Analito			
	AC	AL	AM	AT
RMSEV	2,46	3,18	3,11	2,99
REP (%)	4,47	5,78	5,66	5,44
SEN	0,08	0,047	0,0392	0,116
$\gamma^{-1}$	1,59	1,13	0,73	2,26
LOD	4,8	4,82	4	3,82
LOQ	14	14,48	12	11,30

Todos os valores, exceto o REP, estão em ( $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).

## 5.8.3.3. Análise dos sucos de frutas

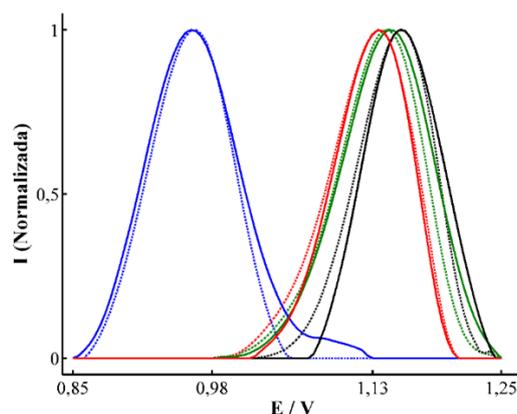
Para a modelagem dos ácidos orgânicos nos sucos de frutas, por MCR-ALS, as mesmas restrições empregadas no conjunto de validação, foram usadas e o número de componentes que seriam capazes de modelar as analitos em cada uma das nove amostras foi avaliado utilizando a PCA. Na **Tab. 13** são apresentados os resultados da variância explicada e do ajuste residual à medida que as PCs são adicionadas.

**Tabela 13.** Resultado da variância explicada e do ajuste residual em função das componentes adicionadas nas amostras de sucos de frutas por MCR-ALS.

PC	AC		AL		AM		AT	
	Var. Exp. (%)	A. Res.*						
1	94,5990	0,0612	93,3920	0,0824	92,0130	0,0835	94,9650	0,0938
2	2,9733	0,0353	3,7193	0,0446	5,6702	0,0455	2,2537	0,0631
3	1,3739	0,0259	1,7674	0,0259	1,3048	0,0304	1,1633	0,0376
4	0,7699	0,0225	1,4366	0,0174	0,8784	0,0282	1,4287	0,0211
5	0,1008	0,0101	0,0740	0,0099	0,0619	0,0086	0,0701	0,0169
6	0,0654	0,0092	0,0410	0,0090	0,0168	0,0063	0,0441	0,0136
7	0,0440	0,0066	0,0289	0,0070	0,0277	0,0052	0,0335	0,0102
8	0,0207	0,0048	0,0159	0,0055	0,0097	0,0042	0,0157	0,0081
9	0,0091	0,0038	0,0079	0,0046	0,0056	0,0035	0,0130	0,0058
10	0,0041	0,0032	0,0053	0,0039	0,0040	0,0029	0,0050	0,0046

\*A. Res = Ajuste residual ( $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).

Ao analisar a **Tab. 13** observa-se que, para todos os analitos, quarto PCs representam mais de 99% da variância explicada e o ajuste residual está em concordância com o ruído instrumental. Em seguida a etapa de inicialização ocorreu de maneira semelhante a que está descrita na seção 4.6.3.2. (utilizando o PURE). Os perfis recuperados para cada analito foram avaliados, através da inspeção visual, tendo como referência os perfis puros de cada analito (**Fig. 35**).



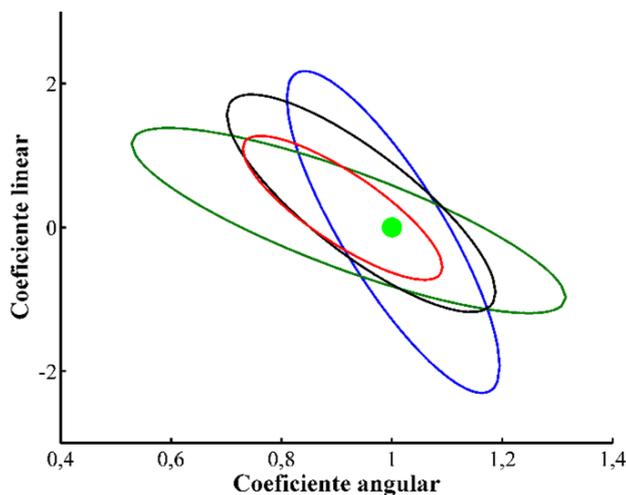
**Figura 35.** Perfis recuperados pelo MRC-ALS, através do conjunto de calibração, para o ácido cítrico (—), ácido láctico (—), ácido málico (—) e ácido tartárico (—) nas amostras de sucos de frutas.

Os perfis recuperados com os modelos MCR-ALS (linha preenchida), são muito semelhantes aos perfis conhecidos dos analitos (linha pontilhada), isso significa que a decomposição das amostras de sucos pelo MCR-ALS foi bem-sucedida. Isso pode ser observado na **Tab. 14** onde valores preditos pelos modelos MCR-ALS otimizados apresentaram concordância satisfatória com os valores obtidos pelo método de referência, demonstrando a grande capacidade do método proposto “driblar” a presença de interferentes, comumente presentes em amostras complexas.

**Tabela 14.** Valores de concentração dos ácidos orgânicos obtidos para as amostras dos sucos de frutas pelo método proposto (modelo MCR-ALS) e o de referência.

Sucos de frutas	Método proposto (g L <sup>-1</sup> )				Método de referência (g L <sup>-1</sup> )			
	AC	AL	AM	AT	AC	AL	AM	AT
Limão + Laranja	6,00	1,85	2,75	3,79	6,11	1,80	2,67	3,56
Açaí + Guaraná	1,32	0,24	0,56	0,39	1,32	0,27	0,58	0,51
Cajú	7,98	2,44	5,11	6,98	9,82	2,71	4,77	5,51
Limão + Laranja	4,22	1,14	2,19	1,98	4,31	1,35	2,38	2,12
Maracujá	24,98	5,69	10,97	12,88	24,56	6,59	12,17	13,78
Laranja	10,42	2,23	2,51	4,33	8,74	2,27	3,05	4,24
Acerola	13,02	5,21	5,41	5,41	12,92	4,04	5,85	6,14
Cajá	12,37	3,50	6,51	7,18	13,27	4,17	5,97	6,54
Goiaba	6,29	1,08	3,73	3,22	5,91	1,24	3,51	3,28

De acordo com o teste-*t* pareado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos, a um nível de confiança de 95%. Além disso, as EJCRC de todos os analitos (**Fig. 36**) contêm o ponto ideal (1 e 0), indicando que não há bias nos modelos MCR-ALS, considerando 95% de confiança estatística.



**Figura 36.** EJCRC para o modelo MCR-ALS dos ácidos cítrico (—), láctico (—), málico (—) e tartárico (—) nas amostras de sucos de frutas.

Por fim, as características de desempenho analíticas para os modelos MCR-ALS (**Tab. 15**) se mostram bastante satisfatórias para a predição dos ácidos cítrico, láctico, málico e tartárico nas amostras dos sucos de frutas.

**Tabela 15.** Figuras de mérito para a predição dos ácidos orgânicos nas amostras dos sucos de frutas por MCR-ALS.

	Analito			
	AC	AL	AM	AT
SEN	0,0450	0,0540	0,0751	0,0823
$\gamma^{-1}$	0,93	1,30	1,90	2,50
LOD	4,30	4,50	3,70	3,60
LOQ	11,03	10,42	11,00	11,03

Todos os valores, exceto o REP, estão em ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

---

Capítulo 6.  
**CONCLUSÃO**

---

## 6. Conclusão

Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, o desenvolvimento de um método voltamétrico para a determinação de ácido cítrico, láctico, málico e tartárico utilizando modelos de calibração multivias, no qual a vantagem de segunda ordem foi bem-sucedida.

A baixa seletividade do sensor CoPC-CPE para os ácidos orgânicos foi contornada pelo uso dos modelos quimiométricos U-PLS/RBL e MCR-ALS baseados em conjuntos de calibração constituídos a partir de soluções padrões de cada analito, que por sua vez, foram testados frente a um conjunto de validação compostos de vinte e cinco soluções contendo a mistura de AC, AL, AM, AS e AT, simultaneamente.

As misturas do conjunto de validação por si só fornecem um sistema analítico muito complexo, uma vez que os ácidos interferem entre si, mais apesar disto, os modelos U-PLS/RBL e MCR-ALS apresentaram ótimo desempenho frente as dificuldades encontradas, mostrando-se robustos, com boa acurácia e isento de bias.

Ao serem aplicados nas amostras de sucos de frutas, os modelos U-PLS/RBL e MCR-ALS apresentaram boas características de desempenho analítico, tais como: sensibilidade, sensibilidade analítica, LOD e LOQ. Dessa forma, um método altamente sensível e confiável, utilizando a SWV associada a ferramentas quimiométricas para determinação dos ácidos orgânicos em sucos de frutas, foi construído com uma resposta linear na faixa de 10 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os resultados obtidos tanto com o método proposto quanto com o método de referência corroboram entre si, de modo que, não houve diferença estatisticamente significativa e nem bias, utilizando-se, respectivamente, teste-*t* pareado e a EJCR, com nível de confiança de 95%.

Com relação a outros métodos descritos na literatura, o método proposto é mais simples, menos dispendioso e “ambientalmente amigável”, porque todas as amostras de sucos de frutas podem ser analisadas sem pré-tratamento da amostra, tais como: filtração, extração, pré-concentração ou procedimentos de limpeza.

O método proposto pode ser estendido para a quantificação de CA, LA, MA, TA e outros ácidos orgânicos (por exemplo: ácido ascórbico, succínico, oxálico) em outros produtos alimentícios, como: vinhos, cervejas, refrigerantes, etc.

---

---

Capítulo 7.

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

## 7. Referências bibliográficas

- 1 P. Flores, P. Hellín, J. Fenoll. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Food Chemistry** 132 (2012) 1049–1054.
- 2 J. D. Escobar, M. Alcaniz, R. Masot, A. Fuentes, R. Bataller, J. Soto, J. M. Barat. *Quantification of organic acids using voltammetric tongues*. **Food Chemistry** 138 (2013) 814–820.
- 3 I. M. Toaldo, F. A. Cruz, E. L. Silva, M. T. Bordignon-Luiz. *Acute consumption of organic and conventional tropical grape juices (Vitis labrusca L.) increases antioxidants in plasma and erythrocytes, but not glucose and uric acid levels, in healthy individuals*. **Nutrition research** 36 (2016) 808–817.
- 4 I. Mato, S. Suárez-Luque, J. F. Huidobro. *A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines*. **Food Research International** 38 (2005) 1175–1188.
- 5 D. B. Gomis, D. M. Tamayo, B. S. Valles, J. J. M. Alonso. *Detection of Apple Juice Concentrate in the Manufacture of Natural and Sparkling Cider by Means of HPLC Chemometric Sugar Analyses*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52 (2004) 201–203.
- 6 A. Santalad, P. Teerapornchaisit, R. Burakham, S. Srijaranai. *Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages*. **Food Science and Technology** 40 (2007) 1741–1746.
- 7 B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. Gallego. *Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction*. **Talanta** 84 (2011) 924–930.
- 8 F-J. Liu, G-S. Ding, A-N. Tang. *Simultaneous separation and determination of five organic acids in beverages and fruits by capillary electrophoresis using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as pseudostationary phase*. **Food Chemistry** 145 (2014) 109–114.
- 9 X. Li, Y. Jua, Y. Xua, W. Wanga, Y. Donga, Y. Maa, X. Chen. *On-line capillary electrophoresis enrichment by combining chitosan trapping with surfactant*

- assisted sample stacking for the ultratrace determination of organic acids in Plateau alfalfa roots. Analytica Chimica Acta* 789 (2013) 100–106.
- 10 O. Kritsunankul, B. Pramote, J. Jakmunee. *Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine. Talanta* 79 (2009) 1042–1049.
- 11 T. Kemmei, S. Kodama, A. Yamamoto, Y. Inoue, K. Hayakawa. *Reversed phase liquid chromatographic determination of organic acids using on-line complexation with copper (II) ion. Analytica Chimica Acta* 886 (2015) 194–199.
- 12 S. M. Oliveira, T. I. M. S. Lopes, I. V. Tóth, A. O. S. S. Rangel. *Simultaneous determination of tartaric acid and potassium in wines using a multicommuted flow system with dialysis. Talanta* 81 (2010) 1735–1741.
- 13 S. Bureau, D. Ruiz, M. Reich, B. Gouble, D. Bertrand, J-M. Audergon, C. M. G. C. Renard. *Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. Food Chemistry* 115 (2009) 1133–1140.
- 14 Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). *Official methods of analysis*. 15<sup>a</sup> ed. Washington: DC, 1990.
- 15 D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*, Trad. Sob a direção de Marco Tadeu Grassi. 8<sup>a</sup> edição. São Paulo: Cengage Learning, 2008.
- 16 A. S. Lourenço, R. F. Nascimento, A. C. Silva, W. F. Ribeiro, M. C. U. Araujo, S. C. B. Oliveira, V. B. Nascimento. *Voltammetric determination of tartaric acid in wines by electrocatalytic oxidation on a cobalt (II)-phthalocyanine-modified electrode associated with multiway calibration. Analytica Chimica Acta* 1008 (2018) 29–37.
- 17 R. E. Schmitt, H. R. Molitor, T. Wu. *Voltammetric Method for the Determination of Lactic Acid Using a Carbon Paste Electrode Modified with Cobalt Phthalocyanine. International Journal of Electrochemical Science* 7 (2012) 10835–10841.

- 18 R. F. Nascimento, T. M. G. Selva, W. F. Ribeiro, M. F. Belian, L. Angnes, V. B. Nascimento. *Flow-injection electrochemical determination of citric acid using a cobalto(II)-phthalocyanine modified carbon paste electrode*. **Talanta** 105 (2013) 354–359.
- 19 S. Shahrokhian, J. Yazdani. *Electrocatalytic oxidation of thioglycolic acid at carbon paste electrode modified with cobalt phthalocyanine: application as a potentiometric sensor*. **Electrochimica Acta** 48 (2003) 4143–4148.
- 20 H. Hosseini, M. Mahyari, A. Bagheri, A. Shaabani. *A novel bioelectrochemical sensing platform based on covalently attachment of cobalt phthalocyanine to graphene oxide*. **Biosensors and Bioelectronics** 52 (2014) 136–142.
- 21 D. Dini, M. Hanack. *In: The Porphyrin Handbook*. K. M. Kadish, K. M. Smith e R. Guilard. Academic Press: Nova Iorque - E.U.A. (Vol. 17) 107 (2003) 1 – 36.
- 22 B. R. Kozub, R. G. Compton. *Voltammetric studies of the redox mediator, cobalt phthalocyanine, with regard to its claimed electrocatalytic properties*. **Sensors and Actuators B** 147 (2010) 350–358.
- 23 M. L. Rodríguez-Méndez, C. Medina-Plaza, C. García-Hernández, S. Rodríguez, C. García-Cabezón, D. Paniagua, M. A. Rodríguez-Pérez, J. A. de Saja. *Improvement of electrocatalytic effect in voltammetric sensors based on phthalocyanines*. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** 20 (2016) 413–420.
- 24 M. L. Rodríguez-Méndez, M. Gay, J. A. de Saja. *New insights into sensors based on radical bisphthalocyanines*. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** 13 (2009) 1159–1167.
- 25 J. H. Zagal, S. Griveau, J. F. Silva, T. Nyokong, F. Bedioui. *Metallophthalocyanine-based molecular materials as catalysts for electrochemical reactions*. **Coordination Chemistry Reviews** 254 (2010) 2755–2791.
- 26 A. C. Olivieri. *Recent advances in analytical calibration with multi-way data*. **Analytical Methods** 4 (2012) 1876–1886.

- 27 J. A. Arancibia, P. C. Damiani, G. M. Escandar, G. A. Ibañez, A. C. Olivieri. *A review on second- and third-order multivariate calibration applied to chromatographic data*. **Journal of Chromatography B** 910 (2012) 22–30.
- 28 A. R. Jalalvand, H. C. Goicoechea. *Applications of electrochemical data analysis by multivariate curve resolution-alternating least squares*. **Trends in Analytical Chemistry** 88 (2017) 134–166.
- 29 A. C. Olivieri, G. M. Escandar, H. C. Goicoechea, A. M. Peña. *Unfolded and Multivias Partial Least-Squares with Residual Multilinearization: Applications*. In: L. M. C. Buydens, P. J. Schoenmakers. *Data Handling in Science and Technology*. Volume 29. Elsevier, 2015; 365–397.
- 30 A. R. Jalalvand, H. C. Goicoechea, D. N. Rutledge. *Applications and challenges of multi-way calibration in electrochemical analysis*. **Trends in Analytical Chemistry** 87 (2017) 32–48.
- 31 S. C. Ricke. *Perspectives on the Use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials*. **Poultry Science** 82 (2003) 632–639.
- 32 M. M. Theron, J. F. R. Lues. *Organic acids and food preservation*. Boca Raton: CRC Press, 2011.
- 33 M. Stratford, T. Eklund. *Organic acids and esters*, In: N. J. Russell, G. W. Gould. *Food preservatives*. 2ª edição. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003; 48–84.
- 34 M. M. Theron, J. F. R. Lues. *Organic Acids and Meat Preservation: A Review*. **Food Reviews International** 23 (2007) 141–158.
- 35 J. B. Gurtler, T. L. Mai. *Traditional Preservatives – Organic Acids*. In: M. Stratford. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Volume 3. Elsevier, 2014; 1729–1737.
- 36 E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, M. Nishida. *Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 28 (2002) 261–267.

- 37 Brasil. (2004). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 44. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B7772-1-0%5D.PDF>. Acessado em 05.07.2017.
- 38 Brasil. (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 5. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Bebidas%2BAlco%25C3%25B3licas%2Bn%25C3%25A3o%2Bfermentadas%2Brdc0005\\_04\\_02\\_2013.pdf/54890021-e35a-47ae-bb7e-2f0bc4adee31](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Bebidas%2BAlco%25C3%25B3licas%2Bn%25C3%25A3o%2Bfermentadas%2Brdc0005_04_02_2013.pdf/54890021-e35a-47ae-bb7e-2f0bc4adee31) Acessado em 05.07.2017.
- 39 Brasil. (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, CP nº. 69/2010. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/392707/Relatorio\\_Contribuicoesaditivos.pdf/5871a541-12f7-46da-9434-f70b11044147?version=1.0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/392707/Relatorio_Contribuicoesaditivos.pdf/5871a541-12f7-46da-9434-f70b11044147?version=1.0) Acessado em 05.07.2017.
- 40 A. M. Laury, M. V. Alvarado, G. Nace, C. Z. Alvarado, J. C. Brooks, A. Echeverry, M. M. Brashears. *Validation of a Lactic Acid– and Citric Acid–Based Antimicrobial Product for the Reduction of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on Beef Tips and Whole Chicken Carcasses*. **Journal of Food Protection** 72 (2009) 2208–2211.
- 41 E.C. Okolocha, L. Ellerbroek. *The influence of acid and alkaline treatments on pathogens and the shelf life of poultry meat*. **Food Control** 16 (2005) 217–225.
- 42 C. Medina-Plaza, C. García-Cabezón, C. García-Hernández, C. Bramorski, Y. Blanco-Val, F. Martín-Pedrosa, T. Kawai, J.A. de Saja, M.L. Rodríguez-Méndez. *Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir–Blodgett films based on functionalized nanoparticles*. **Analytica Chimica Acta** 853 (2015) 572–578.
- 43 A. Lianou, K. P. Koutsoumanis. *Organic acids and other chemical treatments for microbial decontamination of food*. In: A. Demirci, M.O. Ngadi. *Microbial Decontamination in the Food Industry*. Woodhead Publishing Limited, 2012; 592–664.
- 44 G. Du, L. Liu, J. Chen. *White Biotechnology for Organic Acids*. In: A. Pandey, R. Hofer, C. Larroche, M. Taherzadeh, M. Nampoothiri. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Copyright, 2015; 409–444.

- 45 K. L. Penniston, S. Y. Nakada, R. P. Holmes, D. G. Assimos. *Quantitative Assessment of Citric Acid in Lemon Juice, Lime Juice, and Commercially-Available Fruit Juice Products*. **Journal of Endourology** 22 (2008) 567–570.
- 46 A. Apelblat. *Citric Acid*. Switzerland: Springer International Publishing, 2014.
- 47 S. M. Ameen, G. Caruso. *Lactic Acid in the Food Industry*. 1ª edição. Springer International Publishing, 2017.
- 48 C. Aydogan, V. Karakoç, A. Denizli. *Chiral ligand-exchange separation and determination of malic acid enantiomers in apple juice by open-tubular capillary electrochromatography*. **Food Chemistry** 187 (2015) 130–134.
- 49 J. S. F. Santana, M. F. Balian, A. F. Lavorante. *A Spectrophotometric Procedure for Malic Acid Determination in Wines Employing a Multicommutation Approach*. **Analytical Sciences** 30 (2014) 657–661.
- 50 N. Sharma, M.K. Purkait. *Enantiomeric and racemic effect of tartaric acid on polysulfonemembrane during crystal violet dye removal by MEUF process*. **Journal of Water Process Engineering** 10 (2016) 104–112.
- 51 J. Gawronski, K. Gawronska. *Tartaric and Malic Acids in Synthesis*. New York: Wiley Interscience, 1999.
- 52 B. W. Zoecklein, K. C. Fugelsang, B. H. Gump, F. S. Nury. *Tartaric Acid and Its Salts*. In: B. W. Zoecklein, K. C. Fugelsang, B. H. Gump, F. S. Nury. *Production Wine Analysis*. Boston: Springer, 1990; 289–315.
- 53 H. Quitmann, R. Fan, P. Czermak. *Acidic Organic Compounds in Beverage, Food, and Feed Production*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** 143 (2014) 91–141.
- 54 Y. Li, Y. Xu, P. B. Schwarz, G. Gu. *Organic Acids of Commercial Beers in China: A Chemometric Study*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. 65 (2007) 86–91.
- 55 H. Li1, F. Liu. *Changes in Organic Acids During Beer Fermentation*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. 73 (2015) 275–279. 2015.

- 56 E. N. Fernandes, B. F. Reis. *Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process*. **Analytica Chimica Acta** 557 (2006) 380–386.
- 57 F. Lazaro, L. de Castro, M. Valcarcel. *Photometric Determination of Tartaric Acid in Wine by Flow Injection Analysis*. **Analyst** 3 (1986) 729–732.
- 58 R. Puchades, M. A. Herrero, A. Maquieira, J. Atienza. *Simultaneous Enzymatic Determination of L(-) Malic Acid and L(+) Lactic Acid in Wine by Flow Injection Analysis*. **Food Chemistry** 42 (1991) 167–182.
- 59 J. L. F. C. Lima, T. I. M. S. Lopes, A. O. S. S. Rangel. *Enzymatic determination of L(+) lactic and L(-) malic acids in wines by Flow-injection spectrophotometry*. **Analytica Chimica Acta** 366 (1998) 187–191.
- 60 C. Cajavilca, J. Varonb, G. L. Sternbach. *Luigi Galvani and the foundations of electrophysiology*. **Resuscitation** 80 (2009) 159–162.
- 61 E. A. Ticianelli, E. R. González. *Eletroquímica, princípios e aplicações*. 2ª edição. São Paulo, 2005.
- 62 P. Kurzweil. *History Electrochemistry*. Elsevier, 2009.
- 63 V. S. Bagotsky. *Fundamentals of Electrochemistry*, 2ª edição. Moscou: Wiley, 2001.
- 64 É. T. G. Cavalheiro, C. M. A. Brett, A. M. O. Brett, O. F. Filho. *Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds*. **Bioanalytical Reviews** 4 (2012) 31–53.
- 65 W. F. Pacheco, A. Doyle, D. R. A. Duarte, C. S. Ferraz, P. A. M. Farias, R. Q. Aucelio. *Square-Wave Adsorptive Stripping Voltammetry for Trace Determination of Dimoxystrobin and Azoxystrobin in Potatoes and Grapes*. **Food Analytical Methods** 3 (2010) 205–210.
- 66 C. Locatelli. *Catalytic-adsorptive stripping voltammetric determination of ultra-trace iridium (III). Application to fresh- and sea-water*. **Talanta** 85 (2011) 546–550.

- 67 D.A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman. *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- 68 A. J. Bard, G. Inzelt, F. Scholz. *Electrochemical Dictionary*. 1ª edição. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008.
- 69 A. M. O. Brett, C. M. A. Brett. *Eletroquímica Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.
- 70 A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*. 2ª edição. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- 71 J. Wang. *Analytical electrochemistry*. 3ª edição. New Jersey: John Wiley and Sons Ltd., 2006.
- 72 R. Greef, R. Peat, L. M. Peter, D. Pletcher, J. Robinson. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Southampton Electrochemistry Group. Chichester: Ellis Horwood, 1985.
- 73 E. Laborda, J. González, Á. Molina. *Recent advances on the theory of pulse techniques: A mini review*. **Electrochemistry Communications** 43 (2014) 25–30.
- 74 D. Souza, S. A. S. Machado, L. A. Avaca. *Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos*. **Química Nova** 26 (2003) 81–89.
- 75 D. C. Harris. *Análise química quantitativa*. Tradução de Carlos Alberto da Silva Riehl e Alcides Wagner Serpa Guarino. 5ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- 76 D. Souza, L. Codognoto, A. R. Malagutti, R. A. Toledo, V. A. Pedrosa, R. T. S. Oliveira, L. H. Mazo, L. A. Avaca, S. A. S. Machado. *Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações*. **Química Nova** 27 (2004) 790–797.
- 77 V. A. Pedrosa, L. Codognoto, L. A. Avaca. *Determinação Voltamétrica de 4-Clorofenol sobre o Eletrodo de Diamante Dopado Com Boro Utilizando a Voltametria de Onda Quadrada*. **Química Nova** 26 (2003) 844–849.
- 78 A. Fagan-Murphy, M. C. Allen, B. A. Patel. *Chemically modified multiwall carbon nanotube composite electrodes: An assessment of fabrication strategies*. **Electrochimica Acta** 152 (2015) 249–254.

- 79 R. R. Chillawar, K. K. Tadi, R. V. Motghare. *Voltammetric Techniques at Chemically Modified Electrodes*. **Journal of Analytical in Chemistry** 70 (2015) 399–418.
- 80 M. Parsaei, Z. Asadi, S. Khodadoust. *A sensitive electrochemical sensor for rapid and selective determination of nitrite ion in water samples using modified carbon paste electrode with a newly synthesized cobalt(II)-Schiff base complex and magnetite nanospheres*. **Sensors and Actuators B** 220 (2015) 1131–1138.
- 81 S. E. Q. Carvalho. *Desenvolvimento e aplicações de eletrodos quimicamente modificados com Hexacianoferratos do metais Fe, Ni e Co*, 2011. São Carlos – SP.
- 82 T. Kuwana, W. G. French. *Eletrooxidation or reduction of organic compound into aqueous solutions using carbon paste electrode*. **Analytical Chemistry** 36 (1964) 241–242.
- 83 F. A. Schultz, T. Kuwana. *Electrochemical studies of organic compounds dissolved in carbon-paste electrodes*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 10 (1965) 95–103.
- 84 L. M. P. C. Centurion. *Imobilização de ftalocaninas em filmes nanoestruturados e aplicações em sensores*, 2010. São Carlos – SP.
- 85 L. B. Negri. *Complexos rutênio-ftalocianina como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos*, 2015. Ribeirão Preto – SP.
- 86 C. E. Dent, R. P. Linstead, A. R. J. Lowe. Phthalocyanines. *Part VI. The structure of phthalocyanines*. **Journal of the Chemical Society** 2 (1934) 1033–1039.
- 87 R. P. Linstead, J. Monteathr Robertsn. *The Stereochemistry of Metallic Phthalocyanines*. **Journal of the Chemical Society** (1936) 1738 – 1736.
- 88 H. de Diesbaeh, E. Von Der Weid. *Quelques sels complexes des o-dinitriles avec le euivre et la pyridine*. **Helvetica Chimica Acta** 10 (1927) 886 – 888.
- 89 P. M. Matlaba. *Synthesis of zinc phthalocyanine derivatives for possible use in photodynamic therapy*, 2002. Grahamstown.

- 90 V. N. Nemykin, S. V. Dudkin, F. Dumoulin, C. Hirel, A. G. Gurek, V. Ahsen. *Synthetic approaches to asymmetry phthalocyanines and their analogues*. **Arkivoc** 1 (2014) 42–204.
- 91 M. Isaacs, M. J. Aguirre, A. Toro-Labbè, J. Costamagna, M. Pàez, J. H. Zagal. *Comparative study of the electrocatalytic activity of cobalt phthalocyanine and cobalt naphthalocyanine for the reduction of oxygen and the oxidation of hydrazine*. **Electrochemical Acta** 43 (1997) 1821–1827.
- 92 J. Zagal, M. Pgez, A. A. Tanaka, J. R. dos Santos Jr. C. A. Linkous. *Electrocatalytic activity of metal phthalocyanines for oxygen reduction*. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 339 (1992) 13 – 30.
- 93 S. Maree, T. Nyokong. *Electrocatalytic behavior of substituted cobalt phthalocyanines towards the oxidation of cysteine*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 492 (2000) 120–127.
- 94 A. C. Boni, A. Wong, R. A. F. Dutra, M. D. P. T. Sotomayor. *Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dipyrone using FIA*. **Talanta** 85 (2011) 2067–2073.
- 95 W. A. Nevin, M. R. Hempstead, W. Liu, C. C. Leznoff, A. B. P. Lever. *Electrochemistry and Spectroelectrochemistry of Mononuclear and Binuclear Cobalt Phthalocyanines*. **Inorganic Chemistry** 26 (1987) 570 – 577.
- 96 B. Caballero, P. M. Finglas, F. Toldrá. *Encyclopedia of Food and Health*. 1ª edição. Oxford: Academic Press, 2016.
- 97 K. Esbensen, P. Geladi. *The Start and Early History of Chemometrics: Selected Interviews. Part 2*. **Journal of Chemometrics** 4 (1990) 389–412.
- 98 J. N. Miller, J. C. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6ª edição. Pearson, 2010.
- 99 T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen, R. Bergman. *Experimental design and optimization*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 42 (1998) 3–40.

- 100 R. G. Brereton. *Pattern recognition in chemometrics*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 149 (2015) 90–96.
- 101 K. Danzer. *Analytical Chemistry Theoretical and Metrological Fundamentals*. Berlin: Springer, 2007.
- 102 A. Olivieri, G. Escandar. *Calibration Scenarios*. In: A. Olivieri, G. Escandar. *Practical Three-Way Calibration*. 1ª edição. Elsevier, 2014; 1–9.
- 103 P. Koscielniak, M. Wiczorek. *Univariate analytical calibration methods and procedures. A review*. **Analytica Chimica Acta** 944 (2016) 14–28.
- 104 B. B. Neto, M. F. Pimentel, M. C. U. Araújo. *Recomendações para Calibração em Química Analítica - Parte I. Fundamentos e Calibração com um Componente (Calibração Univariada)*. **Quimica Nova** 25 (2002) 856–865.
- 105 A. C. Olivieri, S. Bortolato, F. Allegrini. *Figures of Merit in Multivias Calibration*. In: L. M. C. Buydens, P. J. Schoenmakers. *Data Handling in Science and Technology*. Volume 29. Elsevier, 2015; 541–575.
- 106 M. F. Pimentel, R. K. H. Galvão, M. C. U. Araújo. *Recomendações para Calibração em Química Analítica Parte 2. Calibração Multianalito*. **Quimica Nova** 31 (2008) 462–467.
- 107 D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. 1ª edição. Amsterdam Elsevier, 1997.
- 108 R. Bro. *Multivariate calibration What is in chemometrics for the analytical chemist?*. **Analytica Chimica Acta** 500 (2003) 185–194.
- 109 V. Gómez, M. P. Callao. *Analytical applications of second-order calibration methods*. **Analytica Chimica Acta** 627 (2008) 169–183.
- 110 S. Mas, A. Juan, R. Tauler, A. C. Olivieri, G. M. Escandar. *Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review*. **Talanta** 80 (2010) 1052–1067.

- 111 G. M. Escandar, N. M. Faber, H. C. Goicoechea, A. M. Peña, A. C. Olivieri, R. J. Poppi. *Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications*. **Trends in Analytical Chemistry** 26 (2007).752–765.
- 112 A.C. Olivieri, G.M. Escandar, A. M. Peña. *Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms*. **Trends in Analytical Chemistry** 30 (2011) 607–617.
- 113 E. Sanchez, B. R. Kowalski. *Tensorial Calibration: II. Second-Order Calibration*. **Journal of Chemometrics** 2 (1988) 265–280.
- 114 G. M. Escandar, H. C. Goicoechea, A. M. Peña, A. C. Olivieri. *Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial*. **Analytica Chimica Acta** 806 (2014) 8–26.
- 115 K. S. Booksh, B. R. Kowalski. *Theory of Analytical Chemistry*. **Analytical Chemistry** 66 (1994) 782–791.
- 116 J. M. Amigo, F. Marini. *Multivias Methods*. In: C. Ruckebusch. *Data Handling in Science and Technology*. Volume 28. Elsevier, 2013; 265–313.
- 117 A. K. Smilde, R. Bro, P. Geladi. *Multi-way analysis*. Chichester: Wiley & Sons; 2004.
- 118 R. Bro, E. M. Qannari, H. A. L. Kiers, T. Næs, M. B. Frøst. *Multi-way models for sensory profiling data*. **Journal. Chemometrics** 22 (2008) 36–45.
- 119 A. M PEÑA, H. C. GOICOECHEA, G. M. ESCANDAR, A. C. OLIVIERI. *Fundamentals and Analytical Applications of Multivias Calibration*. 1ª edição. Elsevier, 2015.
- 120 A. C. Olivieri, G. M. Escandar, H. C. Goicoechea, A. M. Peña. *Unfolded and Multivias Partial Least-Squares with Residual Multilinearization: Fundamentals*. In: L. M. C. Buydens, P. J. Schoenmakers. *Data Handling in Science and Technology*. Volume 29. Elsevier, 2015; 347–363.
- 121 S. Wold, P. Geladi, K. Esbensen, J. Ohman. *Multi-Way Principal Components and PLS-Analysis*. **Journal of Chemometrics** 1 (1987) 41–56.

- 122 A. Olivieri, G. Escandar. *Application Example: MCR-ALS*. In: A. Olivieri, G. Escandar. *Practical Three-Way Calibration*. 1ª edição. Elsevier, 2014; 251–271.
- 123 A. Olivieri, G. Escandar. *Multivariate Curve Resolution–Alternating Least-Squares*. In: A. Olivieri, G. Escandar. *Practical Three-Way Calibration*. 1ª edição. Elsevier, 2014; 127–156.
- 124 R. Tauler, A. Juan. *Multivariate Curve Resolution for Quantitative Analysis*. In: L. M. C. Buydens, P. J. Schoenmakers. *Data Handling in Science and Technology*. Volume 29. Elsevier, 2015; 247–292.
- 125 H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri, R. Tauler. *Application of the correlation constrained multivariate curve resolution alternating least-squares method for analyte quantitation in the presence of unexpected interferences using first-order instrumental data*. **Analyst** 135 (2010) 636–642.
- 126 M. Alier, R. Tauler. *Multivariate Curve Resolution of incomplete data multisets*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 127 (2013) 17–28.
- 127 P. H. C. Eilers, I. D. Currie, M. Durbán. *Fast and compact smoothing on large multidimensional grids*. **Computational Statistics & Data Analysis** 50 (2006) 61–76.
- 128 A. R. Jalalvand, M. Roushani, H. C. Goicoechea, D. N. Rutledge, Hui-Wen Gu. *MATLAB in electrochemistry: A review*. **Talanta** 194 (2019) 205–225.
- 129 N-P. V. Nielsen, J. M. Carstensen, J. Smedsgaard. *Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimized warping*. **Journal of Chromatography A** 805 (1998) 17–35.
- 130 G. Tomasi, F. Savorani, S. B. Engelsen. *icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data*. **Journal of Chromatography A**, 1218 (2011) 7832–7840.
- 131 R. H. Jellema. *Variable Shift and Alignment*. *TNO Quality of Life*. The Netherlands: Zeist, 2009.

- 132 J. S. Ribeiro, F. Augusto, M. M. C. Ferreira. *Uso de Perfis Cromatográficos de Voláteis de Café Arábica torrados para a diferenciação das amostras segundo o sabor, o aroma e a qualidade da bebida*. **Química Nova** 33 (2010) 1897 - 1904.
- 133 G. Saccani, S. Gherardi, A. Trifirò, C. S. Bordini, M. Calza, C. Freddi. *Use of ion chromatography for the measurement of organic acids in fruit juices*. **Journal of Chromatography A**, 706 (1995) 395–403.
- 134 G. Shui, L. P. Leong. *Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography*. **Journal of Chromatography A** 977 (2002) 89–96.
- 135 F. Chinnici, U. Spinabelli, C. Riponi, A. Amati. *Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography*. **Journal of Food Composition and Analysis** 18 (2005) 121–130.
- 136 H. Kelebek, S. Selli, A. Canbas, T. Cabaroglu. *HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan*. **Microchemical Journal** 91 (2009) 187–192.
- 137 R. Scherer, A. C. P. Rybka, C. A. Ballus, A. D. Meinhart, J. T. Filho, H. T. Godoy. *Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices*. **Food Chemistry** 135 (2012) 150–154.
- 138 M. Navarro-Pascual-Ahuir, M. J. Lerma-García, E. F. Simó-Alfonso, J. M. Herrero-Martínez. *Quality control of fruit juices by using organic acids determined by capillary zone electrophoresis with poly(vinyl alcohol)-coated bubble cell capillaries*. **Food Chemistry** 188 (2015) 596–603.
- 139 N. J. Goosen, D. Oosthuizen, M. A. Stander, A. I. Dabai, M.-M. Pedavoah, G.O. Usman. *Phenolics, organic acids and minerals in the fruit juice of the indigenous African sourplum (*Ximenia caffra*, Olacaceae)*. **South African Journal of Botany** 119 (2018) 11–16.
- 140 R. N. Kacker, E. S. Lagergren, J. J. Filliben. *Taguchi's orthogonal arrays are classical designs of experiments*. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**. 96 (1991) 577–591.

- 141 Cavazzuti, M. *Optimization methods: From theory to design*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.
- 142 V. N. Gaitonde, S. R. Karnik, B. T. Achyutha, B. Siddeswarappa. *Multi-response optimization in drilling using Taguchi's quality loss function*. **Indian Journal of Engineering and Materials Sciences** 13 (2006) 484 – 488.
- 143 A. C. Olivieri, H-L. Wu, R-Q Yu. *MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 96 (2009) 246 – 251.
- 144 D. D. Perrin, B. Dempsey, E. P. Serjeant. *pKa Prediction for Organic Acids and Bases*. London: Chapman&Hall, 1981.
- 145 J. I. Gowda, S. T. Nandibewoor. *Electrochemical behavior of paclitaxel and its determination at glassy carbon electrode*. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences** 9 (2014) 42 – 49.
- 146 D. K. Gosser Jr. *Cyclic Voltammetry: Simulations and analysis of a reaction mechanisms*. New York: Wiley-VHC, 1993.
- 147 A. O. Agyeman. *Adsorption Studies and Selective Determination of Epinephrine at Glycerol-Clay Modified Glassy Carbon Electrode*. **International Journal of Electrochemical Science** 12 (2017) 9601–9618.
- 148 C. G. ZOSKI. *Handbook of Eletrochemistry*. 1ª edição. Netherlands: Elsevier, 2006.

---

Capítulo 8.  
**APÊNDICE**

---

## 8. Apêndice

### Artigo da tese

Food Chemistry 266 (2018) 232–239



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)



Simultaneous voltammetric determination of four organic acids in fruit juices using multiway calibration



Amanda C. Silva, Anabel S. Lourenço, Mario Cesar Ugulino de Araujo\*

*Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA), Universidade Federal da Paraíba, CCEN, Departamento de Química, Caixa Postal 5093, CEP 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil*