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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA MULTIVARIADA SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Glaucio Jefferson Araújo Gomes

João Pessoa/PB - Brasil
Agosto/2015

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Determinação voltamétrica multivariada simultânea de compostos fenólicos

Glaucio Jefferson Araújo Gomes*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos

*** Bolsista**

CAPES

João Pessoa/PB - Brasil

Agosto /2015

DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA MULTIVARIADA SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Glaucio Jefferson Araújo Gomes e aprovada pela banca examinadora em 04 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Williame Farias Ribeiro
Examinador

Profa. Dra. Cláudia de Oliveira Cunha
Examinadora

DEDICATÓRIA

A meus pais Maria das Graças e Francisco Gomes e a minha irmã, Glaucia, por me ensinarem o verdadeiro sentido de ser família,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, pois só cheguei até aqui por ser sustentado por sua bondade infinita, sendo atendido até no que eu não soube pedir.
- A meus **Pais** e minha **Irmã**, por sempre me apoiarem em tudo.
- Ao professor **Sherlan Lemos**, pela amizade, paciência e disposição a compartilhar conhecimento.
- Aos Professores **Claudia Cunha**, **Marcio Coelho** e **Williame Farias** pelas valiosas contribuições, tão importantes à conclusão deste ciclo.
- Às Professoras **Claudia Braga**, **Conceição Barreto** e **Teresa Saldanha** pelo exemplo e por sempre demonstrarem acreditar no meu potencial, me incentivando a seguir nesta jornada.
- Aos companheiros de caminhada acadêmica, **Aline Pontes**, **Anabel Lourenço**, **Darciely Lindalva**, **Eduardo Matos**, **Jéssica Medeiros**, **Maria Daisy**, **Mayara Barbosa**, **Philipe Diego** e **Romulo Wilker**, por toda força e por sempre fazerem todo esse caminho valer a pena.
- Aos amigos **Aldemy Bezerra**, **Fernanda Barboza**, **Fernando Domingos**, **Flávia Alencar**, **Jacinete Lima** e **Jailto Filho**, por me mostrarem que nem só nas exatas há gente boa, e sempre suportar toda minha chatice.
- Aos amigos **Dilma Soares**, **Janaina Duarte**, **Jouberty Leite** e **Maria J. Bada**, bem como a todos aqueles que perto ou longe, sempre se fazem presentes desejando-me o melhor e torcendo por meu sucesso.
- A todos os **amigos do Laboratório de Estudos em Química Ambiental** (LEQA) por todo apoio e companheirismo, assim como a **Natane Tavares** pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.
- À Universidade Federal da Paraíba, ao Departamento de química e ao Programa de Pós-Graduação e Química da UFPB.
- A **CAPES** pela bolsa concedida.

"Porque nós estamos nas suas mãos, nós e nossos discursos, toda a nossa inteligência e nossa habilidade; foi Ele quem me deu a verdadeira ciência de todas as coisas, quem me fez conhecer a constituição do mundo e as virtudes dos elementos [...] porque foi a sabedoria, criadora de todas as coisas, que mo ensinou." (Sb 7, 16)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ix
LISTA DE TABELAS xi
LISTA DE ABREVIATURAS xii
RESUMO xiii
ABSTRACT xiv
1. INTRODUÇÃO 15
2. OBJETIVOS 18
2.1. Objetivo geral 18
2.2. Objetivos específicos 18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 19
3.1. Compostos fenólicos e a saúde 19
3.2. Determinação de hidroxibenzenos 19
3.3. Voltametria 21
3.4. Técnicas Voltamétricas de Pulso 23
3.5. Determinação eletroquímica simultânea de compostos fenólicos 25
3.6. Planejamento experimental 26
3.7. Planejamento Brereton 27
3.8. Calibração multivariada 28
3.9. Regressão por quadrados mínimos parciais - PLS 28
3.10. Regressão linear múltipla - MLR 30
3.11. Algoritmo das projeções sucessivas - SPA 30
3.12. Algoritmo genético - GA 31
4. EXPERIMENTAL 34
4.1. Reagentes e soluções 34
4.2. Instrumentação 34
4.3. Procedimento experimental 37
4.4. Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial 39
4.5. Parâmetros de desempenho 39
4.6. Planejamento Brereton 41

4.7. Análise quimiométrica 43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
5.1. Avaliação do eletrodo de trabalho 44
5.2. Estudo do pH e eletrólito suporte 46
5.3. Pré-concentração adsortiva 53
5.4. Parâmetros da varredura eletroquímica 55
5.5. Determinação individual dos fenóis 60
5.6. Planejamento Brereton 64
5.7. Análise quimiométrica 65
6. CONCLUSÕES 74
REFERÊNCIAS 75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas dos dihidroxibenzenos e hidroxitolueno. 16

Figura 2 - Modelos da dupla camada életrica para uma camada carregada positivamente: (a) modelo de Helmholtz; (b) modelo de Gouy-Chapman; (c) modelo de Stern. d: distância da dupla camada descrita por Helmholtz. Ψ_0 e Ψ: potenciais na superficie do eletrodo e na interface eletrodo/solução [46]..... 22

Figura 3 - A: Esquema de aplicação dos pulsos de potencial na voltametrica de pulso diferencial. 1 e 2 correspondem aos momentos de coleta da corrente observada. B: Forma de sinal obtido para esta técnica [44]. 24

Figura 4 - Procedimento empregado na modificação do eletrodo de carbono vítreo. As etapas 3 e 4 foram repetidas até a observação de um filme uniforme de NTC. 36

Figura 5 – Esquema do eletrodo de pasta de nanotubos de carbono utilizado. . 37

Figura 6 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com diferentes eletrodos na determinação de 60 µmol L^{-1} de cada analito. Δp: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s. TBR pH 5,0. 44

Figura 7 - Variação do pico de oxidação da hidroquinona em função do pH. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s. 47

Figura 8 - Variação do pico de oxidação do catecol em função do pH. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s. 48

Figura 9 - Variação do pico de oxidação do p-cresol em função do pH. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s. 48

Figura 10 - Variação do pico de oxidação do resorcinol em função do pH. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s. 49

Figura 11 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na avaliação de diferentes tampões a pH 5,0 para a determinação de HQ, CC, CR e RS. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05 s. 50

Figura 12 - Variação do potencial de pico com o pH do meio para a oxidação de hidroquinona, catecol, p-cresol e resorcinol. 51

Figura 13 - Processos reversíveis ocorridos na oxidação da hidroquinona (A) e do catecol (B) na formação da benzoquinona [86] 52

Figura 14 - Processos de formação da benzoquinona a partir de fenois p-substituidos como o p-cresol 52

Figura 15 - Variação da densidade de corrente observada em função das etapas prévias de acumulação, usando potenciais de 0,0V e -0,2V e tempos de 60s e 120s. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05 s. TBR pH 5,0. 54

Figura 16 - Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de hidroquinona. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura. 56

Figura 17 - Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de catecol. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura. 56

Figura 18 - Interação de segunda ordem entre amplitude e tempo de pulso sobre a densidade de corrente observada para as análises de HQ e CC..... 57

Figura 19 -Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de resorcinol. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura. 58

Figura 20 - Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de p-cresol. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura. 58

Figura 21 – Superfícies de resposta sobre o efeito dos fatores estudados em relação à densidade de corrente para a análise de HQ, CC, CR e RS. 59

Figura 22 - Curva analítica para determinação univariada de hidroquinona. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações. ... 61

Figura 23 - Curva analítica para determinação univariada de catecol. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações. 62

Figura 24 - Curva analítica para determinação univariada de resorcinol. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações. 62

Figura 25 - Curva analítica para determinação univariada de p-cresol. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações. 63

Figura 26 - Voltamogramas de pulso diferencial das misturas obtidas pela execução do planejamento Brereton. TBR pH 5,0. 65

Figura 27 -Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo MLR de determinação de hidroquinona. 67

Figura 28 - Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo na análise de catecol 69

Figura 29 -Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo na análise de resorcinol. 70

Figura 30 - Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo na análise de p-cresol 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2^3 completo executado para definição dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial 39

Tabela 2 - Equações da ANOVA para um modelo de regressão MMQ 40

Tabela 3 – Misturas utilizadas como conjunto de calibração. 42

Tabela 4 - Misturas utilizadas para validação externa. 42

Tabela 5 - Efeitos calculados no planejamento fatorial completo 2^3 para os parâmetros de varredura eletroquímica 55

Tabela 6 – Resultados da Análise de variância obtidos para metodologia univariada testada 64

Tabela 7 – Parâmetros de desempenho analítico obtidos para metodologia de análise univariada dos compostos estudados. 64

Tabela 8 – Resultados para validação interna dos modelos gerados com PLS. . 65

Tabela 9 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de hidroquinona. 67

Tabela 10 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de catecol. .. 68

Tabela 11 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de resorcinol. 69

Tabela 12 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de cresol. 71

Tabela 13 - Coeficientes dos modelos obtidos para cada analito 72

Tabela 14 – Previsão por validação externa das misturas teste. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

Δp: Amplitude de pulso

Δs: Incremento de potencial

ν: velocidade de varredura

ECVM: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono

ECV: Eletrodo de carbono vítreo

EMPt: Eletrodo metálico de platina

EPNC: Eletrodo de pasta de nanotubos de carbono

GA: genetic algorithm (algoritmo genético)

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MLR: multiple linear regression (regressão linear múltipla)

MWCN: multi-walled carbon nanotubes

PCR: principal components regression (regressão em componentes principais)

PLS: partial least-squares (mínimos quadrados parciais)

RMSECV: Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada

RMSEP: Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão

SG: Savitzky–Golay filter

SNV: Standard Normal Variate (transformação padrão normal de variação)

SPA: Successive projections algorithm (algoritmo das projeções sucessivas)

SWCN: single-walled carbon nanotubes

TBR: Solução-tampão Britton-Robinson

TFS: Solução-tampão fosfato dissódico/ácido cítrico

TFT: Solução-tampão biftalato/hidróxido de sódio

Tp: Tempo de pulso

USEPA:US Environmental Protection Agency

VPD: Voltametria de pulso diferencial

VPN: Voltametria de pulso normal

RESUMO

GOMES, G. J. A. **Determinação voltamétrica multivariada simultânea de compostos fenólicos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2015.

Os compostos fenólicos hidroquinona (HQ), catecol (CC), resorcinol (RS) e cresol (CR) apresentam larga aplicação industrial e estão atualmente presentes no meio ambiente como resultado da atividade humana. Estes compostos podem constituir uma ameaça a vários sistemas ambientais, uma vez que são de difícil degradação e apresentam elevada toxicidade. Este trabalho visa desenvolver um método para determinação simultânea destes compostos fenólicos, associando a determinação eletroquímica a análise multivariada. Para isso, quatro tipos de eletrodos foram testados usando voltametria de pulso diferencial, cujos parâmetros foram otimizados pela execução de um planejamento fatorial 2^3 completo. O conjunto de calibração foi obtido pela execução de um planejamento fatorial tipo Brereton com quatro componentes em cinco níveis. Foram testados modelos obtidos pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS) e o método da regressão linear múltipla associada a seleção de varáveis pelo algoritmo genético (GA-MLR) ou pelo algoritmo das projeções sucessivas (SPA-MLR). Verificou-se que o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono apresentou resposta eletroquímica mais sensível a HQ, CT e CR e RS nos potenciais 0,20V, 0,30V, 0,65 e 0,75V, respectivamente. Além disso, os modelos obtidos pelo GA-MLR apresentaram a melhor previsão da concentração dos analitos em concentrações micromolares.

Palavras chave: compostos fenólicos, voltametria, determinação simultânea, análise multivariada.

ABSTRACT

GOMES, G. J. A. **Simultaneous multivariate voltammetric determination of phenolic compounds** . 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2015.

Phenolic compounds hydroquinone, catechol, resorcinol and cresol have a wide industrial application and are currently present in the environment especially because of human activity. These compounds can pose a threat to various environmental systems, since they are difficult to degrade and exhibit high toxicity. This work aims to develop a method for simultaneous determination of these phenolic compounds, associating the electrochemical determination to multivariate analysis. For this, four types of electrodes were tested using differential pulse voltammetry, whose parameters were optimized by performing a complete 2^3 factorial design. Calibration set was obtained by performing a Brereton-type factorial design in five levels. Partial least squares (PLS) and multiple linear regression associated with selection of variables by the genetic algorithm (GA-MLR) or by the successive projections algorithm (SPA-MLR) were used as regression techniques. It was found that the carbon nanotubes paste electrode showed electrochemical response to HQ, CC, RS and CR at 0.2V, 0.3V, 0.75V and 0.65V, respectively. Models obtained by GA-MLR showed the best predictions of the concentrations of the studied analytes in the micromolar range.

Keywords: phenolic compounds, voltammetry, simultaneous determination, multivariate analysis.

1. INTRODUÇÃO

Os hidroxibenzenos são moléculas que resultam da adição de pelo menos um grupo hidroxila a um benzeno. Essas estruturas também são conhecidas como compostos fenólicos [1] e podem estar presentes naturalmente no meio ambiente, na forma de produtos de processos de degradação biológica [2]**.** Alguns compostos fenólicos são encontrados, por exemplo, na água do mar como resultado da ação de algas vermelhas. Mesmo assim, a poluição ainda é a principal fonte de absorção do fenol por organismos aquáticos [3].

Os compostos fenólicos também estão presentes no meio ambiente como resultado de atividades antrópicas tais como mineração de carvão, refino de petróleo, produção de tintas, polímeros e medicamentos, além dos resíduos agrícolas e efluentes industriais [4] De maneira geral, os efluentes industriais contêm mais de um tipo de poluente fenólico e, via de regra, quanto mais complexa for a estrutura fenólica, mais elevada é sua toxicidade e os danos que pode causar a diferentes ecossistemas [5]. Por exemplo, a presença de concentrações elevadas de compostos fenólicos em corpos aquáticos pode afetar as propriedades organolépticas da água, podendo ocorrer a interação destes compostos com o cloro proveniente utilizado no tratamento desta, levando a formação de clorofenóis e policlorofenóis que são carcinogênicos [6,7].

Os isômeros posicionais hidroquinona (HQ), catecol (CC) e resorcinol (RS) são conhecidos como dihidroxibenzenos ou benzenodióis, por apresentar em sua estrutura dois grupos OH ligados a um anel benzênico. Os cresóis (CR), também chamados de hidroxitoluenos ou metilfenóis, também compõem um grupo de compostos químicos fenólicos, naturais ou manufaturados, que são formados basicamente pela adição de um grupo metil a um benzeno. A **Figura 1** apresenta as estruturas dos dihidroxibenzenos e hidroxitolueno.

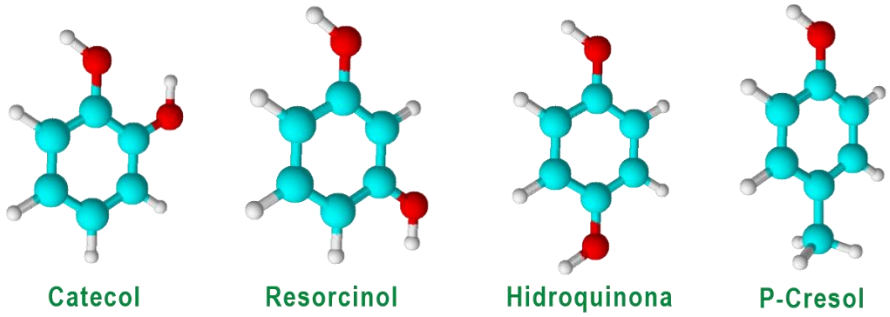

Figura 1 - Estruturas dos dihidroxibenzenos e hidroxitolueno.

Entre as várias aplicações industriais para HQ, CC, RS e CR podemos destacar a produção de cosméticos, antioxidantes, antissépticos e resinas [8]. A HQ é um constituinte de reveladores fotográficos e borracha medicinal, além de ser usada como inibidor de polimerização, como intermediário na produção de corantes, e como agente redutor em sínteses orgânicas [9]. Já o CC é usado como antisséptico, na fabricação de estabilizadores leves, na aplicação de corantes e tintas especificas, além da produção de antioxidantes [10]. Hidroquinona e catecol também podem estar presentes em loções bronzeadoras e em outros cosméticos [11]. O RS também encontra várias aplicações na fabricação de produtos farmacêuticos, adesivos, resinas sintéticas, tintas e antissépticos [12]. O CR é um composto largamente utilizado como desinfetante e antioxidante alimentício. Além disso, também é empregado na flotação de minérios e na produção de resinas fenólicas [13,14].

Considerando-se a dificuldade de degradação desses compostos na natureza [15] e sua capacidade de interferir sobre diversos sistemas [16], a presença destas substâncias na forma de contaminantes constitui um importante problema ambiental. Muitos compostos fenólicos já são reportados como carcinogênicos [17], e a grande maioria oferece algum risco sobre a saúde de animais e plantas, especialmente em sistemas aquáticos [18].

A resolução CONAMA nº 357, de 18 de março de 2005, revogou a Resolução CONAMA 20/86 e define como padrão de lançamento para efluentes industriais o teor máximo de 0,5 mg/L de fenóis totais, que pode

ser expresso como C_6H_5OH [19]. Daí, a importância do desenvolvimento de metodologias que permitam o monitoramento da quantidade desses contaminantes em diferentes ambientes, auxiliando políticas de atenção à saúde e o bem estar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para determinação simultânea de hidroquinona, catecol, p-cresol e resorcinol, por voltametria de pulso diferencial associada às técnicas de calibração multivariada.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar um eletrodo que apresente resposta por VPD mais sensível à hidroquinona, catecol, resorcinol e p-cresol.
- Estabelecer as condições experimentais (parâmetros da voltametria de pulso diferencial e eletrólito de suporte) adequadas à determinação simultânea destes contaminantes.
- Obter e avaliar modelos de calibração multivariada gerados pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS) e pelo método da regressão linear múltipla associada a seleção de varáveis pelo algoritmo genético (GA-MLR) ou pelo algoritmo das projeções sucessivas (SPA-MLR), para a análise simultânea destes contaminantes.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Compostos fenólicos e a saúde

Uma vez que apresentam estruturas e propriedades similares e são fornecidos tanto por fontes naturais quanto pela ação humana, os compostos fenólicos coexistem no meio ambiente [20], e podem agir como contaminantes para diversos sistemas biológicos inclusive para humanos [21]. No corpo humano, os dihidroxibenzenos podem ser introduzidos através dos sistemas digestivo, respiratório, ou até mesmo pelo contato com a pele e mucosas [22].

Ao longo dos anos foram reportados vários possíveis danos à saúde que o contato com essas substâncias pode causar [23]. O CC é classificado pela *International Agency for Research on Cancer* no grupo de substâncias potenciais causadoras de câncer [24,25] uma vez que reage com várias biomoléculas, podendo causar danos irreparáveis ao DNA e, consequentemente, à saúde humana [26,27]. Seres humanos expostos a elevadas quantidades de HQ podem apresentar desde sintomas simples como fadiga e dor de cabeça, até o desenvolvimento de sérios problemas renais, ou a morte [22,28].

A absorção do CC e da HQ pelo sistema digestivo pode induzir a diminuição da função hepática e degeneração do tubo renal [29]. A inalação de altas quantidades de RS pode causar a morte direta de humanos [30]. Por sua vez, os cresóis também são classificados como possíveis causadores de câncer em humanos pela *US Environmental Protection Agency* (USEPA) [31].

3.2. Determinação de hidroxibenzenos

Nos últimos anos foram realizados muitos trabalhos voltados ao desenvolvimento de metodologias rápidas e eficazes na determinação (preferencialmente simultânea) destes analitos. Para isso, diversas técnicas analíticas vêm sendo aplicadas [32,33].

Em espectroscopia é reportado o uso de quimiluminescência e de fluorescência sincrônica [34,35] no desenvolvimento de metodologias para análise de dihidroxibenzenos. No entanto, para a maioria das determinações baseadas em técnicas espectroscópicas, verifica-se a elevada proximidade, ou até mesmo sobreposição, de comprimentos de onda dos sinais observados para esses compostos [36], tornando quase sempre inviável sua determinação simultânea. Também são encontrados métodos que empregam a cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas [37] e a cromatografia líquida de alta eficiência [38,39].

A análise quantitativa de compostos fenólicos também vem sendo realizada por técnicas eletroquímicas [40], uma vez que, em relação a maioria das técnicas espectroscópicas, essas técnicas apresentam algumas vantagens como, rápida resposta, alta sensibilidade e seletividade, baixos limites de detecção e custo, além da possibilidade de determinação simultânea e a dispensa de etapas de separação ou preparação de amostras [41].

Apesar de muitos compostos fenólicos apresentarem eletroatividade, geralmente as metodologias eletroquímicas propostas também apresentam sensibilidade e seletividade prejudicadas pela proximidade, ou sobreposição, dos picos de oxidação destes analitos [40], fenômeno equivalente ao observado para os métodos espectroscópicos. Então, faz-se necessária a adoção de recursos que permitam a melhoria na aquisição e processamento das respostas eletroquímicas geradas, permitindo assim a obtenção de uma boa resolução destes sinais, tais como a modificação de eletrodos ou a utilização de metodologias avançadas para o tratamento dos dados obtidos.

3.3. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície de um eletrodo e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas principalmente por meio da medição da magnitude da corrente elétrica proveniente de processos como oxidação e/ou redução de espécies [42].

A corrente que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar pode ser dividida em duas componentes básicas: corrente faradaica (if) e corrente capacitiva (ic). A corrente faradaica é originada dos processos de oxidação e redução que ocorrem na interface eletrodo-solução. Ela emerge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar quando um potencial é aplicado no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência. Esse sinal de corrente se relaciona a taxa de reação ocorridas na sua superfície enquanto o potencial é aplicado. Assim, a corrente faradaica se relaciona a presença do analito de interesse na matriz analisada, e é considerada resposta útil. Por sua vez, a corrente capacitiva é considerada sinal de interferência ou ruído, sendo gerada no processo de carga e descarga da dupla camada elétrica que forma a interface eletrodo solução [43].

Observada no eletrodo de trabalho, a interface eletrodo-solução é a região mais importante para as determinações eletroquímicas. Quando ocorre a polarização do eletrodo de trabalho, a camada de solução imediatamente vizinha a superfície do eletrodo é alterada e se organiza de maneira que apresente um excesso de cargas proporcional as cargas da superfície do eletrodo, porém de sinal oposto. Essa região é denominada dupla camada elétrica [44].

A dupla camada de Helmhotz (**Figura 2a**) apresenta um comportamento similar a um capacitor de placas paralelas. Goy e Chapman propuseram uma modificação nesse modelo (**Figura 2b**), definindo uma região denominada camada difusa, que leva em conta a

distribuição dos íons na solução do eletrólito. Por fim, Stern descreveu um modelo que alia as ideias do modelo de Helmholtz às ideias de Gouy e Chapman descrevendo duas regiões: a camada de Stern (camada interna ou camada compacta) e a camada difusa [45].

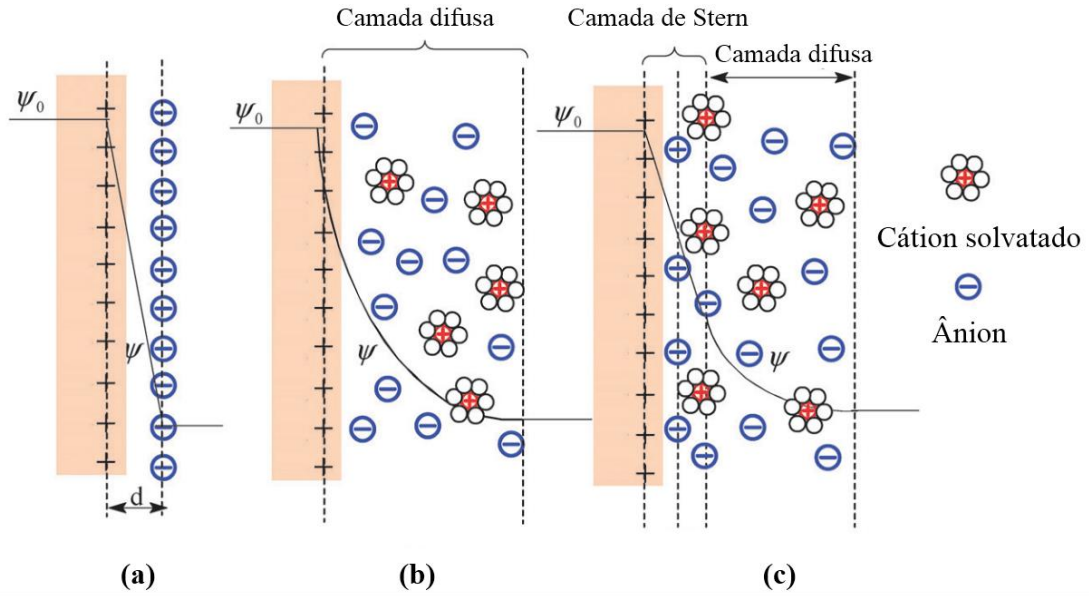

Figura 2 - Modelos da dupla camada életrica para uma camada carregada positivamente: (a) modelo de Helmholtz; (b) modelo de Gouy-Chapman; (c) modelo de Stern. d: distância da dupla camada descrita por Helmholtz. Ψ_0 e Ψ: potenciais na superficie do eletrodo e na interface eletrodo/solução [46].

A camada de Stern é formada pelo plano interno de Helmhotz (camada interna), que é uma camada muito compacta e com pouca mobilidade das moléculas do solvente, e pelo plano externo de Helmhotz região menos compacta e uma mobilidade maior das moléculas de solvente. A camada difusa mantém as considerações do modelo de Gouy e Chapman estendendo-se até a fronteira denominada seio da solução [46].

A determinação voltamétrica geralmente inicia-se com a aplicação de um potencial no qual nenhuma reação acontece, daí este potencial pode ser variado para regiões mais negativas (catódicas) ou positivas (anódicas), dependendo do sistema avaliado, até que as reações de interesse ocorram na interface eletrodo-solução. As variações de corrente neste intervalo de tempo são registradas e relacionadas com os potenciais

aplicados. Os gráficos de corrente *versus* potencial gerados são chamados voltamogramas e são utilizados para qualificação e/ou quantificação das espécies de interesse [44]. Dentre as várias informações contidas nos voltamogramas, os parâmetros mais importantes são o potencial de pico, que apresenta informações da espécie avaliada, e a corrente de pico, que tem relação direta com a quantidade da espécie eletroativa no meio.

3.4. Técnicas Voltamétricas de Pulso

As técnicas voltamétricas de pulso foram desenvolvidas inicialmente com o intuito de sincronizar um pulso de potencial com o período de crescimento da gota no eletrodo de mercúrio, reduzindo assim a contribuição da corrente capacitiva sobre o sinal obtido [43,46]. A partir do desenvolvimento destas técnicas, os métodos eletroanalíticos passaram a ser mais largamente utilizados para as mais diversas aplicações industriais, farmacêuticas e ambientais [47].

Na voltametria de pulso diferencial (VPD), o sinal de excitação consiste na aplicação de pulsos de potencial com amplitude constante sobre a varredura do potencial base realizada com incremento de potencial contínuo ou em forma de escada [48]. A representação da aplicação do potencial na voltametria de pulso diferencial pode ser observada na **Figura 3**.

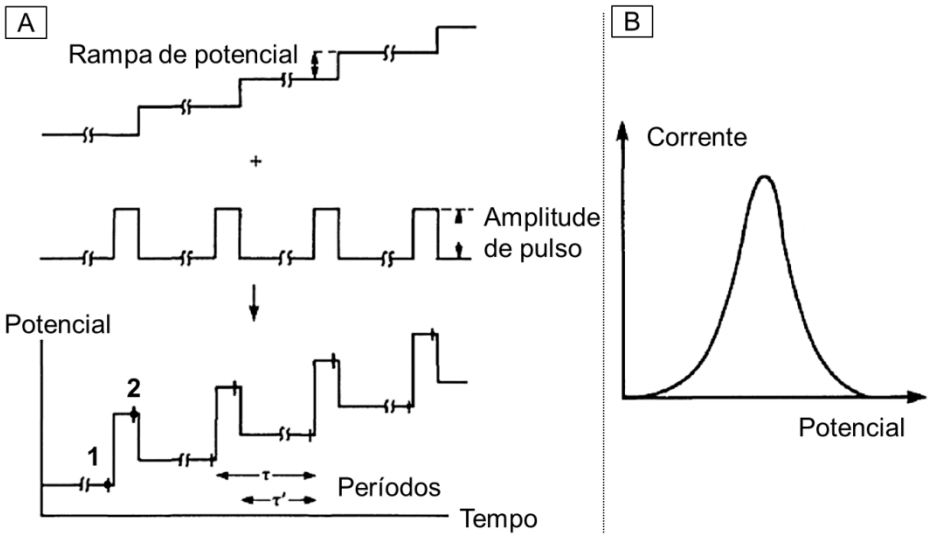

Figura 3 - A: Esquema de aplicação dos pulsos de potencial na voltametrica de pulso diferencial. 1 e 2 correspondem aos momentos de coleta da corrente observada. B: Forma de sinal obtido para esta técnica [44].

Na VPD a coleta de sinal ocorre em dois momentos: antes e ao fim da aplicação do pulso, registrando-se a diferença entre essas duas correntes. Esta diferença da corrente observada em dois instantes permite uma minimização da influência da corrente capacitiva sobre a medida, o que proporciona uma melhora na relação sinal-ruído e consequente redução dos limites de detecção da técnica em relação ao pulso normal. O voltamograma obtido apresenta-se na forma de picos (**Figura 3**) de forma gaussiana, cuja corrente de pico é proporcional a concentração. Para a VPD a corrente observada é obtida pela equação de Cottrell **(1)** [42,44]:

$$I_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi\, t_m}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma}\right) \qquad (1)$$

Onde:

Ip: corrente de pico (A)

n: número de elétrons envolvidos na equação redox

F: constante de Faraday (C)

A: área do eletrodo (cm^2)

tm: tempo entre as leituras de corrente (s)

D: coeficiente de difusão da espécie eletroativa no meio ($cm^2 \cdot s^{-1}$)

C: concentração do analito ($mmol \cdot L^{-1}$)

$\sigma = exp^{\frac{nFAp}{2RT}}$ (T: temperatura absoluta ; R: constante dos gases; Ap: amplitude do pulso)

3.5. Determinação eletroquímica simultânea de compostos fenólicos

As soluções normalmente propostas para a determinação simultânea de compostos fenólicos tem se mantido em torno da modificação de eletrodos. Este recurso muitas vezes proporciona a resolução dos picos de oxidação desses analitos, que são observados em uma estreita janela de potencial. Como exemplo, tem-se a determinação simultânea de catecol e hidroquinona descrita por Li, Yu, Cao e colaboradores [30,49,50].

Muitos materiais têm sido empregados na construção e modificação de eletrodos, apontando especialmente o melhoramento da sensibilidade dos mesmos [16,51,52]. Dentre estes, pode-se destacar o uso do ferroceno e seus derivados [53], que apresentam um par redox com alta reversibilidade que auxilia as transferências eletrônicas entre o analito e a superfície do eletrodo [54]. Porém, a dificuldade de fixação destes mediadores à superfície do eletrodo, pode demandar a utilização de processos ainda mais dispendiosos, como a síntese de novos materiais, reduzindo-se assim algumas das vantagens que a utilização de técnicas eletroquímicas fornecem em relação às demais técnicas [55].

Outros materiais como filmes poliméricos [56], enzimas [57] nanopartículas metálicas [58] e quitosana [41] também tem fornecido importantes aplicações na produção e modificação de eletrodos. Além destes, os materiais derivados do carbono como o grafeno, o carbono mesoporoso, e os nanotubos de carbono também têm sido largamente utilizados no desenvolvimento de metodologias eletroquímicas cada vez mais sensíveis e com melhores limites de detecção [2,59,60].

3.6. Planejamento experimental

O estudo das melhores condições experimentais ou de um processo muitas vezes é feito por meio do método univariado, de maneira que é realizada uma série de experimentos variando-se individualmente cada variável que compõe o processo, até que se encontrem as condições que proporcionem os melhores resultados. Porém, neste tipo de abordagem não há garantias que as condições encontradas sejam as que realmente proporcionam os melhores desempenhos [61]. Além disso, o emprego dessa metodologia geralmente implica numa elevada demanda de tempo, uma vez que as tentativas são realizadas até que uma resposta considerada satisfatória seja observada. Uma solução proposta a essa problemática é a utilização de planejamentos fatoriais, quem geralmente possibilitam uma considerável redução do número de experimentos a serem realizados, sem prejuízo da confiabilidade dos resultados [62].

Planejamentos experimentais bem executados proporcionam vantagens como evitar o desperdício de recursos e proporcionar a economia de tempo, sem que haja execução de testes necessários [63]. Com o desenvolvimento de técnicas quimiométricas, planejamentos fatoriais tem sido cada vez mais explorados e abrangem um número cada vez maior de aplicações [64,65]. Atualmente estes planejamentos já são empregados tanto no meio acadêmico quanto em industrias, cujo o intuito principal é melhorar as condições experimentais ou de produção [32].

A seleção do tipo de planejamento fatorial a ser utilizado depende das características do sistema estudado. Quando o número de fatores não é muito elevado, e estes podem ser testados em poucos níveis, os planejamentos fatoriais completos são geralmente indicados. Este tipo de planejamento permite a construção de modelos lineares através do método dos mínimos quadrados, os quais descrevem superfícies de resposta planas. Para sistemas mais complexos outros tipos de planejamento podem ser empregados [63,66].

3.7. Planejamento Brereton

As técnicas quimiométricas mostram-se especialmente úteis no estudo de sistemas multicomponentes. Porém o emprego de um planejamento experimental inadequado pode comprometer a eficiência do conjunto de calibração a ser usado, e consequentemente levar a modelos que não descrevem bem tais sistemas. Assim, dispor de um conjunto de calibração que seja representativo consiste em um dos maiores desafios na análise multivariada [32,64].

Em muitos casos, especialmente ao estudar sistemas constituídos por misturas, considera-se inadequado o uso de planejamentos fatoriais de dois níveis, pois a representatividade nestes casos geralmente requer a avaliação de cada componente em mais de dois níveis de concentração. Também é importante que estes fatores e níveis apresentem a menor correlação possível [63].

Brereton [67] descreveu um procedimento para a geração de uma série de misturas que obedecem esses requisitos. Definindo-se um número de componentes (k) e o número de níveis que eles terão na mistura (t), o número total de misturas de calibração (N) é dado por $N = mt^p$, onde "m" é um número inteiro maior ou igual a 1, e "p" é um número inteiro maior ou igual a 2. Portanto, para construir um modelo de calibração cujos componentes contenham 5 níveis (t=5, m=1 e p=2) são necessários no mínimo 25 misturas de calibração (N=25). Executando-se a série de etapas descritas por Brereton, é possível gerar estas N misturas que podem ser usadas na construção dos modelos de calibração de interesse [68].

Uma vez que as misturas obtidas pela execução deste planejamento oferecem um arranjo de níveis ortogonalizados, o planejamento Brereton mostra-se ideal para geração do conjunto de dados para análise simultânea de compostos fenólicos.

3.8. Calibração multivariada

A definição da concentração de uma ou mais espécies a partir de dados como espectros ou voltamogramas nem sempre pode ser realizada por meio da análise de um único valor de absorbância ou de corrente. Assim, a análise multivariada é atualmente uma das melhores ferramentas disponíveis para a solução de problemas analíticos quantitativos mais complexos. Ela é considerada uma das mais bem sucedidas combinações de métodos estatísticos com dados químicos [32].

Dentre os métodos de calibração multivariada mais utilizados estão a regressão linear múltipla (MLR - Multiple Linear Regression), a regressão por componentes principais (PCR – Principal Components Regression) e por quadrados mínimos parciais (PLS – Partial Least Square).

Um procedimento que pode proporcionar a melhora da robustez e o aumento da capacidade preditiva dos modelos de calibração gerados é a utilização de ferramentas de seleção de variáveis [69]. Dentre os algoritmos disponíveis para este propósito, temos os baseados em inteligência artificial, como o algoritmo das redes neurais artificiais (ANN – Artificial Neural Network) e algoritmo genético (GA – Genetic Algorithm). Outra ferramenta de seleção disponível é o algoritmo das projeções sucessivas (SPA - Successive projections algorithm), que baseia-se na minimização da colinearidade das variáveis. A utilização de todas essas ferramentas de seleção visa identificar as variáveis que contém as informações mais relevantes ao problema de interesse, e assim obter modelos mais simples e fáceis de interpretar [70].

3.9. Regressão por quadrados mínimos parciais - PLS

A PLS é um método de calibração multivariado que utiliza a técnica de análise de componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados. Consequentemente, também é reduzida a correlação entre conjunto de dados (matriz X) e as propriedades de interesse (matriz Y), que muitas vezes é a concentração de um ou mais

analitos. Neste método as matrizes X e Y são decompostas por PCA por meio das equações **(2)** e **(3)**:

$$\boldsymbol{X = TP^T + E} \quad (2)$$
$$\boldsymbol{Y = UQ^T + F} \quad (3)$$

Onde: P e Q são os pesos de X e Y; T e U são os escores de X e Y, E e F representam as matrizes de resíduos de X e Y, respectivamente [71]. No método PLS, os valores dos escores nas matrizes T e U são alterados até que o melhor modelo linear seja estabelecido entre eles e assim, a menor covariância entre X e Y seja alcançada. Assim, ocorre um compromisso entre a explicação da variância em X e a obtenção da maior correlação com Y. Uma vez que no cálculo de cada componente principal os valores de concentração dos analitos também são levados em consideração, as componentes principais passam a ser denominadas variáveis latentes.

Geralmente, o número de variáveis latentes no modelo é determinado por validação cruzada *leave-one-out* [65], sendo escolhido o número de variáveis latentes a partir do qual não existe variação apreciável no valor de RMSECV que é calculado pela equação **(4)**:

$$\boldsymbol{RMSECV = \sqrt{\frac{\sum(y_p - y_e)^2}{n}}} \quad (4)$$

onde y_p representa o valor previsto pelo modelo, y_e o valor esperado e n o número de amostras de calibração.

Selecionado o número de variáveis latentes, o modelo de regressão pode ser construído e deve ser validado empregando amostras que não fazem parte do conjunto de calibração (validação externa). Uma vez conhecidos os valores reais, a capacidade de previsão do modelo é avaliada pela raiz quadrada do erro médio quadrático médio de previsão (RMSEP), que é calculado, de maneira similar ao RMSECV [65].

3.10. Regressão linear múltipla - MLR

A regressão linear múltipla é uma técnica que visa a resolução de uma série de equações em um sistema multicomponente. Este método busca o estabelecimento de uma relação linear entre as variáveis (matriz X) e os parâmetros de interesse (vetor y) de acordo com a equação **(5)**:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{B}_{\mathbf{MLR}} + \mathbf{E} \tag{5}$$

Onde **X** é a matriz dos sinais de m amostras; **Y** é a matriz dos parâmetros das amostras; $\mathbf{B}_{\mathbf{MRL}}$ corresponde a matriz dos coeficientes lineares de regressão; **E** é a matriz dos resíduos que representa a parte não descrita pelo modelo. A matriz B_{MLR} pode ser obtida pelo método dos mínimos quadrados utilizando a equação **(6)**:

$$\boldsymbol{B_{MLR}} = (\boldsymbol{X^T X})^{-1}\, \boldsymbol{X^T Y} \tag{6}$$

Assim, o MLR analisa as diferenças entre cada valor y e o modelo, correspondentes ao respectivo valor X. O modelo selecionado é o que apresenta a menor soma de quadrados de tais diferenças. Todavia, fatores como alta multicolinearidade ou indeterminação do sistema podem gerar problemas na geração dos modelos. Uma alternativa a resolução desta problemática está no emprego de métodos de seleção de variáveis ou ao uso da regressão a partir das variáveis transformadas não colineares [72].

3.11. Algoritmo das projeções sucessivas - SPA

O SPA é uma metodologia de seleção de variáveis que faz uso da redução da colinearidade do conjunto de dados para melhorar o condicionamento numérico e reduzir a propagação de ruídos na

construção de modelos por regressão linear múltipla. Pela execução de três fases, o SPA faz a seleção das variáveis menos colineares entre si [70].

Na primeira fase são criadas as cadeias de variáveis candidatas. O algoritmo inicia a seleção por uma determinada variável e segue adicionando outras, até que uma condição de parada seja satisfeita. Na segunda fase, as cadeias de variáveis geradas são avaliadas em função da raiz quadrada do erro médio de validação. A cadeia escolhida é aquela que apresenta menor valor de RMSEV. Por fim, na terceira fase o algoritmo elimina as variáveis da cadeia selecionada que não contribuem significativamente na construção do modelo MLR [68].

3.12. Algoritmo genético - GA

Com base na teoria evolutiva das espécies, John H. Holland propôs a construção de um algoritmo matemático que simulava todo o mecanismo da evolução biológica [73]. O algoritmo genético preserva todas as características e vantagens do processo evolutivo, e realiza otimização em sistemas complexos [74].

O GA básico funciona com 6 etapas principais: população inicial; Avaliação da população; Critério de término para a otimização; Reprodução; Mutação; Substituição da corrente populacional pela próxima. Os 5 últimos passos são repetidos continuamente até que um critério de parada seja satisfeito.

Como critério de parada para o algoritmo genético, normalmente adota-se um número máximo de gerações ou até que um erro mínimo desejado seja alcançado [74]. O GA tem sido largamente empregado na análise quimiométrica como ferramenta para seleção de variáveis. Usando código binário, cada gene pode assumir o valor um ou zero.

Assim, quando uma determinada variável assume valor um, é escolhida. Por outro lado, se a posição conter o valor zero, a variável não foi selecionada. A metodologia GA-MLR implica na utilização do algoritmo

genético para seleção de variáveis a serem usadas na análise multivariada por regressão linear múltipla [72].

3.13. Pré-processamento dos dados

Em muitos casos faz-se necessário realizar uma etapa de pré-processamento dos dados obtidos visando a remoção de informações físicas e/ou instrumentais que não estão relacionadas à informação química de interesse da amostra [65]. Assim, dentre os procedimentos mais usados na correção ou remoção das informações indesejadas, estão a suavização por Savitzky-Golay, os métodos da 1ª e 2ª derivada, e a transformação padrão normal de variação - SNV (Standard Normal Variate).

O filtro Savitzky–Golay (SG) [75] geralmente é aplicado para eliminação de ruídos espectrais, e já se encontra incorporado a maioria dos softwares de tratamento de dados. Neste caso, o sinal suavizado é obtido por um por um polinômio que ajusta os pontos de um intervalo definido. Isso possibilita que o filtro SG seja aplicado a sinais analíticos com picos estreitos, apresentando resultados superiores aos obtidos com o filtro de média móvel [76].

As derivadas são aplicadas com intuito de eliminar os desvios lineares de linha de base e problemas de sobreposição. A derivada é definida como o limite da razão da diferença entre dois pontos consecutivos pela variação entre suas abcissas, quando a diferença entre as abcissas tende a zero. Como não se consegue obter dados experimentais com variação infinitesimal, toma–se a menor variação possível das ordenadas e abcissas para o cálculo dessa derivada [76]. Em alguns casos, a derivada de um sinal é mais útil que o dado real, porém esse procedimento pode trazer o inconveniente de diminuir a relação sinal/ruído, problema que pode ser minimizado com a aplicação do alisamento Savitsky-Golay [75,77].

A transformação padrão normal de variação (SNV), ou autoescalonamento de linha, é aplicada especialmente em dados espectroscópicos, uma vez que é especialmente útil tanto na correção de linha de base, quanto nas variações de intensidade global. O sinal transformado é obtido pela equação **(7)**, onde cada sinal (X_i) é subtraído de sua média e dividido pelo desvio padrão:

$$x^*_{i,v} = \frac{x_{i,v} - \overline{X_i}}{s_i} \qquad (7)$$

Após essa transformação, os sinais apresentam média global igual a 0 e desvio padrão igual a 1. Uma particularidade desta técnica é a possibilidade de deslocamento das regiões informativas [78].

4. EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados são de grau analítico (P.A.) e não foram submetidos a nenhum processo de purificação prévia. Todas as soluções foram preparadas com água purificada proveniente de um sistema Milli-Q Plus (Millipore).

As soluções-tampão Britton-Robinson (TBR) com faixa de pH 2,0 a pH 8,0 foram preparadas pela mistura de igual volume das soluções: ácido acético (CH_3COOH) 0,2 mol·L^{-1}, ácido bórico (H_3BO_3) 0,2 mol·L^{-1} e ácido ortofosfórico (H_3PO_4) 0,2 mol·L^{-1}. O pH foi ajustado pela adição de adequado volume de solução 1,0 mol·L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH).

A solução-tampão Mcllavaine ou tampão fosfato (TFS) pH 5,0 foi preparada pela mistura de solução ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) 0,1 mol·L^{-1} e solução fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 0,1 mol·L^{-1}.

A solução-tampão biftalato (TFT) pH 5,0 foi preparada (em KCl 0,1 mol·L^{-1}) pela mistura de solução ftalato ácido ($C_8H_5KO_4$) 0,1 mol·L^{-1} e solução hidróxido de sódio 0,1 mol·L^{-1}.

As soluções-estoque aquosas dos compostos fenólicos de concentração 0,01 mol·L^{-1} e 0,10 mmol·L^{-1} utilizadas nas análises eletroquímicas foram preparadas a partir dos reagentes catecol, resorcinol, hidroquinona e p-cresol adquiridos da Sigma-Aldrich. Para as determinações, concentrações mais reduzidas foram obtidas por meio de diluições desses estoques, realizadas diretamente na célula eletroquímica sobre o volume de 15 mL de eletrólito suporte.

4.2. Instrumentação

O pH das soluções foi ajustado com auxílio de um pHmetro *Metrohm pH 713* e eletrodo combinado de vidro. Para limpeza e renovação da superfície dos eletrodos utilizou-se um banho ultrassônico *Ultrasonic Cleaner USC 800* e uma *Lixadeira/Politriz Universal Arotec AROPOL-2V*.

As determinações eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT302N acoplado a um microcomputador e um sistema de agitação magnética, com auxílio do software NOVA 1.10. Para as medidas voltamétricas, foi utilizado um eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol·L^{-1}) e um eletrodo de platina como auxiliar.

Foram estudados e testados quatro tipos de eletrodo de trabalho: platina, carbono vítreo, carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e pasta de nanotubos de carbono. O processo de limpeza e preparação dos eletrodos variou de acordo com as características de cada material.

O eletrodo de platina (ø = 2 mm) foi polido em politriz (2 minutos a 300 rpm) com pasta de diamante de 1μm de granulometria (AROTEC, Brasil) e óleo mineral sobre pano de polimento metalográfico (AROTEC, Brasil). O excesso de óleo e demais resíduos foram posteriormente removidos em duas etapas de 10 minutos em banho ultrassônico. Na primeira etapa, o eletrodo foi mantido em acetona e na segunda mantido em água purificada.

Para o eletrodo de carbono vítreo (ø = 2 mm) empregou-se inicialmente uma limpeza mecânica com suspensão de alumina 0,05 μm em politriz por 2 minutos a 300 rpm. Ao final, o eletrodo foi lavado com água purificada e mantido em banho ultrassônico por 10 minutos.

Na modificação do eletrodo de carbono vítreo (ø = 2 mm) empregou-se uma adaptação ao procedimento descrito por Qi et al [79]. Depositou-se um filme de nanotubos de carbono 9,5nm×1,5 μm (diâmetro médio x comprimento dos nanotubos) Sigma-Aldrich, sobre eletrodo devidamente limpo. O processo de limpeza foi o mesmo empregado para o eletrodo de carbono vítreo, acrescido de duas etapas de 10 minutos de banho ultrassônico: a primeira em solução 1:1 (v:v) de água e ácido nítrico concentrado e a seguinte em etanol. Uma vez limpo, realizou-se a deposição do filme de nanotubos de carbono, gotejando-se sobre o eletrodo uma suspensão 1 mg mL^{-1} de nanotubos de carbono em

dimetilformamida (DMF) até a observação de formação de um filme uniforme sobre o carbono vítreo, o que ocorria após a adição de aproximadamente 200 µL de suspensão. Para secagem, o eletrodo foi mantido sob luz infravermelha (lâmpada de 250W) por 30 minutos. Um resumo do procedimento de modificação do eletrodo de carbono vítreo é mostrado na **Figura 4**.

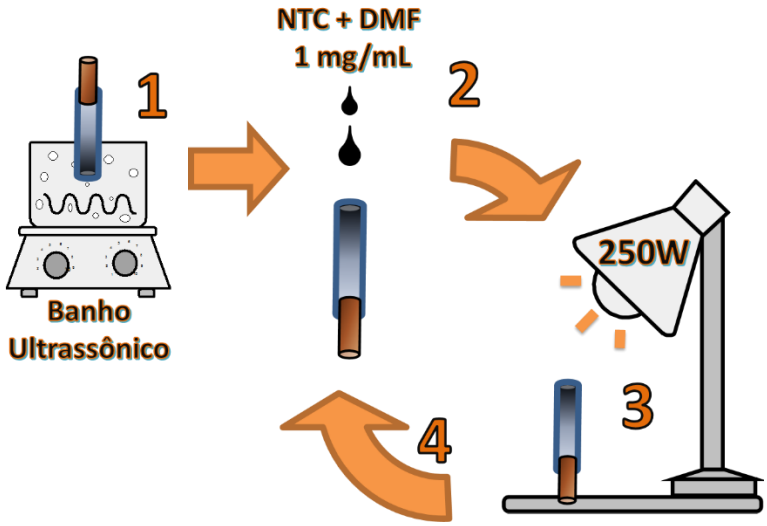

Figura 4 - Procedimento empregado na modificação do eletrodo de carbono vítreo. As etapas 3 e 4 foram repetidas até a observação de um filme uniforme de NTC.

O eletrodo de pasta de nanotubos de carbono foi produzido no próprio laboratório. Ele é composto por uma mistura de nanotubos de carbono e óleo mineral em proporção 70:30 (m:m), que é compactada no interior de um tubo de vidro com uma das extremidades ligadas a um fio de cobre utilizado para conexão ao equipamento, conforme mostrado na **Figura 5**. Este tipo de eletrodo dispensa procedimentos laboriosos de limpeza mecânica, uma vez que sua superfície pode ser facilmente renovada antes de cada medida, sendo necessário apenas que o eletrodo seja riscado em uma folha de papel oficio para que a camada mais externa de pasta seja removida.

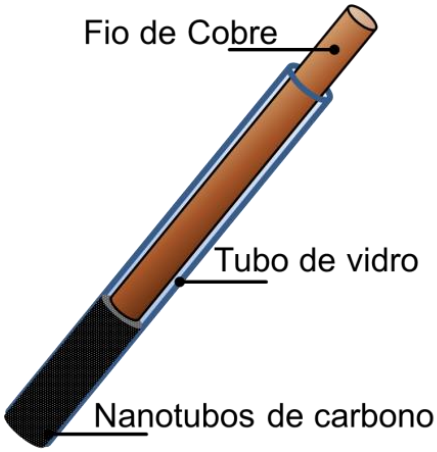

Figura 5 – Esquema do eletrodo de pasta de nanotubos de carbono utilizado.

4.3. Procedimento experimental

Antes da realização de cada determinação voltamétrica foi realizado o condicionamento do eletrodo de trabalho com uma série de varreduras por voltametria cíclica em uma janela de potencial de -0,60 V à 1,30 V e velocidade de varredura de 1,0 $V \cdot s^{-1}$ no eletrólito suporte. Observada a estabilização da linha de base após as varreduras cíclicas sucessivas, o eletrodo estava pronto para o uso.

As determinações eletroquímicas foram realizadas por voltametria de pulso diferencial utilizando-se como eletrólito suporte 15 mL de TBR pH 5,0, à temperatura ambiente (25±1 ºC). Foram empregados os seguintes parâmetros da técnica de pulso, os quais foram obtidos via otimização por planejamento fatorial:

- Janela de potencial: -0,1 à 1,0 V
- Incremento de potencial (Δs): 10 mV
- Amplitude de pulso (Δp): 50 mV
- Tempo de pulso (Tp): 0,05 s
- Velocidade de varredura (ν): 20 $mV \cdot s^{-1}$

Uma medida consistiu de uma série de quatro varreduras no eletrólito suporte, seguida da varredura correspondente à adição do analito. As três primeiras varreduras do eletrólito foram descartadas, pois eram empregadas para a estabilização da linha de base, sendo considerada apenas a quarta varredura.

Em situações em que as medidas apresentaram-se com ruído foi realizada a suavização pelo método de Savitzky–Golay [75]. Também realizou-se a correção de linha de base utilizando o método da média móvel. Ambos os recursos são disponibilizados pelo *software* NOVA.1.10, utilizado para coleta dos dados voltamétricos.

Tendo em vista a relação da área do eletrodo com a geração do sinal na VPD (**sessão 3.4**) e a importância da área eletroativa para geração da resposta observada, adotou-se a densidade de corrente (j) como resposta principal na avaliação das condições da técnica voltamétrica empregadas para as determinação propostas neste trabalho, já que pode ocorrer uma variação considerável da área dos eletrodos constituídos de compósitos sólidos (como o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono, por exemplo).

Para a determinação da área eletroativa do eletrodo necessária ao cálculo da densidade de corrente foram registrados voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varredura. Esse procedimento foi realizado utilizando-se como eletrólito suporte uma solução 0,10 mmol·L^{-1} de ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) a pH 3,00 e 0,10 mol·L^{-1} de cloreto de potássio. Determinada a área eletroativa do eletrodo, realizou-se a análise das respostas eletroquímicas obtidas em função da densidade de corrente, fazendo-se o quociente da quantidade de corrente observada (corrente de pico) pela área eletroativa do eletrodo.

No processo de verificação da resposta eletroquímica para escolha do eletrodo de trabalho, cada analito foi testado separadamente em dois níveis de concentração, o mais baixo de 5 µmol L^{-1} e o maior de 60 µmol·L^{-1}.

4.4. Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

O estabelecimento dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial foi alcançado após a execução de um planejamento fatorial 2^3, onde foram estimados os efeitos destes parâmetros sobre a densidade de corrente observada. Os fatores estudados foram: amplitude de pulso (A_p), tempo de pulso (T_p) e velocidade de varredura (V). Os oito experimentos realizados previstos pelo planejamento 2^3 são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2^3 completo executado para definição dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial

Fatores e níveis				Exp	A	T_p	V
Amplitude (Ap)	50 mV	1		1	-1	-1	-1
	25 mV	-1		2	1	-1	-1
				3	-1	1	-1
Tempo de pulso (Tp)	0,15 s	1		4	1	1	-1
	0,05 s	-1		5	-1	-1	1
				6	1	-1	1
Velocidade de varredura (V)	40 $mV.s^{-1}$	1		7	-1	1	1
	20 $mV.s^{-1}$	-1		8	1	1	1

Os experimentos foram executados em duplicata, totalizando 16 experimentos, cujas as respostas médias foram empregadas no cálculo dos efeitos avaliados para maximização da densidade de corrente.

4.5. Parâmetros de desempenho

Uma vez obtidos os valores adequados dos parâmetros da medida voltamétrica, verificou-se o desempenho analítico da metodologia proposta a partir de características como região linear de resposta, sensibilidade e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada analito separadamente. A resposta analítica foi testada em uma faixa de concentração de 1,0 até 50 $\mu mol \cdot L^{-1}$.

Para cada analito foram construídas curvas analíticas observando-se a região onde houvesse uma relação linear entre a concentração e a

corrente observada. A sensibilidade da metodologia foi definida como equivalente à inclinação da equação que descreve a região linear de resposta. Para a determinação do LD e do LQ, foram realizadas 10 leituras no eletrólito suporte sendo, a estimativa do desvio-padrão dessas varreduras (Sb) e a sensibilidade (b) da região linear de resposta, usadas no cálculo do LD e LQ estimadas de acordo com as relações: LD = 3Sb/b e LQ = 10Sb/b [80].

A obtenção dos parâmetros de desempenho para a determinação individual dos analitos serviu como ponto de partida para o planejamento de calibração multivariada, principalmente no que diz respeito à região linear de resposta. O LD e o LQ para os modelos de calibração multivariada foram estimados a partir das equações (**8**) e (**9**), onde δx é o desvio-padrão estimado pelo modelo para 10 voltamogramas do sinal de referência, considerando nível de 95% de confiança. [81]

$$\boldsymbol{LOD = 3,3\ \delta_x} \quad (8)$$

$$\boldsymbol{LOQ = 10\ \delta_x} \quad (9)$$

Os modelos de previsão univariada propostos para cada analito foram avaliados pelo método analise de variância (ANOVA). Assim, a significância da regressão é estimada pela razão da média quadrática da regressão pela média quadrática do resíduo, que é comparada ao valor de $F_{1,n-2}$ tabelado, para um nível de confiança de 95%. Quando esta razão é maior que o valor de F tabelado e os resíduos mostram-se aleatórios, fica evidenciada a relação linear entre as variáveis X e y. As equações utilizadas na ANOVA estão representadas na **Tabela 2** [62,82].

Tabela 2 - Equações da ANOVA para um modelo de regressão MMQ

ANOVA	***Soma quadrática (SQ)***	***Graus de liberdade***	***Média quadrática***
Modelo	$\sum n_j[(y_e)_i - y_m]^2$	p - 1	$SQ_{mod}/(p-1)$
Resíduo	$\sum\sum y_{ij} - (y_e)i]^2$	n - 1	$SQ_{reg}/(n-p)$

Onde “p” corresponde ao número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração proposto, “n” corresponde ao número total de medidas, “i” indica o nível da variável x, “j” corresponde as medidas repetidas da variável y em um nível de x.

4.6. Planejamento Brereton

Definidas as condições onde verifica-se resposta linear a cada analito, executou-se um planejamento Brereton com 4 componentes correspondentes a HQ, CC, CR e RS em 5 níveis de concentração. Como todos os analitos apresentaram resposta linear em concentrações de 1μmol·L^{-1} a 50μmol·L^{-1}, os cinco níveis de concentração foram definidos para todos os analitos a partir da divisão desta faixa linear em concentrações equidistantes.

A **Tabela 3** mostra o resumo do planejamento empregado e a composição dos 25 experimentos executados. As concentrações foram obtidas pela diluição dos padrões de HQ, CC, CR e RS sobre TBR pH 5,0, e as medidas foram realizadas nas condições otimizadas.

Também realizaram-se 5 adições de variadas concentrações dos analitos que puderam ser utilizadas para validação externa. As concentrações nestas 5 misturas são mostradas na **Tabela 4**.

Tabela 3 – Misturas utilizadas como conjunto de calibração.

Ensaio	Concentração dos analitos em μmol·L⁻¹			
	HQ	**CC**	**CR**	**RS**
1	25	25	25	25
2	25	5	5	50
3	5	5	50	15
4	5	50	15	50
5	50	15	50	25
6	15	50	25	15
7	50	25	15	15
8	25	15	15	40
9	15	15	40	50
10	15	40	50	40
11	40	50	40	25
12	50	40	25	50
13	40	25	50	50
14	25	50	50	5
15	50	50	5	40
16	50	5	40	5
17	5	40	5	25
18	40	5	25	40
19	5	25	40	40
20	25	40	40	15
21	40	40	15	5
22	40	15	5	15
23	15	5	15	25
24	5	15	25	5
25	15	25	5	5

Tabela 4 - Misturas utilizadas para validação externa.

Amostra	*Concentração dos analitos em μmol·L⁻¹*			
	HQ	**CC**	**CR**	**RS**
1	12	6	4	20
2	6	26	4	4
3	10	6	36	6
4	32	30	40	28
5	4	12	8	12

4.7. Análise quimiométrica

Foram obtidos os conjuntos de calibração formado pelos 25 voltamogramas obtidos do planejamento Brereton e predição composto de 5 amostras formadas por misturas em concentrações variadas dos analitos. Todos os dados foram pré-tratados com o filtro de suavização de sinal Savitzky-Golay, formando assim o primeiro conjunto de dados a ser testado.

Outros três conjuntos de dados foram formados realizando outros processos de pré-tratamento em adição a suavização por SG. Foram testados o método da 1ª derivada e a transformação padrão normal de variação (SNV). Por fim, uma combinação destes dois pré-tratamentos também foi testada. Assim, as quatro técnicas de pré-processamento testadas foram:

- PP1: Suavização de sinal Savitzky-Golay (SG)
- PP2: SG + SNV
- PP3: SG + 1ª derivada
- PP4: SG + SNV + 1ª derivada

Esses conjuntos de calibração, juntamente com o conjunto de validação, foram usados para gerar modelos por PLS, SPA-MLR e GA-MLR. Os modelos foram analisados e testados com o conjunto de predição a fim de verificar qual das metodologias consegue estabelecer a melhor relação entre perfil voltamétrico e concentração dos analitos, para predição de concentrações em amostras-teste.

Os algoritmos GA-MLR e SPA-MLR foram executados em ambiente MATLAB® R2008a versão 7.6. Os procedimentos SNV e 1ª derivada foram executados no programa Pirouette® v3.11 que também foi utilizado para a execução do PLS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do eletrodo de trabalho

Testes iniciais foram realizados para verificar a resposta eletroquímica à hidroquinona, catecol, p-cresol e resorcinol em função do eletrodo de trabalho utilizado. Os resultados obtidos para cada eletrodo e analito são mostrados na **Figura 6**.

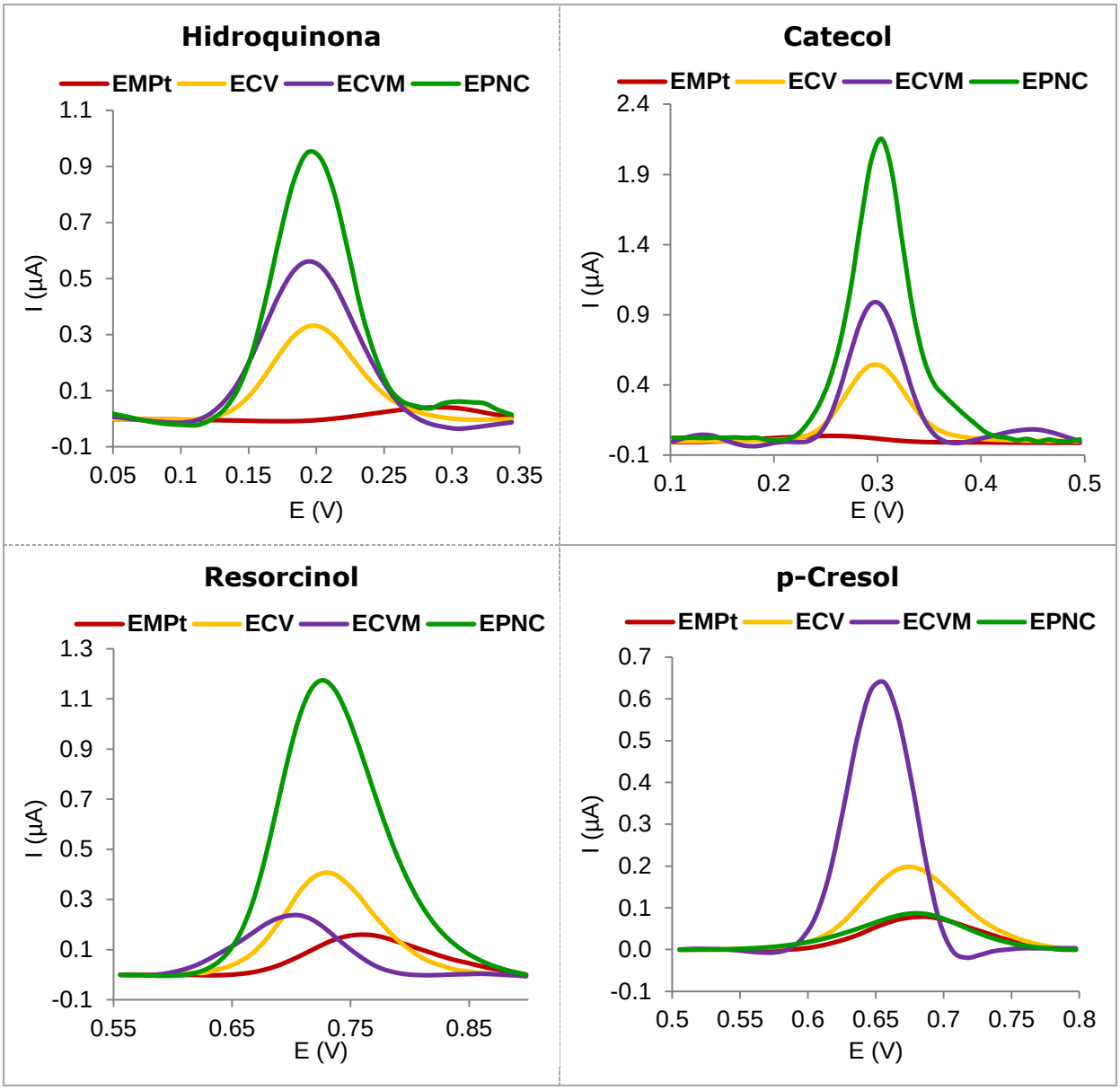

Figura 6 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com diferentes eletrodos na determinação de 60 µmol L^{-1} de cada analito. Δp: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s. TBR pH 5,0.

Para cada analito são apresentados os resultados obtidos na análise de 60 μmol L^{-1}, usando os quatro eletrodos avaliados: platina (EMPt), carbono vítreo (ECV), carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (ECVM) e pasta de nanotubos de carbono (EPNC).

Nas determinações de HQ, observou-se um pico de oxidação em 0,20 V, com os maiores valores de corrente sendo obtidos nos testes realizados com o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono, que apresentou correntes da ordem de 1 μA. Neste caso não se observou sinal eletroquímico mensurável com o emprego do eletrodo de platina, e os demais eletrodos mostraram correntes de pico inferiores às apresentadas pelo eletrodo de pasta de nanotubos.

A determinação CC apresentou resultados similares aos testes realizados com HQ. Mais uma vez verificou-se a ausência de resposta eletroquímica aparente para o eletrodo de platina e um sinal de intensidade mais elevada para o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. Em concordância com outros trabalhos [16,83], a oxidação do CC apresenta pico no potencial de 0,30 V. Observa-se ainda que a intensidade de corrente para este analito é maior que a obtida para HQ, o que pode indicar uma maior sensibilidade para o CC.

Os testes referentes à determinação de RS mostraram correntes de pico no potencial de 0,73 V para os eletrodos de pasta de nanotubos e de carbono vítreo, 0,71 V para o eletrodo de carbono vítreo modificado, e 0,76 V para o eletrodo de platina em concordância com o reportado por Wang et a [84,85].

Ao contrário dos resultados até então obtidos, a determinação de CR com o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono não se mostrou a mais sensível. Verificou-se neste caso que tanto o eletrodo de carbono vítreo como o de carbono vítreo modificado apresentaram correntes mais elevadas ao p-cresol que o eletrodo de pasta de nanotubos, sendo observado o sinal de oxidação do p-cresol a 0,65 V. Além disso, mesmo para o eletrodo com melhor desempenho – carbono vítreo modificado – verificou-se que a magnitude da corrente obtida é menor que a dos outros

analitos, indicando uma menor dos eletrodos testados sensibilidade a este analito.

Por conter grupos OH, o fenol pode ser facilmente oxidado, levando inicialmente a formação de radicais fenóxido, que podem participar de reações de acoplamento, perda de prótons ou ataque nucleofílico, especialmente nas posições *orto* e/ou *para*, quando estas encontram-se disponíveis. Nestas posições a densidade eletrônica favorece a reatividade do anel, fazendo com que ocorra oxidação em potenciais menos positivos. Já a oxidação do RS em potenciais mais elevados ocorre em decorrência da ausência destes anéis aromáticos ativados, o que dificulta processos oxidativos que permitem a formação do fenóxido [86].

No estudo inicial do tipo de eletrodo utilizado na determinação de HQ, CC, CR e RS foram obtidas a respostas eletroquímicas em concordância com as reportadas na literatura. Neste caso, dentre os eletrodos testados, verificou-se que o de pasta de nanotubos de carbono apresentou as melhores respostas eletroquímicas para o conjunto dos analitos, pois além da boa definição dos potenciais de oxidação para a maioria dos analitos, obteve-se um ganho considerável nas correntes de pico observadas.

5.2. Estudo do pH e eletrólito suporte

O estabelecimento do pH de trabalho é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um método eletroanalítico, pois grande parte dos processos redox ocorridos na superfície do eletrodo sofrem forte influência do pH do meio. Considerando a menor sensibilidade aparente observada para o cresol para o eletrodo de pasta de nanotubos de carbono, uma concentração mais elevada para este analito foi adotada como padrão de teste. As **Figuras 7-10** apresentam os resultados obtidos para cada composto fenólico estudado, bem como a ação do pH sobre o potencial de oxidação observado.

Os resultados obtidos para HQ podem ser observados na **Figura 7**, onde verifica-se que os pHs 2,0, 5,0 e 8,0 apresentam valores similares de densidade de corrente, sendo o pH 8,0 o que proporciona a maior densidade (3,4 µA/cm²). Também observa-se que a elevação do pH do meio gera um deslocamento do potencial de pico para potenciais negativos, evidenciando a perda de prótons na oxidação da hidroquinona a p-benzoquinona [86].

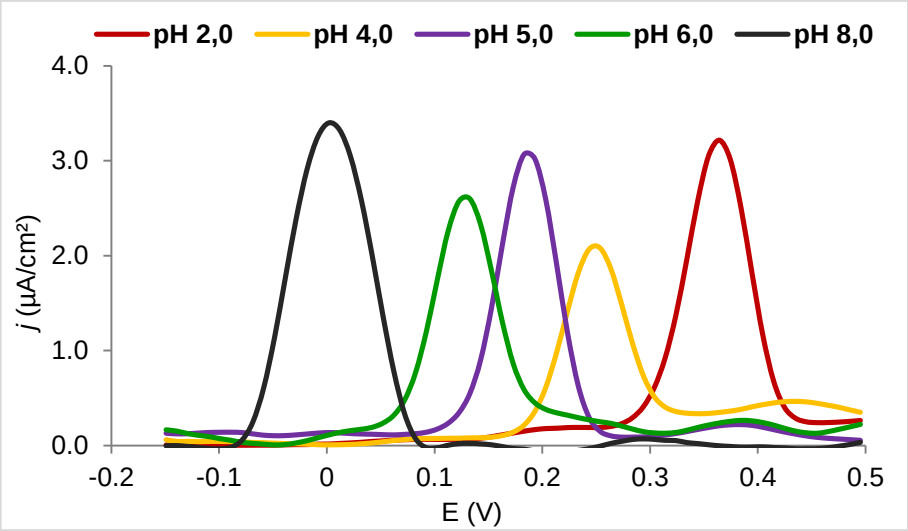

Figura 7 - Variação do pico de oxidação da hidroquinona em função do pH. ∆s: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; ∆p: 50 mV; Tp: 0,05s.

A **Figura 8** apresenta os voltamogramas da oxidação do CC em função do pH. Observa-se um deslocamento do pico de oxidação de 0,45V para aproximadamente 0,15 V ao variar-se o pH de 2,0 para 8,0, respectivamente. Neste caso verificou-se que, ao contrário do que foi observado para a HQ, o pH 8,0 apresenta um dos menores valores de densidade de corrente dentre os pHs testados. Para este analito, a maior densidade de corrente – aproximadamente 6,0 µA/cm² - foi observada a pH 2,0. Nas determinações a pH 6,0 não se verificou resposta eletroquímica aparente ao analito, e a segunda melhor condição foi observada com emprego do pH 5,0, com densidade de corrente calculada em aproximadamente 3,7 µA/cm².

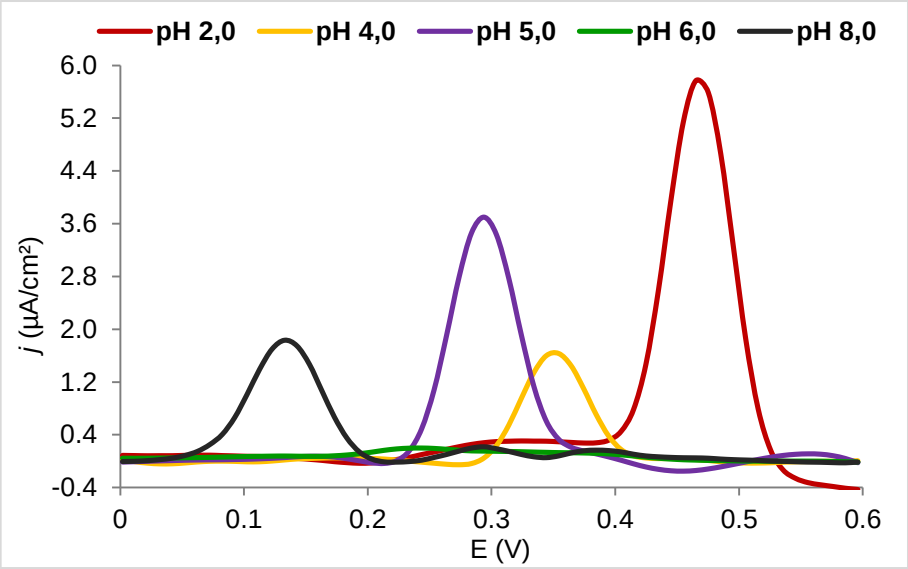

Figura 8 - Variação do pico de oxidação do catecol em função do pH. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s.

Os testes com p-cresol mostraram valores bem próximos de densidade de corrente para a maioria dos pHs testados. Estes resultados podem ser observados na **Figura 9**.

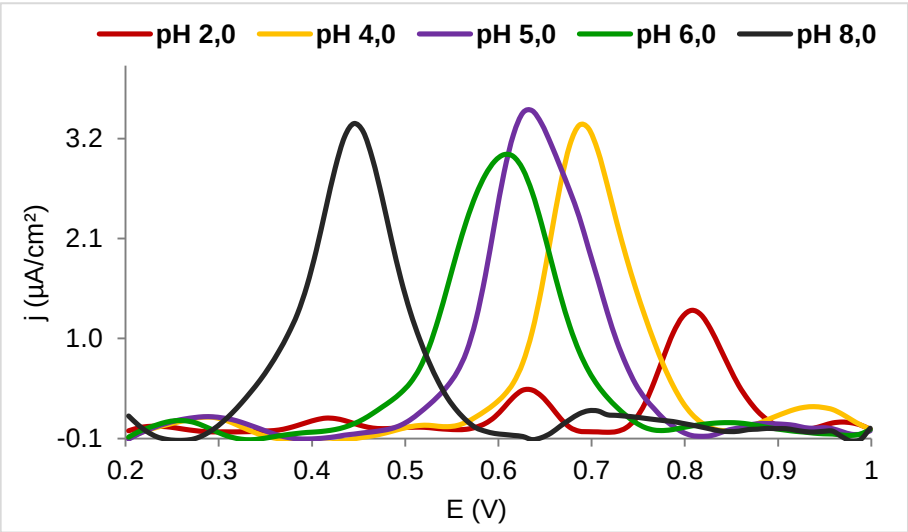

Figura 9 - Variação do pico de oxidação do p-cresol em função do pH. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05s.

Até então, o pH 2,0 apresentava-se como uma boa escolha, com respostas satisfatórias para a oxidação de hidroquinona e catecol. Entretanto, nesta condição observa-se para o p-cresol a menor densidade

de corrente dentre os pHs testados. Uma das melhores condições para este analito foi obtida a pH 5,0, com uma densidade de corrente de 3,5 µA/cm².

Dos quatro analitos estudados, o resorcinol foi o que apresentou os valores mais reduzidos de densidade de corrente em geral. Estes resultados são apresentados na **Figura 10**. A pH 2,0 não se observa resposta para resorcinol. Por outro lado, a pH 6,0 observou-se a densidade de corrente mais elevada. Entretanto, em pH 6,0 a determinação de catecol é prejudicada conforme observado na ausência de resposta eletroquímica aparente neste pH. A segunda melhor condição foi obtida a pH 5,0, com densidade de 0,4 µA/cm².

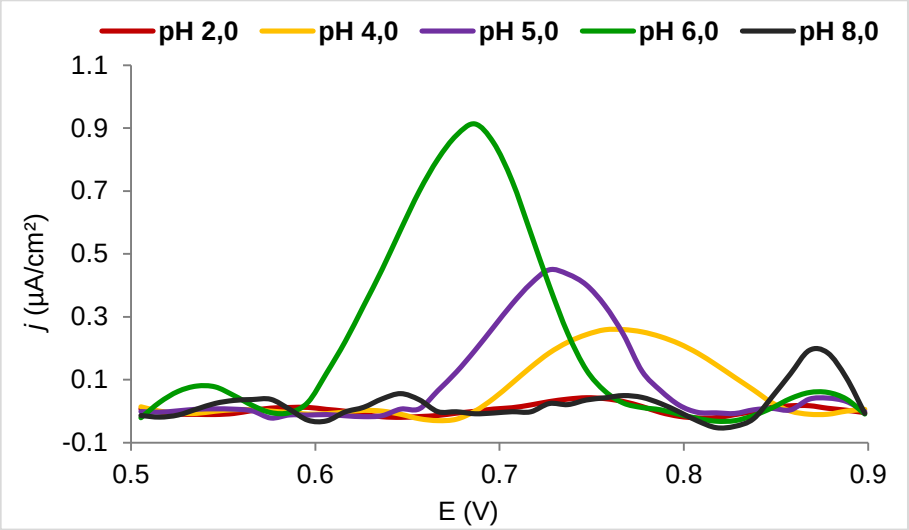

Figura 10 - Variação do pico de oxidação do resorcinol em função do pH. ∆s: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; ∆p: 50 mV; Tp: 0,05s.

A variabilidade da resposta eletroquímica para as condições testadas dificulta a escolha de uma condição ótima de pH que viabilize a determinação simultânea dos quatro analitos. Assim, apesar de não apresentar-se como a condição que fornece o maior valor de densidade de corrente para todos dos analitos, o pH 5,0 mostra-se como uma alternativa viável para o conjunto, pois mostra-se como pelo menos a segunda melhor condição para quase todos os analitos.

Na escolha do eletrólito-suporte foram testadas as soluções-tampão Britton-Robinson (TBR), McIlavaine (TFS) e biftalato (TFT), todas com pH ajustado para 5,0. A **Figura 11** apresenta os resultados obtidos para o uso dos três diferentes tampões a pH 5,0. Novamente adotou-se a concentração de 50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ para o p-cresol e 5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ para o catecol, resorcinol e hidroquinona. Para todos os analitos, os maiores valores de densidade de corrente foram observados com a utilização do tampão Britton-Robson como eletrólito suporte.

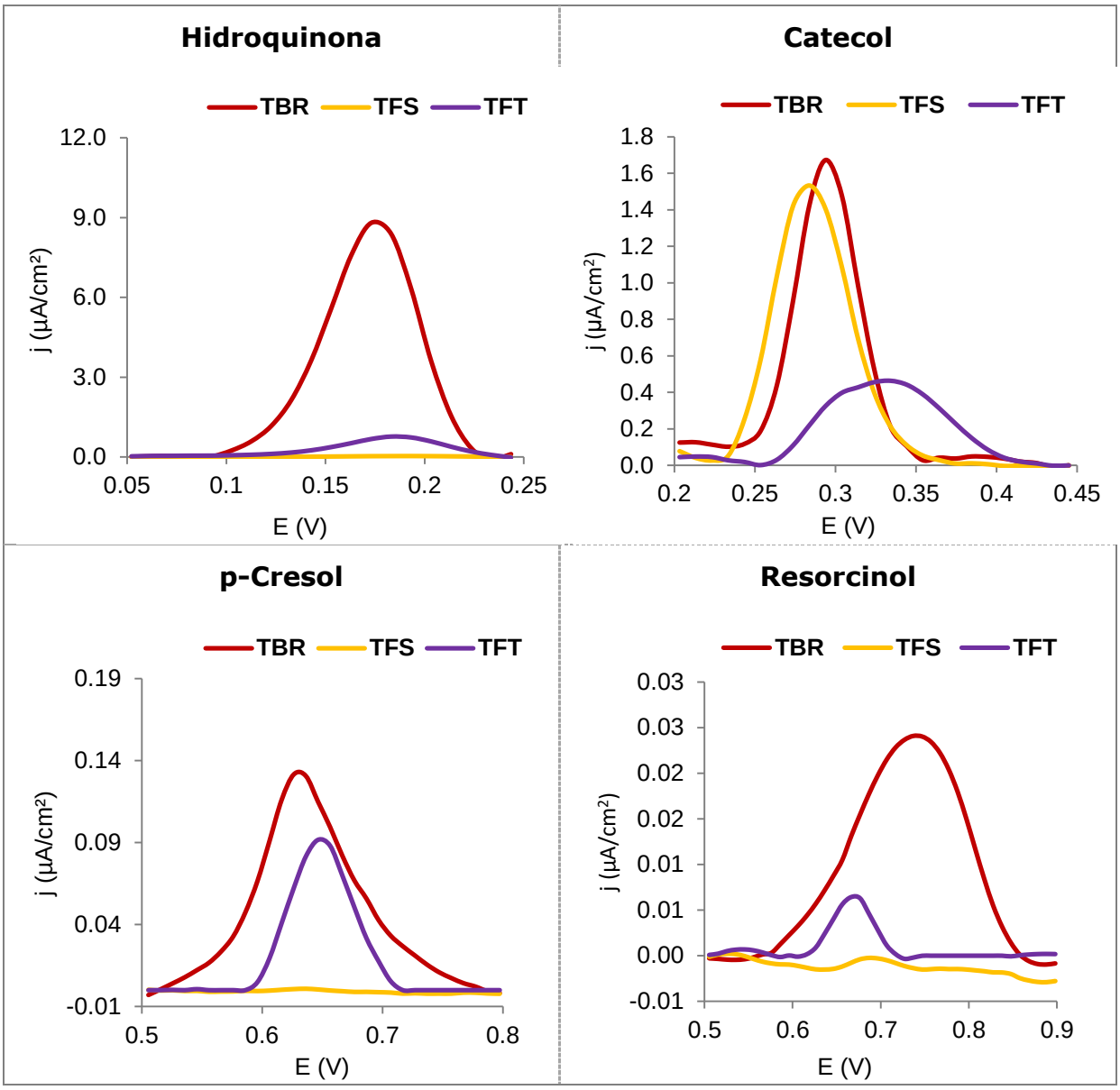

Figura 11 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na avaliação de diferentes tampões a pH 5,0 para a determinação de HQ, CC, CR e RS. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05 s.

Com exceção do catecol, o emprego do tampão fosfato não favoreceu a oxidação dos fenóis para as codições testadas. O tampão biftalato apresentou o segundo melhor desempenho como eletrólito suporte. Portanto, para determinação eletroquímica de hidroquinona, catecol, p-cresol e resorcinol adotou-se como eletrólito-suporte uma solução tampão BR com pH ajustado para 5,0.

Os testes de pH realizados também proporcionaram um melhor entendimento do processo eletroquímico observado. A **Figura 12** mostra o deslocamento do potencial de oxidação com a variação do pH do meio. Essa relação possibilita a estimativa da relação entre o número de prótons e elétrons envolvidos na reação ocorrida neste sistema.

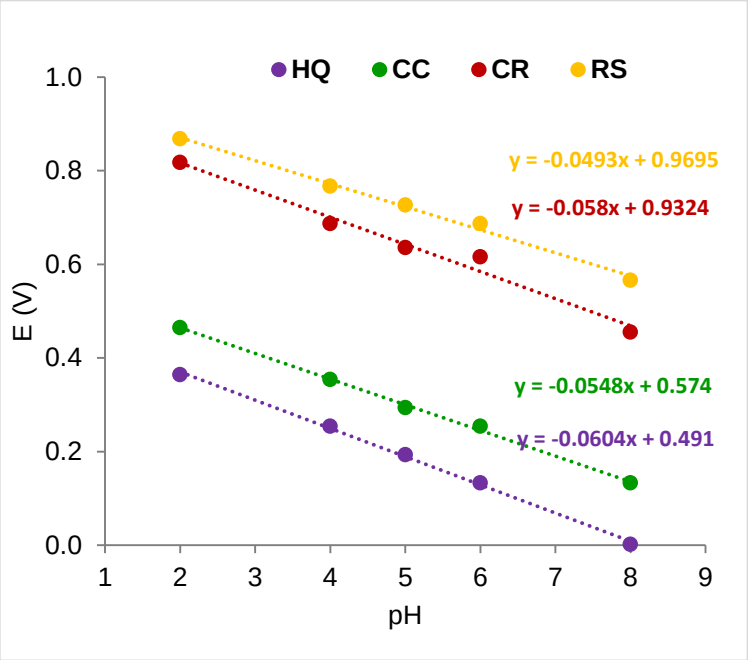

Figura 12 - Variação do potencial de pico com o pH do meio para a oxidação de hidroquinona, catecol, p-cresol e resorcinol.

Observa-se que para cada unidade de pH ocorre um deslocamento do potencial de pico de aproximadamente -60 mV para HQ, -55 mV para CC, -58 mV para CR, e -49 mV para RS. O coeficiente angular da reta que descreve a relação potencial de pico *vs.* pH é proporcional ao número de prótons envolvidos no processo redox, de maneira que quando essa

relação é de -59 mV, estima-se que o número de prótons é igual ao de elétrons [80]. Estas observações encontram em concordância com o reportado na literatura [86] onde são descritos processos de oxidação reversível da hidroquinona para p-benzoquinona e do catecol para o-benzoquinona, com transferência de dois prótons e dois elétrons (**Figura 13**).

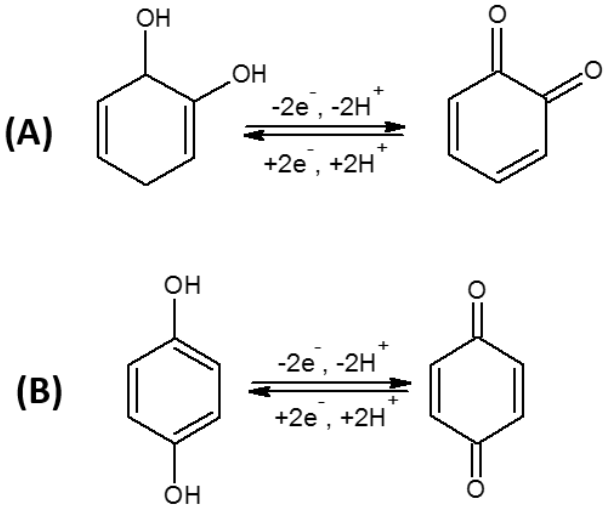

Figura 13 - Processos reversíveis ocorridos na oxidação da hidroquinona (A) e do catecol (B) na formação da benzoquinona [86]

A m-benzoquinona, produto da oxidação do resorcinol, é relatada como termodinamicamente instável, o que explica a considerável diferença entre os potenciais de oxidação desta espécie em relação aos potenciais de oxidação da hidroquinona e catecol, que apresentam a mesma composição química [86].

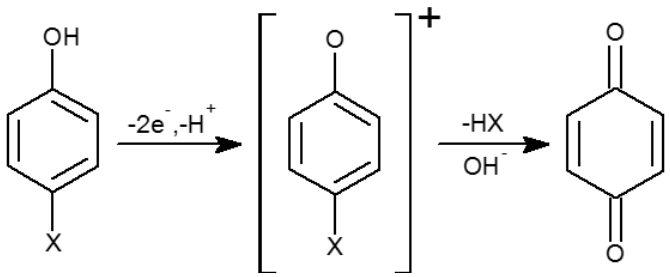

Figura 14 - Processos de formação da benzoquinona a partir de fenois p-substituidos como o p-cresol

O processo de oxidação de fenóis p-substituídos, dentre eles o p-cresol, também pode levar a geração da benzoquinona, por uma reação de transferência direta de 2 elétrons (**Figura 14**). Este processo ocorre em potenciais mais anódicos e é favorecido pelo aumento do pH do meio, podendo levar a formação da hidroquinona a partir da redução da p-benzoquinona produzida [87].

5.3. Pré-concentração adsortiva

A possibilidade de pré-concentração adsortiva dos analitos na superfície do eletrodo também foi avaliada, observando-se os efeitos da aplicação de um potencial de acumulação anterior à varredura eletroquímica. Foram testados dois potenciais, 0,0V e -0,2V, sob agitação constante, sendo cada condição experimental avaliada em duplicata nos tempos de 60s e 120s.

As densidades de corrente médias observadas nos testes de pré-concentração são representadas nos gráficos da **Figura 15**. Em todos os casos verifica-se que para as duas velocidades de varredura testadas, a aplicação de um potencial de -0,2 V não proporciona uma elevação da densidade de corrente. Por outro lado, a aplicação de 0,0V por 60s, produziu um pequeno acréscimo na densidade de corrente observado para os quatro analitos testados. O maior incremento de densidade verificado ocorreu para a maior concentração de HQ. Para as menores concentrações dos quatro analitos, observou-se um ganho de aproximadamente uma unidade de densidade de corrente.

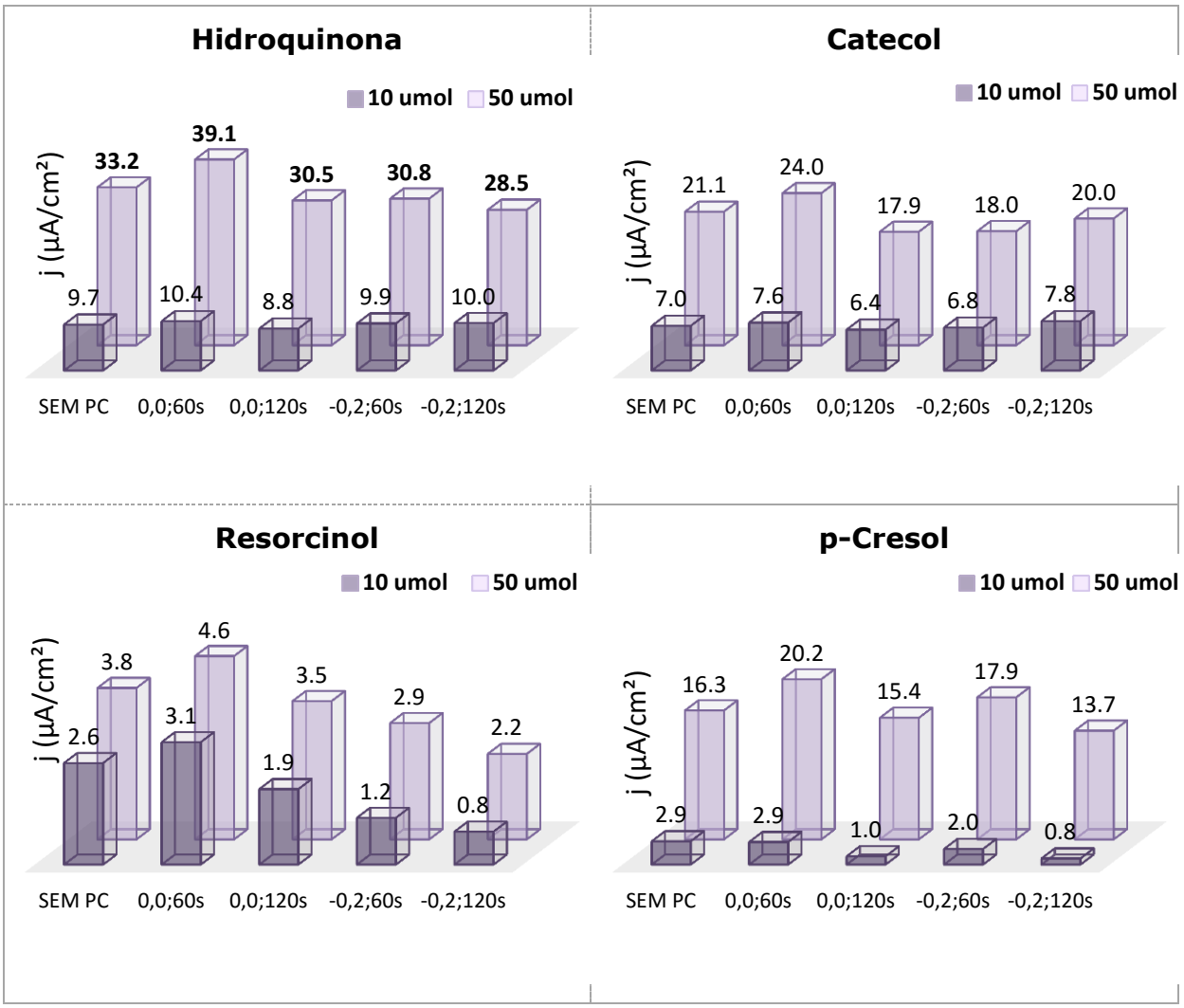

Figura 15 - Variação da densidade de corrente observada em função das etapas prévias de acumulação, usando potenciais de 0,0V e -0,2V e tempos de 60s e 120s. Δs: 10mV; ν: 20mV s^{-1}; Δp: 50 mV; Tp: 0,05 s. TBR pH 5,0.

Assim, o estudo de pré-concentração realizado mostrou que, apesar da aplicação de um potencial de 0,0 V por 60 s proporcionar um discreto aumento nas correntes de pico observadas, este incremento não é suficiente a ponto de justificar o acréscimo de mais uma etapa ao procedimento, elevando assim o tempo de análise. Portanto, optou-se pela não utilização de uma etapa prévia de acumulação.

5.4. Parâmetros da varredura eletroquímica

A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos da execução do planejamento fatorial completo para as concentrações de 10 μmol L^{-1} e 50 μmol L^{-1} de cada analito.

Tabela 5 - Efeitos calculados no planejamento fatorial completo 2^3 para os parâmetros de varredura eletroquímica

10 μmol L⁻¹				
Efeitos	**Hidroquinona**	**Catecol**	**Resorcinol**	**p-Cresol**
Média	24,6 ±1,5	13,9 ±0,8	3,8 ±0,5	4,9 ±0,9
A	18,7 ±2,9	10,7 ±1,6	2,3 ±1,1	4,4 ±1,8
Tp	-32,4 ±2,9	-16,1 ±1,6	-2,5 ±1,1	-2,9 ±1,8
V	0,3 ±2,9	-1,4 ±1,6	-0,6 ±1,1	-8,5 ±1,8
A:Tp	-14,0 ±2,9	-7,8 ±1,6	-3,4 ±1,1	-1,9 ±1,8
A:V	3,4 ±2,9	0,2 ±1,6	-1,4 ±1,1	-3,6 ±1,8
Tp:V	-1,7 ±2,9	0,7 ±1,6	2,2 ±1,1	3,7 ±1,8
50 μmol L⁻¹				
Efeitos	**Hidroquinona**	**Catecol**	**Resorcinol**	**p-Cresol**
Média	66,7 ±4,6	36,5 ±2,6	6,8 ±0,8	24,6 ±2,5
A	49,4 ±9,2	26,1 ±5,3	4,3 ±1,7	20,4 ±5,1
Tp	-81,4 ±9,2	-43,0 ±5,3	-5,3 ±1,7	-11,3 ±5,1
V	-8,6 ±9,2	-6,4 ±5,3	-0,1 ±1,7	-24,7 ±5,1
A:Tp	-33,1 ±9,2	-17,5 ±5,3	-3,9 ±1,7	-2,9 ±5,1
A:V	1,0 ±9,2	-0,7 ±5,3	-2,0 ±1,7	-13,3 ±5,1
Tp:V	1,4 ±9,2	4,7 ±5,3	2,5 ±1,7	-0,2 ±5,1

Esta tabela mostra cada um dos efeitos estimados e suas respectivas interações. Também é mostrado o valor erro padrão de cada um dos efeitos, que serve como uma estimativa do erro de amostragem.

A **Figura 16** apresenta os gráficos de Pareto para hidroquinona nas duas diferentes concentrações investigadas. Neles são mostrados os valores dos efeitos calculados e o erro baseado no teste t a 95% de confiança utilizado para julgamento da significância estatística de cada efeito (linha azul). As barras azuis apresentam os efeitos antagônicos, enquanto as barras de cor cinza, os sinérgicos.

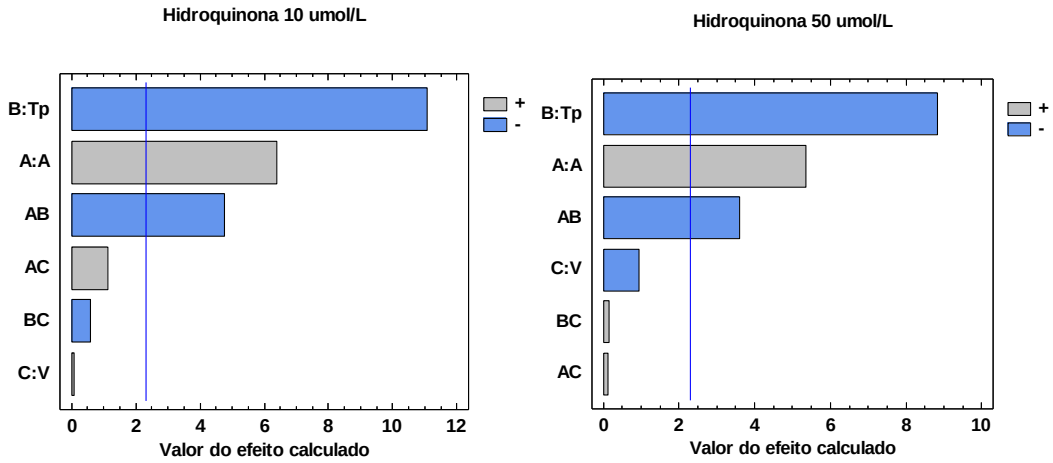

Figura 16 - Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de hidroquinona. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura.

Observa-se que em ambas as concentrações testadas, hidroquinona apresenta o tempo de pulso e a amplitude de pulso como fatores significativos para a variação da densidade de corrente, bem como o efeito de interação de segunda ordem entre esses dois fatores. Os resultados dos testes obtidos para a análise de catecol são apresentados na **Figura 17**.

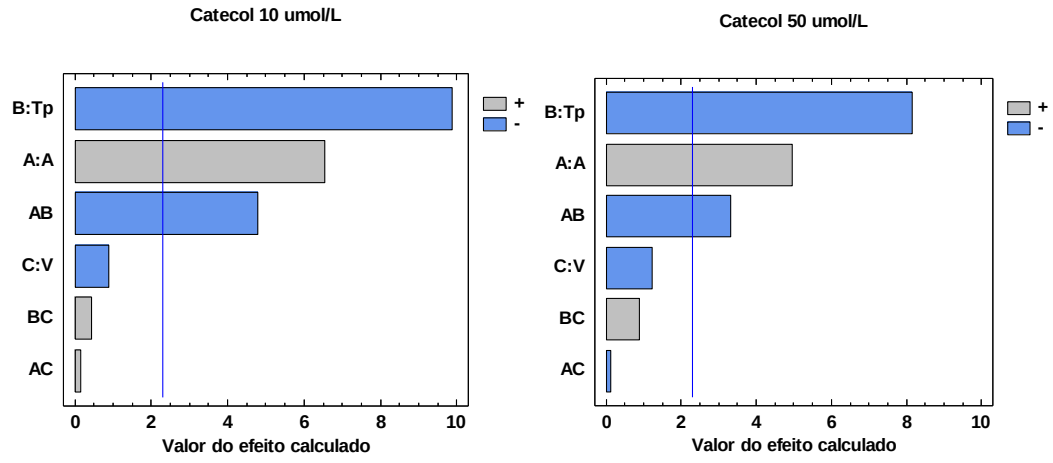

Figura 17 - Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de catecol. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura.

Verifica-se para este analito resultados equivalentes aos obtidos para a hidroquinona, com o tempo e a amplitude de pulso como fatores significativos para a variação da densidade de corrente, além do efeito de interação entre esses dois fatores. O gráfico desta interação de segunda ordem que apresenta efeito negativo para resposta é apresentado na **Figura 18**. As demais interações não mostraram-se significativas para a densidade de corrente nas condições estudadas.

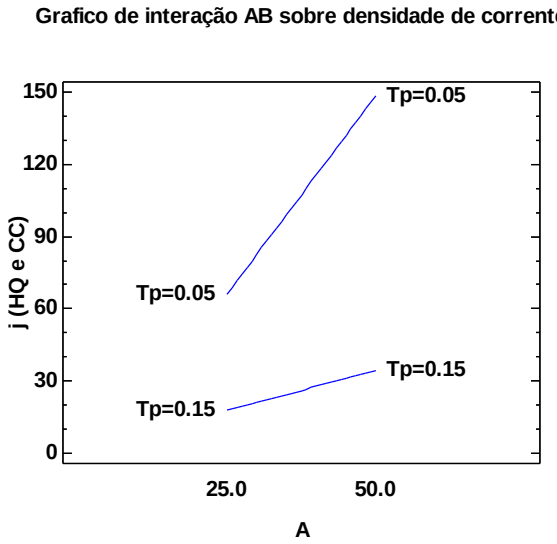

Figura 18 - Interação de segunda ordem entre amplitude e tempo de pulso sobre a densidade de corrente observada para as análises de HQ e CC.

Verifica-se que no nível mais baixo do tempo de pulso (0,05s) testado, o ganho sobre a resposta é maior ao se passar da amplitude de 25mV para 50mV. Esse comportamento foi observado na análise de resorcinol apenas na concentração de 10 μmol L^{-1}, conforme mostrado no gráfico de Pareto da **Figura 19**. Verifica-se que nesta concentração, apenas esta interação negativa é significativa para densidade de corrente. Para a concentração de 10 μmol L^{-1} a densidade de corrente observada na análise de RS é afetada negativamente pelo tempo de pulso e de maneira positiva pela amplitude de pulso, sendo todos os demais fatores principais e interações não significativos para a resposta. Esse comportamento discrepante em relação aos dois isômeros testados pode ser atribuído a

instabilidade termodinâmica da espécie produto da oxidação do resorcinol que interfere sobre o sinal observado.

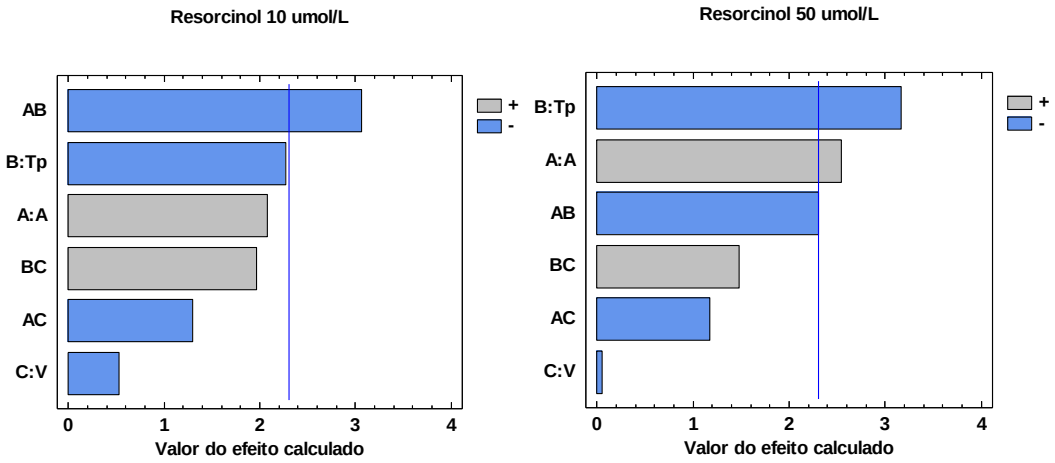

Figura 19 -Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de resorcinol. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura.

Os efeitos calculados e suas significâncias estatísticas para a análise de cresol são apresentados na **Figura 20**. Nela observamos que os efeitos principais da velocidade de varredura e da amplitude de pulso mostraram-se significativos, e o efeito de interação entre esses fatores só se mostrou expressivo para a concentração mais alta testada.

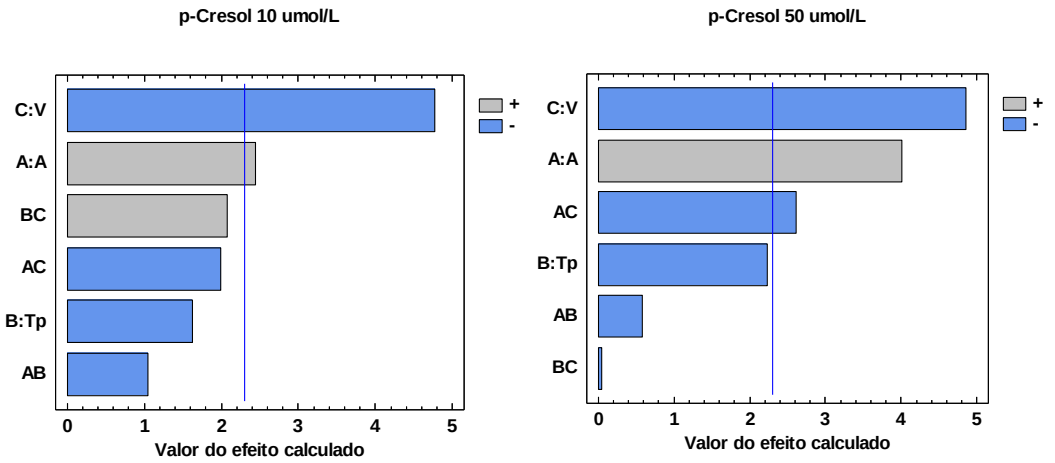

Figura 20 - Gráficos de Pareto para a avaliação dos parâmetros da voltametria diferencial de pulso na determinação de p-cresol. A: amplitude de pulso; B: tempo de pulso; C: velocidade de varredura.

Em nenhum dos casos observou-se o tempo de pulso como estatisticamente significativo para a resposta. A formação de outros produtos pela oxidação do p-cresol pode ser vista como um dos fatores que responsável por essa divergência em relação aos resultados observados para os demais analitos.

As superfícies de resposta mostradas na **Figura 21** ilustram o efeito dos fatores estudados sobre a densidade de corrente e podem ser usadas na escolha das condições que favorecem a resposta de interesse. Os resultados deste planejamento fornecem ferramentas que podem auxiliar a escolha dos melhores parâmetros eletroquímicos para as determinações.

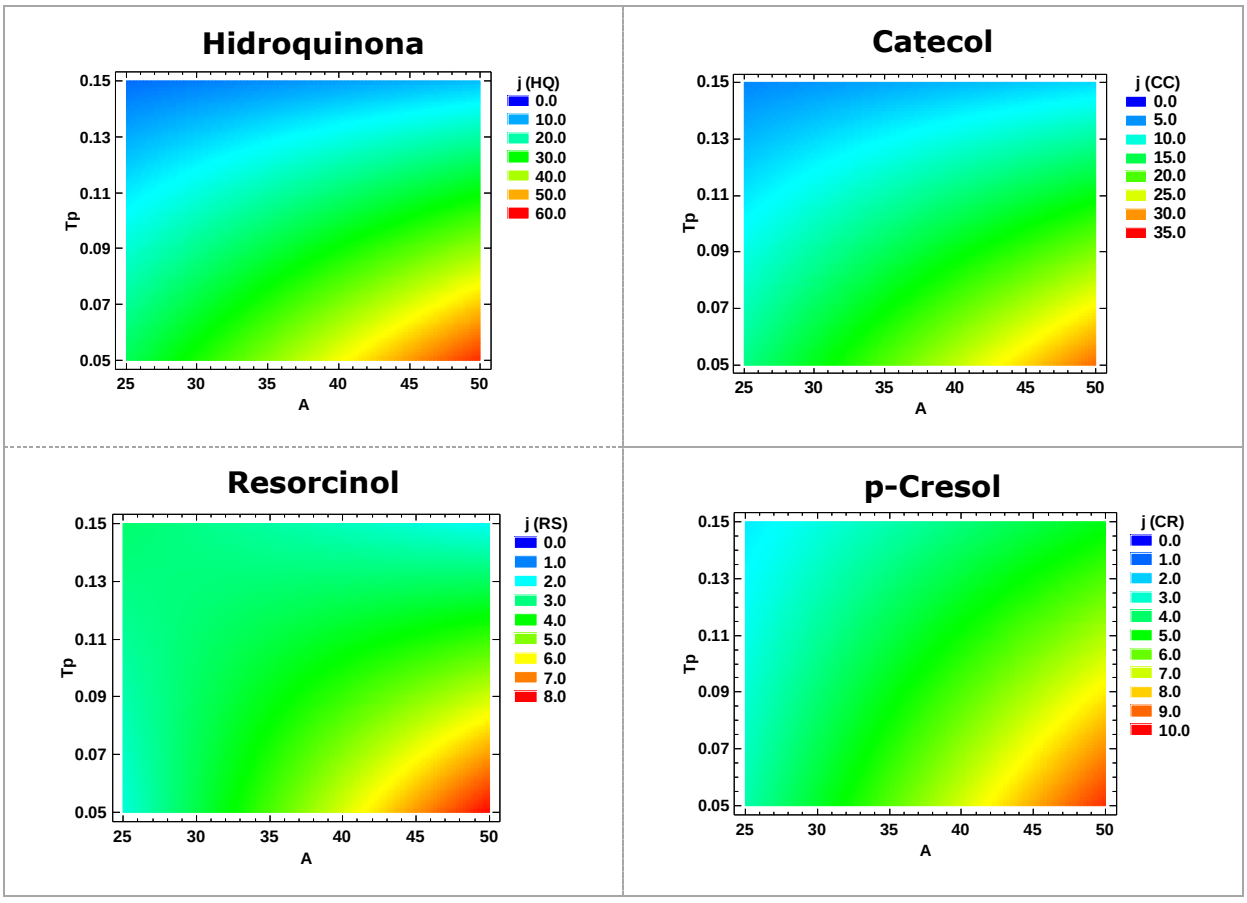

Figura 21 – Superfícies de resposta sobre o efeito dos fatores estudados em relação à densidade de corrente para a análise de HQ, CC, CR e RS.

Verifica-se que para a determinação de hidroquinona e catecol a densidade de corrente cresce ao empregar-se o nível mais alto da amplitude de pulso. Já para o tempo de pulso observa-se uma diminuição considerável do sinal ao se passar do nível mais baixo para o mais alto. O efeito da velocidade de varredura sobre a resposta estudada mostrou-se desprezível para a maioria dos casos, porém quando considerada significativa apresentou efeito negativo sobre a resposta.

Assim, como o intuito do planejamento é encontrar as condições que maximizam a densidade de corrente observada para o conjunto das determinações, define-se como condições de medida o nível mais alto dos fatores 1 e 3 e o nível mais baixo do fator 2. Portanto foram adotadas como condições de medida para a voltametria de pulso diferencial os seguintes parâmetros:

- Janela de potencial: -0,1 a 1,0 V
- Incremento de potencial (Δs): 10 mV
- Amplitude de pulso (Δp): 50 mV
- Tempo de pulso (Tp): 0,05 s
- Velocidade de varredura (ν): 20 mV·s^{-1}

5.5. Determinação individual dos fenóis

As curvas analíticas obtidas para a determinação de hidroquinona, catecol, cresol e resorcinol são apresentadas nesta sessão. O cálculo do desvio-padrão para a análise dos brancos permitiu a estimativa dos limites de detecção e quantificação apresentados. Para a determinação de hidroquinona, observa-se (**Figura 22**) uma região linear de resposta com limite de detecção de 2,30 μmol·L^{-1} e limite de quantificação de 7,66 μmol·L^{-1}.

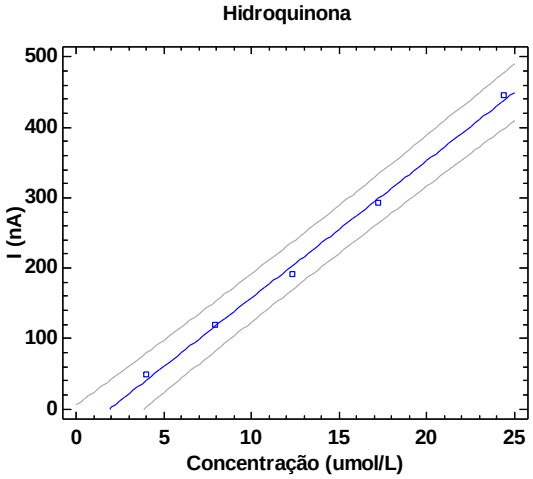

Figura 22 - Curva analítica para determinação univariada de hidroquinona. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações.

O valor de R^2 obtido indica uma capacidade de explicação de 99,7% da variabilidade da concentração de hidroquinona em função da corrente observada para o sistema estudado. Uma forte correlação entre as variáveis fica evidenciada pelo coeficiente de correlação de 0,998 apresentado. O modelo que descreve a relação entre a corrente observada (I) e a concentração de hidroquinona (C_{HQ}) é dado por **$I = -36,9(\pm 9,1) + 19,5(\pm 0,6) * C_{HQ}$**.

A curva analítica obtida para a análise de catecol é mostrada na **Figura 23**, onde um coeficiente de correlação de 0,998 indica uma forte correlação entre corrente de pico e concentração. Observa-se uma sensibilidade de 23,1nA/μmol·L^{-1}, sendo o LD e o LQ calculados 1,80·μmol·L^{-1} e 3,61·μmol·L^{-1} respectivamente.

O modelo que descreve 99,5% da variabilidade na relação entre a corrente observada (I) e a concentração de catecol (C_{CC}) é dado por **$I = -61,7(\pm 14,1) + 23,1(\pm 0,9) * C_{CC}$**.

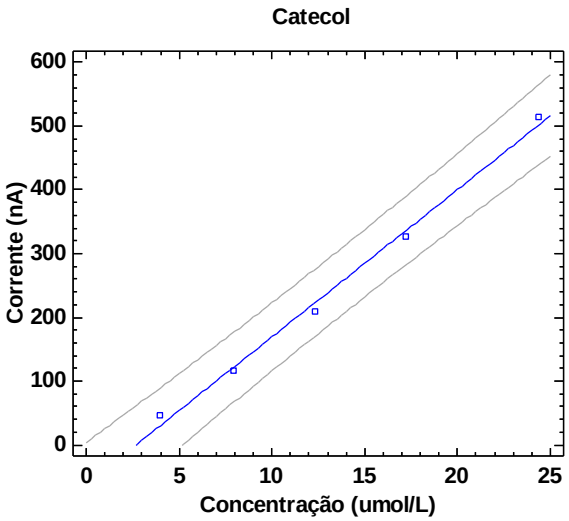

Figura 23 - Curva analítica para determinação univariada de catecol. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações.

O modelo univariado proposto para a determinação de RS apresentou sensibilidade de 32,2nA/µmol·L^{-1} com LD de 0,05·µmol·L^{-1} e limite de quantificação de 0,16 µmol·L^{-1} (**Figura 24**).

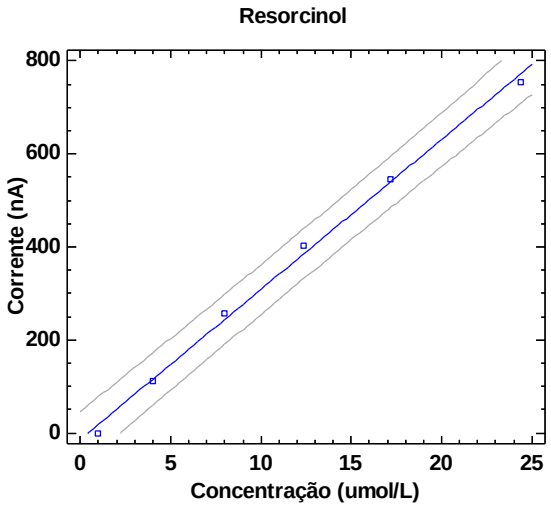

Figura 24 - Curva analítica para determinação univariada de resorcinol. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações.

O valor de R^2 obtido indica uma capacidade de explicação de 99,7% da variabilidade da concentração de resorcinol em função da corrente para o sistema estudado. A elevada correlação entre as variáveis fica evidenciada pelo coeficiente de correlação de 0,998. O modelo que

descreve a relação entre a corrente observada (I) e a concentração de resorcinol (C_{RS}) é dado por **$I = -13,7(\pm12,6) + 32,2(\pm0,9) * C_{RS}$.**

Por fim, para a análise de cresol a metodologia proposta mostrou sensibilidade de 39,9nA/μmol·L^{-1} com limite de detecção calculado em 2,66 μmol·L^{-1} e limite de quantificação de 8,85 μmol·L^{-1} (**Figura 25**).

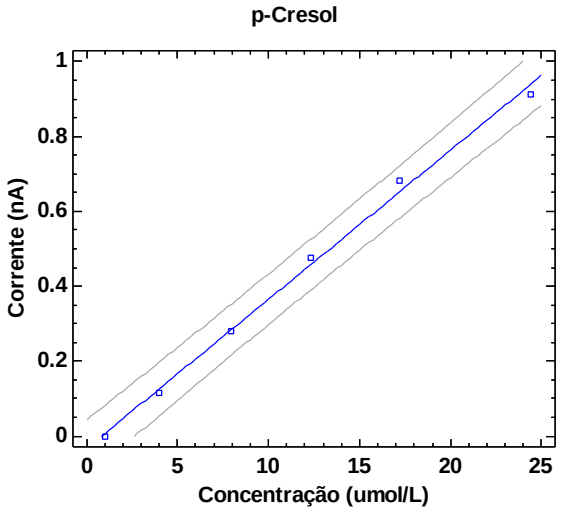

Figura 25 - Curva analítica para determinação univariada de p-cresol. Linhas cinza correspondem aos limites de predição para novas observações.

O valor de R^2 indica uma capacidade de explicação de 99,7% da variabilidade da concentração de p-cresol em função da corrente para o sistema estudado. Uma forte correlação entre as variáveis fica evidenciada pelo coeficiente de correlação de 0,998. O modelo que descreve a relação entre a corrente observada (I) e a concentração de cresol (C_{CR}) é dado por **$I = -33,3(\pm15,8) + 39,9(\pm1,2) * C_{CR}$**.

Os resultados da avaliação dos modelos univariados propostos pela ANOVA para a análise de cada analito estão resumidos na **Tabela 6**. Pela análise de variância, para um modelo de regressão, quanto maior o F, maiores são os quadrados médios do modelo que os quadrados médios residuais. Assim, quanto maior o F, mais significativo o valor de p para a ANOVA. Uma vez que os valores de P observados para os quatro analitos são inferiores a 0,05, pode-se dizer que existe uma relação estatisticamente significativa entre a corrente observada e a concentração

de cada analito a um nível de confiança de 95,0%. A **Tabela 7** resume os principais parâmetros de desempenho obtidos para a análise univariada de cada analito.

Tabela 6 – Resultados da análise de variância obtidos para os métodos univariados.

ANOVA	*Soma quadrática*		*Média quadrática*		*F*	*Valor-P*
	Modelo	**Resíduo**	**Modelo**	**Resíduo**		
HQ	96604,8	281,545	96604	93,84	1029	0,0001
CC	135895	681,566	135895	227,1	598	0,0001
RS	392927	1273,38	392927	318,3	1234	0
CR	600481	2019,12	600481	504,7	1189	0

Tabela 7 – Parâmetros de desempenho analítico obtidos para os métodos de análise univariada dos compostos estudados.

Analito	***Sensibilidade*** *nA/μmol·L⁻¹*	***LD*** *μmol·L⁻¹*	***LQ*** *μmol·L⁻¹*
HQ	23,1	1,80	3,61
CC	32,2	0,05	0,16
RS	39,9	2,66	8,85
CR	23,1	1,80	3,61

Verifica-se que todos os analitos apresentam resposta linear na faixa de concentração de aproximadamente 1,0 x 10^{-6} mol·L^{-1} a 2,5·x 10^{-5} mol·L^{-1}. Estas análises permitiram uma avaliação geral do desempenho do eletrodo proposto e orientaram para a construção dos níveis do planejamento Brereton.

5.6. Planejamento Brereton

Foram executados os experimentos do planejamento Brereton, conforme descrito na sessão 4.6, sendo obtidos os voltamogramas referentes ao conjunto de calibração e validação para as misturas propostas. A **Figura 26** mostra os 25 voltamogramas que compõem

conjunto de calibração após suavização por SG. Observa-se que um dos ensaios apresentou um desvio em relação as demais que, caso necessário, pode ser resolvido com um ajuste simples de linha de base.

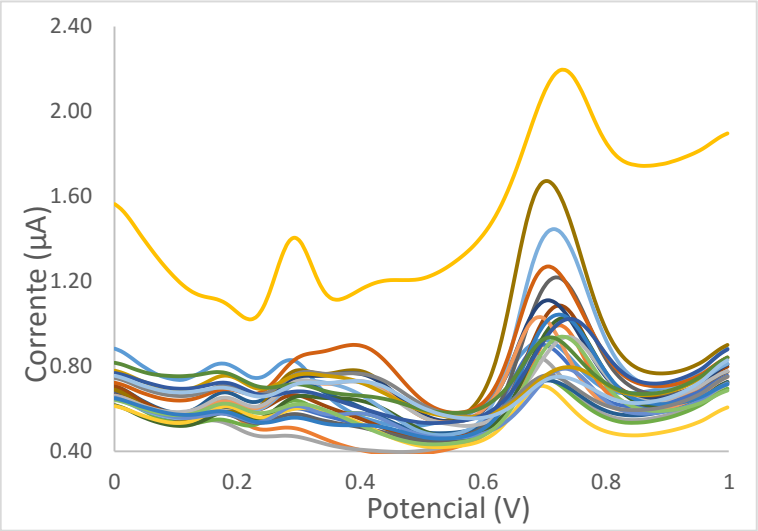

Figura 26 - Voltamogramas de pulso diferencial das misturas obtidas pela execução do planejamento Brereton. TBR pH 5,0.

5.7. Análise quimiométrica

Foram construídos os modelos usando o PLS com validação cruzada *leave-one-out* buscando o menor número possível de variáveis latentes para melhor previsão das concentrações. A **Tabela 8** apresenta os resultados obtidos para validação interna nos diferentes pré-processamento testados, onde **N** corresponde ao número de variáveis latentes selecionadas.

Tabela 8 – Resultados para validação interna dos modelos gerados com PLS.

PLS	*Faixa de concentração: 1,0·10^{-6}mol·L^{-1} a 2,5·10^{-5}mol·L^{-1}.*											
	Hidroquinona			**Catecol**			**Cresol**			**Resorcinol**		
	N	RMSECV	R	N	RMSECV	R	N	RMSECV	R	N	RMSECV	R
PP1	9	9,10	0,8	2	12,3	0,9	2	12,3	0,9	9	10,5	0,9
PP2	3	12,9	0,8	7	7,90	0,8	7	7,90	0,8	5	8,19	0,9
PP3	4	9,39	0,9	3	9,00	0,9	3	9,01	0,9	7	8,81	0,9
PP4	3	9,01	0,9	7	5,81	0,9	7	5,79	0,9	3	6,49	0,8

Verificou-se que para a análise de hidroquinona e resorcinol foram definidas 9 PCs para um sistema com apenas 4 componentes, este fato evidencia um elevado efeito de interação ocorrido neste sistema, especialmente para estes analitos. Além disso, a previsão das amostras usadas para construção do modelo (validação interna), apresentou elevados valores de RMSECV, o que caracteriza uma baixa correlação entre os valores de referência e os valores previstos. Diante disto, e considerando que de maneira geral não é esperado um desempenho melhor com a validação com as amostras externas, entende-se que a geração de modelos PLS para este sistema não se mostra satisfatório para as condições testadas. Portanto não se prosseguiu com testes de modelos gerados por PLS.

Também foram testados modelos gerados pelos algoritmos SPA-MLR e GA-MLR, que fazem uso do recurso de seleção de variáveis. Novamente, o melhor modelo corresponde àquele que, com o menor número de variáveis, consegue estabelecer uma relação entre as concentrações dos analitos e o perfil voltamétrico observado. As amostras que compõem as cinco misturas extras também foram usadas na avaliação da capacidade de predição destes modelos.

A **Tabela 9** apresenta os resultados observados na determinação de hidroquinona nas 25 misturas obtidas da execução do planejamento fatorial, e das 5 amostras de teste. Observa-se que para a validação interna, o menor valor de erro é obtido para os dados pré-processados com SNV usando o algoritmo SPA-MLR, sendo neste caso selecionadas 16 variáveis. Porém, ao realizar-se a validação externa das amostras, observa-se um RMSEP elevado. Ao se tomar como referencial a validação externa, entende-se como modelo mais adequado o que apresenta o menor erro de predição. Esta condição foi obtida para os dados pré-tratados com a 1ª derivada, sendo as variáveis selecionadas pelo algoritmo genético. Dessa forma, para a análise de hidroquinona, foram definidas as 12 variáveis apresentadas na **Figura 27**.

Tabela 9 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de hidroquinona.

Metodo/ Pré-Process.		N	PRESS	RMSE		R
SPA-MLR						
PP1	Validação	16	*813.1*	RMSECV:	5.7	0.942
	Predição		1059.8	RMSEP:	14.6	0.707
PP2	Validação	16	*238.3*	RMSECV:	3.1	0.983
	Predição		12897.7	RMSEP:	50.8	0.736
PP3	Validação	10	*482.2*	RMSECV:	4.4	0.963
	Predição		1241.4	RMSEP:	15.8	0.719
PP4	Validação	11	*1060.2*	RMSECV:	6.5	0.926
	Predição		6758.1	RMSEP:	36.8	0.747
GA-MLR						
PP1	Validação	13	*291.5*	RMSECV:	3.4	0.978
	Predição		1936.8	RMSEP:	19.7	0.820
PP2	Validação	11	*486.2*	RMSECV:	4.4	0.963
	Predição		122.1	RMSEP:	4.9	0.910
PP3	Validação	12	*740.6*	RMSECV:	5.4	0.944
	Predição		88.0	RMSEP:	4.2	0.994
PP4	Validação	4	*1734.0*	RMSECV:	8.3	0.862
	Predição		175.1	RMSEP:	5.9	0.942

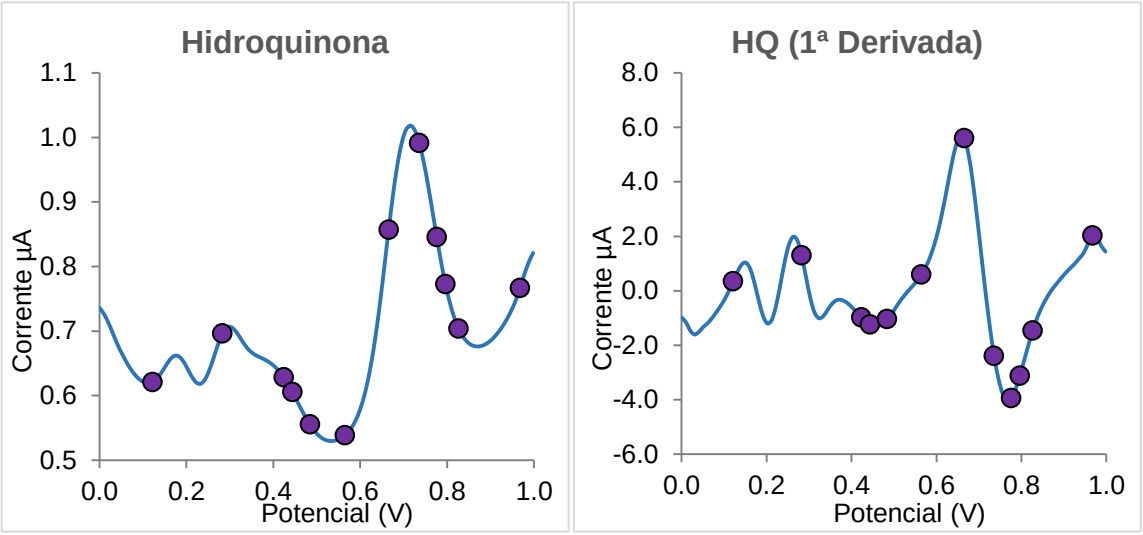

Figura 27 -Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo MLR de determinação de hidroquinona.

Chama a atenção o fato de entre as variáveis selecionadas não estar incluída a variável referente ao potencial de 0,20 V, no qual foi observada a oxidação da hidroquinona para as condições estudadas. Os resultados obtidos para a análise de catecol são mostrados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de catecol.

Metodo/ Pré-Process.		N	PRESS	RMSE		R
SPA-MLR						
PP1	Validação	17	*95.7*	RMSECV:	2.0	0.993
	Predição		1023.7	RMSEP:	14.3	0.773
PP2	Validação	12	*49.7*	RMSECV:	1.4	0.996
	Predição		1583.8	RMSEP:	17.8	0.788
PP3	Validação	20	*1126.1*	RMSECV:	6.7	0.933
	Predição		1505.3	RMSEP:	17.4	0.097
PP4	Validação	17	*187.9*	RMSECV:	2.7	0.986
	Predição		520.5	RMSEP:	10.2	0.884
GA-MLR						
PP1	Validação	13	*120.9*	RMSECV:	2.2	0.991
	Predição		4247.2	RMSEP:	29.1	0.994
PP2	Validação	11	*304.8*	RMSECV:	3.5	0.977
	Predição		998.4	RMSEP:	14.1	0.828
PP3	Validação	8	*1119.6*	RMSECV:	6.7	0.918
	Predição		43.4	RMSEP:	2.9	0.985
PP4	Validação	9	*327.0*	RMSECV:	3.6	0.976
	Predição		476.2	RMSEP:	9.8	0.931

Aqui observa-se que para a validação interna, o menor valor de erro é obtido para os dados pré-processados com SNV e modelo gerado com o SPA-MLR, sendo 12 selecionadas variáveis (**Tabela 10**). Porém, novamente o menor erro de predição foi obtido empregando-se o pré-processamento por 1ª derivada e usando o algoritmo genético na seleção das 8 variáveis mostradas na **Figura 28**.

Neste caso, foram selecionadas as variáveis referentes ao processo de oxidação do catecol em torno de 0,30V. Além destas, o algoritmo também selecionou variáveis nos potenciais mais catódicos que era uma região que apresenta as maiores variações de corrente.

A análise de RS mostrou que o emprego do GA-MLR nos dados apenas suavizados fornece menores erros para validação interna, mas ainda com elevados valores de erro para predição externa (**Tabela 11**).

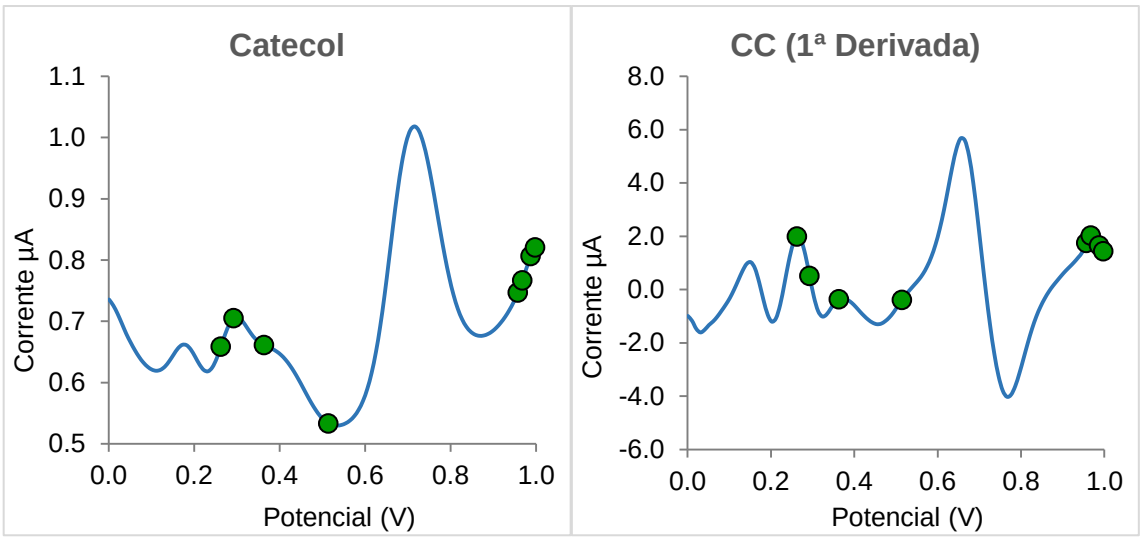

Figura 28 - Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo na análise de catecol

Tabela 11 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de resorcinol.

Metodo/ Pré-Process.		N	PRESS	RMSE		R
SPA-MLR						
PP1	Validação	12	*255.5*	RMSECV:	3.2	0.981
	Predição		1129.2	RMSEP:	15.0	0.987
PP2	Validação	16	*749.6*	RMSECV:	5.5	0.954
	Predição		1765.7	RMSEP:	18.8	0.699
PP3	Validação	7	*1494.0*	RMSECV:	7.7	0.895
	Predição		175.1	RMSEP:	5.9	0.926
PP4	Validação	5	*1029.3*	RMSECV:	6.4	0.922
	Predição		698.2	RMSEP:	11.8	0.855
GA-MLR						
PP1	Validação	13	*124.6*	RMSECV:	2.2	0.991
	Predição		1144.5	RMSEP:	15.1	0.957
PP2	Validação	14	*588.2*	RMSECV:	4.9	0.955
	Predição		9141.7	RMSEP:	42.8	0.161
PP3	Validação	13	*380.3*	RMSECV:	3.9	0.971
	Predição		9.0	RMSEP:	1.3	0.996
PP4	Validação	10	*670.3*	RMSECV:	5.2	0.950
	Predição		95.6	RMSEP:	4.4	0.907

Já o modelo gerado com GA-MLR nos dados pré-tratados com 1ª derivada fornecem os melhores resultados de predição das amostras, com 13 variáveis selecionadas que são mostradas na **Figura 29**.

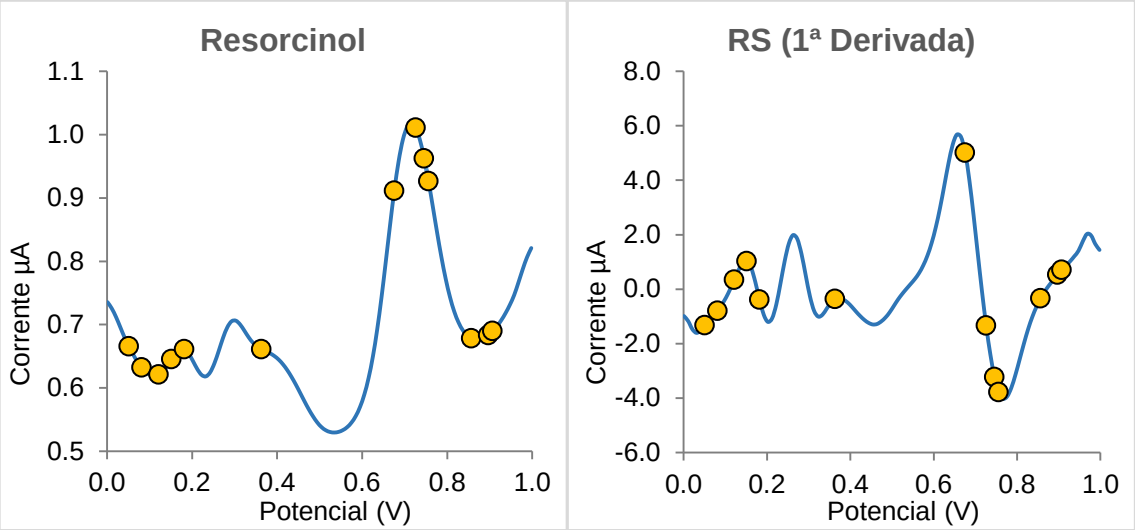

Figura 29 -Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo na análise de resorcinol.

Observa-se que as variáveis selecionadas encontram-se distribuídas na região onde foi observada resposta principal ao resorcinol, mas também na região mais anódica onde também se observa sinais de pequena magnitude para este analito.

Por fim, a análise de cresol mostrou resultados um pouco diferentes. Tanto para validação interna quanto externa o GA-MLR apresentou resultados mais satisfatórios. Conforme mostrado na **Tabela 12**, na validação interna o melhor desempenho foi observado com os dados pré-processados apenas com a suavização SG. Foram selecionadas 14 variáveis para o modelo que apresentou menor erro. Para a validação interna, com 13 variáveis selecionadas, os dados pré-processados com 1ª derivada apresentaram menores erros de predição próximos aos observados com validação interna. As variáveis selecionadas são mostradas na **Figura 30**.

Tabela 12 - Resultados obtidos para modelos gerados na análise de cresol.

Metodo/ Pré-Process.		N	PRESS	RMSE	R
SPA-MLR					
PP1	Validação	6	*950.6*	RMSECV: 6.2	0.928
	Predição		467.6	RMSEP: 9.7	0.848
PP2	Validação	5	*1207.7*	RMSECV: 7.0	0.907
	Predição		578.0	RMSEP: 10.8	0.892
PP3	Validação	9	*1074.2*	RMSECV: 6.6	0.920
	Predição		323.5	RMSEP: 8.0	0.900
PP4	Validação	4	*891.5*	RMSECV: 6.0	0.931
	Predição		522.2	RMSEP: 10.2	0.975
GA-MLR					
PP1	Validação	14	*219.9*	RMSECV: 3.0	0.983
	Predição		536.8	RMSEP: 10.4	0.883
PP2	Validação	11	*374.0*	RMSECV: 3.9	0.972
	Predição		480.7	RMSEP: 9.8	0.932
PP3	Validação	13	*304.1*	RMSECV: 3.5	0.978
	Predição		61.0	RMSEP: 3.5	0.982
PP4	Validação	5	*614.5*	RMSECV: 5.0	0.953
	Predição		133.7	RMSEP: 5.2	0.991

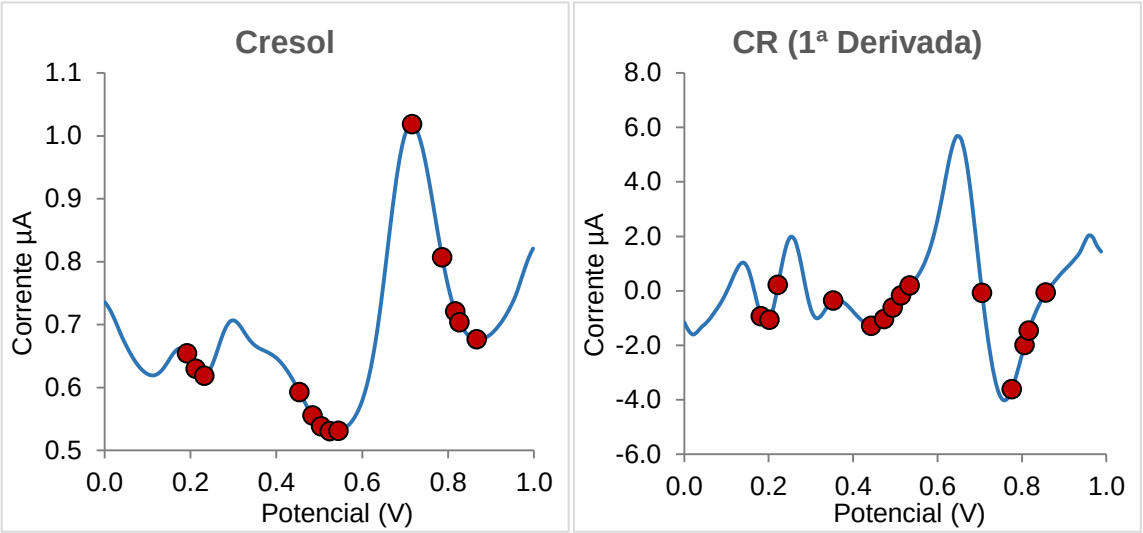

Figura 30 - Variáveis selecionadas pelo algoritmo genético para geração do modelo na análise de p-cresol

As variáveis selecionadas para o p-cresol se concentraram na região da resposta principal observada para este analito e região mais catódica onde se observa a maior variabilidade do sinal de corrente e na

região de potencial próxima a região de resposta à hidroquinona que pode estar ligada a conversão desta espécie a p-benzoquinona.

Assim, observou-se que os modelos gerados com a seleção de variáveis pelo algoritmo genético apresentavam para os quatro analitos a melhor capacidade de previsão das amostras quando comparados aos modelos em que se utilizou o SPA.

Os coeficientes que determinam a relação entre a concentração de cada analito e as variáveis selecionadas são mostrados na **Tabela 13**. Conforme a validação externa realizada, estes coeficientes foram usados para prever os valores das concentrações das 5 amostras de teste.

Tabela 13 - Coeficientes dos modelos obtidos para cada analito

Coef.	***Hidroquinona***	***Catecol***	***Cresol***	***Resorcinol***
β_0	41.4	11.6	56.3	21.5
β_1	$3\cdot(E_{0.12})$	$1.6\cdot(E_{0.26})$	$-0.8\cdot(E_{0.19})$	$1.1\cdot(E_{0.05})$
β_2	$2.1\cdot(E_{0.28})$	$-2.1\cdot(E_{0.29})$	$0.2\cdot(E_{0.21})$	$-4.5\cdot(E_{0.08})$
β_3	$-9.3\cdot(E_{0.42})$	$0.7\cdot(E_{0.36})$	$0.7\cdot(E_{0.23})$	$5.0\cdot(E_{0.12})$
β_4	$13.9\cdot(E_{0.44})$	$-2.2\cdot(E_{0.51})$	$-4.9\cdot(E_{0.45})$	$-2.0\cdot(E_{0.15})$
β_5	$-7.2\cdot(E_{0.48})$	$-24.0\cdot(E_{0.96})$	$30.9\cdot(E_{0.48})$	$-1.1\cdot(E_{0.18})$
β_6	$2.9\cdot(E_{0.56})$	$-0.8\cdot(E_{0.97})$	$-47.7\cdot(E_{0.50})$	$0.3\cdot(E_{0.36})$
β_7	$-1.2\cdot(E_{0.67})$	$97.7\cdot(E_{0.99})$	$26.1\cdot(E_{0.52})$	$-1.8\cdot(E_{0.68})$
β_8	$0.7\cdot(E_{0.74})$	$-73.3\cdot(E_{1.00})$	$-3.7\cdot(E_{0.54})$	$3.9\cdot(E_{0.73})$
β_9	$-3.9\cdot(E_{0.78})$		$-1.2\cdot(E_{0.72})$	$-8.0\cdot(E_{0.75})$
β_{10}	$5.1\cdot(E_{0.80})$		$2.8\cdot(E_{0.79})$	$3.8\cdot(E_{0.76})$
β_{11}	$-3.3\cdot(E_{0.83})$		$-18.9\cdot(E_{0.82})$	$-4.9\cdot(E_{0.86})$
β_{12}	$-1.5\cdot(E_{0.97}))$		$21.0\cdot(E_{0.83})$	$6.3\cdot(E_{0.90})$
β_{13}			$-9.8\cdot(E_{0.87})$	$-6.8\cdot(E_{0.91})$

Os valores reais e valores preditos são mostrados na **Tabela 14**. C_R corresponde a concentração ($\mu mol\cdot L^{-1}$) adicionada e C_P corresponde à concentração ($\mu mol\cdot L^{-1}$) prevista pelo modelo selecionado, seguida do desvio-padrão associado.

Tabela 14 – Previsão por validação externa das misturas teste.

Hidroquinona		Catecol		Resorcinol		Cresol	
C_R	C_P	C_R	C_P	C_R	C_P	C_R	C_P
12.0	7.0 ±3,4	6.0	10.3 ±2,8	20.0	21.0 ±2,7	4.0	0,0 ±2,5
6.0	4.5 ±3,4	26.0	25.7 ±2,8	4.0	1.3 ±2,7	4.0	7.5 ±2,5
10.0	6.0 ±3,4	6.0	5.4 ±2,8	6.0	6.0 ±2,7	36.0	30.7 ±2,5
32.0	25.4 ±3,4	30.0	27.9 ±2,8	28.0	28.5 ±2,7	40.0	38.3 ±2,5
4.0	2.5 ±3,4	12.0	9.1 ±2,8	12.0	11.6 ±2,7	8.0	9.2 ±2,5

Verifica-se uma boa capacidade de predição das concentrações testadas especialmente para a análise de catecol e resorcinol. A análise de hidroquinona e p-cresol apresentam erros mais elevados, isto mostra-se como reflexo das características da metodologia proposta, já que foram observados (**Tabela 7**) limites de detecção e quantificação mais elevados para estes compostos.

6. CONCLUSÕES

- Os nanotubos de carbono associados ao óleo mineral na forma de pasta apresentam uma boa sensibilidade a hidroquinona, catecol, p-cresol e resorcinol, mostrando-se como um bom material para construção de eletrodos voltados a estas determinações.
- Uma condição que favorece a determinação destes quatro analitos é a utilização de tampão TBR a pH 5,0 pois esta apresenta um bom compromisso para a determinação do conjunto de analitos estudados.
- A análise multivariada pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS) sem a utilização de um processo de seleção de variáveis mostrou-se insatisfatória na geração de modelos de predição para este sistema. Por outro lado, a utilização do método da regressão linear múltipla associada a seleção de varáveis pelo algoritmo genético (GA-MLR) mostrou-se como uma boa alternativa para construção destes modelos.
- A associação da análise eletroquímica a técnicas de calibração multivariada possibilita a determinação simultânea de hidroquinona, catecol, cresol e resorcinol.

REFERÊNCIAS

1 - SOLOMONS, T.W.G.; Fryhle, C.B. **Química Orgânica V.1**. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

2 - Hu, F.; Chen, S.; et al. Study on the application of reduced graphene oxide and multiwall carbon nanotubes hybrid materials for simultaneous determination of catechol, hydroquinone, p-cresol and nitrite. **Analytica chimica acta**, v. 724, p. 40–6, 2012.

3 - COLARIETI, M. Soil-catalyzed polymerization of phenolics in polluted waters. **Water Research**, v. 36, n. 12, p. 3015–3022, 2002.

4 - MU, S. Catechol sensor using poly(aniline-co-o-aminophenol) as an electron transfer mediator. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1237–43, 2006.

5 - SILVA, A.M..; Marques, R.R..; et al. Catalysts based in cerium oxide for wet oxidation of acrylic acid in the prevention of environmental risks. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 47, n. 4, p. 269–279, 2004.

6 - COLARIETI, M. Soil-catalyzed polymerization of phenolics in polluted waters. **Water Research**, v. 36, n. 12, p. 3015–3022, 2002.

7 - GENNARO, M.C.; Aigotti, R.; et al. An electrochemical process for the degradation of sulfonate and phenol derivatives in industrial effluents. **Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 735–747, 1997.

8 - WANG, J.; PARK, J.-N.; et al. Room-temperature heterogeneous hydroxylation of phenol with hydrogen peroxide over Fe^{2+}, Co^{2+} ion-exchanged Na beta zeolite. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 5, p. 628–9, 2003.

9 - HIDROQUINONA Ficha de Informação de Produto Químico.Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental CETESB SP. Disponivel em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=HIDROQUINONA>. Acesso em: 10 Julho 2015.

10 - CATECOL Ficha de Informação de Produto Químico. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental CETESB SP. Disponivel em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=CATECOL>. Acesso em: 10 Julho 2015.

11 - WANG, S.M.; SU, W.Y.; et al. A simultaneous and Sensitive Determination of Hydroquinone and Catechol at Anodically Pretreated Screen-Printed Carbon Electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, n. 11, p. 1649–1664, 2010.

12 - RESORCINOL Ficha de Informação de Produto Químico. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental CETESB SP. Disponivel em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=resorcinol>. Acesso em: 10 Julho 2015.

13 - CRESOL Ficha de Informação de Produto Químico. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental CETESB SP. Disponivel em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=cresol>. Acesso em: 10 Julho 2015.

14 - ASAN, A.; ISILDAK, I. Determination of major phenolic compounds in water by reversed-phase liquid chromatography after pre-column derivatization with benzoyl chloride. **Journal of chromatography. A**, v. 988, n. 1, p. 145–9, 2003.

15 - BAI, J.; GUO, L.; et al. Electrochemical properties and simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers at ordered mesoporous carbon-modified electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2497–2503, 2009.

16 - ZHANG, D.; PENG, Y.; et al. Application of multielectrode array modified with carbon nanotubes to simultaneous amperometric determination of dihydroxybenzene isomers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 136, n. 1, p. 113–121, 2009.

17 - NOTSU, H.; TATSUMA, T. Simultaneous determination of phenolic compounds by using a dual enzyme electrodes system. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 566, n. 2, p. 379–384, 2004.

18 - CHEN, C.; SUN, C.; et al. Application of electrosynthesized poly(aniline-co-p-aminophenol) as a catechol sensor. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 9, p. 2575–2580, 2009.

19 - BRITTO, J.M.; RANGEL, M. do C. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 114–122, 2008.

20 - CUI, H.; He, C.; et al. Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection. **Journal of chromatography. A**, v. 855, n. 1, p. 171–9, 1999.

21 - WISE, H.E.; FAHRENTHOLD, P.D. Predicting priority pollutants from petrochemical processes. **Environmental Science & Technology**, v. 15, n. 11, p. 1292–1304, 1981.

22 - ZHAO, G.; Li, M.; et al. Electrocatalytic redox of hydroquinone by two forms of l-Proline. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 255, n. 1-2, p. 86–91, 2006.

23 - OIKAWA, S.; HIROSAWA, I.; et al. Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 8, p. 1239–45, 2001.

24 - MCGRATH, J.W.; CHIN, J.P.; et al. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 412–9, 2013.

25 - International Agency for Research on Cancer.
Agents classified by the IARC monographs, 2013. Disponivel em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>. Acesso em: 10 Fevereiro 2015.

26 - SCHWEIGERT, N.; ZEHNDER, A.J.; et al. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. **Environmental microbiology**, v. 3, n. 2, p. 81–91, 2001.

27 - XIE, T.; LIU, Q.; et al. Simultaneous determination of positional isomers of benzenediols by capillary zone electrophoresis with square wave amperometric detection. **Journal of chromatography. A**, v. 1109, n. 2, p. 317–21, 2006.

28 - HIRAKAWA, K.; OIKAWA, S.; et al. Catechol and hydroquinone have different redox properties responsible for their differential DNA-damaging ability. **Chemical research in toxicology**, v. 15, n. 1, p. 76–82, 2002.

29 - LV, M.; WEI, M.; et al. Electrochemical Detection of Catechol Based on As-Grown and Nanograss Array Boron-Doped Diamond Electrodes. **Electroanalysis**, v. 22, n. 2, p. 199–203, 2010.

30 - MA, L.; ZHAO, G.-C. Simultaneous Determination of Hydroquinone, Catechol and Resorcinol at Graphene Doped Carbon Ionic Liquid Electrode. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

31 - Cresol and cresylic acid.
US Environmental protection agency, air toxics website, 2013. Disponivel em: <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/cresols.html>. Acesso em: fevereiro 2015..

32 - BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I.S.; et al. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006.

33 - QIU, H.; LUO, C.; et al. A chemiluminescence array sensor based on graphene-magnetite-molecularly imprinted polymers for determination of benzenediol isomers. **Analytica chimica acta**, v. 744, p. 75–81, 2012.

34 - PISTONESI, M.F.; DI NEZIO, M.S.; et al. Determination of phenol, resorcinol and hydroquinone in air samples by synchronous fluorescence using partial least-squares (PLS). **Talanta**, v. 69, n. 5, p. 1265–8, 2006.

35 - GHANEM, M.A. Electrocatalytic activity and simultaneous determination of catechol and hydroquinone at mesoporous platinum electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 10, p. 2501–2506, 2007.

36 - ARECCHI, A.; SCAMPICCHIO, M.; et al. Nanofibrous membrane based tyrosinase-biosensor for the detection of phenolic compounds. **Analytica chimica acta**, v. 659, n. 1-2, p. 133–6, 2010.

37 - MOLDOVEANU, S.C.; KISER, M. Gas chromatography/mass spectrometry versus liquid chromatography/fluorescence detection in the analysis of phenols in mainstream cigarette smoke. **Journal of chromatography. A**, v. 1141, n. 1, p. 90–7, 2007.

38 - WANG, L.-H.; KUO, Y.-P. Simultaneous quantitative determination of resorcinol and 1-Naphthol in haircolor products by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 49, n. 3-4, p. 208–211, 1999.

39 - LIN, C.-H.; SHEU, J.-Y.; et al. Determination of hydroquinone in cosmetic emulsion using microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 38, n. 3, p. 414–9, 2005.

40 - ZHANG, X.; DUAN, S.; et al. Electrochemical behavior and simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers at a functionalized SBA-15 mesoporous silica modified carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 1981–1987, 2011.

41 - YIN, H.; ZHANG, Q.; et al. Electrochemical behavior of catechol, resorcinol and hydroquinone at graphene–chitosan composite film modified glassy carbon electrode and their simultaneous determination in water samples. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 6, p. 2748–2753, 2011.

42 - BRETT, A.M.O.; BRETT, C.M.A. **Electroquímica - Princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996.

43 - THOMAS, F.G.; HENZE, G. **Introduction to Voltammetric analysis - theory and practice**. CSIRO: Collingwood VIC, 2001.

44 - PACHECO, W.F.; SEMAAN, F.S.; et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 2013.

45 - LEVIE, R. Notes on Gouy diffuse-layer theory. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 278, n. 1-2, p. 17–24, 1990.

46 - ZHANG, L.L.; ZHAO, X.S. Carbon-based materials as supercapacitor electrodes. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 9, p. 2520, 2009.

47 - FARGHALY, O. a; HAMEED, R.S.A.; et al. Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 3287–3318, 2014.

48 - HENZE, G. **Introduction to polarography and voltammetry**. Hereisau: Metrohm - Monographs, 2003.

49 - YU, J.; DU, W.; et al. High sensitive simultaneous determination of catechol and hydroquinone at mesoporous carbon CMK-3 electrode in comparison with multi-walled carbon nanotubes and Vulcan XC-72 carbon electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 3, p. 984–988, 2009.

50 - CAO, L.; SUN, H.; et al. An enhanced electrochemical platform based on graphene-polyoxometalate nanomaterials for sensitive determination of diphenolic compounds. **Analytical Methods**, v. 3, n. 7, p. 1587, 2011.

51 - XUE, K.-H.; XU, W.; et al. Electrochemical Determination of Dihydroxybenzene Isomers at the Carbon-Atom-Wire-Modified Electrode. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 154, n. 8, p. F147, 2007.

52 - HAN, L.; ZHANG, X. Simultaneous Voltammetry Determination of Dihydroxybenzene Isomers by Nanogold Modified Electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 2, p. 124–129, 2009.

53 - RADFORD, P.T.; CREAGER, S.E. Dual-stream flow injection method for amplified electrochemical detection of ferrocene derivatives. **Analytica Chimica Acta**, v. 449, n. 1-2, p. 199–209, 2001.

54 - RAZUMIENE, J.; VILKANAUSKYTE, A.; et al. New bioorganometallic ferrocene derivatives as efficient mediators for glucose and ethanol biosensors based on PQQ-dependent dehydrogenases. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 668, n. 1-2, p. 83–90, 2003.

55 - QIU, J.; PENG, H.; et al. Ferrocene-modified Fe3O4@SiO2 magnetic nanoparticles as building blocks for construction of reagentless enzyme-based biosensors. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 11, p. 2734–2738, 2007.

56 - YANG, P.; ZHU, Q.; et al. Simultaneous determination of hydroquinone and catechol using poly(p -aminobenzoic acid) modified glassy carbon electrode. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 113, n. 5, p. 2881–2886, 2009.

57 - ZHAO, D.-M.; ZHANG, X.-H.; et al. Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at PASA/MWNTs composite film modified glassy carbon electrode. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 317–21, 2009.

58 - LI, D.-W.; LI, Y.-T.; et al. Simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers using disposable screen-printed electrode modified by multiwalled carbon nanotubes and gold nanoparticles. **Analytical Methods**, v. 2, n. 7, p. 837, 2010.

59 - DU, H.; YE, J.; et al. A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 650, n. 2, p. 209–213, 2011.

60 - HRAPOVIC, S.; LIU, Y.; et al. Reusable platinum nanoparticle modified boron doped diamond microelectrodes for oxidative determination of arsenite. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 2, p. 500–7, 2007.

61 - SANTOS, M..; TOGNOLLI, J..; et al. Quimiometria como ferramenta analitica para definição das condiçoes de ensaio da enzima peroxidase de soja. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 121–131, 2010.

62 - FERRÃO, M.F.; CARVALHO, C.W.; et al. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIRR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 333–340, 2004.

63 - BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; et al. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na industria**. Porto Alegre: Bookman, 2010.

64 - BREITKREITZ, M.C.; SOUZA, A.M. de; et al. A didactic chemometrics experiment for design of experiments (DOE): evaluation of experimental conditions in the spectrophotometric determination of Iron II with o -phenanthroline. A tutorial, part III. **Química Nova**, v. 37, n. 3, 2014.

65 - SOUZA, A.M. de; BREITKREITZ, M.C.; et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013.

66 - BOX, G.E.P.; HUNTER, J.S.; et al. **Statistics for Experimenters - Design, Innovation, and Discovery**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

67 - BRERETON, R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **The Analyst**, v. 125, n. 11, p. 2125–2154, 2000.

68 - NINO, I. D. C. Avaliação de porfirinas na determinação simultânea de cátions por espectrofotometria uv-vis e calibração multivariada. João Pessoa: UFPB, 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) – CCEN/PPGQ, Universidade Federal da Paraíba.

69 - SWIERENGA, H.; HAANSTRA, W.G.; et al. Comparison of Two Different Approaches toward Model Transferability in NIR Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 52, n. 1, p. 7–16, 1998.

70 - NASCIMENTO, M.; Kawakami, R.; et al. Calibration transfer in multivariate methods. v. 30, n. 5, p. 1301–1312, 2007.

71 - PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

72 - SOARES, A. da S.; GALVÃO, R.K.H.; et al. Multi-core computation in chemometrics: case studies of voltammetric and NIR spectrometric analyses. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1626–1634, 2010.

73 - GOLDBERG, D.E. **Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning**. Boston: Longman, 1989.

74 - COSTA FILHO, P.A. da; POPPI, R.J. Algoritmo genético em química. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 405–411, 1999.

75 - SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

76 - CERQUEIRA, E.O.; POPPI, R.J.; et al. Utilização de filtro de transformada de fourier para a minimização de ruídos em sinais analíticos. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 690–698, 2000.

77 - SOUZA, D.M.; MADARI, B.E.; et al. Aplicação de técnicas multivariadas e inteligência artificial na análise de espectros de infravermelho para determinação de matéria orgânica em amostras de solos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1738–1745, 2012.

78 - PICÓ, Y. **Análise Química de Alimentos**. São Paulo: Campus, 2014.

79 - QI, H.; ZHANG, C. Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at a Glassy Carbon Electrode Modified with Multiwall Carbon Nanotubes. **Electroanalysis**, v. 17, n. 10, p. 832–838, 2005.

80 - RIBEIRO, W. F. Determinação voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro. João Pessoa: UFPB, 2012. 112f. Tese (Doutorado) – CCEN/PPGQ, Universidade Federal da Paraíba, 2012.

81 - ALLEGRINI, F.; OLIVIERI, A.C. IUPAC-Consistent Approach to the Limit of Detection in Partial Least-Squares Calibration. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 7858–7866, 2014.

82 - NASCIMENTO, D. S. Determinação simultânea de Cu, Pb, Cd, Ni, Co e Zn em etanol combustível por voltametria de redissolução adsortiva e calibração multivariada. João Pessoa: UFPB, 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado) – CCEN/PPGQ, Universidade Federal da Paraíba, 2013.

83 - DONG, J.; QU, X.; et al. Electrochemistry of Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes (CN x) with Different Nitrogen Content and Its Application in Simultaneous Determination of Dihydroxybenzene Isomers. **Electroanalysis**, v. 20, n. 18, p. 1981–1986, 2008.

84 - WANG, L.; MENG, Y.; et al. Simultaneous electrochemical determination of dihydroxybenzene isomers based on the hydrophilic carbon nanoparticles and ferrocene-derivative mediator dual sensitized graphene composite. **Electrochimica Acta**, v. 92, p. 216–225, 2013.

85 - WANG, Z.; LI, S.; et al. Simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers at single-wall carbon nanotube electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 127, n. 2, p. 420–425, 2007.

86 - ENACHE, T.A.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 1, p. 9–16, 2011.

87 - ZAKY, A.M.; CHAPLIN, B.P. Mechanism of p-Substituted Phenol Oxidation at a Ti 4 O 7 Reactive Electrochemical Membrane. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 10, p. 5857–5867, 2014.