

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Proposta de uma rotina de análise usando o eletrodo
de diamante dopado com boro para a determinação
simultânea de metais traço em água de coco**

Thalles Ramon Rosa

Dissertação de Mestrado em Química

**VITÓRIA
2015**

Thalles Ramon Rosa

Proposta de uma rotina de análise usando o eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação simultânea de metais traço em água de coco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

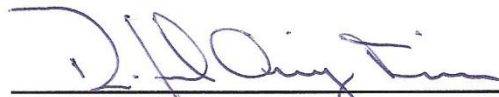
Orientador: Prof. Dr. Rafael de Queiroz Ferreira

VITÓRIA
2015

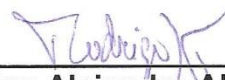
Thalles Ramon Rosa

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.


Aprovado em 31/08/2015 por:




Prof. Dr. Rafael de Queiroz Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Dr. Ernesto Corrêa Ferreira
Instituto Federal do Espírito Santo



Profa. Dra. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo

VITÓRIA, outubro de 2015

“Aos meus pais por abrir mão de muitas coisas para que esse objetivo fosse alcançado.”

AGRADECIMENTOS

À Deus por Sua excelência.

Aos meus pais, Carlos e Alzir, meus irmãos, Thiago e Thais, que juntos são minha base.

À minha namorada e, psicóloga, Jallana Rios, pela compreensão e apoio nesses últimos dois anos.

Aos técnicos do departamento de química da UFES: Guto, Emanuel, Paulinho, Matiello, Thieres e Jane.

Aos meus amigos de longas datas Renan Dias, Ramom Ramos, Alexandre Cunha.

Aos parceiros da caminhada acadêmica: Fernando Betim, Gustavo Gonçalves, Júlia Leite, Murilo Souza e Fernando Fogaça.

Ao José Guilherme (Zeca) e Carolina Provete por serem “engrenagem” essenciais no andamento desse trabalho.

Ao professor Dr. Rafael de Queiroz Ferreira pela parceria e orientação.

Aos professores doutores Rodrigo Alejandro Abarza Munoz e Ernesto Correa Ferreira e a professora doutora Geisamanda Pedrini Brandão Athayde por compor a banca avaliadora.

À professora Dr^a. Rosângela Cristina Barthus, pela ajuda intelectual em vários temas desse trabalho.

Ao DQUI/CCE e LQA pelo espaço de trabalho.

Ao Laboratório de espectrometria atômica do Labpetro, pelas análises por ICP OES.

À todos os demais que contribuíram para minha formação.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Coqueiros das variedades (a) gigante, (b) anã e (c) híbrido (uma mistura do coqueiro gigante e anã) 23
- Figura 2.** (a) Fruto do coqueiro “anão” para obtenção da água de coco. (b) fruto do coqueiro “gigante” para obtenção do coco seco..... 24
- Figura 3.** Distribuição da cocoicultura no estado do Espírito Santo em 2014. . 25
- Figura 4.** (a) relação entre potencial de excitação e o tempo e seus parâmetros experimentais da voltametria cíclica e (b) um voltamograma cíclico genérico. Adaptado: Henze 2004..... 28
- Figura 5.** Sinais de excitação da voltametria de pulso diferencial. As variáveis dessa técnica são: amplitude de pulso (ΔE_p); tempo de aplicação do pulso (tp); tempo do incremento de potencial (Δts); incremento de potencial (ΔEs). Adaptado: Henze (2004). 29
- Figura 6.** Voltamograma de uma análise por voltametria de pulso diferencial. Adaptado: Henze (2004). 30
- Figura 7.** (a) Decaimento das correntes faradaicas e capacitivas em função do tempo e (b) sinal de excitação da onda quadrada: Amplitude de pulso (ΔE_p); tempo de aplicação do pulso (tp); frequência da onda quadrada (f); incremento de potencial (ΔEs); sinal de excitação da *staircase* (L). Adaptado: Henze (2004). 31
- Figura 8.** Etapas do método e curva de potencial *versus* corrente para determinações por voltametria de redissolução anódica. Variáveis são: (a) potencial e tempo de pré-concentração; corrente de pico; (b) tempo de equilíbrio; (c) etapa de determinação podendo ser DPV ou SWV, sendo esta última ilustrada na imagem. Adaptado: Henze (2004)..... 33
- Figura 9.** Área superficial da gota de mercúrio formada *versus* tempo usando os modos (a) DME e (b) SDME. Adaptado: Henze (2004). 35
- Figura 10.** Área superficial da gota de mercúrio formada *vs.* tempo quando se usa (a) o modo HMDE e (b) um eletrodo sólido como o FME. Adaptado: Henze (2004). 36
- Figura 11.** Morfologia do diamante obtido por diferentes métodos: (a) diamante natural; (b) alta-pressão/alta-temperatura (HPHT); (c) deposição química a partir da fase vapor (CVD)..... 38
- Figura 12.** Estrutura mono-hidreto com apenas um átomo de hidrogênio (●) é ligado a cada carbono (○)..... 38
- Figura 13.** O desenvolvimento e colapso de bolhas de cavitação. Adaptada de Priego-Capote e Castro apud Castro e Luque-García (2002) e Mason e Lorimer (2002). 41
- Figura 14.** Elementos analisáveis por ICP OES. Adaptado: Fonte (2014) *apud* Perkin Elmer® (2008). 44

- Figura 15.** Representação da célula eletroquímica: (a) eletrodo de referência, (b) eletrodo de trabalho, (c) agitador (d) eletrodo auxiliar (e) entrada do gás inerte. 52
- Figura 16.** Eletrodo de diamante dopado com boro: (a) fio elétrico, (b) rolha para tubo de ensaio em borracha, (c) estrutura em acrílico e (d) área ativa do diamante dopado com boro. 56
- Figura 17.** Aparato para limpeza e ativação do eletrodo DDB: (a) bombeador do ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (solução de limpeza) para dentro da (b) célula eletroquímica; (c) eletrodo de DDB em tratamento; (d) voltímetro para monitoramento do potencial aplicado; (e) display com contagem regressiva e informações de estágio. 58
- Figura 18.** Software criado para controlar os processos de limpeza e ativação do eletrodo DDB. 59
- Figura 19.** Software para cálculo das concentrações usando a adição de analito nas análises voltamétricas; (a) interface para gerenciar a base dos picos e coletar as correntes de pico; (b) interface para cálculos com gráficos de adição de analito, gráfico de resíduos e algumas informações da célula eletroquímica. 64
- Figura 20.** Eletrodos construídos usando o filme de DDB em (a) base de placa cobreada e (b) em acrílico. 67
- Figura 21.** Microscopia óptica (20x) da junta DDB com a resina epóxi Araldite® Hobby. 68
- Figura 22.** Voltamograma cíclico do eletrodo de diamante dopado de “8000 ppm” de boro em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 69
- Figura 23.** Voltamograma cíclico da (—) solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ com concentração de $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o branco (—) ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 70
- Figura 24.** Primeiro aparato construído para limpeza e ativação do eletrodo DDB. 72
- Figura 25.** Segundo aparato construído para limpeza e ativação do eletrodo DDB. 72
- Figura 26.** (a) Voltamogramas de onda quadrada para a diferentes níveis de concentração do padrão ácido gálico em eletrólito suporte de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $V_{ef} = 100 \text{ mV s}^{-1}$); (b) Curva analítica do ácido gálico com todos os pontos de corrente. Equação da reta: $I_{pico} = 117,46 \pm 0,86 \text{ Ácido Gálico} - 0,0128 \pm 0,0014$ com $r^2 = 0,9991$ 74
- Figura 27.** (a) Resíduos da curva analítica do ácido gálico para os cinco níveis de concentração. 75
- Figura 28.** Superfície de resposta gerada pelo modelo matemático quadrático: otimização das variáveis E_{dep} e t_{dep} em função corrente de pico unificada dos elementos Zn, Cd, Pb e Cu. 79

- Figura 29.** Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial completo para quatro variáveis: Concentração do tampão (*C*); Incremento de potencial (ΔE_s); Amplitude de pulso (ΔE_p); frequência da onda quadrada (*f*). 84
- Figura 30.** Comportamento da resposta unificada dos metais Zn, Cd, Pb e Cu por SWASV. Superfície de resposta de (a) amplitude de pulso *versus* incremento de potencial (b) amplitude de pulso *versus* concentração do tampão, e a interação do (c) incremento de potencial *versus* concentração do tampão. 87
- Figura 31.** Voltamogramas de onda quadrada para a adições de oito alíquotas de solução padrão intermediário contendo Zn, Cd, Pb e Cu (concentrações de 585, 287, 299, 286 $\mu\text{g L}^{-1}$). 89
- Figura 32.** Curvas analíticas (a) para Zn, Cd, Pb e Cu e, para uma melhor visualização, (b) Zn, Cd, Pb. 90
- Figura 33.** Avaliação da concentração de Zn e Cu nas 10 amostras de água de coco..... 93
- Figura 34.** Voltamograma obtido pela SWASV da amostra de água de coco industrializada IA em eletrólito suporte tampão acetato de sódio *pH* 4,7. Fator de diluição: 4 vezes. 96
- Figura 35.** Curva de adição de padrão de (a) zinco; (b) cádmio; (c) chumbo e (d) cobre para a amostra IA (industrializada). 98
- Figura 36.** Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial completo 2^6 (sem interações) das variáveis da DPASV..... 102
- Figura 37.** Curva de nível obtida entre (a) amplitude de pulso e pré-concentração, (b) tempo de pré-concentração e tempo do incremento de potencial e (c) amplitude de pulso e tempo do incremento de potencial. 105
- Figura 38.** Esquema da digestão da água de coco assistida por ultrassom para análises voltamétricas. 108
- Figura 39.** Comportamento da DPASV em solução contendo oxigênio dissolvido em nitrato de potássio 0,1 mol L^{-1} . Adaptado: Henze (2004) 111
- Figura 40.** Solução digerida dos experimentos (a) 7, (b) ponto central e (c) 3. 112
- Figura 41.** Polarogramas dos experimentos (a) 7, (b) ponto central e (c) 3 do planejamento CCD da digestão da amostra (**NC**). A imagem dos tubos para verificar a coloração da amostra encontra-se inseridas em cada gráfico. Os volumes nas legendas correspondem à adição da solução estoque intermediária de Zn 1,00 mg L^{-1} 113
- Figura 42.** Varredura por DPASV de uma solução digerida após a adição de bissulfito de sódio. Destaque para o aparecimento dos picos (a) e (b). 114
- Figura 43.** Curvas de adição de analito para determinação de Zn da (a) Replicata 1 (—), (b) Replicata 2 (—) e (c) Replicata 3 (—) na amostra **NC** digerida com 0,8 mL H_2O_2 30% (*v/v*) e 0,6 mL de HCl_{conc} 115
- Figura 44.** Voltamogramas da SWASV usando DDB aplicado a amostra digerida NA. Os volumes informados na legenda correspondem a solução intermediária de Zn e Cu, ambos 1,00 mg L^{-1} 118

- Figura 45.** Curva de adição de analito do (a) Zn e (b) Cu sobre a amostra natural digerida NA. Fator de diluição: 20 vezes. 119
- Figura 46.** Voltamogramas da SWASV usando DDB aplicado a amostra digerida NE. Os volumes informados na legenda correspondem a solução intermediária de Zn e Cu, ambos $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ 121
- Figura 47.** Curva de adição de analito do (a) Zn e (b) Cu^{a} sobre a amostra natural digerida NE. Fator de diluição: 20 vezes. 122
- Figura 48.** Influência da solução tampão na altura de pico com (a) amônia / amônio (pH 8,0) e $E_{\text{dep}} = -1600 \text{ mV}$ (b) ácido bórico / borato (pH 8,0) e $E_{\text{dep}} = -1600 \text{ mV}$ e (c) acetato (pH 5,5) e $E_{\text{dep}} = -1400 \text{ mV}$. Concentração de Zn = 1 mg L^{-1} . Adaptado: Langeloth *et al.* (2010). 124
- Figura 49.** (a) Sobreposição dos voltamogramas para a determinação do LD usando os parâmetros da Tabela 33. (b) Curva analítica construída a partir dos voltamogramas em eletrólito suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão amoniacal (pH 8,0). 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais constituintes orgânicos e inorgânicos em 100 g água de coco.....	19
Tabela 1. Principais constituintes orgânicos e inorgânicos em 100 g água de coco.....	20
Tabela 2. Os principais radicais livres produzidos durante a aplicação de ultrassom em meio aquoso.	42
Tabela 3. Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	50
Tabela 4. Listagem da codificação para as 10 amostras de água de coco e sua origem.	54
Tabela 5. Variáveis para otimização do processo de digestão da água de coco.	54
Tabela 6. Variáveis e níveis escolhidos para etapa de triagem para a DPASV usando o HMDE.	56
Tabela 7. Variáveis e níveis para a otimização da pré-concentração da SWASV usando o DDB.	60
Tabela 8. Variáveis e níveis para a otimização da varredura da SWASV usando o DDB.....	61
Tabela 9. Variáveis da SWASV e seus valores otimizados/definidos para a determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu.....	63
Tabela 10. Condições operacionais do ICP OES segundo SOUSA <i>et al.</i> (2005) ^{12,37}	65
Tabela 11. Corrente de pico em função da concentração das replicatas de ácido gálico em ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹	73
Tabela 12. Avaliação da repetitividade para os 5 níveis de concentração do ácido gálico.	75
Tabela 13. Matriz do planejamento CCD para a otimização das variáveis <i>Edep</i> e <i>tdep</i> na determinação de Zn, Cd, Pb e Cu em água de coco.....	77
Tabela 14. ANOVA e validação do modelo matemático para a etapa de pré-concentração.....	78
Tabela 15. Resultados experimentais obtidos na etapa de triagem para o valor da resposta unificada	83
Tabela 16. Valores experimentais usados na otimização e a resposta unificada.	85
Tabela 17. Tabela ANOVA para o planejamento CCD das variáveis da SWV e concentração de tampão acético.....	86
Tabela 18. Valores de LD e LQ do método para a SWASV usando o eletrodo de DDB.....	88

Tabela 19. Valores de LD e LQ do método para a SWASV usando o eletrodo de DDB.....	91
Tabela 20. Características de desempenho para a análise das amostras de água de coco natural.....	92
Tabela 21. Concentrações de Zn, Cd, Pb e Cu em amostras de água de coco natural e industrial analisadas por ICP OES.	92
Tabela 22. Concentração de Zn, Cd, Pb, Cu reportados na literatura para a água de coco natural e industrializada.....	94
Tabela 23. Corrente de pico média (Ipicomédia) e o desvio padrão (DP) obtidos após construção da curva de adições de padrão na água de coco IA.	95
Tabela 24. Determinação livre usando SWASV e total usando ICP OES em água de coco industrializada (IA).	98
Tabela 25. Corrente de pico (<i>Ipico</i>) de Zn para cada experimento (<i>Exp.</i>) obtido pela matriz do planejamento fatorial completo.	101
Tabela 26. Matriz do planejamento CCD para três variáveis e a corrente de pico de Zn de cada experimento da DPASV.	103
Tabela 27. ANOVA e validação do modelo matemático linear para a DPASV.	104
Tabela 28. Valores das variáveis usadas para os experimentos eletroquímicos.	106
Tabela 29. Concentração de Zn determinada nos experimentos 2, 3, 7 e ponto central obtida por DPASV.....	112
Tabela 30. Concentração de Zn calculada na amostra NC em cada replicata aplicando 0,8 mL H ₂ O ₂ 30% (v/v) e 0,6 mL de HCl _{conc}	116
Tabela 31. Valores das variáveis da SWASV escolhidos para a determinação simultânea de Zn e Cu em água de coco em pH 4,7.....	117
Tabela 32. Concentração de Zn e Cu para amostra NA após a digestão e os valores obtidos por ICP OES.....	120
Tabela 33. Valores das variáveis da SWASV escolhidos para a determinação simultânea de Zn e Cu em água de coco em pH 8,0.	120
Tabela 34. Concentração de Zn e Cu para amostra NE após a digestão e os valores obtidos por ICP OES.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
CCD	<i>Central Composite Design</i>
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i>
DDB	Diamante Dopado com Boro
DME	<i>Drop Mercury Electrode</i>
DPV	<i>Diferencial Pulse Voltammetry</i>
DPASV	<i>Diferencial Pulse Anodic Stripping Voltammetry</i>
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EES	Eletrodo de Estado Sólido
ENH	Eletrodo Normal de Hidrogênio
ES	Espírito Santo
F AAS	<i>Flame Absorption Atomic Spectroscopy</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GF AAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
HF-CVD	<i>Hot Filament Chemical Vapor Deposition</i>
HMDE	<i>Hanging Mercury Drop Electrode</i>
HPHT	<i>High-Pressure/High-Temperature</i>
ICP AES	<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>
ICP MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
LCD	<i>Liquid Crystal Display</i>
LD	Limite de Detecção
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MFE	<i>Mercury Film Electrode</i>
MW	<i>Micro-Wave</i>
PVC	Policloreto de Vinila
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
SDME	<i>Static Drop Mercury Electrode</i>
SWASV	<i>Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry</i>
SWV	<i>Square-Wave Voltammetry</i>
US	Ultrassom
VC	Voltametria Cíclica

LISTA DE SÍMBOLOS

E_{dep}	Potencial de pré-concentração
E^o	Potencial padrão
$E_{oxidação}$	Potencial de oxidação
$E_{redução}$	Potencial de redução
$I_{codificada}$	Corrente de pico codificada
I_{pico}	Corrente de pico
$I_{pico}^{Médio}$	Média das correntes de pico
$LD_{ICP\ OES}$	Limite de detecção da técnica ICP OES
LD_{SWASV}	Limite de detecção da técnica SWASV
X^t	Matriz transposta a matriz contraste
r^2	Coefficiente de correlação ao quadrado
s_b	Desvio padrão do branco
t_{dep}	Tempo de pré-concentração
t_p	Tempo de aplicação do pulso
ΔE_p	Amplitude de pulso
ΔE_s	Incremento de potencial
Δt_s	Tempo do incremento de potencial
ΔE	Varição de potencial
C	Concentração da Solução tampão
$MQ_{err. Puro}$	Média quadrática do erro puro
MQF_{ajuste}	Média quadrática da falta de ajuste
MQR	Média quadrática da regressão
MQr	Média quadrática dos resíduos
X	Matriz de contraste
Y	Matriz resposta
f	Frequência
m	Coefficiente angular da curva analítica
n	Número de elétrons
DP	Desvio Padrão
t	Tempo
α	Ponto axial da matriz planejamento CCD

RESUMO

A combinação da voltametria de redissolução anódica usando onda quadrada (SWASV) com o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) foi proposta para a determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu livre e total em água de coco natural e industrializada. Os valores ótimos e/ou escolhidos a partir do planejamento experimental para essa técnica foram: -1500 mV e 240 s para o potencial e tempo de pré-concentração; $0,206\text{ mol L}^{-1}$ para a concentração do tampão acetato $\text{pH } 4,7$; $11,56\text{ mV}$ para o incremento do potencial; 55 mV e 100 Hz para a amplitude de pulso e frequência. A aplicação da SWASV na amostra industrializada de água de coco I (IA), sem digestão prévia, forneceu concentrações livres de Zn e Cu iguais a $76,8 \pm 4,2$ e $7,7 \pm 0,6\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Comparando com a técnica ICP OES, essas concentrações foram $0,33$ ($230 \pm 2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) de Zn e $1,54$ ($5,0 \pm 0,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) do Cu. Nesta determinação, as concentrações de Cd e Pb foram menores que os respectivos $LD_{ICP\ OES}$, $0,25$ e $1,6\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, uma determinação da concentração total desses analitos foi obtida após uma digestão assistida por ultrassom. Neste método, foram usados $1,00\text{ mL}$ da amostra de água de coco natural A, $0,8\text{ mL}$ de H_2O_2 (37% , v/v) e $0,6\text{ mL}$ HCl (35% , v/v). Após aplicação da SWASV na amostra digerida, os valores de concentração para Zn e Cu foram $1,02$ e $0,46$ em relação aos valores obtidos por ICP OES. Novamente, Cd e Pb foram menores que o LD de ambas as técnicas. Alternativamente, foram realizados estudos preliminares aplicando a SWASV, com as mesmas variáveis citadas anteriormente, porém empregando o tampão amoniacal $\text{pH } 8,0$ em substituição ao tampão acetato $\text{pH } 4,7$, para determinar a concentração dos quatro metais em uma amostra natural E (NE) digerida. Os resultados obtidos para Zn e Cu foram, respectivamente, $192,6 \pm 17$ ($1,04$ do ICP OES) e $13 \pm 3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ($< 1,6\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, $LD_{ICP\ OES}$), com destaque para a grande sensibilidade obtida para o Cu. Ao final desses estudos, podemos constatar que o uso do eletrodo de diamante dopado com boro em conjunto com a SWASV é uma ferramenta analítica sensível e versátil, que abre novas possibilidades para a determinação de metais traço em amostras naturais e digeridas.

Palavras-chave: Zinco, Cádmiio, Chumbo, Cobre, Diamante Dopado com Boro, água de coco, voltametria de onda quadrada e voltametria de redissolução anódica.

ABSTRACT

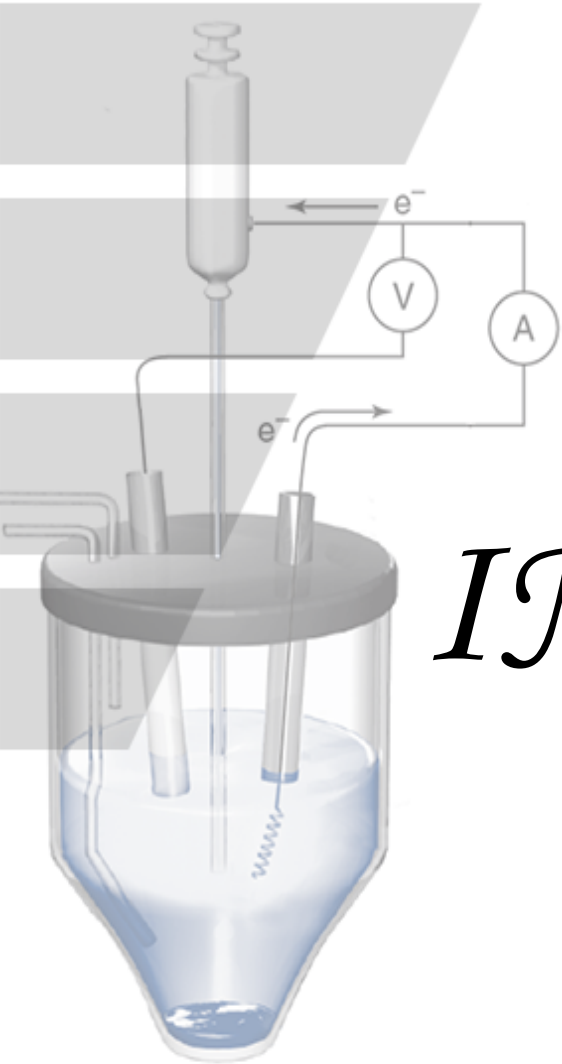
The square-wave anodic-stripping voltammetry (SWASV) and boron-doped diamond thin film electrode (BDD) have been proposed for the simultaneous determination of Zn, Cd, Pb and Cu, free and total, in natural and processed coconut water. The optimal values and/or chosen from the experimental design for this technique were: -1500 mV; 240 s; 0.206 mol L⁻¹; 11.56 mV; 55 mV and 100 Hz for the potential; time of deposition; concentration of acetate buffer pH 4.7; step voltage; pulse amplitude and frequency, respectively. The application of SWASV in the processed coconut water I (AI), with no previous digestion provided free Zn and Cu concentrations values of (85,8 ± 5%) and (7.7 ± 9%) µg L⁻¹, respectively. Compared to the ICP OES technique, these concentrations were 33% (230 ± 1%, in µg L⁻¹) of Zn and 154% (5.0 ± 10%, µg L⁻¹) of Cu. In this determination, the concentrations of Cd and Pb were lower than the respective LOD_{ICP OES} (0.25 and 1.6 µg L⁻¹, respectively). On the other hand, the determination of the total concentration of these analytes was carried out after digestion process assisted by ultrasound. In this method there were used 1.00 mL of natural coconut water of the sample A (NA), 0.8 mL of H₂O₂ (37% v/v) and 0.6 mL HCl (35% v/v). After the application of the SWASV the concentration values of the digested sample for Zn and Cu were 102% and 46% in response to the values obtained by ICP OES. Again, Cd and Pb were lower than the LOD of both techniques. Alternatively, preliminary studies were conducted by applying SWASV with the same previously cited variables, but using pH 8.0 ammonium acetate buffer to replace the buffer with pH 4.7 to determine the concentration of the four metals in a digested natural sample E (NE). The results obtained for Zn and Cu were respectively 192.6 ± 17 µg L⁻¹ (104% of ICP OES) and 13 ± 3 µg L⁻¹ (< 1,6 µg L⁻¹), highlighting the great sensitivity obtained for the Cu. At the end of these studies we noted that the use of DDB in conjunction with SWASV is a sensitive and versatile analytical tool which opens new possibilities for the determination of trace metals in natural and digested samples.

Keywords: zinc, cadmium, lead, copper, boron doped diamond, coconut water, square wave voltammetry and anodic stripping voltammetry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Considerações Iniciais	19
1.2	A cultura do coqueiro	21
1.2.1	Cultivo do Coqueiro no Mundo	22
1.2.2	Cultivo do Coqueiro no Brasil	22
1.2.3	Cultivo do Coqueiro no estado do Espírito Santo	24
1.3	Técnicas analíticas para determinação de metais na água de coco ...	25
1.4	Técnicas Voltamétricas.....	27
1.4.1	Voltametria cíclica.....	27
1.4.2	Voltametria de Pulso Diferencial.....	28
1.4.3	Voltametria de Onda Quadrada	30
1.4.4	Voltametria de redissolução anódica	32
1.5	O mercúrio como eletrodo de trabalho	34
1.5.1	Modos do Eletrodo de Mercúrio.....	34
1.6	A toxicidade do mercúrio	36
1.6.1	Mercúrio Metálico	36
1.6.2	Compostos inorgânicos de mercúrio	36
1.6.3	Compostos orgânicos de Mercúrio	37
1.7	O eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho	37
1.8	Preparo de Amostras.....	39
1.8.1	Digestão assistida por Ultrassom	40
1.8.2	Efeitos gerados pelo ultrassom.....	41
1.8.3	Dispositivos geradores de Ultrassom	42
1.9	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)	43
1.10	Planejamento e otimização de experimentos	44
2	OBJETIVO	48
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	50
3.1	Reagentes e Soluções.....	50
3.1.1	Soluções padrão para os ensaios voltamétricos.....	50
3.2	Instrumentação Eletroanalítica	52
3.2.1	Célula eletroquímica	52
3.3	Construção das curvas de adição de analito	53
3.4	Amostra de água de coco	53
3.5	Metodologia para digestão das amostras de água de coco.....	54
3.6	Planejamento Experimental da DPASV usando eletrodo de mercúrio	55
3.7	Construção do eletrodo com o filme de DDB.....	56
3.8	Verificação do funcionamento do DDB	57
3.9	Construção do Aparato para Limpeza/Ativação	57
3.9.1	Verificação da repetitividade na limpeza/ativação do DDB.....	59
3.10	Planejamento Experimental da SWASV usando DDB.....	59
3.10.1	Otimização dos parâmetros de pré-concentração da SWASV	60

3.10.2	Otimização dos parâmetros de varredura da SWASV	60
3.11	Tratamento dos dados das etapas de otimização	61
3.12	Determinação do LD e LQ da SWASV e DDB.....	61
3.13	Linearidade e faixa de trabalho da SWASV e eletrodo DDB	62
3.14	Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu livres em água de coco usando SWASV e DDB.....	62
3.15	Cálculos para adição de analito na SWASV e DDB	63
3.16	Determinação por ICP OES.....	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	Caracterização eletroquímica do sistema por VC.....	67
4.2	Aparato “ <i>labmade</i> ” para limpeza e ativação do DDB.....	71
4.2.1	Repetitividade do eletrodo de DDB após limpeza/ativação	73
4.3	Planejamento Experimental da SWASV usando DDB.....	76
4.3.1	Estudo do comportamento das variáveis da pré-concentração	76
4.3.2	Estudo do comportamento das variáveis da SWV.....	80
4.4	Determinação do limite de detecção e quantificação.....	88
4.5	Linearidade e faixa de trabalho da SWASV com eletrodo de DDB	89
4.6	Determinação total de Zn, Cd, Pb e Cu em água de coco.....	91
4.7	Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu livres em água de coco usando a SWASV	94
4.8	Planejamento Experimental da DPASV usando eletrodo de mercúrio	99
4.9	Digestão da água de coco assistida por ultrassom	107
4.10	Digestão assistida por Ultrassom para análise total por SWASV	116
4.10.1	Determinação de Zn e Cu por SWASV em pH 4,7	117
4.10.2	Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu por SWASV em pH 8,0	120
5	CONCLUSÃO	127
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
7	ANEXOS	140
7.1	Planejamento Fatorial Completo	140
7.1.1	Matriz do planejamento fatorial completo 2^6	140
7.1.2	Matriz do planejamento fatorial completo 2^4	142
7.2	Planejamento CCD	143
7.2.1	Matriz do planejamento CCD 2^2 com 3 pontos centrais.....	143
7.2.2	Matriz do planejamento CCD 2^3 com 3 pontos centrais.....	144



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A formação da endosperma líquida do fruto do coqueiro (*Cocos Nucifera* L.) é uma estratégia ecofisiológica para o armazenamento de substâncias nutritivas de reserva como mecanismo de sobrevivência da espécie.^{1,2} Portanto, esse líquido de aspecto turvo, mais conhecido como água de coco, é rico em carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais tais como Na, Ca, Fe, Zn, K, Mg, P, entre outros, citados na Tabela 1.³ Os teores dessas substâncias podem variar em função do período de maturação, da nutrição do solo de cultivo, da irrigação e condições climáticas ao longo do ano.^{4,5}

Tabela 1. Principais constituintes orgânicos e inorgânicos em 100 g água de coco.

(continua)

Nutrientes	Quantidade
Água	(94,99 ± 0,270) g
Proteína	(0,72 ± 0,417) g
Lipídios Total	(0,20 ± 0,085) g
Cinzas	(0,39 ± 0,082)g
Carboidratos	3,71 g
Fibras	1,1 g
Açúcares Total	2,61 g
Vitaminas	
C	2,4 mg ± 0,879
B1	0,030 ± 0,022mg
B2	0,057 ± 0,044
B3	0,080 ± 0,060 mg
B5	0,043 mg
B6	0,032 mg
Lipídios	
Ácidos Graxos, Total saturado	0,176 g
Ácidos graxos, Total monoinsaturada	0,008 g
Aminoácidos	
Triptofano	0,008g
Treonina	0,026 g
Isoleucina	0,028 g
Leucina	0,053 g

Tabela 2. Principais constituintes orgânicos e inorgânicos em 100 g água de coco.

(conclusão)

Nutrientes	Quantidade
Lisina	0,032 g
Metionina	0,013 g
Cistina	0,014 g
Tirosina	0,022 g
Valina	0,044 g
Arginina	0,118 g
Histidina	0,017 g
Alanina	0,037 g
Ácido aspártico	0,070 g
Ácido glutâmico	
Glicina	0,034 g
Prolina	0,03 g
Minerais	
Cálcio	24 ± 3,347 mg
Ferro	0,29 ± 0,094 mg
Magnésio	25 mg
Potássio	250 mg
Sódio	105 mg
Zinco	0,10 mg
Cobre	0,040 mg
Manganês	0,142 mg
Selênio	1 µg

Fonte: *Statistics Report 12119*.³

A água de coco é um alimento isotônico mundialmente conhecido e apreciado em todo o Brasil, principalmente em regiões litorâneas, devido ao sabor agradável e suas propriedades medicinais.^{6,7} O benefício da água de coco para o metabolismo vem sendo elucidado a cada pesquisa realizada.^{8,9}

O aperfeiçoamento do processo de conservação da água de coco fora do fruto (industrializada) tem facilitado a comercialização e exportação, principalmente por aumentar o tempo de prateleira.^{10,11} Nesse sentido, uma atenção especial é dada para essa amostra, no tocante ao desenvolvimento e aprimoramento de técnicas analíticas visando o monitoramento da qualidade desse alimento.

A Tabela 1 apresenta vários compostos orgânicos e macro/micronutrientes inorgânicos existentes na água de coco. Neste trabalho, destacamos os micronutrientes zinco (Zn) e cobre (Cu).¹² Ambos têm diversas

funcionalidades no organismo humano. O Cu, por exemplo, participa da síntese da hemoglobina na etapa de oxidação do ferro, o qual ocorre no plasma sanguíneo, através da enzima ferroxidase. Ele está presente nas enzimas responsáveis pela síntese de elastina e colágeno e na enzima citocromo oxidase, que catalisa a redução do oxigênio molecular para água, na célula. A intoxicação por Cu é caracterizada pelo seu acúmulo no fígado, causando náuseas e vômitos. O valor diário recomendado para a sua ingestão máxima é 2 mg. O Zn é um dos constituintes da anidrase carbônica, fosfatase alcalina e de uma série de desidrogenases e peptidases. Ele também participa na síntese de RNA e outras proteínas. Além disso, ele é essencial para o crescimento e desenvolvimento normal do esqueleto. O valor diário para ingestão é de 15 mg.¹³

Além dos elementos Zn e Cu, a determinação do valor das concentrações de cádmio (Cd) e chumbo (Pb) também foi avaliada neste trabalho para um monitoramento das contaminações por metais tóxicos na água de coco.

Os metais Zn, Cd, Pb e Cu citados podem ser determinados em várias matrizes usando técnicas voltamétricas e diversos tipos eletrodos de trabalho como os de mercúrio, ouro^{14,15}, carbono vítreo¹⁶⁻¹⁸, nanotubos de carbono¹⁹⁻²¹, etc. No entanto, diante das recentes tecnologias de materiais eletródicos aplicados como eletrodo de trabalho, podemos citar o eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB), que vem se destacando a mais de duas décadas dentre os materiais utilizados pela eletroquímica.²²⁻²⁸

1.2 A cultura do coqueiro

O coqueiro é um dos principais recursos vegetais da humanidade sendo considerado pelos pesquisadores como a árvore da vida, a planta de “mil e uma” utilidades. Todas as suas partes, como raiz, caule, folha, inflorescência e fruto são empregadas para fins artesanais, alimentícios, nutricionais, agroindustriais, medicinais e biotecnológicos, entre outros. O seu cultivo se destaca não só pelos aspectos econômicos que proporciona, mas também pelos ganhos sociais e ambientais advindos da exploração sustentável dessa cultura.²⁹

1.2.1 Cultivo do Coqueiro no Mundo

A cultura do coco pode ser encontrada em mais de 200 países. Porém, sua exploração comercial se detém expressivamente em aproximadamente 90 desses países. O principal objetivo do cultivo mundial é a obtenção do óleo e coco seco desidratado, que possuem maiores aplicações na culinária.²⁹

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (sigla FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*), na década de 70, indicou que a produção total mundial foi cerca de 26 milhões de toneladas colhidos numa área de 6,7 milhões de hectares. Atualmente, a produção circunda a quantidade de 60 milhões de toneladas em uma área colhida próxima a 12 milhões de hectares. Porém, o que mais chamou a atenção foi o aumento significativo, em termos de produção por hectare (produtividade), que é consequência do aprimoramento tecnológico dos sistemas de cultivo refletindo no avanço da produtividade global.²⁹ Os 5 principais países são (em ordem decrescente de produção): Indonésia, Filipinas, Índia, Brasil e Sri Lanka.²⁹

O Brasil é o quarto país do mundo na produção de frutos contribuindo com cerca de 5% do total produzido.³⁰

1.2.2 Cultivo do Coqueiro no Brasil

A produção brasileira se destina, basicamente, à agroindústria para a produção de coco ralado e leite de coco e, cada vez mais crescente, a água de coco.²⁹

O cultivo do coqueiro para a obtenção da água de coco tem aumentado nos últimos anos, o que o classifica como um mercado promissor com uma forte tendência econômica para o futuro.¹

No que se refere ao comércio de derivados de coco, é importante evidenciar que, até o ano passado, o crescimento interno e externo mercadológico foi atribuído, principalmente, ao aumento da qualidade de vida e saúde da população brasileira.²⁹ Por esse e outros motivos, o setor é promissor e alvo de investimentos milionários.³¹

O crescimento da cultura do coqueiro no Brasil foi tão evidente que de 2000 até 2008, sua posição na produção mundial de cocos saltou de décimo para quarto. Atualmente, essa condição de destaque do Brasil no cenário mundial se sobressai ainda mais quando se compara aos países da América do Sul, região na qual a produção brasileira é responsável por 88%.⁶

A região nordeste contribui com a maior produção nacional de coco. No entanto, o rendimento da cultura nessa região, em termos de produtividade, é menor do que em outras regiões, como a sudeste. Esta situação decorre principalmente do nível tecnológico empregado, das variedades de coco exploradas e de sua utilização final. No Nordeste, por exemplo, o cultivo de coco é voltado para as espécies de coqueiro “Gigante” (Figura 1a) cujos frutos são, geralmente, destinados a produção de coco seco com maior aplicação na culinária. A região sudeste contém predominantemente o cultivo das espécies de coqueiros “Anões” (Figura 1b) e “Híbridos” (Figura 1c).²⁹

a)



b)



c)



Figura 1. Coqueiros das variedades (a) gigante, (b) anã e (c) híbrido (uma mistura do coqueiro gigante e anão).²⁹

As espécies de coqueiro anão (Figura 2a) e híbrido compõem uma cultura voltada pra a obtenção da água de coco ao passo que, o coqueiro gigante é usado para a obtenção do coco seco (Figura 2b).²⁹

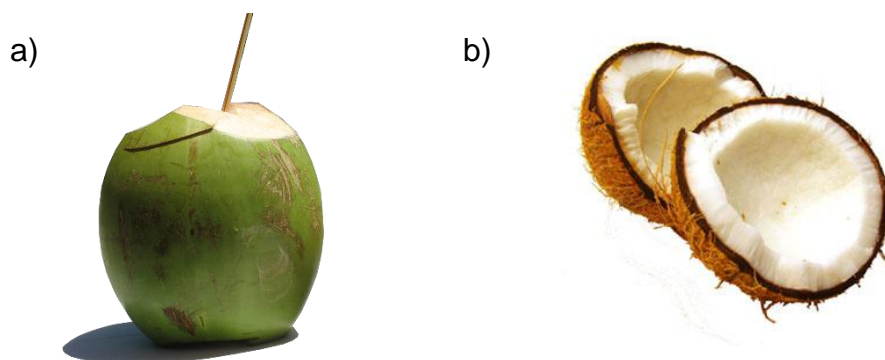


Figura 2. (a) Fruto do coqueiro “anão” para obtenção da água de coco. (b) fruto do coqueiro “gigante” para obtenção do coco seco.²⁹

Os principais estados brasileiros produtores são (em ordem decrescente): Bahia, Ceará, Sergipe, Pará, Espírito Santo, Pernambuco e Rio de Janeiro. Porém, em termos de **produtividade** (frutos / hectare), o Rio de Janeiro e Espírito Santo (ES) ganham destaque.²⁹

1.2.3 Cultivo do Coqueiro no estado do Espírito Santo

Em 2009, o estado do ES mantinha uma produção de 158 milhões de frutos por ano. Essa estatística posicionou o estado em 5º lugar na produção brasileira e o 2º na produção de frutos por hectare (produtividade), atrás apenas do Rio de Janeiro.⁶ Hoje, o ES permanece na 5º posição, porém, lidera a produtividade do Brasil, reportando-o para uma condição de destaque nacional.²⁹

Os municípios do ES pioneiros na cultura do coco foram: São Mateus, Conceição da Barra, Vila Valério, São Gabriel da Palha e Linhares (Figura 3). Além disso, estes também são os principais contribuintes da região sudeste a qual detém 7,7% da área cultivada e, 15,6% da produção brasileira.²⁹

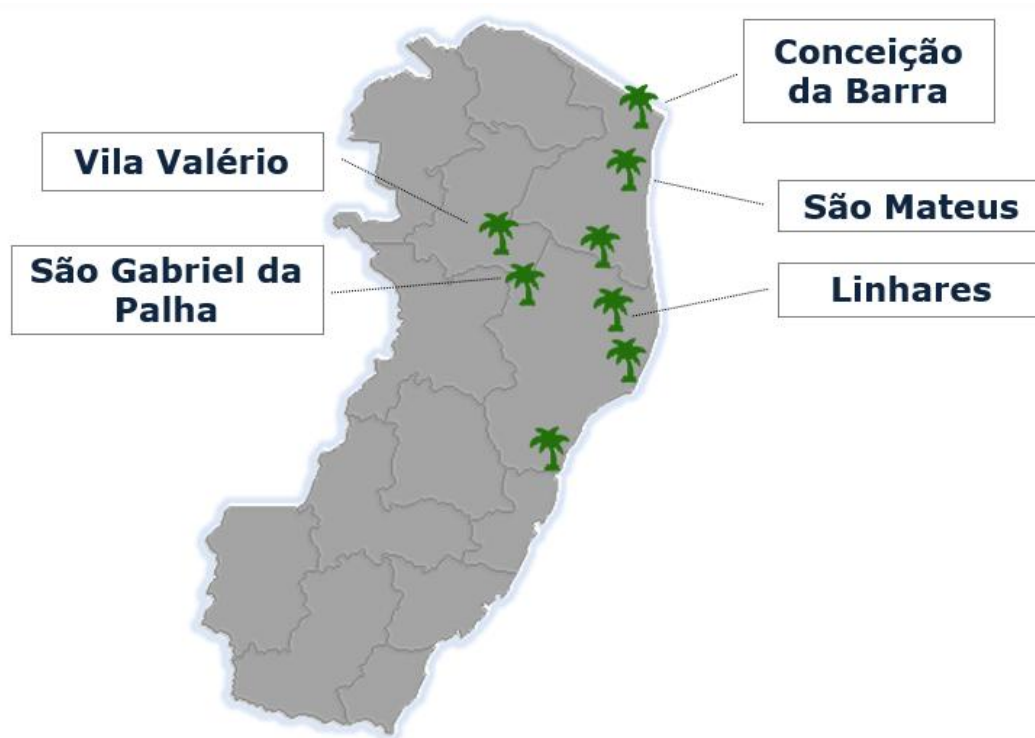


Figura 3. Distribuição da cococultura no estado do Espírito Santo em 2014.

O município de São Mateus, no Espírito Santo tem a maior área plantada da região, com 15,2% do total, e quantidade produzida de 22,6% da produção regional.²⁹

1.3 Técnicas analíticas para determinação de metais na água de coco

A crescente demanda mercadológica da água de coco despertou em pesquisadores de várias partes do mundo uma busca por métodos analíticos capazes de avaliar características sensoriais, parâmetros físico-químicos, bem como a sua composição orgânica e inorgânica de forma rápida e eficiente. Nesse sentido, a eletroforese e as técnicas cromatográficas podem ser empregadas para qualificar ou quantificar vários compostos orgânicos na água de coco.^{7,32,33} Por outro lado, os compostos inorgânicos são, na maioria das vezes, determinados por técnicas espectrométricas.^{7,12,34,35}

Os metais K, Na, Mg e Ca, por exemplo, foram determinados na matriz água de coco por espectrometria de absorção atômica com chama (sigla F AAS, do inglês *Flame Absorption Atomic Spectroscopy*) por Jeganathan *et al.*³⁴ em 1992. Quatro anos mais tarde Santoso *et al.*³⁵ usaram a técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (sigla

ICP AES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*) para determinar Mg, K, Na, Ca, P, S, Mn, Fe, Zn, Cu, B e Al na mesma matriz. Aleixo *et al.*³⁶ em 2000 determinaram a concentração de Selênio em água de coco e leite de coco industrializado utilizando a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (sigla GF AAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*). No ano de 2005, Sousa *et al.* determinaram Mg, Ca, Mn, Fe, Zn e Cu em água de coco industrializada¹² e natural³⁷ por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (sigla ICP OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).

No entanto, as técnicas espectroanalíticas, anteriormente citadas, possuem um custo elevado e tempos moderados de execução. Em contrapartida, as técnicas eletroanalíticas, principalmente a voltametria, vem sendo cada vez mais empregadas para obter informações fundamentais sobre diversas substâncias orgânicas e inorgânicas, inclusive espécies metálicas. A sua aplicabilidade é ampla e vasta, com destaque para o seu emprego em processos de oxirredução em vários meios; em processos de adsorção em superfícies e em mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos de trabalho modificados.³⁸ Um aspecto desejável das técnicas voltamétricas é a possibilidade de sua aplicação direta na amostra evitando o preparo da mesma.³⁹ Essa característica possibilita análises com materiais coloridos ou mesmo amostras turvas, como o caso da água de coco, que contém partículas sólidas dispersas.⁵

O uso de técnicas voltamétricas se baseia na relação direta entre a concentração do analito e suas propriedades elétricas (corrente elétrica, potencial, condutividade, resistência e carga). Além disso, essas técnicas são bem adequadas na quantificação das espécies de interesse em diversas áreas, pois as medidas propostas apresentam baixo nível de complexidade, alta sensibilidade, curto tempo de execução, baixo custo se comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas.^{40,41}

As técnicas eletroanalíticas tem se tornado cada vez mais sensíveis as diversas espécies, fazendo com que os seus limites de detecção (LD) sejam

comparadas as técnicas convencionais, usadas na análise de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais, biológicas e em alimentos.³⁸

1.4 Técnicas Voltamétricas

Dentre as técnicas voltamétricas mais conhecidas, podemos destacar a **voltametria cíclica** (VC), a **voltametria de pulso diferencial** (sigla DP, do inglês, *Differential Pulse*) e a **voltametria de onda quadrada** (SWV).

A voltametria cíclica é geralmente aplicada para uma investigação qualitativa do sistema eletroquímico. As principais informações obtidas pela VC, para posterior aplicação em técnicas de redissolução anódica (será citada no 1.4.4), são: Reversibilidade do sistema; potencial mínimo aplicado para pré-concentrar o analito e região de potencial onde ocorrem os picos da redissolução (ou oxidação). Seu conceito envolve algumas particularidades destacadas a seguir.

1.4.1 Voltametria cíclica

A Voltametria Cíclica é um método que proporciona uma varredura de potencial (com velocidade constante) compreendido numa faixa delimitada por dois potenciais preestabelecidos. Nestes potenciais, também chamados primeiro e segundo potencial de vértice, ocorre a inversão no sentido da varredura. Com isso, estudam-se as reações eletroquímicas diretas e inversas dadas pelos fenômenos de oxidação e redução, respectivamente.⁴¹ A Figura 4a mostra algumas variáveis da técnica e a Figura 4b um voltamograma genérico para a voltametria cíclica.⁴²

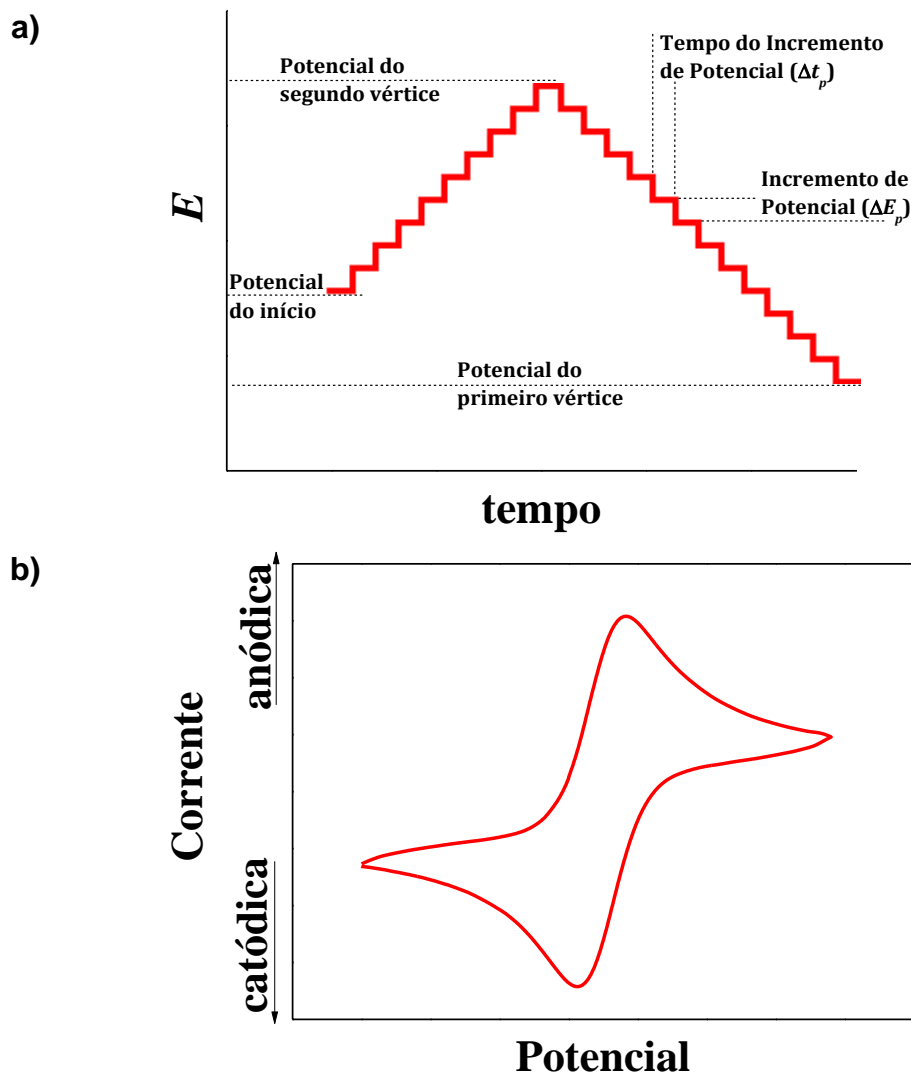


Figura 4. (a) relação entre potencial de excitação e o tempo e seus parâmetros experimentais da voltametria cíclica e (b) um voltamograma cíclico genérico. Adaptado: Henze 2004.⁴²

1.4.2 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso foi inicialmente desenvolvida para suprimir a contribuição das correntes capacitivas originadas da interface eletrodo-eletrólito.⁴³ Por ser desenvolvida no século passado, a voltametria de pulso diferencial cresceu acompanhada do eletrodo gotejante de mercúrio (sigla DME, do inglês *Drop Mercury Electrode*), visto que esse sistema possibilita uma sincronia da queda da gota de mercúrio com o final do pulso aplicado. Por consequência, a corrente oriunda de processos meramente capacitivos foi minimizada.⁴⁴

A DPV, ou voltametria de pulso diferencial, pode alcançar LD's da ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, limites estes menores que os da polarografia que não utilizavam o pulso.

A Figura 5 apresenta o sinal de excitação aplicado no eletrodo de trabalho para uma voltametria usando DPV.⁴⁰ O potencial de amplitude pulso (ΔE_p) é aplicado sobre uma *staircase* (linha preta hachurada, L) durante um tempo (t_p). Além desses parâmetros, a DPV também possui parâmetros como tempo entre cada um incremento de potencial (Δt_s) e o próprio incremento de potencial (ΔE_s).

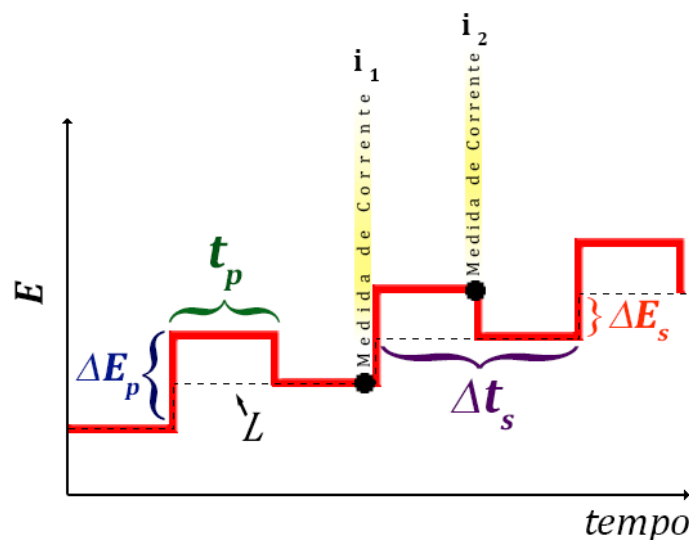


Figura 5. Sinais de excitação da voltametria de pulso diferencial. As variáveis dessa técnica são: amplitude de pulso (ΔE_p); tempo de aplicação do pulso (t_p); tempo do incremento de potencial (Δt_s); incremento de potencial (ΔE_s). Adaptado: Henze (2004)⁴².

A resposta obtida por meio do voltamograma é dado pela altura do pico o qual está relacionada proporcionalmente com a concentração do analito (Figura 6). O perfil do pico é obtido pelas medidas de corrente no final do patamar da *staircase* (i_1) e no final da aplicação do pulso (i_2), fazendo com que a resposta seja uma diferença de corrente obtida a cada pulso (Δi).⁴⁰ A corrente de pico (i_p) é obtida pela altura do ponto máximo do pico até a linha de base.

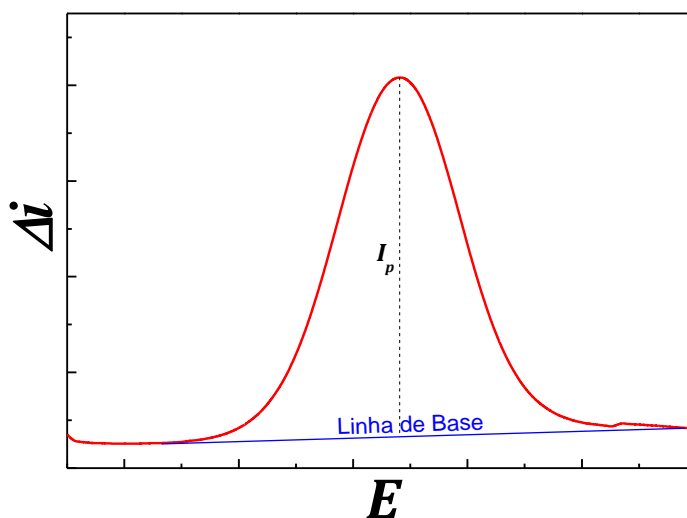


Figura 6. Voltamograma de uma análise por voltametria de pulso diferencial. Adaptado: Henze (2004)⁴².

1.4.3 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (sigla SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) se destaca entre as outras técnicas pela velocidade de varredura. Ela foi inventada por Ramaley e Krause⁴⁵ e, posteriormente, ajustada por Osteryoung, Turner e Christie.^{46,47} Estes autores pensaram que a voltametria de redissolução anódica com pulsos deveria ter menores limites de detecção do que o método com varredura linear tradicional, pois, no primeiro caso, a corrente é lida em um estágio de menor intensidade. Os autores reconhecem também que com o pulso, parte da substância que foi redissolvida é repostada entre o intervalo dos pulsos. A velocidade de varredura atualmente proposta possui valores maiores que 100 mVs^{-1} .³⁸

A Figura 7a mostra as medidas de corrente sendo realizadas apenas ao final do pulso de potencial, onde a magnitude da corrente capacitiva já está minimizada e a corrente faradaica ainda possui uma magnitude considerável. Isso porque a corrente capacitiva é proporcional a $e^{-t/R\bar{c}}$, onde t é o tempo, R a resistência a solução e \bar{c} a capacitância da dupla camada, e a corrente faradaica é proporcional a $t^{-1/2}$, o decaimento da primeira, após a aplicação do pulso, é muito mais pronunciado que o da última.³⁸

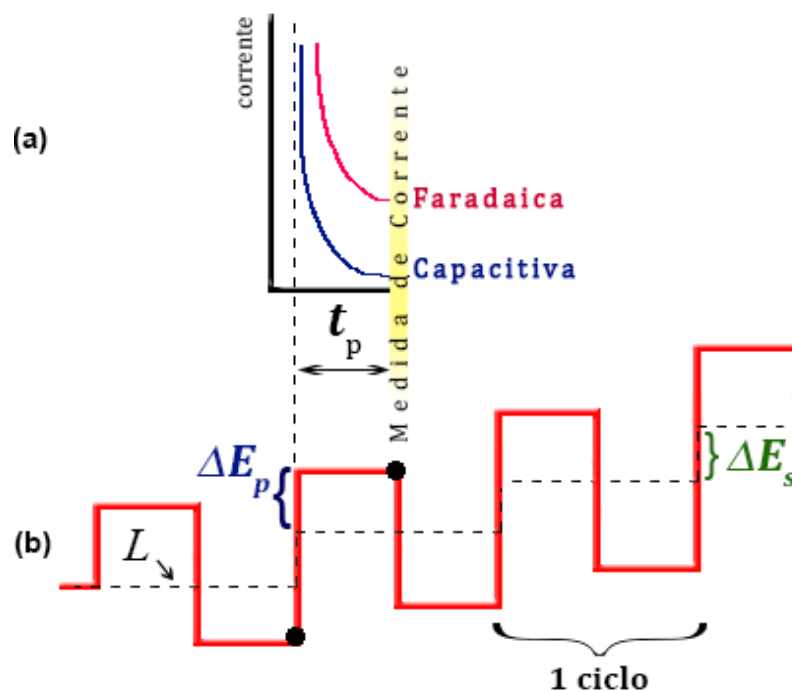


Figura 7. (a) Decaimento das correntes faradaicas e capacitivas em função do tempo e (b) sinal de excitação da onda quadrada: Amplitude de pulso (ΔE_p); tempo de aplicação do pulso (t_p); frequência da onda quadrada (f); incremento de potencial (ΔE_s); sinal de excitação da *staircase* (L). Adaptado: Henze (2004)⁴².

A Figura 7a traz o comportamento das correntes no decorrer da aplicação do pulso. O decaimento da corrente capacitiva é mais pronunciado que a faradaica levando a uma melhor relação entre essas duas. A Figura 7b, contém o sinal de excitação para a onda quadrada (em vermelho), bem como a amostragem de corrente no final de cada pulso.

Na SWV, a forma com a qual o potencial é aplicado no eletrodo de trabalho pode ser desmembrado em uma *staircase* (linha hachurada L em forma de escada na Figura 7b) e uma onda quadrada. Os patamares da *staircase* se diferem um dos outros por um incremento de potencial chamado de ΔE_s . Nesse sentido, cada um desses patamares comporta um ciclo de onda quadrada que é executado em um tempo de $2 \times t_p$. Logo, durante metade do tempo (t_p) de aplicação desse patamar, um potencial é acrescido (ΔE_p) ao passo que durante a outra metade o mesmo valor de potencial é subtraído. O formato resultante dessas aplicações de pulsos corresponde a linha vermelha da Figura 7b. O tempo total para que a onda quadrada realize um ciclo é chamado de período e, por definição, o inverso do período é a frequência (f) da onda.

Para cada um desses ciclos, duas amostras de corrente são lidas nos momentos indicados com pontos sólidos da Figura 7b (ou seja, no final de cada pulso). Como pode-se observar, nesses pontos a relação entre corrente faradaicas e capacitivas é otimizada. A velocidade efetiva para uma análise por SWV é dada pelo produto do incremento de potencial com a frequência de aplicação dos pulsos de potencial ($\Delta E_s \cdot f$). Sendo assim, tempos experimentais muito curtos podem ser obtidos utilizando-se frequências moderadas.³⁸

1.4.4 Voltametria de redissolução anódica

A voltametria de redissolução anódica (sigla ASV, do inglês *Anodic stripping voltammetry*) foi utilizada pela primeira vez por Zbinden em 1931, ao tentar determinar íons Cu^{2+} eletrogravimetricamente depositando-o num eletrodo de platina. Como a quantidade depositada era demasiadamente pequena para ser determinada com exatidão, Zbinden sugeriu inverter a corrente e oxidar (ou “redissolver”) o cobre existente no eletrodo, determinando-o quantitativamente através da corrente consumida durante o processo.⁴⁸ Desde então, iniciou-se os estudos com pré-concentração do analito.^{49–54}

O procedimento de pré-concentração consiste no acúmulo do analito no eletrodo de trabalho por uma cronoamperometria, seguido de uma detecção por alguma técnica voltamétrica, como por exemplo, a DPV ou SWV supracitada.⁵⁵

A técnica voltamétrica que utiliza o *stripping* anódico seguido de uma DPV é chamada de DPASV (do inglês, *Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry*) ao passo que a técnica que usa a SWV é chamada de SWASV (do inglês, *Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry*) ambas muito aplicadas na determinação da concentração de espécies metálicas^{18,41,56–58} por atingirem LD na ordem de $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.⁴⁰

Os passos da ASV são mostrados na Figura 8. Na seção **(a)** ocorre uma pré-concentração (ou eletrodeposição) na qual o analito é reduzido no eletrodo

de trabalho a um potencial constante menor que seu potencial de redução. Essa etapa ocorre com agitação constante.⁴²

Na seção **(b)** ocorre um período de repouso. Durante esse período, não há agitação, o que ocasiona uma queda na corrente catódica por falta de convecção do sistema. O potencial aplicado é constante e igual ao potencial inicial da voltametria usada na redissolução. Desta maneira, a dupla camada elétrica é “reorganizada” ao experimentar o novo campo elétrico gerado por esse potencial aplicado. Por fim, é na seção **(c)** que é aplicada uma voltametria de varredura, como a DPV, SWV, etc.

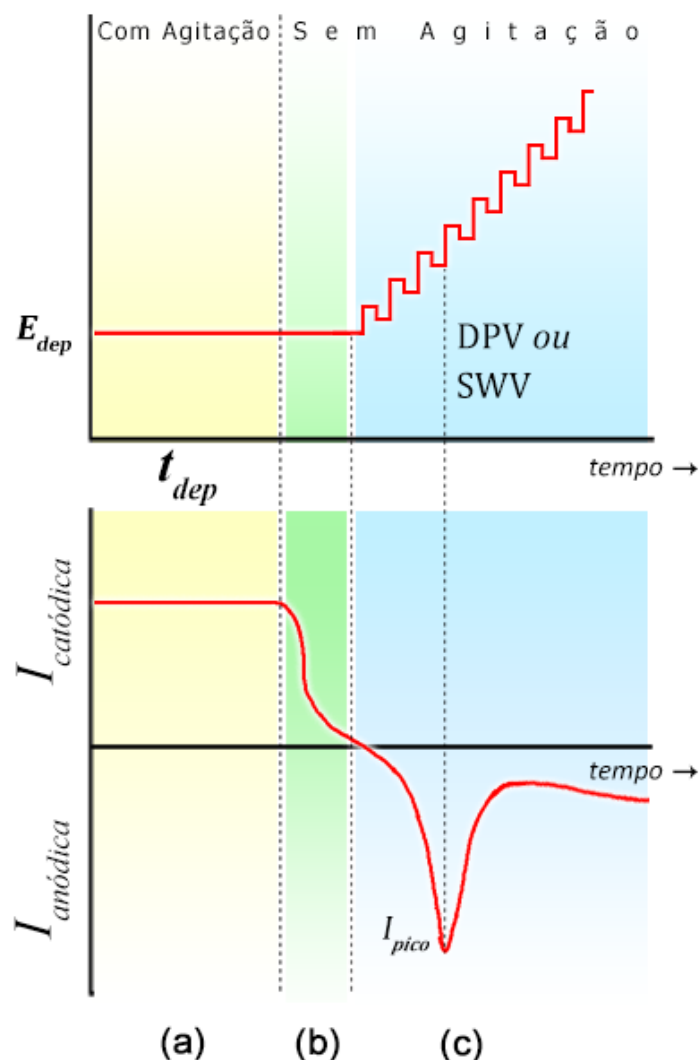


Figura 8. Etapas do método e curva de potencial *versus* corrente para determinações por voltametria de redissolução anódica. Variáveis são: (a) potencial e tempo de pré-concentração; corrente de pico; (b) tempo de equilíbrio; (c) etapa de determinação podendo ser DPV ou SWV, sendo esta última ilustrada na imagem. Adaptado: Henze (2004)⁴².

Contudo, um voltamograma da corrente *versus* potencial aplicado proporciona o valor da corrente de pico (I_{pico}), exemplificado na seção (c) da anterior, o qual está relacionado com a concentração do analito.⁴²

Explorando a ASV, Brainina apresentou em 1971 um dos trabalhos mais completos sobre o tema ao indicar o eletrólito suporte ideal, limites de detecção entre outras informações relevantes para a determinação de vários analitos.⁵⁹ Ainda à época, o autor cita o uso do MFE (do inglês, *Mercury Film Electrode*) como eletrodo de trabalho que ainda é usado.¹⁴

1.5 O mercúrio como eletrodo de trabalho

O mercúrio é um metal líquido a temperatura ambiente que pode ser obtido com pureza analítica. Quando esse metal é aplicado como eletrodo de trabalho, este proporciona superfícies renováveis e área de gota reprodutíveis. Além disso, o Hg possui um elevado sobrepotencial de hidrogênio quando comparado com a maioria dos outros eletrodos, o que facilita seu uso na determinação de metais, principalmente os pesados.⁴⁰

Atualmente, o eletrodo de mercúrio opera em 3 modos.⁴²

1.5.1 Modos do Eletrodo de Mercúrio

O DME é um modo do eletrodo de mercúrio pioneiro e de simples construção. Por isso, a elaboração da teoria da polarografia é, praticamente, acompanhada do uso desse eletrodo. O gotejamento do mercúrio é realizado durante todo o tempo de varredura de potencial.^{60,61} A Figura 9a mostra o aumento da área superficial até que a gota atinja um tamanho máximo e desprenda do capilar.

O DME apresenta valores expressivos de correntes capacitivas quando comparado às correntes advindas de processos de oxirredução com o analito de interesse (corrente faradaica). Nesse sentido, outros modos do eletrodo de mercúrio surgiram para melhorar a relação corrente faradaica e corrente capacitiva, como o caso do SDME (do inglês, *Static Drop Mercury Electrode*). Este modo do eletrodo de mercúrio funciona similarmente ao DME (Figura 9a), no entanto, a gota permanece estática após a sua formação, como mostra a

Figura 9b. O potencial constante aplicado a essa gota, cuja área superficial também constante, gera uma acomodação da dupla camada elétrica num primeiro momento. Nessa perspectiva, a amostragem da corrente poderá ser realizada no final do tempo de vida da gota.^{42,62}

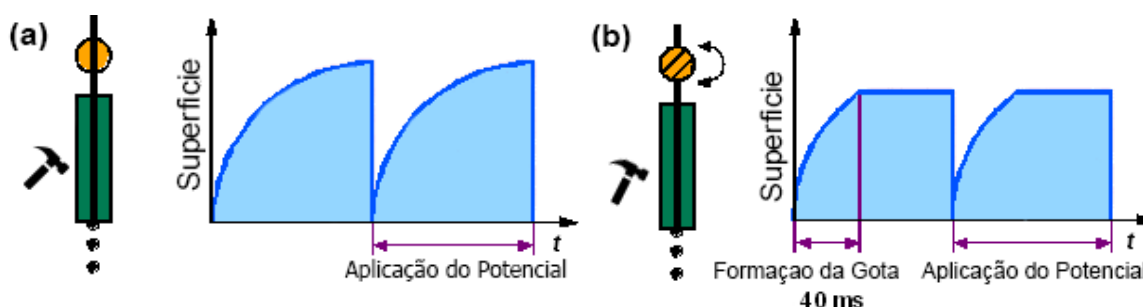


Figura 9. Área superficial da gota de mercúrio formada *versus* tempo usando os modos (a) DME e (b) SDME. Adaptado: Henze (2004)⁴².

No entanto, o DME e SDME consomem uma quantidade expressiva de mercúrio. Nessa perspectiva, outros modos do eletrodo de mercúrio são utilizados, por exemplo, o HMDE (do inglês, *Hanging Mercury Drop Electrode*).⁶² Esse modo de eletrodo forma uma pequeníssima gota, semi-esférica, que permanecem “penduradas” durante toda a medida. Com isso, o mercúrio líquido torna-se um eletrodo estático como os eletrodos sólidos (Figura 10a), porém, renovável com uma facilidade maior. Hoje, a automação instrumental é capaz de gerenciar a formação das gotas de mercúrio de maneira categórica, com grande reprodutibilidade superficial.⁴² O uso do FME, nas primeiras décadas da polarografia, permitiu a aplicação da pré-concentração de analitos em conjunto com as atrativas propriedades eletroquímicas do mercúrio supracitadas. O FME é um eletrodo com área superficial constante (Figura 10b), que era preparado reduzindo cátions de mercúrio, numa superfície condutora e inerte.^{59,63,64}

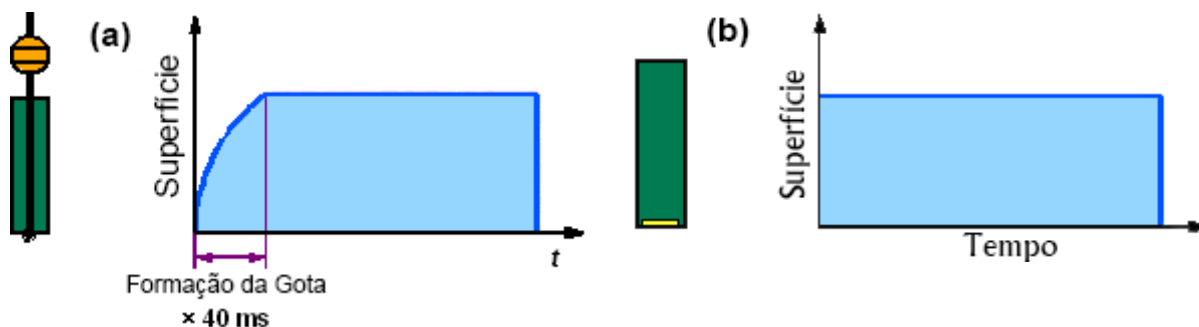


Figura 10. Área superficial da gota de mercúrio formada vs. tempo quando se usa (a) o modo HMDE e (b) um eletrodo sólido como o FME. Adaptado: Henze (2004)⁴².

Porém, como veremos a seguir, o emprego do mercúrio como eletrodo de trabalho possui um agravante, devido a sua alta toxicidade.

1.6 A toxicidade do mercúrio

Os efeitos tóxicos de compostos de mercúrio são discussões relevantes na área ambiental e da medicina moderna. Vale ressaltar que existem diferenças substanciais na toxicidade entre mercúrio elementar (metálico), sais inorgânicos e compostos organometálicos de mercúrio.⁶⁵

1.6.1 Mercúrio Metálico

O mercúrio metálico possui pressão de vapor a 25 °C igual a 0,002 mmHg. Essa pressão quase dobra a cada 10 °C. Por isso, aumentando-se a probabilidade de ser inalado pelas vias aéreas. Quando o vapor de mercúrio é inalado, este acumula no corpo, principalmente no sistema nervoso central, local no qual sua ação é mais pronunciada.⁶⁵

1.6.2 Compostos inorgânicos de mercúrio

As toxicidades de sais de mercúrio variam com a sua solubilidade. Normalmente, o Hg (I) possui baixa solubilidade, logo, menor toxicidade quando comparado a compostos de Hg (II), os quais são mais solúveis. Por isso, sais inorgânicos de mercúrio apresentam um risco muito maior que o Hg elementar quando ingeridos, isso se deve a sua maior solubilidade em água. Nesse sentido, o dano causado pela dosagem letal de 0,5 g de cloreto de mercúrio (II) equivale a 100 g de mercúrio metálico.⁶⁵

1.6.3 Compostos orgânicos de Mercúrio

Compostos de mercúrio orgânicos são grandes causadores de envenenamento.⁶⁵

A grande toxicidade desses compostos é oriunda da sua solubilidade em lipídios, componente da membrana externa celular. Uma dose oral ingerida pode ser absorvida de 90 a 100%. Após a absorção, a distribuição exata no organismo não é muito clara.⁶⁵

Por esses motivos, diversas alternativas têm sido propostas a fim de substituir o mercúrio como eletrodo por outros materiais de menor toxicidade. Nessa perspectiva, o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) pode ser aplicado como eletrodo sólido em substituição aos eletrodos de mercúrio.^{22,23,25-27}

1.7 O eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho

O diamante é a mais densa forma alotrópica de carbono e, por isso, em altas pressões ele deve ser a forma mais estável. Este raciocínio foi a base para a síntese do diamante pelo crescimento em alta-pressão/alta-temperatura (do inglês *high-pressure/high-temperature*, sigla HPHT) a qual mais se assemelha ao processo de formação natural do diamante. Esta técnica tem sido utilizada na síntese comercial nos últimos 40 anos. Vários outros estudos sobre o crescimento do diamante em baixas pressões foram realizados durante os anos 60 e 70. Recentemente, o diamante sintético é produzido com sucesso por deposição química a vapor (do inglês *Chemical Vapor Deposition*, sigla CVD) a qual ocorre em baixa pressão.⁶⁶

Os dois métodos de produção citados diferem quanto aos parâmetros de crescimento utilizados em cada processo. O método HPHT necessita de temperaturas iguais ou maiores a 1670 K e de pressões altíssimas, da ordem de $5 \times 10^9 \text{ Pa}$. Por outro lado, o CVD trabalha com temperaturas de 1270 K e pressões subatmosféricas da ordem de 10^3 a 10^4 Pa .⁶⁷

O diamante natural tem, em geral, grãos de formato octaédrico, enquanto o diamante CVD apresenta dois planos preferenciais de crescimento de grãos, um em formato cúbico e outro em formato octaédrico, como pode ser visto na Figura 11.

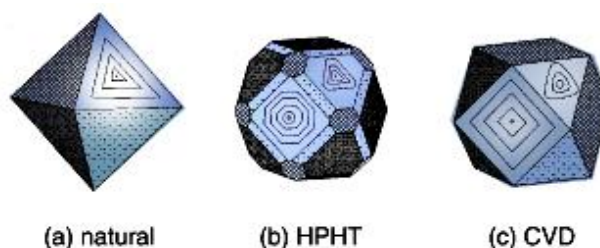


Figura 11. Morfologia do diamante obtido por diferentes métodos: (a) diamante natural; (b) alta pressão/alta-temperatura (HPHT); (c) deposição química a partir da fase vapor (CVD).

O diamante HPHT apresenta grãos com cantos não definidos, porém, é o que mais se assemelha ao diamante natural. Em contrapartida, o diamante CVD tem um custo menor dentre as três morfologias. Vale ressaltar que várias das propriedades do diamante, como condutividade térmica, resistência elétrica, não variam com a orientação dos grãos.⁶⁷

Os filmes policristalinos crescidos pelo método CVD podem conter, em sua rede cristalina, uma certa quantidade de impurezas provenientes de gases não totalmente eliminados do reator pelo vácuo, ou dos materiais usados no reator. Além disso, podem ocorrer a formação de ligações sp^2 entre os próprios átomos de carbono. A superfície do diamante tem uma camada terminal de átomos de hidrogênio em estágios diferentes de estruturação superficial a qual a mais estável é apresentada na Figura 12.

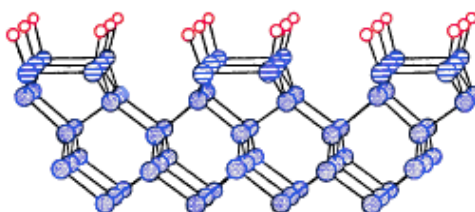


Figura 12. Estrutura mono-hidreto com apenas um átomo de hidrogênio (●) é ligado a cada carbono (○).

A utilização de novas técnicas baseadas em reatores de alta potência tornou-se mais comum e, pela primeira vez, no ano de 2000, foi possível produzir um pequeno pedaço de diamante, cerca de 200 mg, por menos de

US\$ 1,0.⁶⁷ Depois disso, pesquisas começaram no Japão, Estados Unidos, França, Suíça e outros países, sendo que, nos últimos anos, o número de publicações aumentaram consideravelmente.^{66,67}

Contudo, o diamante possui uma resistividade elevada para ser utilizado como material semicondutor. Para contornar esse problema, dopou-se o diamante com o elemento boro, fazendo alusão ao diamante naturalmente encontrado, chamado de **Ib**, que possui características resistivas 10 bilhões de vezes inferior aos outros tipos.⁶⁷ Desta forma, vários níveis de dopagem de boro no diamante foram estudados para fins eletroquímicos.⁶⁸

O primeiro trabalho sobre o diamante policristalino dopado com boro foi publicado por Pleskov *et al.* (1987)⁶⁹. Nas últimas décadas, esse material tem se destacado como um possível substituto do eletrodo de mercúrio por possuir propriedades atrativas que incluem uma extensa janela eletroquímica ($-0,75 V$ a $+2,35 V$ *versus* eletrodo normal de hidrogênio, ENH), com destaque para as regiões de potencial negativo (a qual possibilita o seu uso na determinação de espécie metálicas), baixas correntes capacitivas e grande resistência a vários meios agressivos^{23,70-72} além de ser quimicamente inerte não poluindo, portanto, o ambiente.⁷³

1.8 Preparo de Amostras

As várias técnicas analíticas, tais como espectrometria, espectrofotometria, voltametria, potenciometria, requerem, geralmente, amostras com o analito na forma dissolvida.⁷⁴ Assim, o preparo de amostras é uma etapa crucial perante as análises químicas, visto que ela representa, em média, cerca de 61% do tempo total do experimento e também pode ser responsável por aproximadamente 30% do erro total dos resultados.⁷⁵ Uma das etapas mais importante do preparo de amostras é a digestão, que promove a mineralização da matriz disponibilizando o analito. Essa etapa é base para a determinação de várias espécies em diferentes matrizes.^{76,77}

A dissolução da matriz é um procedimento que converte os componentes da amostra em espécies de menor complexidade. A maneira pela qual a digestão da matriz é realizada depende dos métodos analíticos utilizados na

determinação dos analitos. Por exemplo, certa quantidade de matéria orgânica não destruída (mas dissolvidos) pode ser tolerada quando a solução resultante é analisada por métodos de análise elementar que utilizam ICP (AES/OES ou MS) e F AAS. No entanto, esse não é o caso quando são usados métodos de voltametria ou espectrofotométricos. Os erros mais comuns acontecem quando o analito é parcialmente incorporado numa molécula orgânica e, assim, mascarado durante a determinação analítica. Nesses casos, se as espécies iônicas (ou livres) são necessárias para a determinação, a decomposição deverá ser realizada até completa mineralização.⁷⁴ Porém, processos demorados de digestão em condições extremas podem aumentar a chance de contaminação, durante sua execução, e perda do analito por volatilização.⁷⁸ Atualmente, métodos de digestão assistida por micro-ondas (sigla MW, do inglês *Micro Wave*) ou por ultrassom têm a capacidade de mineralizar as amostras e disponibilizar os metais com eficiência em tempos relativamente curtos. Porém, o aparelho de micro-ondas para digestão de amostras envolve um custo inicial muito maior em relação ao aparelho ultrassônico.⁷⁹

Contudo, há casos em que a solubilização parcial da amostra com a extração completa dos analito é suficiente para uma determinação precisa.³⁹ Nessa perspectiva, as técnicas voltamétricas podem ser aplicadas para especificação de analitos sem preparo prévio da amostra chegando a resultados de grande importância para a comunidade científica.^{39,57} Deste modo, as informações sobre a reatividade, mobilidade e biodisponibilidade de metais, por exemplo, podem ser obtidas mediante a esses estudos de especificação com determinação parcial das concentrações.³⁹ Porém, para uma determinação total, as técnicas eletroanalíticas devem ser antecedidas por algum preparo da amostra tornando os analitos eletroativos.¹⁴

1.8.1 Digestão assistida por Ultrassom

A eficácia do banho ultrassônico tem ganhado espaço na mineralização/extração de metais presentes na amostra. Ilander e Väisänen⁸⁰, por exemplo, fizeram uma determinação de elementos tóxicos em amostras de cinzas. Os autores trataram 30 amostras simultaneamente em 18 minutos utilizando uma solução água régia e outra de ácido fluorídrico. Além disso,

Santos *et al.*⁸¹ realizaram uma extração multielementar ácida em amostras de feijão. Para as amostras de água de coco, podemos citar o trabalho de Munoz *et al.*¹⁴ onde os autores relataram que é possível obter a concentração de zinco total após uma digestão assistida por ultrassom (US), com resultados comparáveis com a técnica de GF AAS.

1.8.2 Efeitos gerados pelo ultrassom

O ultrassom (US) é uma onda sonora com frequências maiores que a faixa audível para os seres humanos (20 kHz).⁸² O US é conhecido principalmente por ter efeitos mecânicos através de super-agitação.⁸³ O seu uso em áreas científicas tem aumentado nos últimos anos com destaque para a medicina e indústria, as quais tiveram o maior impacto.⁸² A área química, em especial a química analítica, também tem incorporado a energia do US para realizar tarefas desde uma simples limpeza de vidrarias até mesmo tarefas mais sofisticadas envolvida no preparo de amostra como a digestão, a lixiviação, extração líquido-líquido, derivação, etc.^{14,83}

O US é transmitido por meio de qualquer substância sólida, líquida ou gasosa que possua propriedades elásticas. No líquido, quando a intensidade do US é suficientemente elevada para criar compressão e expansão das moléculas, o ciclo de expansão pode criar bolhas ou cavidades no líquido. Isso acontece quando a pressão negativa exercida pelo US excede a resistência da ruptura local do líquido. Nessa perspectiva, o processo pelo qual as bolhas se formam, crescem e sofrem colapso implosivo é conhecido como "cavitação". As etapas envolvidas nesse processo são apresentadas na Figura 13.

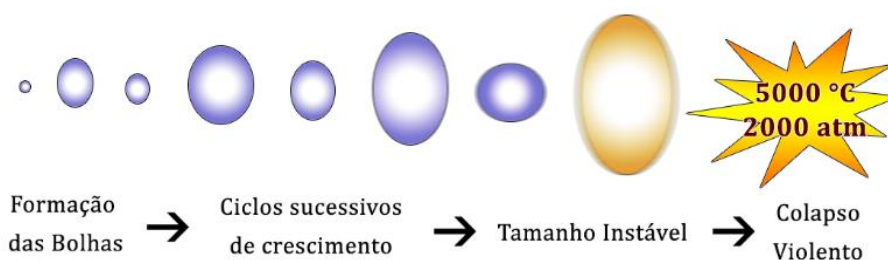
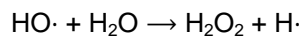
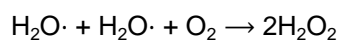
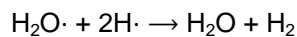
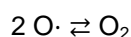
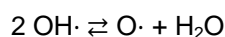
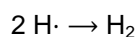
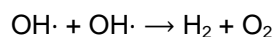
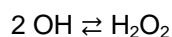
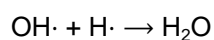
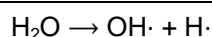


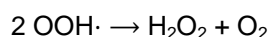
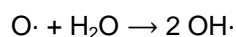
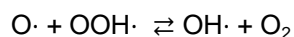
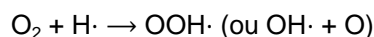
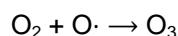
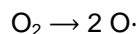
Figura 13. O desenvolvimento e colapso de bolhas de cavitação. Adaptada de Priego-Capote e Castro⁸² apud Castro e Luque-García (2002) e Mason e Lorimer (2002).

A alta pressão e temperatura produzida pelo colapso das bolhas de cavitação produzidas pelo US causam a formação de radicais livres e várias espécies de alta reatividade. A Tabela 3 apresenta as principais reações ocorridas em água quando aplicada por US. Algumas das espécies de radicais gerados têm sido citados como potenciais agentes de destruição de poluentes por possuir potenciais de oxirredução extremamente elevados como, por exemplo, o de $E^o = + 2,8 V$ dos radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$).⁸³

Tabela 3. Os principais radicais livres produzidos durante a aplicação de ultrassom em meio aquoso.



Reações adicionais na presença de oxigênio:



Fonte: Adaptado de Capote e Castro (2007).⁸²

Além disso, o uso do peróxido de hidrogênio na digestão assistida por ultrassom gera uma gama de reações de alto poder oxidante que ajudam na mineralização da amostra.⁸²

1.8.3 Dispositivos geradores de Ultrassom

Há dois dispositivos geradores de US comumente usados para aplicações no preparo de amostras: o banho ultrassônico e a sonda ultrassônica. Esta última, tem a vantagem de concentrar sua energia em uma região de amostragem, proporcionando uma maior eficiência da cavitação no líquido. No

entanto, os banhos de ultrassom são mais usados nos laboratórios. Eles têm duas desvantagens que diminuem substancialmente a repetitividade e reprodutibilidade experimental:⁸⁴⁻⁸⁶

- Falta de uniformidade na distribuição de energia do US (apenas uma pequena fração do volume de líquido total nas imediações da fonte de US experimenta a cavitação);
- Diminuição da potência de US com o tempo.

Embora digestão assistida por US não seja tão estabelecida como a digestão assistida por micro-ondas ou métodos clássicos de digestão (via seca ou via úmida), a energia do US pode ser usada para acelerar a digestão de uma grande variedade de amostras. Além disso, o uso dessa alternativa traz benefícios como: a simplicidade de utilização; os custos relativamente baixos; maior segurança, em comparação com os métodos convencionais; nenhum risco de evaporação da mistura digerida; e aptidão para o trabalho baseado em campo.⁸⁷

No entanto, o ideal, em determinações analíticas de concentrações traço, seria negligenciar/reduzir a etapa do preparo de amostras minimizando: perdas do analito por volatilização, contaminações além do custo de análise, por exigir menos trabalho técnico e consumo de reagentes. Nesse sentido, vale destacar o trabalho de Sousa *et al.* (2005), que usou a técnica de ICP OES aplicando apenas filtrações e diluições.¹³

1.9 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

A técnica de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ou ICP OES é uma poderosa ferramenta para determinação de elementos químicos numa gama de amostras. Com essa técnica, amostras aquosas são injetadas para o interior de um plasma que pode chegar a temperatura de 10.000 K. Esse plasma é obtido por uma descarga elétrica num gás inerte (geralmente argônio). Nessa etapa, ocorre a ionização do gás fornecendo uma população de elétrons que são induzido e mantido por um campo magnético oriundo de um sistema de bobina e fonte de radiofrequência.^{88,89} As escolhas dos

nebulizadores, câmaras de nebulização, visão axial/radial, entre outros geram uma gama de possibilidades de análises para diversos elementos, principalmente metais. Os elementos atualmente analisáveis por ICP OES estão destacados na Figura 14, ou seja, quase toda a tabela periódica.

1 H																	2 He																												
3 Li 670.784 I	4 Be 313.107 II	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-right: 10px;"> 51 Sb 206.836 I </div> <div style="margin-right: 10px;"> número atômico, elemento comprimento de onda estado de ionização </div> <div style="margin-right: 10px;"> Comprimento de onda (nm) Estado de ionização I=átomo neutro II=ion 1+ </div> </div>														5 B 249.772 I	6 C 193.030 I	7 N	8 O	9 F	10 Ne																								
11 Na 589.592 I	12 Mg 280.271 II															13 Al 396.153 I	14 Si 251.611 I	15 P 213.617 I	16 S 180.669 I	17 Cl 725.670 I	18 Ar																								
19 K 766.490 I	20 Ca 393.366 II	21 Sc 361.383 II	22 Ti 334.940 II	23 V 290.880 I	24 Cr 267.716 II	25 Mn 257.610 II	26 Fe 238.204 II	27 Co 228.616 II	28 Ni 231.604 II	29 Cu 327.393 I	30 Zn 206.200 II	31 Ga 417.206 I	32 Ge 265.118 I	33 As 188.979 I	34 Se 196.026 I	35 Br 863.866 I	36 Kr																												
37 Rb 780.023 I	38 Sr 407.771 II	39 Y 371.029 II	40 Zr 343.823 II	41 Nb 309.418 II	42 Mo 202.031 II	43 Tc 249.677 II	44 Ru 240.272 II	45 Rh 343.489 I	46 Pd 340.458 I	47 Ag 328.068 I	48 Cd 228.804 I	49 In 230.606 I	50 Sn 189.927 II	51 Sb 206.836 I	52 Te 214.281 I	53 I 178.215 I	54 Xe																												
55 Cs 455.531 I	56 Ba 455.403 II	57 La 408.672 II	58 Ce 413.764 II	59 Pr 414.311 II	60 Nd 406.109 II	61 Pm	62 Sm 442.434 II	63 Eu 381.967 II	64 Gd 342.247 II	65 Tb 350.917 II	66 Dy 353.170 I	67 Ho 345.600 II	68 Er 337.271 II	69 Tm 313.126 II	70 Yb 328.937 II	71 Lu 261.542 II	72 Hf 264.141 II	73 Ta 226.230 II	74 W 207.912 II	75 Re 197.248 I	76 Os 228.226 II	77 Ir 224.268 II	78 Pt 214.423 I	79 Au 267.595 I	80 Hg 194.168 II	81 Tl 190.801 II	82 Pb 220.353 II	83 Bi 223.06 I	84 Po	85 At	86 Rn														
87 Fr	88 Ra	89 Ac																																											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td>58 Ce 413.764 II</td> <td>59 Pr 414.311 II</td> <td>60 Nd 406.109 II</td> <td>61 Pm</td> <td>62 Sm 442.434 II</td> <td>63 Eu 381.967 II</td> <td>64 Gd 342.247 II</td> <td>65 Tb 350.917 II</td> <td>66 Dy 353.170 I</td> <td>67 Ho 345.600 II</td> <td>68 Er 337.271 II</td> <td>69 Tm 313.126 II</td> <td>70 Yb 328.937 II</td> <td>71 Lu 261.542 II</td> </tr> <tr> <td>90 Th 283.730 II</td> <td>91 Pa 385.958 II</td> <td>92 U 385.958 II</td> <td>93 Np</td> <td>94 Pu</td> <td>95 Am</td> <td>96 Cm</td> <td>97 Bk</td> <td>98 Cf</td> <td>99 Es</td> <td>100 Fm</td> <td>101 Md</td> <td>102 No</td> <td>103 Lr</td> </tr> </tbody> </table>																		58 Ce 413.764 II	59 Pr 414.311 II	60 Nd 406.109 II	61 Pm	62 Sm 442.434 II	63 Eu 381.967 II	64 Gd 342.247 II	65 Tb 350.917 II	66 Dy 353.170 I	67 Ho 345.600 II	68 Er 337.271 II	69 Tm 313.126 II	70 Yb 328.937 II	71 Lu 261.542 II	90 Th 283.730 II	91 Pa 385.958 II	92 U 385.958 II	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr
58 Ce 413.764 II	59 Pr 414.311 II	60 Nd 406.109 II	61 Pm	62 Sm 442.434 II	63 Eu 381.967 II	64 Gd 342.247 II	65 Tb 350.917 II	66 Dy 353.170 I	67 Ho 345.600 II	68 Er 337.271 II	69 Tm 313.126 II	70 Yb 328.937 II	71 Lu 261.542 II																																
90 Th 283.730 II	91 Pa 385.958 II	92 U 385.958 II	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr																																
<div style="display: flex; justify-content: flex-end; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> <p>Limites de detecção</p> <ul style="list-style-type: none"> <0.1ppb 0.1-1.0ppb 1.0-10.0ppb >10.0ppb </div> </div>																																													

Figura 14. Elementos analisáveis por ICP OES. Adaptado: Fonte (2014)⁹⁰ *apud* Perkin Elmer[®] (2008).

1.10 Planejamento e otimização de experimentos

As técnicas espectroanalíticas e eletroanalíticas, anteriormente citadas, podem apresentar um aumento significativo de sua performance a partir do uso da otimização multivariada.^{19,91} Essa ferramenta estatística explora as condições experimentais do sistema com o mínimo de experimentos possíveis revelando, portanto, as contribuições das variáveis da técnica na resposta analítica de forma mútua. Além disso, a otimização aumenta a sensibilidade do método, minimizando o efeito da matriz por possibilitar uma maior diluição da amostra mantendo a concentração do analito ainda detectável.⁹²⁻⁹⁴

Nesse sentido, a otimização multivariada pode empregar o planejamento fatorial completo em uma etapa inicial, chamada de triagem, que seleciona as variáveis experimentais que influenciam significativamente na resposta analítica.⁹⁵ As tabelas presentes nos itens 7.1.1 e 7.1.2 (em anexo) apresentam as matrizes usadas para um planejamento fatorial completo 2^k com seis ($k = 6$)

e quatro ($k = 4$) variáveis, respectivamente. Com esse planejamento se obtêm as variáveis que mais influenciam na resposta analítica.⁹²

Numa etapa seguinte, as variáveis mais significativas são otimizadas por alguma ferramenta estatística que geram modelos quadráticos, por exemplo, o planejamento composto central (sigla CCD, do inglês *Central Composite Design*).⁹⁶

O CCD é uma ampliação do planejamento fatorial completo adicionado a pontos axiais, também conhecido como planejamento em estrela e pontos centrais, usados para estimar o erro padrão.⁹²

O número de experimentos a ser realizados na etapa de otimização usando o CCD é igual a $2^k + 2k + n$, onde k indica o número de variáveis estudadas e 2^k , $2k$ e n são, respectivamente, os números de experimentos referentes ao planejamento fatorial completo, ao planejamento axial e ao ponto central. As tabelas presentes nos itens 7.2.1 e 7.2.2 (em anexo) apresentam duas matrizes CCD, para duas ($k = 2$) e três ($k = 3$) variáveis, representadas pelo planejamento fatorial 2^k adicionado ao planejamento em estrela e a um ponto central, onde $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$.⁹²

No planejamento CCD, cada variável é estudada em 5 níveis distintos (0, +1, -1, $+\alpha$ e $-\alpha$) compondo a matriz do planejamento. Desta maneira, quando o número de variáveis é igual a dois, os níveis codificados são: 0, +1, -1, +1,41 e -1,41. Por outro lado, quando o número de variáveis é igual a três, os níveis são: 0, +1, -1, +1,68 e -1,68.⁹²

Após a realização dos experimentos, é estabelecida uma equação matemática que relaciona as variáveis a serem otimizadas ($X_{(1)}$, $X_{(2)}$, $X_{(3)}$, etc.) com a resposta analítica. Vale ressaltar que os experimentos devem ser conduzidos em ordem aleatória para evitar resultados tendenciosos.⁹²

O modelo matemático polinomial gerado deve apresentar boas estimativas para os coeficientes, fornecendo uma boa regressão e pouca falta de ajuste. Nesse sentido, a análise de variância (ANOVA) é empregada para a validação desse modelo matemático, garantindo a adequação do mesmo às

respostas obtidas experimentalmente e avaliando numericamente a qualidade do seu ajuste.⁹⁶

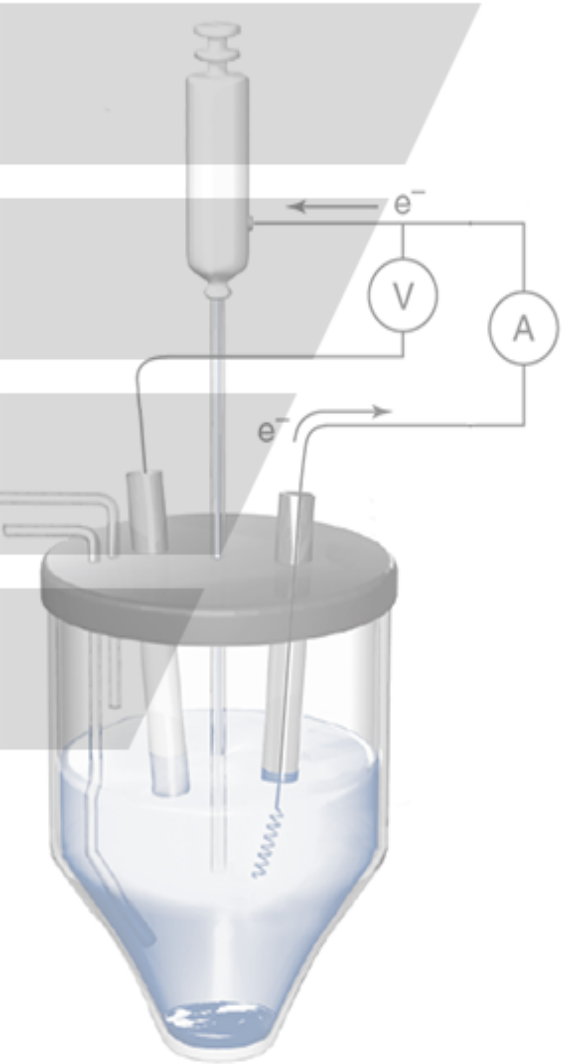
Após a validação do modelo matemático, a equação pode ser expressada graficamente através de uma superfície de resposta, que auxilia na escolha visual dos valores das variáveis. Por outro lado, os valores otimizados podem, também, ser obtidos aplicando derivadas parciais em relação às variáveis da equação do planejamento CCD.⁹² Nesse método, iguala-se as equações a zero e o sistema de n equações e n incógnitas é resolvido obtendo os valores do ponto crítico.⁹²

A conversão dos valores codificados em valores reais (ou vice-versa) é realizada com a Equação 1, apresentada abaixo:⁹⁶

$$\text{Valor Codificado} = \frac{(Z_{real} - Z_{média})}{\left(\frac{\Delta Z}{2}\right)} \quad \text{Equação 1}$$

onde Z_{real} é o valor real da variável, $Z_{média}$ é a média dos valores dos níveis +1 e -1 e ΔZ é a variação entre os valores dos níveis +1 e -1.

Essas ferramentas estatísticas usadas no planejamento experimental, já foram empregadas para uma otimização de métodos eletroanalíticos.¹⁹



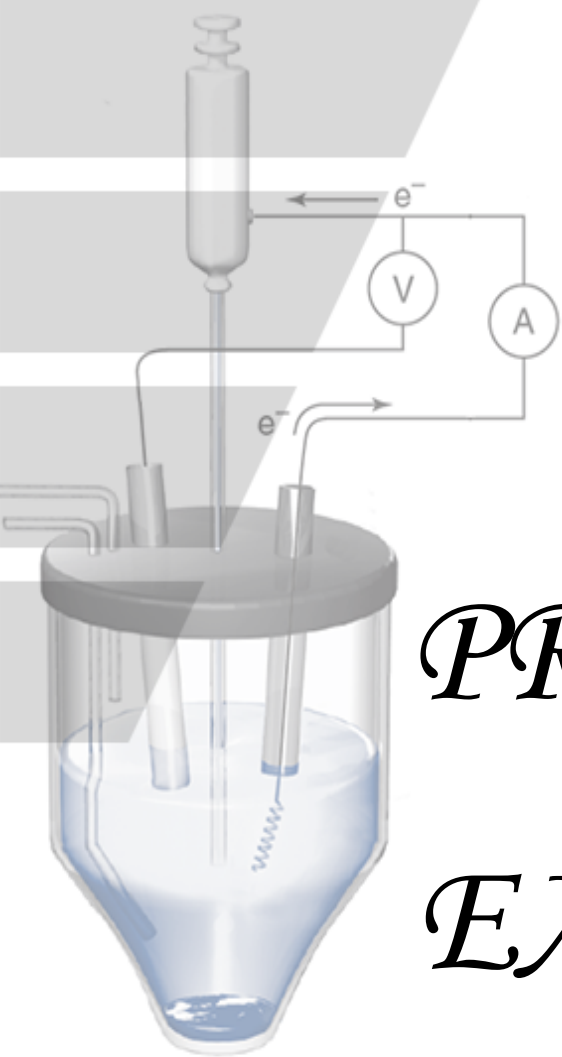
OBJETIVO

2 OBJETIVO

O principal objetivo desse trabalho foi aprimorar uma metodologia eletroquímica usando o DDB como eletrodo de trabalho para determinar metais traço em amostras de água de coco natural e industrializada por SWASV.

Para isso, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- ✓ Preparação e caracterização do eletrodo de DDB empregado como eletrodo de trabalho;
- ✓ Avaliação do desempenho dos eletrodos de DDB por meio de estudos de limpeza e ativação;
- ✓ Otimização e caracterização dos parâmetros responsáveis pelo desempenho analítico da metodologia proposta;
- ✓ Desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica para determinação de Zn, Cd, Pb e Cu livre e total na água do coco;
- ✓ Aprimoramento da metodologia de digestão das amostras de água de coco assistida por ultrassom.
- ✓ Verificação da metodologia eletroanalítica proposta comparando com a técnica de ICP OES.



PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

As soluções empregadas nos experimentos foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico (listados na Tabela 4) utilizando água ultrapura (resistividade de $17 M\Omega cm$ $25\text{ }^{\circ}C$) obtida de um sistema de purificação com osmose reversa (Quimis[®]). Todas as vidrarias foram descontaminadas, usando solução 10% (*v/v*) de ácido nítrico por 48 horas, e enxaguadas com água de osmose.

Tabela 4. Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Reagentes	Procedência	Teor
Ácido Clorídrico (<i>HCl</i>)	Vetec [®]	37%
Ácido Nítrico (<i>HNO₃</i>)	Vetec [®]	65%
Peróxido de Hidrogênio (<i>H₂O₂</i>)	Dinâmica [®]	30%
Ácido sulfúrico (<i>H₂SO₄</i>)	Pró-Quimios [®]	98%
Amônia Aquosa (<i>NH₃(aq)</i>)	Pró-Quimios [®]	25%
Ferricianeto de Potássio (<i>K₃[Fe(CN)₆]</i>)	Cinética Química [®]	99,0%
Acetato de Zinco (<i>Zn(CH₃COO)₂ · 2H₂O</i>)	Merck [®]	99,0%
Cloreto de Cádmio (<i>CdCl₂ · H₂O</i>)	Nuclear [®]	95%
Acetato de Chumbo (<i>Pb(CH₃COO)₂ · 3H₂O</i>)	Merck [®]	99%
Acetato de Cobre (<i>Cu(CH₃COO)₂ · H₂O</i>)	Merck [®]	99,5%
Acetato de Sódio Anidro (<i>CH₃COONa</i>)	Isofar [®]	99%
Padrão de Zinco*	Qhemis [®]	1000 mg L ⁻¹
Padrão de Cádmio*	Qhemis [®]	1000 mg L ⁻¹
Padrão de Chumbo*	Qhemis [®]	1000 mg L ⁻¹
Padrão de Cobre*	Qhemis [®]	1000 mg L ⁻¹

* Usado nas determinações por ICP OES

3.1.1 Soluções padrão para os ensaios voltamétricos

As soluções estoque comerciais destinadas para as análises espectrométricas em meios aquosos usam, na maioria das vezes, nitratos metálicos estabilizados em solução diluída de ácido nítrico. No entanto, as técnicas voltamétricas que usam o eletrodo DDB requerem o uso de soluções a base de sais ausentes de nitrato. Isso se dá pela viabilidade do eletrodo de

DDB reduzir nitrato à amônia diminuindo a eficiência da etapa de pré-concentração dos metais durante a determinação eletroquímica.^{97,98}

Portanto, as soluções estoque de Zn, Cd, Pb e Cu foram preparadas a partir da dissolução dos sais de acetato de zinco, cloreto de cádmio, acetato de chumbo e acetato de cobre, respectivamente, em água ultrapura obtendo-se uma concentração final próximo a 300 mg L^{-1} . As quatro soluções foram armazenadas sob refrigeração durante 6 meses. Neste período, duas determinações das concentrações destes analitos foram realizadas por ICP OES, uma no início e outra no final do período de armazenamento. Com isso, verificou-se a estabilidade das soluções estoque durante a realização dos ensaios eletroquímicos. Por fim, as concentrações de Zn, Cd, Pb e Cu, em cada solução estoque foram iguais a (295 ± 2) ; (287 ± 1) ; (299 ± 2) ; $(286 \pm 2) \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Uma solução estoque **intermediária** mista foi preparada, diariamente, a partir das quatro soluções estoque supracitadas para se obter $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ dos analitos Zn, Cd, Pb e Cu em solução 0,2 % (v/v) de HCl. Neste trabalho, sempre que for mencionado a adição dos analitos na célula eletroquímica, subtende-se o uso desta solução estoque intermediária.

Uma solução tampão $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COONa}$ (tampão acetato) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,7) foi preparada e utilizada como eletrólito de suporte durante as análises eletroquímicas, de acordo com Honório *et al.* (2014).¹⁸

Uma solução de acetato de sódio $1,7 \text{ mol L}^{-1}$ e amônia aquosa $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ foram usadas após as digestões para titular o HCl remanescente até a formação de um tampão acetato pH 4,7 e $\text{NH}_3 / \text{NH}_4\text{Cl}$ (tampão amoniacal) pH 8,0, respectivamente.

3.2 Instrumentação Eletroanalítica

Para pesagem, utilizou-se uma balança analítica digital Sartorius® modelo ED224S com legibilidade da pesagem de 0,1 mg.

Os ensaios eletroquímicos foram realizados com um analisador voltamétrico da Metrohm® modelo 797 VA Computrace. Todos os dados gerados pelo programa foram tratados e disponibilizados na forma de gráficos utilizando o programa Origin 8.5 da Microcal®.

Um banho ultrassônico da marca Sonders® modelo SoniClean 6 foi usado como gerador de ultrassom na frequência de 40 kHz. O ajuste automático de pH foi realizado usando um Titulador da marca Hanna Instruments® modelo HI 902C.

3.2.1 Célula eletroquímica

A célula eletroquímica utilizada é confeccionada em vidro borossilicato com volume de trabalho entre 10 a 90 mL e tampa em policloreto de vinila (PVC) contendo orifícios para a acomodação dos eletrodos (eletrodo de trabalho, auxiliar e referência), mangueira para desoxigenação com o gás inerte bem como um agitador conforme é ilustrado na Figura 15.

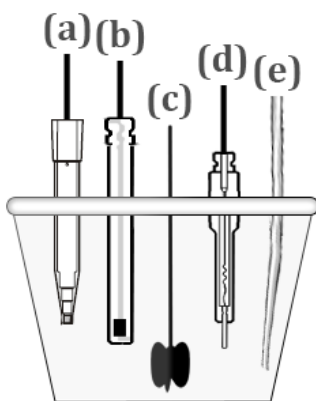


Figura 15. Representação da célula eletroquímica: (a) eletrodo de referência, (b) eletrodo de trabalho, (c) agitador (d) eletrodo auxiliar (e) entrada do gás inerte.

O sistema de eletrodos empregado nas determinações eletroquímicas é composto por: um eletrodo auxiliar de platina (Pt) em formato cilíndrico com área geométrica próxima a 1 cm² pertencente a própria configuração padrão do

equipamento; um eletrodo de referência de Ag/AgCl em KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$, com um valor de potencial de 240 mV contra eletrodo normal de hidrogênio (ENH); e eletrodo de trabalho de diamante um dopado com boro com área geométrica de $0,23 \text{ cm}^2$ e grau final de dopagem de “8000 ppm” de boro. Este eletrodo de trabalho foi criado e adaptado (*labmade*) para operar no 797Computrace.

3.3 Construção das curvas de adição de analito

Para a construção das curvas de adição para cada analito, cada quantidade de matéria de Zn, Cd, Pb e Cu adicionados à célula eletroquímica devem gerar respectivas concentrações finais dentro na faixa linear de trabalho. Nesse sentido, usou-se uma solução estoque intermediária de concentração igual a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de cada metal para realizar adições de volumes entre 100 a $500 \mu\text{L}$ com o auxílio de uma micropipeta (Marca Eppendorf®).

3.4 Amostra de água de coco

Foram obtidas 5 amostras de água de coco industrializadas, de diferentes fabricantes, em embalagem *Tetra Pak*®. Outras 5 amostras de coco verde com 5 a 6 meses de maturação foram obtidas no comércio de Vitória/ES.

As amostras industrializadas foram mantidas na própria embalagem de origem. Por outro lado, as amostras naturais foram extraídas usando uma haste de inox para abrir um orifício entre a casca e o interior do coco. Em seguida, a amostra foi extraída com auxílio de uma seringa de vidro com agulha em inox, descontaminados.

As amostras naturais foram armazenadas em frasco de polipropileno de 500 mL ao passo que as industriais foram mantidas na própria embalagem do fabricante. Por fim, todas as amostras foram codificadas, segundo a Tabela 5, e armazenadas sob refrigeração ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 30 dias.

Tabela 5. Listagem da codificação para as 10 amostras de água de coco e sua origem.

Tipo	Código	Procedência
Natural	NA	São Mateus/ES
Natural	NB	São Mateus/ES
Natural	NC	Varejo em Vitória/ES
Natural	ND	Varejo em Vitória/ES
Natural	NE	Varejo em Vitória/ES
Industrializada	IA	Fabricante A
Industrializada	IB	Fabricante B
Industrializada	IC	Fabricante C
Industrializada	ID	Fabricante D
Industrializada	IE	Fabricante E

3.5 Metodologia para digestão das amostras de água de coco

O procedimento de digestão abordado faz alusão à metodologia proposta por Munoz *et al.* (2007)¹⁴. No entanto, os volumes que compõem uma mistura oxidante formada por HCl concentrado e H₂O₂ 30% (v/v) foram estudados a fim de se obter a melhor combinação desses reagentes com a maior eficiência. O parâmetro avaliado para uma interpretação indireta dessa eficiência foi a concentração de zinco por DPASV (que será citada no 3.6). Nesse sentido, um planejamento CCD tipo “estrela” para duas variáveis e três pontos centrais (totalizando 11 experimentos) foi adotado (matriz disponível no item 7.2.1). Os níveis mínimo e máximo assumidos para as variáveis encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Variáveis para otimização do processo de digestão da água de coco.

Variáveis	Nível	
	Mínimo	Máximo
Volume HCl concentrado (mL)	0,2	0,6
Volume H ₂ O ₂ 30% (v/v) (mL)	0,2	0,6

Cada experimento foi realizado em tubos Pyrex[®] autoclaváveis, comumente usados em análises de demanda química de oxigênio (DQO). Desta maneira, adicionou-se uma alíquota de 1,00 mL da amostra de água de coco industrializada (IA) e os volumes dos reagentes inerentes a cada um dos

11 experimentos. O tubo fechado foi posicionado no centro do banho ultrassônico e ultrassonicado durante 15 min. Ordinalmente, o tubo, ainda fechado, foi colocado em banho-maria a 100 °C durante 7 min. Por fim, aliviou-se a pressão interna, cuidadosamente, mantendo o tubo ainda em banho-maria por 8 min, porém, com a tampa aberta para eliminar o peróxido remanescente.

Antes de ser submetida à análise eletroquímica por DPASV, já otimizada, uma solução de acetato de sódio $1,7 \text{ mol L}^{-1}$ foi usada para titular o ácido clorídrico não consumido durante a digestão. Desta maneira, e, categoricamente, o excesso ácido foi titulado com o auxílio de um titulador automático configurado para o *end point* o pH de trabalho 4,7.

Os cálculos para determinar a concentração dos metais nas amostras de água de coco foram realizados levando em consideração a diluição de cada amostra.

3.6 Planejamento Experimental da DPASV usando eletrodo de mercúrio

A DPASV com o eletrodo de mercúrio (HMDE) foi usada nesse trabalho para avaliar a eficiência da digestão de maneira indireta quanto a quantificação da concentração de zinco na solução digerida. Dessa maneira, visando aperfeiçoar o método, realizou-se um levantamento bibliográfico para as variáveis que mais influenciam na técnica.^{18,21,99,100}

Inicialmente, realizou-se uma etapa de triagem aplicando-se um planejamento fatorial completo para 6 variáveis 2^6 (matriz disponível no item 7.1.1 do anexo). Desta forma, o potencial de pré-concentração (E_{dep}), tempo de pré-concentração (t_{dep}), amplitude do pulso (ΔE_p), incremento de potencial (ΔE_s), tempo do incremento de potencial (Δt_s), e tempo de duração do pulso (t_{pulso}) foram abordados nos níveis listados na Tabela 7.

Tabela 7. Variáveis e níveis escolhidos para etapa de triagem para a DPASV usando o HMDE.

Variáveis	Níveis	
	Mínimo	Máximo
Potencial de pré-concentração (<i>mV</i>)	-1200	-1150
Tempo de pré-concentração (<i>s</i>)	30	120
Amplitude de pulso (<i>mV</i>)	20	60
Tempo de pulso (<i>s</i>)	0,02	0,05
Incremento de Potencial (<i>mV</i>)	3	6
Tempo de duração do Pulso (<i>s</i>)	0,1	0,5

As variáveis, tempo de pré-concentração, amplitude de pulso e tempo de incremento de potencial foram submetidas a uma otimização usando o planejamento CCD 2³ (matriz disponível no item 7.2.2 do anexo).

Os valores otimizados da DPASV foram usados nas análises eletroquímicas subsequentes.

3.7 Construção do eletrodo com o filme de DDB

O eletrodo de trabalho foi montado usando um filme de diamante dopado com boro fixado com solda eletrônica (Estanho: 63% e Chumbo: 37%) em um fio de cobre para proporcionar contato elétrico com o equipamento. A estrutura foi confeccionada em acrílico acomodando o filme diamante. As extremidades foram cobertas com resina epóxi Araldite[®] Hobby deixando-se secar por 3 dias (Figura 16).

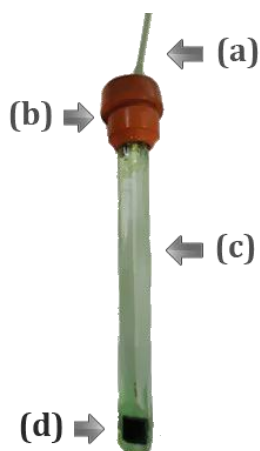


Figura 16. Eletrodo de diamante dopado com boro: (a) fio elétrico, (b) rolha para tubo de ensaio em borracha, (c) estrutura em acrílico e (d) área ativa do diamante dopado com boro.

O filme de DDB foi preparado no Centro Suíço de Eletrônica e de Microtécnica (Neuchâtel-Suíça), sobre um substrato de silício contendo um filme de ouro na parte posterior para permitir o contato elétrico. Esse filme de DDB foi sintetizado pela técnica HF-CVD (do inglês *Hot Filament Chemical Vapor Deposition*), com temperatura de filamento compreendida entre 2440 e 2560 °C. A fase gasosa consistia em metano (CH₄) com excesso de H₂, sendo o gás de dopagem o trimetil-boro.

A limpeza e ativação do eletrodo do DDB foi realizada de acordo com Suffredini *et al.*⁷² (2004) e consiste no pré-tratamento anódico da superfície do eletrodo em uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ aplicando um potencial de +3,0 V por 15 segundos, seguido de um pré-tratamento catódico aplicando um potencial de -3,0 V por 45 segundos. O procedimento de limpeza-ativação do DDB foi realizado de maneira automatizada com um **aparato “labmade” de limpeza/ativação** visando assegurar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados experimentais.

3.8 Verificação do funcionamento do DDB

A caracterização inicial do sistema foi realizado aplicando a VC, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, em uma solução de ferricianeto de potássio 160 μmol L⁻¹ (diluído em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹), previamente desaerada por 10 minutos, a fim de se comprovar, junto a literatura⁷², a adaptação do eletrodo de DDB no analisador voltamétrico para fins eletroanalíticos.

3.9 Construção do Aparato para Limpeza/Ativação

O aparato para limpeza e ativação do DDB foi construído usando uma plataforma de prototipagem *Arduino* modelo Mega 2560 R3, display de cristal líquido (sigla LCD, do inglês *Liquid Crystal Display*), servo motor modelo 960G, motor de passo e sistema de êmbolo, ventoinha adaptado para agitação, eletrodo de platina como eletrodo auxiliar no processo de limpeza, além de outros componentes eletrônicos básicos.

O sistema automatizado para limpeza/ativação encontra-se na Figura 17. O seu custo foi de aproximadamente R\$ 600,00 reais.

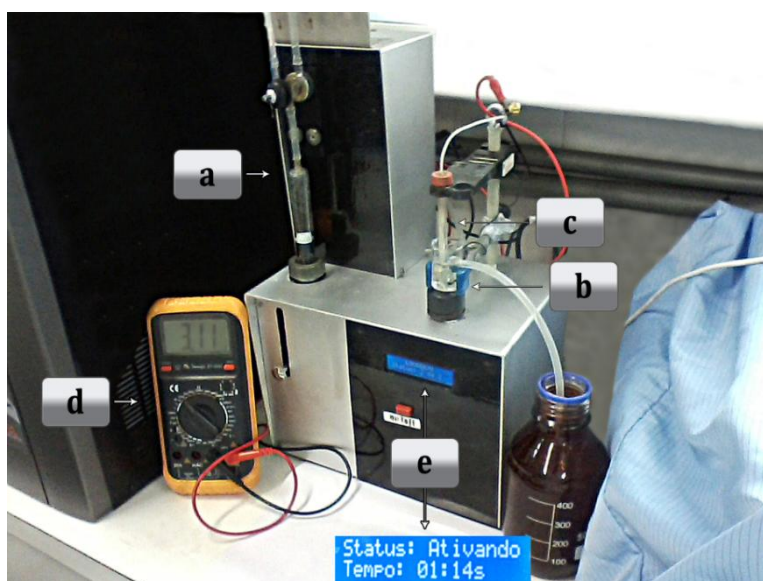


Figura 17. Aparato para limpeza e ativação do eletrodo DDB: (a) bombeador do ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (solução de limpeza) para dentro da (b) célula eletroquímica; (c) eletrodo de DDB em tratamento; (d) voltímetro para monitoramento do potencial aplicado; (e) display com contagem regressiva e informações de estágio.

Um *software* com interface amigável foi criado usando o *Microsoft Visual Studio 2013*[®] exclusivamente para gerenciar remotamente vários dos parâmetros pertinentes para a limpeza/ativação do eletrodo de DDB, tais como: o tempo de aplicação dos potenciais catódicos e anódicos; o valor dos potenciais; a velocidade de agitação; o número de lavagens da célula onde é realizada a limpeza eletroquímica contra eletrodo de platina. A interface disponível para o analista encontra-se na Figura 18.

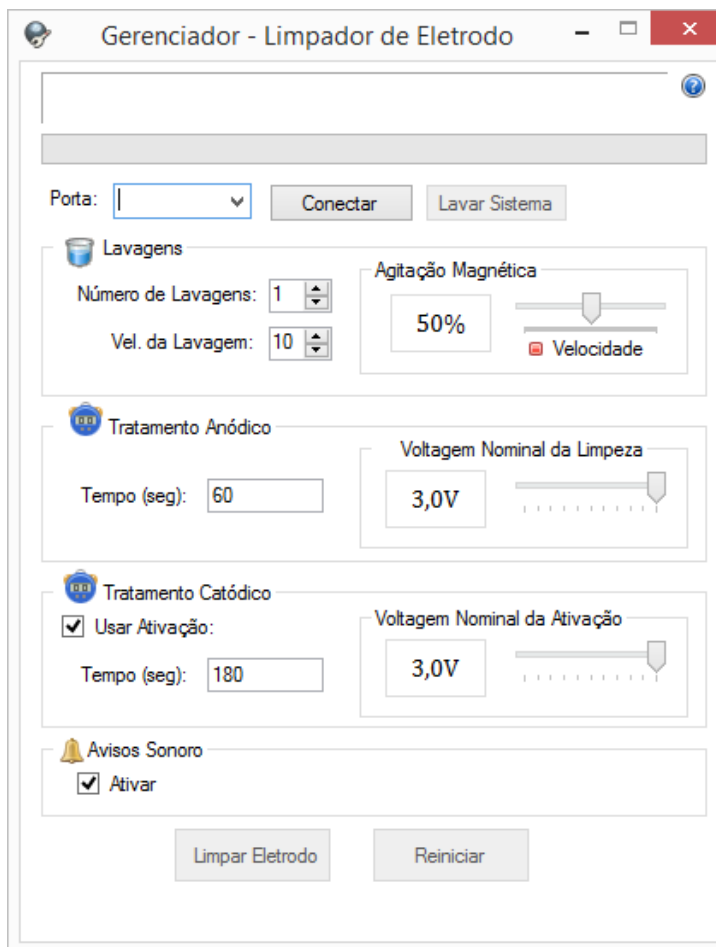


Figura 18. Software criado para controlar os processos de limpeza e ativação do eletrodo DDB.

3.9.1 Verificação da repetitividade na limpeza/ativação do DDB

A verificação da eficiência e repetitividade do processo de limpeza e ativação foram investigados realizando sete varreduras de onda quadrada em cinco soluções padrão de ácido gálico com concentrações de 0,6; 1,0; 0,5; 1,9 e $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito suporte H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A avaliação dos resultados foi realizada segundo os critérios de aceitação de repetitividade orientado pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA).¹⁰¹

3.10 Planejamento Experimental da SWASV usando DDB

Para cada uma das varreduras por SWASV foi realizado o tratamento eletroquímico no DDB utilizando o aparato supracitado. Além disso, os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória para evitar medidas tendenciosas oriundas de efeitos de memória do eletrodo de DDB. Desta

forma, a otimização foi separada em parâmetros de pré-concentração e parâmetros de varredura (SWV)

3.10.1 Otimização dos parâmetros de pré-concentração da SWASV

Na otimização do potencial (E_{dep}) e do tempo (t_{dep}) da pré-concentração, as variáveis da SWV foram fixadas em 100 Hz para a frequência, 50 mV para a amplitude de pulso, 10 mV para o incremento de potencial e 0,10 mol L⁻¹ para a concentração do eletrólito suporte de tampão acetato (pH 4,7). A solução empregada nessa etapa foi composta por 5,00 mL da amostra de água de coco industrializada (IA) e 2,0 mL da solução estoque do eletrólito suporte. Além disso, foram adicionados 1,00 mL da solução estoque intermediária de Zn, Cd, Pb e Cu para fortificar o sistema com os analitos de interesse. A solução foi aferida para um volume final de 20,0 mL com água ultrapura.

Os valores das duas variáveis da pré-concentração (potencial e tempo) foram otimizados aplicando o planejamento composto central (CCD) com duas repetições dos pontos centrais totalizando 11 experimentos (matriz disponível no item 7.2.1 do anexo).

Tabela 8. Variáveis e níveis para a otimização da pré-concentração da SWASV usando o DDB.

Variáveis	Níveis	
	Mínimo	Máximo
Potencial de pré-concentração (mV)	-1500	-1350
Tempo de pré-concentração (s)	30	240

3.10.2 Otimização dos parâmetros de varredura da SWASV

Para a otimização dos parâmetros de varredura, a composição do sistema e as variáveis já otimizadas na pré-concentração foram usados. Consequentemente, o potencial e o tempo de pré-concentração foram de -1500 mV e 240 s, respectivamente.

As variáveis da SWV abordadas nesse trabalho estão listadas na Tabela 9. Elas são relatadas na literatura por apresentarem influência no pico.^{38,45} A concentração do tampão acetato foi otimizada nessa etapa uma vez que o efeito da queda-ômica¹⁰² na SWV foi estudado por Mirceski *et al.*¹⁰³ em 2001.

Tabela 9. Variáveis e níveis para a otimização da varredura da SWASV usando o DDB.

Variáveis	Níveis	
	Mínimo	Máximo
Concentração do Tampão ¹⁰³ ($mol L^{-1}$)	0,05	0,1
Incremento ³⁸ (mV)	2,5	7,5
Amplitude ³⁸ (mV)	45	55
Frequência ³⁸ (Hz)	90	110

Para uma avaliação das variáveis da SWV, aplicou-se o planejamento fatorial 2^4 obtendo 16 experimentos (matriz disponível no item 7.1.2 do anexo). Em seguida, os valores das variáveis significativas, concentração do tampão (C), incremento de potencial (ΔE_s), amplitude de pulso (ΔE_p) foram otimizados aplicando o planejamento CCD para 3 variáveis e 2 repetições do ponto central totalizando 17 experimentos (matriz disponível no item 7.2.2 do anexo).

3.11 Tratamento dos dados das etapas de otimização

Os valores das correntes de pico dos analitos Zn, Cd, Pb e Cu foram primeiramente normalizados devido à discrepância das intensidades entre cada elemento. Nesse sentido, o maior valor de corrente assumido por um analito recebeu o valor unitário e as demais correntes valores proporcionais a esse.¹⁰⁴ Por fim, a variável resposta (resposta unificada) usada na matriz da otimização, foi dada pelo somatório dos quatro valores previamente normalizados. Portanto, esta resposta unificada agrupa as correntes de pico proporcionando uma otimização conjunta dos metais.

Todo o processo de triagem e otimização dos experimentos foi executado utilizando a versão teste do *software Statistica 6.0* e *OpenOffice Calc* do *suite* de aplicativos *Open Office*[®] para o processamento dos dados obtidos.

3.12 Determinação do LD e LQ da SWASV e DDB

As variáveis da SWASV otimizadas da Tabela 10 foram aplicadas às soluções estoque dos analitos cujas concentrações variaram de 2 a $12 \mu g L^{-1}$ para cada metal em tampão acetato ($pH 4,7$) $0,206 mol L^{-1}$. Desta forma, observou-se a menor concentração de analito capaz de gerar uma corrente de

pico mensurável (LD_{SWASV}). Por outro lado, os limites de quantificação (LQ_{SWASV}) foram obtidos multiplicando os respectivos LD por 3,3.¹⁸

3.13 Linearidade e faixa de trabalho da SWASV e eletrodo DDB

As linearidades de Zn, Cd, Pb e Cu foram obtidas pela construção das curvas analíticas desses metais sob condições da SWASV otimizadas. Desta forma, pequenos volumes de uma solução contendo 585, 287, 299, 286 $\mu g L^{-1}$ de Zn, Cd, Pb e Cu, respectivamente, foi adicionada a 20,0 mL de solução tampão acetato 0,206 $mol L^{-1}$ com *pH* 4,7. A avaliação da linearidade foi observada pelo coeficiente de correlação ao quadrado (r^2) e o gráfico de resíduos.

3.14 Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu livres em água de coco usando SWASV e DDB

Para a análise dos metais naturalmente disponíveis na água de coco empregamos os parâmetros otimizados nas etapas anteriores. Uma alíquota de 5,00 mL de amostra foi adicionada a 4,12 mL de tampão acetato 1,0 $mol L^{-1}$, e aferido para um volume final de 20,0 mL para obter uma concentração otimizada de eletrólito suporte equivalente a 0,206 $mol L^{-1}$. Em um segundo momento, adicionou-se quatro alíquotas de 100 μL da solução estoque intermediária para construção da curva de adição de analito dos metais Zn, Cd, Pb e Cu. Os parâmetros da SWASV usados estão listados na Tabela 10.

Tabela 10. Variáveis da SWASV e seus valores otimizados/definidos para a determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu.

Parâmetros	Valores
Concentração do Tampão (C)	$0,206 \text{ mol L}^{-1}$
pH	4,7
Incremento de Potencial (ΔE_s)	11,56 mV
Frequência (f)	100 Hz
Velocidade da onda quadrada ($f \times \Delta E_s$)	1156 mV s^{-1}
Amplitude de Pulso (ΔE_p)	55 mV
Potencial de pré-concentração (E_{dep})	-1500 mV
Tempo de pré-concentração (t_{dep})	240 s
Janela eletroquímica de trabalho	-1400 mV a +150 mV

3.15 Cálculos para adição de analito na SWASV e DDB

Como o eletrodo de DDB necessita de limpeza e ativação durante cada varredura, não é possível usar os cálculos de concentrações dos analitos diretamente com o *software* do analisador voltamétrico. Por outro lado, esse *software* da Metrohm® disponibiliza os pontos de potenciais (eixo x) e correntes (eixo y) de cada voltamograma em formato de texto, legível em outros programas. Nesse sentido, e para favorecer toda a adaptação com o eletrodo, um *software* foi criado, para importar esses pontos (Figura 19a). Nessa etapa de importação, é possível determinar as correntes de pico de cada analito estudado. Posteriormente, na interface do programa mostrado na Figura 19b, é possível calcular as concentrações, visualizar o gráfico de resíduos e a incertezas dos coeficientes da regressão linear. Todas os cálculos para o ajuste linear, resíduos, coeficiente de correlação foram escritos de acordo Souza e Junqueira (2005)¹⁰⁵ e validados com a reprodução total do conteúdo dos artigos Pimentel e Neto (1996)¹⁰⁶ (dados não mostrados). Por fim, esse *software* torna as determinações das concentrações usando o eletrodo DDB mais ágeis.

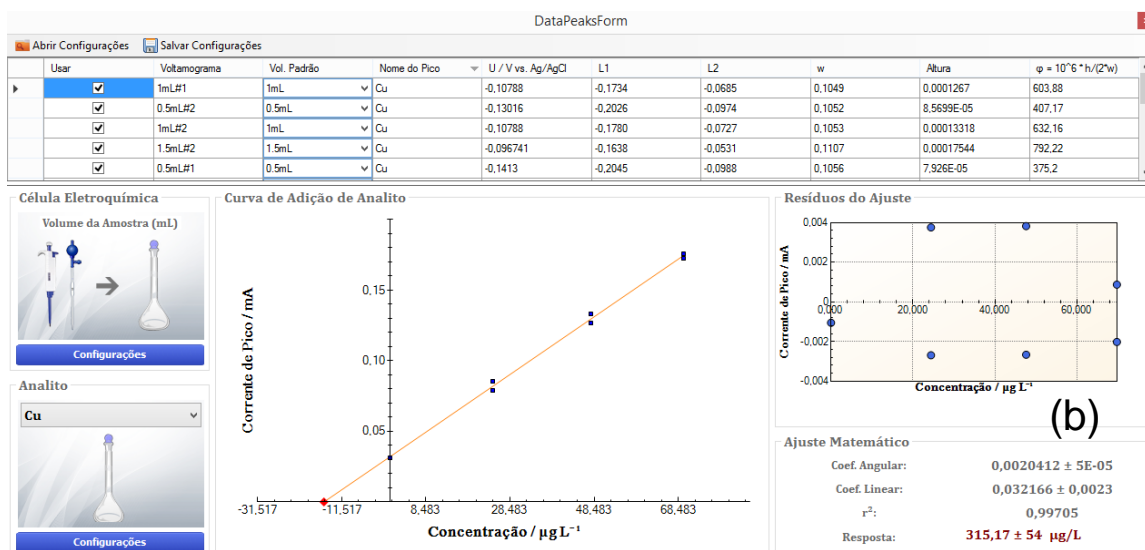
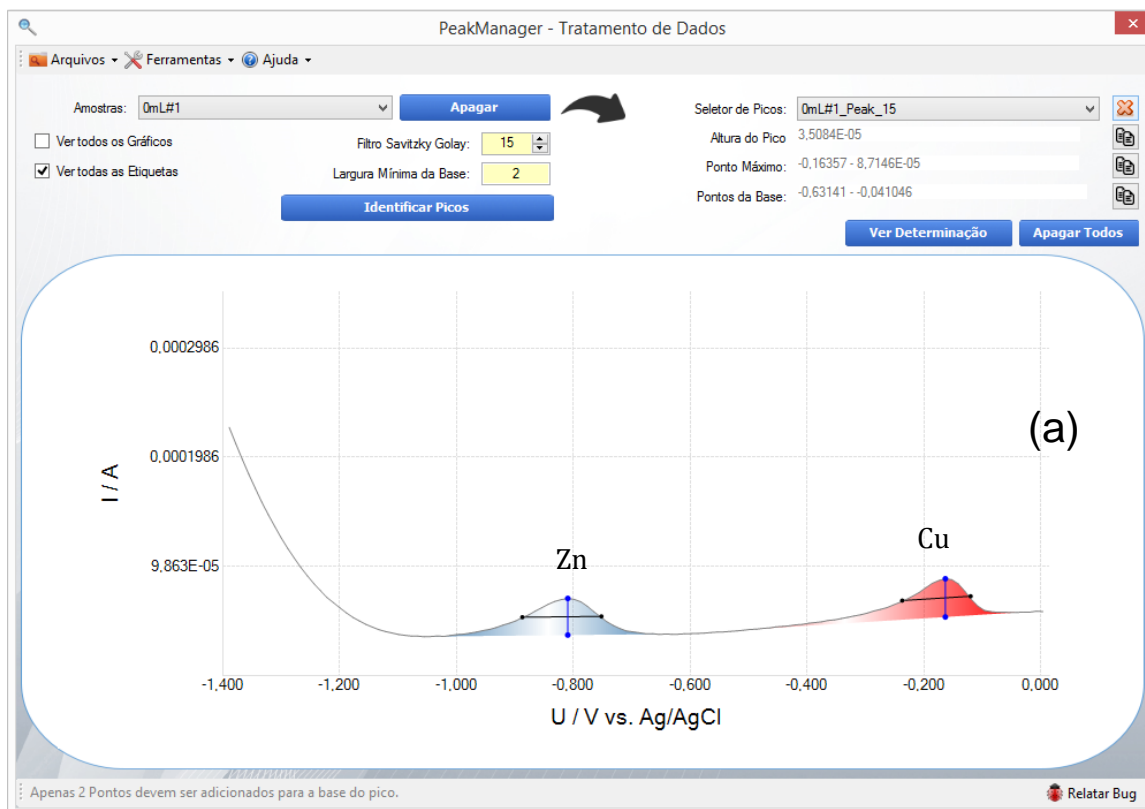


Figura 19. Software para cálculo das concentrações usando a adição de analito nas análises voltamétricas; (a) interface para gerenciar a base dos picos e coletar as correntes de pico; (b) interface para cálculos com gráficos de adição de analito, gráfico de resíduos e algumas informações da célula eletroquímica.

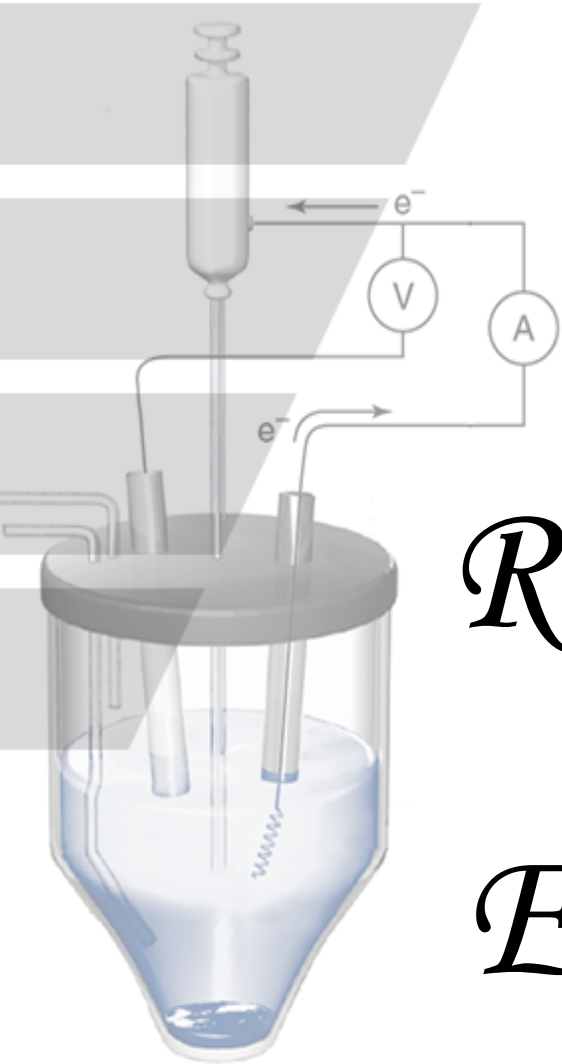
3.16 Determinação por ICP OES

As determinações dos elementos Zn, Cd, Pb e Cu foram realizadas usando um ICP OES (Perkin Elmer, Modelo Optima 7000 DV, EUA). As seguintes linhas espectrais foram usadas: Zn I (213,857 nm), Cd I (228,802 nm), Pb II (220,353 nm), Cu I (324,752 nm).

As amostras de água de coco foram filtradas e diluídas de acordo com Sousa *et al.* (2005)^{12,37}. Para isso, 2,00 mL da amostra foram coletados e diluído em HNO₃ (2%) (v/v) até um volume final de 10,0 mL. Os valores dos parâmetros usados para a realização das análises estão listados na Tabela 11.

Tabela 11. Condições operacionais do ICP OES segundo SOUSA *et al.* (2005)^{12,37}.

Câmara de Nebulização	<i>Ciclônica Twiter</i>
Nebulizador	<i>Mira Mist</i>
Injetor de Alumina (mm I.D)	1,2
Tocha de Quartzo	<i>One Slot</i>
Gerador de Rádio Frequência (MHz)	40
Potência de radiofrequência (W)	1400
Fluxo gás de plasma (L min ⁻¹)	15
Fluxo gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,6
Fluxo gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Taxa de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	1,0
<i>Instrument stabilization delay (s)</i>	40



RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização eletroquímica do sistema por VC

Antes da construção do principal eletrodo com suporte em acrílico usado neste trabalho, vários outros foram confeccionados usando, no lugar do acrílico, placas de fenolite com face cobreadas de circuitos eletrônicos cobertas com resina epóxi Araldite[®] Hobby (Figura 20a). Esse tipo de construção de eletrodo tinha por inconveniência a pouca durabilidade que ocasionava, após algum tempo, infiltrações da solução da célula eletroquímica entre a resina e o filme DDB. Isto foi observado pela coloração esverdeada da oxidação de cobre da placa e pelos picos de cobre e chumbo (presente na solda eletrônica) nos voltamogramas.

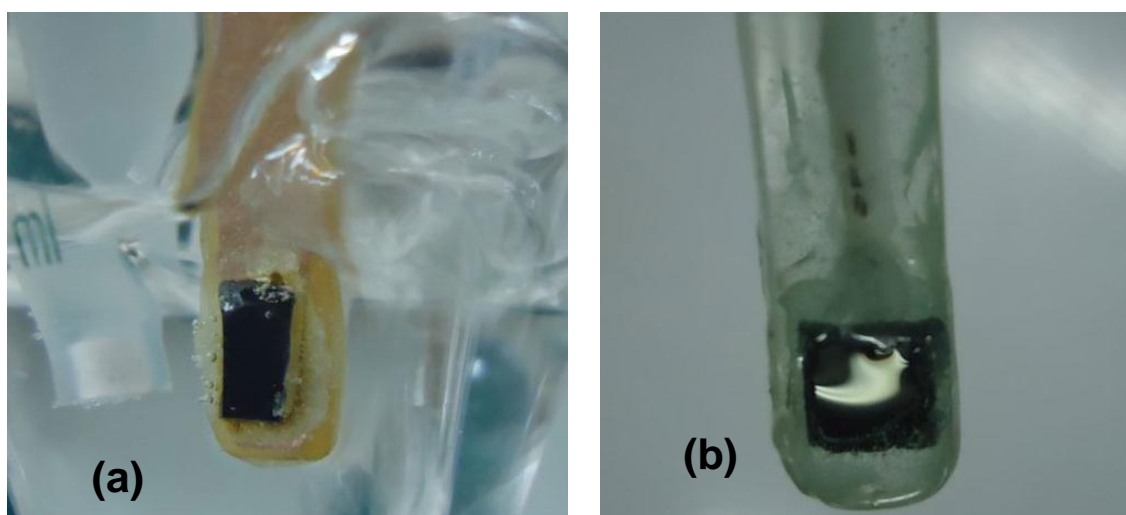


Figura 20. Eletrodos construídos usando o filme de DDB em (a) base de placa cobreada e (b) em acrílico.

Por outro lado, o eletrodo confeccionado em acrílico (Figura 20b) e com a mesma resina epóxi, manteve apenas o filme condutor de DDB em contato com a solução da célula eletroquímica. Uma visão frontal da junção DDB/resina realizada com auxílio de uma microscopia óptica encontrada na Figura 21, mostra a ausência de vazios/defeitos na disposição da resina proporcionando uma maior durabilidade do eletrodo montado com a base de acrílico. Deste modo, podemos garantir que a solução da célula eletroquímica não entrará em contato com a solda eletrônica e o fio de cobre.

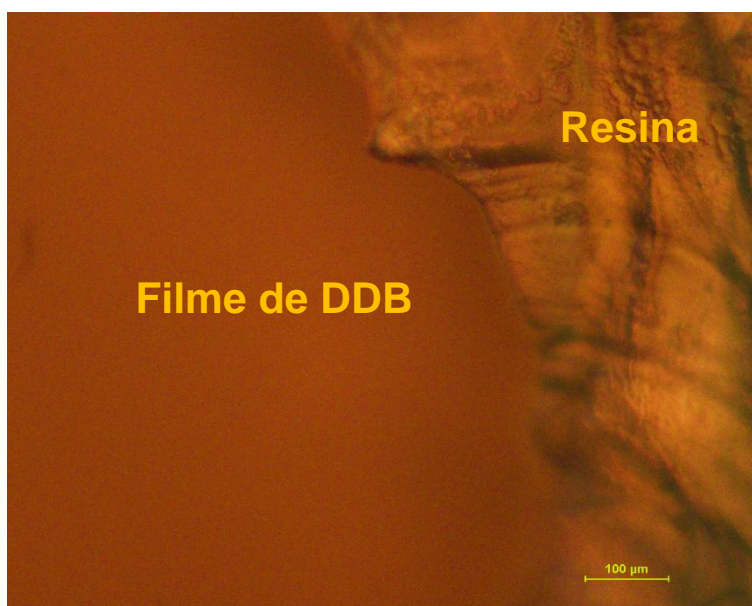


Figura 21. Microscopia óptica (20x) da junta DDB com a resina epóxi Araldite® Hobby.

Por se tratar de uma adaptação do eletrodo de DDB na configuração padrão do equipamento, o funcionamento do sistema eletroquímico foi verificado realizando uma VC em meio ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ encontrada na Figura 22. Para este eletrólito de suporte, o eletrodo de diamante dopado com “8000 ppm” de boro apresentou uma extensa janela eletroquímica ($-0,66 \text{ V}$ a $1,90 \text{ V}$ vs Ag/AgCl) com pequenos valores de corrente capacitiva num longo intervalo de potencial. A região, no voltamograma, próxima a $+1,6 \text{ V}$ mostra uma pequena corrente anódica que Mahé *et al.* (2005)²⁴ caracterizou como pequenas quantidades de carbono sp^2 como impureza da superfície do diamante.

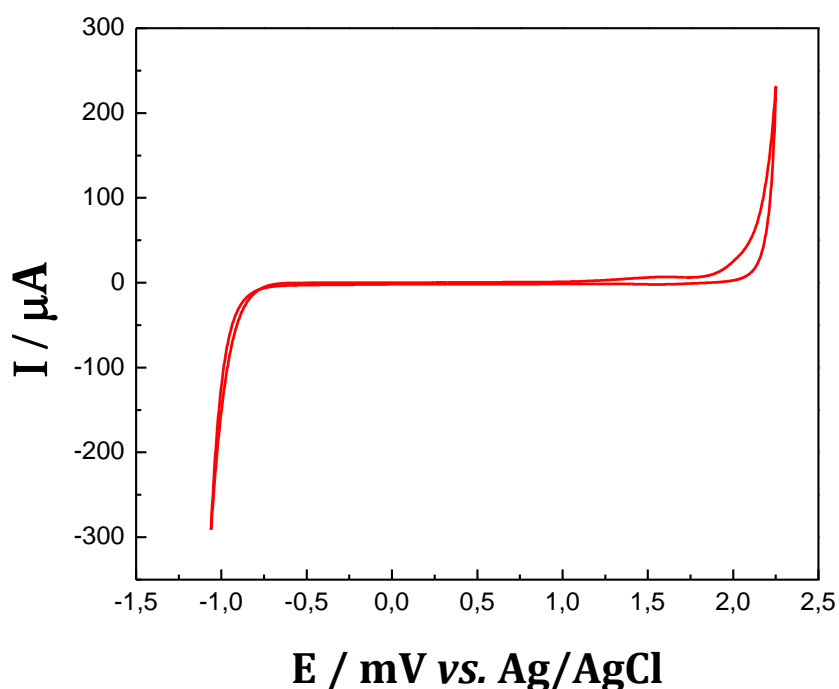


Figura 22. Voltamograma cíclico do eletrodo de diamante dopado de “8000 ppm” de boro em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

O segundo passo da caracterização do sistema eletroquímico foi a realização de uma VC, disponível na Figura 23, de uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ com concentração de $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ em eletrólito de suporte ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O sistema composto pelo ferricianeto é reversível e bem definido. Para a região negativa de corrente (corrente catódica) ocorre a redução do ferricianeto na superfície do eletrodo de acordo com a reação a seguir:



Na região positiva de corrente (corrente anódica) ocorre a oxidação do ferricianeto (reduzido anteriormente), como apresenta a seguinte reação:



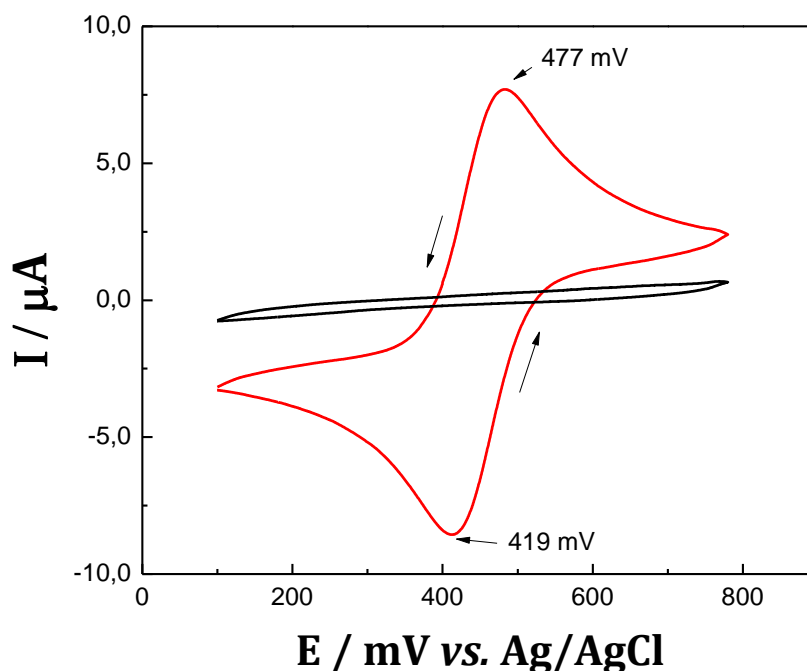


Figura 23. Voltamograma cíclico da (—) solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ com concentração de $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o branco (—) ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

A diferença dos potenciais de oxidação e redução para um sistema reversível é dado por:¹⁰⁷

$$\Delta E = E_{\text{oxidação}} - E_{\text{redução}} = \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad \text{Equação 2}$$

onde n é o número de elétrons envolvidos no processo de oxirredução.

No caso do ferricianeto de potássio, o n é igual a 1. Assim, temos que os dados experimentais obtidos geraram uma diferença de 58 mV . Valor este coerente com o teórico (59 mV) fornecido da Equação 2. Portanto, o sistema está apto para a realização dos ensaios eletroquímicos seguintes.

No entanto, nem todas as reações são reversíveis como as do ferricianeto de potássio. Na prática, uma voltametria realizada em uma amostra contendo uma infinidade de compostos pode conter espécies com comportamento irreversível gerando subprodutos. Estes subprodutos podem ser adsorvidos na superfície do eletrodo ou desencadear uma série de reações paralelas. Em especial, a adsorção na superfície do eletrodo pode causar efeito de memória o

que compromete a repetitividade das medidas voltamétricas. Nesse sentido, o pré-tratamento anódico é empregado para limpeza eletroquímica da superfície do filme de DDB por oxidação de moléculas adsorvidas. Em seguida, o pré-tratamento catódico proporciona a formação de terminais superficiais de hidrogênio (como na Figura 12 localizada na página 38) gerando uma superfície mais condutora (ou mais ativa) melhorando a sensibilidade nas determinações analíticas. Portanto, esse processo de pré-tratamento catódico da superfície (ativação), proposto por Suffredini *et al.* (2004)⁷², tem efeito significativo na resposta do eletrodo DDB para aplicações analíticas.

4.2 Aparato “*labmade*” para limpeza e ativação do DDB

O eletrodo de DDB é um eletrodo de estado sólido (EES) com propriedades atrativas para as técnicas eletroanalíticas. Porém, as ASV de redissolução anódica que usam um EES, por exemplo, possui um procedimento manual de rotina para a limpeza do eletrodo antes da pré-concentração e varredura. No caso específico do DDB usado neste trabalho, além de uma limpeza eletroquímica, uma ativação eletroquímica também deve ser aplicada. Nesse sentido, a repetitividade dos voltamogramas, mesmo quando sujeitos às mesmas condições, dependem da repetitividade do tratamento dado ao eletrodo. Por fim, os tempos de aplicação dos potenciais de limpeza/ativação não podem sofrer variação entre as medidas dos voltamogramas.

Todo esse procedimento era realizado manualmente com o auxílio de um cronômetro e um pequeno terminal de inversão da polaridade (Figura 24). Embora esse pequeno aparato fosse suficiente para o tratamento do DDB, ele exigia total atenção do operador ocasionando determinações mais trabalhosas com pouca repetitividade dos voltamogramas. Muitas características do eletrodo de DDB superam as do eletrodo de mercúrio, principalmente quanto a toxicidade e sobrepotencial de hidrogênio: DDB -1500 mV^{18} contra Hg -1200 mV^{39} . Porém, a repetitividade dos voltamogramas obtidos pelo eletrodo DDB é uma desvantagem em relação ao eletrodo de mercúrio.

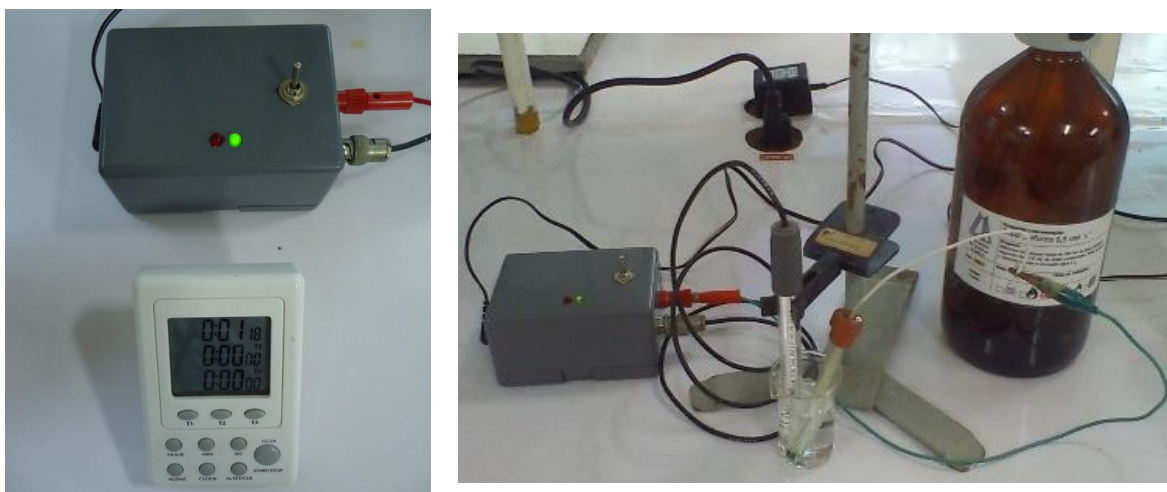


Figura 24. Primeiro aparato construído para limpeza e ativação do eletrodo DDB.

Nesse sentido, um novo sistema mecanizado foi criado (Figura 25) para a limpeza/ativação do eletrodo DDB. Com este segundo aparato, o eletrodo era colocado na célula eletroquímica para promover a limpeza e ativação assistido pelo *software*.



Figura 25. Segundo aparato construído para limpeza e ativação do eletrodo DDB.

4.2.1 Repetitividade do eletrodo de DDB após limpeza/ativação

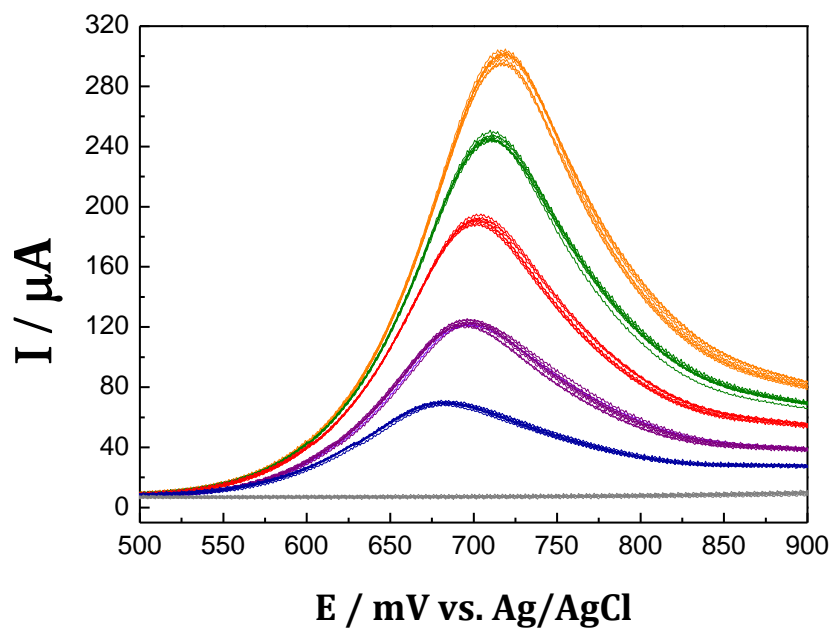
A eficiência do novo aparato foi investigada usando a SWV de cinco soluções de ácido gálico em eletrólito de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ cujas concentrações variaram de $0,6$ a $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$. Esse sistema é irreversível e compromete a limpeza do eletrodo. Entre cada voltamograma, foi realizado o pré-tratamento para a limpeza/ativação do eletrodo DDB. As 35 leituras das correntes de pico do ácido gálico encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Corrente de pico em função da concentração das replicatas de ácido gálico em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

	I_1	I_2	I_3	I_4	I_5	I_6	I_7	$I_{\text{média}}$	<i>Desvio Padrão</i>	RSD_i
Ácido Gálico (mmol L^{-1})	μA									
0,59	53,3	54,3	55,0	56,0	56,0	55,3	55,7	55,1	1,0	1,8%
1,00	106,0	102,0	102,0	102,0	103,0	104,0	103,0	103,1	1,5	1,4%
1,48	162,0	164,0	166,0	164,0	168,0	164,0	167,0	165,0	2,1	1,3%
1,92	218,0	215,0	215,0	211,0	213,0	212,0	215,0	214,1	2,3	1,1%
2,36	261,0	257,0	263,0	259,0	264,0	265,0	264,0	261,9	3,0	1,1%

Diante disso, os dados foram repetíveis e a relação de concentração *versus* corrente de pico encontra-se nas Figura 26 a e b.

a)



b)

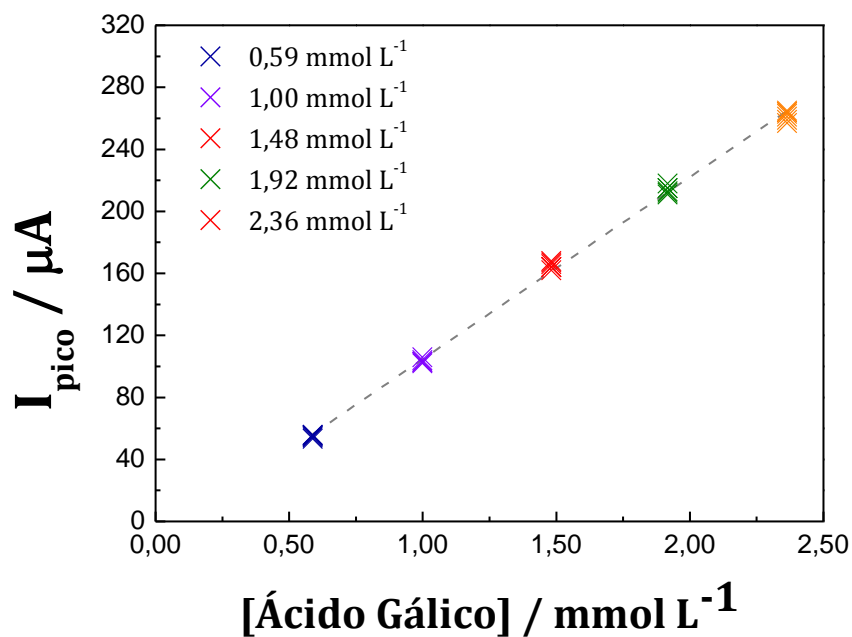


Figura 26. (a) Voltamogramas de onda quadrada para a diferentes níveis de concentração do padrão ácido gálico em eletrólito suporte de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e $V_{ef} = 100 \text{ mV s}^{-1}$); (b) Curva analítica do ácido gálico com todos os pontos de corrente. Equação da reta: $I_{pico} = 117,46_{\pm 0,86} [\text{Ácido Gálico}] - 0,0128_{\pm 0,0014}$ com $r^2 = 0,9991$.

A equação obtida a partir de um ajuste linear dos mínimos quadrados para os pontos de corrente de pico da Figura 26b é, havendo boa linearidade e dispersão dos resíduos (Figura 27).

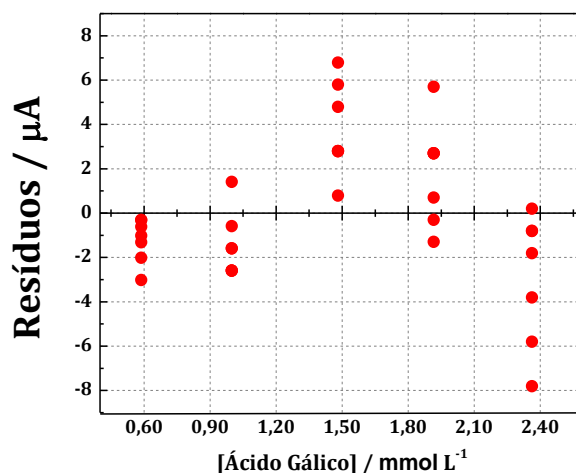


Figura 27. (a) Resíduos da curva analítica do ácido gálico para os cinco níveis de concentração.

A eficiência da limpeza/ativação foi avaliada indiretamente pela variabilidade das corrente de pico aplicando os critérios de aceitação disponível no Manual de Garantia da Qualidade Analítica¹⁰¹. Os valores do coeficiente de variação (RSD_i) de cada conjunto de dados (i) para os cinco níveis de concentração foram obtidos (Tabela 12). Comparando-os com o $RSD_{Horwitz}$ teórico obtido pela Equação 3:

$$RSD_{Horwitz} = 2^{(1 - 0,5 \log k)} \quad \text{Equação 3}$$

onde k é a fração mássica adimensional (g/g).

O desvio padrão relativo dos dados obtidos deverá ser menor que 2/3 do desvio padrão relativo da equação de Horwitz (Equação 3). Nesse sentido, para cada nível de concentração, o desvio padrão relativo calculado pelas 7 correntes de oxidação do ácido gálico atenderam o critério de aceitação (Tabela 13). Por fim, a limpeza/ativação realizada pelo aparato “*labmade*” entre cada uma das 35 SWV’s (5 níveis com 7 replicatas) foram repetíveis.

Tabela 13. Avaliação da repetitividade para os 5 níveis de concentração do ácido gálico.

Níveis (i)	Ácido Gálico ($mmol L^{-1}$)	RSD_i	$RSD_{Horwitz}$	Critério $RSD_i < \frac{2}{3} RSD_{Horwitz}$
1	0,59	1,8%	8,0 %	Aceito

2	1,00	1,4%	7,4 %	Aceito
3	1,48	1,3%	7,0 %	Aceito
4	1,92	1,1%	6,7 %	Aceito
5	2,36	1,1%	6,5 %	Aceito

Cada procedimento de tratamento do DDB consome cerca de 20 mL da solução de limpeza ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tem um tempo total de 80 segundos.

4.3 Planejamento Experimental da SWASV usando DDB

Os parâmetros experimentais da SWASV que foram otimizados usando o planejamento fatorial completo neste estudo, representam as principais variáveis, que segundo a literatura, influenciam significativamente a corrente de pico dos voltamogramas.^{38,103,108}

4.3.1 Estudo do comportamento das variáveis da pré-concentração

Para a otimização das variáveis na etapa de pré-concentração, estabeleceu cinco níveis para as variáveis potencial (E_{dep}) e tempo (t_{dep}), onde o nível zero foi de -1450 mV para a variável E_{dep} e 135 s para t_{dep} . A Tabela 14 apresenta a otimização de duas variáveis com base na matriz do planejamento composto central.

Tabela 14. Matriz do planejamento CCD para a otimização das variáveis E_{dep} e t_{dep} na determinação de Zn, Cd, Pb e Cu em água de coco.

Ensaio	Potencial de pré-concentração		Tempo de pré-concentração		Resposta Unificada ¹⁰⁴	
	(mV)		(s)			
1	-1490	(-1)	61	(-1)	1,185	Planejamento Fatorial
2	-1410	(+1)	61	(-1)	0,828	
3	-1490	(-1)	209	(+1)	3,393	
4	-1410	(+1)	209	(+1)	2,591	
5	-1450	(0)	135	(0)	2,361	Ponto Central
6	-1450	(0)	135	(0)	2,433	
7	-1450	(0)	135	(0)	2,236	
8	-1510	(-1,41)	135	(0)	2,882	Pontos Axiais
9	-1390	(+1,41)	135	(0)	1,873	
10	-1450	(0)	30	(-1,41)	0,623	
11	-1450	(0)	240	(+1,41)	3,477	

Os valores entre parenteses correspondem ao valor codificado.

O modelo polinomial quadrático que descreve uma relação entre as variáveis otimizadas E_{dep} e t_{dep} com a resposta (corrente de pico) foi estabelecida na Equação 4 a partir da matriz de planejamento CCD. Os ensaios eletroanalíticos foram realizados aleatoriamente para não haver erros estatísticos associados. A Equação 4 apresenta o modelo algébrico usado para otimização das variáveis x_1 (E_{dep}), x_2 (t_{dep}).

$$Y = b_0 + b_1(x_1) + b_2(x_2) + b_3(x_1)^2 + b_4(x_2)^2 + b_5(x_1x_2) \quad \text{Equação 4}$$

Onde b_0 é o valor da média dos pontos centrais e b_1 até b_5 são os coeficientes do modelo a serem determinados. Os coeficientes da equação do modelo foram obtidos por meio da Equação 5:

$$b = (X^tX)^{-1}X^tY \quad \text{Equação 5}$$

Onde X é a matriz de contraste, X^t é a transposta de X e a matriz Y é a média das respostas unificadas. Sendo assim, a Equação 6 foi obtida para o modelo de otimização de E_{dep} e t_{dep} :

$$I_{codificada} = 2,343_{\pm 0,090} - 0,323_{\pm 0,055} (E_{dep}) - 0,037_{\pm 0,065} (E_{dep})^2 + 1,000_{\pm 0,055} (t_{dep}) - 0,200_{\pm 0,066} (t_{dep})^2 - 0,200_{\pm 0,078} (t_{dep} E_{dep}) \quad \text{Equação 6}$$

Para a validação do ajuste do modelo desenvolvido na otimização das variáveis, foi aplicada a análise de variância (ANOVA). A Tabela 15 apresenta a validação do modelo matemático gerado para otimização das variáveis E_{dep} e t_{dep} .

Tabela 15. ANOVA e validação do modelo matemático para a etapa de pré-concentração.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}^{95\%}$
Regressão	9,13	4	2,28	$\frac{MQR}{MQR} = 113,4$	$F_{4,6} = 4,53$
Resíduo	0,12072	6	0,0212		
Falta de Ajuste	0,10084	4	0,0252	$\frac{MQF_{ajuste}}{MQ_{err. Puro}} = 2,54$	$F_{4,2} = 19,25$
Erro Puro	0,01987	2	0,0099		
Total	9,25025	10			

Varição Explicada = **98,69** %

Máxima de Variação Explicável = **99,79**%

MQR (Média Quadrática da Regressão), **MQR** (Média Quadrática do Resíduo), **MQF_{ajuste}** (Média Quadrática da Falta de Ajuste) e **MQ_{err. Puro}** (Média Quadrática do Erro Puro).

O Teste F foi aplicado para verificar a significância da regressão, visto que um $F_{calculado}$ maior que o $F_{tabelado}^{95\%}$ indica uma regressão forte e positiva e, conseqüentemente, um modelo matemático que representa satisfatoriamente seu experimento.⁹²

Desta maneira, com os dados obtidos pela tabela da ANOVA, verificou-se que o modelo matemático gerado é estatisticamente significativo, visto que o $F_{calculado}$ da regressão (113,4) é maior que o $F_{tabelado}$ (4,53) a um nível de confiança de 95%, e 4 e 6 graus de liberdade. Além disso, o ajuste quadrático aplicado foi verificado analisando a falta de ajuste e o erro puro. Sendo assim, o valor de $F_{calculado}$ igual a 2,54 é menor que o valor do $F_{tabelado}$ (19,25) a 95%

de nível de confiança com graus de liberdade de 4 e 2. Portanto, o modelo não possui falta de ajuste.⁹⁴

A partir do modelo descrito pela Equação 6 foi possível gerar a superfície de resposta (Figura 28) para os metais Zn, Cd, Pb e Cu, simultaneamente.

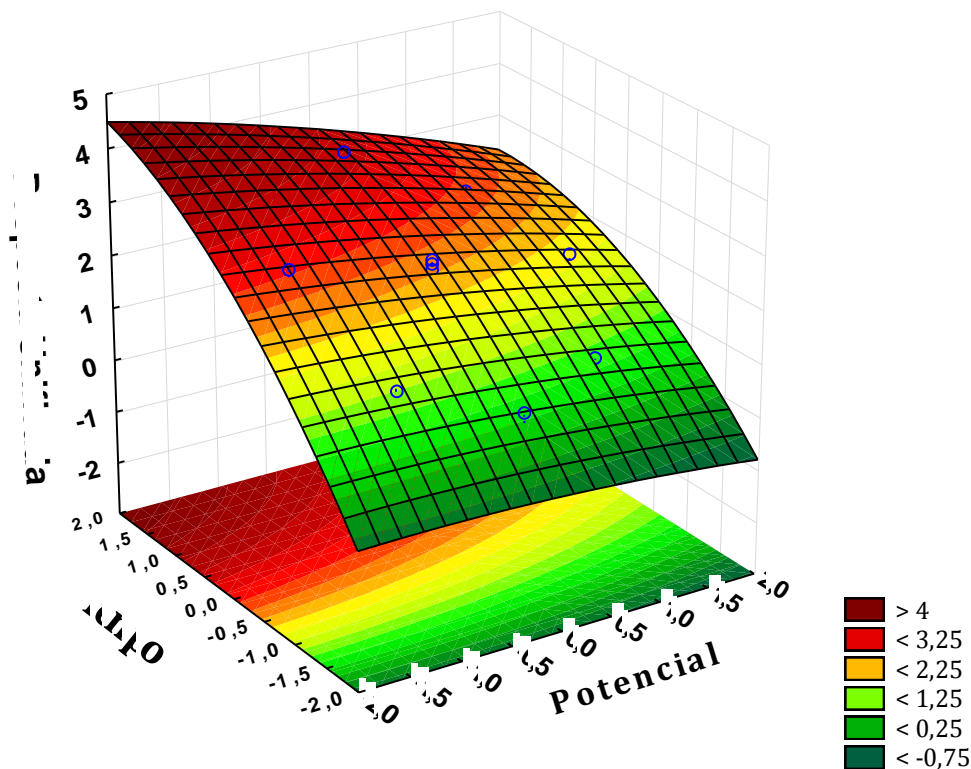


Figura 28. Superfície de resposta gerada pelo modelo matemático quadrático: otimização das variáveis E_{dep} e t_{dep} em função corrente de pico unificada dos elementos Zn, Cd, Pb e Cu.

A etapa de pré-concentração proporciona uma maior sensibilidade na determinação da concentração dos metais. As duas variáveis estudadas nessa etapa são: potencial de pré-concentração (E_{dep}) e o tempo em que ele é aplicado (t_{dep}). Conseqüentemente, a etapa de triagem para duas variáveis é desnecessária. Neste caso, essa otimização foi realizada diretamente com o planejamento CCD.

Para as análises voltamétricas que empregam a pré-concentração, o aumento de sensibilidade pode ser atribuído a quantidade de analito depositado na superfície do eletrodo de trabalho. Portanto, espera-se que o emprego de potenciais mais negativos aumente a sensibilidade da SWASV.¹⁹ Assim, o menor valor que pode ser assumido por E_{dep} foi de -1500 mV , por ser

o menor potencial capaz de reduzir todos os quatro metais sem que houvesse a redução dos íons H^+ . Contudo, esta redução compete com a redução dos analitos, o que diminuiria a eficiência da pré-concentração. Em contrapartida, -1400 mV é o maior valor de potencial capaz de depositar todos os metais, inclusive o Zn, que dentre os quatro metais apresenta o maior potencial de redução.

Os níveis ($-1,41$ e $+1,41$) atribuídos para os valores de t_{dep} foram 30 e 240 s. A superfície de resposta mostra que valores elevados de t_{dep} aumentam a resposta unificada dos analitos. Porém, o tempo efetivo total de análise também aumentaria, o que não é uma característica atrativa para um método analítico.

Assim, os pontos críticos foram estabelecidos em -1500 mV para o potencial de pré-concentração e 240 s para o tempo de pré-concentração.

4.3.2 Estudo do comportamento das variáveis da SWV

Uma vez que os analitos Zn, Cd, Pb e Cu são reduzidos no eletrodo de trabalho, a segunda etapa (SWV) estabelece uma corrente de pico oriunda da redissolução destes metais. Consequentemente, as variáveis da SWV que influenciam consideravelmente na sensibilidade e seletividade do método foram otimizadas neste trabalho.

A frequência (f) de aplicação dos pulsos de potencial, por exemplo, é uma das mais importantes variáveis da SWV.³⁸ Ela influencia proporcionalmente na corrente de pico ocasionando maior sensibilidade do método. Por outro lado, em frequências maiores, a resolução do pico é reduzida quando esta perde o seu aspecto que, de maneira simplista, faz alusão a uma gaussiana.

A amplitude de pulso (ΔE_p) na SWV aumenta a altura e largura do pico. Nesse sentido, o aumento dessa corrente de pico pela amplitude de pulso é desejado. Por outro lado, o alargamento do pico proporcionaria uma menor seletividade ao sobrepor correntes de pico de analitos vizinhos.

Em contrapartida, a velocidade de varredura da SWV é função do produto da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) com o incremento de potencial (ΔE_s). Sendo assim, o incremento de potencial afeta a velocidade de varredura da onda quadrada melhorando significativamente a sensibilidade das análises.

Além dessas três variáveis, a concentração do eletrólito suporte (C) foi avaliada nessa etapa uma vez que, segundo Mirčeski *et al.* (2001)¹⁰³, a queda ôhmica pode influenciar diretamente na SWV. Portanto, realizou-se um planejamento fatorial completo do tipo 2^4 , isto é, 4 variáveis estudadas em 2 níveis cada uma.

No planejamento fatorial completo de uma determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu, o uso de uma resposta unificada¹⁰⁴ das correntes de pico pode ser empregado para uma triagem conjunta dos metais. Desta forma, a

Tabela 16 apresenta o valor experimental unificado para todos os metais.

Tabela 16. Resultados experimentais obtidos na etapa de triagem para o valor da resposta unificada

Exp.	Concentração Tampão		Incremento de Potencial		Amplitude de pulso		Frequência		Resposta Unificada ¹⁰⁴
	$(mol L^{-1})$		(mV)		(mV)		(Hz)		
1	0,05	(-1)	2,5	(-1)	45	(-1)	90	(-1)	1,21
2	0,1	(+1)	2,5	(-1)	45	(-1)	90	(-1)	1,69
3	0,05	(-1)	7,5	(+1)	45	(-1)	90	(-1)	2,15
4	0,1	(+1)	7,5	(+1)	45	(-1)	90	(-1)	3,20
5	0,05	(-1)	2,5	(-1)	55	(+1)	90	(-1)	1,54
6	0,1	(+1)	2,5	(-1)	55	(+1)	90	(-1)	1,85
7	0,05	(-1)	7,5	(+1)	55	(+1)	90	(-1)	2,61
8	0,1	(+1)	7,5	(+1)	55	(+1)	90	(-1)	3,77
9	0,05	(-1)	2,5	(-1)	45	(-1)	110	(+1)	1,28
10	0,1	(+1)	2,5	(-1)	45	(-1)	110	(+1)	1,74
11	0,05	(-1)	7,5	(+1)	45	(-1)	110	(+1)	2,48
12	0,1	(+1)	7,5	(+1)	45	(-1)	110	(+1)	3,34
13	0,05	(-1)	2,5	(-1)	55	(+1)	110	(+1)	1,35
14	0,1	(+1)	2,5	(-1)	55	(+1)	110	(+1)	2,00
15	0,05	(-1)	7,5	(+1)	55	(+1)	110	(+1)	2,44
16	0,1	(+1)	7,5	(+1)	55	(+1)	110	(+1)	4,00

Os valores entre parenteses correspondem ao valor codificado.

A partir desta resposta unificada, calcularam-se os efeitos de cada variável para o sistema que é apresentado no diagrama de Pareto (Figura 29).

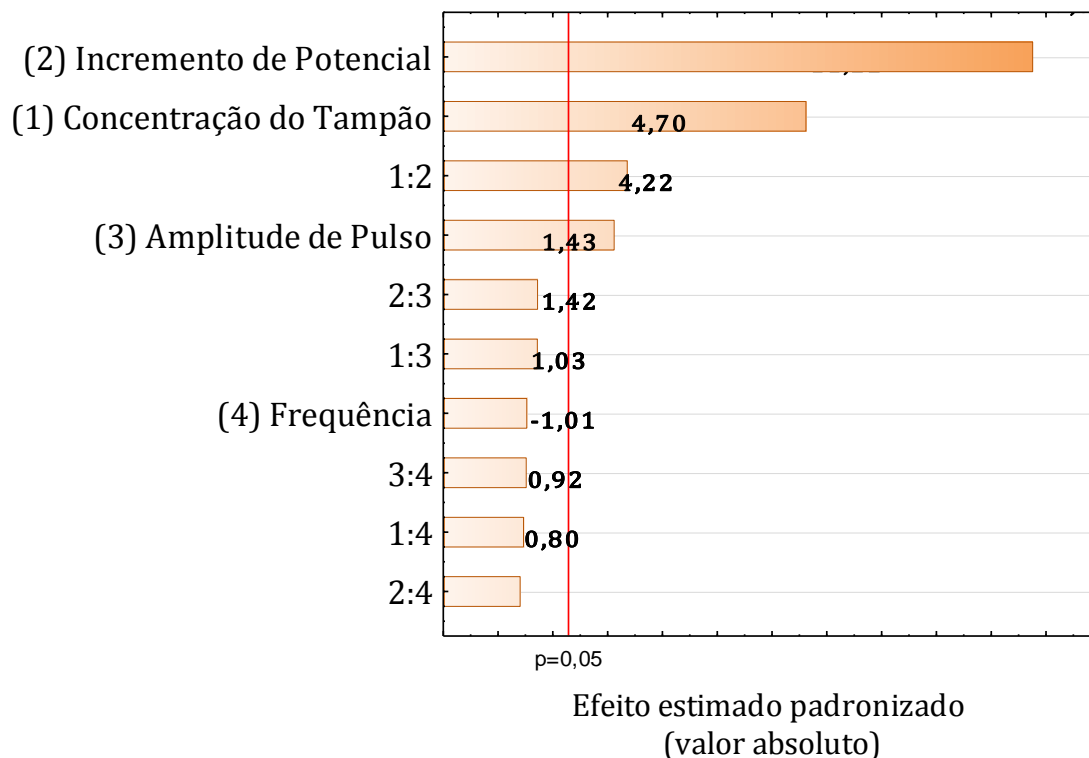


Figura 29. Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial completo para quatro variáveis: Concentração do tampão (C); Incremento de potencial (ΔE_s); Amplitude de pulso (ΔE_p); frequência da onda quadrada (f).

O diagrama de Pareto expressa as variáveis consideradas significativas a 95% de nível de confiança. Além do mais, é possível evidenciar a importância do incremento de potencial (ΔE_s) e a concentração do tampão acetato (C) uma vez que, os mesmos influenciam individualmente e sinergicamente (interação 1: 2) na resposta unificada.

A quarta variável (frequência) pôde ser desprezada dentro do domínio de 90 a 110 Hz uma vez que o efeito calculado (1,034) pode ser negligenciado com 95% de confiança. Além disso, as interações da frequência com as outras três variáveis também obtiveram efeitos não significativos. Contrapondo o resultado anterior, sabemos que a frequência é um parâmetro importante para a SWV, porém, essa afirmativa não pôde ser contemplada na etapa de triagem tendo em vista o pequeno intervalo de frequência utilizado na otimização dos experimentos. Assim, o valor de frequência escolhido foi de 100 Hz.

Desta forma os parâmetros: concentração do tampão (C), incremento de potencial (ΔE_s) e amplitude de pulso (ΔE_p), foram significativos na etapa de

triagem e foram otimizados utilizando o planejamento CCD. A Tabela 17 mostra a matriz do planejamento com os 17 experimentos realizados e a respectiva resposta unificada.

Tabela 17. Valores experimentais usados na otimização e a resposta unificada.

	Concentração do Tampão ($mol L^{-1}$)		Incremento de Potencial (mV)		Amplitude de pulso (mV)		Resposta Unificada ¹⁰⁴	
1	0,100	(-1)	5,0	(-1)	40	(-1)	1,70	
2	0,200	(+1)	5,0	(-1)	40	(-1)	1,62	
3	0,100	(-1)	10,0	(+1)	40	(-1)	2,38	
4	0,200	(+1)	10,0	(+1)	40	(-1)	2,68	Planej. Fatorial
5	0,100	(-1)	5,0	(-1)	70	(+1)	2,45	
6	0,200	(+1)	5,0	(-1)	70	(+1)	2,29	
7	0,100	(-1)	10,0	(+1)	70	(+1)	3,39	
8	0,200	(+1)	10,0	(+1)	70	(+1)	3,90	
9	0,150	(0)	7,5	(0)	55	(0)	2,70	Ponto Central
10	0,150	(0)	7,5	(0)	55	(0)	2,70	Repeti. do Ponto Central
11	0,150	(0)	7,5	(0)	55	(0)	2,68	Ponto Central
12	0,066	(-1,68)	7,5	(0)	55	(0)	2,45	
13	0,234	(+1,68)	7,5	(0)	55	(0)	2,54	
14	0,150	(0)	3,3	(-1,68)	55	(0)	1,56	Pontos Axiais
15	0,150	(0)	11,7	(+1,68)	55	(0)	3,49	
16	0,150	(0)	7,5	(0)	30	(-1,68)	1,78	
17	0,150	(0)	7,5	(0)	80	(+1,68)	3,29	

Os valores entre parenteses correspondem ao valor codificado.

A Equação 7 apresenta o modelo matemático quadrático para otimização C , ΔE_s e ΔE_p .

$$\begin{aligned}
 I_{codificada} = & 2,683_{\pm 0,057} + 0,066_{\pm 0,027} (C) + 0,561_{\pm 0,027} (\Delta E_s) \\
 & + 0,456_{\pm 0,026} (\Delta E_p) - 0,042_{\pm 0,029} (C)^2 - 0,039_{\pm 0,029} (\Delta E_s)^2 \\
 & - 0,027_{\pm 0,029} (\Delta E_p)^2 + 0,126_{\pm 0,035} (C \Delta E_s) \\
 & + 0,003_{\pm 0,034} (C \Delta E_p) + 0,088_{\pm 0,035} (\Delta E_s \Delta E_p)
 \end{aligned}
 \tag{Equação 7}$$

onde que C é a concentração do tampão acetato, ΔE_s é o incremento de potencial e ΔE_p é a amplitude de pulso.

A validação do modelo gerado pela matriz de planejamento CCD foi realizada com o auxílio da ANOVA, na Tabela 18.

Tabela 18. Tabela ANOVA para o planejamento CCD das variáveis da SWV e concentração de tampão acético.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}^{95\%}$
Regressão	7,413	10	0,741	$\frac{MQR}{MQr} = 65,81$	$F_{4,6} = 4,06$
Resíduo	0,0676	6	0,0113		
Falta de Ajuste	0,0417	4	0,0104	$\frac{MQF_{ajuste}}{MQ_{err. Puro}} = 0,80$	$F_{4,2} = 19,25$
Erro Puro	0,0259	2	0,0129		
Total	7,4810	16			

Varição Explicada = **99,0965** %

Máxima de Variação Explicável = **99,6541** %

MQR (Média Quadrática da Regressão), **MQr** (Média Quadrática do Resíduo), **MQF_{ajuste}** (Média Quadrática da Falta de Ajuste) e **MQ_{err. Puro}** (Média Quadrática do Erro Puro).

A partir da ANOVA, verifica-se que o modelo gerado é estatisticamente significativo, visto que o $F_{calculado}$ da regressão (65,81) é maior que o $F_{tabelado}$ (4,06) a um nível de confiança de 95 %, e 10 e 6 graus de liberdade. Além disso, podemos também avaliar que o modelo quadrático aplicado está significativamente ajustado, pois o $F_{calculado}$ do erro puro (0,80) é menor que o $F_{calculado}$ (19,25) a um nível de confiança de 95 %, e 4 e 2 graus de liberdade.^{92,94}

Dada a aceitação do modelo obtido pela matriz de planejamento CCD, foram plotadas três curvas de nível, conforme podemos visualizar na Figura 30.

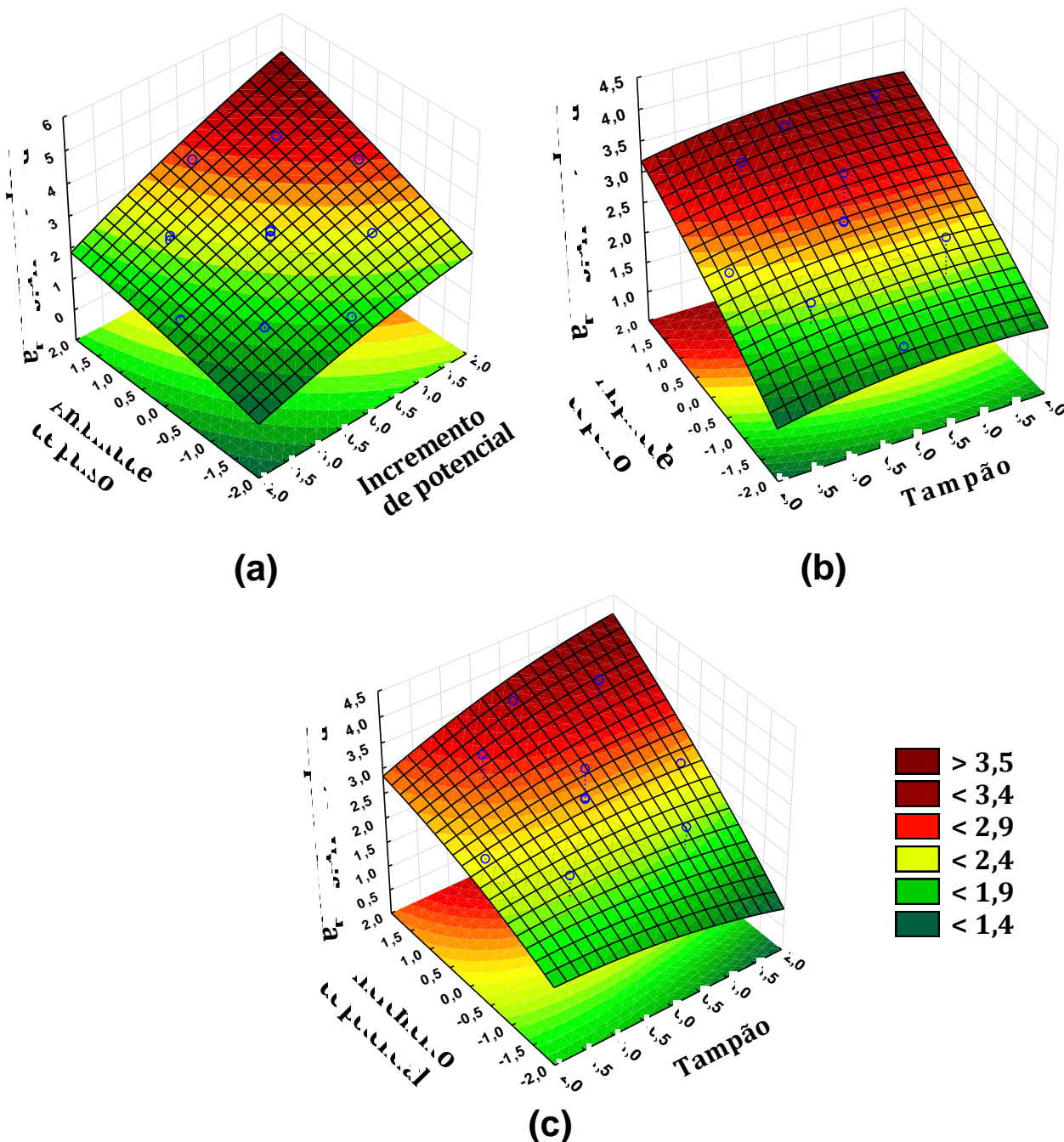


Figura 30. Comportamento da resposta unificada dos metais Zn, Cd, Pb e Cu por SWASV. Superfície de resposta de (a) amplitude de pulso *versus* incremento de potencial (b) amplitude de pulso *versus* concentração do tampão, e a interação do (c) incremento de potencial *versus* concentração do tampão.

A metodologia da superfície de resposta nos auxilia ao ilustrar as melhores condições experimentais e o comportamento das variáveis sobre o sistema. Desta forma, a obtenção do ponto crítico (ponto de máximo, neste caso) dentro do domínio experimental confere ao método uma maior sensibilidade.

Por fim, os valores ótimos calculados pela Equação 7 e decodificados são de $0,206 \text{ mol L}^{-1}$ para a concentração do tampão, $11,56 \text{ mV}$ para o incremento de potencial e $130,78 \text{ mV}$ para a amplitude de pulso.

O valor calculado para a amplitude é aceito matematicamente, porém, na prática, valores elevados de amplitude acarretam num deslocamento do potencial e alargamento do pico. Esse alargamento faz com que o método perca seletividade ao superpor picos de analitos vizinhos. Logo, o ponto escolhido para amplitude foi estabelecido em 55 mV , por apresentar, em conjunto com os outros valores otimizados, boa sensibilidade e seletividade. Por fim, todos os valores para a SWASV usando o eletrodo DDB estão apresentados na Tabela 10.

4.4 Determinação do limite de detecção e quantificação

As variáveis da SWASV da Tabela 10 foram aplicadas nas soluções padrões dos analitos cujas concentrações variaram de 2 a $12 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada metal em tampão acetato ($\text{pH } 4,7$) $0,206 \text{ mol L}^{-1}$. Desta forma, observou-se a menor concentração de analito capaz de gerar uma corrente de pico mensurável.

Os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação estão listados na Tabela 19. Diante desses dados, pôde-se observar que o Zn apresentou o maior valor ($4,4 \mu\text{g L}^{-1}$) e o Cu o menor valor ($0,6 \mu\text{g L}^{-1}$) para o LD.

Tabela 19. Valores de LD e LQ do método para a SWASV usando o eletrodo de DDB.

Analito	Potencial de meia onda (mV)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD _{ICP OES} ^(a) ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Zn	-980	4,4	14,5	0,19
Cd	-750	4,2	13,9	0,25
Pb	-380	3,0	9,9	1,6
Cu	-90	0,6	2,0	2,6

(a) As determinações usando ICP OES serão citados no Item 4.5.

Os LD listados para a SWASV correspondem a concentração dos analitos na célula eletroquímica.

Quando comparados os LD's da SWASV (LD_{SWASV}) com os obtidos por ICP OES ($LD_{ICP\ OES}$), apenas o analito Cu apresentou seu valor de concentração menor. Vale enfatizar que a determinação do LD_{SWASV} foi obtido pela menor concentração mensurável dos analitos que pôde ser distinguida da corrente de fundo dos voltamogramas. Por outro lado, o $LD_{ICP\ OES}$ são obtidos a partir de cálculos estatísticos que envolvem a sensibilidade da curva analítica e desvio-padrão do branco.

4.5 Linearidade e faixa de trabalho da SWASV com eletrodo de DDB

Para determinar a linearidade e a faixa de trabalho da SWASV para os quatro analitos, construiu-se quatro curvas analíticas a partir das correntes de pico média dos voltamogramas apresentados na Figura 31. As concentrações das soluções analisadas foram variadas de 15 – 90 $\mu g L^{-1}$ para Zn e de 5 – 43 $\mu g L^{-1}$ para Cd, Pb e Cu.

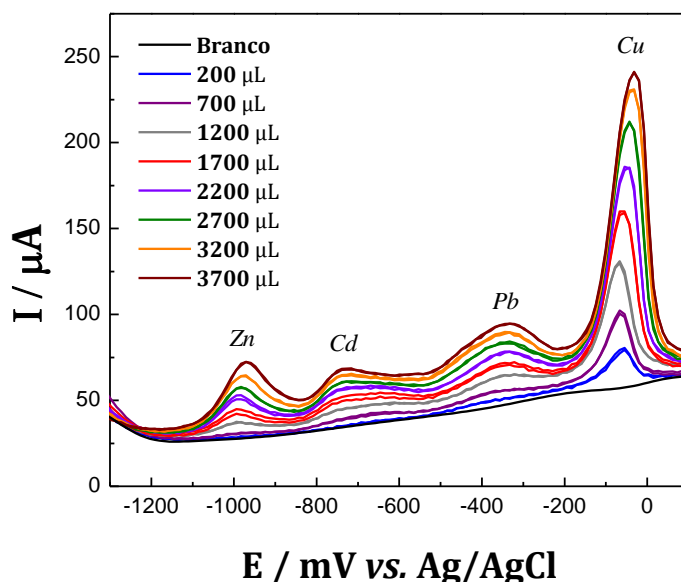


Figura 31. Voltamogramas de onda quadrada para a adições de oito alíquotas de solução padrão intermediário contendo Zn, Cd, Pb e Cu (concentrações de 585, 287, 299, 286 $\mu g L^{-1}$).

A Figura 32a apresenta a variação das correntes de pico média em função da concentração de cada analito e a Figura 32b é uma ampliação da região pontilhada da Figura 32a.

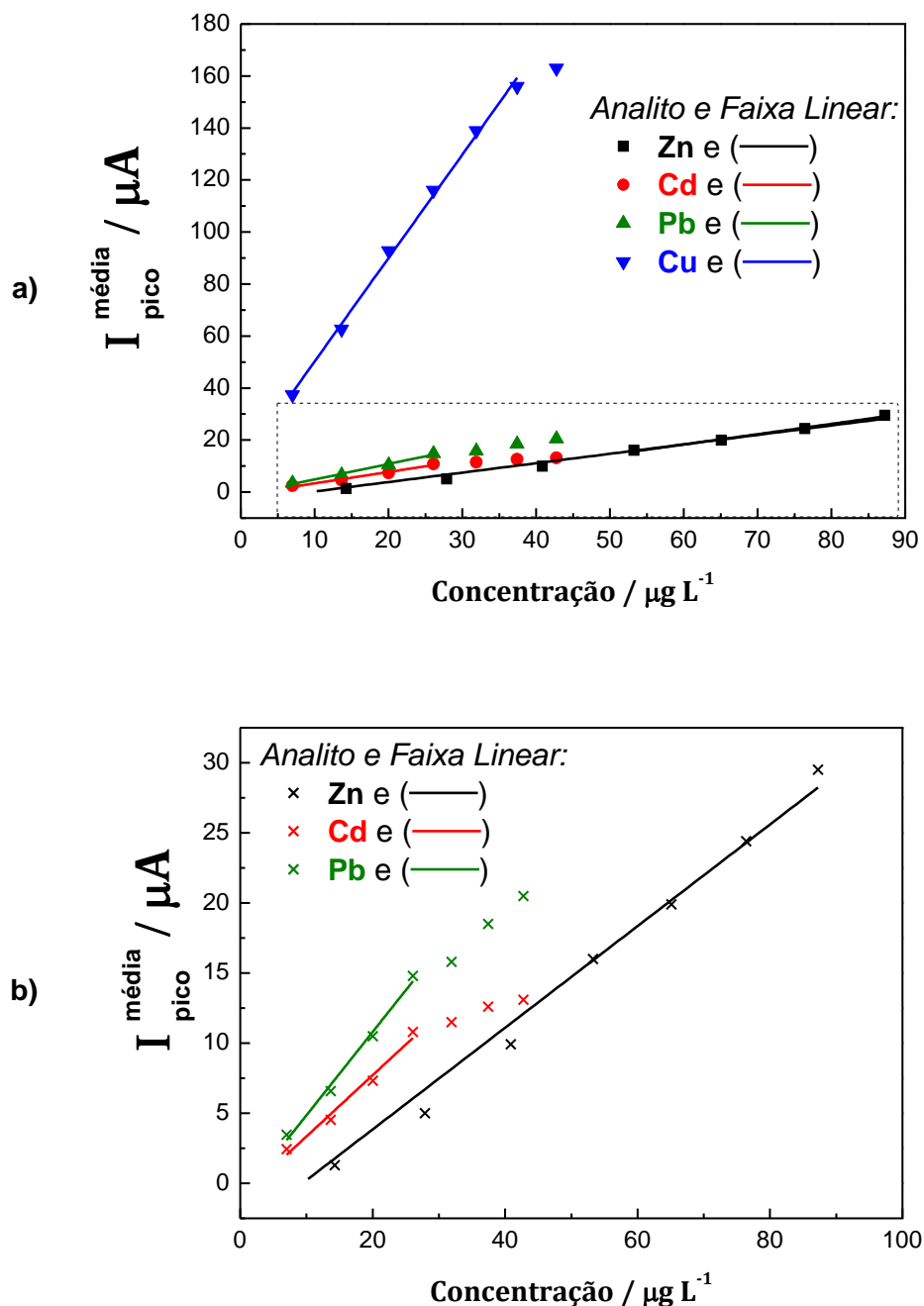


Figura 32. Curvas analíticas (a) para Zn, Cd, Pb e Cu e, para uma melhor visualização, (b) Zn, Cd, Pb.

O início da faixa linear é dado pelo LD_{SWASV} . As adições foram realizadas até que não houvesse uma relação linear entre a corrente de pico e concentração contemplado pelo gráfico de resíduos (não mostrado). Nas

Figura 32a e b, é possível observar a perda da linearidade para os analitos. Todas as faixas lineares apresentaram $r^2 > 0,98$ e gráfico de resíduos não tendenciosos. As informações sobre as regressões estão disponíveis na Tabela 20.

O Zn apresenta a maior faixa de trabalho (Figura 32a). Os metais Cd e Pb perdem rapidamente a linearidade acima de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ por ocasionar um alargamento nos seus respectivos picos. Por outro lado, até a concentração de $90 \mu\text{g L}^{-1}$ houve linearidade para o Zn. O Cu possui a maior sensibilidade, dado o seu maior coeficiente angular.

Tabela 20. Valores de LD e LQ do método para a SWASV usando o eletrodo de DDB.

	Coef. Angular ($\mu\text{A L}/\mu\text{g}$)	Coef. Linear (μA)	r^2	$p - \text{value}^{(a)}$	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Zn	$0,397 \pm 0,022$	$-5,5 \pm 1,6$	0,9915	$p < 0,05$	4,4 – 90
Cd	$0,448 \pm 0,035$	$-1,27 \pm 0,64$	0,9816	$p < 0,05$	4,2 – 26
Pb	$0,595 \pm 0,039$	$-1,10 \pm 0,71$	0,9872	$p < 0,05$	3,0 – 26
Cu	$3,98 \pm 0,11$	$10,4 \pm 2,7$	0,9963	$p < 0,05$	0,6 – 35

(a) Caso $p - \text{value} > 0,05$ (ou seja, 95%) rejeita-se a hipótese de que a corrente de pico é função linear da concentração.

4.6 Determinação total de Zn, Cd, Pb e Cu em água de coco por ICP OES

A análise da água de coco por ICP OES foi realizada aplicando a metodologia proposta por Sousa *et al.* (2003)¹³ para comparar os resultados com a SWASV deste trabalho. Os autores usaram o material de referência certificado “*Mixed Food Diet*” e reportam algumas características de desempenho para método usando ICP OES. Por fim, as concentrações de macro e micro-nutrientes metálicos em água de coco foram reportadas.

Os coeficientes para um ajuste linear com o coeficiente linear interceptando zero estão apresentados na Tabela 21. As curvas analíticas dos quatro analitos assumiram bons coeficientes de correlação, todos maiores que 0,999. Além disso, os gráficos de resíduos assumiram uma distribuição aleatória não tendenciosa.¹⁰⁶ Os limites de detecção obtidos experimentalmente foram menores que o LD reportado por Souza *et al.*

(2003)¹³ com exceção do cobre. Vale ressaltar que as condições instrumentais usadas para as análises por ICP OES neste trabalho são as mesmas proposta pelos autores.

Tabela 21. Características de desempenho para a análise das amostras de água de coco natural.

	Coeficiente de Inclinação	Coeficiente Linear ^(a)	Coef. Corr.	$LD_{ICP\ OES}$	$LQ_{ICP\ OES}$	$LD_{Liter.}$ ¹³
	$\left(\frac{Intensidade \cdot L}{mg}\right)$	$(Intensidade)$			$(\mu g\ L^{-1})$	
Zn	487100	0	0,9996	0,19	0,63	0,7
Cd	623300	0	0,9994	0,25	0,83	0,6
Pb	30490	0	0,9994	1,6	5,3	11
Cu	1779000	0	0,9995	2,6	8,6	1,5

(a) O coeficiente linear foi forçado como zero por assumir valores negativos próximos a -100. Este valor de intensidade é negligenciável quando comparado com o coeficiente de inclinação.

As concentrações dos 4 analitos para dez amostras encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22. Concentrações de Zn, Cd, Pb e Cu em amostras de água de coco natural e industrial analisadas por ICP OES.

	Zn	Cd	Pb	Cu
Código	$\mu g\ L^{-1}$			
<i>NA</i>	924 ± 60	< 1,3	< 8	744 ± 40
<i>NB</i>	531 ± 40	< 1,3	< 8	90,0 ± 0,3
<i>NC</i>	203 ± 1	< 1,3	< 8	< 13
<i>ND</i>	182 ± 6	< 1,3	< 8	< 13
<i>NE</i>	184,4 ± 0,7	< 1,3	< 8	< 13
<i>IA</i>	230 ± 2	< 1,3	< 8	5,0 ± 0,5 ^(a)
<i>IB</i>	216 ± 2	< 1,3	< 8	< 13
<i>IC</i>	48,9 ± 0,5	< 1,3	< 8	< 13
<i>ID</i>	219,3 ± 0,9	< 1,3	< 8	48,4 ± 0,7
<i>IE</i>	238,7 ± 0,1	< 1,3	< 8	61,8 ± 0,9

(a) Valores correspondentes a estimativas de concentração, por estarem abaixo do LQ, mas acima do LD.¹⁰⁹

As concentrações de zinco e cobre nas amostras NA e NB do município de São Mateus/ES são, no mínimo, o dobro das outras amostras. As Figura 33

mostram uma avaliação da concentração de Zn, Cd, Pb e Cu para as dez amostras estudadas. Os metais Zn e Cu são comumente determinados na matriz água de coco, e suas concentrações, segundo *National Nutrient Database for Standard Reference*³, são próximas a $1,0$ e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. No Brasil, a faixa encontrada para as concentração desses dois metais são $0,4$ a $0,18 \text{ mg L}^{-1}$ para o zinco. Por outro lado, as concentrações de cobre assumem valores menores que $6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.¹²

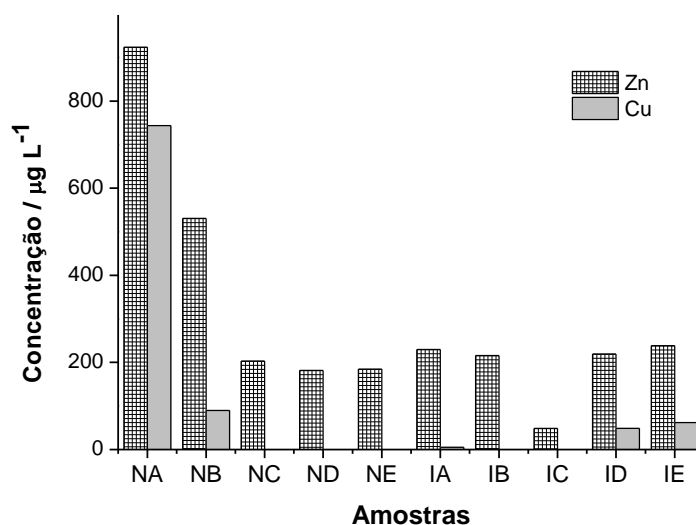


Figura 33. Avaliação da concentração de Zn e Cu nas 10 amostras de água de coco.

A Tabela 23 mostra as faixas de concentração para Zn, Cd, Pb e Cu para a água de coco natural e industrializada reportadas por alguns autores.

Nessa tabela, a concentração máxima para o Zn e Cu em amostras naturais é obtida neste trabalho. Estes metais estão presentes na composição dos fertilizantes, logo, são micronutrientes. Conseqüentemente, há o acúmulo destes na água de coco por parte do coqueiro. Desta maneira, podemos propor que as amostras NA e NB apresentam uma maior concentração de Zn e Cu visto que são oriundas do maior produtor por hectare da América Latina, o município de São Mateus/ES, e provavelmente devem empregar uma maior quantidade de aditivos salinos na cococultura. Por outro lado, Cd e Pb não são geralmente determinados na água de coco, porém, suas concentrações devem ser monitoradas por estes serem tóxicos, mesmo em concentrações ínfimas. O

autor relatou que as concentrações desses metais, determinadas por ICP OES, foram menores que o seus LD's.

Há uma variabilidade nas concentrações dos analitos entre os autores. O teor desses metais na água de coco variam com o período de maturação do fruto e a estação do ano como estudado por Kwiatkowski *et al.* (2012)⁵. Estes autores relatam que o Zn e Cu sofrem uma redução na concentração com o aumento do tempo de desenvolvimento dos frutos. Segundo eles, o Cu só apresentou concentração mensurável no verão. Acredita-se que as elevadas taxas de evaporação proporcionada pela temperatura média dessa estação diminuem o volume de água no interior do fruto, o que ocasiona uma pré-concentração.

Tabela 23. Concentração de Zn, Cd, Pb, Cu reportados na literatura para a água de coco natural e industrializada.

<i>Autor(es)</i>	<i>Zn</i>		<i>Cd</i>		<i>Pb</i>		<i>Cu</i>	
	<i>Nat.</i>	<i>Ind.</i>	<i>Nat.</i>	<i>Ind.</i>	<i>Nat.</i>	<i>Ind.</i>	<i>Nat.</i>	<i>Ind.</i>
Este Trabalho	491 – 984	48 – 239	< 0,25	< 0,25	< 1,6	< 1,6	90 – 704	0 – 63
Naozuka ¹¹⁰	400 – 480	350 – 630	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	2,6 – 3,6	40 – 130
Kwiatkowski ⁵	140 – 520	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	0 – 270	<i>ND</i>
Munoz ¹⁴	302 – 508	95 – 311	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	< 0,03	< 0,03
Sousa ¹³	40 – 180	200 – 360	< 6	< 1	< 11,1	< 9,6	90 – 190 ^(a)	
USDA ³	100 ^(a)		<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	40 ^(a)	

(a) Tipo de amostra não identificada como natural ou industrializada.

Nat.: Natural; *Ind.*: Industrializada; *ND*: Não determinado no trabalho;

4.7 Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu livres em água de coco por SWASV

A principal vantagem da voltametria em relação às outras técnicas é a possibilidade de análise da amostra com pouco ou nenhuma etapa de extração e/ou separação.^{38,39} No entanto, a determinação da concentração total só é possível se todo o metal estiver lábil. Nesse sentido, a voltametria tem sido usada para estudo da especiação química.^{39,57} Esta é tão importante quando a quantificação do teor total de um analito. Alguns autores, por exemplo, consideram que espécies lábeis apresentam maior biodisponibilidade aos organismos e, por isso, a concentração das formas possíveis de um analito deve ser mensurada.¹¹¹

Na água de coco, uma fração da quantidade total de zinco está disponível na forma lábil e a outra parte está combinado a outras moléculas, principalmente as orgânicas.¹⁴

Na determinação da concentração lábil, os valores otimizados das variáveis da SWASV foram aplicados nas amostras de água de coco IA (industrializada), sem qualquer tratamento prévio. Munoz *et al.* (2007)¹⁴ relatam que a proposta inicial do trabalho era a determinação de Zn e Cu diretamente na amostra sem adição de eletrólito suporte e diluição prévia. No entanto, os autores informam que mesmo com procedimentos de filtrações da amostra, o eletrodo de filme de mercúrio (usado para o Zn) sofria envenenamento, possivelmente pela forte adsorção de moléculas orgânicas. Além disso, o mesmo comportamento era observado no eletrodo de ouro (para determinação de Cu).

Por outro lado, essa anomalia não foi observada neste trabalho por ser usado o eletrodo DDB em conjunto com o aparato de limpeza/ativação. Logo, foi possível determinar a concentração de Zn e Cu livres, simultaneamente.

A Tabela 24 apresenta as correntes de pico média ($I_{pico}^{média}$) para as curvas de adição de analito.

Tabela 24. Corrente de pico média (I_{pico}^{medio}) e o desvio padrão (DP) obtidos após construção da curva de adições de padrão na água de coco IA.

Solução Padrão Intermediária (μL)	Zn		Cd		Pb		Cu	
	$I_{pico}^{média}$	DP	$I_{pico}^{média}$	DP	$I_{pico}^{média}$	DP	$I_{pico}^{média}$	DP
	(μA)							
0	1,37	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,92	0,15
200	1,53	0,13	1,31	0,07	1,64	0,03	3,86	0,13
400	1,75	0,02	3,57	0,19	3,82	0,02	5,69	0,08
600	1,90	0,16	5,28	0,42	6,31	0,18	7,50	0,13
800	2,34	0,34	5,90	0,68	8,70	0,21	9,07	0,31

Como pode ser observado na Figura 34, os sinais de corrente de pico associados ao Cd e Pb não foram detectados, porém, suas curvas de adição de analito estão disponíveis na Figura 35b e c, respectivamente. A curva de

adição de analito do Zn e Cu estão apresentadas na Figura 35a e d, respectivamente.

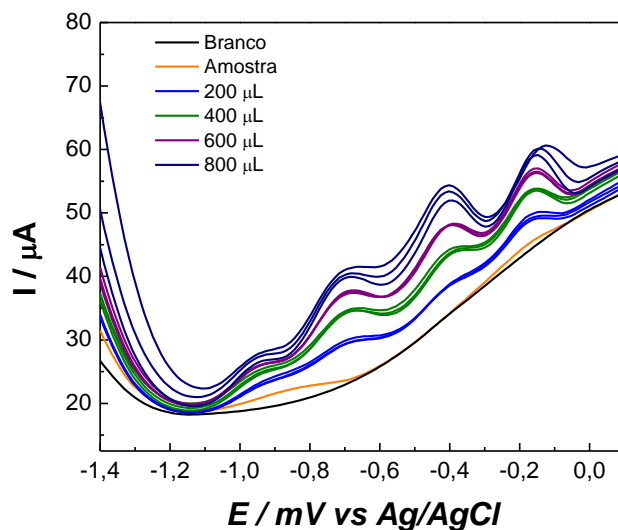
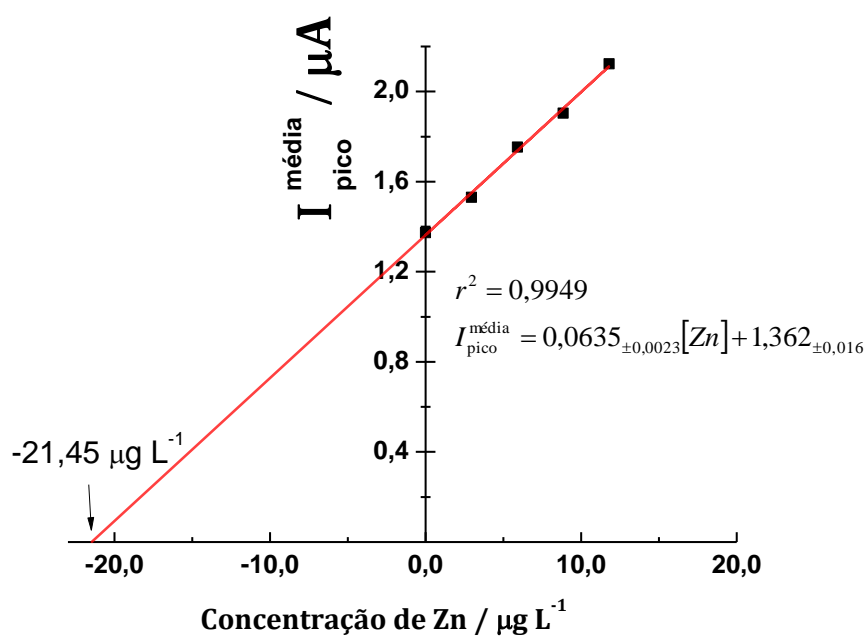
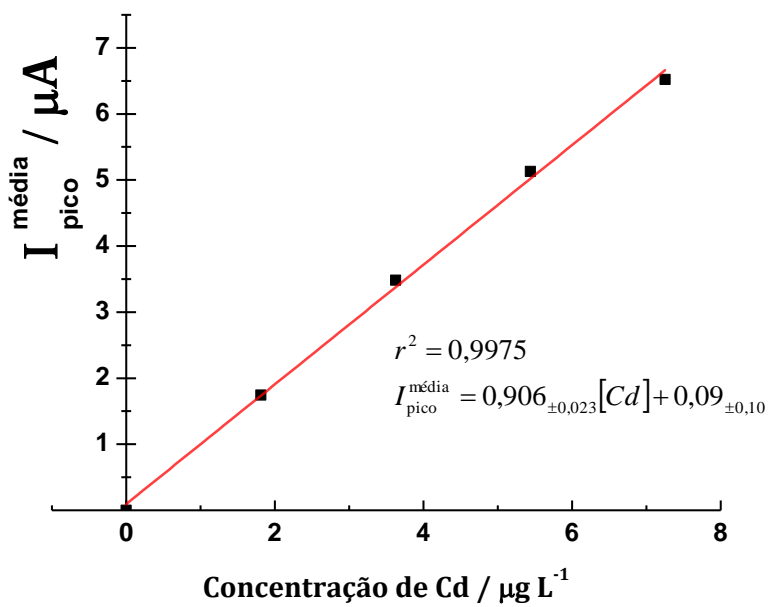


Figura 34. Voltamograma obtido pela SWASV da amostra de água de coco industrializada IA em eletrólito suporte tampão acetato de sódio *pH* 4,7. Fator de diluição: 4 vezes.

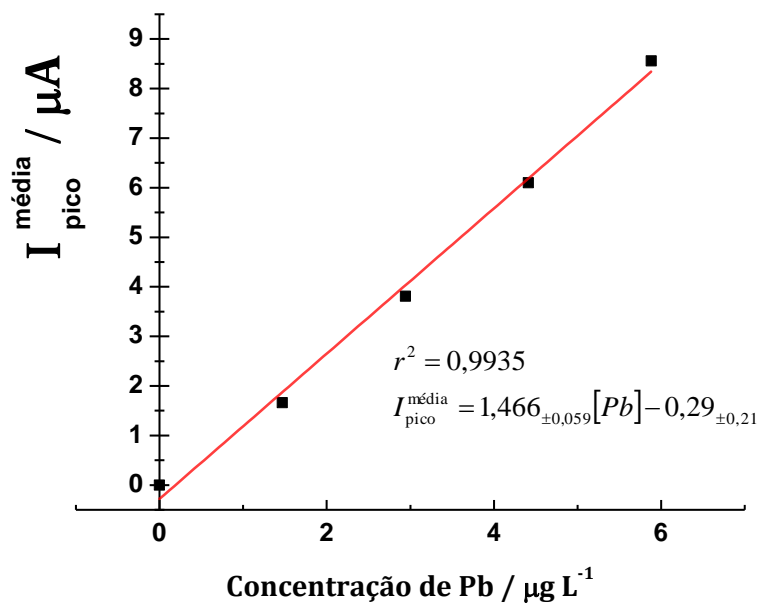
a)



b)



c)



d)

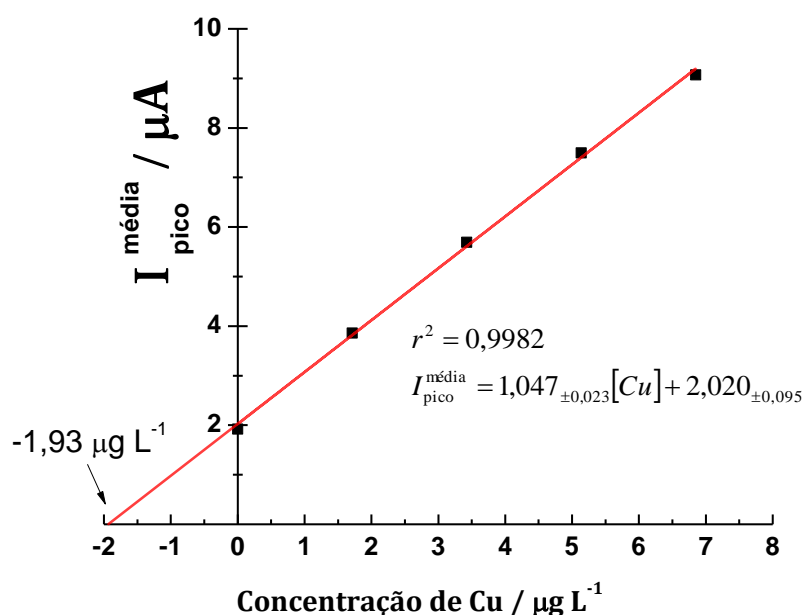


Figura 35. Curva de adição de padrão de (a) zinco; (b) cádmio; (c) chumbo e (d) cobre para a amostra IA (industrializada).

Todas as curvas citadas anteriormente tiveram $r^2 > 0,99$, indicando boa linearidade nesta faixa de trabalho.

Para a expressão final das concentrações de Zn e Cu da Tabela 25, o fator de diluição (5,00 mL da amostra para 20,0 mL da célula eletroquímica) foi considerado.

Tabela 25. Determinação livre usando SWASV e total usando ICP OES em água de coco industrializada (IA).

Analitos	Concentração SWASV	Concentração ICP OES
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Zn	$85,8 \pm 4,2$	230 ± 2
Cd	$< 16,8$	$< 1,3$
Pb	< 12	< 8
Cu	$7,7 \pm 0,6$	$5,0 \pm 0,5$

Por outro lado, as duas principais técnicas espectrométricas usadas para a análise **total** de micronutrientes metálicos em água de coco, já reportadas na literatura, são: GF AAS¹⁴ e o ICP OES^{12,37}. Ambas as técnicas fornecem energia térmica suficiente para degradar a amostra de maneira a atomizar (GF AAS) ou atomizar/ionizar (ICP OES) todo o analito presente. Desta forma, a

concentração de Zn encontrados por SWASV são inferiores os da técnica de ICP OES. Além disso, o valor de concentração para o Cu obtido por ICP OES é menor que o seu $LQ_{ICP\ OES}$ ($8,6\ \mu g\ L^{-1}$). Logo, este resultado é uma estimativa da concentração não representando, portanto, a concentração real. Então, é razoável presumir que as duas concentrações para Cu são próximas e parte dos analitos encontram-se de fato ligados a compostos não eletroativos para a SWASV.^{14,39}

Visando determinar a concentração de Zn, Cd, Pb e Cu total, igualmente obtido pela técnica de ICP OES, usando voltametria, uma digestão similar à proposta pelos autores Munoz *et al.* (2007)¹⁴ foi aplicada na amostra de água de coco (que será citada no item 4.9 na página 107).

A eficiência dessa digestão foi avaliada de maneira indireta pela concentração de zinco disponível após a digestão, aplicando a DPASV e o eletrodo de mercúrio HMDE. Esse modo de eletrodo de gota pendente é o que mais se assemelha (dentre os modos DME, SMDE e HMDE, disponíveis pelo analisador voltamétrico) ao eletrodo FME usado pelos autores. Além disso, o uso do HMDE e DPASV é relativamente rápido por ser totalmente automatizado. A renovação de cada gota com boa reprodutibilidade superficial facilita a determinação de vários analitos.

A literatura reporta inúmeros trabalhos que aplicaram essa técnica em diferentes tipos de matrizes. Por fim, três fatores motivaram a otimização da DPASV, a saber: (i) usá-la na avaliação da eficiência da digestão; (ii) servir como método voltamétrico comparativo com a SWASV empregando o eletrodo DDB; (iii) e servir como sugestão de aula prática para a disciplina de análise instrumental ministrada nesta universidade.

4.8 Planejamento Experimental da DPASV usando eletrodo de mercúrio

Como foi visto anteriormente, a DPASV é uma técnica voltamétrica similar a SWASV, no tocante à análise por redissolução anódica. Porém, as suas variáveis experimentais da etapa de varredura são diferentes. Nessa perspectiva, alguns trabalhos citados na literatura auxiliaram na escolha das variáveis que mais influenciam a corrente de pico obtida por essa técnica. Yüce

et al. (2011)²¹, por exemplo, realizaram experimentos de DPASV variando o potencial (E_{dep}) e tempo (t_{dep}) de pré-concentração para determinação de Pb.

Usando essa mesma técnica voltamétrica, Opoka *et al.* (2011)¹⁰⁰ estudaram a significância da amplitude (ΔE_p) e o tempo de aplicação dos pulsos (t_p) para determinação de Zn e Cu em suco e mucosa gástrica de ratos. Além disso, Ugo *et al.* (1997)¹⁶ relataram que a velocidade de varredura é, também, uma variável importante para a DPASV. Essa velocidade depende do incremento de potencial (ΔE_s) e do tempo de incremento de potencial (Δt_s).

Desta forma, as seis variáveis, ΔE_s , ΔE_p , t_{pulso} , Δt_s , E_{dep} e t_{dep} foram submetidas a um planejamento fatorial completo ($2^6 = 64$) para explorar as variáveis que mais influenciam na DPASV. Esse planejamento é válido uma vez que, 6 variáveis gerariam muitos experimentos na etapa do planejamento CCD, aplicado na sequência. Por outro lado, o uso do DPASV e HMDE é totalmente automatizado e não consome a solução da célula eletroquímica. Por isso, se realizou o planejamento fatorial completo e não apenas o fracionado. Na prática, a realização dos 64 experimentos exigiu um pouco mais que 2 horas. Todas as correntes de pico do zinco dessa etapa estão na Tabela 26.

Tabela 26. Corrente de pico (I_{pico}) de Zn para cada experimento (*Exp.*) obtido pela matriz do planejamento fatorial completo.

<i>Exp.</i>	I_{pico}	<i>Exp.</i>	I_{pico}	<i>Exp.</i>	I_{pico}	<i>Exp.</i>	I_{pico}
	nA		nA		nA		nA
1	4,53	17	5,76	33	3,42	49	2,40
2	4,54	18	5,86	34	1,77	50	2,07
3	16,90	19	21,30	35	4,57	51	9,20
4	18,80	20	21,70	36	5,31	52	8,00
5	15,10	21	20,60	37	9,69	53	12,90
6	15,20	22	22,90	38	10,20	54	14,00
7	57,90	23	74,40	39	28,40	55	46,40
8	67,20	24	84,70	40	31,70	56	53,90
9	3,34	25	4,52	41	1,61	57	2,23
10	3,89	26	5,28	42	2,02	58	2,69
11	13,70	27	15,90	43	8,08	59	7,63
12	16,10	28	17,50	44	6,25	60	10,10
13	7,77	29	11,60	45	7,38	61	12,30
14	8,05	30	12,70	46	7,95	62	10,50
15	36,50	31	42,70	47	26,20	63	38,60
16	40,60	32	56,00	48	24,50	64	44,60

O resultado do planejamento fatorial completo pode ser melhor interpretado com o auxílio do diagrama de Pareto (Figura 36) o qual denota a significância de cada variável na resposta de corrente de pico do zinco.

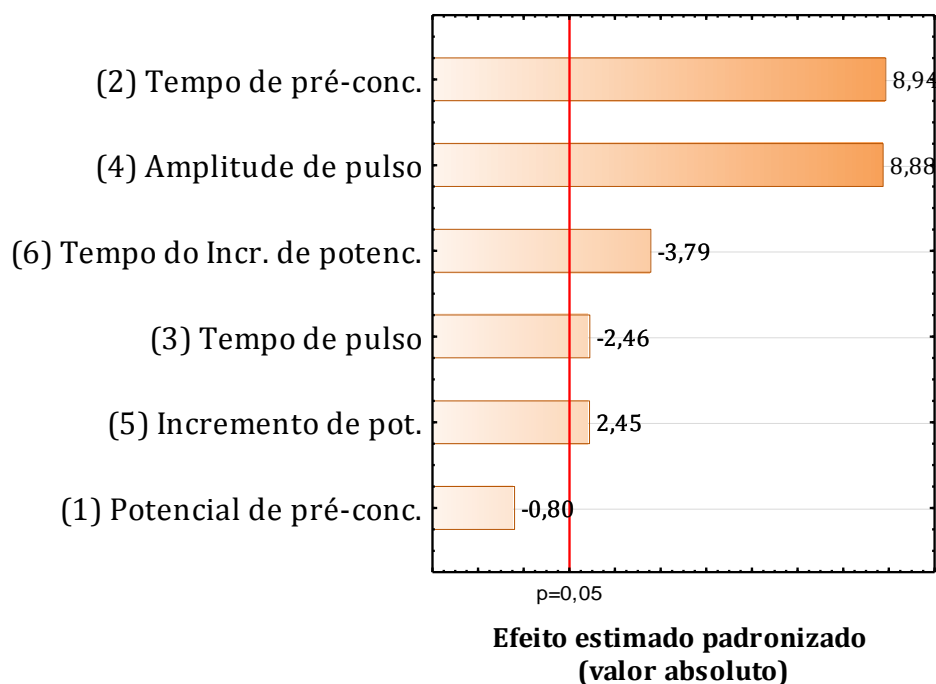


Figura 36. Diagrama de Pareto resultante do planejamento fatorial completo 2^6 (sem interações) das variáveis da DPASV.

A partir desse gráfico pode-se observar que os parâmetros à esquerda da linha de $p = 0,05$ (que delimita o limite de confiança de 95 %) não tem efeitos significativos para a técnica. Por outro lado, aqueles que assumirem maiores valores, em módulo, são estatisticamente significativos.⁹² Desta maneira, observa-se que o potencial de pré-concentração pode ser negligenciado dentro do intervalo estudado. Portanto, essa variável será fixada em -1200 mV para os experimentos seguintes.

As outras cinco variáveis devem ter seus efeitos interpretados da mesma forma. O tempo de pré-concentração, amplitude de pulso e incremento de potencial tem um efeito positivo sobre a técnica, enquanto o tempo do incremento de potencial e tempo de pulso, um efeito negativo. Contudo, podemos destacar que o tempo de pré-concentração, a amplitude de pulso e o tempo do incremento de potencial assumem os maiores efeitos na DPASV.

As variáveis incremento de potencial e o tempo de pulso devem ser fixados para aplicar o planejamento CCD nas 3 variáveis mais significativas. O efeito do incremento de potencial é positivo ao passo que o tempo de pulso é negativo. Por consequência, serão utilizados os valores dentro do domínio experimental trabalhado, 6 mV (máximo) e $0,02\text{ s}$ (mínimo), respectivamente.

As três variáveis tempo de pré-concentração (t_{dep}), amplitude de pulso (ΔE_p) e o tempo de incremento do potencial (Δt_s) foram otimizadas aplicando o planejamento CCD com três pontos centrais, totalizando 17 experimentos. Os valores das variáveis codificadas e os experimentos realizados encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27. Matriz do planejamento CCD para três variáveis e a corrente de pico de Zn de cada experimento da DPASV.

Exp.	Tempo de pré-concentração		Amplitude de pulso		Tempo de incremento de potencial		I_{pico} (nA)	
	(s)		(mV)		(mV)			
1	48,24	(-1)	28,1	(-1)	0,18	(-1)	10,20	
2	101,76	(+1)	28,1	(-1)	0,18	(-1)	21,10	
3	48,24	(-1)	51,9	(+1)	0,18	(-1)	20,10	
4	101,76	(+1)	51,9	(+1)	0,18	(-1)	40,10	Planej. Fatorial
5	48,24	(-1)	28,1	(-1)	0,42	(+1)	7,54	
6	101,76	(+1)	28,1	(-1)	0,42	(+1)	14,80	
7	48,24	(-1)	51,9	(+1)	0,42	(+1)	15,70	
8	101,76	(+1)	51,9	(+1)	0,42	(+1)	31,70	
9	75,00	(0)	40	(0)	0,3	(0)	16,60	Ponto Central
10	75,00	(0)	40	(0)	0,3	(0)	17,50	Repetições do Ponto Central
11	75,00	(0)	40	(0)	0,3	(0)	17,80	
12	30,00	(-1,68)	40	(0)	0,3	(0)	5,65	
13	120,00	(+1,68)	40	(0)	0,3	(0)	27,70	
14	75,00	(0)	20	(-1,68)	0,3	(0)	6,67	Pontos Axiais
15	75,00	(0)	60	(+1,68)	0,3	(0)	26,00	
16	75,00	(0)	40	(0)	0,1	(-1,68)	21,60	
17	75,00	(0)	40	(0)	0,5	(+1,68)	12,80	

Os valores entre parentes correspondem ao valor codificado.

A aplicação do modelo quadrático gerou coeficientes quadráticos estatisticamente nulos a 95 % de confiança. Por isso, o modelo matemático **linear** foi usado. A Equação 8 relaciona as variáveis t_{dep} , ΔE_p e Δt_s com a corrente de pico em nA para o Zn.

$$\begin{aligned}
 Y = & 18,35_{\pm 0,51} + 13,36_{\pm 1,18} (t_{dep}) + 12,66_{\pm 1,18} (\Delta E_p) \\
 & - 5,37_{\pm 1,19} (\Delta t_s) + 4,46_{\pm 1,54} (t_{dep} \Delta E_p) \\
 & - 1,91_{\pm 1,54} (t_{dep} \Delta t_s) - 0,96_{\pm 1,54} (\Delta E_p \Delta t_s)
 \end{aligned}
 \tag{Equação 8}$$

onde que t_{dep} é o tempo de pré-concentração, ΔE_p é o amplitude de pulso e Δt_s é o tempo do incremento de potencial.

O modelo linear foi aplicado e validado com o auxílio da ANOVA, na Tabela 28.

Tabela 28. ANOVA e validação do modelo matemático linear para a DPASV.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}^{95\%}$
Regressão	1304	6	217,31	$\frac{MQR}{MQr} = 43,56$	$F_{6,10} = 3,22$
Resíduo	49,9	10	4,99		
Falta de Ajuste	47,07	8	5,88	$\frac{MQF_{ajuste}}{MQ_{err. Puro}} = 10,25$	$F_{8,2} = 19,37$
Erro Puro	1,147	2	0,57		
Total	1354	16			

Varição Explicada = **96,13 %**

Máxima de Variação Explicável = **99,91 %**

A partir da ANOVA, verifica-se que o modelo gerado é estatisticamente significativo, visto que o F calculado da regressão (43,56) é maior que o F tabelado (3,22) a um nível de confiança de 95 %, e 6 e 10 graus de liberdade. Além disso, podemos também avaliar que o modelo quadrático aplicado está significativamente ajustado, pois o F calculado do erro puro (10,25) é menor que o F tabelado (19,37) a um nível de confiança de 95 %, e 8 e 2 graus de liberdade.^{92,94}

Por fim, o uso da RSM (Figura 30) auxiliou na escolha das variáveis para a DPASV.

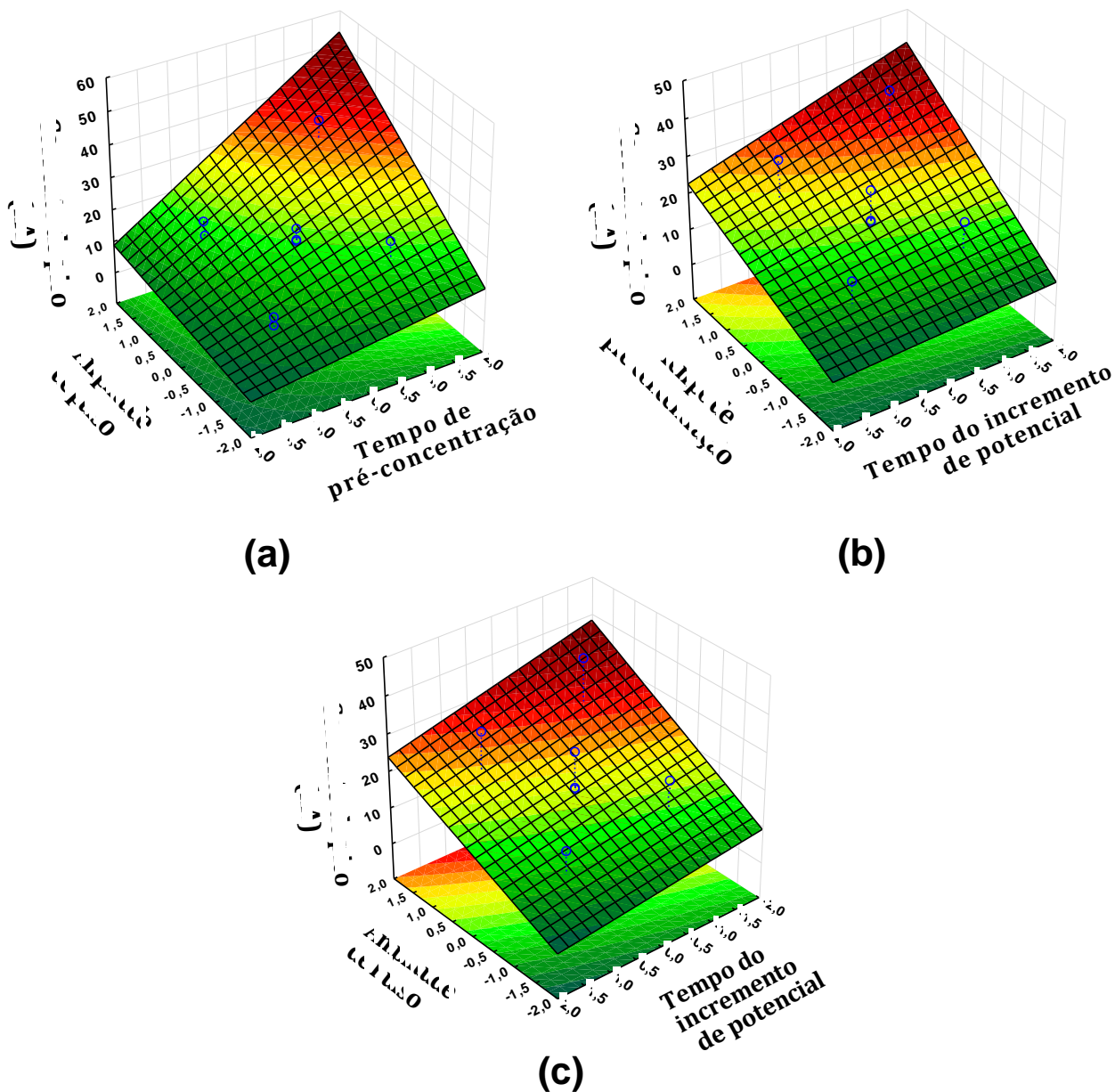


Figura 37. Curva de nível obtida entre (a) amplitude de pulso e pré-concentração, (b) tempo de pré-concentração e tempo do incremento de potencial e (c) amplitude de pulso e tempo do incremento de potencial.

Um ajuste linear não possui pontos críticos. No entanto, é possível explorar o comportamento da corrente de pico do zinco com as três variáveis: tempo de pré-concentração, tempo do incremento de potencial e amplitude de pulso.

Nessa perspectiva, as curvas de nível da Figura 37a e b exibem um aumento na corrente de pico quando se aplica tempos maiores para a

deposição. Logo, é razoável o uso de maiores valores para essa variável. Porém, tempos elevados de pré-concentração geram análises demoradas. Logo, essa variável poderá ser ajustada, quando necessário, objetivando uma maior sensibilidade para a DPASV na determinação de zinco na solução digerida.

A superfície de resposta da Figura 37c apresenta um aumento da corrente de pico do zinco com o aumento da amplitude de pulso e menores valores do tempo de incremento de potencial. Conseqüentemente, os valores para estas variáveis serão correspondentes aos seus níveis do domínio $+\alpha$ (6 mV) e $-\alpha$ (0,1 s), respectivamente. Na Tabela 29, encontram-se os valores experimentais escolhidos para as a determinação de zinco em água de coco digerida usando DPASV.

Tabela 29. Valores das variáveis usadas para os experimentos eletroquímicos.

Variáveis	Valores Experimentais
Potencial de pré-concentração (mV)	-1200
Tempo de pré-concentração (s)	60
Amplitude de Pulso (mV)	60
Tempo de Pulso (s)	0,02
Incremento de Pontencial (mV)	6
Tempo do incremento de potencial (s)	0,1

O modelo linear obtido (Equação 8) denota características matemáticas e estatísticas, as quais auxiliam nas interpretações químicas sobre a técnica voltamétrica DPASV. A principal delas é que os coeficientes que multiplicam os pares de variáveis (interações) são baixos em relação aos coeficientes linear de cada uma das três variáveis sozinhas. As duas interações com maiores coeficientes são: $(t_{dep} \Delta E_p)$ e $(t_{dep} \Delta t_s)$. Ambas possuem o tempo de pré-concentração (t_{dep}) como fator da multiplicação. Essa variável é a que mais afeta a DPASV por ter o maior coeficiente linear ($13,36_{\pm 1,18} t_{dep}$). Por outro lado, a terceira interação apresentada na equação, $(\Delta E_p \Delta t_s)$, possui um coeficiente estatisticamente nulo, com 95 % confiança. Os dois principais efeitos obtidos pelo gráfico de Pareto (Figura 36) possuem seus valores próximos, 8,94 e 8,88 que são, respectivamente, os efeitos do tempo de pré-

concentração e da amplitude de pulso. No entanto, a interação dessas duas variáveis é desprezível diante das 3 principais variáveis, t_{dep} , ΔE_p , Δt_s .

Desta forma, podemos inferir que, para as técnicas voltamétricas de redissolução anódica, a etapa de pré-concentração independe da etapa de varredura. Logo, a pré-concentração pode ser otimizada separadamente da etapa de varredura, seja por DP ou SWV.

Para o eletrodo de DDB, que exige um tratamento eletroquímico entre medidas, é vantajoso realizar essa otimização por etapas, em dias diferentes. Um experimento usando SWASV e eletrodo DDB, por exemplo, tem duração mínima de 12 minutos (limpeza/ativação do DDB, pré-concentração, etc.). Logo, numa triagem conjunta das 6 variáveis da SWASV (como realizado para a DPASV), o tempo total estimado seria inviável 13 horas, apenas para uma triagem. Por outro lado, a ideia da otimização multivariada é a máxima informação estatística obtida de um experimento de maneira rápida com o mínimo de experimentos possível.

4.9 Digestão da água de coco assistida por ultrassom

Com o objetivo de obter a concentração total dos analitos, a Figura 38 mostra um esquema com as quatro principais etapas da metodologia de digestão de água de coco proposta por Munoz *et al.* (2007)¹⁴ com pequenas modificações.

Na primeira etapa, são adicionados 1,0 mL da amostra e 2 mL de uma composição de diferentes proporções de H₂O₂ 30% (v/v) e HCl_{conc.} ao tubo. A mistura é submetida à energia do US por 15 minutos com o tubo fechado.



Figura 38. Esquema da digestão da água de coco assistida por ultrassom para análises voltamétricas.

A literatura reporta que o banho ultrassônico apresenta perdas expressivas na potência do US com o passar do tempo. Além disso, a distribuição de energia dentro do banho de ultrassom não é uniforme. Nesse sentido, apenas as proximidades da fonte geradora do US experimentam a cavitação. Este fenômeno fornece energia suficiente para a formação de inúmeros compostos reativos os quais auxiliam na decomposição da amostra de água de coco.⁸⁴⁻⁸⁶ Para minimizar esses impasses, os tubos foram posicionados no centro do ultrassom (acima da fonte de US do banho).

Em seguida, os tubos, ainda fechados, são colocados em banho-maria (100 °C) por 8 minutos. Durante essa etapa, a pressão interna aumenta consideravelmente devido a formação de gás oxigênio e o aumento da pressão de vapor da água.

A abertura dos tubos ainda em banho-maria é realizada para eliminar o peróxido de hidrogênio, que é indesejável para a voltametria. A sua taxa de decomposição aumenta aproximadamente 2,5 vezes para cada 10 °C de incremento na temperatura.¹¹²

Na terceira etapa, os autores propõem a neutralização do excesso de ácido clorídrico, após a digestão, com solução de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} seguido da adição de tampão acetato $pH 4,7$. Neste trabalho, para minimizar a adição de reagentes, o ácido clorídrico foi neutralizado com acetato de sódio

$1,7 \text{ mol L}^{-1}$ até o $\text{pH } 4,7$. O tampão acetato de sódio tem sua máxima capacidade tamponante neste pH e este, por sua vez, quando muito baixo, favorece o desprendimento de gás hidrogênio durante a etapa de pré-concentração.^{25,40}

A concentração do eletrólito suporte tampão acetato de sódio ($\text{pH } 4,7$) após a titulação, não é igual a concentração otimizada de $0,206 \text{ mol L}^{-1}$. Em linhas gerais, a concentração calculada a partir dos volumes gastos da base conjugada acetato de sódio $1,7 \text{ mol L}^{-1}$ está entre $0,2$ a $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Esta faixa de concentração está compreendida no domínio experimental estudado para a SWASV.

A formação do tampão *in situ* favorece o uso de digestões ácidas para determinações voltamétricas. O tampão é formado a partir da adição da base fraca conjugada até o pH desejado com maior rigor.

Tyszczyk *et al.* (2007)¹¹³ estudaram a interferência da formação dos complexos intermetálicos Cu-Zn em eletrodo de filme de mercúrio e observaram que Zn é determinado com exatidão quando sua concentração é superior a 10 vezes a concentração de Cu. A amostra NC analisada por ICP OES apresentou concentração de Cu menor que $2,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e concentração de Zn igual a $(203 \pm 1) \mu\text{g L}^{-1}$. Caso a interferência de Cu na presença de Zn também ocorra para o eletrodo de DDB, será possível determinar Zn com exatidão, uma vez que sua concentração é no mínimo 80 vezes superior a concentração de Cu.

Por último a eficiência da digestão é verificada por DPASV. Esta metodologia foi ajustada com os valores das variáveis disponíveis na Tabela 29 para a determinação de Zn livre, por proporcionar resultados mais rápidos para a avaliação da eficiência da digestão realizada. Caso a digestão seja eficiente, a disponibilização de Zn, Cd, Pb e Cu serão próximas aos obtidos por ICP OES.

A ideia inicial foi determinar a concentração de zinco livres após as digestões oriunda das diferentes proporções volumétrica de H_2O_2 30% *v/v* : HCl 37% *m/v* oriundos da matriz do planejamento CCD. No entanto, vários

experimentos não foram conclusivos por falta de repetitividade dos voltamogramas e por ocorrer sobreposições dos picos de corrente. Por outro lado, as determinações bem-sucedidas geraram concentrações de zinco superiores (132%) as obtidas por ICP OES, para a mesma amostra, $203 \pm 1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os volumes de peróxido de hidrogênio variaram a cada experimento (de acordo com a matriz do planejamento CCD). Nesse sentido, o tempo para eliminar o peróxido de hidrogênio remanescente em banho-maria ($100\text{ }^\circ\text{C}$) deveria ser proporcional ao seu respectivo volume adicionado. No entanto, esse procedimento não foi realizado e pode justificar os valores elevados para a concentração do zinco.

O peróxido de hidrogênio se decompõe formando oxigênio dissolvido o qual pode ser reduzido eletroquimicamente produzindo duas ondas no voltamograma (Figura 39), a mais intensa delas é incidente no potencial de -1000 mV , o mesmo que o potencial de meia onda do zinco ($E_{1/2} = -980\text{ mV}$). Por esse motivo, os sinais do zinco são mascarados e, conseqüentemente, obtêm-se valores superiores aos encontrados por ICP OES. Não suficiente, o peróxido de hidrogênio pode reagir com diversas substâncias, inclusive, oxidar o analito eletrodepositado antes que se realize a varredura por pulso diferencial. A purga com gás nitrogênio durante 5 a 10 minutos é suficiente para eliminar o oxigênio atmosférico dissolvido, que está na faixa de 8 mg L^{-1} a $25\text{ }^\circ\text{C}$, mas não decompõe totalmente o peróxido de hidrogênio, remanescente, para eliminá-lo completamente da célula eletroquímica.⁴²

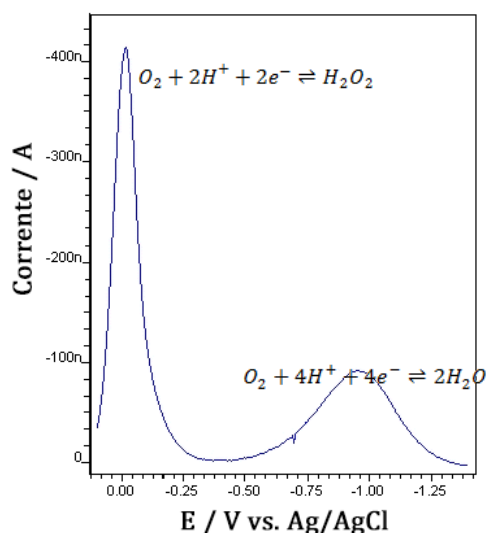


Figura 39. Comportamento da DPASV em solução contendo oxigênio dissolvido em nitrato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Adaptado: Henze (2004)⁴²

Antes da eliminação do peróxido de hidrogênio com os tubos abertos, todas as soluções dos experimentos assumem o aspecto transparente e incolor. No entanto, o aparecimento de uma solução de coloração amarelada para as soluções com menor porção de peróxido de hidrogênio é observada gradativamente com o passar do tempo de aquecimento. A pouca quantidade de peróxido de hidrogênio proporciona uma digestão insuficiente com quantidades ainda expressivas de moléculas orgânicas, principalmente os carboidratos. A presença de carboidratos durante a etapa de eliminação de peróxido de hidrogênio com o tubo aberto favorece a reação de Maillard, que tem produtos de coloração amarela, observada na Figura 40.114

Entre os 11 polarogramas obtidos pela matriz do planejamento CCD, podemos destacar os três mais representativos em relação a proporção $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$, que são os experimentos: 7, ponto central e 3, visualizados na Figura 40a, b e c, respectivamente.

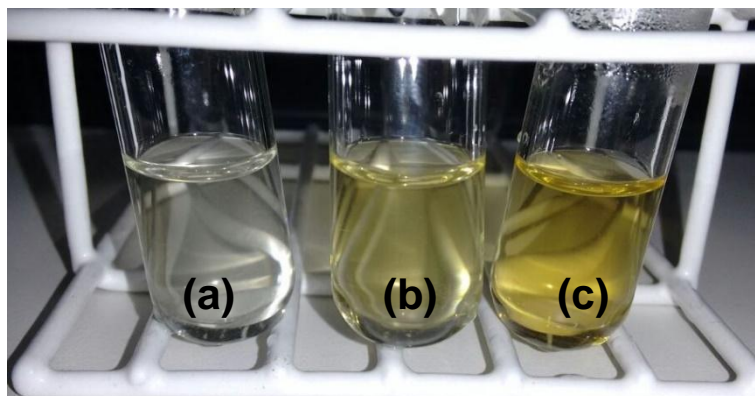


Figura 40. Solução digerida dos experimentos (a) 7, (b) ponto central e (c) 3.

A composição da solução digestora para os três experimentos, ilustrados acima, encontram-se na Tabela 30.

Tabela 30. Concentração de Zn determinada nos experimentos 2, 3, 7 e ponto central obtida por DPASV.

Experimento	Volumes		Coloração final	Concentração
	H_2O_2 30% (v/v) (mL)	$HCl_{conc.}$ (mL)		Zn ($\mu g L^{-1}$)
7	0,40	0,20	Figura 40a	356 ± 16
Ponto Central	0,40	0,40	Figura 40b	259 ± 8
3	0,26	0,54	Figura 40c	448 ± 42

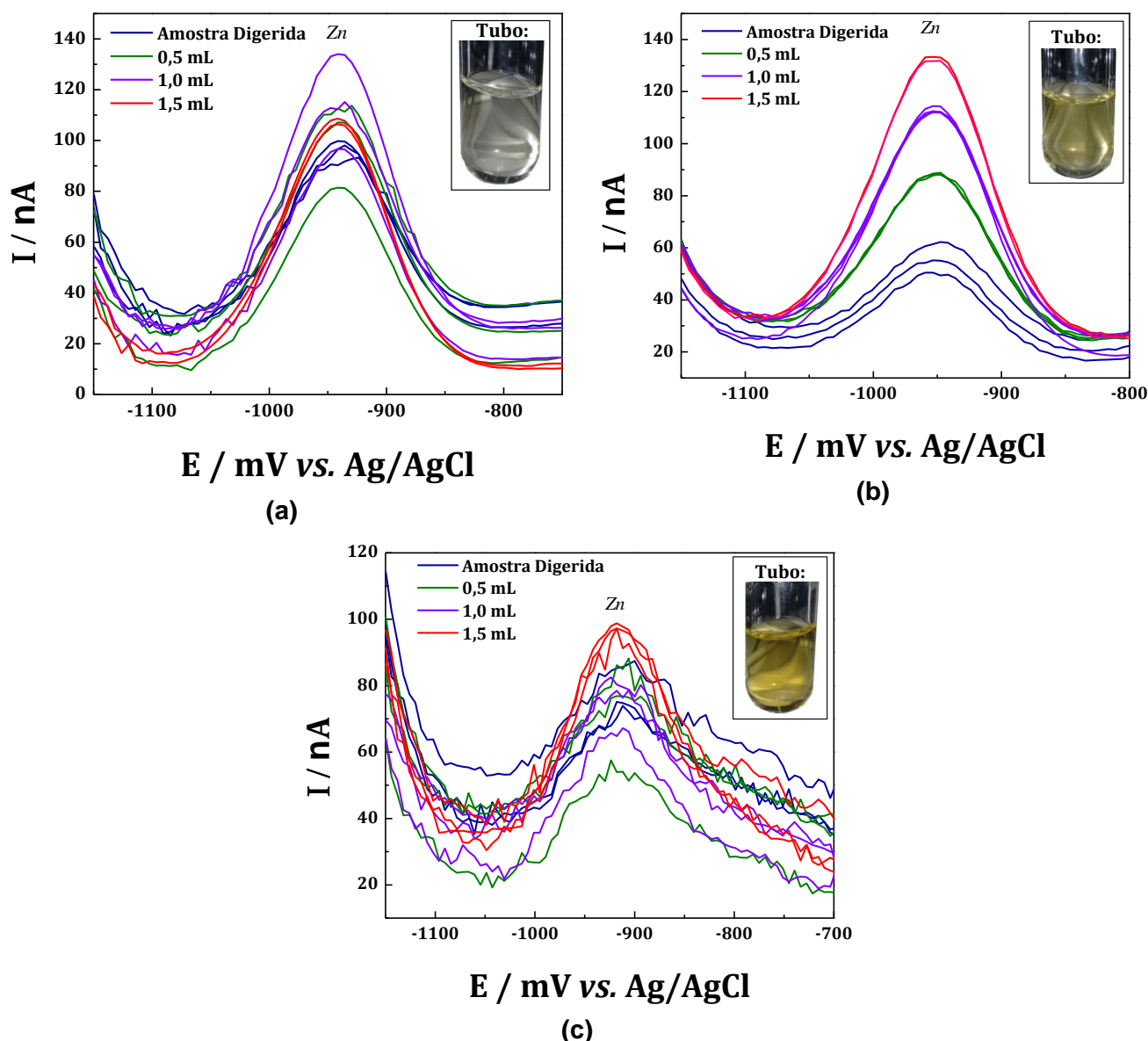


Figura 41. Polarogramas dos experimentos (a) 7, (b) ponto central e (c) 3 do planejamento CCD da digestão da amostra (**NC**). A imagem dos tubos para verificar a coloração da amostra encontra-se inseridas em cada gráfico. Os volumes nas legendas correspondem à adição da solução estoque intermediária de Zn $1,00 \text{ mg L}^{-1}$.

O polarograma da Figura 41c (Experimento 3) apresenta uma maior instabilidade nas leituras de corrente. Neste experimento, o volume de H_2O_2 30% (v/v) é a metade do volume de $HCl_{conc.}$, como apresentado na Tabela 30. Diante disso, acredita-se que a matéria orgânica não foi degradada suficientemente. Com isso, é razoável que a carga orgânica inicial tenha sido convertida em inúmeros compostos intermediários aumentando a interferência de matriz em comparação com os outros 2 experimentos destacados.

No que se refere à proporção volumétrica de H_2O_2 30% (v/v) e $HCl_{conc.}$, o experimento 7 (Figura 41a) possui o dobro do volume do peróxido de

hidrogênio em relação ao ácido e o ponto central (Figura 41b) igual volume desses dois reagentes.

Em linhas gerais, a eliminação incompleta de peróxido de hidrogênio pode interferir na concentração de zinco, obtendo valores superiores aos do ICP OES. Por outro lado, percebeu-se que maiores volumes de H_2O_2 30% (v/v) melhora a digestão por proporcionar uma baixa intensidade na coloração amarelada das soluções.

Desta forma, a maior proporção em volume para H_2O_2 30% (v/v) foi adotada. Porém, o processo para eliminá-lo deveria ser aprimorado. Para isso, alguns ensaios foram realizados adicionando-se bissulfito de sódio como agente redutor. No entanto, surgiram dois picos próximos ao potencial de -600 mV e -400 mV , como mostrado na Figura 42. Estes picos mascaram os picos de oxidação de chumbo e cádmio no voltamograma. Por esse motivo, o uso dessa ação foi rejeitado.

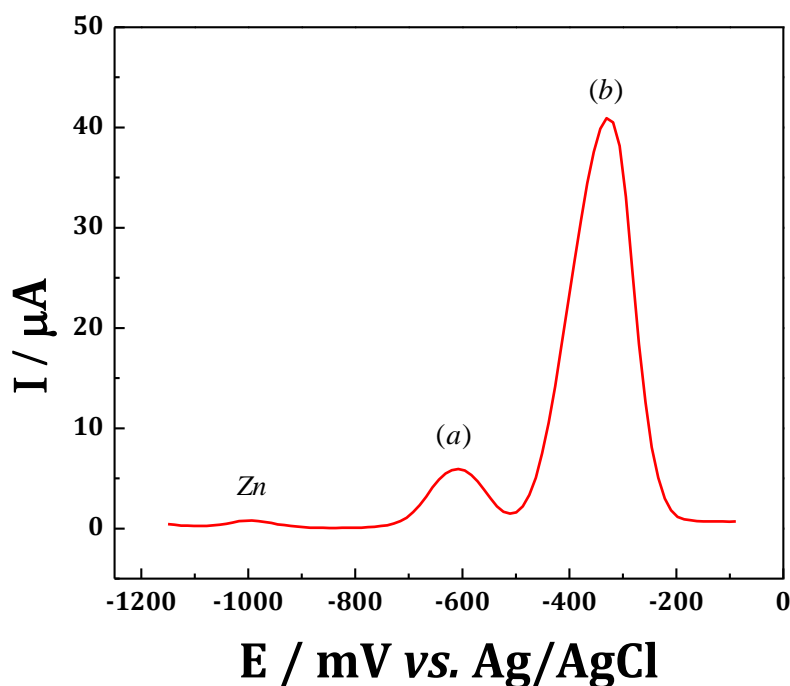


Figura 42. Varredura por DPASV de uma solução digerida após a adição de bissulfito de sódio. Destaque para o aparecimento dos picos (a) e (b).

Diante do exposto, decidiu-se que, após a abertura do tubo, este retornaria para o ultrassom por 10 segundos. Nesse curto intervalo de tempo, a

mistura aquecida em conjunto com o ultrassom gerou grande desprendimento de gás oxigênio. Por fim, o tubo aberto foi novamente aquecido em banho-maria por 8 minutos para garantir a total eliminação do peróxido de hidrogênio.

Após o procedimento supracitado, a repetitividade da digestão pode ser observada nas três curvas de adição de analito da Figura 43.

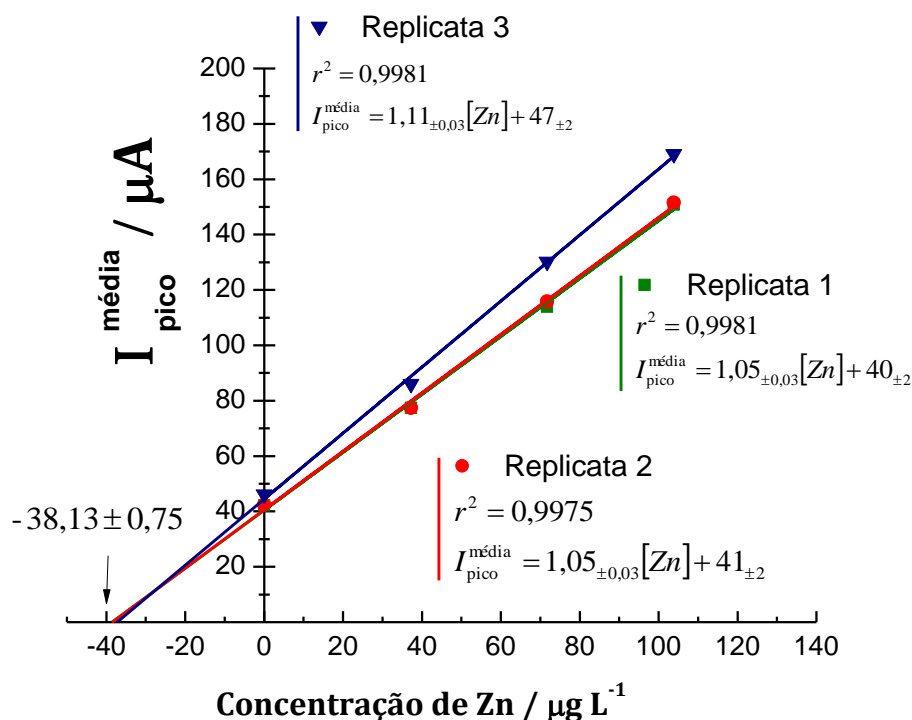


Figura 43. Curvas de adição de analito para determinação de Zn da (a) Replicata 1 (—), (b) Replicata 2 (—) e (c) Replicata 3 (—) na amostra **NC** digerida com 0,8 mL H₂O₂ 30% (v/v) e 0,6 mL de HCl_{conc}.

A curva de adição de analito para a terceira replicata não superpõe as outras duas. Neste caso, houve uma mudança na sensibilidade (coeficiente angular), porém, o seu resultado para a concentração de zinco está coerente com as replicatas 1 e 2. As concentrações das três determinações, considerando o fator de diluição igual a 7, estão disponíveis na Tabela 31.

Tabela 31. Concentração de Zn calculada na amostra NC em cada replicata aplicando 0,8 mL H₂O₂ 30% (v/v) e 0,6 mL de HCl_{conc.}

Replicata	Concentração de Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	267 \pm 21
2	268 \pm 15
3	265 \pm 16

Os valores para a concentração de zinco apresentado anteriormente são coerentes entre si, porém, ao compará-los com as concentrações de referência, obtidos por ICP OES ($[\text{Zn}] = 203 \pm 1 \mu\text{g L}^{-1}$), o *test t Student* rejeita a hipótese de igualdade das médias com 95 % de confiança. No entanto, estes foram os resultados mais próximos do esperado, por isso, a digestão foi definida na proporção de 1,00 mL de água de coco com 0,8 mL H₂O₂ 30 % (v/v) e 0,6 mL de HCl_{conc.}

4.10 Digestão assistida por Ultrassom para análise total por SWASV

O uso de um material de referência certificado com composição similar a matriz da água de coco (como o “*Mixed Food Diet*”, *High Purity Standards* usado por Souza *et al.*³⁷) proporcionaria uma validação analítica entre as duas técnicas, ICP OES e SWASV usando o eletrodo DDB. No entanto, na sua ausência, uma mesma amostra (NA) foi analisada por ambas as técnicas para uma verificação.

Na análise por ICP OES, o preparo da amostra (filtração e diluição) é mais simples se comparado com as condições da digestão assistida por ultrassom aplicado para a SWASV. Nesse sentido, deve-se tomar alguns cuidados, principalmente, quanto ao intervalo de tempo entre as duas análises. Isso porque as amostras de água de coco são perecíveis. O seu envelhecimento, ainda que sob refrigeração, altera principalmente a composição orgânica (por ação enzimática e microbiana), onde presume-se estar a fração não livre de Zn, Cd, Pb e Cu.

Desta forma, os estudos a seguir são preliminares para a aplicação de uma rotina usando adaptação do eletrodo de DDB, aparato de limpeza/ativação

do DDB, software para cálculo quantitativos e digestão assistida por ultrassom para a proposta da metodologia SWASV na determinação de metais traço.

A digestão definida anteriormente foi aplicada em amostras naturais de água de coco. Em seguida, dois procedimentos usando a SWASV foram aplicados à solução digerida. No primeiro, usou-se o procedimento otimizado nesse trabalho em eletrólito suporte tampão acetato de sódio *pH* 4,7. No segundo, aplica-se a SWASV com os mesmos valores das variáveis escolhidos, porém, em tampão amoniacal *pH* 8,0, proposto por Langeloth *et al.* (2010)²⁵.

4.10.1 Determinação de Zn e Cu por SWASV em *pH* 4,7

Os valores das variáveis da SWASV usadas para a determinação de Zn e Cu estão disponíveis na Tabela 32 para a aplicação na amostra digerida NA.

Tabela 32. Valores das variáveis da SWASV escolhidos para a determinação simultânea de Zn e Cu em água de coco em *pH* 4,7.

Variáveis	Valores
Concentração do Tampão (<i>C</i>)	0,153 mol L ⁻¹ ^(a)
<i>pH</i>	4,7
Incremento de Potencial (ΔE_s)	11,56 mV
Frequência (<i>f</i>)	100 Hz
Velocidade da onda quadrada ($f \times \Delta E_s$)	1156 mV s ⁻¹
Amplitude de Pulso (ΔE_p)	55 mV
Potencial de pré-concentração (E_{dep})	-1500 mV
Tempo de pré-concentração (t_{dep})	120 s
Janela eletroquímica de trabalho	-1350 mV a 0 mV

(a) Concentração estimada pelo volume gasto de acetato de sódio 1,7 mol L⁻¹.

Para todas as amostras, as concentrações de Cd e Pb, obtidas por ICP OES, foram menores que o $LD_{ICP\ OES}$. Este valor, por sua vez, é menor que o LD_{SWASV} . Isso corrobora com a ausências das correntes de pico para esses dois analitos, como mostra o voltamograma da Figura 44 para a amostra digerida (—). Por esse motivo, não foram realizadas as adições de analito para esses dois metais.

A limpeza/ativação automatizada do eletrodo de DDB realizado entre cada um dos voltamogramas da Figura 44 apresentou boa repetitividade auxiliando na determinação.

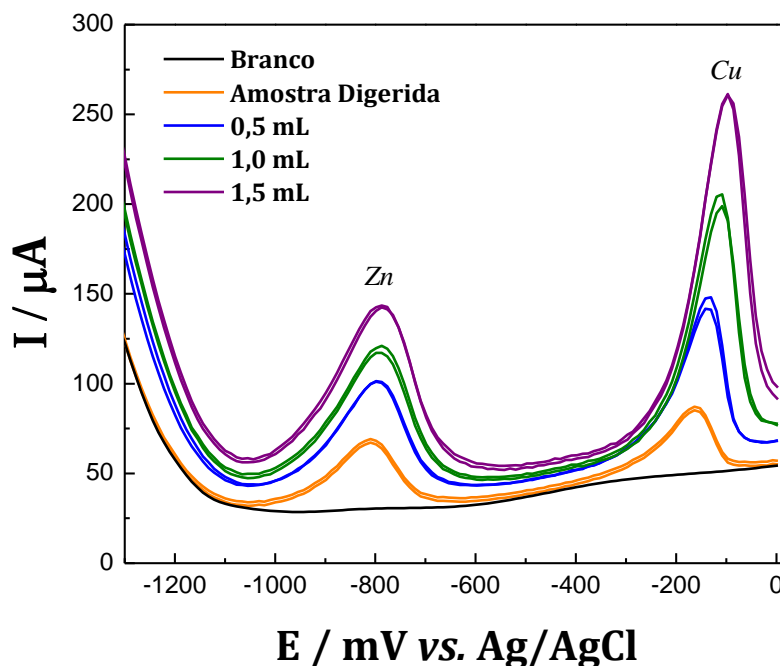
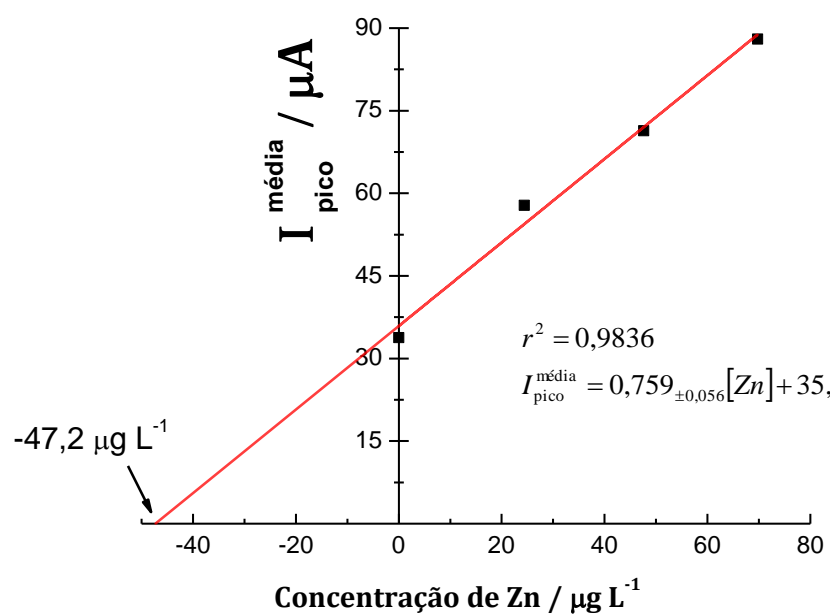


Figura 44. Voltamogramas da SWASV usando DDB aplicado a amostra digerida NA. Os volumes informados na legenda correspondem a solução intermediária de Zn e Cu, ambos $1,00 \text{ mg L}^{-1}$.

Os voltamogramas da Figura 44 foram obtidos a partir das adições de $500 \mu\text{L}$ da solução estoque intermediária $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e Cu. Suas curvas de adição do analito encontram-se na Figura 45a e b, respectivamente.

a)



b)

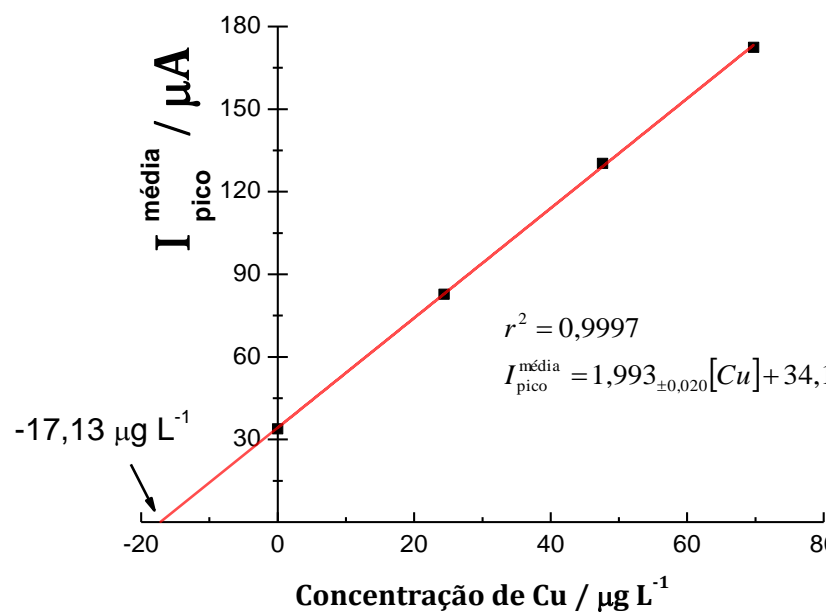


Figura 45. Curva de adição de analito do (a) Zn e (b) Cu sobre a amostra natural digerida NA. Fator de diluição: 20 vezes.

As concentrações de Zn e Cu considerando o fator de diluição de 20 vezes encontram-se na Tabela 33.

Tabela 33. Concentração de Zn e Cu para amostra NA após a digestão e os valores obtidos por ICP OES

Analitos	Concentração SWASV	Concentração ICP OES
	$(\mu\text{g L}^{-1})$	
Zn	944 ± 80	924 ± 60
Cu	343 ± 16	744 ± 40

As concentrações de Zn entre as duas técnicas estão coerentes. No entanto, a concentrações de Cu obtida por SWASV foi a metade da obtida por ICP OES. Quando esses metais estão presentes em concentrações elevadas, há uma tendência para a formação de um intermetálico Zn-Cu no eletrodo.¹¹⁵ Esses compostos intermetálicos, quando redissolvidos rapidamente pela SWV, podem ser retirados do eletrodo de trabalho sem que haja processo faradaico. Esse impasse tem sido solucionado adicionando sais de gálio (Ga^{2+}) que desestabiliza a ligação intermetálica de Zn e Cu.^{17,113}

4.10.2 Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu por SWASV em pH 8,0

Os valores das variáveis da SWASV usadas para a determinação de Zn e Cu estão disponíveis na Tabela 34 para a aplicação na amostra digerida NE em tampão amoniacal com pH 8,0.

Tabela 34. Valores das variáveis da SWASV escolhidos para a determinação simultânea de Zn e Cu em água de coco em pH 8,0.

Variáveis	Valores
Concentração do Tampão (C)	$0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (a)
pH	8,0
Incremento de Potencial (ΔE_s)	$11,56 \text{ mV}$
Frequência (f)	100 Hz
Velocidade da onda quadrada ($f \times \Delta E_s$)	1156 mV s^{-1}
Amplitude de Pulso (ΔE_p)	55 mV
Potencial de pré-concentração (E_{dep})	-1600 mV
Tempo de pré-concentração (t_{dep})	120 s
Janela eletroquímica de trabalho	$-1350 \text{ mV a } 100 \text{ mV}$

(a) Concentração estimada pelo volume gasto de $\text{NH}_3(aq)$ $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A aplicação da voltametria em eletrólitos com concentrações elevadas de NH_3 (aq) geram complexos com analitos Zn e Cu, geralmente, $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4^{+2}$ e $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{+2}$. A Figura 46 mostra os voltamogramas de adição de analito. Os potenciais de oxidação foram deslocados para valores mais negativos devido a formação dos complexos.¹¹⁶ Em pH 4,7 com tampão acetato, os potenciais de meia onda do Zn e Cu são próximos a -800 mV e -100 mV , respectivamente, como pode ser observado na Figura 44. Por outro lado, em pH 8,0 com tampão amoniacal (Figura 46), os potenciais de meia onda foram próximos a -1000 mV e -400 mV . Além disso, nesse eletrólito suporte há a formação de um segundo pico de cobre (Cu^b), próximo ao potencial 0 mV , que corresponde ao segundo potencial de eletrodo.⁴⁰

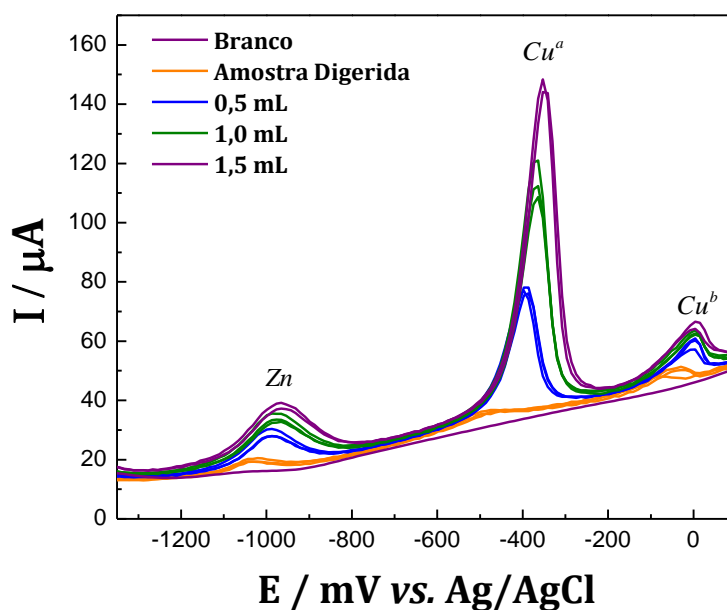
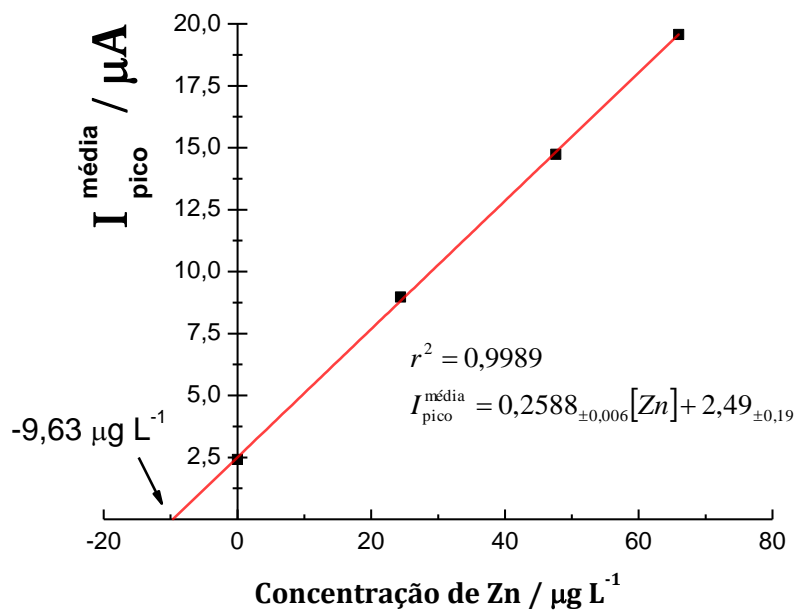


Figura 46. Voltamogramas da SWASV usando DDB aplicado a amostra digerida NE. Os volumes informados na legenda correspondem a solução intermediária de Zn e Cu, ambos $1,00 \text{ mg L}^{-1}$.

A partir das correntes de pico dos voltamogramas acima, construiu-se as curvas de adição de analito para Zn (Figura 47a) e Cu (Figura 47b).

a)



b)

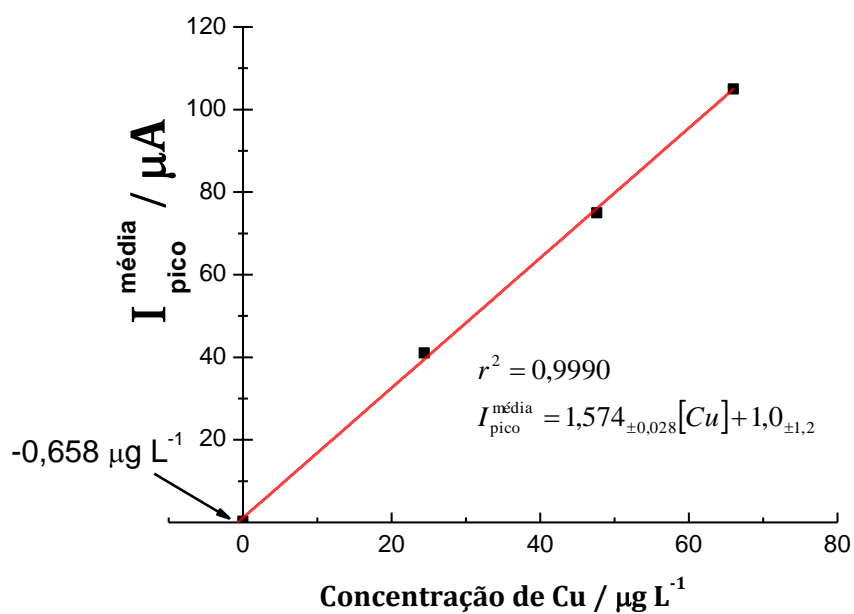


Figura 47. Curva de adição de analito do (a) Zn e (b) Cu^a sobre a amostra natural digerida NE. Fator de diluição: 20 vezes.

A concentração de Zn e Cu considerando o fator de diluição de 20 vezes encontram-se na Tabela 35.

Tabela 35. Concentração de Zn e Cu para amostra NE após a digestão e os valores obtidos por ICP OES.

Analitos	Concentração SWASV	Concentração ICP OES
	$(\mu\text{g L}^{-1})$	
Zn	193 ± 17	$184,4 \pm 0,7$
Cu	13 ± 3	< 13

A amostra NE foi escolhida para a aplicação do método SWASV em eletrólito suporte tampão amoniacal por possuir concentração de Cu inferior ao $LD_{ICP\ OES}$. No entanto, dado o menor LD_{SWASV} para o Cu, a concentração desse metal pôde ser determinada com valor igual a $13 \pm 3 \mu\text{g L}^{-1}$.

A concentração de Zn não apresentou diferença estatística em relação ao determinado por ICP OES (104%). Por outro lado, a concentração de Cu obtida por SWASV foi igual a $(13 \pm 3) \mu\text{g L}^{-1}$, valor este acima do LQ_{SWASV} . No entanto, a concentração obtida por ICP OES para a mesma amostra foi menor que $26 \mu\text{g L}^{-1}$ (*Fator de diluição* $\times LD_{ICP\ OES}$).

A estimativa do $LD_{ICP\ OES}$ é obtida estatisticamente aplicando $3s_b/m$, onde s_b é o desvio padrão para 10 observações do branco e m a inclinação da curva analítica. Porém, o $LQ_{ICP\ OES}$ é o parâmetro mais importante na prática. No caso do cobre, o valor de sua concentração está entre o $LD_{ICP\ OES}$ ($2,6 \mu\text{g L}^{-1}$) e o $LQ_{ICP\ OES}$ ($8,6 \mu\text{g L}^{-1}$). Por outro lado, para a técnica SWASV usando o eletrodo DDB, a concentração de Cu pôde ser determinada.

A concentração de Zn está coerente com a do ICP OES, considerando a incerteza calculada. Na prática, os LD's para a SWASV usando como eletrólito suporte tampão amoniacal pH 8,0 são ainda menores que em tampão acetato. A Figura 48 mostra a influência do tampão usado como eletrólito suporte na corrente de pico do zinco aplicando o eletrodo DDB ("10000 ppm") estudado por Langeloth *et al.* (2010)²⁵.

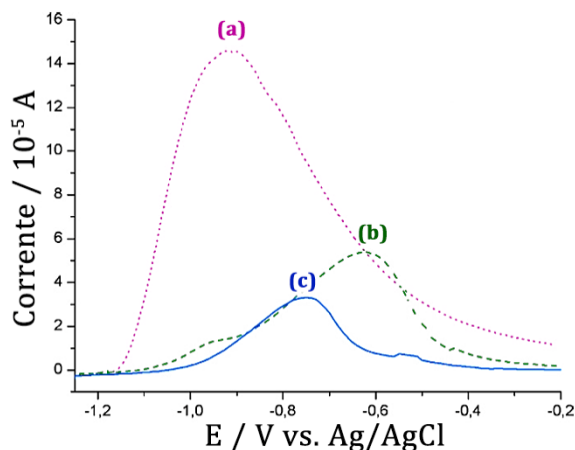
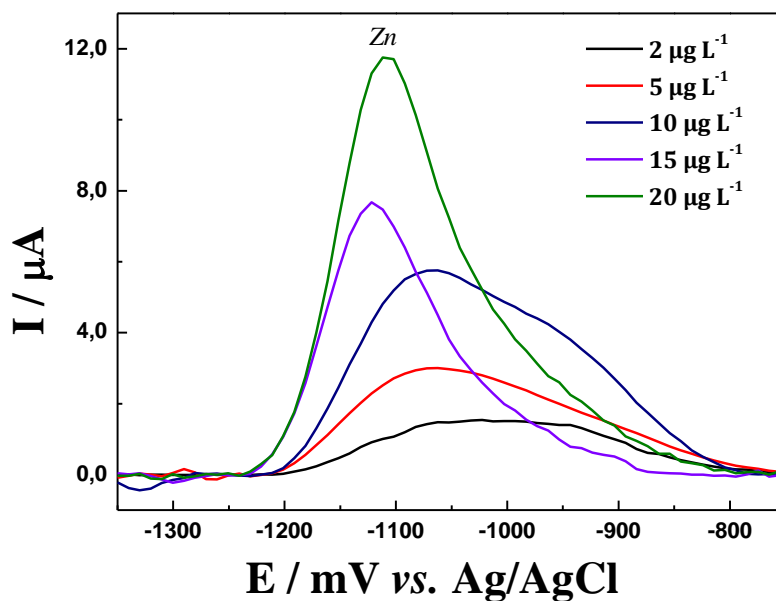


Figura 48. Influência da solução tampão na altura de pico com (a) amônia / amônio (pH 8,0) e $E_{dep} = -1600 \text{ mV}$ (b) ácido bórico / borato (pH 8,0) e $E_{dep} = -1600 \text{ mV}$ e (c) acetato (pH 5,5) e $E_{dep} = -1400 \text{ mV}$. Concentração de Zn = 1 mg L^{-1} . Adaptado: Langeloth *et al.* (2010)²⁵.

A maior sensibilidade é atribuída ao tampão amoniacal. O meio básico permite a aplicação de potenciais de deposição mais negativos ($E_{dep} = -1600 \text{ mV}$) se comparado com o tampão acetato ($E_{dep} = -1600 \text{ mV}$) com pH 5,5. Os autores reportam um LD para o Zn igual a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ em eletrólito suporte tampão amoniacal $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando DPASV. O LD calculado nesse trabalho foi obtido aplicando a SWASV utilizando as condições operacionais da Tabela 34. Os voltamogramas da Figura 49a geraram as correntes de pico para a construção da curva analítica da Figura 49b com boa linearidade ($r^2 = 0,9987$).

a)



b)

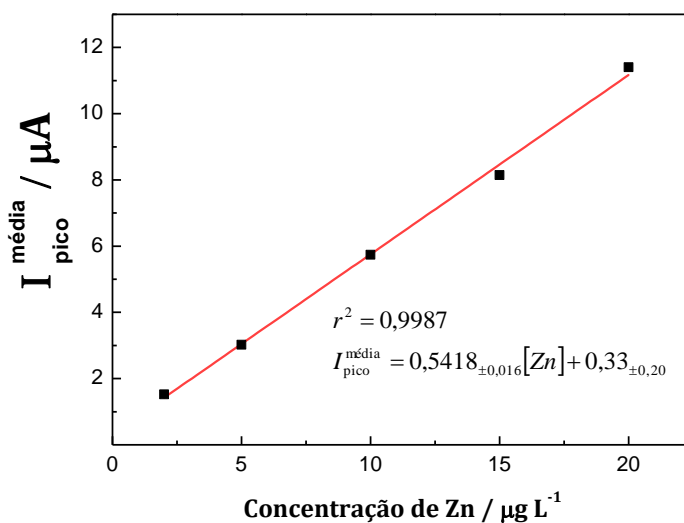
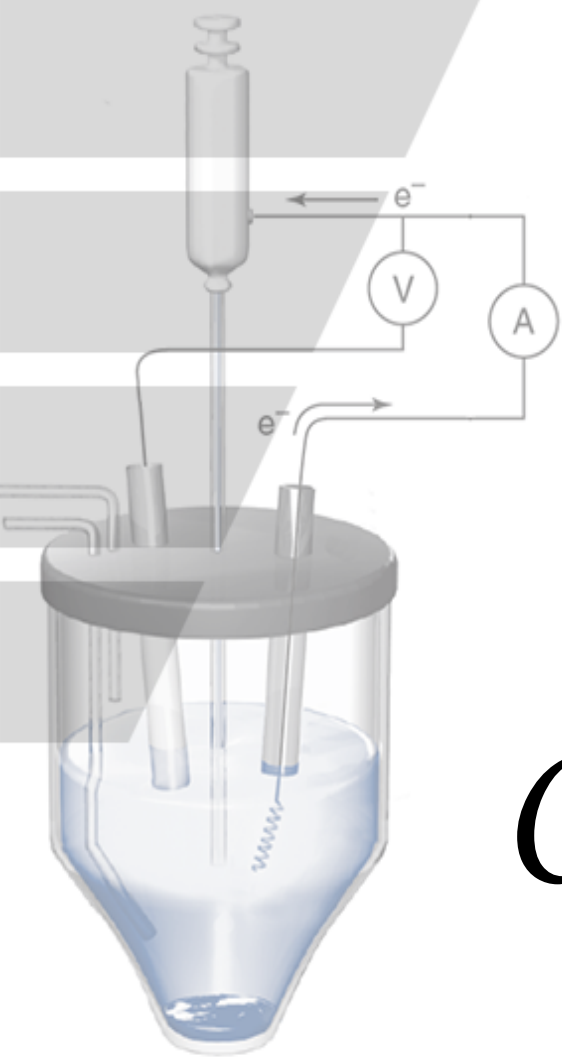


Figura 49. (a) Sobreposição dos voltamogramas para a determinação do LD usando os parâmetros da Tabela 34. (b) Curva analítica construída a partir dos voltamogramas em eletrólito suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão amoniacal (pH 8,0).

A menor concentração detectável de Zn foi $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, um LD menor que os obtidos por Langeloth *et al.* (2010)²⁵. Logo, a menor sensibilidade obtida nesse trabalho é atribuída a voltametria de onda quadrada.



CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

O eletrodo de DDB apresentou-se como um dispositivo versátil e com excelente durabilidade. Isto porque desde o início de sua construção (com acrílico e resina epóxi) até o fim deste trabalho, foram realizadas mais de 1400 leituras voltamétricas. Durante essas leituras, o aparato “*labmade*” usado para limpeza/ativação desse eletrodo foi eficiente e não exigiu nenhuma manutenção. Esse tratamento eletroquímico automatizado aplicado ao filme de DDB potencializa o uso deste eletrodo em química analítica por mesclar todas as características atrativas do DDB com a boa reprodutibilidade dos voltamogramas. Logo, este eletrodo pode ser aplicado como um substituto do eletrodo de mercúrio na determinação de substâncias inorgânicas (como os metais Zn, Cd, Pb e Cu) e até mesmo substâncias orgânicas (como ácido gálico).

Os planejamentos experimentais aplicados às variáveis das técnicas voltamétricas DPASV e SWASV foram ferramenta fundamentais para a obtenção das melhores condições experimentais. Diante das superfícies de resposta, foi possível melhorar a seletividade (largura do pico de oxidação) e, principalmente, a sensibilidade (altura do pico de oxidação) das técnicas. Com isso, obteve-se menores LD's que permitem a maior diluição da amostra minimizando o efeito da matriz (tão presente nas voltametrias).

Em especial, o planejamento experimental para SWASV auxiliou na escolha dos valores ótimos para as principais variáveis desta técnica. Na etapa de pré-concentração foram definidos os valores de -1500 mV e 240 s para o potencial e tempo, respectivamente. Para a etapa de varredura, o valor definido para frequência foi de 100 Hz e os valores otimizados de incremento do potencial e amplitude de pulso foram $11,56\text{ mV}$ e $130,78\text{ mV}$, respectivamente. Contudo, o valor da amplitude de pulso em conjunto com as outras variáveis causam um alargamento no pico, por esse motivo, o potencial escolhido foi de 55 mV . Além disso, a concentração do tampão acetato $pH\ 4,7$ otimizada foi igual a $0,206\text{ mol L}^{-1}$.

Com essa metodologia, obteve-se os LD_{SWASV} dos analitos Zn, Cd, Pb e Cu na solução iguais a 4,4; 4,2; 3,0 e $0,6 \mu g L^{-1}$, respectivamente. Por outro lado, a técnica espectrométrica comparativa, ICP OES, apresentou $LD_{ICP OES}$ na solução iguais a 0,19; 0,25; 1,6 e $2,6 \mu g L^{-1}$.

Diante dos valores de LD's apresentados, pode-se destacar que o Cu apresentou o menor LD_{SWASV} quando comparado com o $LD_{ICP OES}$. Em contrapartida, Zn, Cd e Pb tiveram valores de LD_{SWASV} superiores.

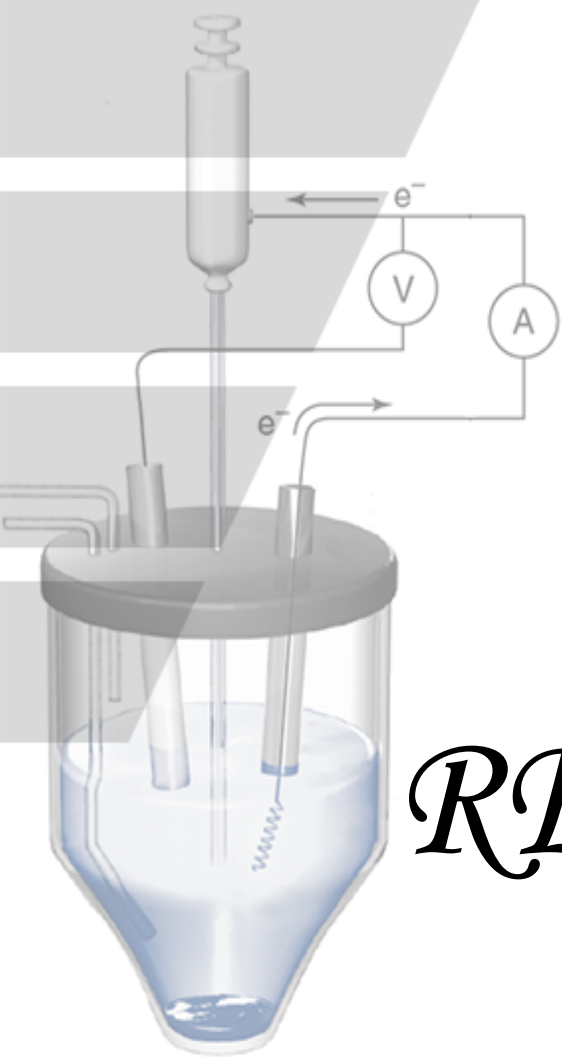
A aplicação da SWASV na análise direta da amostra de água de coco industrializada determinou a concentração das espécies de Zn e Cu livres ou lábeis. Os valores encontrados para as concentrações de Zn e Cu foram de $(76,8 \pm 4,2) \mu g L^{-1}$ e $(7,7 \pm 0,6) \mu g L^{-1}$, respectivamente. Desta forma, a especiação desses metais pode ser aplicada em outros estudos, como por exemplo, na avaliação do tempo de maturação em função da concentração de metais livres.

Na determinação da concentração total dos quatro analitos em água de coco usando a SWASV, a relação de 1,00 mL de amostra com 0,6 mL de HCl concentrado para 0,8 mL e H_2O_2 30% (v/v) foi definida na digestão assistida por ultrassom. Os resultados mostraram que a concentração de Zn e Cu obtidas em tampão acetato foram 102% e 46%, respectivamente, em relação aos valores obtidos por ICP OES. Contudo, as concentrações de Cd e Pb foram menores que seus respectivos LD_{SWASV} . Apesar disso, estes resultados já eram esperados visto que, a concentração desses dois analitos também estão abaixo do $LD_{ICP OES}$.

Em contrapartida ao uso do tampão acetato, o tampão amoniacal proporcionou uma redução do LD do Zn para $2 \mu g L^{-1}$, ou seja, a metade.

A aplicação da SWASV com eletrodo de DDB em meio tampão amoniacal para a amostra NE digerida apresentou resultados para o Zn no qual não apresentou diferença estatística em relação ao determinado por ICP OES (104%). Por outro lado, a concentração de Cu obtida por SWASV foi igual a $(13 \pm 3) \mu g L^{-1}$, valor este acima do LQ_{SWASV} . No entanto, a concentração

obtida por ICP OES para a mesma amostra foi menor que $26 \mu\text{g L}^{-1}$ (*Fator de diluição* $\times LD_{ICP\ OES}$). Apesar dessa comparação requerer maiores estudos, ela é uma aplicação prática de que a sensibilidade da SWASV usando o eletrodo DDB para determinação de Cu é maior quando comparado com o ICP OES.



REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aragão, F.B.; Loiola, C.M.; Cambui, É.V.F.; Aragão, W.M., Produção de água de coco de cultivares de coqueiro amarelo, (2005) 1–2.
2. Campbell-Falck, D.; Thomas, T.; Falck, T.M.; Tutuo, N.; Clem, K., The intravenous use of coconut water., *Am. J. Emerg. Med.* 18 (2000) 108–111.
3. National, U.; Database, N.; Release, S.R.; Date, R., Statistics Report 12119 , Nuts , coconut water (liquid from coconuts), (2015) 1–8.
4. Ferreira Neto, M.; Holanda, J.S. De; Folegatti, M. V.; Gheyj, H.R.; Pereira, W.E.; Cavalcante, L.F., Quality of green fruits of “anão verde” coconut in relation to doses of nitrogen and potassium via fertigation, *Rev. Bras. Eng. Agrícola E Ambient.* 11 (2007) 453–458.
5. Kwiatkowski, A.; Oliveira, D.M.; Clemente, E., Atividade enzimática e parâmetros físico-químicos de água de cocos colhidos em diferentes estádios de desenvolvimento e estação climática, *Rev. Bras. Frutic.* 34 (2012) 551–559.
6. Martins, C.R.; Jesus Junior, L.A. De, comércio internacional - Panorama 2010 Panorama 2010, *Documentos.* 164 (2011) 32.
7. Wu, Y.; Hu, B., Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7657–7663.
8. Syafriani, R.; Sukandar, E.Y.; Apriantono, T.; Sigit, J.I., The Effect of Coconut Water (*Cocos Nucifera* L.) and an Isotonic Drink on the Change of Heart Rate Frequency in the Rats Induced Hypertension, *Procedia Chem.* 13 (2014) 177–180.
9. DebMandal, M.; Mandal, S., Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention, *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4 (2011) 241–247.
10. Naozuka, J.; Tadini, C.C.; Oliveira, P. V, Estudo da influência de processos de conservação na distribuição de espécies elementares em água de coco, (2004) 1–4.
11. Amoriggi, G.; Satin, M., Natural beverage, (1998).
12. Sousa, R.A.; Silva, J.C.J.; Baccan, N.; Cadore, S., Determination of metals in bottled coconut water using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, *J. Food Compos. Anal.* 18 (2005) 399–408.

13. Sousa, R.A., Uso da espectrometria de emissão óptica em plasma de argônio com acoplamento indutivo na determinação de nutrientes e contaminantes inorgânicos em água de coco natural e industrializada, Unicamp, 2003.
14. Munoz, R.A.A.; Kolbe, M.; Siloto, R.C.; Oliveira, P. V.; Angnes, L., Ultrasound-Assisted Treatment of Coconut Water Samples for Potentiometric Stripping Determination of Zinc, *Talanta*, 18 (2007) 410–415.
15. Munoz, R.A.A.; Oliveira, P. V.; Angnes, L., Combination of ultrasonic extraction and stripping analysis: An effective and reliable way for the determination of Cu and Pb in lubricating oils, *Talanta*, 68 (2006) 850–856.
16. Ugo, P.; Sporni, L.; Moretto, L.M., Ion-Exchange Voltammetry of Trace Mercury(r1) at Glassy Carbon Electrodes Coated with a Cationic Polypyrrole Derivative. Application to Pore- Waters Analysis, *Electroanalysis*, 15 (1997) 0–5.
17. Metrohm, Determination of zinc, cadmium, lead and copper by anodic stripping voltammetry using carbon electrodes Summary, *Electron. Des.* 1 (1991) 1–15.
18. Honório, G.G.; Azevedo, G.C.; Matos, M.A.C.; de Oliveira, M.A.L.; Matos, R.C., Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry, *Food Control*, 36 (2014) 42–48.
19. Vicentini, F.C.; Figueiredo-Filho, L.C.S.; Janegitz, B.C.; Santiago, A.; Pereira-Filho, E.R.; Fatibello-Filho, O., Factorial design and response surface: voltammetric method optimization for the determination of Ag(I) employing a carbon nanotubes paste electrode, *Quim. Nova*, 34 (2011) 825–830.
20. Janegitz, B.C.; Marcolino-Junior, L.H.; Campana-Filho, S.P.; Faria, R.C.; Fatibello-Filho, O., Anodic stripping voltammetric determination of copper(II) using a functionalized carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan, *Sensors Actuators, B Chem.* 142 (2009) 260–266.
21. Yüce, M.; Nazır, H.; Dönmez, G., Utilization of heat-dried *Pseudomonas aeruginosa* biomass for voltammetric determination of Pb(II)., *N. Biotechnol.* 28 (2011) 356–61.
22. Albuquerque Pedrosa, V.; Codognoto, L.; Avaca, L.A., Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada, *Quim. Nova*, 26 (2003) 844–849.
23. Salazar-Banda, G.R.; Andrade, L.S.; Nascente, P. a P.; Pizani, P.S.; Rocha-Filho, R.C.; Avaca, L. a., On the changing electrochemical

- behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments, *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 4612–4619.
24. Mahé, E.; Devilliers, D.; Comninellis, C., Electrochemical reactivity at graphitic micro-domains on polycrystalline boron doped diamond thin-films electrodes, *Electrochim. Acta.* 50 (2005) 2263–2277.
 25. Langeloth, M.; Chiku, M.; Einaga, Y., Anodic stripping voltammetry of zinc at boron-doped diamond electrodes in ammonia buffer solution, *Electrochim. Acta.* 55 (2010) 2824–2828.
 26. Xiao, L.; Streeter, I.; Wildgoose, G.G.; Compton, R.G., Fabricating random arrays of boron doped diamond nano-disc electrodes: Towards achieving maximum Faradaic current with minimum capacitive charging, *Sensors Actuators, B Chem.* 133 (2008) 118–127.
 27. Pedrosa, V.A.; Codognoto, L.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A., Is the boron-doped diamond electrode a suitable substitute for mercury in pesticide analyses? A comparative study of 4-nitrophenol quantification in pure and natural waters, *J. Electroanal. Chem.* 573 (2004) 11–18.
 28. Souza, D.; Codognoto, L.; et al., Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações, *Quim. Nova.* 27 (2004) 790–797.
 29. Martins, C.R.; Jesus Junior, L. a. D., Produção e Comercialização de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014, (2014) 53.
 30. FAO, *World Prod.* (2014).
 31. Com investimento de R\$ 85 mi, Ducoco quer dobrar produção, *Exame.* (2015).
 32. Duarte, A.C.P.; Coelho, M.A.Z.; Leite, S.G.F., Identification of Peroxidase and Tyrosinase in Green Coconut Water Identificación De Peroxidasa Y Tirocinasa En Jugo De Coco Verde Identificación De Peroxidasa E Tirocinasa En Xugo De Coco Verde, *Cienc. Y Tecnol. Aliment.* 3 (2002) 266–270.
 33. Ma, Z.; Ge, L.; Lee, A.S.Y.; Yong, J.W.H.; Tan, S.N.; Ong, E.S., Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction, *Anal. Chim. Acta.* 610 (2008) 274–281.
 34. Jeganathan, M., Nut water analysis as a diagnostic tool in coconut nutrition studies, 23. (1992) 2667.
 35. Santoso, U.; Kubo, K.; Ota, T.; Tadokoro, T.; Maekawa, A., Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.), *Food Chem.* 57 (1996) 299–304.

36. Quináia, S.P.; Nóbrega, J. a., Determinação direta de cromo em açúcar e leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, *Quim. Nova.* 23 (2000) 185–190.
37. Sousa, R.A.; Baccan, N.; Cadore, S., Determination of metals in Brazilian coconut water using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, *J. Braz. Chem. Soc.* 16 (2005) 540–544.
38. Souza, D.; Machado, S. a S.; Avaca, L. a., Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos, *Quim. Nova.* 26 (2003) 81–89.
39. Tonietto, A.E.; Grassi, M.T., Análise De Especificação de cobre e zinco empregando voltametria de redissolução Anódica com pulso diferencial, *Quim. Nova.* 35 (2012) 170–174.
40. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Couch, S.R., **Fundamentos de Química Analítica, Editora Thomson, tradução da 8^a edição**, 8th ed., Cengage Learning., São Paulo, 2006.
41. Gonçalves, M.L.S.S., **Métodos instrumentais para análise de soluções: Análise quantitativa.**, 4th ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001.
42. Henze, G., **Introduction to Polarography and Voltammetry**, Metrohm Limited, German, 2004.
43. Lovrić, M.; Osteryoung, J., Theory of differential normal pulse voltammetry, *Electrochim. Acta.* 27 (1982) 963–968.
44. Brett, C.M.A.; Brett, A.M.O., **Electrochemistry Principles, Methods, and Applications**, 1993.
45. Ramaley, L.; Krause, M.S., Theory of Square Wave Voltammetry, *Anal. Chem.* 41 (1969) 1361–1365.
46. Christie, J.H.; Turner, J.A.; Osteryoung, R.A., Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: theory, *Anal. Chem.* 49 (1977) 1899–1903.
47. Turner, J. a.; Christie, J.; Vukovic, M.; Osteryoung, R., Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: experimental, *Anal. Chem.* 49 (1977) 1904–1908.
48. Elema, B., The Zbinden method for the micro-estimation of copper after preliminary deposition of the metal by electrolysis, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 12 (1947) 243–256.
49. Nicholson, M.M., Polarography of metallic monolayers, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 7–12.
50. Nicholson, M.M., Anodic stripping voltammetry of nickel at solid electrodes, *Anal. Chem.* 32 (1960) 1058–1062.

51. Jagner, D.; Graneli, A., Potentiometric stripping analysis, *Anal. Chim. Acta.* 83 (1976) 19–26.
52. Holland John F, M.J.D., **Portable polarographic analyzer and quick polarographic determinations**, 1975.
53. Tamba, M.G.; Vantini, N., A new device for anodic stripping voltammetry, *Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 25 (1970) 235–244.
54. Tindall, G.W.; Bruckenstein, S., The simultaneous determination by stripping analysis of copper and silver in sulfuric acid supporting electrolyte using the platinum ring-disk electrode, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 22 (1969) 367–373.
55. Fan, W.; Wang, X.; Li, X.; Xue, F., Determination of metallothionein in *Daphnia magna* by modified square wave cathodic stripping voltammetry, *Electrochem. Commun.* 52 (2015) 17–20.
56. Illuminati, S.; Annibaldi, A.; Truzzi, C.; Finale, C.; Scarponi, G., Square-wave anodic-stripping voltammetric determination of Cd, Pb and Cu in wine: Set-up and optimization of sample pre-treatment and instrumental parameters, *Electrochim. Acta.* 104 (2013) 148–161.
57. Annibaldi, A.; Illuminati, S.; Truzzi, C.; Scarponi, G., SWASV speciation of Cd, Pb and Cu for the determination of seawater contamination in the area of the Nicole shipwreck (Ancona coast, Central Adriatic Sea), *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 2813–2821.
58. Lau, O.W.; Cheng, O.M., Determination of zinc in environmental samples by anodic stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta.* 376 (1998) 197–207.
59. Brainina, K.Z., Film stripping voltammetry, *Talanta.* 18 (1971) 513–539.
60. Heyrovský, J., Modern trends of polarographic analysis, *Anal. Chim. Acta.* 2 (1948) 533–541.
61. Heyrovský, J.; Zuman, P., **Practical Polarography**, Elsevier, 1968.
62. Bard, A.J.; Faulkner, L.R., **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2001.
63. Economou, A.; Fielden, P.R., Mercury film electrodes: developments, trends and potentialities for electroanalysis, *Analyst.* 128 (2003) 205–213.
64. Demars, R.D.; ShainHAIN, I., Anodic Stripping Voltammetry Using the Hanging Mercury Drop Electrode, *Anal. Chem.* 29 (1957) 1825–1827.
65. Langford, N.; Ferner, R., Toxicity of mercury., *J. Hum. Hypertens.* 13 (1999) 651–656.

66. Alfaro, M.A.Q.; Ferro, S.; Martínez-Huitle, C.A.; Vong, Y.M., Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 227–236.
67. Barros, R.D.C.M.; Ribeiro, M.C.; An-Sumodjo, P.T.; Julião, M.S.D.S.; Serrano, S.H.P.; Ferreira, N.G., Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização, *Quim. Nova.* 28 (2005) 317–325.
68. Ferreira, N.G.; Silva, L.L.G.; Corat, E.J.; Trava-Airoldi, V.J., Kinetics study of diamond electrodes at different levels of boron doping as quasi-reversible systems, *Diam. Relat. Mater.* 11 (2002) 1523–1531.
69. Pelskov, Y. V.; Sakharova, A.Y.; Krotova, M.D.; Bouilov, L.L.; Spitsyn, B. V., Photoelectrochemical properties of semiconductor diamond, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 228 (1987) 19–27.
70. Perret, A.; Haenni, W.; et al., Electrochemical behavior of synthetic diamond thin film electrodes, *Diam. Relat. Mater.* 8 (1999) 820–823.
71. Rao, T.N.; Fujishima, A., Recent advances in electrochemistry of diamond, *Diam. Relat. Mater.* 9 (2000) 384–389.
72. Suffredini, H.B.; Pedrosa, V.A.; Codognoto, L.; Machado, S.A.S.; Rocha-Filho, R.C.; Avaca, L.A., Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment, *Elect. Acta.* 49 (2004) 4021–4026.
73. Kobashi, K., **Chapter 14 - Conclusions, In Diamond Film**, Elsevier Science Ltd, Oxford, 1976.
74. Novozamsky, I.; van der Lee, H.J.; Houba, V.J.G., Sample digestion procedures for trace element determination, *Mikrochim. Acta.* 119 (1995) 183–189.
75. Costa, L.M.; Korn, M. das G.A.; Castro, J.T.; Santos, W.P.C.; Carvalho, E. V.; Nogueira, A.R.A., Planejamento fatorial aplicado à digestão de amostras de feijão assistida por radiação microondas, *Quim. Nova.* 29 (2006) 149–152.
76. Nardi, E.P.; Evangelista, F.S.; et al., The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples, *Food Chem.* 112 (2009) 727–732.
77. Luque de Castro, M.D.; Priego-Capote, F., Ultrasound-assisted preparation of liquid samples, *Talanta.* 72 (2007) 321–334.
78. Nogueira, A.R.D.A., Preparo de amostras., *VIII Encontro Nac. Sobre Métodos Laboratório Embrapa.* (2004).

79. Nascentes, C.C.; Korn, M.; Arruda, M.A., A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables, *Microchem. J.* 69 (2001) 37–43.
80. Ilander, A.; Väisänen, A., An ultrasound-assisted digestion method for the determination of toxic element concentrations in ash samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry., *Anal. Chim. Acta.* 602 (2007) 195–201.
81. Santos, W.P.C.; Castro, J.T.; Bezerra, M.A.; Fernandes, A.P.; Ferreira, S.L.C.; Korn, M.G.A., Application of multivariate optimization in the development of an ultrasound-assisted extraction procedure for multielemental determination in bean seeds samples using ICP OES, *Microchem. J.* 91 (2009) 153–158.
82. Capote, F Priego and de Castro, M.L., **Analytical applications of Ultrasound**, Elsevier, 2007.
83. **Analytical Applications of Ultrasound**, Elsevier, 2007.
84. Pugin, B., Qualitative characterization of ultrasound reactors for heterogeneous sonochemistry, *Ultrasonics.* 25 (1987) 49–55.
85. Capelo-Martínez, J.L.; Ximénez-Embún, P.; Madrid, Y.; Cámara, C., Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 331–340.
86. Chitra, S.; Paramasivan, K.; Sinha, P.K.; Lal, K.B., Ultrasonic treatment of liquid waste containing EDTA, *J. Clean. Prod.* 12 (2004) 429–435.
87. Priego-Capote, F.; Luque De Castro, M.D., Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 644–653.
88. Hou, X.; Jones, B.T., **Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry**, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
89. Pinto, H.S.; Roberto, M., Simulação de uma Descarga de Rf Pelo Método PIC/MCC, com Argônio e Mercúrio, *Encontro Iniciação Científica E Pós-Graduação Do ITA – VIII ENCITA, 10, 2002, São José Dos Campos.* 1 (2002) 4–10.
90. Fonte, A.R. Della, Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de iodo em amostras de premixes e soluções expectorantes usando técnicas espectrométricas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.
91. Vanini, G.; Souza, M.O.; Carneiro, M.T.W.D.; Filgueiras, P.R.; Bruns, R.E.; Romão, W., Multivariate optimisation of ICP OES instrumental parameters for Pb/Ba/Sb measurement in gunshot residues, *Microchem. J.* 120 (2015) 58–63.

92. Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., **Como fazer experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**, 4th ed., Editora Bookman, São Paulo, 2010.
93. Breitzkreitz, M.C.; Souza, A.M. de; Poppi, R.J., 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, *Quim. Nova.* 37 (2014) 564–573.
94. Teófilo, R.F.; Ferreira, M.M.C., Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial, *Quim. Nova.* 29 (2006) 338–350.
95. Silva, J.A.; Damasceno, B.P.G. de L.; Silva, F.L.H. da; Madruga, M.S.; Santana, D.P. de, Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica, *Quim. Nova.* 31 (2008) 1073–1077.
96. Souza, M. de O.; Rainha, K.P.; Castro, E.V.R.; Carneiro, M.T.W.D.; Ferreira, R. de Q., Análise exploratória das concentrações dos metais Na, Ca, Mg, Sr e Fe em extrato aquoso de petróleo, determinados por ICP OES, após otimização empregando planejamento de experimentos, *Quim. Nova.* 0 (2015) 7.
97. Bouamrane, F.; Tadjeddine, a.; Butler, J.E.; Tenne, R.; Lévy-Clément, C., Electrochemical study of diamond thin films in neutral and basic solutions of nitrate, *J. Electroanal. Chem.* 405 (1996) 95–99.
98. Lévy-Clément, C.; Ndao, N. a.; et al., Boron doped diamond electrodes for nitrate elimination in concentrated wastewater, *Diam. Relat. Mater.* 12 (2003) 606–612.
99. Locatelli, C.; Torsi, G., Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference, *J. Electroanal. Chem.* 509 (2001) 80–89.
100. Opoka, W.; Baś, B.; et al., Applicability of the silver amalgam electrode in voltammetric determination of zinc and copper in gastric juice and gastric mucosa of rats, *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 68 (2011) 481–492.
101. Brazil, **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.**, 1st ed., Mapa/ACS, Brasília, 2011.
102. Agostinho, S.M.L.; Villamil, R.F. V.; Agostinho Neto, A.; Aranha, H., O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo, *Quim. Nova.* 27 (2004) 813–817.
103. Mirčeski, V.; Lovrić, M., Ohmic drop effects in square-wave voltammetry, *J. Electroanal. Chem.* 497 (2001) 114–124.

104. Portugal, L.A.; Ferreira, H.S.; dos Santos, W.N.L.; Ferreira, S.L.C., Simultaneous pre-concentration procedure for the determination of cadmium and lead in drinking water employing sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 87 (2007) 77–80.
105. Souza, S.V.C.; Junqueira, R.G., A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, *Anal. Chim. Acta.* 552 (2005) 25–35.
106. Pimentel, M.F.; Neto, B.D.B., Calibração: Uma Revisão Para Químicos Analíticos, *Quim. Nova.* 19 (1996) 268–277.
107. Wang, J., **Analytical Electrochemistry**, 3rd ed., John Wiley & Sons, 2006.
108. Buchanan, E., Optimization of instrumental parameters for square-wave anodic stripping voltammetry, *Talanta.* 30 (1983) 459–464.
109. Boss, C.B.; Fredeen, K.J., **Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry**, Perkin Elmer Norwalk, 1999.
110. Naozuka, J.; da Veiga, M. a M.S.; Richter, E.M.; Paixão, T.R.L.C.; Angnes, L.; Oliveira, P. V., Use of Metals and Anion Species with Chemometrics Tools for Classification of Unprocessed and Processed Coconut Waters, *Food Anal. Methods.* 4 (2011) 49–56.
111. Mylon, S.E.; Twining, B.S.; Fisher, N.S.; Benoit, G., Relating the speciation of Cd, Cu, and Pb in two Connecticut rivers with their uptake in algae, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1261–1267.
112. Mattos, I.L.; Shiraishi, K.A.; Delphini Braz, A.; Fernandes, J.R., Peróxido De Hidrogênio: Importância E Determinação, *Quim. Nov.* 26 (2003) 373–380.
113. Tyszczyk, K.; Korolczyk, M.; Grabarczyk, M., Application of gallium film electrode for elimination of copper interference in anodic stripping voltammetry of zinc., *Talanta.* 71 (2007) 2098–101.
114. Maillard, L.C., Action des acidesamines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique, *CR Acad. Sci.* 154 (1912) 66–68.
115. Copeland, T.; Osteryoung, R.A.; Skogerboe, R.K., Elimination of Copper-Zinc Intermetallic Interferences in Anodic Stripping Voltammetry, *Anal. Chem.* 46 (1974) 2097.
116. Lingane, J.J., Interpretation of the Polarographic Waves of Complex Metal Ions., *Chem. Rev.* 29 (1941) 1–35.

7 ANEXOS

7.1 Planejamento Fatorial Completo

7.1.1 Matriz do planejamento fatorial completo 2^6

Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	-1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1	-1
18	+1	-1	-1	-1	+1	-1
19	-1	+1	-1	-1	+1	-1
20	+1	+1	-1	-1	+1	-1
21	-1	-1	+1	-1	+1	-1
22	+1	-1	+1	-1	+1	-1
23	-1	+1	+1	-1	+1	-1
24	+1	+1	+1	-1	+1	-1
25	-1	-1	-1	+1	+1	-1
26	+1	-1	-1	+1	+1	-1
27	-1	+1	-1	+1	+1	-1
28	+1	+1	-1	+1	+1	-1
29	-1	-1	+1	+1	+1	-1
30	+1	-1	+1	+1	+1	-1
31	-1	+1	+1	+1	+1	-1
32	+1	+1	+1	+1	+1	-1
33	-1	-1	-1	-1	-1	+1
34	+1	-1	-1	-1	-1	+1
35	-1	+1	-1	-1	-1	+1

36	+1	+1	-1	-1	-1	+1
37	-1	-1	+1	-1	-1	+1
38	+1	-1	+1	-1	-1	+1
39	-1	+1	+1	-1	-1	+1
40	+1	+1	+1	-1	-1	+1
41	-1	-1	-1	+1	-1	+1
42	+1	-1	-1	+1	-1	+1
43	-1	+1	-1	+1	-1	+1
44	+1	+1	-1	+1	-1	+1
45	-1	-1	+1	+1	-1	+1
46	+1	-1	+1	+1	-1	+1
47	-1	+1	+1	+1	-1	+1
48	+1	+1	+1	+1	-1	+1
49	-1	-1	-1	-1	+1	+1
50	+1	-1	-1	-1	+1	+1
51	-1	+1	-1	-1	+1	+1
52	+1	+1	-1	-1	+1	+1
53	-1	-1	+1	-1	+1	+1
54	+1	-1	+1	-1	+1	+1
55	-1	+1	+1	-1	+1	+1
56	+1	+1	+1	-1	+1	+1
57	-1	-1	-1	+1	+1	+1
58	+1	-1	-1	+1	+1	+1
59	-1	+1	-1	+1	+1	+1
60	+1	+1	-1	+1	+1	+1
61	-1	-1	+1	+1	+1	+1
62	+1	-1	+1	+1	+1	+1
63	-1	+1	+1	+1	+1	+1
64	+1	+1	+1	+1	+1	+1

7.1.2 Matriz do planejamento fatorial completo 2^4

Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1

7.2 Planejamento CCD

7.2.1 Matriz do planejamento CCD 2² com 3 pontos centrais

Exp.	X ₁	X ₂	Planejamento
1	-1	-1	Planejamento Fatorial
2	+1	-1	
3	-1	+1	
4	+1	+1	
5	0	0	Ponto Central
6	0	0	
7	0	0	
8	- α	0	Pontos Axiais
9	+ α	0	
10	0	- α	
11	0	+ α	

Para 2 variáveis $\alpha = \sqrt[4]{2^2} \cong 1,41$

7.2.2 Matriz do planejamento CCD 2^3 com 3 pontos centrais

Exp.	X_1	X_2	X_3	Planejamento
1	-1	-1	-1	Planejamento Fatorial
2	+1	-1	-1	
3	-1	+1	-1	
4	+1	+1	-1	
5	-1	-1	+1	
6	+1	-1	+1	
7	-1	+1	+1	
8	+1	+1	+1	
9	0	0	0	Ponto Central
10	0	0	0	
11	0	0	0	
12	$-\alpha$	0	0	Pontos Axiais
13	$+\alpha$	0	0	
14	0	$-\alpha$	0	
15	0	$+\alpha$	0	
16	0	0	$-\alpha$	
17	0	0	$+\alpha$	

Para 3 variáveis $\alpha = \sqrt[4]{2^3} \cong 1,68$