

ERNESTINA MARIA ROCHA MOREIRA

Licenciada em Química F.C.U.P.

**DETERMINAÇÃO DA RIBOFLAVINA POR
VOLTAMETRIA COM ADSORÇÃO**

*Dissertação para
Mestrado em Química*

**Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**

1999

ERNESTINA MARIA ROCHA MOREIRA

Licenciada em Química F.C.U.P.

**DETERMINAÇÃO DA RIBOFLAVINA POR
VOLTAMETRIA COM ADSORÇÃO**

*Dissertação para
Mestrado em Química*

**Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**

1999

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Aquiles de Barros, pela disponibilidade, dedicação, interesse e saber, demonstrados durante a realização deste trabalho.

A todos os elementos da área de Química Analítica, em especial ao Doutor José António Rodrigues, pela disponibilidade e colaboração durante a realização deste trabalho.

À Poliface, que permitiu a realização deste mestrado.

À família, ao Nuno e a todos os amigos que me ajudaram e incentivaram para a realização deste mestrado.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	x
RESUMO	
I. PARTE TEÓRICA	1
1. A RIBOFLAVINA	2
1.1. Introdução	2
1.2. Estrutura e propriedades	2
1.2.1. Estrutura	2
1.2.2. Propriedades físico-químicas	4
1.3. Métodos de determinação	10
1.4. Ocorrência	11
1.5. Estabilidade nos alimentos	12
1.6. Presença nos seres humanos e outros animais	13
1.6.1. Absorção, transporte, distribuição, armazenagem, metabolismo e excreção	13
1.6.2. Necessidades	15
1.6.3. Deficiências	17
2. ANÁLISE VOLTAMÉTRICA	18
2.1. Introdução	18
2.2. Instrumentação	19
2.2.1. Eléctrodo de mercúrio gotejante	19
2.2.2. Eléctrodo de mercúrio gota suspensa	20
2.2.3. Eléctrodo de película de mercúrio	20
2.2.4. Eléctrodos sólidos	21
2.3. Métodos Voltamétricos	21
2.3.1. Polarografia clássica	21
2.3.2. Técnicas voltamétricas com impulsos de potencial	24
2.3.2.1. Voltametria normal com impulsos	24
2.3.2.2. Voltametria diferencial com impulsos	26
2.3.2.3. Voltametria de onda quadrada	27

2.3.3. Métodos voltamétricos com pré-acumulação	28
2.3.4. Voltametria com adsorção	30
2.3.4.1. A adsorção na interface eléctrodo-solução	31
2.3.4.2. Sinal voltamétrico	33
2.3.4.3. Instrumentação	34
2.3.4.4. Metodologia	34
3. ANÁLISE ESPETROFLUORIMÉTRICA	36
3.1. Introdução	36
3.2. Processos de desactivação de uma molécula no estado excitado	37
3.3. Espectro de emissão e absorção	38
3.4. Rendimento quântico e tempo de vida do estado excitado	39
3.5. Factores que afectam a fluorescência molecular	40
3.6. Aspectos instrumentais	43
3.7. Análise quantitativa	46
3.8. As Vantagens do método	47
II. PARTE EXPERIMENTAL	49
1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	50
1.1. Instrumentação	50
1.2. Reagentes e Soluções	50
2. DETERMINAÇÃO DA RIBOFLAVINA POR VOLTAMETRIA COM ADSORÇÃO	52
2.1. Optimização do processo	52
2.2. Influência da luz	61
3. DETERMINAÇÃO DA RIBOFLAVINA NAS PASTILHAS “SMINT”	71
4. DETERMINAÇÃO DA RIBOFLAVIAN NO LEITE	74
4.1. Análise espectrofluorimétrica	74
4.1.1. Considerações prévias	74
4.1.2. Extracção de riboflavina	76
4.1.3. Estudo da eficiência da extracção	79
4.2. Análise Voltamétrica	83
4.3. Comparação dos métodos	93
BIBLIOGRAFIA	I

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Fórmulas de estrutura da riboflavina nos vários estados de oxidação e redução. 1.a.- Riboflavina- forma totalmente oxidada; 1.b.- Dihidroriboflavina- forma totalmente reduzida, 1.c.- radical anião e 1.d. radical neutro.	3
Fig. 2. Fórmulas estruturais das formas coenzimas da riboflavina. 2.a.- flavina-mononucleótido (FMN); 2.b.- flavina - adenina - dinucleótido (FAD).	3
Fig. 3. Espectro de absorção (—) e emissão fluorescente (- - - - -) na zona UV/Vis da riboflavina em solução aquosa neutra.	5
Fig. 4. Diagrama de Jablonski para as flavinas.	5
Fig. 5. Estrutura da riboflavina e dos seus foto-produtos	7
Fig. 6. Reacção de formação do lumicromo.	8
Fig. 7. Mecanismo de formação das cetonas.	9
Fig. 8. Formação da cetona por redução da riboflavina segundo Brdicka	9
Fig. 9. Cisão da cetona segundo Brdicka	9
Fig. 10. Formação da lumiflavina segundo Brdicka	10
Fig. 11. Metabolismo das flavinas nos mamíferos	15
Fig. 12. Eléctrodo de mercúrio gotejante	19
Fig. 13. Variação do potencial com o tempo em polarografia clássica.	21

- Fig. 14.** Variação da intensidade de corrente ao longo do tempo no eléctrodo de mercúrio gotejante. 22
- Fig. 15.** Exemplo de um polarograma. 22
- Fig. 16.** Variação do potencial com o tempo na voltametria normal com impulsos, onde a) corresponde ao tempo em que o impulso é aplicado, b) o intervalo de tempo em que o mesmo é medido, c) representa o instante em que a gota cai e d) o tempo de vida da gota 24
- Fig. 17.** A variação da intensidade de corrente durante o impulso, onde a) corresponde ao momento em que o impulso é aplicado, b) o intervalo de tempo em que o mesmo é medido 25
- Fig. 18.** A representação do voltamograma, onde d) é o tempo de vida da gota 25
- Fig. 19.** Variação do potencial com o tempo na voltametria diferencial com impulsos, onde a) corresponde ao tempo em que o impulso é aplicado, b) os dois intervalos de tempo em que o mesmo é medido, c) representa o instante em que a gota cai, d) o tempo de vida da gota e e) a amplitude do impulso 26
- Fig. 20.** Variação da intensidade de corrente com o potencial em voltametria diferencial com impulsos onde d) é o tempo de vida da gota. 27
- Fig. 21.** Variação do potencial com o tempo em voltametria de onda quadrada 28
- Fig. 22.** Dependência do potencial em função do tempo nos métodos de voltametria com redissolução. A - momento em que termina a agitação 29
- Fig. 23.** Equilíbrio de adsorção na camada da interface, onde A é a espécie adsorvida, S o solvente e E o eléctrodo 31

Fig. 24. Variação da concentração da espécie adsorvida em função da sua 32
concentração na solução

Fig. 25. Efeito da concentração da solução e do tempo de acumulação na 35
intensidade de corrente

Fig. 26 - Regra do espelho e o princípio de Franck- Condon 39

Fig. 27. Diagrama esquemático de um fluorímetro 44

Fig. 28. Relação entre a intensidade da radiação e a concentração da espécie 47
fluorescente

Fig. 29. Análise da riboflavina em solução HCl 0.1M por voltametria 53
diferencial com impulsos.

Fig. 30. Análise da riboflavina em tampão acetato 0.01M, pH 4.5, por voltametria 54
diferencial com impulsos, ___ Tampão acetato 0.01M, ___ 1.25×10^{-7} de
riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de riboflavina

Fig. 31. A influência da frequência na determinação da riboflavina utilizando a 54
voltametria de onda quadrada. (A) 100 Hz, (B) 400 Hz e (C) 800 Hz. ___
Tampão Fosfato 0.1M, pH 7, ___ 1.25×10^{-7} de riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de
riboflavina. Tempo de acumulação: 0 s, Amplitude: 0.01V e Potencial de impulso:
0.005 V.

Fig. 32. Relação entre a intensidade de corrente de pico e a concentração da 55
vitamina para as três frequências diferentes ensaiadas.

Fig. 33. A influência do tempo de deposição na determinação da riboflavina 56
utilizando a voltametria de onda quadrada. (A) 0s, (B) 30s. ___ Tampão Fosfato
0.1M, pH 7, ___ 1.25×10^{-7} de riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de riboflavina.
Frequência 400 Hz, Amplitude: 0.01V e Potencial de impulso: 0.005 V.

Fig. 34. Influência do tempo de deposição e da frequência na determinação da 57
riboflavina utilizando a voltametria de onda quadrada. (A) 0s e 400 Hz, (B) 30s e
400 Hz, (C) 0s e 800 Hz e (D) 30s e 800 Hz ___ Tampão Amoniacal 0.1M, pH 9,
___ 1.25×10^{-7} de riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de riboflavina. Amplitude: 0.01V
e Potencial de impulso: 0.005 V.

Fig. 35. Intensidade de corrente de pico em função da concentração da 58
vitamina para diferentes frequências e tempos de acumulação

Fig. 36. Influência da frequência na determinação da riboflavina utilizando 58
tampão fosfato 0.01M, pH 12 com força iônica controlada.

Fig. 37. Intensidade de corrente de pico em função da concentração da 60
riboflavina a 200 Hz.

Fig. 38. Adições sucessivas de solução padrão de riboflavina. 60

Fig. 39. Intensidade de corrente de pico em função da concentração da 61
riboflavina (curvas de calibração obtidas a partir dos resultados apresentados na
Figura 38)

Fig. 40. Análises consecutivas de 2.56×10^{-7} M de riboflavina a 400 Hz, em 62
tampão fosfato 0.1M, pH 7, com a célula protegida da luz.

Fig. 41. Análises consecutivas de 2.56×10^{-7} M de riboflavina a 400 Hz, em 62
tampão fosfato 0.1M, pH 7, logo após a exposição da célula à luz ambiente.

Fig. 42. Influência do tempo de exposição à luz na determinação da 63
riboflavina.

Fig. 43. Influência da luz na determinação da riboflavina, em tampão fosfato 64
0.1 M, pH 7, a 400 e 600 Hz.

Fig. 44. Percentagem de degradação de diversas soluções de riboflavina com a 65
luz, em tampão fosfato 0.1 M, pH 7, a 400 e 600 Hz.

Fig. 45. Influência da concentração de riboflavina na intensidade de corrente 66
de pico, a 600 Hz, na ausência de luz ($E_p = -0.43$ V)

Fig. 46. Influência da concentração de riboflavina na intensidade de corrente 68
de pico na presença de luz, após desaparecimento do pico a -0.44 mV e
estabilização do sinal a -0.56 mV, para concentrações de vitamina entre os 10^{-7} e
os 10^{-6} M.

Fig. 47. Influência da concentração de riboflavina na intensidade de corrente 69
de pico na presença de luz, após desaparecimento do pico a -0.44 mV e
estabilização do sinal a -0.56 mV, para concentrações de vitamina entre os 10^{-8} e
os 10^{-7} M.

Fig. 48. Análise voltamétrica da riboflavina presente nas pastilhas “Smint”. 71
Adições sucessivas de 1×10^{-7} M riboflavina

Fig. 49. Determinação da riboflavina presente na pastilha “Smint” 72

Fig. 50. Determinações sucessivas da riboflavina nas pastilhas “Smint”. 73

Fig. 51. Espectros de fluorescência de uma solução de riboflavina 2.67×10^{-7} M 75
a 440nm (a) e 470 nm (b).

Fig. 52. Curva de calibração da riboflavina em meio tampão acetato 1 %, 76
utilizando dois comprimentos de onda de excitação.

Fig. 53. Espectros de fluorescência obtidos na determinação da riboflavina no 77
extracto de leite pelo método das adições padrão.

Fig. 54. Curva de adição de padrão de riboflavina ao leite em meio tampão 78
acetato 1 % (medindo a fluorescência a um comprimento de onda de excitação de
440 nm.)

Fig. 55. Curvas com adição de padrão ao leite antes e após a extracção. 80

Fig. 56. Curvas de adição de padrão a extractos de amostras de leite (amostra 81
1), com adição prévia de riboflavina: 1.11×10^{-6} M (amostra 2), 2.23×10^{-6} M,
(amostra 3) e 3.34×10^{-6} M, (amostra 4).

Fig. 57. Análise voltamétrica da riboflavina directamente em 0.5 ml leite, 83
usando o método das adições de padrão.

Fig. 58. Determinação da riboflavina directamente em 0.5 ml de leite pelo 84
método das adições sucessivas de padrão.

Fig. 59. Análise voltamétrica da riboflavina directamente em 1 ml leite, 85
usando o método das adições de padrão.

Fig. 60. Determinação da riboflavina directamente em 1 ml de leite pelo 86
método das adições sucessivas de padrão.

Fig. 61. Análise voltamétrica da riboflavina em 1 ml de extracto de leite, 87
usando o método das adições de padrão.

Fig. 62. Análise voltamétrica da riboflavina em 1 ml de extracto de leite, 88
usando o método das adições de padrão.

Fig. 63. Determinação da riboflavina em 1 ml de extracto de leite pelo método das adições sucessivas de padrão. 89

Fig. 64. Análise voltamétrica da riboflavina directamente em 1 ml de leite, usando o método das adições de padrão. 90

Fig. 65. Determinação da riboflavina directamente em 1 ml de leite pelo método das adições sucessivas de padrão 91

Fig. 66. Determinação sucessiva de riboflavina directamente no leite 92

Fig. 67. Determinação sucessiva de riboflavina no extracto 92

Fig. 68. Determinação da riboflavina directamente no leite e no seu extracto, a 400 Hz 93

Fig. 69. Determinação da riboflavina directamente no leite e no seu extracto, a 600 Hz 94

Fig. 70. Curvas com adição de padrão ao leite antes e após a extracção. 96

Fig. 71. Curvas de adição de padrão a extractos leite (amostra 1), com adição prévia de riboflavina: 9.56×10^{-8} M (amostra 2), 1.91×10^{-7} M, (amostra 3) e 2.87×10^{-7} M, (amostra 4). 97

Fig. 72. Curvas de adição de padrão a amostras de leite (amostra 1), com adição prévia de riboflavina: 9.96×10^{-8} M (amostra 2), 1.99×10^{-7} M, (amostra 3) e 2.99×10^{-7} M, (amostra 4). 99

ÍNDICE DE TABELAS

Tab. 1. Quantidade de riboflavina presente em alguns alimentos	12
Tab. 2. Quantidade de flavina existente nos órgãos dos seres vivos e a forma em que se encontra. Determinação efectuada através de um método baseado em HPLC.	14
Tab. 3. Quantidade de riboflavina recomendada na dieta humana. *RDA- Recommended Dietary Allowances	16
Tab. 4. Quantidade de riboflavina reconhecida como necessária na dieta de alguns animais	16
Tab. 5. Reagentes utilizados na preparação das soluções tampão.	51
Tab. 6. Soluções de electrólito utilizadas, as respectivas concentrações e o pH	52
Tab. 7. Intensidade de corrente do pico (amperes) em função da concentração da vitamina para diferentes frequências	55
Tab. 8. Intensidade de corrente do pico (amperes) em função da concentração da vitamina para diferentes frequências e tempos de deposição.	57
Tab. 9. Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina, na ausência de luz ($E_p = -0.43V$)	66
Tab. 10. Valor de intensidade de corrente de pico ($E_p = -0.55 V$) em função da concentração de riboflavina na célula, na presença de luz, para concentrações de vitamina entre os 10^{-7} e os 10^{-6} M.	67

- Tab. 11.** Valor de intensidade de corrente de pico ($E_p = -0.55$ V) em função da concentração de riboflavina na célula, na presença de luz, para concentrações de vitamina entre os 10^{-8} e os 10^{-7} M. **69**
- Tab. 12.** Intensidade máxima obtida por espectrofluorimetria para as diferentes concentrações de riboflavina. **75**
- Tab. 13.** Intensidade máxima obtida por espectrofluorimetria para as diferentes concentrações de padrão de riboflavina adicionadas à amostra. **78**
- Tab. 14.** Intensidade de fluorescência em extractos de leite, com adição de riboflavina antes e depois da extracção **80**
- Tab. 15.** Concentração de riboflavina previamente adicionada e determinada nas amostras de leite. **82**
- Tab. 16.** Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina adicionada a 0.5 ml de leite. **84**
- Tab. 17.** Valor de intensidade de corrente em função da concentração de riboflavina adicionada a 1 ml de leite. **86**
- Tab. 18.** Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina adicionada a 1 ml de extracto de leite. **88**
- Tab. 19.** Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina adicionada directamente a 1 ml de leite. **90**
- Tab. 20.** Concentração de riboflavina no leite obtida a partir da análise directa e a partir da análise do extracto **95**

Tab. 21. Concentração de riboflavina previamente adicionada e determinada 98 nas amostras de leite.

Tab. 22. Concentração de riboflavina previamente adicionada e quantificada 100 na célula.

I. PARTE TEÓRICA

1 A RIBOFLAVINA

1.1. Introdução

As vitaminas são compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades na dieta dos seres humanos e da maior parte dos animais, por esta razão são designadas por micronutrientes. São componentes essenciais das coenzimas e dos grupos prostéticos das enzimas, daí o seu papel fundamental no metabolismo celular ³.

As vitaminas dividem-se em dois grupos, as hidrossolúveis e as lipossolúveis. No primeiro grupo incluem-se a tiamina (vitamina B₁), a riboflavina (vitamina B₂), a piridoxina (vitamina B₆), a vitamina B₁₂ e o ácido ascórbico (vitamina C) entre outras. As vitaminas A, D, E e K não são solúveis em água ³.

A riboflavina foi descoberta em 1920 no ovo, foi isolada treze anos mais tarde, mas só em 1935 a sua estrutura foi definida e pela primeira vez foi sintetizada ⁴.

1.2. Estrutura e Propriedades

1.2.1. Estrutura

A cor amarela da riboflavina deve-se à sua estrutura, um sistema de anéis insaturados de isoaloxazina (Fig. 1.a).

A riboflavina tem duas formas radicalares, uma aniónica (Fig. 1.c) e outra neutra (Fig. 1.d), e uma forma totalmente reduzida, a dihidroriboflavina (Fig. 1.b) ⁴.

Esta vitamina pode designar-se pelos seus vários estados de oxidação- redução: a forma inteiramente oxidada é a flavoquinona, a forma radicalar é designada por flavosemiquinona e a forma totalmente reduzida é conhecida por flavohidroquinona.

A vitamina B₂ pode ser fosforilada em sistemas biológicos e depois adenilada, convertendo-se facilmente em duas coenzimas: flavina-mononucleótido (FMN, Fig. 2.a) e flavina - adenina - dinucleótido (FAD, Fig. 2.b) ⁴.

A flavina-mononucleótido foi inicialmente obtida a partir da riboflavina em 1932 ⁴. A co-enzima foi separada da enzima por acidificação e diálise.

Os dois sistemas de anéis da flavina - adenina - dinucleótido encontram-se com um

arranjo estrutural de um anel sobre o outro, tornando-se, deste modo numa molécula quase planar.

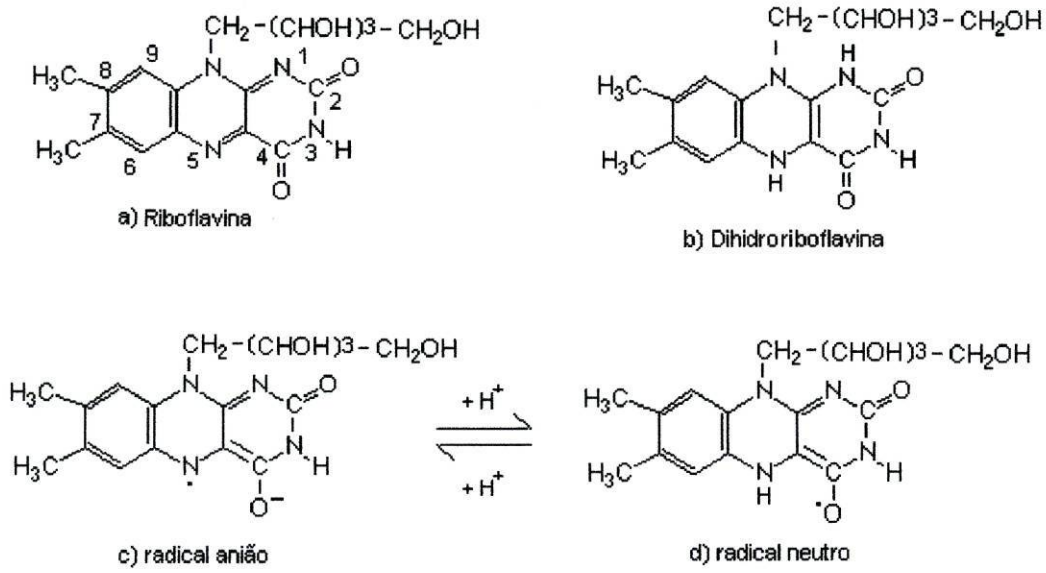


Fig. 1. Fórmulas de estrutura da riboflavina nos vários estados de oxidação redução. 1.a.- Riboflavina- forma totalmente oxidada; 1.b.- Dihidroriboflavina- forma totalmente reduzida, 1.c.- radical anião e 1.d. radical neutro.

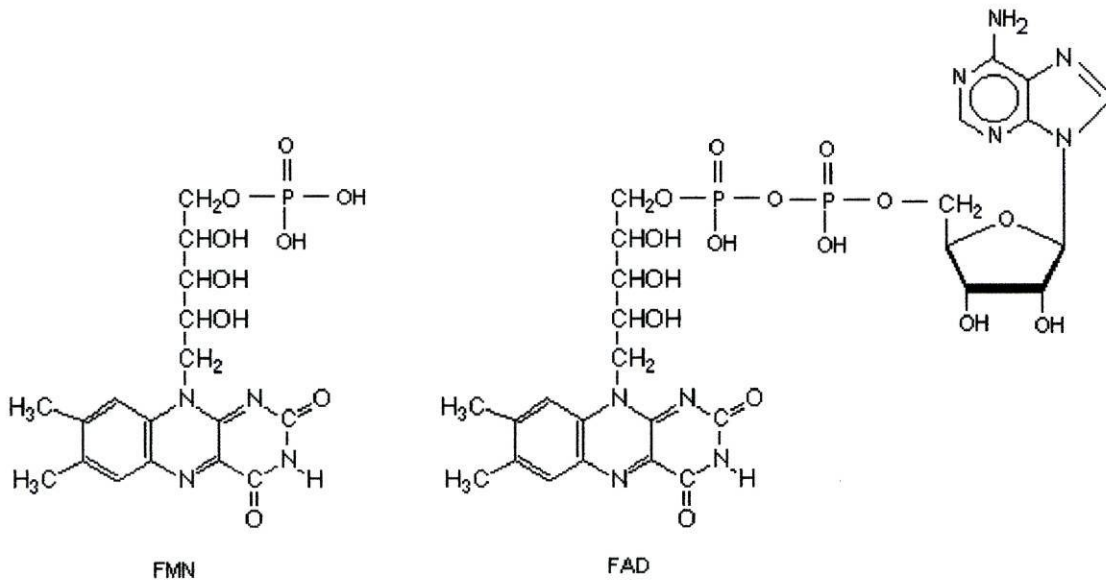


Fig. 2. Fórmulas estruturais das formas coenzimas da riboflavina. 2.a.- flavina-mononucleótido (FMN); 2.b.- flavina - adenina - dinucleótido (FAD).

1.2.2. Propriedades Físico-Químicas

As propriedades catalíticas da riboflavina devem-se exclusivamente à combinação de anéis no sistema de isoaloxazina.

As posições mais reactivas são as correspondentes ao N-1, C-4 e N-5, pertencentes aos anéis de pirazina e pirimidina. Inicialmente pensava-se que o anel benzénico era pouco reactivo, mas agora conhece-se a elevada reactividade de C-8 e C-6 ⁴.

A cadeia linear ligada ao sistema de anéis pode ser facilmente fosforilada.

A riboflavina forma sais de prata vermelhos escuros. Os catiões Cu^+ e Hg^{2+} formam complexos similares aos da prata com a vitamina. As suas cores indicam uma transferência de carga entre o metal e a flavina.

A riboflavina tem uma função de coenzima e é uma das moléculas mais versáteis que participam em reacções de oxidação - redução em processos biológicos devido à sua capacidade de dar e aceitar electrões em sistemas biológicos.

Quando submetida a um processo de oxidação - redução a molécula de riboflavina muda de configuração: a forma oxidada da molécula é planar enquanto que a reduzida perde essa característica.

A forma oxidada das flavinas é a mais conhecida, não só pelo seu comportamento após absorção de luz, mas também devido à sua estabilidade na presença de oxigénio.

A riboflavina pode ser reduzida incorporando dois átomos de hidrogénio, formando-se a 1,5-dihidroflavina que é uma molécula incolor. Esta molécula é re-oxidada na presença de ar.

As duas formas radicalares surgem em diferentes condições: o anião forma-se através da ligação de um electrão à forma oxidada; por sua vez, esta forma pode sofrer uma protonação, originando o radical neutro.

A riboflavina é moderadamente solúvel em água e etanol. É completamente insolúvel em solventes apolares e bastante solúvel em soluções alcalinas diluídas ⁴.

O espectro de absorção e emissão fluorescente da riboflavina em solução aquosa neutra na zona do ultravioleta-visível é o representado na Figura 3. As quatro bandas de absorção mais distintas estão centradas a 446, 375, 265 e 220 nm ⁵.

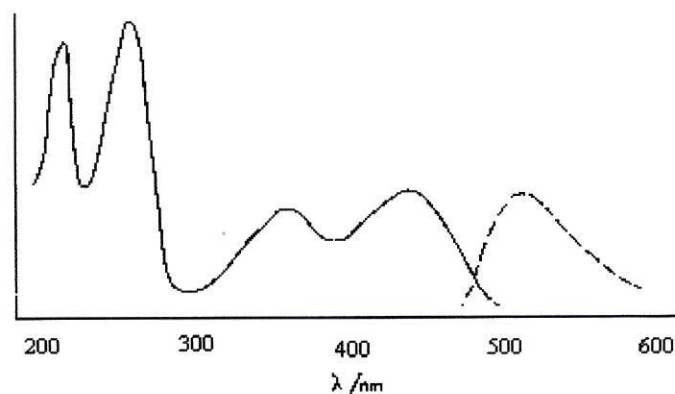


Fig. 3. Espectro de absorção (—) e emissão fluorescente (-----) na zona UV/Vis da riboflavina em solução aquosa neutra.

O coeficiente de extinção molar dos máximos de absorção ($>10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$) indica que estão associados a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

O diagrama de Jablonski das flavinas é o representado na Figura 4 ⁵.

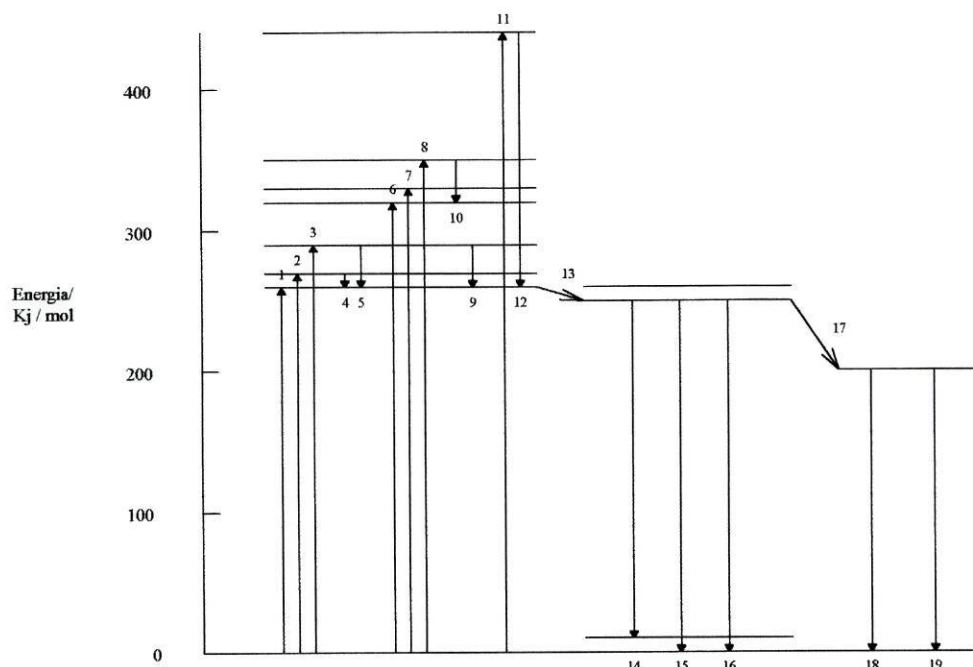


Fig. 4. Diagrama de Jablonski para as flavinas.

A banda centrada em 446 nm corresponde à transição electrónica de menor energia $\pi \rightarrow \pi^*$, à transição do estado fundamental singleto, S_0 , para o primeiro estado excitado com a mesma multiplicidade, S_1 . As transições electrónicas são normalmente acompanhadas por variações vibracionais, daí a possibilidade do electrão ser transferido para qualquer um dos níveis vibracionais desse estado (Fig. 4, transições 1-3).

O pico de absorção a 375 nm deve-se também a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, mas desta vez o electrão transita para o segundo estado electrónico excitado. À semelhança do que acontece a 446 nm prevê-se a existência de três transições vibracionais diferentes (Fig. 4, transições 6-8).

Pouco se sabe relativamente às transições de maior energia cujas bandas estão centradas a 265 nm (Fig. 4, transição 11) e 220 nm. A presença de pares de electrões não ligantes possibilita transições electrónicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$. Embora estas transições tenham baixa probabilidade de ocorrerem devido a restrições de simetria e/ou de sobreposição de orbitais, nas flavinas elas podem ser intensas devido à falta de simetria molecular.

No entanto, há evidências que qualquer transição $n \rightarrow \pi^*$ é mascarada pelas transições mais intensas $\pi \rightarrow \pi^*$.

O electrão tem um tempo de vida finito nos estados de maior energia, tende a regressar ao estado vibracional de menor energia do nível electrónico em que se encontra por relaxamento vibracional (Fig. 4, transições 4,5 e 10), e ao primeiro estado excitado por decaimento não radioactivo (Fig. 4, transições 9 e 12).

A probabilidade do electrão regressar nesta altura ao estado fundamental é máxima.

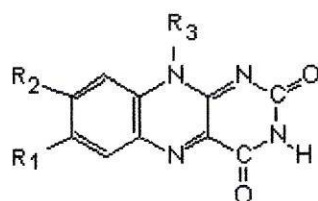
Verifica-se a fluorescência quando ocorre a transição do electrão de um estado excitado singleto para o estado fundamental com a mesma multiplicidade (Fig. 4, transições 14 e 15). Esta desactivação pode ainda ocorrer através de processos não radioactivos (Fig. 4, transição 16).

Quando a desactivação da molécula ocorre associada a uma inversão de spin, há a passagem do electrão do estado singleto para um estado tripleto por interconversão de sistemas (Fig. 4, transição 17). Depois disso, o electrão regressa ao estado fundamental singleto através de processos não radioactivos (Fig. 4, transição 19), ou por fosforescência (Fig. 4, transição 18) ⁵.

A fluorescência das flavinas pode ser reduzida na presença de vários compostos ou

iões. São conhecidos dois mecanismos distintos de redução da fluorescência: o mecanismo estático, onde há associação da flavina no estado fundamental a um composto inibidor e há a formação de um complexo menos fluorescente ou mesmo sem qualquer fluorescência; o mecanismo dinâmico, em que a excitação das flavinas ocorre normalmente, mas um choque com o inibidor provoca a degradação da energia electrónica ⁵.

Uma característica típica da riboflavina é a sua considerável sensibilidade à luz que causa a sua decomposição ^{4, 6, 7, 8, 9}. Durante o processo de decomposição, a cadeia linear ligada ao sistema de anéis da isoaloxazina sofre uma fragmentação podendo formar-se vários foto produtos (Fig. 5.) ⁹.



Composto	R1, R2	R3
Riboflavina (RF)	- CH ₃	- CH ₂ (CH ₂ OH) ₃ -CH ₂ OH
Formilmetilflavina (FMF)	- CH ₃	- CH ₂ CHO
Carboximetilflavina (CMF)	- CH ₃	- CH ₂ COOH
Lumiflavina (LF)	- CH ₃	- CH ₃

Lumicromo (LC)

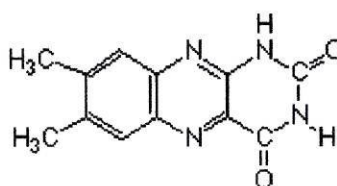


Fig. 5. Estrutura da riboflavina e dos seus foto-produtos

Foram considerados mecanismos para três tipos distintos de reacção: a perda total da cadeia linear e a formação do lumicromo, a oxidação da cadeia lateral e a consequente formação de cetonas e a fragmentação da cadeia com formação da formilmetilflavina e em reacções secundárias de lumiflavina e carboximetilflavina.

A formação de lumicromo ocorre por fotodesalquilação (Fig.6.). A desalquilação envolve a quebra síncrona da ligação N₁₀ - C₁' e C₂' - H na conformação cis-periplanar, com transferência directa de um protão ⁸. Nesta reacção há formação do lumicromo e de um alceno

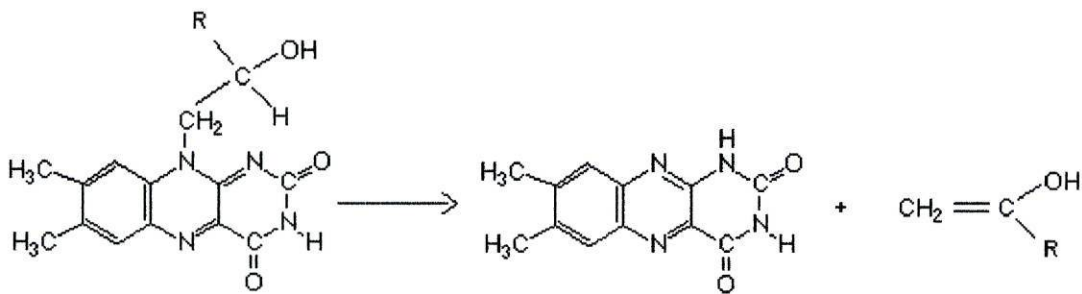
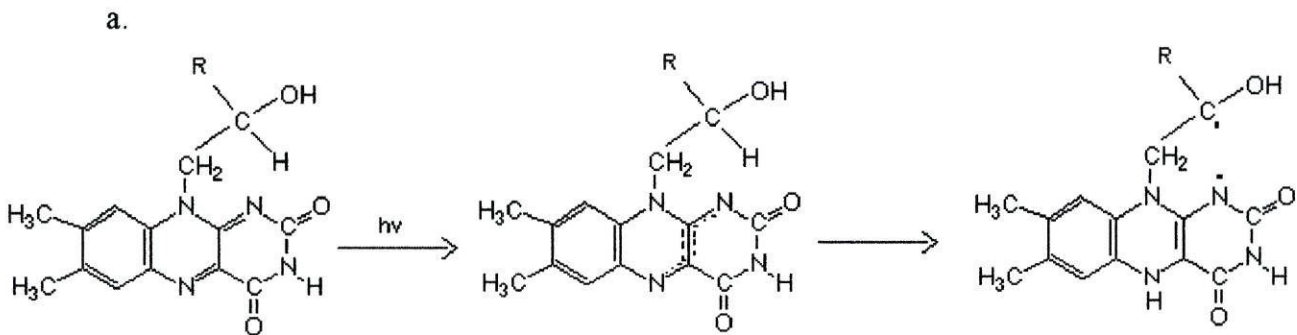


Fig. 6. Reacção de formação do lumicromo ⁸.

O sistema de anéis de isoaloxazina pode ainda sofrer uma fotorredução intramolecular (Fig. 7.). Inicialmente dá-se a remoção de hidrogénio da ligação α-CH e a consequente formação de um dirradical (a.), que conduz posteriormente à formação de uma cetona (b.) ⁵:



b.

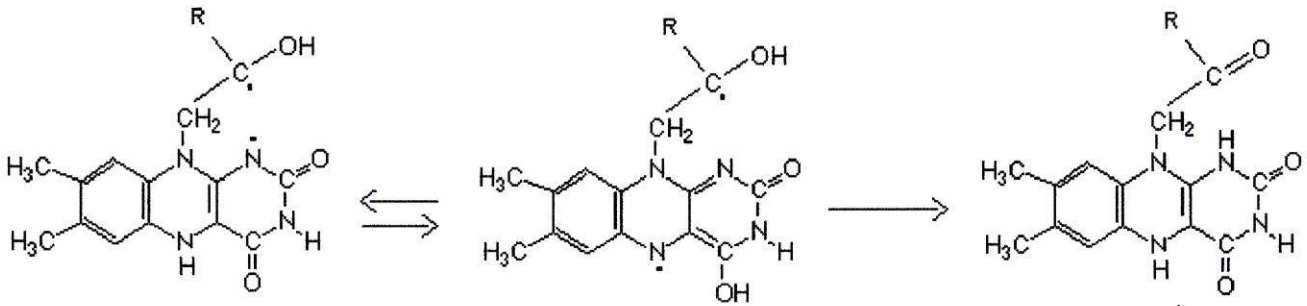


Fig. 7. Mecanismo de formação das cetonas ⁵.

Estudos polarográficos permitiram a Brdicka ⁷ prever a formação da lumiflavina. Numa fase inicial, ocorre a oxidação da cadeia linear e a consequente formação de uma cetona, Figura 8; posteriormente e em condições favoráveis, dá-se a cisão da ligação entre o carbono ligado ao sistema de anéis e o carbono do grupo carbonilo, formando-se um álcool e um aldeído ⁷, Figura 9:

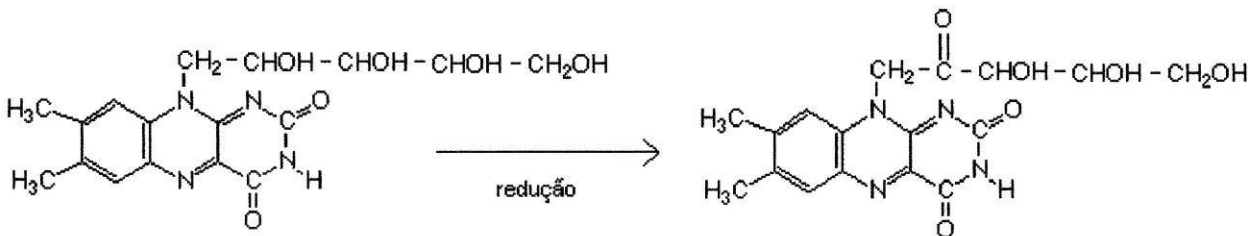


Fig. 8. Formação da cetona por redução da riboflavina segundo Brdicka ⁷.

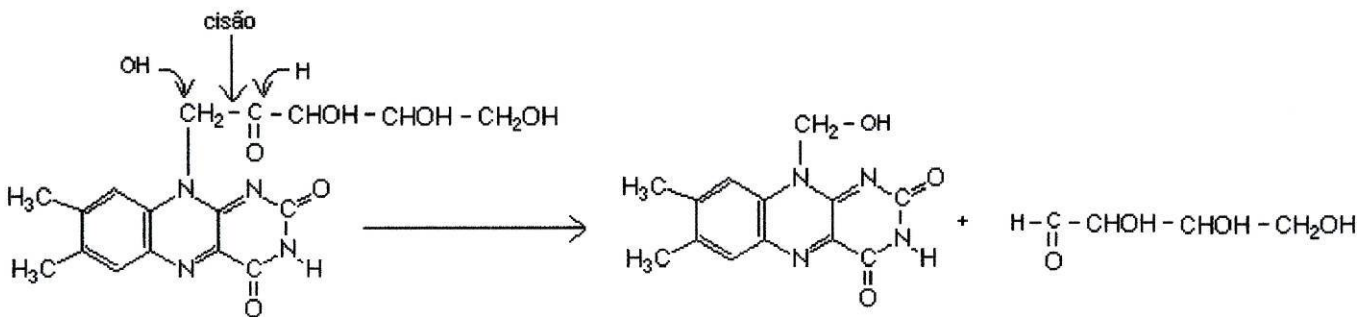


Fig. 9. Cisão da cetona segundo Brdicka ⁷.

Deste modo, a reacção entre o grupo hidroximetilamida e o grupo aldeído, em condições favoráveis, origina a lumiflavina e o ácido eritrónico ⁷ (Fig.10.):

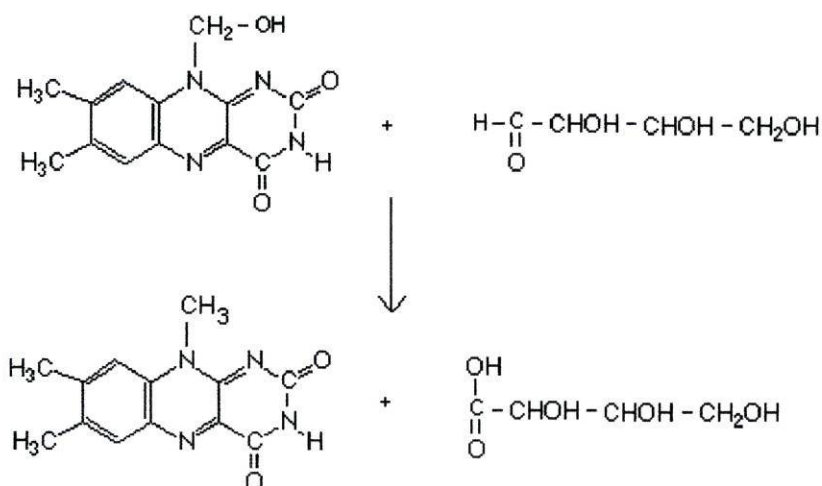


Fig. 10. Formação da lumiflavina segundo Brdicka ⁷.

1.3. Métodos de Determinação

O método mais usado na determinação de riboflavina baseia-se na fluorescência exibida por esta vitamina na zona do verde amarelado quando irradiada com luz ultravioleta. A fluorescência depende da concentração da vitamina e do pH.

De acordo com os métodos de análise adoptados pela “Association of Official Agricultural Chemists”, o comprimento de onda de excitação mais conveniente é 440 nm e a emissão deve ser medida a 565 nm ².

Muitas vezes a determinação de riboflavina em certas matrizes mais complexas, como a urina, tecidos animais e alimentos é feita através da combinação da detecção fluorimétrica com a separação cromatográfica ⁴.

A cromatografia de camada fina (TLC) e principalmente a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) são várias vezes utilizadas nos vários métodos de determinação da vitamina B₂ publicados na literatura ⁴.

Para além dos métodos espectrofluorimétricos e dos métodos cromatográficos, pode utilizar-se, ainda, a voltametria ^{10, 11, 12}, a polarografia ¹³ e a coulometria ¹⁴ para quantificar a riboflavina em diversas matrizes, encontrando-se diversos artigos publicados baseados nestas técnicas de análise química.

Os métodos microbiológicos são também utilizados para a determinação da vitamina. Bactérias como a *Lactobacillus Casei*, a *Leuconostoc Mesenteroides* e a *Tetrahymena Phyriformis* são frequentemente utilizadas para essa determinação ⁴.

Devido à sensibilidade desta vitamina à luz e na presença de soluções básicas, as análises devem ser feitas no escuro e em amostras previamente acidificadas.

1.4. Ocorrência

Os vegetais e as proteínas animais são ricos em riboflavina, mesmo quando cozinhados.

O leite é uma excelente fonte de riboflavina. Aproximadamente um quarto da riboflavina necessária à dieta dos seres humanos é obtida através de leite ou dos seus derivados. Esta vitamina surge, no entanto, em vários alimentos, como mostra a Tabela 1 ⁴:

Alimento	Riboflavina (mg/100g)
Fruta	
Maçã	0.01
Banana	0.04
Citrinos	0.03-0.04
Morango	0.03
Vegetais	
Brócolos	0.27
Couve	0.05
Ervilha	0.14
Cogumelo	0.57
Salsa	0.24
Carne	
Vaca	0.16-0.32
Porco	0.19-0.33
Galinha	0.10-0.28
Peixe	
Bacalhau	0.17
Salmão, lata	0.12
Atum, lata	0.13
Cereais	
Trigo	0.10
Arroz	0.06
Centeio	0.20
Produtos diários	
Queijo	0.54
Ovo	0.48
Leite	0.15-0.17

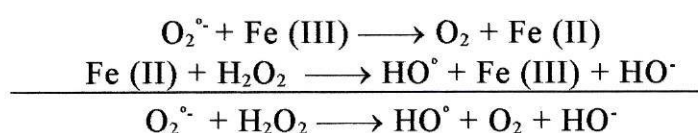
Tab. 1. Quantidade de riboflavina presente em alguns alimentos ⁴

1.5. Estabilidade nos alimentos

Os alimentos que contêm riboflavina podem ser cozinhados sem que ocorra a alteração das características desta vitamina. No entanto, a exposição dos alimentos à luz provoca uma perda rápida de riboflavina.

No leite, por exemplo, ocorre uma diminuição de vitamina B₂ quando este é armazenado em frascos de vidro. O mesmo se passa nos alimentos que sofrem um processo de secagem à luz do sol.

A exposição à luz do soro do leite acelera a degradação da riboflavina. A radiação luminosa conduz à formação do anião superóxido, O₂^{•-}, e de peróxido de hidrogénio, H₂O₂. Na presença do catião ferro (III) (a quantidade deste catião no leite é entre 6 e 12 mg/litro), ocorre a formação do radical hidroxilo, através de uma reacção de Haber-Weiss ⁴:



Esse radical hidroxilo é muito mais reactivo que o anião superóxido e é o responsável pelas reacções de peroxidação dos lípidos e a desnaturação dos ácidos nucleicos. Estudos publicados sugerem que o radical hidroxilo é o principal responsável pela degradação da riboflavina, porque a triptofana, que é conhecida como uma poderosa armadilha para estes radicais, protege a decomposição desta vitamina.

1.6. Presença nos Seres Humanos e outros Animais

1.6.1. *Absorção, Transporte, Distribuição, Armazenagem, Metabolismo e Excreção*

Nos seres humanos e animais a absorção, o metabolismo, as interacções e a excreção da riboflavina são essencialmente controladas por hormonas. Esta regulação centra-se na conversão desta vitamina numa coenzima, essencial ao funcionamento de vários processos biológicos.

Nos alimentos, muitas flavinas estabelecem ligações não covalentes com proteínas e são libertadas durante a digestão; no entanto, há casos em que as ligações são mais fortes e não se verifica a sua ruptura completa.

No organismo humano e animal a maior parte da riboflavina encontra-se na forma de coenzimas como se pode verificar na Tabela 2 ⁴:

Orgão	Total de Flavina (µg/g)	FAD (%)	FMN (%)	Riboflavina (%)
Fígado	26.86	89.0	9.9	1.1
Rim	37.50	61.9	36.5	1.6
Coração	20.66	94.9	4.9	0.2
Cérebro	2.54	87.4	11.4	1.2

Tab. 2. Quantidade de flavina existente nos órgãos dos seres vivos e a forma em que se encontra. Determinação efectuada através de um método baseado em HPLC ⁴.

As coenzimas estão quase sempre associadas a proteínas que as protegem da excreção.

No processo de digestão, as flavinas são libertadas das proteínas às quais estão ligadas. A libertação ocorre com a ajuda das pirofosfatases e fosfatases. A absorção intestinal da riboflavina ocorre de uma forma rápida e em pequenas quantidades, proporcionais à quantidade que existe no organismo.

A riboflavina livre é a forma mais importante das flavinas transportadas nas células. A vitamina encontra-se armazenada nesta forma essencialmente na retina do olho, na urina e no leite de vaca.

O ser humano adulto tem capacidade para conservar a riboflavina no organismo cerca de 2 a 6 semanas.

Nos mamíferos, a conversão de riboflavina nas suas coenzimas ocorre no citoplasma de alguns tecidos celulares, principalmente no intestino delgado, coração, fígado e rins.

O primeiro passo envolve a fosforilação da vitamina, com a transformação de ATP em ADP; esta reacção envolve a perda de energia e é catalisada pela enzima flavoquinase. O produto, FMN, pode ligar-se a várias apoenzimas e formar flavoproteínas. No entanto, a maior parte deste FMN é convertido em FAD numa reacção que envolve novamente o ATP. Este passo é catalisado pela enzima pirofosforilase.

A biossíntese destas coenzimas é regulada por hormonas.

O metabolismo das flavinas nos mamíferos é representado na Figura 11 ⁴:

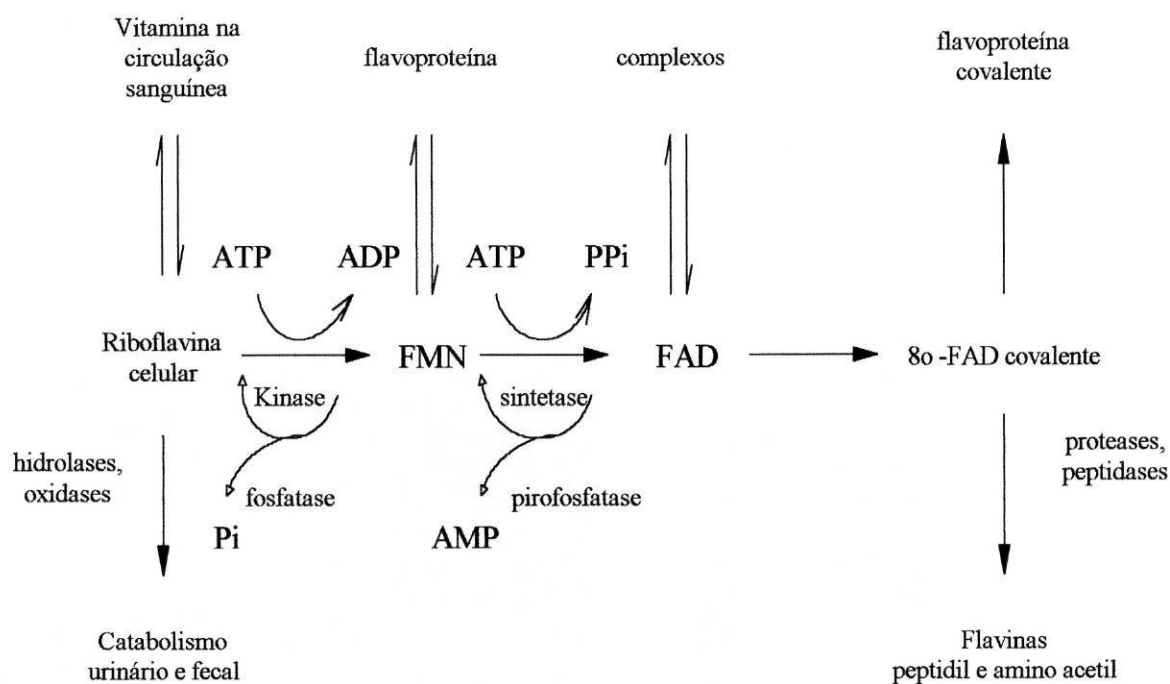


Fig. 11. Metabolismo das flavinas nos mamíferos ⁴

A excreção das flavinas ocorre essencialmente através dos rins. Para além da riboflavina, produtos característicos da sua decomposição são encontrados na urina, o que mostra que provavelmente ocorre a degradação da vitamina dentro do organismo dos seres vivos.

1.6.2. Necessidades

A riboflavina é essencial no metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas.

A quantidade recomendada de riboflavina na dieta dos seres humanos depende da idade e do sexo. As mulheres grávidas e em fase de aleitamento têm necessidades diferentes desta vitamina.

Na Tabela 3 estão descritas as quantidades de riboflavina que são reconhecidas como necessárias ao ser humano:

	Idade	*RDA (mg)
Crianças	0-6 meses	0.4
	6-12 meses	0.6
	1-3 anos	0.8
	4-6 anos	1.0
	7-10 anos	1.4
Homens	11-14 anos	1.6
	15-22 anos	1.7
	23-50 anos	1.6
	+ 50 anos	1.4
Mulheres	11-22 anos	1.3
	+ 23 anos	1.2
Grávidas		1.6
Aleitamento		1.8

Tab. 3. Quantidade de riboflavina recomendada na dieta humana. *RDA-Recommended Dietary Allowances ⁴

Esta vitamina está envolvida na protecção e regulação de certas hormonas, é responsável por uma pele e um cabelo sadio e ajuda na protecção dos glóbulos vermelhos.

Tal como o homem os animais necessitam que a riboflavina faça parte da sua dieta. As necessidades de alguns deles estão escritas na Tabela 4:

Animal	Necessidade de Riboflavina (mg/Kg de dieta)
Gato	3-4
Cão	2.2
Galinha	3-4
Pato	3
Porco	2-4
Vitela	1
Porco	3

Tab. 4. Quantidade de riboflavina reconhecida como necessária na dieta de alguns animais ⁴

1.6.3. Deficiências

As flavinas são compostos activos em diversas áreas do metabolismo.

A deficiência da vitamina prejudica o metabolismo dos hidratos de carbono, dos ácidos gordos, dos amino-ácidos, de algumas vitaminas e interfere na função de vários órgãos.

Uma alimentação desequilibrada é a principal causa desta deficiência.

A carência desta vitamina também pode ser provocada pelo excessivo consumo de álcool. O etanol reduz consideravelmente as propriedades da vitamina.

Diversos estudos efectuados demonstram que o nível de riboflavina em mulheres que usam contraceptivos orais é mais baixo que nas restantes.

A deficiência de riboflavina pode ser indicada pelo aparecimento de lesões nos cantos da boca ou na língua, por modificações nas características da pele e/ou pela diminuição da visão.

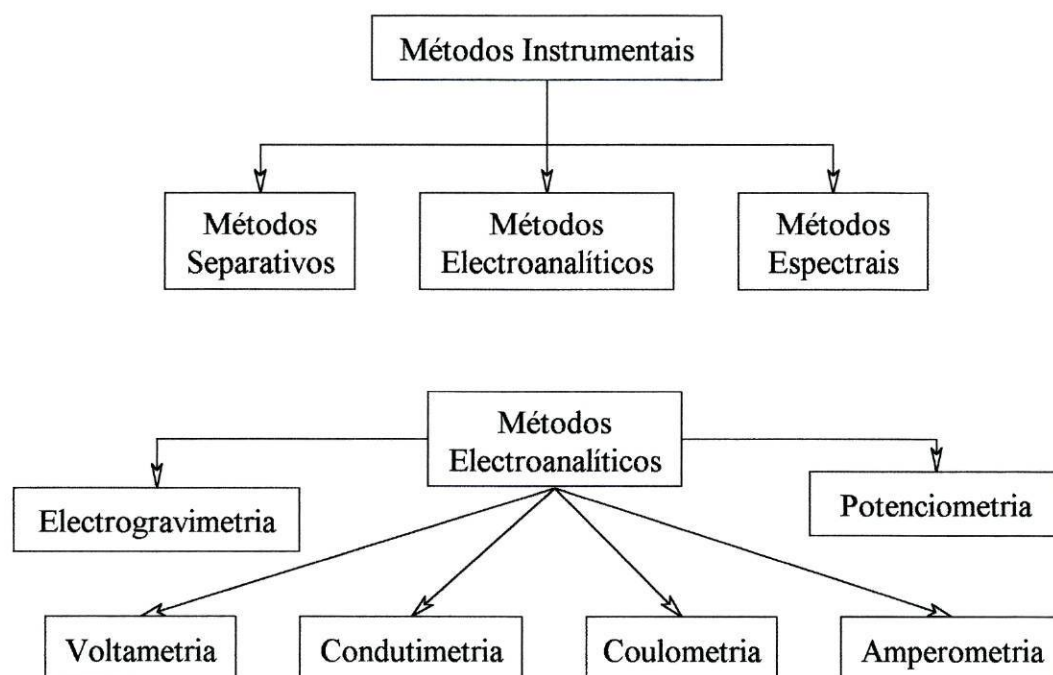
Os sintomas de deficiência de riboflavina nos animais são caracterizados pela falta de apetite, por anomalias na estrutura óssea e pela inibição do crescimento. Em alguns animais pode notar-se inflamações na pele, lesões nos cantos da boca, perda de pelo e o aparecimento de cataratas.

2. ANÁLISE VOLTAMÉTRICA

2.1. Introdução

Nos métodos instrumentais de análise efectua-se a medição do valor de uma propriedade física ou química que possa ser relacionada com a presença de uma determinada espécie na amostra. Essa propriedade pode ser utilizada para realizar uma análise qualitativa e, por vezes, uma análise quantitativa.

Os métodos instrumentais dividem-se em três grandes grupos: espectrais, separativos e electroanalíticos. Cada um destes grupos tem um conjunto de métodos associados.



A voltametria é um método electroanalítico no qual a informação analítica se obtém através da medida da intensidade de corrente em função do potencial aplicado, em condições que favoreçam a polarização do eléctrodo de trabalho. Para favorecer essa polarização, a superfície do eléctrodo de trabalho deve ter uma área reduzida, um microeléctrodo.

O caso particular em que o eléctrodo de trabalho utilizado é o eléctrodo de mercúrio gotejante designa-se por polarografia.

A voltametria é usada fundamentalmente para o estudo de processos de oxidação-redução de muitas espécies orgânicas e inorgânicas. Esta técnica, inventada em 1920, teve grande desenvolvimento na primeira metade do século XX. Após um período de crise nas décadas de 60 e 70, tem vindo a ganhar nova importância, resultante da inovação instrumental e científica, sobretudo no campo da electrónica ¹⁵.

2.2. Instrumentação

2.2.1. Eléctrodo de Mercúrio Gotejante

O eléctrodo mais importante para fins analíticos é o microeléctrodo de mercúrio gotejante (Fig. 12).

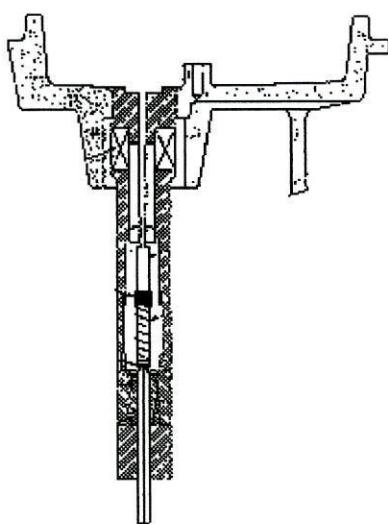


Fig. 12. Eléctrodo de mercúrio gotejante ¹⁵

Este microeléctrodo consiste essencialmente num tubo capilar ligado a um reservatório que contém uma coluna de mercúrio metálico puro. À medida que o mercúrio passa através do capilar forma-se uma gota no orifício de saída. Esta cresce até atingir o tamanho máximo, de forma perfeitamente definida, que depende do raio de abertura do capilar e da tensão superficial entre o mercúrio e a solução. Depois a gota cai e uma outra começa a formar-se e o processo repete-se ¹⁶.

Como eléctrodo indicador em polarografia, o de mercúrio tem vantagens sobre os de metal sólido: o elevado sobrepotencial de H_2 neste metal permite determinar espécies muito menos oxidantes do que o catião H^+ ; o mercúrio forma amálgama com muitos metais, facilitando a redução dos respectivos catiões metálicos; apresenta uma superfície reprodutível para um dado capilar; a constante renovação da superfície elimina possíveis efeitos de passivação ou envenenamento.

Com este microeléctrodo e na ausência de aniões que precipitem com os catiões $Hg(I)$ e $Hg(II)$, na zona anódica pode ser utilizado até potenciais na ordem dos + 0.3 V em relação ao eléctrodo saturado de calomelanos, ESC, e na zona catódica pode ser usado até potenciais da ordem dos -2.8 V (sais de amónio quaternários), -2.0 V (sais de metais alcalinos) ou -1.2 V (soluções 1M em HCl).

Este eléctrodo permite a utilização de dispositivos de desalojamento de gota, o que permite uma maior versatilidade e reprodutibilidade no tempo de gota.

Versões mais modernas têm surgido, em que as medições da intensidade de corrente são feitas após a gota ter parado de crescer, eléctrodo de mercúrio de gota estática, SMDE.

2.2.2. Eléctrodo de Mercúrio de gota suspensa

A principal diferença relativamente ao eléctrodo de mercúrio gotejante deve-se ao facto do eléctrodo de gota suspensa utilizar uma única gota para efectuar toda a experiência. Quando esta é desalojada surge uma outra para nova experiência.

A sua utilização é semelhante à dos eléctrodos sólidos, com a grande vantagem da facilidade de remoção da superfície entre as experiências. Permite a execução de voltamogramas em poucos segundos e a aplicação de técnicas com pré-concentração.

2.2.3. Eléctrodo de Película de Mercúrio

O eléctrodo de película de mercúrio obtém-se por deposição de uma fina camada deste metal num eléctrodo de carbono vítreo.

Este tipo de eléctrodo praticamente só é usado na voltametria de redissolução anódica.

Devido ao facto da camada de mercúrio depositada ser muito fina, não deve ser

utilizado para concentrações superiores a $10^{-7}M$.

Este eléctrodo oferece uma elevada razão área-volume e tem uma elevada facilidade de rotação a uma velocidade elevada.

2.2.4. Eléctrodos Sólidos

Quando se pretende determinar redutores fracos por oxidação temos que substituir o eléctrodo de mercúrio, uma vez que este é facilmente oxidável. Os eléctrodos mais usados em oxidação são eléctrodos sólidos de carbono vítreo e de metais nobres, como o ouro e a platina.

2.3. Métodos Voltamétricos

2.3.1. A Polarografia Clássica

O primeiro método voltamétrico a ser conhecido e utilizado foi a polarografia clássica ou polarografia DC; envolve a aplicação de uma rampa linear de potencial entre dois eléctrodos, um pequeno e facilmente polarizável como o microeléctrodo de mercúrio, e um outro, grande e dificilmente polarizável, o eléctrodo de referência.

A rampa de potencial aplicado tem um valor entre 2 e 5 mV por segundo (por degrau e por gota), para que não se verifique uma grande variação durante o tempo de vida da gota de mercúrio (Fig. 13) ¹⁷.

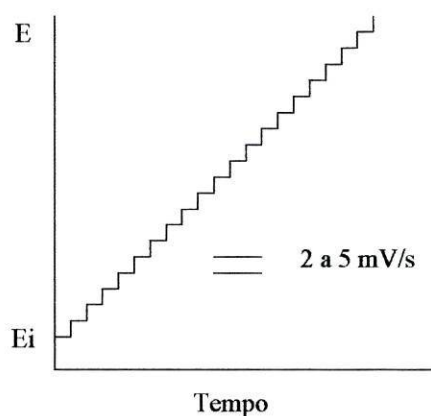


Fig. 13. Variação do potencial com o tempo em polarografia clássica.

A intensidade de corrente observada sofre flutuações periódicas correspondentes à renovação da gota de mercúrio. Quando a gota cai a intensidade de corrente tende para um valor nulo, quando surge uma nova gota no capilar e com o aumento da área do eléctrodo, a superfície onde pode ocorrer a reacção cresce e a intensidade de corrente aumenta (Fig. 14).

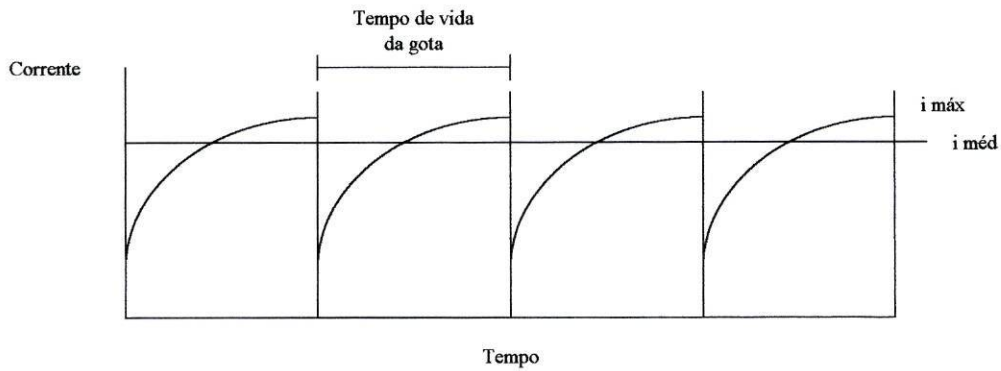


Fig. 14. Variação da intensidade de corrente ao longo do tempo no eléctrodo de mercúrio gotejante.

O facto da superfície da gota, e o conseqüente valor da intensidade de corrente não serem constantes reflecte-se no serrilhado observado nas curvas polarográficas (Fig.15).

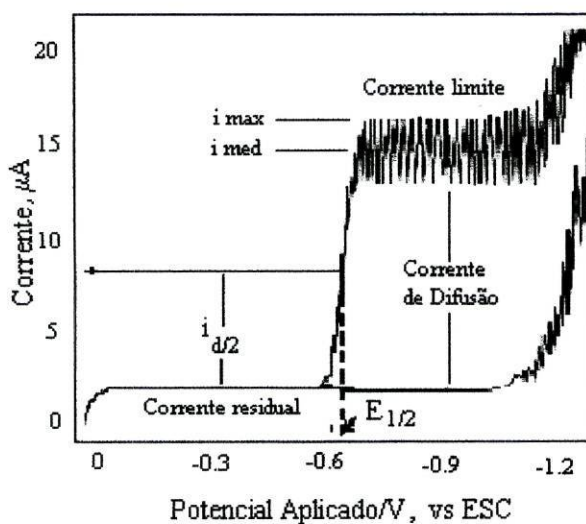


Fig. 15. Exemplo de um polarograma ¹⁵

A intensidade de corrente média é uma constante hipotética que representa a mesma quantidade de carga no tempo de vida da gota, t , que a intensidade de corrente variável real no mesmo período. Em polarografia a intensidade de corrente é controlada por difusão; é com a obtenção no polarograma do seu valor e utilizando a equação de Ilkovic que se determina quantitativamente a espécie pretendida ¹⁵:

$$(id) \text{ máx} = 706 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} c$$

onde $(id) \text{ máx}$ é a intensidade de corrente de difusão máxima em amperes, c a concentração do analito em moles por centímetro cúbico, D é o coeficiente de difusão da espécie que se reduz, expresso em $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, n é o número de electrões consumidos por mole de substância reduzida no eléctrodo, m o caudal de mercúrio em $\text{mg} \cdot \text{s}^{-1}$ e t o tempo, em segundos, que demorou a electrólise.

Para obter a expressão para a intensidade de corrente de difusão média, $(id) \text{ méd}$, basta substituir o 706 da expressão por 607 ¹⁵:

$$(id) \text{ méd} = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} c$$

Para se obter o verdadeiro valor da intensidade de corrente de difusão é necessário fazer uma correcção devida à intensidade de corrente residual, que engloba a intensidade de corrente capacitiva e a intensidade devida á electrólise de impurezas existentes no electrólito. Pode conhecer-se esse valor ao traçar o voltamograma do electrólito de suporte ¹⁵.

Com apenas uma modificação a esta técnica polarográfica clássica, consegue-se uma resposta mais simples.

Este método envolve a medição da intensidade de corrente na parte final da gota, é muitas vezes designado por polarografia TAST.

Os instrumentos voltamétricos mais recentes já estão equipados com um relógio mecânico que mede o tempo da medição da corrente de uma maneira altamente reprodutível.

2.3.2. Técnicas Voltamétricas com Impulso de Potencial

As técnicas polarográficas por impulsos, normal e diferencial, são variantes da técnica polarográfica clássica e têm como principal vantagem um considerável aumento da sensibilidade. Ambas se baseiam na medição da intensidade de corrente num certo intervalo de tempo após a aplicação de um impulso de potencial convenientemente escolhido.

Utilizando-se estas técnicas consegue-se minimizar a contribuição da corrente capacitiva, devido ao reajustamento das cargas na camada dupla, em grande parte resultante da variação do potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho.

2.3.2.1. Voltametria normal com impulsos

Na voltametria normal com impulsos aplica-se um impulso curto, de alguns milissegundos, na parte final do tempo de vida da gota, após o qual o potencial regressa ao seu valor inicial. De gota para gota, o valor do impulso vai crescendo sucessivamente (Fig. 16).

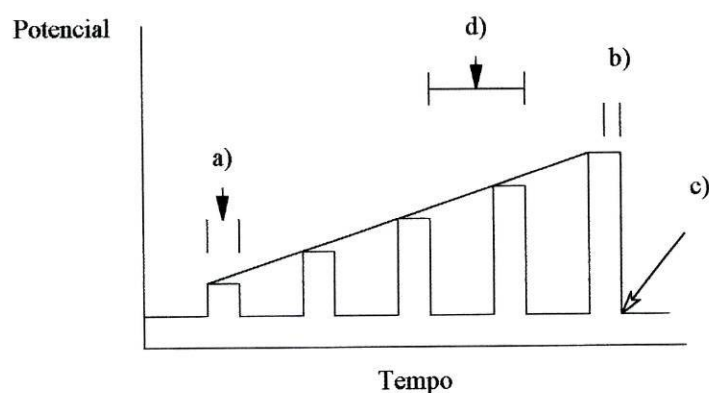


Fig. 16. Variação do potencial com o tempo na voltametria normal com impulsos, onde a) corresponde ao tempo em que o impulso é aplicado, b) o intervalo de tempo em que o mesmo é medido, c) representa o instante em que a gota cai e d) o tempo de vida da gota.

A intensidade de corrente é medida próximo do fim de cada impulso, antes da gota ser desalojada. É no final do tempo de vida da gota que a razão entre a intensidade de corrente faradaica e capacitiva é máxima: embora se verifique uma pequena diminuição da primeira, a intensidade de corrente capacitiva nesse período tende para zero (Fig. 17). A intensidade da corrente medida irá ser quase só devida à componente faradaica.

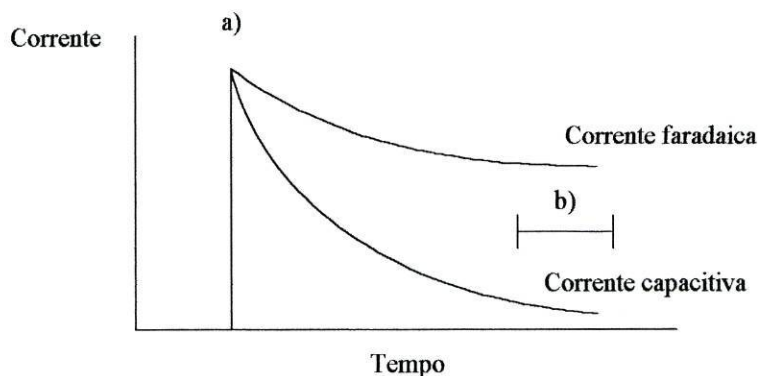


Fig. 17. A variação da intensidade de corrente durante o impulso, onde a) corresponde ao momento em que o impulso é aplicado, b) o intervalo de tempo em que o mesmo é medido

O voltamograma resultante da representação da corrente medida em função do potencial é o mostrado na Figura 18.

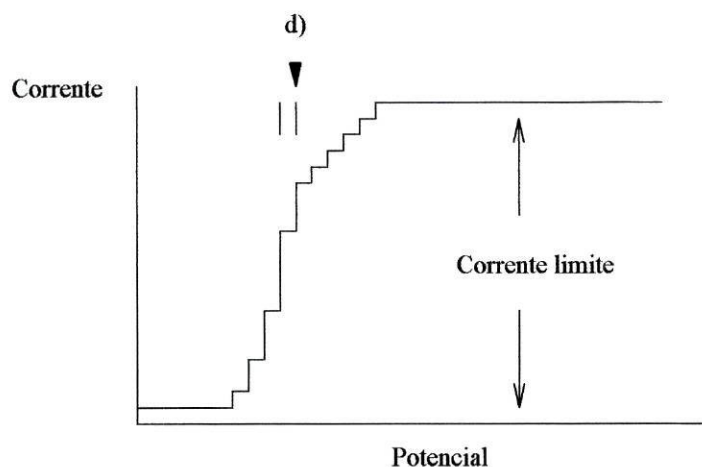


Fig. 18. A representação do voltamograma, onde d) é o tempo de vida da gota.

Este processo é cerca de 10 vezes mais sensível que a polarografia clássica, e é especialmente útil nos casos em que pode haver “envenenamento” do eléctrodo por acumulação de produtos à sua superfície, porque o potencial volta sempre ao valor inicial ¹⁷.

2.3.2.2. Voltametria diferencial com impulsos

A voltametria diferencial com impulsos é caracterizada pela sobreposição de uma série de impulsos curtos e constantes (10 a 100 mV) a uma rampa de potencial idêntica à da polarografia clássica (Fig. 19). Impulsos inferiores a 10 mV implicam uma baixa sensibilidade, superiores a 100 mV afectam a selectividade.

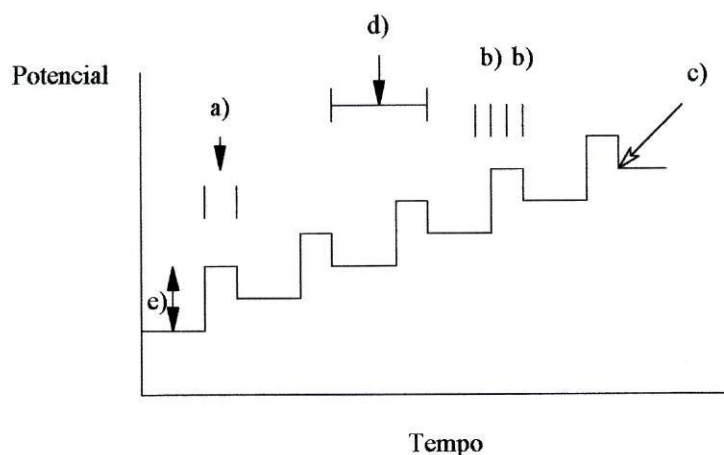


Fig. 19. Variação do potencial com o tempo na voltametria diferencial com impulsos, onde a) corresponde ao tempo em que o impulso é aplicado, b) os dois intervalos de tempo em que o mesmo é medido, c) representa o instante em que a gota cai, d) o tempo de vida da gota e e) a amplitude do impulso.

Duas medições de intensidade de corrente são feitas em cada gota, uma imediatamente antes da aplicação do impulso de potencial, a outra no instante que antecede a queda da gota, para minimizar a contribuição da corrente capacitiva na intensidade de corrente medida.

A intensidade de corrente representada é a diferença entre o valor obtido na parte

final da aplicação do impulso e o observado antes da sua aplicação.

Esta técnica é mais útil sob o ponto de vista analítico, uma vez que a resposta é dada sob a forma de um pico (Fig. 20), o que torna mais simples a sua utilização para fins qualitativos e quantitativos. Para além disso esta técnica é mais sensível que as anteriores ¹⁷.

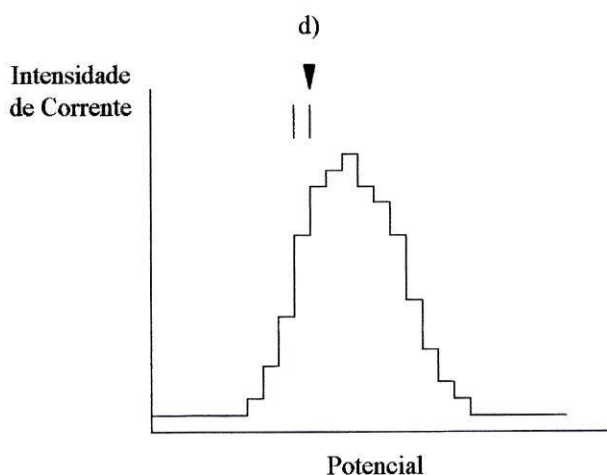


Fig. 20. Variação da intensidade de corrente com o potencial em voltametria diferencial com impulsos onde d) é o tempo de vida da gota.

2.3.2.3. Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada é o tipo de voltametria com impulsos que mais vantagens oferece a nível de velocidade e sensibilidade.

Esta técnica pode realizar-se com um eléctrodo de mercúrio gotejante, no qual o varrimento é efectuado na última metade do tempo de vida da gota e normalizado para compensar o seu crescimento no processo de medida, ou utilizando um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

O sinal obtido resulta da sobreposição de uma onda quadrada a uma rampa de potencial (Fig. 21).

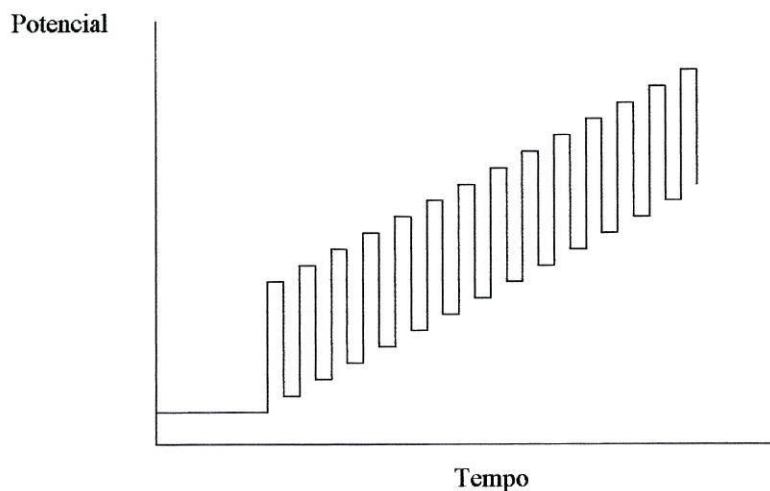


Fig. 21. Variação do potencial com o tempo em voltametria de onda quadrada.

A intensidade de corrente é medida no final do impulso e no final do impulso inverso. O valor de intensidade observado corresponde a essa diferença ¹⁷.

2.3.3. Métodos Voltamétricos com pré acumulação

Os métodos voltamétricos com pré-acumulação são, quando aplicáveis, métodos de análise electroquímica muito sensíveis, tendo por isso despertado um grande interesse nos últimos anos.

Estes métodos desenvolvem-se em duas etapas: há inicialmente a pré-concentração de uma espécie (ou espécies) à superfície do eléctrodo, a um potencial constante (essa espécie pode ser formada electroquimicamente no eléctrodo ou ser uma espécie já existente em solução que é adsorvida), a que se segue a imposição de um varrimento de potencial ao eléctrodo de trabalho, utilizando uma das técnicas anteriormente descritas para oxidar ou reduzir a espécie depositada (Fig. 22). A intensidade de corrente resultante dos processos electroquímicos que eventualmente ocorram é medida ⁴.

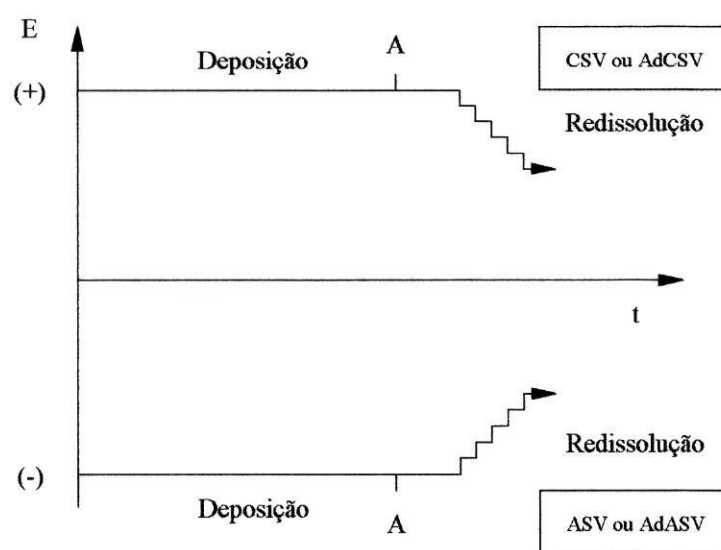


Fig. 22. Dependência do potencial em função do tempo nos métodos de voltametria com redissolução. A - momento em que termina a agitação

Os métodos electroquímicos que envolvem uma pré-concentração dividem-se em electrolíticos e não electrolíticos; distinguem-se entre si pelo facto do processo de pré-concentração ser diferente em cada um deles.

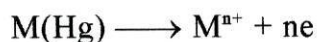
Os primeiros englobam a voltametria de redissolução anódica e catódica. Nos segundos salienta-se a voltametria com adsorção.

A voltametria de redissolução anódica é de grande utilidade na determinação de catiões de certos metais pesados pois tem um limite de determinação muito baixo.

A determinação de quantidades muito pequenas da espécie em estudo é conseguida devido à redução do catião metálico à superfície do eléctrodo, com deposição do metal formando uma amálgama com o mercúrio, a um potencial controlado, mais negativo que o potencial de redução do catião:

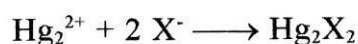
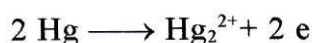


Após essa pré-concentração, é feito um varrimento anódico do potencial, com a redissolução do metal e a medição dos respectivos valores de intensidade de corrente:



A voltametria de redissolução catódica é usada na determinação de espécies que formam sais insolúveis com os iões de mercúrio. O eléctrodo de mercúrio tem um papel activo na formação do depósito.

O eléctrodo é oxidado superficialmente, tendo como consequência a deposição de um filme insolúvel à sua superfície, devido à reacção entre o catião metálico resultante da oxidação do eléctrodo e os aniões presentes em solução:



Após essa pré-concentração, faz-se um varrimento catódico, durante o qual o catião metálico é reduzido:



A voltametria com adsorção baseia-se num processo de pré-concentração distinto dos utilizados nos métodos anteriores, não havendo uma pré-concentração electrolítica. Este método baseia-se no facto de muitos compostos orgânicos existentes em solução poderem ser adsorvidos na superfície de uma fase sólida. Este fenómeno pode ser aproveitado na pré-concentração da espécie à superfície do eléctrodo de trabalho

Se a espécie adsorvida contiver um grupo redutível ou oxidável é possível fazer a sua determinação voltametricamente, varrendo catódica ou anodicamente o potencial, conforme se pretenda reduzir ou oxidar a espécie em estudo.

2.3.4. Voltametria com Adsorção

O desenvolvimento da voltametria com adsorção foi o resultado da investigação das tendências de adsorção espontânea de espécies no eléctrodo, que aumentam a sensibilidade das medições voltamétricas.

Na polarografia clássica, o fenómeno de adsorção era um problema, uma vez que afectava a forma dos polarogramas obtidos, dificultando as medições. Por outro lado, observava-se uma melhoria na corrente induzida por este fenómeno em estudos polarográficos de muitos compostos orgânicos e inorgânicos; por esta razão começou a pensar-se na possibilidade da sua utilização com fins analíticos.

Na voltametria com adsorção, o processo de adsorção espontâneo no eléctrodo estacionário é propositadamente utilizado como passo de pré-concentração de espécies que não podem ser acumuladas por electrólise.

A intensidade da corrente produzida durante o processo de redissolução é a variável medida; a possibilidade de obter uma calibração linear depende simultaneamente do passo de adsorção e do varrimento do potencial ¹⁹.

2.3.4.1. A adsorção na interface eléctrodo-solução

Em electroquímica, adsorção significa a ligação de moléculas ou iões à superfície do eléctrodo.

A interface eléctrodo-electrólito apresenta propriedades diferentes das observadas no seio da solução ou do eléctrodo.

A tendência para atrair e reter as espécies é uma das mais importantes propriedades da interface.

A velocidade de formação da camada adsorvida depende da velocidade de adsorção da espécie no eléctrodo e da velocidade de difusão da espécie do seio da solução até ao eléctrodo. O mais lento dos dois vai ser o que determina a velocidade da reacção.

O equilíbrio que envolve a adsorção que ocorre na camada da interface está representado na Figura 23:

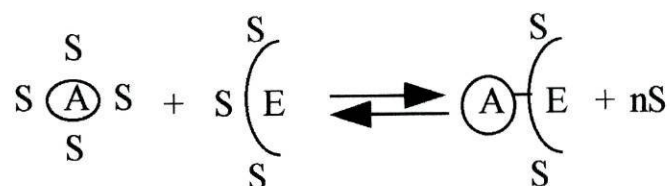


Fig. 23. Equilíbrio de adsorção na camada da interface, onde A é a espécie adsorvida, S o solvente e E o eléctrodo ¹⁹.

De uma forma simplificada pode dizer-se que neste processo as moléculas do solvente à superfície do eléctrodo são substituídas por moléculas da espécie adsorvida.

A relação de equilíbrio entre a concentração da espécie adsorvida na superfície e no interior da solução é dada pela isotérmica de adsorção.

A relação frequentemente mais usada é a isotérmica de Langmuir, que pode ser expressa por:

$$\Gamma = \Gamma_m \left(\frac{BC}{1+BC} \right)$$

onde Γ é a concentração à superfície da espécie adsorvida, Γ_m a concentração à superfície correspondente a uma monocamada completa, C a concentração da espécie em solução e B o coeficiente de adsorção ¹⁹.

Esta isotérmica pode ser representada graficamente por (Fig. 24):

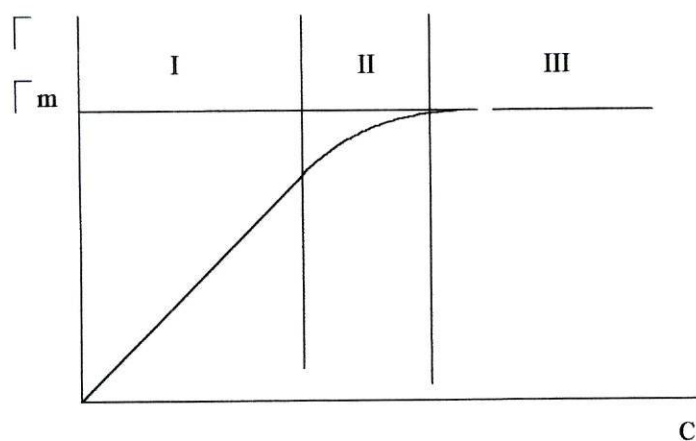


Fig. 24. Variação da concentração da espécie adsorvida em função da sua concentração na solução.

Quando o produto $BC \ll 1$, zona I, a concentração de espécie adsorvida à superfície do eléctrodo é directamente proporcional à concentração desta no seio da solução, $\Gamma = kC$. O aumento de concentração da espécie em solução implica a perda dessa linearidade, zona II. Quando a cobertura total é alcançada, $BC \gg 1$, a concentração de espécie adsorvida atinge o valor máximo e torna-se independente da sua concentração

em solução, zona III.

A situação preferencial em termos quantitativos é sem dúvida a representada na zona I ¹⁸.

2.3.4.2. Sinal Voltamétrico

Quando uma espécie é adsorvida, forma-se uma camada à superfície do eléctrodo; essa espécie fica automaticamente disponível para sofrer uma reacção de oxidação ou redução, sem ter que difundir do seio da solução.

Independentemente do tipo de voltametria usada no processo de redissolução, o valor máximo de intensidade de corrente é directamente proporcional à concentração da espécie na superfície do eléctrodo

$$i_p = k \cdot \Gamma = k \cdot \Gamma_m \cdot \left(\frac{BC}{1 + BC} \right)$$

Para baixas concentrações, $B.C \ll 1$, para as quais este método é normalmente utilizado, a isotérmica de adsorção é linear, pelo que ¹⁸:

$$i_p = k \cdot \Gamma_m \cdot B.C$$

A voltametria diferencial com impulsos é a forma de varrer o potencial mais utilizada, estando disponível na maior parte dos equipamentos comerciais.

A velocidade do varrimento é um factor muito importante na voltametria com adsorção: como as espécies formam uma camada à volta da superfície do eléctrodo, a intensidade de corrente de redução é independente da difusão do reagente, pelo que se pode obter um grande aumento de sensibilidade quando se aumenta a velocidade de varrimento.

No entanto, como a voltametria diferencial com impulsos não é muito compatível com velocidades de varrimento elevadas, a voltametria de onda quadrada começa a tornar-se mais utilizada ¹⁸.

2.3.4.3. Instrumentação

A instrumentação utilizada nos métodos voltamétricos com redissolução é a mesma que é usada nos métodos mais convencionais.

Nos casos em que se faz a redução da espécie adsorvida, deve usar-se o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, com renovação da gota após cada varrimento.

Em processos de oxidação deve usar-se eléctrodos sólidos. A reprodutibilidade destes não é tão boa como a do eléctrodo de mercúrio de gota suspensa e os limites de detecção são mais baixos.

2.3.4.4. Metodologia

Para se obter o máximo de sensibilidade com este tipo de análise voltamétrica é preciso otimizar uma série de parâmetros experimentais, de modo a obterem-se as melhores condições para máxima adsorção durante o processo de acumulação.

Os parâmetros experimentais mais importantes são: o electrólito de suporte, o potencial, o tempo de acumulação, o processo de agitação durante essa pré-concentração, a força iónica, o pH e a temperatura.

Os voltamogramas devem ser inicialmente obtidos com soluções 10^{-7} - 10^{-8} M¹⁸. Ao impor um período inicial de agitação consegue-se um substancial aumento do pico de intensidade de corrente.

Muitos processos de voltametria com adsorção são dependentes do pH.

Normalmente são usadas soluções aquosas diluídas para minimizar os problemas de solubilidade.

O electrólito de suporte também pode afectar a intensidade e a forma do pico.

A temperatura é outra variável que é necessário controlar, uma vez que a altura do pico cresce cerca de 7% por cada grau Celsius que se aumente à temperatura da solução.

A relação entre a quantidade acumulada e o tempo de deposição deve ser linear, o que indica uma velocidade de adsorção constante. Essa velocidade depende da concentração da solução (Fig. 25).

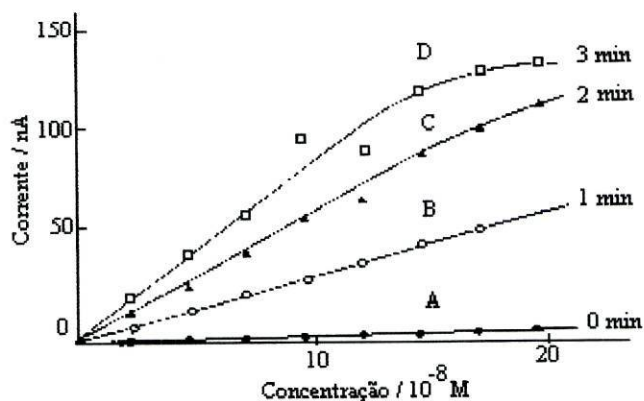


Fig. 25. Efeito da concentração da solução e do tempo de acumulação na intensidade de corrente

A linearidade entre a altura do pico e a concentração normalmente é observada entre 10^{-7} e 10^{-9} M; dependendo das propriedades de adsorção e do tempo de acumulação, o intervalo pode alargar-se para 10^{-6} - 10^{-10} M, podendo chegar aos 10^{-11} M. Para concentrações elevadas há desvios à linearidade devido à saturação da superfície do eléctrodo; como se deve utilizar a parte linear da curva, nestas condições deve diminuir-se o tempo de acumulação e eliminar-se o período de agitação¹⁵.

3. ANÁLISE ESPECTROFLUORIMÉTRICA

3.1. Introdução

Apesar da espectrofluorimetria surgir neste trabalho apenas como método de comparação para avaliar a fiabilidade da voltametria com adsorção na análise da riboflavina, resolveu-se fazer uma apresentação dos seus fundamentos.

Uma molécula ou átomo está no seu estado fundamental quando tem todos os seus electrões nos níveis mais baixos de energia disponíveis.

Um ou mais electrões de um sistema químico, por absorção de energia proveniente de diversos tipos de fontes, pode ser excitado para um nível electrónico superior. Quando o sistema perde o excesso de energia através da reemissão de radiação diz-se que tem um comportamento luminescente.

O fenómeno de luminescência corresponde à emissão de radiação que se pode verificar quando um electrão que está num estado excitado cai para um nível de energia mais baixa. A radiação emitida é caracterizada pela diferença energética entre os dois níveis electrónicos, podendo situar-se na zona do visível, ultravioleta, ou em regiões mais energéticas do espectro.

Uma molécula ou átomo com um spin electrónico total nulo (todos os electrões emparelhados ou dois electrões não emparelhados com spins opostos), está num estado singleto. Ao verificar-se a existência de um electrão não emparelhado ter-se-á um estado duplete. O estado tripleto corresponde a uma situação em que há dois electrões não emparelhados com spins paralelos.

A luminescência divide-se em dois tipos dependendo da natureza do estado a partir do qual se dá a emissão. A fluorescência é a emissão de radiação que se verifica quando se dá a transição de um electrão de um estado excitado singleto para um estado com a mesma multiplicidade de spin, mas de energia mais baixa. A fosforescência corresponde a uma transição de um estado excitado tripleto para um estado singleto de menor energia²⁰.

3.2. Processos de desactivação de uma molécula no estado excitado

Para que possa ocorrer emissão por processos de luminescência, é necessário expor a espécie a radiação na zona do espectro onde a molécula é susceptível de absorver energia.

As transições por absorção têm habitualmente origem a partir do nível vibracional mais baixo do estado fundamental, S_0 . Os electrões passam para qualquer um dos níveis vibracionais de um estado electrónico superior com a mesma multiplicidade, S_1 , S_2 ou mesmo S_3 (Fig. 4, transições 1-3, 6-8 e 11 respectivamente).

Durante o tempo em que a molécula é capaz de permanecer no estado excitado, entre 10^{-8} a 10^{-4} s, o excesso de energia vibracional é dissipado e rapidamente o electrão atinge o nível vibracional mais baixo desse estado excitado, ocorrendo o chamado relaxamento vibracional (Fig. 4, transições 4, 5 e 10). Este decaimento pode resultar de uma transferência de energia por colisões intermoleculares, ou por troca de energia dentro da própria molécula.

A molécula pode passar para um estado electrónico excitado de mais baixa energia através de uma transferência não radiactiva, designada por conversão interna (Fig. 4, transições 9 e 12). Este processo de desactivação é mais provável quando existem dois níveis de energia próximos com a mesma multiplicidade onde há possibilidade de ocorrer a sobreposição de níveis vibracionais devido a possíveis interacções e transferências de energia entre as moléculas excitadas e as do solvente, ou outros solutos, por colisões ou interacções a longa distância. A probabilidade do electrão regressar nesta altura ao estado fundamental é máxima.

Quando um electrão num estado excitado singleto transita para um estado de mais baixa energia com a mesma multiplicidade ocorre a fluorescência (Fig. 4, transições 14 e 15). Pode ainda dar-se a desactivação da molécula por processos não radiactivos (Fig. 4, transição 16).

Quando a desactivação se dá com inversão de spin do electrão excitado e conseqüente alteração da multiplicidade da molécula, diz-se que há uma interconversão de sistemas (Fig. 4, transição 17). Este tipo de mecanismo é mais vulgar em moléculas que contenham estruturas rígidas. Este processo também se dá com maior probabilidade quando existem espécies paramagnéticas em solução, o que faz diminuir a fluorescência.

Depois de ocorrer a interconversão de sistemas a desactivação pode dar-se por fosforescência (Fig. 4, transição 18) ou por processos não radiactivos (Fig. 4, transição 19).

As transições que envolvem alteração de multiplicidade são menos prováveis e têm um tempo de vida médio superior no estado excitado; no entanto estão mais sujeitas a mecanismos de desactivação como a conversão interna e externa, observando-se o fenómeno de fosforescência apenas a temperaturas muito baixas ou em meio viscoso.

3.3. Espectro de Emissão e de Absorção

Qualquer molécula fluorescente tem dois espectros característicos: o espectro de excitação e o espectro de emissão.

O espectro de emissão de um composto resulta da re-emissão de radiação absorvida por essa molécula. Obtém-se o espectro de emissão para um determinado comprimento de onda, fixando-se o monocromador de excitação e variando o monocromador da emissão.

A forma do espectro de excitação deve ser idêntica à do espectro de absorção e independente do comprimento de onda a que a intensidade de fluorescência é medida. Fixando-se o monocromador da emissão e variando o monocromador da excitação obtém-se o espectro de excitação para aquele comprimento de onda de emissão.

Normalmente, o espectro de emissão é a imagem num espelho do espectro de absorção. Esta simetria deve-se à semelhança entre os níveis vibracionais do estado excitado e do estado fundamental, o que permite que a absorção e a emissão ocorram entre os mesmos níveis vibracionais dos diferentes estados electrónicos. De acordo com Franck-Condon todas as transições electrónicas ocorrem sem modificação da posição do núcleo; como resultado deste princípio, se uma determinada molécula tem maior probabilidade de absorver energia e ser excitada para o segundo nível vibracional de um estado excitado, a transição recíproca, também é a mais provável (Fig. 26) ²⁰.

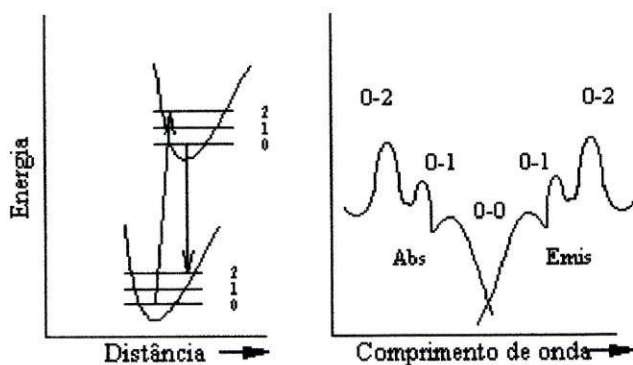


Fig. 26 - Regra do espelho e o princípio de Franck- Condon

Podem ocorrer exceções a esta regra, normalmente indicativas de um rearranjo geométrico no estado excitado ou mesmo de reacções que ocorrem nos estados de maior energia.

3.4. Rendimento Quântico e Tempo de Vida do Estado Excitado

Uma molécula fluorescente pode ser caracterizada pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. A este quociente chama-se Rendimento Quântico, ϕ ²¹:

$$\phi = N^{\circ} \text{ fótons emitidos} / N^{\circ} \text{ fótons absorvidos}$$

Quanto mais elevado o valor de ϕ , mais fluorescente é o composto. Um rendimento quântico próximo de zero indica que uma molécula é muito pouco fluorescente.

O tempo de vida fluorescente de uma determinada molécula, τ , está relacionado com o tempo de semi-vida do seu estado excitado. Após excitação, a probabilidade de se encontrar uma molécula, num estado de maior energia, depois de um tempo t , é $e^{-t/\tau}$.

A relação entre a intensidade de fluorescência, I , e o tempo de tempo de vida, τ , é:

$$I = I_0 \cdot e^{-t/\tau}$$

onde I_0 é a intensidade de fluorescência máxima durante a excitação e t é o tempo após remoção da fonte de excitação ²¹.

3.5. Factores que afectam a fluorescência molecular

O método fluorimétrico é muito dependente das condições do meio, como a temperatura, o pH, a força iónica, etc, mas tal facto pode-se transformar numa vantagem e não numa limitação. O controlo das condições experimentais pode ser utilizado pelo analista para aumentar a sensibilidade e a selectividade do método. A variação de um determinado factor experimental pode ser utilizada para o estudo da espécie em análise.

De um modo geral não é fácil prever se uma molécula é ou não fluorescente. A primeira condição para que se produza a fluorescência é a existência de uma estrutura molecular absorvente.

A fluorescência raramente resulta da absorção de radiação com um comprimento de onda inferior a 250 nm, porque esta radiação é suficientemente energética para provocar uma pré-dissociação. Por este motivo, raramente se observam fenómenos de fluorescência provenientes de transições $\sigma^* \rightarrow \sigma$, mas sim de mecanismos menos energéticos como $\pi^* \rightarrow \pi$ e $\pi^* \rightarrow n$ ¹⁶.

Os compostos que normalmente apresentam fluorescência, com uma intensidade apreciável, são aqueles que contêm grupos funcionais aromáticos com transições de baixa energia $\pi \rightarrow \pi^*$. Também podem apresentar fluorescência os compostos com grupos carbonilo alifáticos e alicíclicos, ou com ligações duplas conjugadas.

A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos são fluorescentes em solução, sendo o rendimento quântico tanto maior quanto maior o número de anéis e o seu grau de condensação ²¹.

Nos compostos heterocíclicos com átomos de azoto a transição electrónica de mais baixa energia envolve uma transição $n \rightarrow \pi^*$, que rapidamente se transforma num estado tripleto e impede a fluorescência. Mas quando há fusão de anéis benzénicos a estes compostos, ocorre um aumento de absorvidade molar o que leva a um tempo de vida do estado excitado menor, observando-se a fluorescência de tais compostos.

A presença de substituintes em anéis aromáticos pode afectar drasticamente o

rendimento quântico e os comprimentos de onda de emissão: grupos doadores de electrões geralmente aumentam a fluorescência, os grupos receptores diminuem o fenómeno ²¹.

As moléculas com uma estrutura rígida planar podem apresentar uma elevada fluorescência; essa estrutura aumenta a interacção e a conjugação do sistema p e uma consequente diminuição da interacção com o solvente e da conversão interna e externa.

As transições $s \rightarrow s^*$ e $s \rightarrow \sigma^*$ nunca conduzem a fenómenos de fluorescência porque a quantidade de energia em jogo leva à quebra de ligações químicas antes de ocorrer a emissão.

O sistema de anéis conjugados da riboflavina justifica a sua tendência fluorescente.

Vários factores experimentais podem influenciar drasticamente a fluorescência em moléculas poliatómicas.

Uma transição electrónica pode ocorrer em 10^{-18} s, isto é, $10^3 - 10^4$ vezes mais rápida que a velocidade de vibração de estiramento de ligação, ou seja, a transição electrónica ocorre antes da variação da distância interatómica. Esta observação é conhecida pelo princípio de Franck - Condon ¹⁶.

A molécula absorve energia e transita sem qualquer alteração para um estado excitado, o chamado estado excitado de Franck - Condon. Aqui, ela é re-orientada pela acção do solvente e atinge um estado excitado de equilíbrio. Ocorre a emissão para um estado fundamental de Franck - Condon e há uma nova re-orientação devido ao solvente, só depois ocorre o regresso ao estado fundamental.

Em solução, os dois estados excitados têm diferentes energias, pelo que os comprimentos de onda de emissão e absorção são diferentes.

No estado excitado de Franck - Condon, a molécula é mais polar; a maior polaridade do solvente vai estabilizar mais este estado que o fundamental, pelo que o espectro de emissão é mais sujeito ao efeito do solvente que o espectro de absorção ²¹.

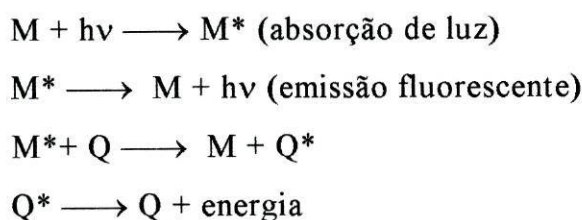
A polaridade do solvente pode assim influenciar as energias de transição: verifica-se um aumento nas $n \rightarrow \pi^*$, sofrendo as $\pi \rightarrow \pi^*$ um efeito oposto.

A fluorescência dum composto aromático com substituintes ácidos ou básicos no anel é geralmente dependente do pH. As duas formas ácido / base têm comprimentos de onda e intensidades de emissão diferentes, observando-se o mesmo na absorção. De um modo geral, pode afirmar-se que a constante de dissociação ácida para a molécula

excitada é menor do que para a mesma espécie no seu estado fundamental.

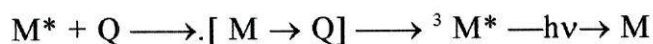
A luz ultra-violeta utilizada para a excitação da molécula pode provocar mudanças no comportamento foto-químico da espécie e/ou a destruição das suas características fluorescentes.

A interacção de espécies não fluorescentes (Q) com fluoróforos (M, moléculas fluorescentes) pode conduzir à diminuição da fluorescência provocada pela competição das reacções. Esse processo pode ser descrito pelo seguinte mecanismo ²¹:



A diminuição da fluorescência pode ser provocada por inúmeros factores.

A presença de átomos pesados, como o iodo, ou de iões paramagnéticos em solução, como o Cu^{2+} e o Fe^{3+} , privilegia a interconversão de sistemas (passagem de um estado excitado singleto para um estado excitado tripleto) e a fosforescência, (regresso ao estado fundamental a partir de em estado excitado tripleto). O resultado é a diminuição da fluorescência. Este efeito possivelmente deve-se à formação de complexos de transferência de carga entre molécula no seu estado excitado singleto M^* e o átomo pesado Q ²¹:



Pode observar-se ainda um desvio no espectro para comprimentos de onda maiores.

A diminuição da temperatura aumenta a intensidade de fluorescência, o que se deve essencialmente ao facto dos processos não radiactivos serem menos eficazes a temperaturas mais baixas. As temperaturas elevadas favorecem a agitação e as colisões entre as partículas, o que provoca uma diminuição da energia das moléculas.

As ligações de hidrogénio entre as moléculas aromáticas substituídas e os solventes ou outros solutos podem também diminuir a intensidade da fluorescência. Como regra, na análise de moléculas que contenham grupos funcionais como -OH, -COOH, -NR₂ ou

-SH, deve-se usar solventes que não formem ligações de hidrogénio com os substituintes.

Uma concentração de oxigénio na ordem dos 10^{-3} M numa solução aquosa, pode reduzir a fluorescência dessa solução em cerca de 20% ²¹. Os compostos aromáticos não substituídos, os aldeídos alifáticos e as cetonas são as espécies mais sensíveis à presença desse gás.

A fluorescência de uma solução é afectada pela sua concentração. Para que se observe a fluorescência, é necessário que ocorra absorção de energia. Também há uma relação de proporcionalidade entre a intensidade da fluorescência e a absorvidade molar: quanto maior a capacidade da espécie em absorver radiação, maior a sua fluorescência. No entanto, se a absorção é muito elevada, a luz não é capaz de passar de forma uniforme através da célula para provocar a mesma excitação em todas as moléculas.

Observa-se uma relação linear entre a fluorescência e as concentrações mais baixas. À medida que se aumenta a concentração verifica-se uma distribuição não uniforme da fluorescência, com a parte da solução mais exposta à fonte a absorver mais radiação do que o resto da solução. Como resultado, ocorre uma maior excitação das moléculas mais próximas da fonte de radiação; com a excitação das moléculas a tornar-se menor à medida que se atravessa a célula. Este fenómeno denomina-se por efeito de filtro interno ²¹.

Muitas moléculas aromáticas têm capacidade de formar dímeros ou outros agregados em solução, tendência que é tanto maior quanto mais elevada a concentração de soluto. Na maior parte dos casos os agregados moleculares são menos fluorescentes que os monómeros.

3.6. Aspectos instrumentais

Nos métodos fluorimétricos é necessário dar uma atenção especial aos aspectos instrumentais. Em primeiro lugar, porque se trata de uma técnica extremamente sensível; além disso, a falta de um fluorímetro ideal conduz a uma distorção dos espectros de excitação e emissão.

Os componentes básicos de um fluorímetro (Fig. 27) são: a fonte de radiação, os

selectores de comprimento de onda, a célula que contém a amostra e o sistema detector²¹.

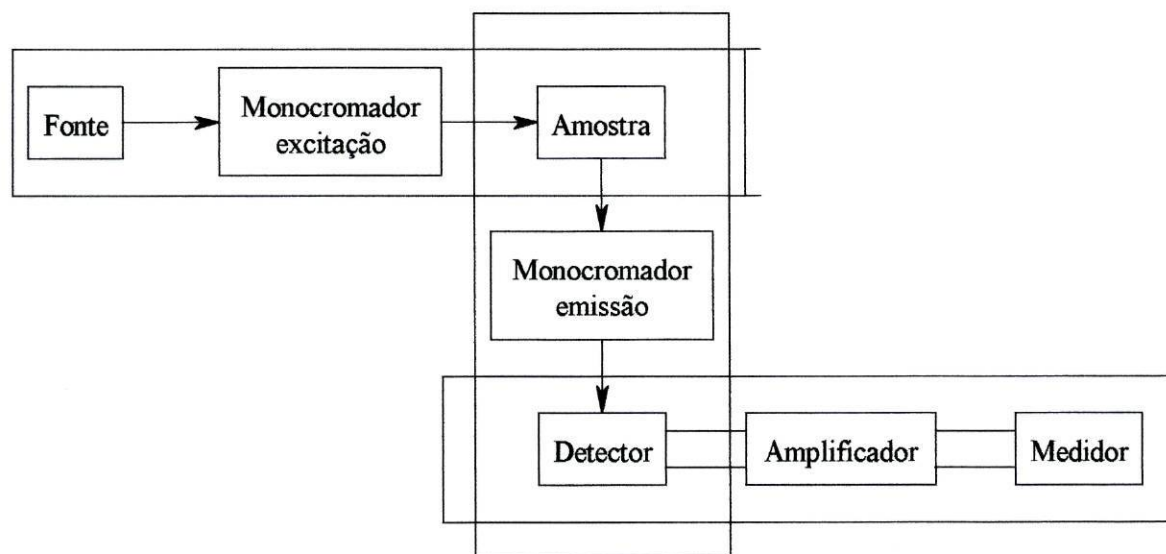


Fig. 27. Diagrama esquemático de um fluorímetro

A fonte emite radiação electromagnética que passa através de uma fenda, que limita a largura da banda, e incide numa célula espectrofluorimétrica. Essa radiação monocromática é parcialmente absorvida pela amostra ao passar pela cuba. O detector é colocado a 90° de maneira a não ser atingido pela radiação não absorvida.

Ao sair da célula, a radiação emitida pela amostra passa pelo segundo monocromador e é enviada para um detector, produzindo um sinal que, se necessário, é amplificado antes de ser enviado para o instrumento de leitura.

As fontes de luz normalmente utilizadas são as lâmpadas de arco de mercúrio ou de xénon. Esta última produz uma radiação intensa devido á passagem de uma corrente através de uma atmosfera de xénon. O espectro é contínuo entre 250 e 600 nm, tendo um máximo a cerca de 470 nm. A lâmpada de arco de mercúrio produz um intenso espectro de riscas. As lâmpadas de alta pressão dão riscas a cerca de 365, 398, 436, 546, 579, 690 e 734 e as de baixa pressão, se forem de sílica, dão também uma radiação bem definida a cerca de 254 nm. Como a fluorescência para a maioria dos compostos pode ser induzida por uma variedade de comprimentos de onda, pelo menos uma das

riscas do mercúrio é apropriada ¹⁶.

Um monocromador é composto por um conjunto de fendas e lentes, juntamente com um elemento que dispersa a radiação, que pode ser um filtro ou uma rede de difracção.

A rede consiste numa peça de vidro ou outro material transparente, na qual se faz uma série de sulcos paralelos e igualmente distanciados. Quando a rede é iluminada pela radiação vinda de uma fenda, cada sulco actua como uma nova fonte de radiação, dando-se uma interferência construtiva entre os feixes de radiação dispersada, o que resulta numa onda de amplitude máxima sempre que o valor da diferença do percurso óptico coincidir com um número inteiro de comprimento de onda.

Pode ainda seleccionar-se os comprimentos de onda com a ajuda de um filtro colocado entre a fonte e a amostra. Para que apenas a luz reflectida da amostra seja detectada, há a inclusão de um filtro secundário entre a célula e o detector. Há vários tipos de filtros, que devem ser escolhidos por forma a absorverem qualquer radiação “parasita” e transmitirem a luz proveniente da amostra.

As células podem ser de vidro, de quartzo ou de sílica fundida. Para comprimentos de onda inferiores a 320 nm, é necessário a utilização de compartimentos de quartzo ou sílica fundida. Tanto podem ser utilizadas células cilíndricas como rectangulares; no entanto, estas últimas são as mais utilizadas, uma vez que a luminescência medida passa perpendicularmente às paredes da cuba, (a medição é feita segundo um ângulo de 90°), minimizando-se assim a reflexão ¹⁶.

O detector deve ser sensível, responder rapidamente numa larga gama de comprimentos de onda, produzir um sinal eléctrico que possa ser facilmente amplificado e ter um pequeno ruído de fundo. Neste método utiliza-se na maior parte das vezes um tipo de detector designado por tubo fotomultiplicador.

Este tipo de detector é constituído por um cátodo, um ânodo e uma série de díodos. Os díodos, que têm a função de um terceiro eléctrodo, são lâminas revestidas a uma película de uma substância com uma pequena força de atracção que repele os electrões. O electrão sai do cátodo, é atraído e acelerado pelo primeiro díodo e parte para o segundo com um potencial positivo adicional, e assim sucessivamente. Este processo pode ser repetido de 10 a 20 vezes, podendo o potencial passar dos 20 para os 110 V.

3.7. Análise quantitativa

A intensidade de radiação fluorescente F é proporcional à intensidade do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema ¹⁵:

$$F = K' (I_0 - I)$$

onde I_0 é a intensidade do feixe incidente e I a intensidade do feixe depois de atravessar uma célula com o comprimento b . A constante K' depende do rendimento quântico do processo de fluorescência. Através da lei de Beer temos ¹⁵:

$$I / I_0 = 10^{-\epsilon bc}$$

onde ϵ corresponde à absorvidade molar e c refere-se à concentração da solução. A partir destas duas equações pode-se dizer que:

$$F = K' I_0 (1 - 10^{-\epsilon bc})$$

Como se pode verificar através da análise aos parâmetros da equação, outros factores para além da concentração podem afectar a intensidade da radiação. Quanto maior a eficiência quântica, maior é essa intensidade. A mesma relação é verificada entre a intensidade da radiação incidente e a intensidade da fluorescência, mas neste caso é necessário tomar algumas precauções porque fontes muito intensas podem provocar a foto-decomposição da amostra. Quanto mais elevada a absorvidade molar, maior será a intensidade de fluorescência do composto.

O termo exponencial da equação anterior pode ser desenvolvido através da série de Maclaurin em ¹⁵:

$$F = K' I_0 [2.303\epsilon bc - (2.303\epsilon bc)^2/2! + (2.303\epsilon bc)^3/3! \dots]$$

Para soluções muito diluídas, em que apenas é absorvida uma pequena fracção de luz, ou seja, em que o termo ϵbc é inferior a 0.05, todos os termos do desenvolvimento

podem ser desprezados relativamente ao primeiro, pelo que, a representação gráfica da intensidade de fluorescência em função da concentração para concentrações baixas é linear:

$$F = K' I_0 2.302 \epsilon bc$$

Para concentrações mais elevadas os termos de ordem superior têm significado e não se verifica um comportamento linear. À medida que se aumenta a concentração, a intensidade de fluorescência atinge um valor máximo podendo mesmo diminuir para concentrações muito elevadas (Fig. 28) ²¹.

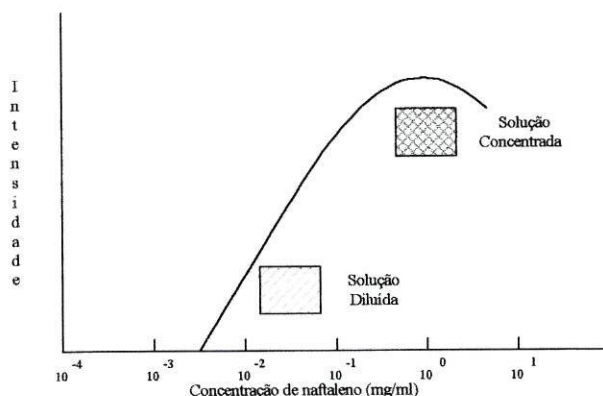


Fig. 28. Relação entre a intensidade da radiação e a concentração da espécie fluorescente

3.8. As Vantagens do Método

A luminescência é uma técnica analítica particularmente importante devido à sua elevada sensibilidade e selectividade. Os métodos fluorimétricos têm a capacidade de detectar concentrações na ordem de uma parte por dez biliões, uma sensibilidade mil vezes superior à de muitos métodos espectrofotométricos.

A principal razão desta grande sensibilidade deve-se ao facto de neste método a radiação emitida ser directamente medida, havendo a possibilidade de a aumentar ou diminuir, alterando a intensidade da energia de excitação. Nos métodos

espectrofotométricos a radiação absorvida é medida indirectamente, a partir da diferença entre a intensidade do feixe incidente e do feixe transmitido, o que conduz a uma grande perda de sensibilidade deste método ²¹.

A selectividade do método deve-se ao facto de serem utilizados dois comprimentos de onda em fluorimetria e apenas um em espectrofotometria. Dois compostos que absorvem radiação ao mesmo comprimento de onda, provavelmente não emitem energia com o mesmo comprimento de onda. A diferença entre os picos de excitação e emissão podem variar entre 10 e 280 nm.

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

1.1. Instrumentação

Análise espectrofluorimétrica

Utilizou-se um espectrofluorímetro RF-5001PC da Shimadzu, associado a um computador equipado com um programa constituído por diversas funções que opera em ambiente DOS.

Análise voltamétrica

Utilizou-se o sistema voltamétrico Autolab PGSTAT10 (Eco Chimie), controlado por um computador equipado com o software GPES para Windows, versão 4.4. O sistema foi acoplado a um posto de voltametria 663 VA da Metrohm, usado no modo HMDE (eléctrodo de mercúrio de gota suspensa).

O sistema de três eléctrodos era completado com um eléctrodo de referência AgCl/Ag (3M KCl) e um eléctrodo auxiliar de carbono.

1.2. Reagentes e soluções

Solução de Riboflavina

Prepararam-se as soluções 10^{-4} M da vitamina por dissolução de 20 mg de riboflavina, Aldrich, em 500 ml de água destilada. As soluções 10^{-5} M foram preparadas diariamente por diluição rigorosa da solução mais concentrada em água destilada. Estas soluções eram conservadas ao abrigo da luz.

Solução de ácido acético

Preparou-se a solução 33 % (v/v) por diluição de ácido acético glacial, Carlo Erba, em água destilada.

Soluções tampão

Preparou-se as soluções de tampão representadas na Tabela 5 por dissolução do reagente (diluição no caso da solução de tampão HCl) em água destilada e ajustou-se o pH ao valor pretendido, com HCl 6 M ou NaOH sólido, conforme o caso.

Solução Tampão	Reagente	pH
HCl	HCl 37% p.a. Pronolab	1
Acetato	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. Merck	4.5
Fosfato	HNa_2PO_4 p.a. Merck	7
Amoniacal	NH_4Cl p.a. Merck	9
Fosfato	HNa_2PO_4 p.a. Merck	12
NaOH	NaOH p.a. Merck	13

Tab. 5. Reagentes utilizados na preparação das soluções tampão.

2. DETERMINAÇÃO DA RIBOFLAVINA POR VOLTAMETRIA DE ADSORÇÃO

2.1. Optimização do processo

O processo de optimização com vista à determinação da riboflavina utilizando a voltametria com adsorção envolveu um estudo sequencial de vários parâmetros experimentais. Utilizou-se dois tipos de varrimento de potencial: diferencial por impulsos e onda quadrada. Estudou-se a influência do electrólito de suporte na intensidade do sinal, fazendo variar o pH, a concentração dos componentes do electrólito e a sua força iónica. Avaliou-se, também, a relação existente entre a quantidade acumulada e o tempo de deposição.

Na Tabela 6 estão descritas as soluções de electrólito utilizadas, as respectivas concentrações e o pH.

Solução	pH
Solução HCl 0.1 M	1
Solução tampão acetato 0.1 M	4,5
Solução tampão acetato 0.01 M	4,5
Solução tampão acetato 0.001 M	4,5
Solução tampão fosfato 0.1 M	7
Solução tampão amoniacal 0.1 M	9
Solução tampão fosfato 0.1 M	12
Solução tampão fosfato 0.01 M	12
Solução tampão fosfato 0.001 M	12
Solução de hidróxido de sódio 0.1 M	13

Tab. 6. Soluções de electrólito utilizadas, as respectivas concentrações e o pH

Para o estudo de cada electrólito colocou-se na célula 10^{-7} M de riboflavina, fez-se o varrimento a diferentes velocidades e com diferentes tempos de acumulação. Adicionou-se novamente a mesma quantidade de vitamina para identificar o pico obtido e avaliar

preliminarmente o seu incremento com a concentração.

Em meios ácidos obtiveram-se melhores resultados com a voltametria diferencial com impulsos. Utilizando-se uma solução de HCl 0.1 M obtiveram-se os voltamogramas representados na Figura 29; à medida que se tentou aumentar a velocidade de varrimento, a definição do pico tornou-se pior devido ao aumento da corrente capacitiva.

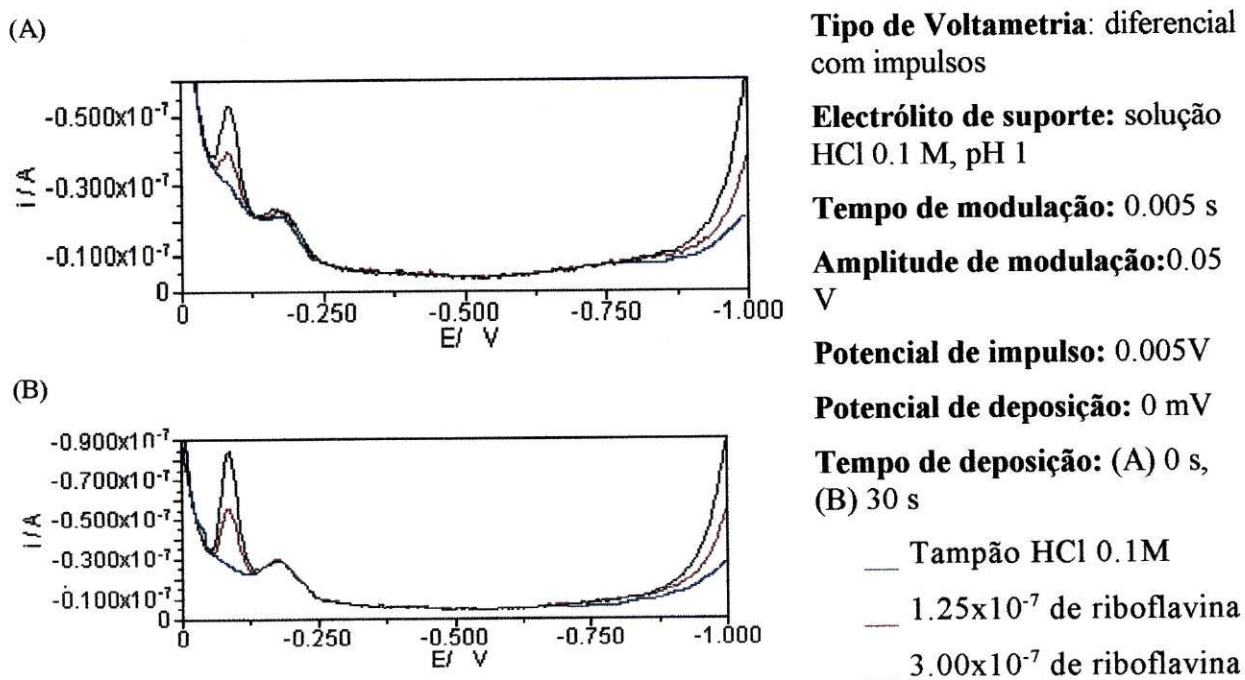


Fig. 29. Análise da riboflavina em solução HCl 0.1M por voltametria diferencial com impulsos.

Usando-se uma solução menos ácida, o tampão acetato 0.1 M, com pH 4.5, verificou-se que a resposta do branco interferia directamente com o sinal da riboflavina. Numa tentativa de melhorar a linha de base diminuiu-se a concentração do tampão para 0.01 M, mas verificou-se que o incremento do pico com a concentração não era linear. Os resultados obtidos estão representados na Figura 30.

Tipo de Voltametria: diferencial com impulsos

Electrólito de suporte: solução tampão acetato 0.01 M, pH 4.5

Tempo de modulação: 0.02 s

Amplitude de modulação: 0.05 V

Potencial de deposição: 0 V

Potencial de impulso: 0.005V

Tempo de deposição: (A) 0 s,
(B) 30 s

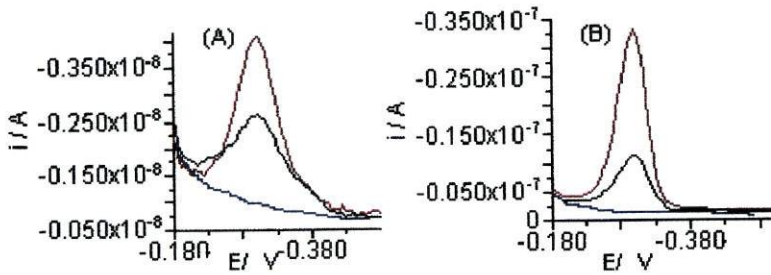


Fig. 30. Análise da riboflavina em tampão acetato 0.01M, pH 4.5, por voltametria diferencial com impulsos, ___ Tampão acetato 0.01M, ___ 1.25×10^{-7} de riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de riboflavina

Em meio neutro verificou-se que a voltametria diferencial com impulsos não permite a quantificação da vitamina. No entanto, a utilização da voltametria de onda quadrada origina sinais bem definidos que permitem essa determinação (Fig. 31).

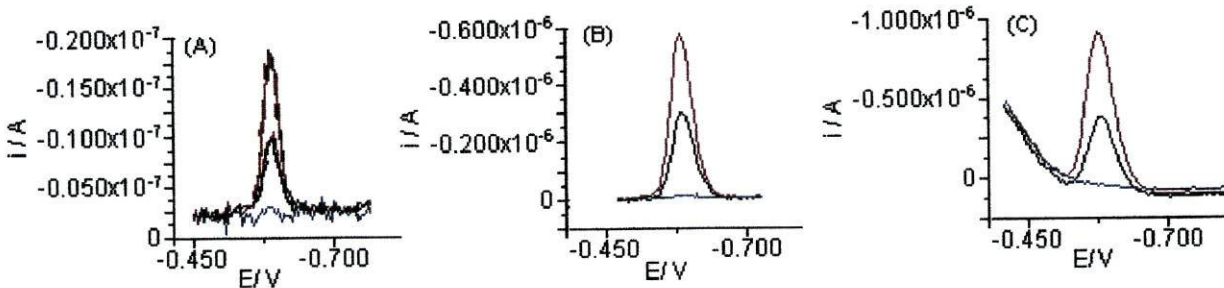


Fig. 31. A influência da frequência na determinação da riboflavina utilizando a voltametria de onda quadrada. (A) 100 Hz, (B) 400 Hz e (C) 800 Hz. ___ Tampão fosfato 0.1M, pH 7, ___ 1.25×10^{-7} de riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de riboflavina. Tempo de acumulação: 0 s, Amplitude: 0.01V e Potencial de impulso: 0.005 V.

Verifica-se que o aumento da frequência favorece o aumento da intensidade de corrente; no entanto, para valores muito elevados, a corrente capacitiva torna-se um factor limitativo. A forma da curva intensidade de corrente em função do potencial aplicado para uma frequência de 800 Hz (Fig. 31, C) reflecte essa limitação, já que a linha de base não é tão conveniente para a quantificação da vitamina. O mesmo não ocorre para frequências mais baixas (Fig. 31, A e B), onde o pico está perfeitamente definido e aumenta proporcionalmente com a concentração da riboflavina adicionada.

As intensidades de corrente observadas nas frequências estudadas para as diferentes concentrações de riboflavina estão representadas na Tabela 7 e na Figura 32:

Frequência	Concentração		
	0 M	1.25×10^{-7} M	3.00×10^{-7} M
100 Hz	0	7.680×10^{-8}	1.664×10^{-7}
400 Hz	0	3.074×10^{-7}	5.882×10^{-7}
800 Hz	0	4.437×10^{-7}	9.445×10^{-7}

Tab. 7. Intensidade de corrente do pico (amperes) em função da concentração da vitamina para diferentes frequências

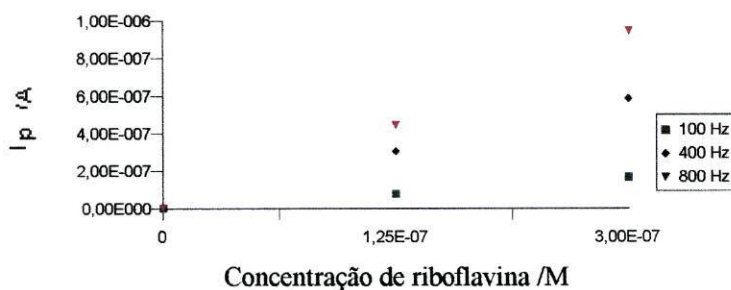


Fig. 32. Relação entre a intensidade de corrente de pico e a concentração da vitamina para as três frequências diferentes ensaiadas.

Ao aumentar o tempo de deposição de zero para trinta segundos, o valor da intensidade de corrente do pico aumenta cerca de cinco vezes, como se pode observar na Figura 33.

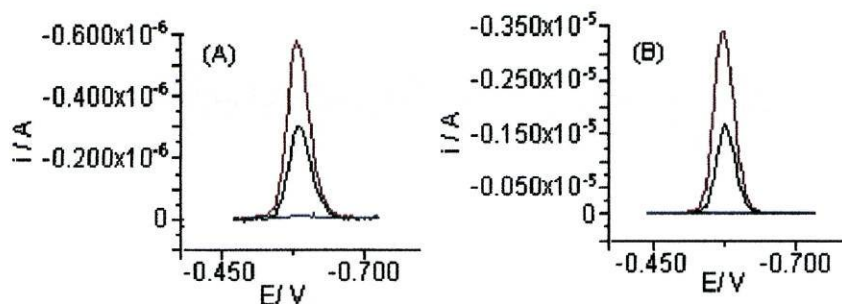


Fig. 33. A influência do tempo de deposição na determinação da riboflavina utilizando a voltametria de onda quadrada. (A) 0s; (B) 30s. ___ Tampão Fosfato 0.1M, pH 7, ___ 1.25×10^{-7} de riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de riboflavina. Frequência 400 Hz, Amplitude: 0.01V e Potencial de impulso: 0.005 V.

Utilizando o tampão amoniacal, 0.1 M, com pH 9, não se obteve uma resposta satisfatória quando se utilizou a voltametria diferencial com impulsos, mas, tal como aconteceu em meio neutro, o sinal da riboflavina é bem definido quando se utiliza a voltametria de onda quadrada com frequências na ordem dos 400 / 800 Hz. Aumentando a velocidade de varrimento, surgem os problemas da corrente capacitiva e uma consequente má definição da linha de base. Na Figura 34, está representada a intensidade de corrente em função do potencial aplicado, para frequências de 400 e 800 Hz, com 0 e 30 segundos de deposição.

Embora se verifique uma boa sensibilidade utilizando estas condições, a relação entre a intensidade de corrente de pico e a concentração de riboflavina não é linear como se pode observar na Tabela 8 e na Figura 35.

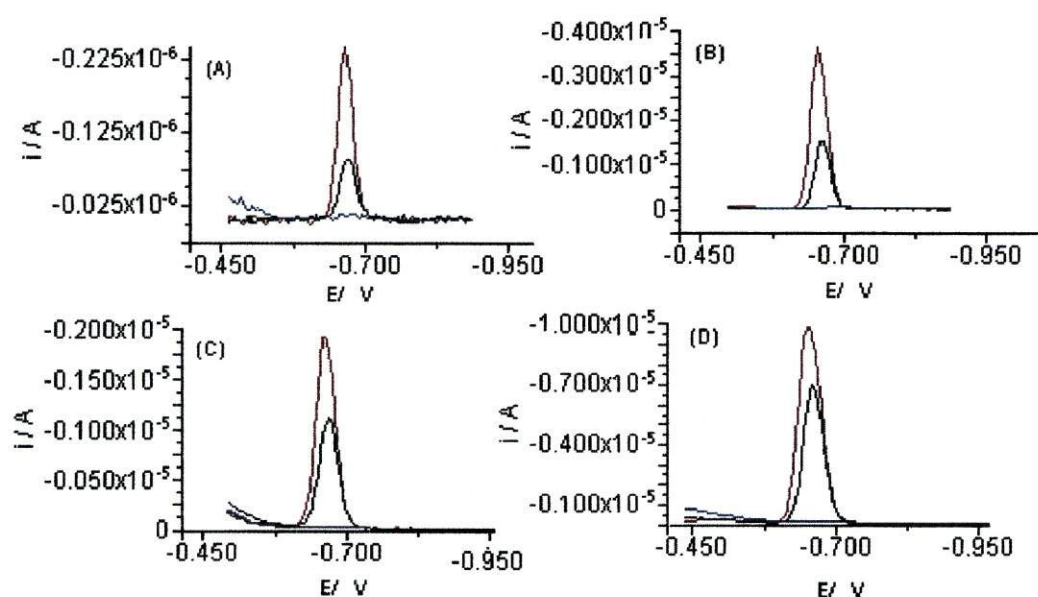


Fig. 34. Influência do tempo de deposição e da frequência na determinação da riboflavina utilizando a voltametria de onda quadrada. (A) 0s e 400 Hz, (B) 30s e 400 Hz, (C) 0s e 800 Hz e (D) 30s e 800 Hz ____ Tampão Amoniacal 0.1M, pH 9, ___ 1.25×10^{-7} de riboflavina, ___ 3.00×10^{-7} de riboflavina. Amplitude: 0.01V e Potencial de impulso: 0.005 V.

Frequência/ Tempo de deposição	Concentração		
	0 M	1.25×10^{-7} M	3.00×10^{-7} M
400 Hz/ 0 s	0	8.064×10^{-8}	2.365×10^{-7}
400 Hz/ 30 s	0	1.531×10^{-6}	3.598×10^{-6}
800 Hz/ 0 s	0	1.104×10^{-6}	1.891×10^{-6}
800 Hz/30 s	0	6.921×10^{-6}	9.873×10^{-6}

Tab. 8. Intensidade de corrente do pico (amperes) em função da concentração da vitamina para diferentes frequências e tempos de deposição.

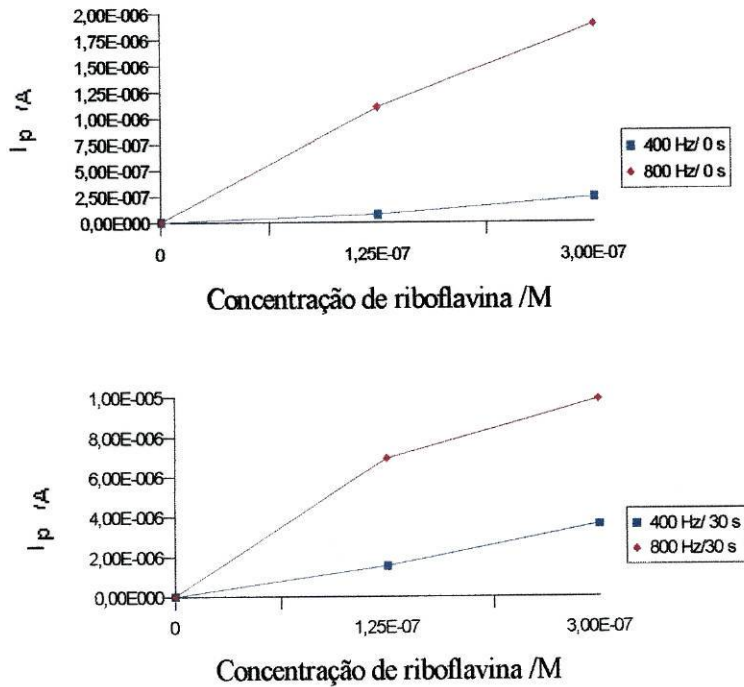


Fig. 35. Intensidade de corrente de pico em função da concentração da vitamina para diferentes frequências e tempos de acumulação

Para valores de pH mais elevados surgiram muitas dificuldades na compreensão da resposta da riboflavina.

Utilizando-se o tampão fosfato com pH 12, para menores frequências surge um sinal com relativa intensidade a um potencial de -0.81V. Quando se aumenta a frequência esse sinal deixa de ter significado quando comparado com um outro que surge a um potencial de -0.66 V. Os dois aumentam com a adição de riboflavina (Fig. 36)

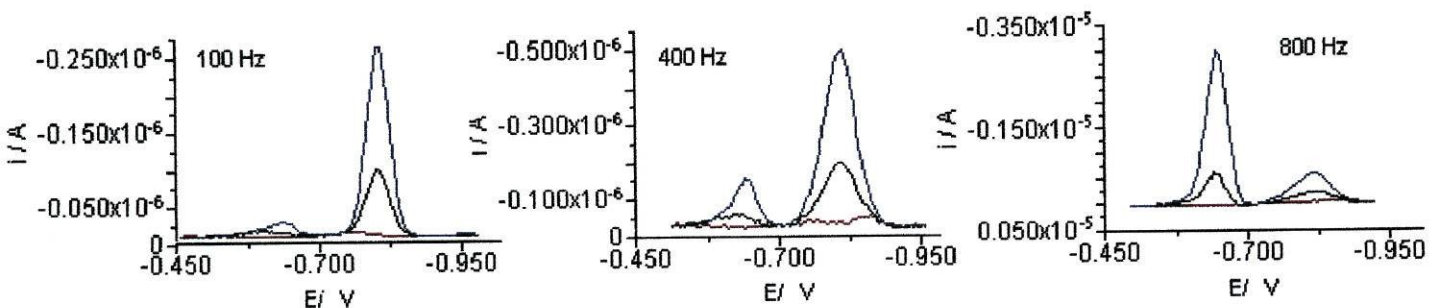


Fig. 36. Influência da frequência na determinação da riboflavina utilizando tampão fosfato 0.01M, pH 12 com força iônica controlada.

O sinal do tampão NaOH, seja qual for a sua concentração, mascara a resposta da riboflavina se esta estiver em pequena quantidade.

Com base nos resultados obtidos, seleccionou-se o tampão fosfato 0.1 M, pH 7 como o mais adequado à determinação da riboflavina. O procedimento analítico é o seguinte:

1. Adição da amostra a 25 ml de tampão fosfato 0.1 M, pH 7, seguindo-se a desoxigenação da solução durante 10 minutos (após cada adição de padrão o tempo de desoxigenação é de 30 segundos)

2. Análise voltamétrica nas seguintes condições:

- Tipo de voltametria: Onda Quadrada
- Potencial de Deposição: -0.2 V
- Tempo de Deposição: 30 s
- Frequência: várias
- Potencial de Impulso: 0.005 V
- Amplitude: 0.01 V

3. Adição de padrão, seguida de nova análise voltamétrica.

Inicialmente procedeu-se à análise de uma série de soluções de riboflavina de concentrações conhecidas. Atendendo à sua pouca solubilidade e à precisão da balança analítica, fez-se a diluição rigorosa de cerca de 20 mg em 500 ml de água desionizada.

A solução tampão 0.1 M foi preparada a partir do hidrogenofostato de sódio, obtendo-se o pH 7 por adição de umas gotas de HCl 6M.

Analisou-se a riboflavina utilizando-se voltametria de onda quadrada e adições sucessivas de solução padrão, nas condições descritas no procedimento anterior.

Para valores de frequência baixos, não há uma proporcionalidade entre a concentração de riboflavina e a intensidade do sinal, como se observa na Figura 37:

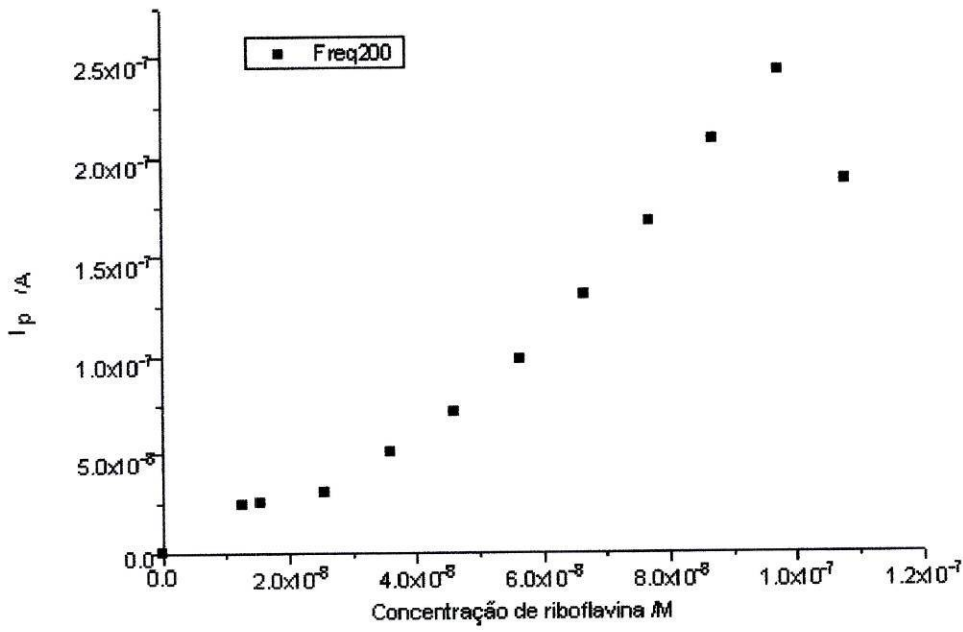


Fig. 37. Intensidade de corrente de pico em função da concentração da riboflavina a 200 Hz.

Para frequências mais elevadas essa proporcionalidade verifica-se, conforme se pode observar nos resultados representados nas Figura 38 e 39:

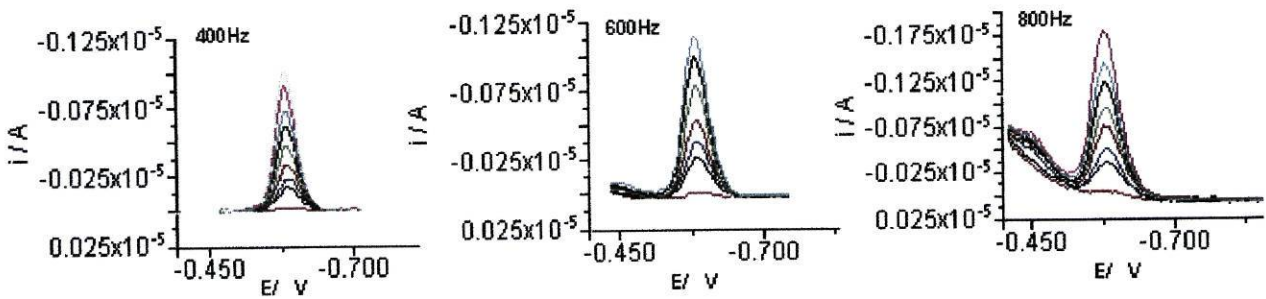


Fig. 38. Adições sucessivas de solução padrão de riboflavina.

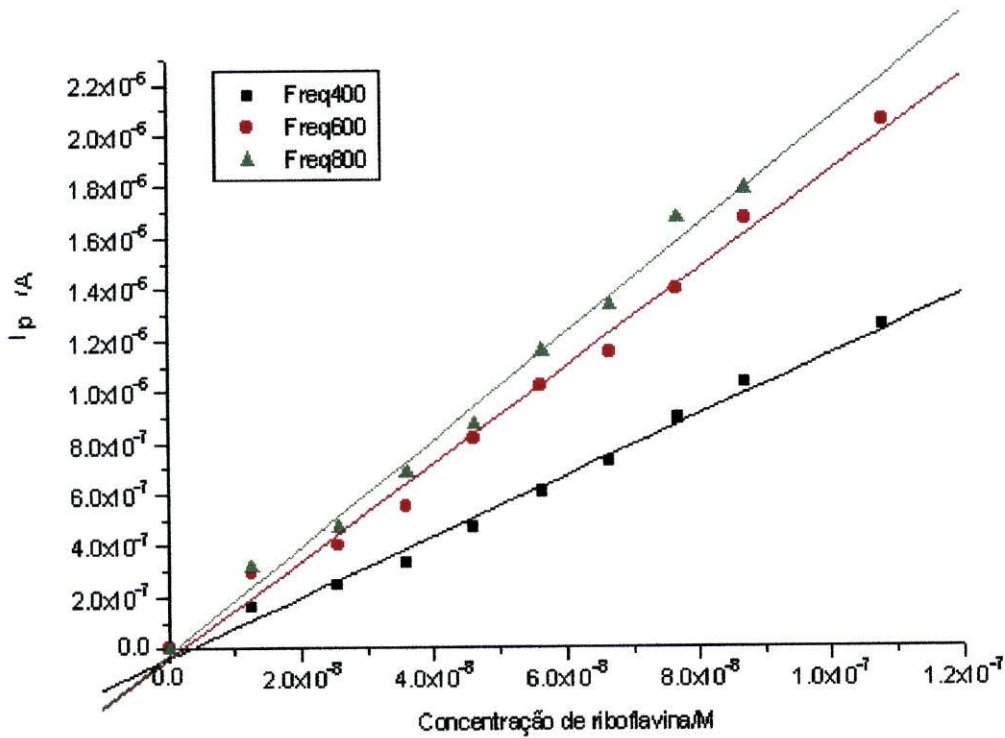


Fig. 39. Intensidade de corrente de pico em função da concentração da riboflavina (curvas de calibração obtidas a partir dos resultados apresentados na Figura 38)

As equações das rectas que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguintes:

400 Hz	$I_p (A) = -3.721 \times 10^{-8} + 11.811 M$
600 Hz	$I_p (A) = -4.214 \times 10^{-8} + 18.977 M$
800 Hz	$I_p (A) = -2.827 \times 10^{-8} + 20.803 M$

2.2. Influência da luz

Inicialmente, o estudo das condições para a determinação da riboflavina foi efectuado sem a preocupação de colocar as soluções no escuro. No entanto, como já foi referido várias vezes ao longo deste trabalho, esta vitamina é sensível à luz.

Para verificar a influência da luz, fizeram-se determinações consecutivas de riboflavina nas condições referidas na secção anterior, no escuro e na presença da luz natural. As primeiro quatro análises foram feitas com a célula tapada (Fig. 40). Retirou-se a protecção da célula e repetiu-se as análises com a mesma frequência (Fig. 41).

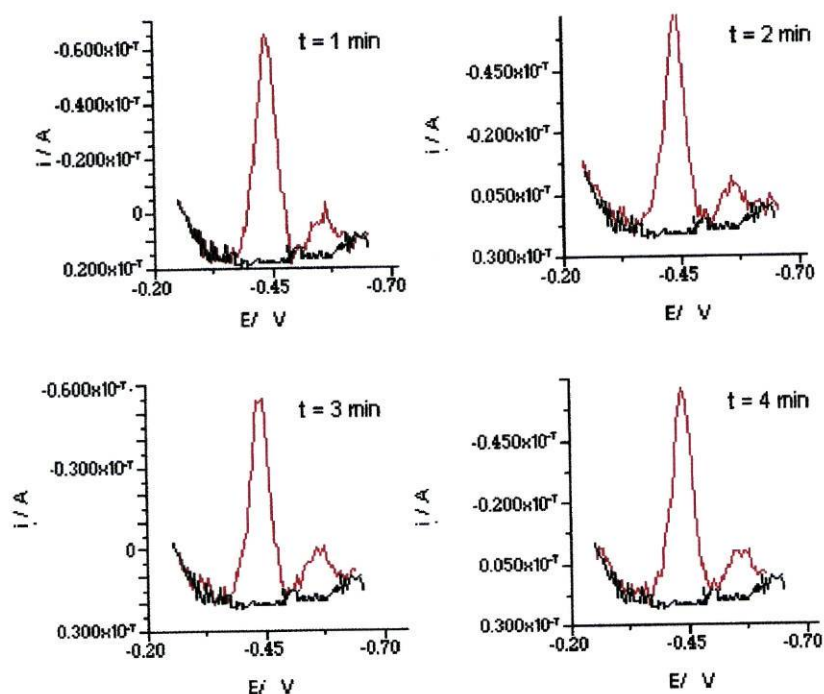


Fig. 40. Análises consecutivas de 2.56×10^{-7} M de riboflavina a 400 Hz, em tampão fosfato 0.1M, pH 7, com a célula protegida da luz.

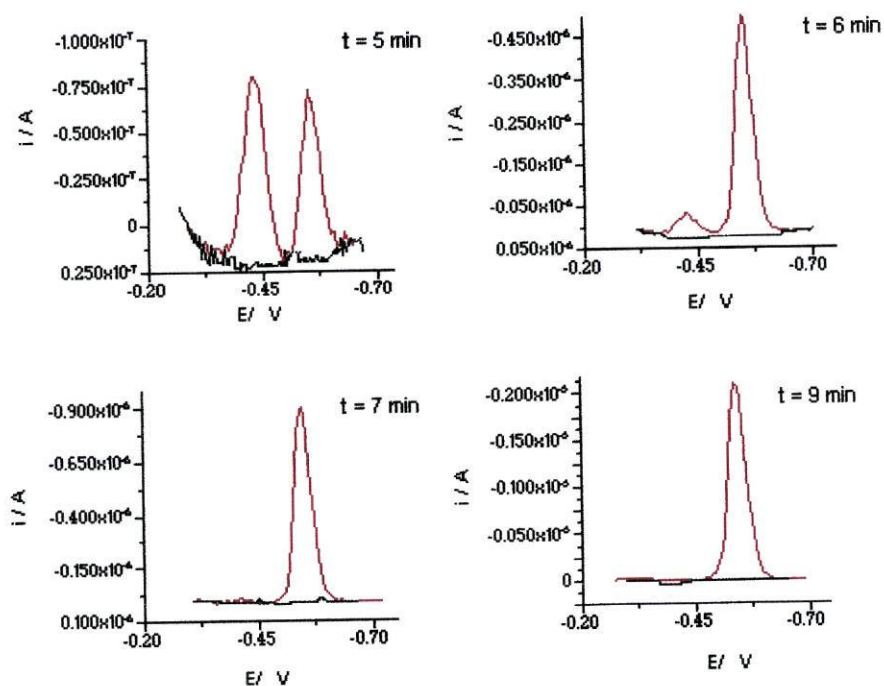


Fig. 41. Análises consecutivas de 2.56×10^{-7} M de riboflavina a 400 Hz, em tampão fosfato 0.1M, pH 7, logo após a exposição da célula à luz ambiente.

Como se pode observar na Figura 40, o sinal voltamétrico obtido na análise no escuro de uma solução 2.56×10^{-7} M de riboflavina é composto por dois picos de intensidades diferentes, um a -0.43 V com um valor cerca de 60 nA e outro, ligeiramente à direita com uma intensidade muito menor.

Logo que a solução entra em contacto com a luz, o segundo pico, a -0.55 V, aumenta rapidamente, atingindo uma intensidade de corrente muito maior que o primeiro, que praticamente desaparece, Figura 41.

A evolução dos dois sinais com o tempo e com as condições de luz está representada na Figura 42:

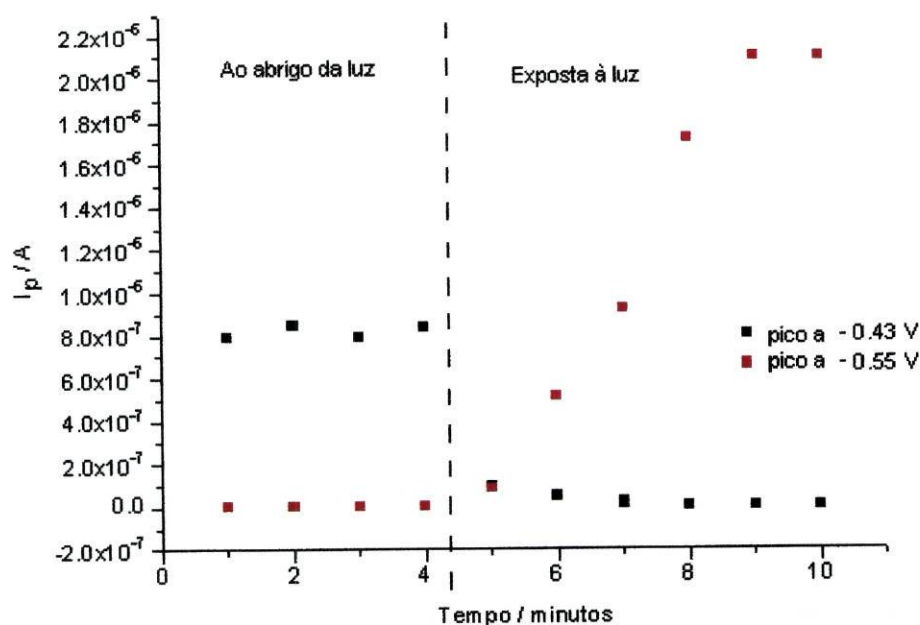


Fig. 42. Influência do tempo de exposição à luz na determinação da riboflavina.

De acordo com estes resultados experimentais, pode interpretar-se a variação das intensidades dos sinais como sendo respostas de espécies diferentes.

Estes resultados indicam que, no escuro, a vitamina pode ser determinada a -0.43 V. A presença de luz desencadeia a sua rápida decomposição, formando-se um ou mais produtos que respondem a um potencial ligeiramente mais negativo, -0.55 V.

A optimização do processo de determinação da riboflavina apresentada anteriormente, foi feito na presença da luz, provavelmente o que se considerou não foi a

resposta da riboflavina mas sim do(s) seu(s) produto(s) de degradação. No entanto, resolveu manter-se o procedimento para a determinação da vitamina.

Numa tentativa de entender o comportamento da riboflavina na presença e na ausência de luz, estudou-se a evolução dos dois sinais em diferentes condições, estando os resultados expressos na Figura 43. Utilizando como electrólito uma solução 0.1M de tampão fosfato com pH 7 estudou-se também a relação entre a concentração da vitamina e a sua velocidade de degradação, analisando soluções com 2×10^{-7} , 2×10^{-6} e 2×10^{-5} M de riboflavina.

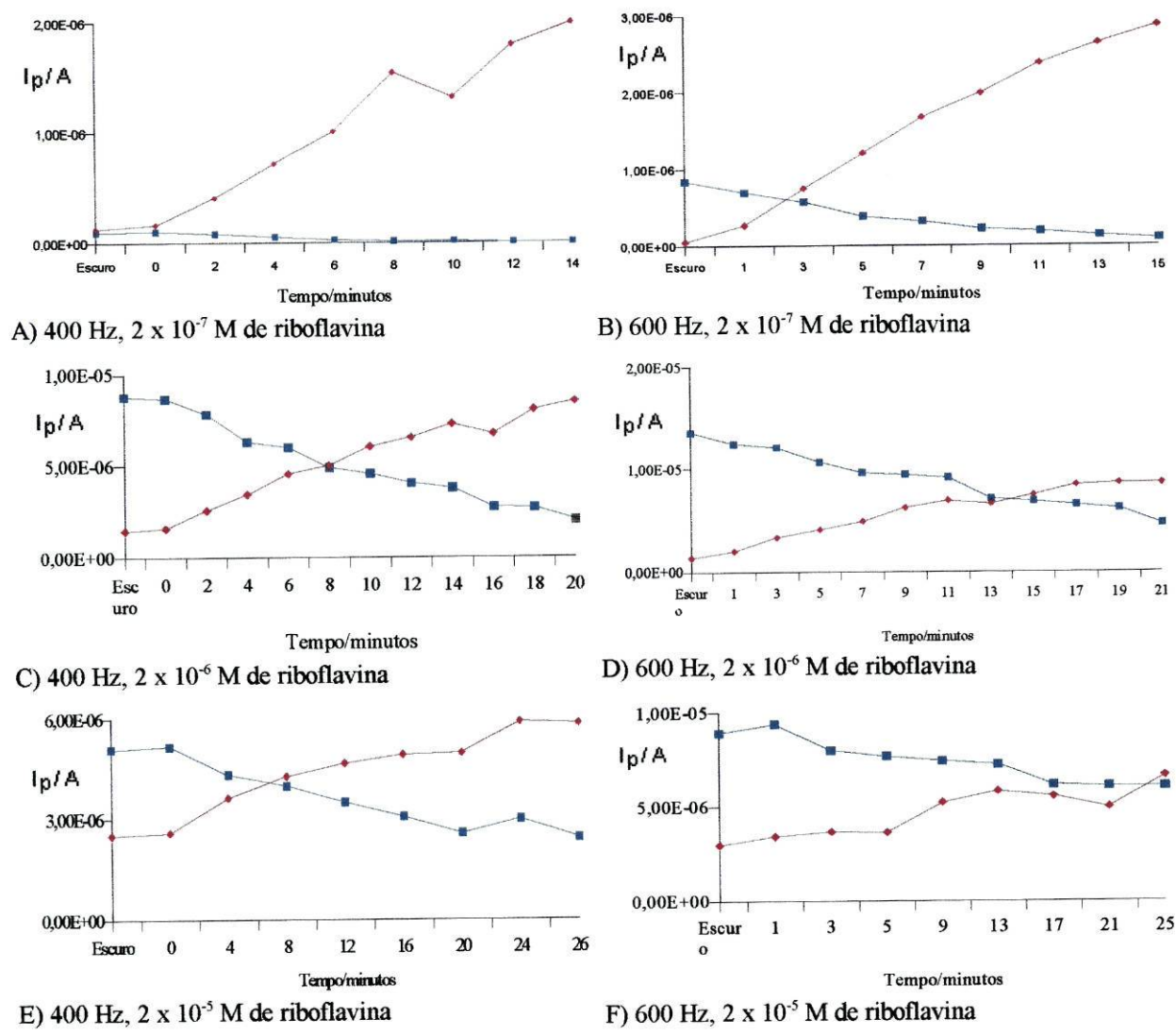


Fig. 43. Influência da luz na determinação da riboflavina, em tampão fosfato 0.1 M, pH 7, a 400 e 600 Hz, ■ pico a -0.44 V e ◆ pico a -0.56 V.

Determinou-se a percentagem de degradação da riboflavina em função do tempo de exposição à luz admitindo que não há degradação quando a solução está no escuro. Os resultados estão descritos na Figura 44.

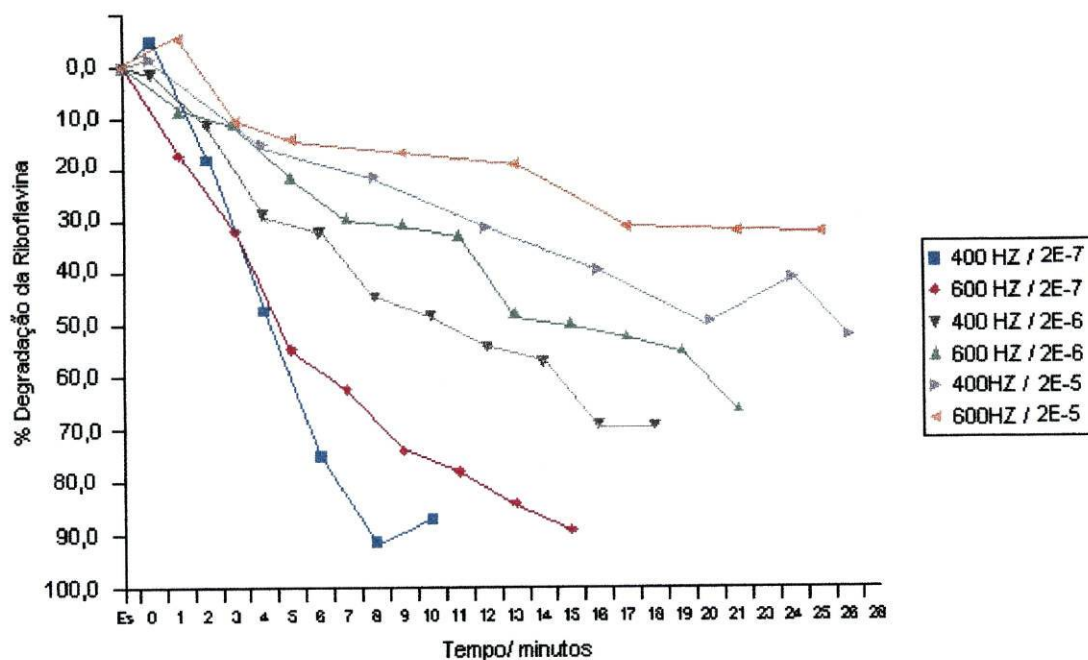


Fig. 44. Percentagem de degradação de diversas soluções de riboflavina com a luz, em tampão fosfato 0.1 M, pH 7, a 400 e 600 Hz.

Através da análise dos resultados anteriores pode concluir-se que quanto mais diluída for a solução de riboflavina maior é a sua degradação. Este comportamento pode ser justificado pela maior dispersão das partículas em solução e a conseqüente maior exposição aos raios de luz. A frequências mais altas parece haver uma maior degradação da vitamina, o que se pode dever à maior velocidade de varrimento neste caso.

Obtiveram-se curvas de calibração na presença e ausência de luz, tendo-se verificado que existe uma relação linear entre a concentração e a intensidade de corrente, quer a -0.43 V (no escuro), quer a -0.55 V (na presença de luz).

Analisou-se nas condições descritas anteriormente uma solução recém preparada de riboflavina no escuro, tendo-se verificado que só existe proporcionalidade entre a concentração de riboflavina e a intensidade de corrente a uma frequência de 600 Hz; os resultados estão representados na Tabela 9 e na Figura 45.

Concentração de riboflavina / M	Intensidade de corrente de pico / A
0	0
1.59×10^{-8}	2.169×10^{-8}
3.19×10^{-8}	3.478×10^{-8}
4.78×10^{-8}	5.447×10^{-8}
6.38×10^{-8}	7.447×10^{-8}
7.97×10^{-8}	9.930×10^{-8}
9.57×10^{-8}	1.282×10^{-7}
1.12×10^{-7}	1.433×10^{-7}

Tab. 9. Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina, na ausência de luz ($E_p = -0.43$ V).

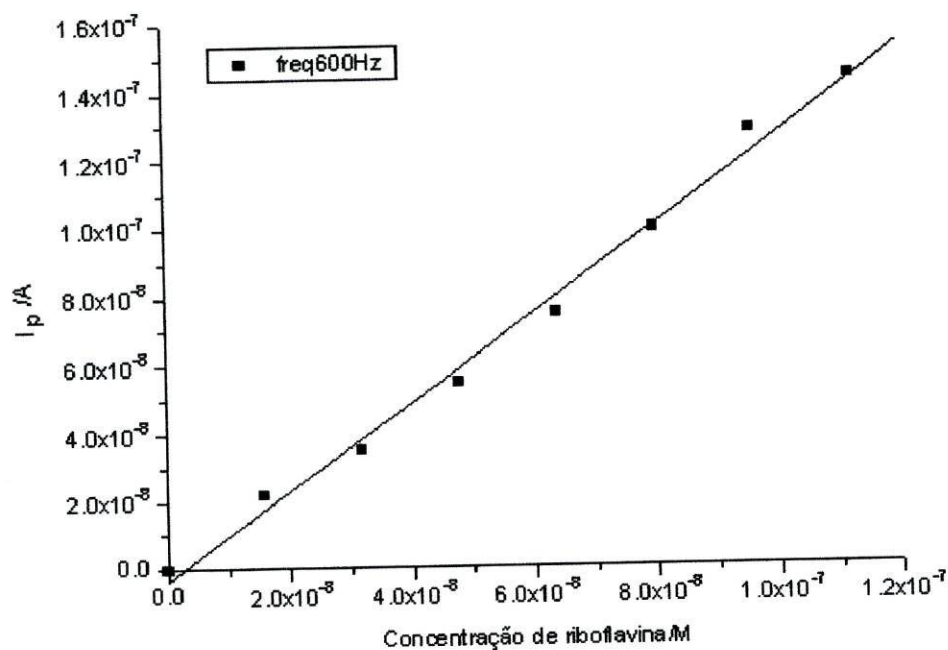


Fig. 45. Influência da concentração de riboflavina na intensidade de corrente de pico, a 600 Hz, na ausência de luz ($E_p = -0.43$ V).

A equação de recta que melhor se ajusta aos valores experimentais é a seguinte:

$$I_p \text{ (A)} = -3.250 \times 10^{-8} + 1.30307 \text{ M}$$

Utilizou-se o mesmo procedimento para quantificar a riboflavina na presença de luz em soluções com diferentes concentrações, tendo-se medido o valor da intensidade correspondente após a estabilização do sinal. Iniciou-se o estudo para soluções mais concentradas, repetindo-o para concentrações mais baixas para verificar o intervalo em que a linearidade é satisfeita. Os resultados para uma gama de concentrações mais alta estão representados na Tabela 10 e na Figura 46.

Concentração de Riboflavina/M	Intensidade de corrente de pico / A				
	200 Hz	300 Hz	400 Hz	500 Hz	600 Hz
0	0	0	0	0	0
3.18×10^{-8}	6.285×10^{-8}	1.683×10^{-7}	2.298×10^{-7}	2.731×10^{-7}	3.134×10^{-7}
1.12×10^{-7}	2.431×10^{-7}	5.753×10^{-7}	8.651×10^{-7}	1.021×10^{-6}	1.090×10^{-6}
3.51×10^{-7}	5.682×10^{-7}	1.505×10^{-6}	2.079×10^{-6}	2.691×10^{-6}	3.113×10^{-6}
5.91×10^{-7}	9.912×10^{-7}	2.314×10^{-6}	3.354×10^{-6}	4.109×10^{-6}	5.047×10^{-6}
8.30×10^{-7}	1.357×10^{-6}	3.118×10^{-6}	4.335×10^{-6}	5.741×10^{-6}	6.316×10^{-6}
1.07×10^{-6}	1.649×10^{-6}	4.060×10^{-6}	5.626×10^{-6}	6.593×10^{-6}	7.885×10^{-6}

Tab. 10. Valor de intensidade de corrente de pico ($E_p = -0.55 \text{ V}$) em função da concentração de riboflavina na célula, na presença de luz, para concentrações de vitamina entre os 10^{-7} e os 10^{-6} M .

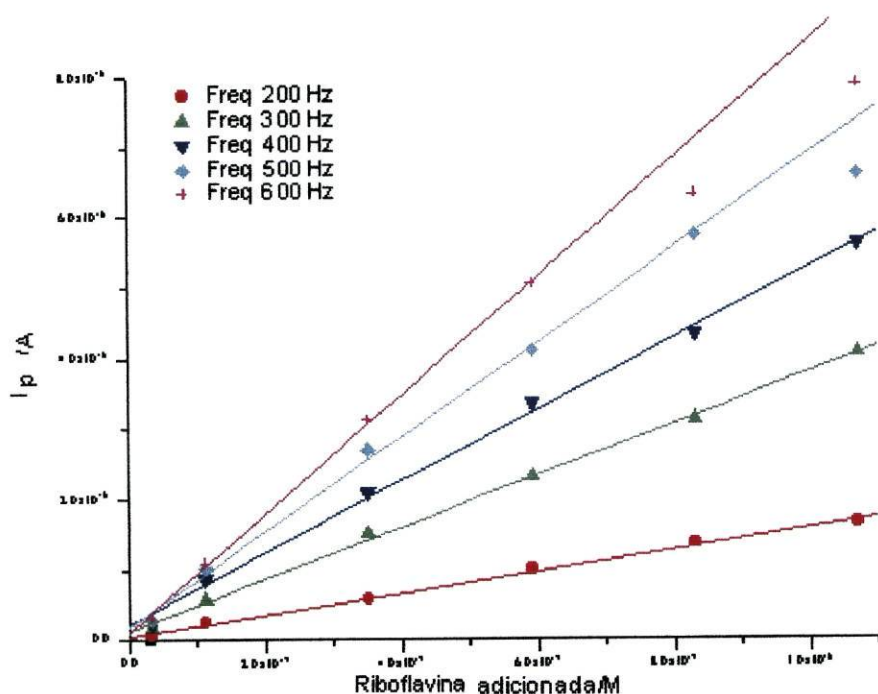


Fig. 46. Influência da concentração de riboflavina na intensidade de corrente de pico na presença de luz, após desaparecimento do pico a -0.44 mV e estabilização do sinal a -0.56 mV, para concentrações de vitamina entre os 10⁻⁷ e os 10⁻⁶ M.

Verifica-se que há perda da linearidade para frequências mais altas para os valores de concentração mais elevados. Não considerando estes valores, as equações das rectas que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguintes:

200 Hz	$I_p (A) = 4.7444 \times 10^{-8} + 1.53611 M$
300 Hz	$I_p (A) = 1.3362 \times 10^{-7} + 3.66353 M$
400 Hz	$I_p (A) = 2.2482 \times 10^{-7} + 5.07049 M$
500 Hz	$I_p (A) = 1.9424 \times 10^{-7} + 6.71429 M$
600 Hz	$I_p (A) = 1.0364 \times 10^{-7} + 8.42511 M$

Com objectivo de verificar o limite de detecção da técnica, usou-se o mesmo procedimento para concentrações mais baixas de riboflavina. Os valores de intensidade de corrente em função dessa concentração estão representados na Tabela 11 e na Figura 47.

Concentração de Riboflavina/M	Intensidade de corrente de pico / A		
	200 Hz	300 Hz	600 Hz
0	0	0	0
1.59×10^{-8}	3.208×10^{-8}	8.320×10^{-8}	1.790×10^{-7}
3.19×10^{-8}	6.566×10^{-8}	1.721×10^{-7}	3.495×10^{-7}
4.78×10^{-8}	9.356×10^{-8}	2.312×10^{-7}	4.911×10^{-7}
6.38×10^{-8}	1.340×10^{-7}	3.233×10^{-7}	6.470×10^{-7}
7.97×10^{-8}	1.664×10^{-7}	4.148×10^{-7}	8.683×10^{-7}
9.57×10^{-8}	2.216×10^{-7}	5.041×10^{-7}	9.637×10^{-7}
1.12×10^{-7}	2.626×10^{-7}	6.042×10^{-7}	1.122×10^{-6}

Tab. 11. Valor de intensidade de corrente de pico ($E_p = -0.55$ V) em função da concentração de riboflavina na célula, na presença de luz, para concentrações de vitamina entre os 10^{-8} e os 10^{-7} M.

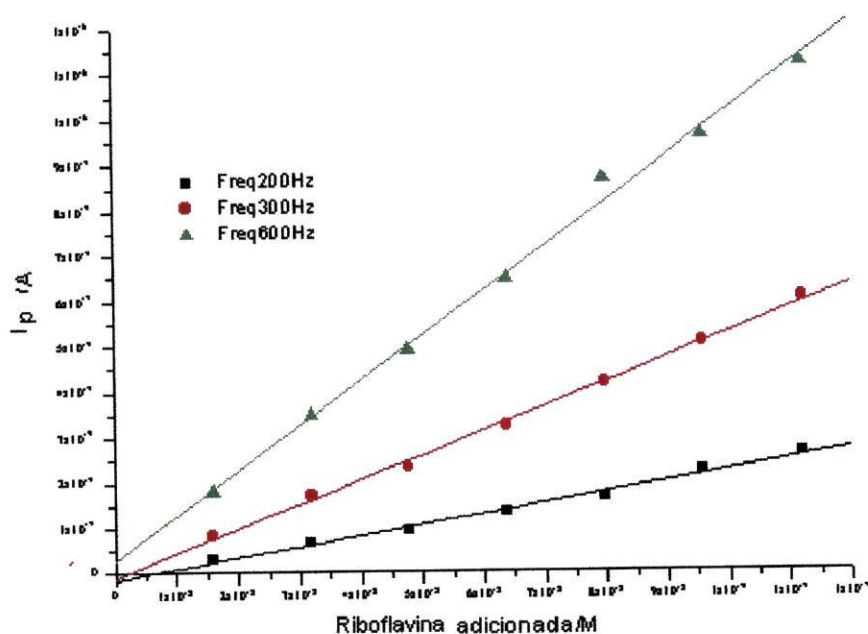


Fig. 47. Influência da concentração de riboflavina na intensidade de corrente de pico na presença de luz, após desaparecimento do pico a -0.44 mV e estabilização do sinal a -0.56 mV, para concentrações de vitamina entre os 10^{-8} e os 10^{-7} M.

As equações das rectas que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguintes:

$$200 \text{ Hz} \quad I_p \text{ (A)} = -1.3982 \times 10^{-8} + 2.40258 \text{ M}$$

$$300 \text{ Hz} \quad I_p \text{ (A)} = -1.0372 \times 10^{-8} + 5.38386 \text{ M}$$

$$600 \text{ Hz} \quad I_p \text{ (A)} = -2.8049 \times 10^{-8} + 9.9021 \text{ M}$$

Para valores mais baixos de concentração de riboflavina torna-se difícil, nestas condições, observar o sinal da vitamina.

Encontradas as melhores condições para a obtenção de uma resposta voltamétrica proporcional à concentração de riboflavina e uma vez determinada a correspondente recta de calibração, passou-se ao objectivo principal deste trabalho: a determinação da riboflavina em matrizes mais ou menos complexas por voltametria com adsorção.

3. DETERMINAÇÃO NAS PASTILHAS “SMINT”

Com o objectivo de confirmar a aplicabilidade do procedimento desenvolvido na determinação da riboflavina, fez-se a análise desta vitamina nos “Smint”, pastilhas com sabor a limão, constituídas por vários compostos naturais, multivitaminadas, que facilmente se dissolvem em água e dando origem a uma matriz simples.

Preparou-se a solução a analisar, por dissolução rigorosa de uma pastilha “Smint”, cerca de 0.2 g, em 500 ml de tampão fosfato 0.1M, pH 7, protegendo-a da luz.

Analisaram-se 25 ml desta solução por voltametria de onda quadrada, a uma frequência de 400 Hz e com uma pré-concentração de 30 segundos. O varrimento foi feito entre os -0.2 V e os -1.5 V. Utilizou-se um potencial de impulso de 0.002 V e uma amplitude de 0.2 V. Fizeram-se várias adições de 1×10^{-7} M riboflavina padrão à célula para verificar o incremento do sinal com o aumento da quantidade da vitamina. Durante toda a análise, as soluções de riboflavina e a célula voltamétrica permaneceram protegidas da luz. Os voltamogramas obtidos estão representados na Figura 48:

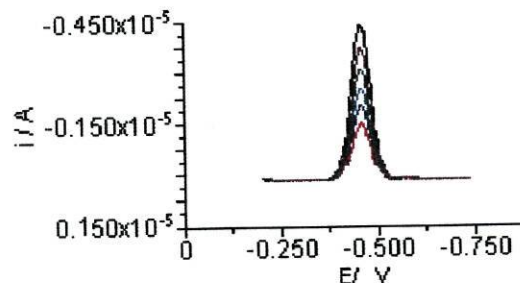


Fig. 48. Análise voltamétrica da riboflavina presente nas pastilhas “Smint”. Adições sucessivas de 1×10^{-7} M riboflavina

Representando graficamente a intensidade de corrente de pico em função da concentração de vitamina adicionada, pode determinar-se a quantidade presente nos “Smint” por extrapolação do valor da concentração para a intensidade de corrente de pico nula, conforme se pode observar na Figura 49:

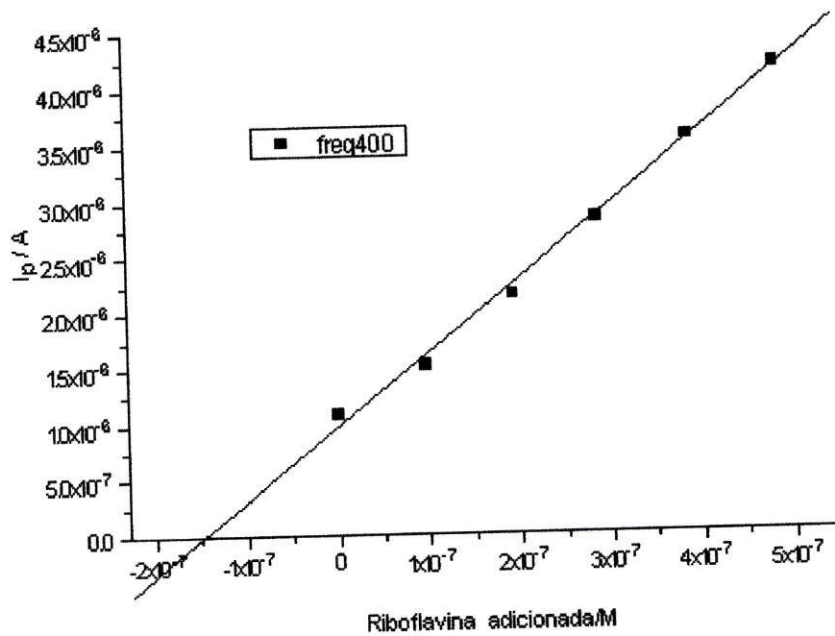


Fig. 49. Determinação da riboflavina presente na pastilha “Smint”

A equação da recta que melhor de ajusta aos valores experimentais é a seguinte:

$$I_p \text{ (A)} = 9.7501 \times 10^{-7} + 6.57571 \text{ M}$$

A concentração de riboflavina presente numa pastilha “Smint” é $1.48 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Realizaram-se análises consecutivas, após a preparação da solução, a uma frequência de 400 Hz e os resultados estão representados na Figura 50:

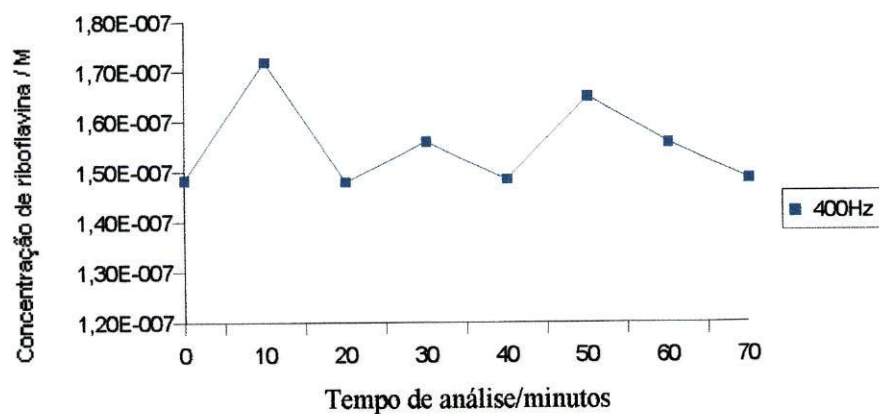


Fig. 50. Determinações sucessivas da riboflavina nas pastilhas “Smint”.

Como se pode observar através dos resultados obtidos, a concentração de riboflavina ao longo do tempo é praticamente constante, ou seja, não há degradação da vitamina na solução.

4. DETERMINAÇÃO DA RIBOFLAVINA NO LEITE

4.1. Análise espectrofluorimétrica

4.1.1. Considerações Prévias

A espectrofluorimetria é o método de análise adoptado pela “Association of Official Agricultural Chemists”² para a determinação da riboflavina. O objectivo deste estudo é a comparação dos resultados obtidos por este método com aqueles que se obtêm por voltametria.

A espectrofluorimetria não permite a utilização de matrizes muito complexas uma vez que impedem a luz de passar de forma uniforme através da célula para provocar a mesma excitação em todas as moléculas. Por essa razão, há a necessidade de se simplificar a matriz, recorrendo a um processo de extracção.

A parte experimental deste trabalho foi iniciada com o estudo espectrofluorimétrico de soluções de riboflavina. O objectivo deste estudo foi o da determinação da curva de calibração desta vitamina em meio tampão acetato 1 %²², depois da selecção dos comprimentos de onda de excitação e emissão mais adequado ao método.

Preparou-se uma solução padrão 3.34×10^{-5} M de riboflavina em meio tampão acetato 1%. Para as determinações espectrofluorimétricas prepararam-se soluções de riboflavina, com as concentrações registadas na tabela 1, por diluição da solução previamente preparada no mesmo meio tampão.

Analisaram-se as soluções por espectrofluorimetria experimentando dois comprimentos de onda de excitação distintos, 440 nm (1) e 470 nm²³, usando-se como branco a solução de ácido acético 1 %. Na Figura 51 estão representados os espectros de fluorescência de uma solução de riboflavina 2.67×10^{-7} M a esses dois comprimentos de excitação. A primeira banda corresponde ao sinal do branco, a segunda é devida à presença da riboflavina.

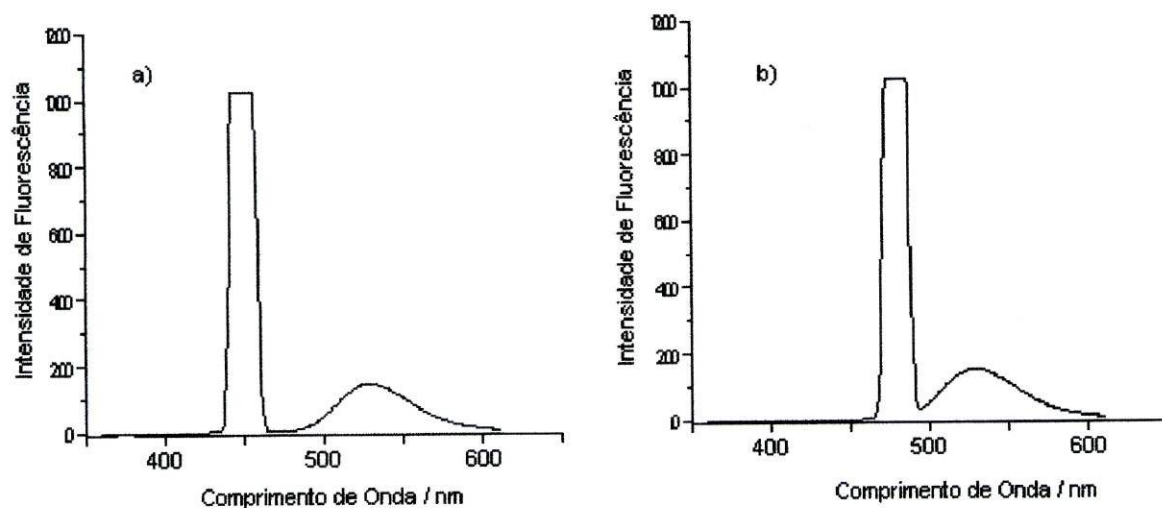


Fig. 51. Espectros de fluorescência de uma solução de riboflavina $2.67 \times 10^{-7} \text{M}$ a 440nm (a) e 470 nm (b).

Como se pode observar nas Figuras 51.a e 51.b, o comprimento de onda de excitação que parece mais indicado é o de 440 nm, uma vez que há uma completa separação das duas bandas o que não se verifica a 470 nm.

Mesmo assim, verificou-se o comportamento de soluções de riboflavina de várias concentrações nos dois comprimentos de onda. Os valores máximos de intensidade estão registados na Tabela 12.

Concentração / M	I máx. ($\lambda = 440 \text{ nm}$)	I máx. ($\lambda = 470 \text{ nm}$)
3.34×10^{-8}	32.08	32.08
6.68×10^{-8}	44.72	44.72
2.51×10^{-7}	145.79	150.01
2.67×10^{-7}	145.79	150.01
6.01×10^{-7}	322.68	343.74
7.68×10^{-7}	406.91	411.12
9.35×10^{-7}	495.35	529.05
1.27×10^{-6}	689.09	731.20
1.54×10^{-6}	817.05	882.71

Tab. 12. Intensidade máxima obtida por espectrofluorimetria para as diferentes

concentrações de riboflavina.

Na Figura 52 está representado graficamente o valor da intensidade de fluorescência máxima, I_{\max} , em função das concentrações de riboflavina para os dois comprimentos de onda referidos:

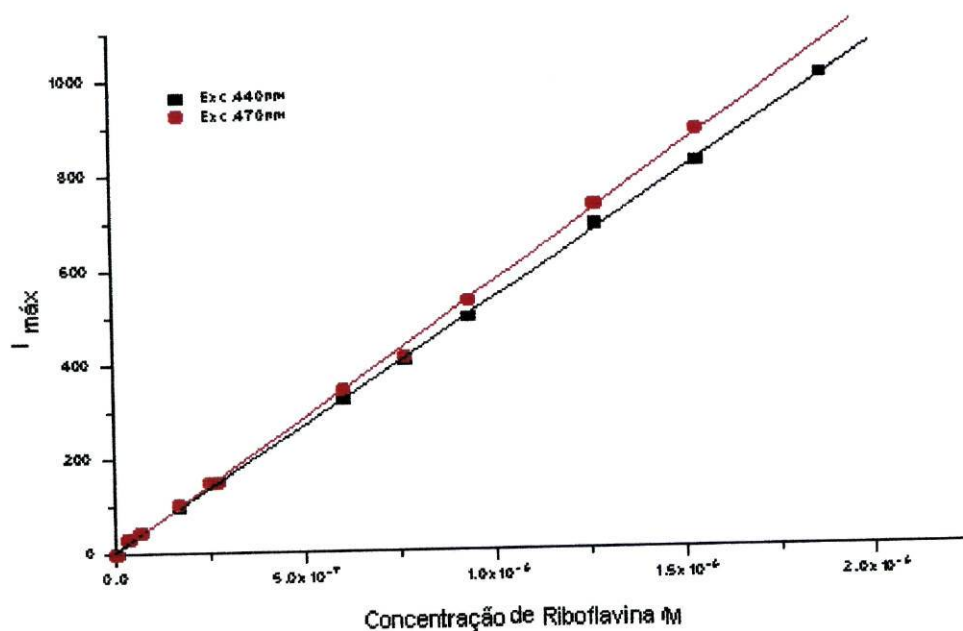


Fig. 52. Curva de calibração da riboflavina em meio tampão acetato 1 %, utilizando dois comprimentos de onda de excitação.

As equações das rectas que melhor se ajustam aos pontos experimentais são as seguintes:

$$\begin{aligned} \lambda = 440 \text{ nm} & \quad I_{\max} = 7.62 + 5.29 \times 10^8 \text{ M} \\ \lambda = 470 \text{ nm} & \quad I_{\max} = 3.68 + 5.66 \times 10^8 \text{ M} \end{aligned}$$

3.1.2. Extração de Riboflavina

O método ensaiado foi utilizado para determinar a quantidade de riboflavina no leite, tendo sido adoptado um comprimento de onda de 440 nm.

Inicialmente procedeu-se à extração da riboflavina do leite comercial, de acordo

com o processo sugerido por Lee, Jung e Kim ²⁴. Utilizaram-se diferentes tampões de maneira a obter uma melhor separação. Verificou-se que os melhores resultados se obtinham com a adição de 0.500 ml de solução de ácido acético 33.3% a 30 ml de leite.

Após centrifugação, retirou-se 10.00 ml da solução sobrenadante e adicionou-se água destilada até perfazer um volume de 25.00 ml. Como o sinal obtido foi demasiado intenso, diluiu-se 5.00 ml desta solução num volume de 50.00 ml.

Determinou-se a concentração de riboflavina no extracto do leite através da adição sucessiva de solução padrão 3.34×10^{-5} M.

Na Figura 53 estão representados os espectros correspondentes à determinação da riboflavina no extracto, pelo método das adições de padrão, em meio tampão acetato 1%, a um comprimento de onda de excitação de 440 nm.

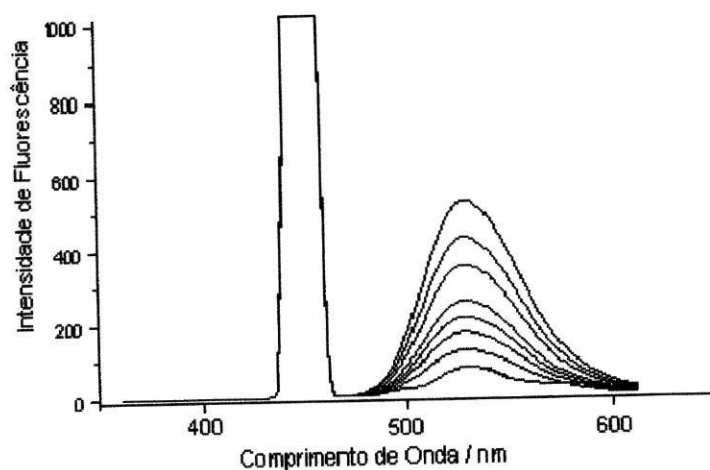


Fig. 53. Espectros de fluorescência obtidos na determinação da riboflavina no extracto de leite pelo método das adições padrão.

Na Tabela 13 estão representados os valores de concentração padrão adicionados e a intensidade de fluorescência máxima correspondentes.

Volume de padrão adicionado / ml	Concentração de padrão adicionada / M	Intensidade de fluorescência máxima
0	0	78.41
0.125	8.35×10^{-8}	127.74
0.250	1.67×10^{-7}	171.06
0.375	2.51×10^{-7}	212.18
0.500	3.34×10^{-7}	255.30
0.750	5.01×10^{-7}	352.16
1.000	6.68×10^{-7}	427.97
1.250	8.35×10^{-7}	520.62

Tab. 13. Intensidade de fluorescência máxima obtida por espectrofluorimetria para as diferentes concentrações de padrão de riboflavina adicionadas à amostra.

Na figura 54 está representada graficamente a intensidade de fluorescência, I, em função da concentração de padrão adicionada.

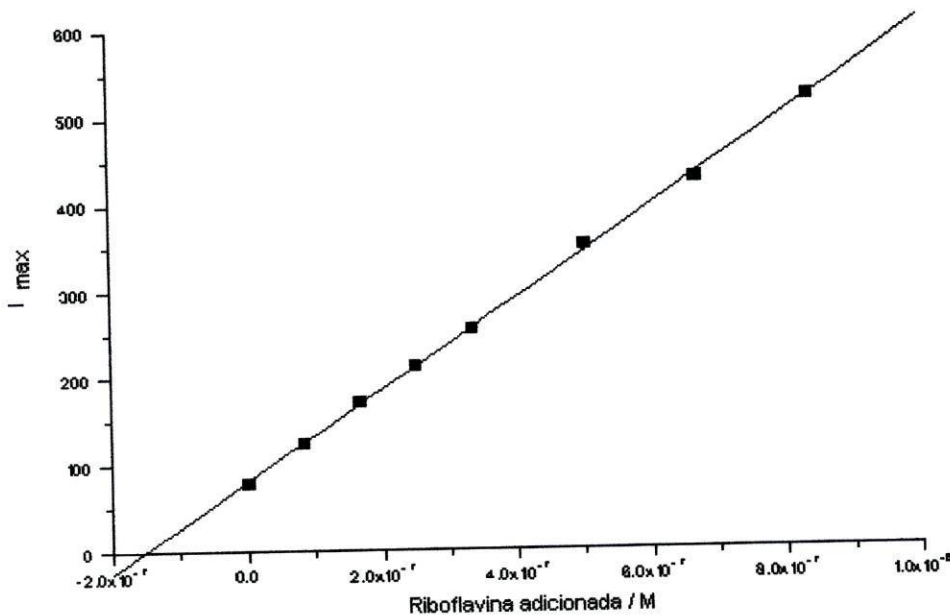


Fig. 54. Curva de adição de padrão de riboflavina ao leite em meio tampão acetato 1% (medindo a fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 440 nm.)

A equação da recta que melhor ajusta aos pontos experimentais é a seguinte:

$$I_{\max} = 81.03 + 5.27 \times 10^9 M$$

O valor da abcissa na origem é $1.54 \times 10^{-7} M$, a que corresponde uma concentração de riboflavina no extracto do leite, admitindo uma extracção completa, de $3.85 \times 10^{-6} M$, isto é 1.45 mg/l.

4.1.3. Estudo da eficiência da extracção

Para determinar a quantidade de riboflavina no leite é necessário conhecer o grau de extracção da vitamina. Com esse objectivo, procurou fazer-se a sua determinação da seguinte forma:

1. Preparação de extractos a partir de amostras de leite, com adições prévias e variáveis de riboflavina;
2. Análise desses extractos; determinação da riboflavina pelo método das adições padrão;
3. Determinação, para cada um dos extractos preparados, da quantidade de riboflavina neles existentes, utilizando o método de adições padrão.

Para isso utilizou-se o seguinte procedimento experimental:

- a) A quatro amostras de leite adicionou-se 0.500 ml de ácido acético 33.3%.
- b) A três das misturas, adicionou-se respectivamente 1.00, 2.00, 3.00 ml de solução padrão de riboflavina $3.34 \times 10^{-5} M$.
- c) Centrifugaram-se as misturas e separou-se a camada sobrenadante de cada uma delas.
- d) Retirou-se 1.00 ml de cada e diluiu-se rigorosamente a 25.00 ml.
- e) Determinou-se a quantidade de riboflavina no extracto do leite.

Na Tabela 14 estão representadas as quantidades de riboflavina adicionadas antes e após extracção e a intensidade de fluorescência em cada um dos casos:

Antes da Extração	Depois da extração	
Concentração de padrão adicionada/M	Concentração de padrão adicionada/M	Intensidade de fluorescência
0	0	82.82
	4.18×10^{-6}	175.28
	8.35×10^{-6}	263.72
1.11×10^{-6}	0	99.47
	4.18×10^{-6}	183.70
	8.35×10^{-6}	272.14
2.23×10^{-6}	0	112.10
	4.18×10^{-6}	200.55
	8.35×10^{-6}	288.99
3.34×10^{-6}	0	124.74
	4.18×10^{-6}	217.39
	8.35×10^{-6}	301.62

Tab. 14. Intensidade de fluorescência em extractos de leite, com adição de riboflavina antes e depois da extração

Representando graficamente a intensidade de fluorescência em função da concentração de padrão adicionada ao leite antes da extração, e em função da concentração adicionada ao extracto, obtemos as rectas representadas na Figura 55.

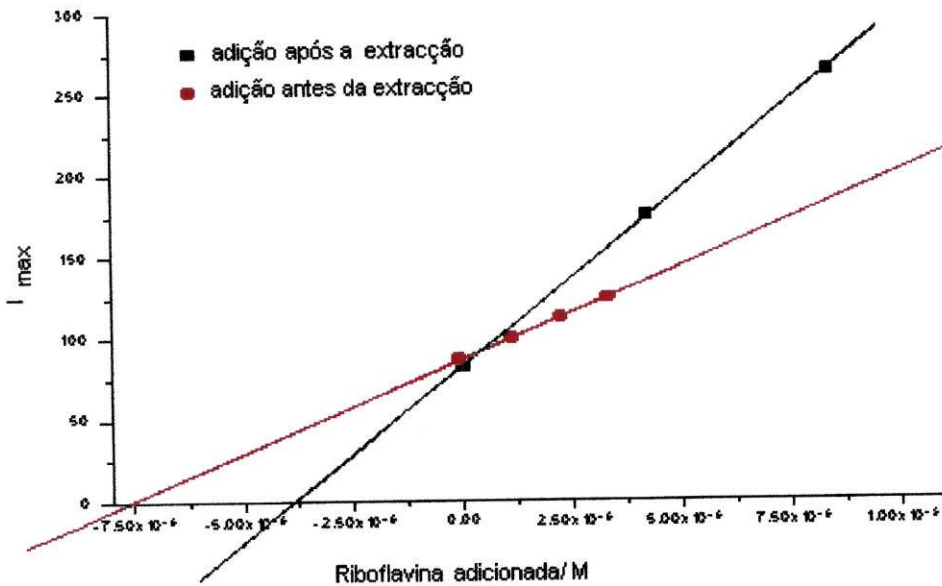


Fig. 55. Curvas com adição de padrão ao leite antes e após a extração.

As equações das rectas que melhor se ajustam aos pontos experimentais são as seguintes:

Adição no leite: $I_{\max} = 86.83 + 1.15 \times 10^7 M$

Adição após extracção: $I_{\max} = 83.29 + 2.17 \times 10^7 M$

Os valores das ordenadas na origem são 7.55×10^{-6} e 3.84×10^{-6} respectivamente. O grau de extracção pode ser obtido através da razão dos dois valores:

$$\text{Grau de extracção} = (3.84 \times 10^{-6} / 7.55 \times 10^{-6}) \times 100 = 50.9 \%$$

A percentagem de extracção pode ser obtida de uma outra forma. Na Figura 56 estão representadas as curvas de adição padrão de riboflavina em meio tampão 1% a extractos de leite sem adição prévia de riboflavina (amostra 1), com adição prévia de 1.11×10^{-6} M (amostra 2), 2.23×10^{-6} M, (amostra 3) e 3.34×10^{-6} M, (amostra 4), de riboflavina.

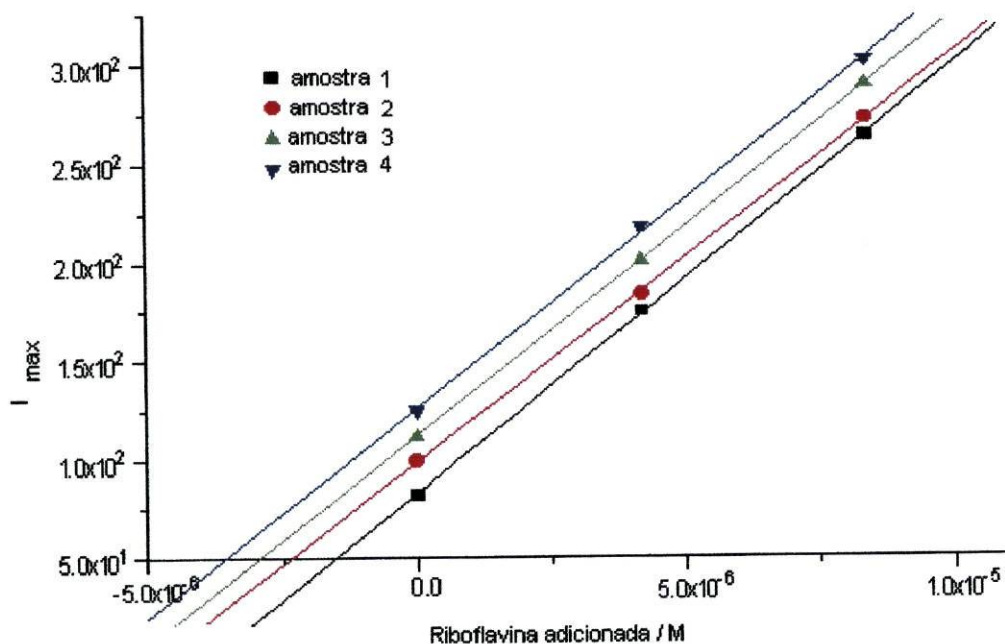


Fig. 56. Curvas de adição de padrão a extractos de amostras de leite (amostra 1), com adição prévia de riboflavina: 1.11×10^{-6} M (amostra 2), 2.23×10^{-6} M, (amostra 3) e 3.34×10^{-6} M, (amostra 4).

As equações de recta que melhor se ajustam aos pontos experimentais são as seguintes:

Amostra 1	$I_{\max} = 83.29 + 2.17 \times 10^7 M$
Amostra 2	$I_{\max} = 98.73 + 2.07 \times 10^7 M$
Amostra 3	$I_{\max} = 112.07 + 2.12 \times 10^7 M$
Amostra 4	$I_{\max} = 126.11 + 2.12 \times 10^7 M$

Pode calcular-se a quantidade de riboflavina no leite, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 15:

Amostra	Adição de prévia de riboflavina /M	Concentração de riboflavina/M
Leite 1	0	3.84×10^{-6}
Leite 2	1.11×10^{-6}	4.77×10^{-6}
Leite 3	2.23×10^{-6}	5.29×10^{-6}
Leite 4	3.34×10^{-6}	5.95×10^{-6}

Tab. 15. Concentração de riboflavina previamente adicionada e determinada nas amostras de leite.

O grau de extracção para cada um dos casos pode ser determinado em função da concentração de riboflavina sem adição prévia, “Amostra 1”:

Amostra 2 Grau de extracção = $[(4.77 \times 10^{-6} - 3.84 \times 10^{-6}) / 1.11 \times 10^{-6}] \times 100 = 83.9 \%$

Amostra 3 Grau de extracção = $[(5.29 \times 10^{-6} - 3.84 \times 10^{-6}) / 2.23 \times 10^{-6}] \times 100 = 64.9 \%$

Amostra 4 Grau de extracção = $[(5.95 \times 10^{-6} - 3.84 \times 10^{-6}) / 3.34 \times 10^{-6}] \times 100 = 63.2 \%$

Embora os resultados obtidos não sejam muito concordantes, verifica-se que a extracção da riboflavina do leite pelo método proposto por Lee, Jung e Kim ²⁴ está longe de ser completa, situando-se por volta dos 60%.

4.2. Análise voltamétrica

Na determinação da riboflavina no leite por voltametria com adsorção, começou por se investigar a possibilidade da análise directa, sem extracção. Para isso, adicionou-se directamente ao electrólito uma pequena quantidade de leite sem qualquer tratamento inicial e observou-se o sinal utilizando as condições anteriormente descritas. Verificou-se o sinal piorava com o aumento do tempo de acumulação, o que pode ser explicado pela complexidade da matriz. Por essa razão, fez-se a determinação da riboflavina sem qualquer tempo de pré-concentração.

Inicialmente, adicionou-se 0.5 ml de leite em 25 ml de tampão fosfato 0.1M, pH 7, com a célula protegida da luz. Observou-se a resposta voltamétrica a várias frequências e fizeram-se adições sucessivas de solução de riboflavina para estudar a evolução do sinal. O resultado está representado na Figura 57.

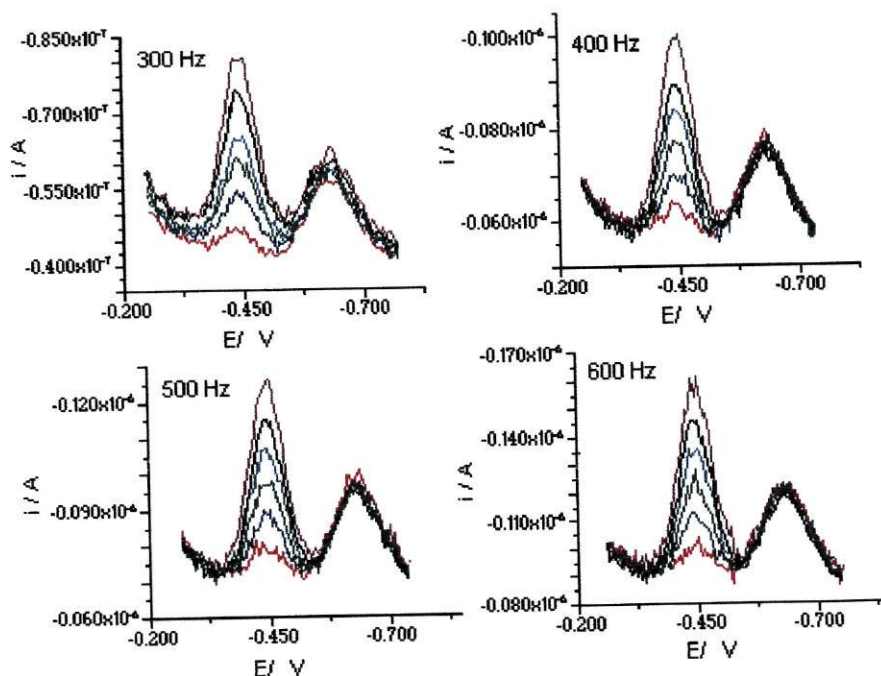


Fig. 57. Análise voltamétrica da riboflavina directamente em 0.5 ml leite, usando o método das adições de padrão.

A quantidade de riboflavina adicionada assim com as intensidades de corrente observadas estão representadas na Tabela 16.

Concentração de Riboflavina adicionada/M	Intensidade de corrente de pico / A			
	300 Hz	400 Hz	500 Hz	600 Hz
0	4.447×10^{-9}	5.804×10^{-9}	8.138×10^{-9}	1.351×10^{-8}
1.06×10^{-7}	9.738×10^{-9}	1.164×10^{-8}	1.718×10^{-8}	2.091×10^{-8}
2.13×10^{-7}	1.544×10^{-8}	1.921×10^{-8}	2.473×10^{-8}	3.693×10^{-8}
3.19×10^{-7}	1.978×10^{-8}	2.723×10^{-8}	3.557×10^{-8}	4.346×10^{-8}
4.26×10^{-7}	2.621×10^{-8}	3.215×10^{-8}	4.180×10^{-8}	5.332×10^{-8}

Tab. 16. Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina adicionada a 0.5 ml de leite.

Representando graficamente os valores obtidos, pode determinar-se a concentração de riboflavina presente no leite por extrapolação do valor da concentração para a intensidade de corrente de pico nula, conforme se pode observar na Figura 58.

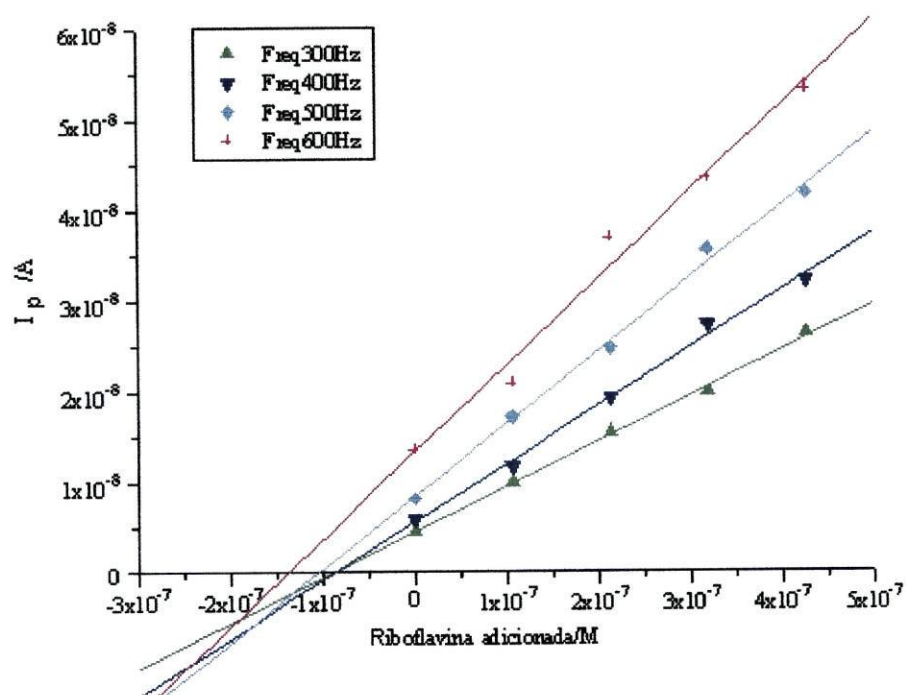


Fig. 58. Determinação da riboflavina directamente em 0.5 ml de leite pelo método das adições sucessivas de padrão.

As equações de recta que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguintes:

300 Hz	$I_p (A) = 4.4188 \times 10^{-9} + 0.0503 M$
400 Hz	$I_p (A) = 5.5637 \times 10^{-9} + 0.06411 M$
500 Hz	$I_p (A) = 8.3586 \times 10^{-9} + 0.08047 M$
600 Hz	$I_p (A) = 1.3209 \times 10^{-8} + 0.09595 M$

Numa tentativa de melhorar a sensibilidade do método aumentou-se a quantidade de leite adicionado à célula voltamétrica, mesmo correndo o risco do aumento da complexidade da matriz prejudicar a resposta da vitamina. Mediu-se o sinal a diversas frequências, fazendo-se adições de riboflavina para verificar o seu comportamento. Os voltamogramas estão representados na Figura 59.

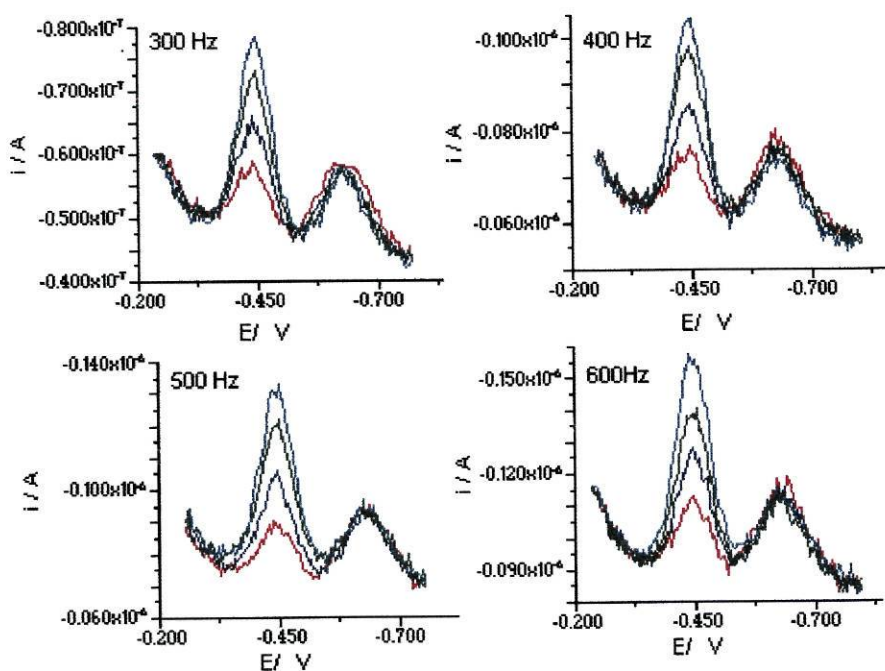


Fig. 59. Análise voltamétrica da riboflavina directamente em 1 ml leite, usando o método das adições de padrão.

A quantidade de riboflavina adicionada assim como as intensidades de corrente de pico observadas estão representadas na Tabela 17.

Concentração de Riboflavina adicionada/M	Intensidade de corrente de pico / A			
	300 Hz	400 Hz	500 Hz	600 Hz
0	1.030×10^{-8}	1.407×10^{-8}	1.766×10^{-8}	2.233×10^{-8}
1.60×10^{-7}	1.778×10^{-8}	2.456×10^{-8}	3.168×10^{-8}	3.669×10^{-8}
3.19×10^{-7}	2.456×10^{-8}	3.348×10^{-8}	4.437×10^{-8}	4.753×10^{-8}
4.79×10^{-7}	2.975×10^{-8}	4.190×10^{-8}	5.527×10^{-8}	6.179×10^{-8}

Tab. 17. Valor de intensidade de corrente em função da concentração de riboflavina adicionada a 1 ml de leite.

Representando graficamente os valores obtidos, pode determinar-se a concentração de riboflavina presente no leite por extrapolação do valor da concentração para a intensidade de corrente de pico nula, conforme se pode observar na Figura 60.

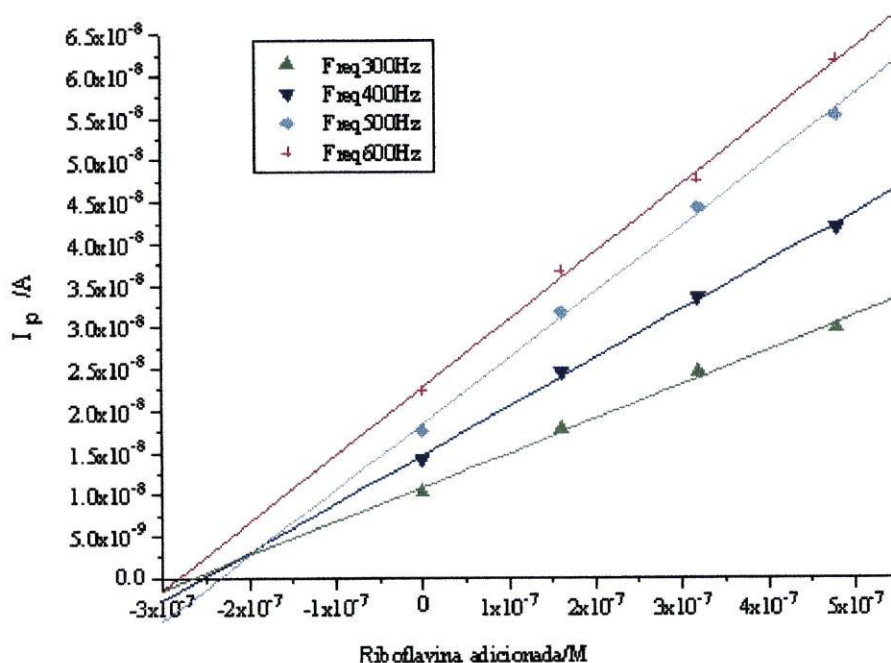


Fig. 60. Determinação da riboflavina directamente em 1 ml de leite pelo método das adições sucessivas de padrão.

As equações de recta que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguintes:

300 Hz	$I_p \text{ (A)} = 1.0824 \times 10^{-8} + 0.04081 \text{ M}$
400 Hz	$I_p \text{ (A)} = 1.4635 \times 10^{-8} + 0.05790 \text{ M}$
500 Hz	$I_p \text{ (A)} = 1.8409 \times 10^{-8} + 0.07865 \text{ M}$
600 Hz	$I_p \text{ (A)} = 2.2695 \times 10^{-8} + 0.08096 \text{ M}$

Para verificar a influência da matriz na determinação da riboflavina, procedeu-se à análise no extracto do leite. O procedimento de extracção foi igual ao que se utilizou para a determinação da riboflavina por espectrofluorimetria. Uma vez que a matriz se torna muito mais simples, é possível aumentar a sensibilidade da técnica, inclusivamente com a utilização de um período de pré-concentração da amostra de 30 segundos. Os voltamogramas, obtidos a diversas frequências e no escuro, com 1 ml de extracto diluído em 25 ml de electrólito estão representados na Figura 61.

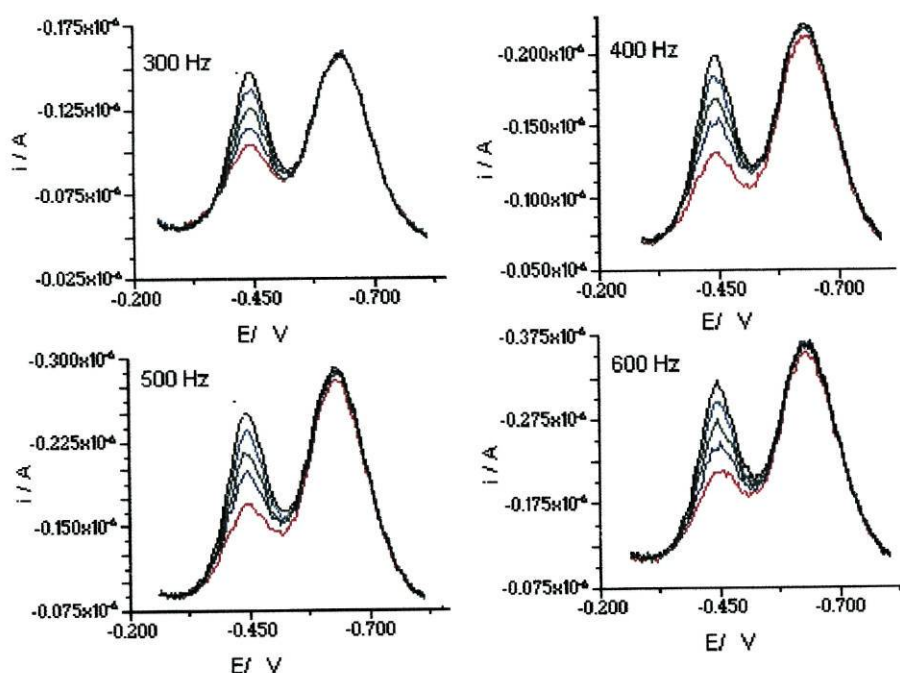


Fig. 61. Análise voltamétrica da riboflavina em 1 ml de extracto de leite, usando o método das adições de padrão.

Nestas condições, embora se observe um crescimento do sinal à medida que se adiciona solução padrão de riboflavina à célula, verifica-se uma maior interferência. Esta interferência foi reduzida acentuadamente alterando o valor do potencial de

impulso de 0.005 V para 0.002 V, a amplitude de 0.01 V para o dobro, e eliminando-se o período de pré-concentração

Um outro factor a ser introduzido com vista a melhorar a qualidade do sinal obtido, foi a realização de cinco varrimentos e utilizar a sua média como resultado final.

Após as alterações analisou-se novamente 1 ml de extracto e fizeram-se adições sucessivas de solução padrão de riboflavina, desta vez sem qualquer acumulação da espécie no eléctrodo de mercúrio. Os resultados obtidos para as frequências de 400 e 600 Hz estão expressos na Figura 62.

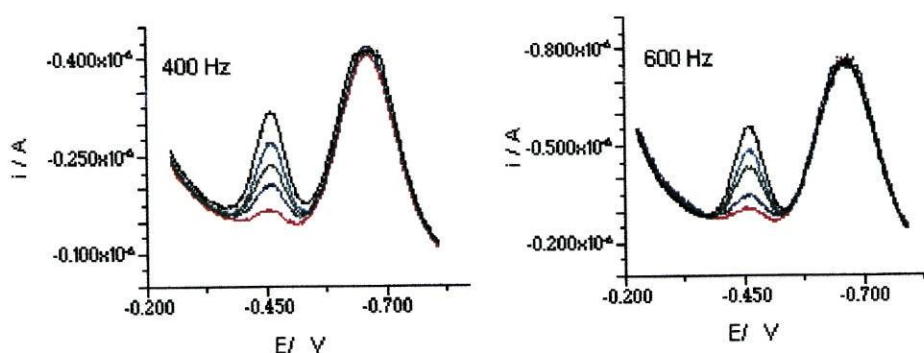


Fig. 62. Análise voltamétrica da riboflavina em 1 ml de extracto de leite, usando o método das adições de padrão.

A quantidade de riboflavina adicionada assim com as intensidades de corrente observadas estão representadas na Tabela 18.

Concentração de Riboflavina adicionada/M	Intensidade de corrente de pico / A	
	400 Hz	600 Hz
0	2.103×10^{-8}	3.681×10^{-8}
9.58×10^{-8}	4.857×10^{-8}	8.894×10^{-8}
1.92×10^{-7}	7.719×10^{-8}	1.481×10^{-7}
2.87×10^{-7}	1.070×10^{-7}	2.023×10^{-7}
3.83×10^{-7}	1.427×10^{-7}	2.637×10^{-7}

Tab. 18 . Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina adicionada a 1 ml de extracto de leite.

Representando graficamente os valores obtidos, pode determinar-se a concentração de riboflavina presente no extracto leite por extrapolação do valor da concentração para a intensidade de corrente de pico nula, conforme se pode observar na Figura 63.

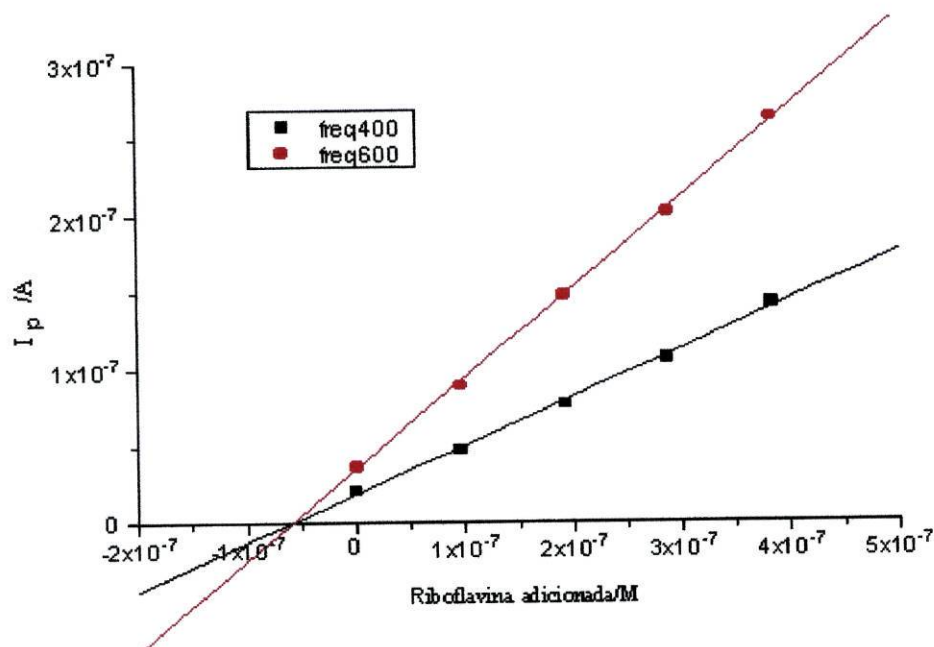


Fig. 63. Determinação da riboflavina em 1 ml de extracto de leite pelo método das adições sucessivas de padrão.

As equações de recta que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguinte:

$$400 \text{ Hz} \quad I_p \text{ (A)} = 1.8907 \times 10^{-8} + 0.31526 \text{ M}$$

$$600 \text{ Hz} \quad I_p \text{ (A)} = 3.4470 \times 10^{-8} + 0.59250 \text{ M}$$

Depois de reajustadas as condições para a análise da riboflavina no extracto de leite, procedeu-se da mesma maneira para a determinação da vitamina por análise directa do leite. Os voltamogramas obtidos estão representados na Figura 64.

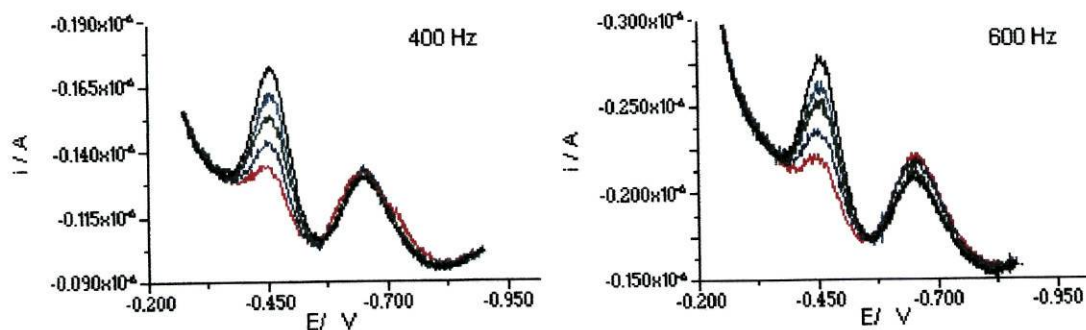


Fig. 64. Análise voltamétrica da riboflavina directamente em 1 ml de leite, usando o método das adições de padrão.

A quantidade de riboflavina adicionada assim com as intensidades de corrente observadas estão representadas na Tabela 19.

Concentração de Riboflavina adicionada/M	Intensidade de corrente de pico / A	
	400 Hz	600 Hz
0	1.817×10^{-8}	2.629×10^{-8}
9.58×10^{-8}	2.641×10^{-8}	3.718×10^{-8}
1.92×10^{-7}	3.568×10^{-8}	5.625×10^{-8}
2.87×10^{-7}	4.416×10^{-8}	6.631×10^{-8}
3.83×10^{-7}	5.329×10^{-8}	8.157×10^{-8}

Tab. 19. Valor de intensidade de corrente de pico em função da concentração de riboflavina adicionada directamente a 1 ml de leite.

Representando graficamente os valores obtidos, pode determinar-se a concentração de riboflavina presente no leite por extrapolação do valor da concentração para a intensidade de corrente de pico nula, conforme se pode observar na Figura 65.

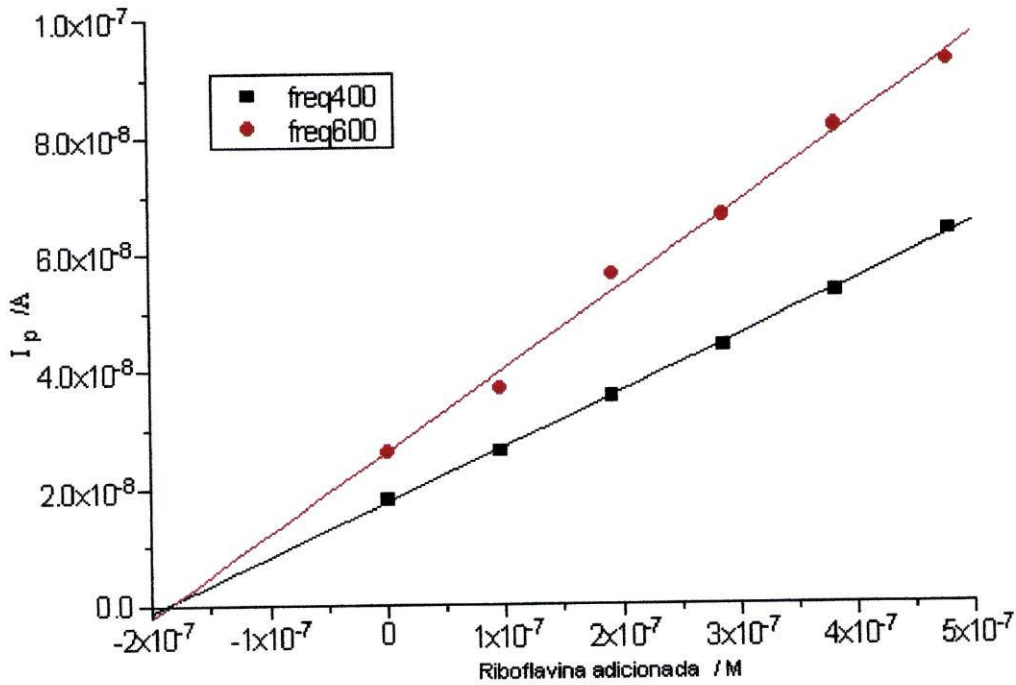


Fig. 65. Determinação da riboflavina directamente em 1 ml de leite pelo método das adições sucessivas de padrão.

As equações de recta que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguintes:

400 Hz	$I_p (A) = 1.7627 \times 10^{-8} + 0.09432 M$
600 Hz	$I_p (A) = 2.6127 \times 10^{-8} + 0.14153 M$

Encontradas as condições que permitem a determinação da riboflavina no leite e no seu extracto, procedeu-se à quantificação da vitamina em diferentes amostras, realizaram-se análises consecutivas, quer no leite quer no extracto, ao longo do tempo, a uma frequência de 400 Hz e os resultados estão representados nas Figuras 66 e 67:

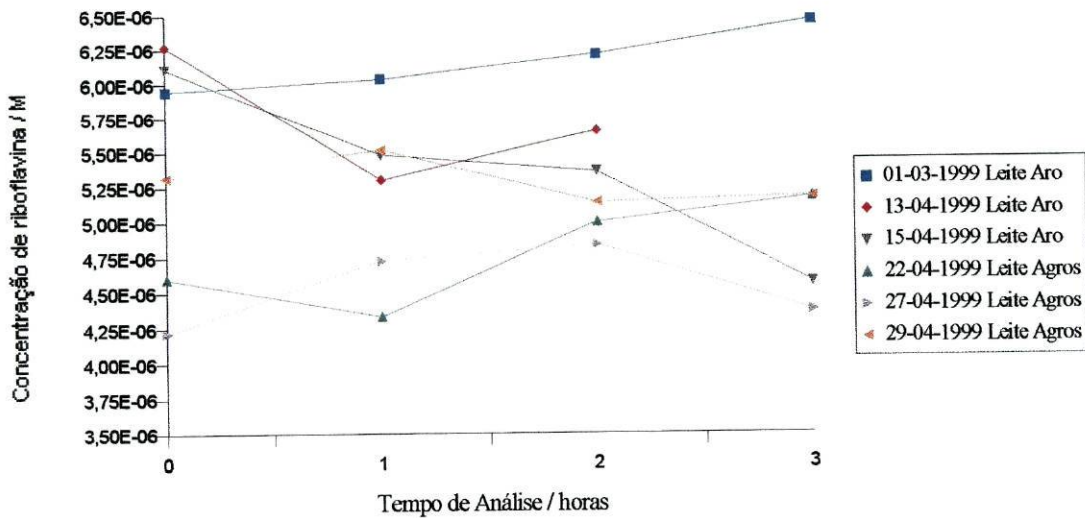


Fig. 66. Determinação sucessiva de riboflavina directamente no leite

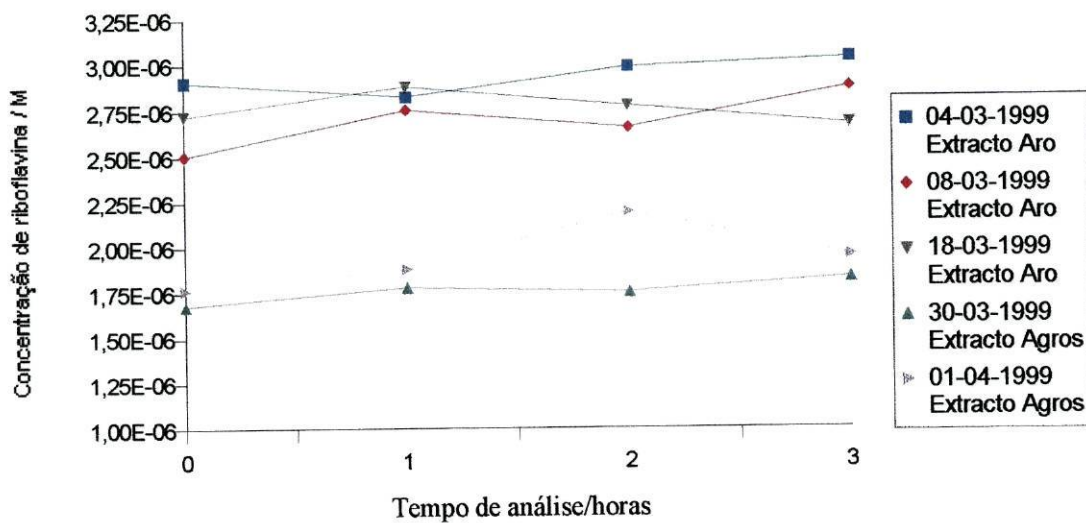


Fig. 67. Determinação sucessiva de riboflavina no extracto

Como se pode verificar nas figuras anteriores, não se pode dizer que haja uma variação significativa dos resultados no tempo; a quantidade de riboflavina presente no extracto é inferior à quantificada directamente no leite. O leite Agros, por exemplo, tem um teor de riboflavina na ordem dos 4.5×10^{-6} M, ou seja, 1.7 mg/L. Se a vitamina for quantificada no extracto, obtém-se um valor próximo dos 1.7×10^{-6} M, ou seja 0.6 mg/L, bastante inferior ao valor representado na Tabela 1. Verifica-se que a quantidade de riboflavina varia com a marca e o pacote analisado.

4.3. Comparação dos métodos

Uma das principais vantagens do método voltamétrico em relação ao espectrofluorimétrico é a possibilidade de se determinar a quantidade de riboflavina directamente no leite, sem qualquer tratamento prévio. A análise voltamétrica é mais rápida e mais simples e o resultado não é afectado por possíveis perdas da vitamina no processo de extracção.

Nas Figuras 68 e 69 estão representados os resultados obtidos na análise da riboflavina no leite e no extracto, usando a frequência de 400 e 600 Hz respectivamente:

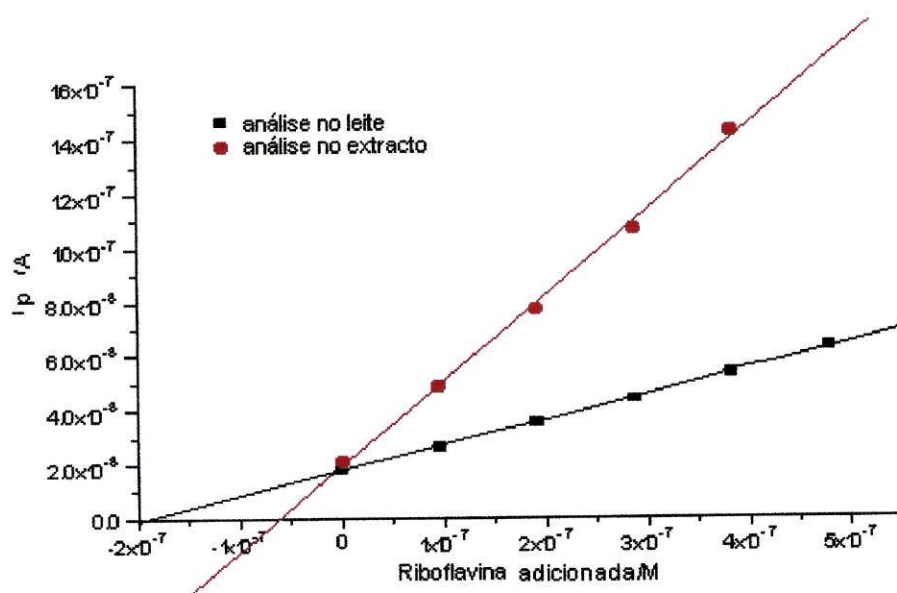


Fig. 68. Determinação da riboflavina directamente no leite e no seu extracto, a 400 Hz

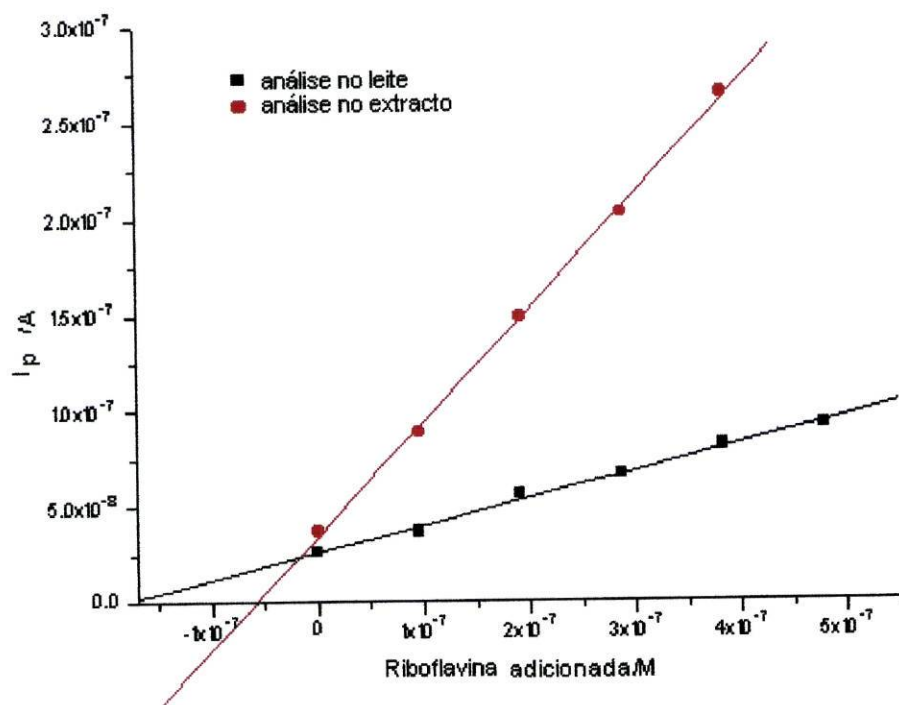


Fig. 69. Determinação da riboflavina directamente no leite e no seu extracto, a 600 Hz

As equações de recta que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguintes:

400 Hz	leite	$I_p (A) = 1.7656 \times 10^{-8} + 0.09428 M$
	extracto	$I_p (A) = 1.8991 \times 10^{-8} + 0.31522 M$
600 Hz	leite	$I_p (A) = 2.6175 \times 10^{-8} + 0.14145 M$
	extracto	$I_p (A) = 3.4625 \times 10^{-8} + 0.59238 M$

Através das equações obtidas pode determinar-se a concentração de riboflavina presente no leite, por extrapolação do valor da concentração para a intensidade de corrente de pico nula em cada um dos casos. Os resultados estão representados na Tabela 20:

Frequência	Matriz	Concentração de Riboflavina/M
400 Hz	leite	4.682×10^{-6}
	extracto	1.506×10^{-6}
600 Hz	leite	4.626×10^{-6}
	extracto	1.461×10^{-6}

Tab. 20. Concentração de riboflavina no leite obtida a partir da análise directa e a partir da análise do extracto

Da análise dos resultados anteriores pode verificar-se que embora a sensibilidade da resposta seja maior no extracto, o que é facilmente explicado pela maior simplicidade da matriz, é possível a determinação directamente no leite; a concentração obtida neste caso é muito superior à quantificada no extracto, o que significa que a quantidade extraída de vitamina no leite está muito longe dos 100%.

$$\text{Grau de extracção a 400 Hz} \quad (1.506 \times 10^{-6} / 4.682 \times 10^{-6}) \times 100 = \mathbf{32.2\%}$$

$$\text{Grau de extracção a 600 Hz} \quad (1.461 \times 10^{-6} / 4.626 \times 10^{-6}) \times 100 = \mathbf{31.6\%}$$

Verifica-se que não há uma diferença significativa entre o valor do grau de extracção obtido para as duas frequências. No entanto, este é um resultado bastante inferior ao que se obteve na análise espectrofluorimétrica, na qual se utilizou o mesmo processo de extracção, o que pode estar relacionado com o facto de se ter utilizado um o processo de cálculo da percentagem de recuperação diferente.

Calculou-se então o grau de extracção do modo utilizado na análise espectrofluorimétrica:

1. Prepararam-se os extractos a partir de amostras de leite, com adições prévias e variáveis de riboflavina;
2. Analisou-se os diferentes extractos; determinou-se a concentração de riboflavina pelo método das adições padrão;
3. Determinou-se, para cada um dos extractos preparados, a quantidade de riboflavina neles existentes, utilizando o método de adições padrão.

Representando graficamente a intensidade de corrente de pico em função da

concentração de padrão adicionada ao leite antes da extracção, e em função concentração de padrão adicionado ao extracto de leite obtemos as rectas representadas na Figura 70.

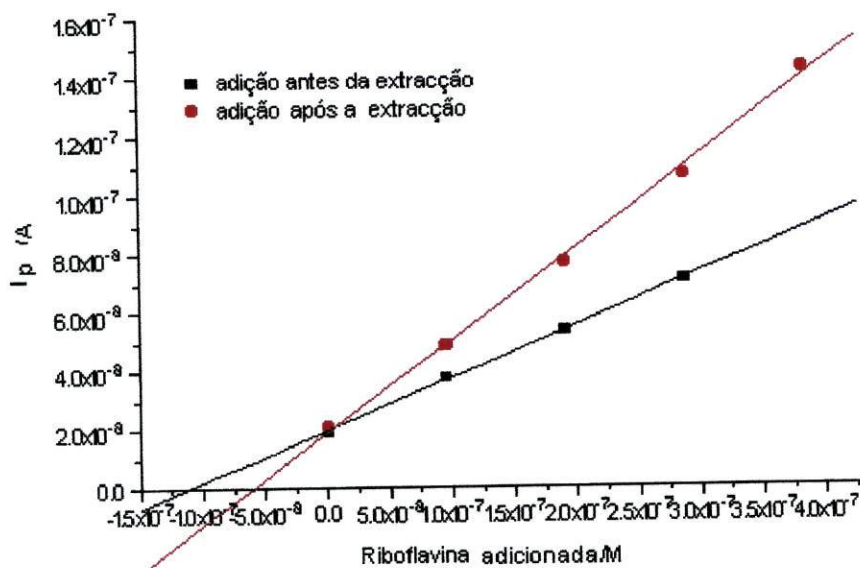


Fig. 70. Curvas com adição de padrão ao leite antes e após a extracção.

As equações das rectas que melhor se ajustam aos pontos experimentais são as seguintes:

Adição no leite:	$I_p = 1.9921 \times 10^{-8} + 0.17906 M$
Adição após extracção:	$I_p = 1.8991 \times 10^{-8} + 0.31522 M$

Através das equações obtidas pode determinar-se a concentração de riboflavina presente no leite, por extrapolação do valor da concentração para a intensidade de corrente de pico nula em cada um dos casos. Os resultados obtidos são $2.781 \times 10^{-6} M$ e $1.506 \times 10^{-6} M$, respectivamente. O grau de extracção pode ser obtido através da razão dos dois valores:

$$\text{Grau de extracção} = (1.506 \times 10^{-6} / 2.781 \times 10^{-6}) \times 100 = 54.2 \%$$

Tal como se procedeu na análise espectrofluorimétrica, determinou-se a percentagem de extracção de uma outra forma. Prepararam-se quatro amostras de leite, sem qualquer adição de riboflavina (amostra 1), com adição prévia de 9.56×10^{-8} M (amostra 2), 1.91×10^{-7} M, (amostra 3) e 2.87×10^{-7} M, (amostra 4), e procedeu-se à extracção. Analisou-se cada um dos extractos pelo método de adição de padrão. O resultado está representado na Figura 71.

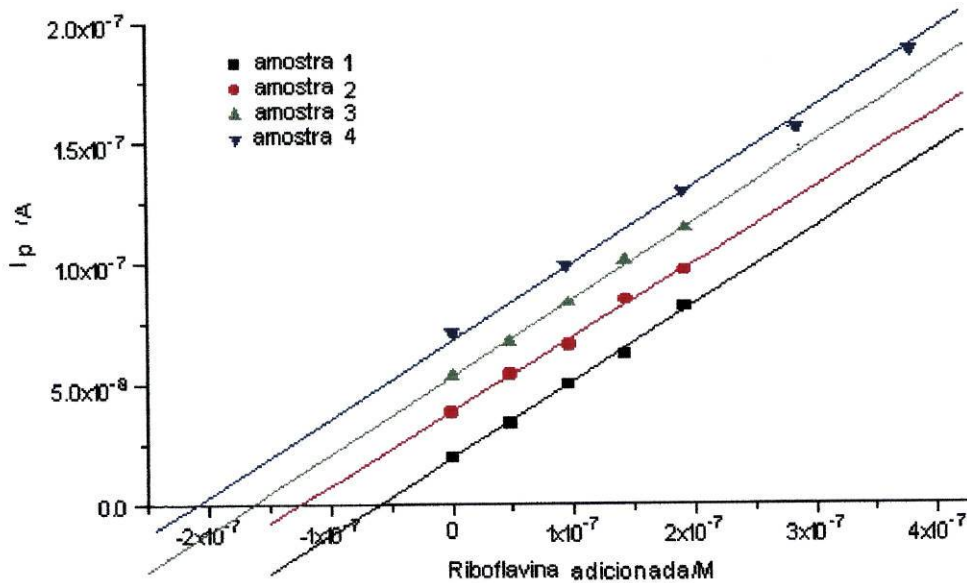


Fig. 71. Curvas de adição de padrão a extractos leite (amostra 1), com adição prévia de riboflavina: 9.56×10^{-8} M (amostra 2), 1.91×10^{-7} M, (amostra 3) e 2.87×10^{-7} M, (amostra 4).

As equações de recta que melhor se ajustam aos pontos experimentais são as seguintes:

Amostra 1	$I_p (A) = 1.9351 \times 10^{-8} + 0.31871 M$
Amostra 2	$I_p (A) = 2.8439 \times 10^{-8} + 0.30851 M$
Amostra 3	$I_p (A) = 5.2952 \times 10^{-8} + 0.32223 M$
Amostra 4	$I_p (A) = 6.8932 \times 10^{-8} + 0.32069 M$

Pode calcular-se a quantidade de riboflavina no leite, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 21:

Amostra	Adição de prévia de riboflavina /M	Concentração de riboflavina na célula /M
Leite 1	0	6.07×10^{-8}
Leite 2	9.56×10^{-8}	1.25×10^{-7}
Leite 3	1.91×10^{-7}	1.64×10^{-7}
Leite 4	2.87×10^{-7}	2.15×10^{-7}

Tab. 21. Concentração de riboflavina previamente adicionada e determinada nas amostras de leite.

A percentagem de extracção para cada um dos casos pode ser determinado em função da concentração de riboflavina sem adição prévia, “Amostra 1”:

$$\text{Amostra 2- \% extracção} = [(1.25 \times 10^{-7} - 6.07 \times 10^{-8}) / 9.56 \times 10^{-8}] \times 100 = \mathbf{67.3 \%}$$

$$\text{Amostra 3- \% extracção} = [(1.64 \times 10^{-7} - 6.07 \times 10^{-8}) / 1.91 \times 10^{-7}] \times 100 = \mathbf{54.1 \%}$$

$$\text{Amostra 4- \% extracção} = [(2.15 \times 10^{-7} - 6.07 \times 10^{-8}) / 2.87 \times 10^{-7}] \times 100 = \mathbf{53.8 \%}$$

Quando se utiliza a adição variável de padrão a amostras de leite e conseqüente extracção e determinação da riboflavina, verifica-se que a percentagem de extracção é maior do que quando se calcula o valor através da razão entre a quantidade analisada directamente no leite e a que se quantifica a partir do extracto.

Essa diferença pode ter duas explicações:

1. falta de exactidão no método de análise directa da riboflavina, ou seja, a resposta da vitamina não varia linearmente com a adição de padrão;

2. o processo de determinação do grau de extracção a partir de adições variáveis de vitamina ao leite, e a sua posterior extracção, não é correcto; isto pode suceder se a riboflavina que se adiciona ao leite for extraída mais facilmente do que aquela que o constitui.

Com o objectivo de verificar a linearidade da resposta voltamétrica da vitamina,

procurou fazer-se a sua determinação adicionando-se previamente quantidades de riboflavina variáveis a várias amostras leite.

A determinação da quantidade de riboflavina existente em cada uma das amostras de leite preparadas, utilizando o método de adições de padrão, é feita em função dos valores extrapolados da Figura 72 para uma frequências de 400 Hz :

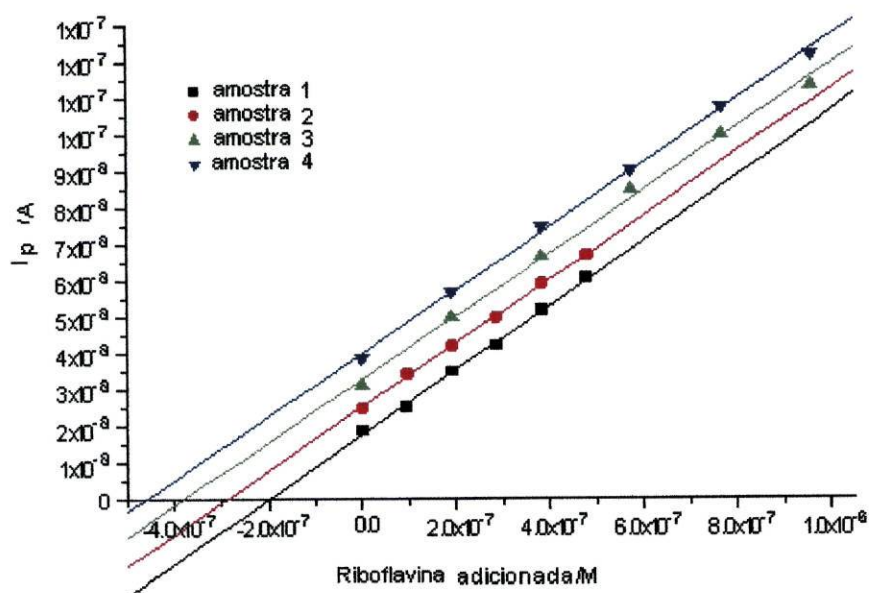


Fig. 72. Curvas de adição de padrão a amostras de leite (amostra 1), com adição prévia de riboflavina: 9.96×10^{-8} M (amostra 2), 1.99×10^{-7} M, (amostra 3) e 2.99×10^{-7} M, (amostra 4).

As equações de recta que melhor se ajustam aos valores experimentais são as seguinte:

Amostra 1	Sem adição prévia	$I_p (A) = 1.7819 \times 10^{-8} + 0.08863 M$
Amostra 2	Adição de 9.96×10^{-8} de riboflavina	$I_p (A) = 2.5214 \times 10^{-8} + 0.08724 M$
Amostra 3	Adição de 1.99×10^{-7} de riboflavina	$I_p (A) = 3.2877 \times 10^{-8} + 0.08627 M$
Amostra 4	Adição de 2.99×10^{-7} de riboflavina	$I_p (A) = 4.0022 \times 10^{-8} + 0.08689 M$

Através das equações obtidas pode determinar-se a concentração de riboflavina presente em cada amostra leite, por extrapolação do valor da concentração para a

intensidade de corrente de pico nula em cada um dos casos. Os resultados estão representados na Tabela 22.

Amostra	Adição de prévia de riboflavina /M	Concentração de Riboflavina calculada /M
Amostra 1	0	2.01×10^{-7}
Amostra 2	9.96×10^{-8}	2.89×10^{-7}
Amostra 3	1.99×10^{-7}	3.81×10^{-7}
Amostra 4	2.99×10^{-7}	4.61×10^{-7}

Tab. 22. Concentração de riboflavina previamente adicionada e a quantificada na célula.

A partir destes valores, verifica-se que a quantidade de riboflavina calculada é relativamente próxima da quantidade adicionada, o que permite validar a utilização da análise directa:

$$\text{Amostra 2- } [(2.89 \times 10^{-7} - 2.01 \times 10^{-7}) / 9.96 \times 10^{-8}] \times 100 = \mathbf{88.3 \%}$$

$$\text{Amostra 3- } [(3.81 \times 10^{-7} - 2.01 \times 10^{-7}) / 1.99 \times 10^{-7}] \times 100 = \mathbf{90.5 \%}$$

$$\text{Amostra 4- } [(4.61 \times 10^{-7} - 2.01 \times 10^{-7}) / 2.99 \times 10^{-7}] \times 100 = \mathbf{86.8 \%}$$

Pode então concluir-se, que o facto de se obter um grau de recuperação aparentemente maior quando se utiliza o método de adições prévias e sucessivas de padrão antes da extracção, se fica a dever provavelmente a uma maior facilidade de remoção da riboflavina adicionada relativamente àquela que lá existe.

Em face dos resultados obtidos pode dizer-se que o grau de extracção da vitamina do leite pouco ultrapassa os 30 % (Tab. 20). O valor obtido na análise directa do leite é muito superior ao obtido no extracto, o que mostra que a análise voltamétrica é duplamente vantajosa em relação à análise espectrofluorimétrica: é muito mais simples e rápida (não é preciso fazer a extracção) e muito mais rigorosa (não ocorrem as perdas associadas à extracção).

BIBLIOGRAFIA

1. Application Bulletin, Metrohm, N° 219/1f
2. AOAC Official Methods of Analysis, (1984), 43.039
3. Lehninger, A. L., "Principles of biochemistry", Worth Publishers Inc., New York, 1982
4. Friedrich, W., "Vitamins", Walter de Gruyzer, 1988
5. Heelis, P., *Chem. Soc. Rev.*, (1982), **11**, 15
6. Moore, W. M., Spence, J. T., Raymond, F. A., Colson, S. D., *J. Am. Chem. Soc.*, (1963), **85**, 3367
7. Brdicka, R., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, (1939), **14**, 130
8. Moore, W. M., Ireton, R.C., *Photochem. Photobiol.*, (1977), **25**, 347
9. William, L. C., Metzler, D. E., *J. Am. Chem. Soc.*, (1971), **93**, 2772
10. Cakir, S., Atayman, I, Cakir, O, *Mikrochim. Acta*, (1997), **126**, 237
11. Economou, A., Fielden, P, *Electroanalysis*, (1995), **7**, 277
12. Wang, J., Luo, D., Farias, P., Mahmoud, J., *Analyt. Chem.*, (1985), **57**, 158
13. Lindquist, J., Farroha, S., *Analyst*, (1975), **100**, 377
14. Foresti, M., Pergola, F., Aloisi, G., Guidelli, R., *J. Electroanal. Chem.*, (1982), **137**, 341

15. Skoog, D., Leary, J., "Principles of Instrumental Analysis", 4ª Edição, Saunders College Publishing, 1992
16. Gonçalves, M., "Métodos Instrumentais para Análise de Soluções", Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983
17. Willard, H., Merrit Jr., L., Dean, J., Settle Jr., F., "Instrumental Methods of Analysis", 7ª Edição, Wadsworth Durlifhing Company, Califórnia, 1988
18. Barros A., *Portugaliae Electrochimica Acta*, 10, 1992
19. Wang, J., em "Electroanalytical Chemistry", A.J.Bard, Vol 16, Marcel Dekker, 1989
20. Lakowicz, J. R., "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, New York
21. Svehla, G., "Comprehensive Analytical Chemistry", Vol 8 Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1977
22. Pombeiro, A., "Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial, 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1991
23. Utecht, R. E., *J. Chem. Educ.*, (1993), **70**, 673
24. Lee, K. H., Jung, M. Y., Kim, S. Y., *J. Agric. Food Chem.*, (1998), **46**, 407