José António Maia Rodrigues
Licenciado em Química (FCUP)

Análise voltamétrica, após derivatização, de compostos passíveis de condensação cíclica

Análise em alimentos

Dissertação para doutoramento em Química
na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Química
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
1998

JOSÉ ANTÓNIO MAIA RODRIGUES
Licenciado em Química (FCUP)

ANÁLISE VOLTAMÉTRICA, APÓS DERIVATIZAÇÃO, DE COMPOSTOS PASSÍVEIS DE CONDENSAÇÃO CÍCLICA

ANÁLISE EM ALIMENTOS

Dissertação para doutoramento em Química
na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Química
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
1998

Aos meus Pais

À Maria José

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Aquiles Araújo Barros, meu supervisor, por todo o interesse, apoio, valorosas achegas e por toda a amizade revelada.

Ao Professor Doutor João Cabral por me ter acolhido no seu grupo de investigação, pelo interesse manifestado e pelo empenho na obtenção de condições propícias à execução do trabalho.

À Doutora Maria Fernanda Cabral pela constante ajuda e dedicação com que sempre atendeu as minhas solicitações.

À Fundação Gomes Teixeira pela bolsa concedida.

Ao Grupo de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela dispensa de serviço docente.

Ao Paulo Almeida a boa camaradagem, o apoio e amizade demonstrada.

A todos os meus colegas no Departamento de Química, em particular ao grupo de Química Analítica, a quem devo o bom ambiente de trabalho.

A todos aqueles que colaboraram e me ajudaram

o meu muito obrigado.

ÍNDICE GERAL

pág.

AGRADECIMENTOS i

ÍNDICE GERAL iii

ÍNDICE DE FIGURAS x

ÍNDICE DE TABELAS xx

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS xxv

RESUMO xxix

ABSTRACT xxxi

RÉSUMÉ xxxiii

INTRODUÇÃO xxxv

PARTE I - ***FUNDAMENTAÇÃO DO TEMA*** 1

1 - REACÇÕES DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS 2

1.1 - Estrutura e reactividade do grupo carbonílico[1,2,3] 2

1.2 - Algumas reacções de adição nucleófila ao grupo carbonilo 3

1.2.1 - Hidratação e adição de hidrogenossulfito 3

1.2.2 - Adição de aminas primárias e seus derivados 6

1.3 - Algumas reacções de adição nucleófila ao grupo carboxílico e seus derivados 8

1.4 - Equilíbrios tautoméricos em compostos carbonílicos 10

2 - REACÇÕES DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS COM A O-FENILENODIAMINA 12

2.1 - Aspectos gerais 12

2.2 - Estrutura dos compostos α-dicarbonílicos. Distribuição em classes. 13

2.3 - Reacção de derivatização 14

2.3.1 - Influência do pH na reacção de derivatização 16

2.3.2 - Influência da ciclização na reacção de derivatização 17

2.4 - Compostos α-dicarbonílicos estudados nas várias classes 19

2.4.1 - Compostos α-dicarbonílicos da classe I 20

2.4.1.1 - Papel do metilglioxal na química dos processos biológicos 20

2.4.1.2 - Papel do diacetilo em química alimentar 22

2.4.2 - Compostos α-dicarbonílicos da classe II. α-cetoácidos 30

2.4.3 - Ácido oxálico 32

2.4.4 - Ácido desidroascórbico 36

2.5 - Métodos de análise de compostos α-dicarbonílicos baseados na reacção de derivatização com o-diaminas aromáticas. 41

3 - EVOLUÇÃO DA POLAROGRAFIA. TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS MODERNAS 49

3.1 - Enquadramento histórico da polarografia 49

3.2 - Técnicas electroanalíticas usando o eléctrodo de mercúrio 54

PARTE II - ***COMPORTAMENTO POLAROGRÁFICO E VOLTAMÉTRICO DAS QUINOXALINAS*** 61

1 - EXECUÇÃO EXPERIMENTAL 62

1.1 - Solvente e reagentes 62

1.2 - Material utilizado 64

1.3 - Instrumentação 64

1.4 - Condições experimentais utilizadas 65

1.4.1 - Ensaios polarográficos e voltamétricos 65

1.4.2 - Ensaios espectrofotométricos 66

2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 67

2.1 - Ensaios polarográficos e voltamétricos 67

2.1.1 - Classe das quinoxalinas (classe I) 67

2.1.2 - Classe das hidroxiquinoxalinas (classe II) 75

2.1.3 - Classe das di-hidroxiquinoxalinas (classe III) 83

2.2 - Estudos espectrofotométricos 90

PARTE III - *ANÁLISE POLAROGRÁFICA DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS* 93

1 - ANÁLISE DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE I 95

1.1 - Preparação de soluções aquosas 96

1.2 - Optimização das condições de análise 97

1.2.1 - Selecção das condições de derivatização 98

1.2.2 - Efeito da quantidade de OFDA 109

1.2.3 - Avaliação do processo polarográfico de análise 120

2 - ANÁLISE DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE I 129

2.1 - Preparação de soluções aquosas 130

2.2 - Optimização das condições de análise 131

2.2.1 - Selecção das condições de derivatização 131

2.2.1.1 - Derivatização do ácido glioxilico com a OFDA em diferentes condições de meio 131

2.2.1.2 - Calibração preliminar da 2-hidroxiquinoxalina 133

2.2.1.3 - Influência da acidez no processo de derivatização do ácido glioxilico 135

2.2.1.4 - Influência da concentração de OFDA no processo de derivatização do ácido glioxilico 139

2.2.1.5 - Influência da acidez no processo de derivatização do ácido pirúvico 141

2.2.2 - Selecção das condições de análise polarográfica 143

2.2.3 - Avaliação do processo polarográfico de análise 147

3 - ANÁLISE DE ÁCIDO OXÁLICO (COMPONENTE ÚNICO DA CLASSE III) 152

3.1 - Instrumentação 153

3.2 - Preparação das soluções aquosas de ácido oxálico 153

3.3 - Optimização das condições de análise 153

3.3.1 - Selecção das condições de derivatização 153

3.3.1.1 - Derivatização em diferentes condições de meio 154

3.3.1.2 - Influência da concentração de HCl no processo de derivatização 156

3.3.1.3 - Influência da concentração de OFDA no processo de derivatização 157

3.3.1.4 - Influência do modo de aquecimento da solução em reacção. Comparação entre aquecimento directo e em banho-maria 159

3.3.2 - Selecção e avaliação das condições de análise polarográfica 160

3.3.2.1 - Influência da concentração de HCl 161

3.3.2.2 - Influência da concentração de OFDA 163

3.3.2.3 - Teste de repetibilidade do processo de análise 164

3.3.2.4 - Influência do volume de solução a evaporar 165

3.3.2.5 - Influência da concentração de HCl na análise polarográfica 167

3.3.3 - Avaliação do processo polarográfico de análise do ácido oxálico 168

4 - ANÁLISE DE ÁCIDO DESIDROASCÓRBICO, COMPOSTO α-DICARBONÍLICO DA CLASSE IV) 171

4.1 - Preparação de soluções aquosas 172

4.2 - Instrumentação 173

4.3 - Estudo da velocidade da reacção de derivatização e do comportamento polarográfico do produto da reacção 173

4.4 - Selecção das condições de oxidação do AA a ADA e optimização das condições de análise 179

4.4.1 - Oxidação usando carvão activado 180

4.4.1.1 - Influência da quantidade de carvão activado 180

4.4.1.2 - Influência das condições de meio 182

4.4.2 - Oxidação utilizando a N-bromossuccinimida 184

4.4.2.1 - Características polarográficas da NBSI e análise polarográfica de AA, após oxidação com NBSI, em diferentes soluções tampão 185

4.4.2.2 - Efeito da concentração de NBSI e OFDA no sinal interferente 187

4.4.2.3 - Influência da quantidade de OFDA no processo de análise do AA 189

4.5 - Avaliação do processo polarográfico de análise do ácido ascórbico 191

4.5.1 - Curva de calibração de AA, utilizando como oxidante o carvão activado 191

4.5.2 - Curva de calibração de AA, utilizando como oxidante a N-bromossuccinimida 193

PARTE IV - ***APLICAÇÕES*** 197

1 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE I 198

1.1 - Aplicação ao estudo da estabilidade de soluções desses compostos 198

1.2 - Determinação polarográfica de diacetilo na cerveja 204

1.2.1 - Ensaios preliminares 206

1.2.2 - Destilação de compostos α-dicarbonílicos da classe I 211

1.2.2.1 - Destilação de soluções de diacetilo 212

1.2.2.2 - Destilação de soluções de glioxal, metilglioxal e 2,3-pentanodiona 213

1.2.2.3 - Destilação de misturas diacetilo/ metilglioxal e diacetilo/ glioxal 214

1.2.3 - Determinação de diacetilo na cerveja após destilação 216

1.2.3.1 - Determinação espectrofotométrica de diacetilo na cerveja (método recomendado pelo EBC) 216

1.2.3.2 - Comparação entre o método espectrofotométrico e polarográfico 219

1.2.3.3 - Estudo da interferência do metilglioxal na determinação polarográfica 226

1.3 - Determinação polarográfica de diacetilo na aguardente, na manteiga e no vinho 230

1.3.1 - Determinação do diacetilo e do metilglioxal na aguardente 230

1.3.2 - Determinação do diacetilo na manteiga 234

1.3.3 - Análise do teor de diacetilo no vinho 237

2 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE α-CETOÁCIDOS (COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE II) 244

3 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE ÁCIDO OXÁLICO (COMPOSTO α-DICARBONÍLICO DA CLASSE III) 247

3.1 - Estudo de interferências no método de determinação polarográfica de ácido oxálico 247

3.2 - Determinação de oxalato em rolhas de cortiça 254

3.3 - Determinação de oxalato na cerveja 260

3.3.1 - Estudo do grau de recuperação de oxalato ao longo do processo de tratamento da amostra 263

3.3.2 - Análise de oxalato na cerveja 269

4 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DA VITAMINA C EM SUMOS COMERCIAIS 272

PARTE V - ***FENÓMENOS DE ADSORÇÃO DE QUINOXALINAS NO ELÉCTRODO DE MERCÚRIO*** 279

1 - EFEITOS DE ADSORÇÃO NA POLAROGRAFIA E NA VOLTAMETRIA POR IMPULSOS 280

1.1 - Efeitos de adsorção na polarografia por impulsos 281

1.2 - Efeitos de adsorção na voltametria por impulsos 286

2 - EXECUÇÃO EXPERIMENTAL 290

2.1 - Instrumentação 290

2.2 - Ensaios polarográficos 290

2.2.1 - Polarografia diferencial por impulsos 291

2.2.2 - Polarografia normal por impulsos 292

2.3 - Ensaios voltamétricos 295

2.3.1 - Estudos voltamétricos com a 2,3-dimetilquinoxalina (DMQ) 295

2.3.1.1 - Voltametria normal por impulsos 295

2.3.1.2 - Voltametria cíclica 297

2.3.1.3 - Cronoamperometria 302

2.3.1.4 - Voltametria de onda quadrada 305

2.3.1.4.1 - Efeito da frequência 306

2.3.1.4.2 - Efeito da amplitude do impulso 309

2.3.1.4.3 - Efeito do degrau de potencial 311

2.3.1.4.4 - Efeito do tempo de acumulação 313

2.3.1.4.5 - Efeito da adição tensioactivos 314

2.3.1.4.6 - Efeito da variação da concentração do electrólito 315

2.3.2 - Estudos voltamétricos com a 2-hidroxiquinoxalina (2HQ) 320

2.3.2.1 - Voltametria cíclica 320

2.3.2.2 - Voltametria normal por impulsos 324

2.3.2.3 - Voltametria de onda quadrada 326

2.4 - Aplicações analíticas 328

2.4.1 - Efeito da frequência na determinação da DMQ e da 2HQ 329

2.4.1.1 - 2,3-dimetilquinoxalina 329

2.4.1.2 - 2-hidroxiquinoxalina 333

2.4.2 - Determinação após derivatização com a o-fenilenodiamina 335

2.4.3 - Influência da frequência no sinal do composto resultante da decomposição da o-fenilenodiamina 339

2.4.4 - Efeito da frequência de onda quadrada no grau de interferência do oxigénio na determinação da DMQ 341

CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO 345

BIBLIOGRAFIA 347

ÍNDICE DE FIGURAS

pág.

PARTE I - *FUNDAMENTAÇÃO DO TEMA*

Figura 2.1 - Esquema do processo enzimático do sistema glioxalase. 21

Figura 2.2 - Esquema do processo de formação do metilglioxal em sistemas biológicos, resultante da eliminação de fosfato, que pode ter lugar por via enzimática ou química a partir de gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato. 23

Figura 2.3 - Formação de diacetilo e 2,3-pentanodiona durante o processo de fermentação cervejeira. Relação com o processo de biossíntese da isoleucina e valina resultante da actividade da levedura. 25

Figura 2.4 - Evolução da concentração das α-dicetonas durante a fermentação. O tipo de curva obtido depende da temperatura em que a fermentação decorre bem como do processo de fermentação. Os valores obtidos dependem, ainda, do método de análise utilizado na determinação. (Adaptação da figura 2 da referência 2.2). 26

Figura 2.5 - Principal via de degradação do ácido ascórbico na presença de oxigénio[65]. (I)-ácido ascórbico; (II)-ácido desidroascórbico; (III)-ácido 2,3-dicetogulónico; (IV)-ácido desidroascórbico (configuração de monómero bicíclico hidratado). 39

Figura 3.1 - Polarogramas clássicos de (I) HCl 1M (electrólito de suporte); (II) $5{,}0\times10^{-4}$ M Cd (II) em HCl 1M. I_d = intensidade de corrente limite de difusão; $E_{1/2}$ = potencial de meia-onda. 50

Figura 3.2 - Representação da **a)** intensidade de corrente resultante de uma **b)** variação de potencial em onda quadrada. De notar os diferentes decréscimos no tempo das intensidades de corrente faradaíca e capacitiva após a aplicação do impulso e os instantes onde é realizada a amostragem da intensidade de corrente. 53

Figura 3.3 - Esquema do eléctrodo de mercúrio multimodo (MME) Metrohm[110, 111]. **1-** contacto eléctrico para ligação do eléctrodo ao equipamento electróquímico; **2-** depósito de mercúrio; **3-** ligação do gás inerte (azoto) sob pressão; **4-** diafragma que faz movimentar a agulha de aço; **5-** agulha de aço que pode obstruir a passagem de mercúrio pelo capilar; **6-** capilar de vidro. 55

Figura 3.4 - Esquema de um sistema de medição electróquímica controlado por computador. CAD = conversor analógico.digital; CDA = conversor digital - analógico; CSE = controlador de sistemas exteriores (posto de polarografia, buretas automáticas, etc.).[114]. 56

PARTE II - *COMPORTAMENTO POLAROGRÁFICO E VOLTAMÉTRICO DAS QUINOXALINAS*

Figura 2.1 - Efeito do pH nos polarogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$ M de 2,3-dimetilquinoxalina nas várias soluções tampão estudadas. 69

Figura 2.2 - Efeito do pH nos polarogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$ M de 2,3-dimetilquinoxalina nas várias soluções tampão estudadas. 70

Figura 2.3 - Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da quinoxalina (■), da 2-metilquinoxalina (▲) e da 2,3-dimetilquinoxalina (◆) nos ensaios realizados por polarografia diferencial por impulsos. 71

Figura 2.4 - Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da quinoxalina (■), da 2-metilquinoxalina (▲) e da 2,3-dimetilquinoxalina (◆) nos ensaios realizados por voltametria diferencial por impulsos num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. 72

Figura 2.5 - Polarogramas diferenciais por impulsos de um solução $1x10^{-5}$ M de 2-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH. 77

Figura 2.6 - Voltamogramas diferenciais por impulsos de um solução $1x10^{-5}$ M de 2-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH. 78

Figura 2.7 - Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2-hidroxiquinoxalina (■) e da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina (●) nos ensaios realizados por polarografia diferencial por impulsos. 79

Figura 2.8 - Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2-hidroxiquinoxalina (■) e da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina (●) nos ensaios realizados por voltametria diferencial por impulsos num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. 80

Figura 2.9 - Polarogramas diferenciais por impulsos de um solução $1x10^{-5}$ M de 2,3-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH. 84

Figura 2.10- Voltamogramas diferenciais por impulsos de um solução $1x10^{-5}$ M de 2,3-di-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH. 85

Figura 2.11- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2,3-di-hidroxiquinoxalina nos ensaios realizados por polarografia diferencial por impulsos. 86

Figura 2.12- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2,3-di-hidroxiquinoxalina nos ensaios realizados por voltametria diferencial por impulsos num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. 87

Figura 2.13- Espectro de absorção de soluções $2x10^{-5}$M de: **1)** quinoxalina; **2)** 2-metilquinoxalina; e **3)** 2,3-dimetilquinoxalina. 90

Figura 2.14- Espectro de absorção de soluções $2x10^{-5}$M de: **1)** 2-hidroxiquinoxalina; **2)** 2-hidroxi-3-metilquinoxalina. 91

Figura 2.15- Espectro de absorção de soluções $2x10^{-5}$M de 2,3-di-hidroxiquinoxalina. 91

PARTE III - *ANÁLISE POLAROGRÁFICA DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS*

Figura 1.1 - Polarogramas resultantes da derivatização de uma solução $1x10^{-5}$M de diacetilo com OFDA 0,2% em diferentes soluções tampão com diferentes valores de pH. 104

Figura 1.2 - Espectros obtidos em várias soluções tampão, com diferentes valores de pH. 107

——— - Solução tampão com OFDA 0,2% e 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M vs. água destilada;

——— - Solução tampão com OFDA 0,2% vs. água destilada;

——— - Solução tampão com OFDA 0,2% e 2,3.-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M vs. Solução tampão com OFDA 0,2%.

Figura 1.3 - Evolução da absorvância com o tempo da solução de diacetilo $1x10^{-5}$M em derivatização com OFDA 0,2%, em diferentes soluções tampão com pH diferentes. 108

Figura 1.4 - Influência da concentração de OFDA na evolução com o tempo do sinal polarográfico para uma solução de diacetilo $1x10^{-5}$M em derivatização. 115
a) Solução tampão fosfato 0,1M, pH=7; **b)** Solução de NaHO 0,1M, pH=13.
Concentração de OFDA na solução em reacção: ■- 0,01%; ●- 0,05%, ▲- 0,1%; ▼- 0,2%.

Figura 1.5 - Influência da concentração de OFDA na evolução no tempo do sinal polarográfico do metilglioxal $1x10^{-5}$M em derivatização, em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7. 115
Concentração de OFDA na solução em reacção: ◆- 0,001%; ■- 0,01%; ●- 0,05%, ▲- 0,1%; ▼- 0,2%; ◆- 1%.

Figura 1.6 - Influência da concentração de OFDA e da temperatura na evolução no tempo do sinal polarográfico do glioxal $1x10^{-5}$M em derivatização, em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7. Temperatura e concentração de OFDA na solução em reacção: 116
Ensaios a 25ºC <> ●- 0,05%, ▲- 0,1%; ▼- 0,2%. Ensaios a 37ºC <> ■- 0,05%.

Figura 1.7 - Polarogramas obtidos através da adição sucessiva de solução de diacetilo a três soluções tampão distintas com diferentes pH: **a)** - HCl 0,1M, pH=1; **b)** - Tampão fosfato 0,1M, pH=7; **c)** - NaHO 0,1M, pH=13. 119
——— - adições sucessivas de diacetilo ($1x10^{-5}$M, cada adição);
——— - adição de 2,3-dimetilquinoxalina ($1x10^{-5}$M, após adições de diacetilo).

Figura 1.8 - Curvas de calibração de diacetilo obtidas por polarografia: (▲) após derivatização e (▼) análise directa. Curva de calibração da 2,3-dimetilquinoxalina obtida por polarografia: (■) em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,05% de OFDA. Em destaque a representação dos pontos da curva de calibração polarográfica de diacetilo cuja concentração é inferior ao limite de detecção do método espectrofotométrico. 124

Figura 1.9 - Curva de calibração de diacetilo obtida através do método de análise espectrofotométrica recomendado pelo EBC ("European Brewing Convention")[34]. 124

Figura 1.10- Curva de calibração da 2,3-dimetilquinoxalina em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7: (■) sem OFDA e (●) com 0,05% de OFDA no meio. 126
a) Utilizando o eléctrodo de mercúrio gotejante (DME);
b) Utilizando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE).

Figura 1.11- Curva de calibração de metilglioxal obtida por polarografia: (□), após derivatização com 0,05% de OFDA e de 2-metilquinoxalina obtida por polarografia: (●) em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,05% de OFDA. 128

Figura 1.12- Curva de calibração de glioxal obtida por polarografia: (●), após derivatização com 0,1% de OFDA e da quinoxalina obtida por polarografia: (■) em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,1% de OFDA. 128

Figura 1.13- Curva de calibração da 2,3-pentanodiona obtida por polarografia após derivatização com 0,05% de OFDA. 129

Figura 2.1 - Curvas de calibração da 2-hidroxiquinoxalina obtidas por polarografia: (■) em solução HCl 0,1M; (●) em solução tampão acetato 0,1M, pH=5. 134

Figura 2.2 - Estimativa do grau de conversão do ácido glioxílico em 2-hidroxiquinoxalina para diferentes condições de pH. Recolhas de amostras da solução em reacção realizadas ao fim de (■) 3, de (●) 20 e de (▲) 40 min em reacção. 137
(Concentração de OFDA no meio reactivo = 0,5%; concentração de ácido glioxílico = $2,5x10^{-4}$M; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

Figura 2.3 - Estimativa do grau de conversão do ácido glioxílico em 2-hidroxiquinoxalina para diferentes percentagens de OFDA no meio em reacção. Recolhas realizadas ao fim de (■) 3, de (●) 20 e de (▲) 40 min em reacção. 141
(Concentração de ácido glioxílico = $2,5x10^{-4}$M; pH=0,8; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

Figura 2.4 - Estimativa do grau de conversão do ácido pirúvico em 2-hidroxi-3-metilquinoxalina para diferentes condições de pH. Recolhas realizadas ao fim de (■) 3 e de (●) 30 min em reacção. (Concentração de OFDA no meio reactivo = 0,5%; concentração de piruvato de sódio = $2,5x10^{-4}$M; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5). 142

Figura 2.5 - Curvas de calibração da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina obtidas por polarografia: (■) em solução HCl 0,1M; (●) em solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5; (▲) em solução tampão fosfato 0,1M, pH=7. 146

Figura 2.6 - Curvas de calibração da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina obtidas por polarografia: (▼) em solução tampão amoniacal 0,1M, pH=9; (●), (✚) e (✕) em solução tampão carbonato 0,1M, pH=9,5; 10 e 10,5, respectivamente; (✱) em solução tampão fosfato 0,1M, pH=12. 146

Figura 2.7 - Curva de calibração de ácido glioxílico obtida por polarografia (■) após derivatização em meio HCl 0,1M com 0,2% de OFDA e pH≈1; análise polarográfica efectuada em meio tampão amoniacal com pH≈9. (■)incremento de sinal polarográfico correspondente à adição na célula de um número de moles de 2-hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido glioxílico submetidos a derivatização. 150

Figura 2.8 - Curva de calibração de ácido pirúvico obtida por polarografia (■) após derivatização em meio HCl 0,1M com 0,2% de OFDA e pH≈1; análise polarográfica efectuada em meio tampão amoniacal com pH≈9. (■)incremento de sinal polarográfico correspondente à adição na célula de um número de moles de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido pirúvico submetidos a derivatização. 150

Figura 2.9 - Curva de calibração de ácido α-cetoglutárico obtida por polarografia (■) após derivatização em meio HCl 0,1M com 0,2% de OFDA e pH≈1; análise polarográfica efectuada em meio tampão amoniacal com pH≈9. (■)incremento de sinal polarográfico correspondente à adição na célula de um número de moles de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido α-cetoglutárico submetidos a derivatização. 151

Figura 3.1 - Estimativa do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina para diferentes concentrações de HCl no meio em reacção, para diferentes intervalos de tempo em reacção. Concentração de HCl no meio em reacção: (●) 0,01M; (▲) 0,1M; (✚) 0,5M; (✕) 1M; (Δ) 2M; (○) 4M; (□) 6M. (Concentração de ácido oxálico = $5x10^{-4}$M; concentração de OFDA= 1%; reacção realizada num balão mergulhado num banho-maria à ebulição; análise polarográfica em solução HCl 0,1M). 157

Figura 3.2 - Estimativa do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina para diferentes concentrações de OFDA no meio em reacção, para diferentes intervalos de tempo em reacção. Concentração de OFDA no meio em reacção: (■) 0,04%; (●) 0,2%; (▲) 0,5%; (△) 1%; (○) 2%; (□) 5%.
(Concentração de ácido oxálico = $5x10^{-4}$M; concentração de HCl= 2M; reacção realizada num balão mergulhado num banho-maria à ebulição; análise polarográfica em solução HCl 0,1M). 158

Figura 3.3 - Evolução do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina com o tempo de reacção em duas condições distintas de aquecimento: (■) aquecimento em banho-maria à ebulição; (●) aquecimento directo à ebulição.
(Concentração de ácido oxálico = $5x10^{-4}$M; concentração de HCl= 2M; concentração de OFDA= 1%; análise polarográfica em solução HCl 0,1M). 160

Figura 3.4 - Evolução do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina em função da concentração de OFDA no meio em reacção, para diferentes concentrações de ácido oxálico. Concentração de ácido oxálico no meio em reacção: (■) $1x10^{-6}$M; (■) $4x10^{-6}$M; (●) $4x10^{-5}$M; (▲) $2x10^{-4}$M. (Concentração de HCl= 0,5M; análise polarográfica em solução HCl 0,1M). 164

Figura 3.5 - Curva de calibração de ácido oxálico obtida por polarografia (●) após derivatização nas seguintes condições: meio HCl 0,5M; concentração de OFDA= 2%; processo de derivatização até à evaporação da solução em reacção; análise polarográfica efectuada em HCl 1M. Curva de calibração de 2,3-di-hidroxiquinoxalina obtida por polarografia (■) através da adição sucessiva de solução padrão de 2,3-di-hidroxiquinoxalina a um branco que foi submetido ao mesmo processo de derivatização utilizado para as amostras. 170

Figura 4.1 - Análise polarográfica de AA. Influência da massa de carvão activado utilizado na oxidação na intensidade de corrente de pico. Concentração de AA na célula polarográfica: (■) 8mg/L; (●) 2mg/L. (concentração de OFDA= 0,1%; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5). 181

Figura 4.2 - Evolução com o tempo do sinal polarográfico de uma solução de AA 1mg/L, submetida a oxidação prévia com NBSI e a derivatização, nos seguintes meios: (■) HCl 0,1M; (●) HCl 10^{-3}M com NaCl 0,1M; e (▲) tampão acetato 0,1M, pH=4,5. (Concentração de OFDA= 0,1%; concentração de NBSI= 20mg/L). 187

Figura 4.3 - Evolução com o tempo do sinal polarográfico de uma solução de AA 1mg/L, submetida a oxidação prévia com NBSI e a derivatização na presença da diferentes concentrações de OFDA: (■) 0,025%; (◆) 0,05%; (●) 0,1%; (▲) 0,15%; e (▼) 0,2%. (Oxidação, derivatização e análise em meio tampão acetato 0,1M, pH=4,5; concentração de NBSI= 10mg/L). 190

Figura 4.4 - Curva de calibração de AA obtida por polarografia após oxidação com carvão activado. **A-** curva de calibração entre 0 e 40mg/L; **B-** curva de calibração entre 0 e 2,5mg/L, evidenciando a zona de calibração linear. (oxidação a ADA, derivatização e análise em tampão acetato 0,1M, pH=4,5; derivatização com 0,1% de OFDA). 193

Figura 4.5 - Curvas de calibração de AA obtidas por polarografia após oxidação com diferentes concentrações de NBSI. **a)** curva de calibração entre 0 e 4mg/L de AA utilizando 2mg/L de NBSI; **b)**- curva de calibração entre 0 e 8mg/L de AA utilizando 5mg/L de NBSI; **c)**- curva de calibração entre 0 e 30mg/L de AA utilizando 20mg/L de NBSI. (oxidação a ADA, derivatização e análise em tampão acetato 0,1M, pH=4,5; derivatização com 0,1% de OFDA). 196

PARTE IV - *APLICAÇÕES*

Figura 1.1 - Sinais polarográficos de soluções de compostos α-dicarbonílicos preparadas em várias soluções tampão e em água em função do tempo após a preparação da solução. Solução preparada em: ✚- água; ■- HCl 0,1M, pH=1; ●- tampão acetato 0,1M, pH=5; ▲- tampão fosfato 0,1M, pH=7; ▼- tampão amoniacal 0,1M, pH=9; ◆- NaHO 0,1M, pH=13. 202

Figura 1.2 - Evolução do sinal polarográfico de uma solução de diacetilo $2x10^{-5}$M em NaHO 0,1M, após a sua preparação. 203

Figura 1.3 - Polarogramas obtidos na análise directa da cerveja, sem qualquer tratamento prévio, sem **a)** e após **b)** derivatização: **1-** branco (solução tampão fosfato 0,1M, pH=7); **2-** solução anterior + 1mL de cerveja; 1'- 1mL de cerveja após derivatização; 2'- +adição de DMQ $8x10^{-6}$M. 208

Figura 1.4 - Polarogramas obtidos na análise da cerveja após destilação simples **a)** e por arrastamento de vapor **b).1-** destilado de 25mL de cerveja (destilação simples); **2-** adição de DMQ $2x10^{-7}$M; 1'- destilado de 25mL de cerveja (destilação por arrastamento de vapor); **2-** adição de DMQ $2x10^{-7}$M. 210

Figura 1.5 - Polarogramas obtidos na análise sem destilação e após destilação simples de: **a)** solução de diacetilo $2x10^{-6}$M; **b)** e **c)** misturas de solução de diacetilo $2x10^{-6}$M com glioxal $2x10^{-6}$M e com metilglioxal $2x10^{-6}$M, respectivamente. 1- pico polarográfico do diacetilo; 2- pico polarográfico do glioxal; 3- pico polarográfico do metilglioxal. 215

Figura 1.6 - Correcção dos resultados espectrofotométricos tomando em consideração a absorção do destilado da cerveja. 1, 2- espectros de absorção de destilado da cerveja derivatizado usando solução com OFDA e destilado acidulado como referência, respectivamente; 3- destilado da cerveja antes da derivatização usando água como referência. AD- leitura de absorvância incorrecta considerada através do método oficial; AB ou CD- leitura de absorvância corrigida para a absorvância própria do destilado. 218

Figura 1.7 - **a)** Espectros de destilado da cerveja com adição de padrão: 1- usando solução com OFDA como referência; 2- usando destilado acidulado como referência. **b)** Espectros correspondentes à obtenção da curva de calibração de diacetilo usando solução com OFDA como referência. 222

Figura 1.8 - Análise espectrofotométrica de diacetilo na cerveja após destilação. **a)**- método da curva de calibração; **b)**- método da adição de padrão. 223

Figura 1.9 - Polarogramas obtidos na análise da cerveja após destilação simples, quantificação através do método de adição de padrão.
1- destilado de 25mL de cerveja; **2**- destilado de 25mL de cerveja com adição de $4x10^{-7}$M de diacetilo; **3**- destilado de 25mL de cerveja com adição de $8x10^{-7}$M de diacetilo. 224

Figura 1.10- Análise polarográfica de diacetilo na cerveja após destilação, pelo método de adição de padrão. (■) cerveja; (●) cerveja + $4,0x10^{-7}$M de diacetilo; (▲) cerveja + $8,0x10^{-7}$M de diacetilo. 225

Figura 1.11- Análise polarográfica de diferentes fracções de destilado da cerveja: **a)** destilação simples; **b)** destilação por arrastamento de vapor. Fracção de destilado recolhida (25mL de cerveja): **1**- 5mL; **2**- 10mL; **3**- 15mL. No ensaio 4- adicionou-se à cerveja, antes da destilação, $1x10^{-6}$M de metilglioxal (10mL de destilado recolhido). 229

Figura 1.12- Polarogramas obtidos na análise directa da aguardente, sem qualquer tratamento prévio, sem **a)** e após **b)** derivatização. 231

Figura 1.13- Polarogramas obtidos na análise da aguardente após derivatização (sem prévio tratamento da amostra), quantificação através do método de adição de padrão.
a) quantificação de diacetilo: **1**- 5mL de aguardente; **2**, **3**, **4**- adições sucessivas de $2x10^{-6}$M de dimetilquinoxalina.
b) quantificação de metilglioxal: **1'**- 5mL de aguardente; **2'**, **3'**, **4'**- adições sucessivas de $2x10^{-6}$M de metilquinoxalina. 232

Figura 1.14- Análise polarográfica de metilglioxal **a)** e de diacetilo **b)** em aguardente, utilizando na quantificação o método de adição de padrão através da adição de: **a)** 2-metilquinoxalina; **b)** 2,3-dimetilquinoxalina. 233

Figura 1.15- Polarogramas obtidos na análise da manteiga após destilação por arrastamento de vapor; quantificação através do método de adição de padrão:
1- destilado de manteiga; **2**, **3**, **4**- adições sucessivas de $2x10^{-6}$M de dimetilquinoxalina. 235

Figura 1.16- Análise polarográfica de diacetilo na manteiga, pelo método de adição de padrão. (●) manteiga; (●) manteiga + $2,0x10^{-6}$M de diacetilo; (●) manteiga + $4,0x10^{-6}$M de diacetilo; (●) manteiga + $6,0x10^{-6}$M de diacetilo. 236

Figura 1.17- Polarogramas obtidos com três soluções tampão distintas na presença de 50mg/L (50ppm) de sulfito: **a)** HCl 0,1M; **b)** tampão acetato 0,1M, pH=5; **c)** 1-tampão fosfato 0,1M, pH=7 e 2-diacetilo $2x10^{-5}$M derivatizado em presença de sulfito (50ppm). 240

Figura 1.18- Polarogramas obtidos na análise de vinho após destilação por arrastamento de vapor; quantificação através do método de adição de padrão: **1**- destilado de vinho; **2**, **3**- adições sucessivas de $2x10^{-7}$M de dimetilquinoxalina. 242

Figura 1.19- Análise polarográfica de diacetilo no vinho, pelo método de adição de padrão. (■) vinho; (■) vinho + $1,0x10^{-6}$M de diacetilo; (■) vinho + $2,0x10^{-6}$M de diacetilo. 243

Figura 2.1 - Análise polarográfica de α-cetoácidos no vinho, sem tratamento prévio da amostra. **a**- vinho sem adição de OFDA (sem derivatização); **b**- solução de OFDA sem adição de vinho; **c**- vinho após derivatização; **d**- adição de $4x10^{-6}$M de 2,3-dimetilquinoxalina (pico 1) e de $2x10^{-6}$M de 2-metilquinoxalina (pico 2); **e**- adição de $6x10^{-6}$M de 2-hidroxiquinoxalina (pico 1') e de $5x10^{-6}$M de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina (pico 2'). 246

Figura 3.1 - Análise polarográfica de oxalato em extractos de rolhas utilizando o método de adição de padrão. **a)** extracto de rolhas naturais: 1- extracto, 2- adição de $2,5x10^{-6}$M de oxalato. **b)** extracto de rolhas "lavadas com pouco cloro": 1'- extracto, 2' e 3'- adição de $3,0x10^{-5}$M e de $6x10^{-5}$ de oxalato, respectivamente. 257

Figura 3.2 - Análise polarográfica de oxalato em rolhas de cortiça, pelo método de adição de padrão. Lote de rolhas: (▼) naturais; (▲) lavadas com muito cloro e tratadas; (●)lavadas com muito cloro; (■) lavadas com pouco cloro. 258

Figura 3.3 - Análise espectrofotométrica de ácido oxálico em rolhas de cortiça, utilizando o método enzimático. A tracejado representa-se a interpolação realizada para a obtenção da concentração de ácido oxálico nos quatro lotes de rolhas. Lotes de rolhas: (■) naturais; (◆) lavadas com muito cloro e tratadas; (●)lavadas com muito cloro; (■) lavadas com pouco cloro. 259

Figura 3.4 - Esquema do sistema de resinas permutadoras utilizado no processo de pré-tratamento da amostra de cerveja. 262

Figura 3.5 - Análise de uma solução de ácido oxálico, utilizando o método espectrofotométrico. A tracejado representa-se a interpolação realizada para a obtenção da massa de oxalato existente nos 5mL de solução analisada. 266

Figura 3.6 - Análise polarográfica utilizando o método de adição de padrão das várias soluções obtidas ao longo do processo de tratamento da amostra de uma solução de ácido oxálico, utilizando o procedimento referido no método espectrofotométrico. (■) solução inicial; (■) solução resultante da passagem nas colunas permutadoras e eluição; (■) solução resultante da precipitação e solubilização. 267

Figura 3.7 - Análise polarográfica de oxalato na cerveja, pelo método de adição de padrão. 270

Figura 3.8 - Análise polarográfica de oxalato na cerveja, após passagem da cerveja no sistema de resinas permutadoras, utilizando o método de adição de padrão. **1**- amostra; 2, 3, 4- adições de $4,8x10^{-6}$M, $9,6x10^{-6}$M e $14,4x10^{-6}$M de oxalato, respectivamente. 271

Figura 4.1 - Análise polarográfica de ácido ascórbico em sumos de fruta, pelo método de adição de padrão. Análise de: (■) trinaranjus (de laranja); (■) compal (de ananás). 275

Figura 4.2 - Análise polarográfica de ácido ascórbico em sumos de fruta, utilizando a curva de calibração (■). As linhas representam a interpolação realizada para a obtenção da concentração de ácido ascórbico. Análise de: (■) 25μL, (■) 50μL, (■) 75μL e (■)100μL de trinaranjus (de laranja); (●) 50μL de compal (de ananás). 275

Figura 4.3 - Representação das razões ip/C (curva de calibração) e (ipx-ip1)/C (adição de padrão) em função da concentração de AA: (■) curva de calibração com AA padrão; (●) análise de AA no *Trinaranjus* por adição de padrão; (▲) análise de AA no *Compal* por adição de padrão. 277

PARTE V - *FENÓMENOS DE ADSORÇÃO DE QUINOXALINAS NA ELÉCTRODO DE MERCÚRIO*

Figura 1.1 - Representação esquemática do perfil de concentração na vizinhança do eléctrodo: - quando $t = t_0$ (1) na ausência; (2) na presença de adsorção;- quando $t = t_0 + t_p$ (1') na ausência; (2') na presença de adsorção; t_0 - intervalo de tempo antes da aplicação do impulso; t_p - intervalo de tempo de aplicação do impulso. 282

Figura 1.2 - Representação esquemática da dependência temporal das intensidades de corrente de adsorção (1) e de difusão (2), após a aplicação do impulso de potencial. Em (3) representa-se a intensidade de corrente resultante. 283

Figura 1.3 - **a)**- representação esquemática de um polarograma normal por impulsos na presença (2) e na ausência (1) de adsorção. **b)**- representação das curvas cronoamperométricas resultantes da aplicação dos impulsos na polarografia normal por impulsos nos potenciais assinalados em **a)**, na presença de adsorção. 285

Figura 1.4 - Representação da perturbação de potencial em onda quadrada. ΔE_P- amplitude de potencial de onda quadrada; i_c- intensidade de corrente catódica; i_a- intensidade de corrente anódica; ΔE_s- incremento de potencial após um ciclo. 287

Figura 2.1 - Efeito do tempo de aplicação de impulso nos polarogramas diferenciais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M e da **b)** 2-hidroxiquinoxalina $1x\ 10^{-6}$M. 291

Figura 2.2 - Efeito do tempo de aplicação de impulso nos polarogramas normais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M e da **b)** 2-hidroxiquinoxalina $1x10^{-6}$M. 293

Figura 2.3 - Efeito do tempo gotejamento nos polarogramas normais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M e da **b)** 2-hidroxiquinoxalina $1x10^{-6}$M. (eléctrodo multimodo na configuração SMDE; tempo de aplicação de impulso de 5ms). 293

Figura 2.4 - Efeito do tempo de aplicação de impulso nos voltamogramas normais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 e do **b)** cádmio (II) $1,5x10^{-5}$M em tampão acetato 0,1M, pH=5. (acumulação a -0,2V durante 30s). 296

Figura 2.5 - Voltamogramas cíclicos da 2,3-dimetilquinoxalina $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 (à esquerda) e em tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7 (à direita) para diferentes velocidades de varrimento. (O voltamograma representado corresponde ao terceiro de três ciclos consecutivos). 299

Figura 2.6 - Voltamogramas cíclicos da DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 para diferentes potenciais de acumulação e de início de varrimento de potencial: (·····) -500mV; (—) -600mV; (—) -700mV; (—) -800mV; (—) -900mV; (—)-1000mV. **a)**- Varrimento inicial no sentido catódico: 1) $E_{acumulação}$ até -1000mV; 2) -1000mV até -500mV; -500mV até $E_{acumulação}$. **b)**- Varrimento inicial no sentido anódico: 1) $E_{acumulação}$ até -500mV; 2) -500mV até -1000mV; -1000mV até $E_{acumulação}$. (O voltamograma representado corresponde ao terceiro de três ciclos consecutivos). 300

Figura 2.7 - Cronoamperogramas obtidos no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa com a solução: **a)**- tampão fosfato 0,1M, pH=7; **b)**- tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7. Impulsos de potencial desde -500mV até: (—) -700mV; (—) -750mV; (—) -800mV; (—) -850mV; (—) -900mV. 303

Figura 2.8 - Cronoamperogramas obtidos no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa com DMQ $5x10^{-7}$M em solução: **a)**- tampão fosfato 0,1M, pH=7; **b)**- tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7. Impulsos de potencial desde -500mV até: (—) -700mV; (—) -750mV; (—) -800mV; (—) -820mV; (—) -850mV; (—) -900mV (—) -950mV. 304

Figura 2.9 - Variação da amplitude do pico de onda quadrada da DMQ $5x10^{-7}$M em função da frequência em tampão fosfato 0,1M, pH=7. Acumulação a -200mV durante 30s; amplitude de onda quadrada= 20mV; degrau de potencial= 2mV. 306

Figura 2.10- Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7, obtidos por voltametria de onda quadrada (—) e respectivas componentes catódicas (—) e anódicas (—) da intensidade de corrente medida nos impulsos catódicos e anódicos. Frequência de onda quadrada: **a)**- 100Hz; **b)**- 400Hz; **c)**- 800Hz; **d)**- 1200Hz. (degrau de potencial= 2mV; acumulação a -200mV durante 30s; amplitude de onda quadrada= 20mV). 309

Figura 2.11- Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 para diferentes amplitudes de onda quadrada. (Frequência= 100Hz, degrau de potencial= 2mV, sem acumulação). 310

Figura 2.12- Voltamogramas de DMQ 5x10-7M em tampão fosfato 0,1M, pH=7, obtidos por voltametria de onda quadrada (—) e respectivas componentes catódicas (—) e anódicas (—) da intensidade de corrente medida nos impulsos catódicos e anódicos. Amplitude de onda quadrada: **a)**- 20mV; **b)**- 50mV. (Frequência= 100Hz, degrau de potencial= 2mV, sem acumulação). 311

Figura 2.13- Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 para diferentes valores de degrau de potencial. **a)**- 100Hz e **b)**- 400Hz. Degrau de potencial: (—) 1mV; (—) 2mV; (—) 4mV; (—) 8mV; (—) 15mV. (sem acumulação, amplitude de onda quadrada= 20mV). 312

Figura 2.14- Influência do tempo de acumulação no sinal voltamétrico. Concentração de DMQ: (■) $1x10^{-9}$M, (●) $5x10^{-7}$M. (amplitude de onda quadrada= 20mV, degrau de potencial= 2mV; frequência= 100Hz, 30s acumulação a -200mV). 313

Figura 2.15- Influência da frequência de onda quadrada na amplitude do pico voltamétrico da DMQ $5x10^{-7}$M, na presença de diferentes concentrações de cloreto de tetrafenilfosfónio. Concentração de CTFF (mg/L): (■)0; (●)1; (▲)2; (✚)5; (✱)10. (Tampão fosfato 0,1M, pH=7, degrau de potencial= 2mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, 30s de acumulação a -200mV). 315

Figura 2.16- Influência da frequência de onda quadrada na amplitude do pico voltamétrico da DMQ $5x10^{-7}$M, para diferentes concentrações de tampão fosfato com pH= 7. Concentração de tampão fosfato (M): (✕)$1x10^{-3}$; (○)$5x10^{-3}$; (✚)$1x10^{-2}$; (▲)$5x10^{-2}$; (▼)$1x10^{-1}$; (◆)$5x10^{-1}$. (degrau de potencial= 2mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, 30s de acumulação a -200mV). 316

Figura 2.17- Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M obtidos em diferentes concentrações de tampão fosfato pH=7. Concentração de tampão fosfato (M): **a)**-$1x10^{-4}$; **b)**- $5x10^{-4}$; **c)**- $1x\ 10^{-3}$; **d)**- $5x10^{-3}$; **e)**- $1x10^{-2}$; **f)**- $5x10^{-2}$; **g)**- $1x10^{-1}$; **h)**- $5x10^{-1}$. (30s de acumulação a -200mV, amplitude de onda quadrada=20mV, degrau de potencial=2mV, frequência=100Hz). 318

Figura 2.18- Variação da intensidade de corrente do pico voltamétrico da DMQ $5x10^{-7}$M com a frequência para duas concentrações de tampão distintas contendo 0,1M de KCl para controlo da força iónica. Concentração de tampão fosfato (M): (■)$1x10^{-4}$, (●)$1x10^{-2}$. (Degrau de potencial= 2mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, 30s de acumulação a -200mV). 319

Figura 2.19- Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M obtidos com duas diferentes concentrações de tampão fosfato pH=7, contendo 0,1M de KCl . Concentração de tampão fosfato (M): **a)**-$1x10^{-4}$; **b)**- $1x10^{-2}$. (30s acumulação a -200mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, degrau de potencial= 2mV, frequência= 100Hz). 319

Figura 2.20- Voltamogramas cíclicos da 2-hidroxiquinoxalina $2,5x10^{-6}$M (1ºciclo) obtidos com diferentes velocidades de varrimento e com diferente degrau de potencial: **a)**- 1mV/ impulso; **b)**- 5mV/ impulso. 321

Figura 2.21- Voltamogramas normais por impulsos da 2-hidroxiquinoxalina $2,5x10^{-6}$M em tampão acetato 0,1M, pH=5, obtidos com diferentes intervalos de tempo de aplicação de impulso e com diferente degrau de potencial: **a)**- 1mV/ impulso; **b)**- 5mV/ impulso. Tempo de aplicação de impulso: (—) 3ms; (—) 5ms; (—) 10ms; (—) 20ms; (—) 50ms. 325

Figura 2.22- Voltamograma obtido por voltametria de onda quadrada de 2-hidroxiquinoxalina $5x10^{-6}$M em tampão acetato 0,1M, pH=5. (—) intensidade de corrente resultante; (----) intensidade de corrente catódica; (----) intensidade de corrente anódica. (Degrau de potencial= 5mV; amplitude de impulso de onda quadrada= 20mV; frequência = 50Hz); 30s de acumulação a -200mV). 326

Figura 2.23- Voltamogramas por onda quadrada obtidos com quatro concentrações distintas de DMQ, a diferentes frequências. Concentração de DMQ: (—) $2x10^{-9}$M; (—) $5x10^{-9}$M; (—) $2x10^{-8}$M; (—) $5x10^{-8}$M. **a)-** sem acumulação; **b)-** 30s de acumulação a -500mV. (Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV). 332

Figura 2.24- Curvas de calibração da 2-hidroxiquinoxalina obtidas por voltametria de onda quadrada, a diferentes frequências e em diferentes electrólitos de suporte. Electrólitos de suporte: **A-** solução HCl 0,1M, pH=1; **B-** solução tampão acetato 0,1M, pH=5; **C-** solução tampão amoniacal 0,1M, pH=9. Frequência de onda quadrada: (■) 10Hz; (■) 20Hz; (■) 50Hz; (■) 100Hz; (■) 200Hz. (Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; acumulação durante 30s a -200mV). 335

Figura 2.25- Voltamogramas por onda quadrada de uma solução de diacetilo $2x10^{-8}$M, derivatizada com 0,05% de OFDA, para diferentes frequências de onda quadrada. Frequências de onda quadrada (Hz): (—) 25; (—) 50; (—)100; (—)200. (Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 0,05% de OFDA; 3 min de tempo de derivatização; sem acumulação). 336

Figura 2.26- Voltamogramas por onda quadrada de uma solução de diacetilo $2x10^{-8}$M, derivatizada com 0,05% de OFDA, para diferentes tempos de acumulação. Tempo de acumulação (s): (—) 0; (—) 30; (—) 60. (Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 0,05% de OFDA; 3 min de tempo de derivatização; frequência de 100Hz). 337

Figura 2.27- Voltamogramas por onda quadrada correspondentes à adição sucessiva de diacetilo a uma solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,05% de OFDA.. Concentração de diacetilo resultante na célula (M): (—) 0; (—) $2x10^{-8}$; (—) $4x10^{-8}$; (—) $6x10^{-8}$; (—) $8x10^{-8}$; (—) $1x10^{-7}$; (—) $1,5x10^{-7}$; (—)$2x10^{-7}$. (frequência= 100Hz; amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 0,05% de OFDA; 3 min de tempo de derivatização; sem acumulação). 338

Figura 2.28- Curva de calibração de diacetilo obtida por voltametria de onda quadrada após derivatização em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,05% de OFDA. (frequência= 100Hz; amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 3 min de tempo de derivatização; sem acumulação). 338

Figura 2.29- Voltamogramas por onda quadrada do produto da derivatização de diacetilo $5x10^{-7}$M (**Y**) com OFDA 0,1% em tampão fosfato 0,1M, pH=7, para várias frequências de onda quadrada. (**X**) representa o pico da 2,3-diaminofenazina. (Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 30s de acumulação a -200mV). 340

Figura 2.30- Voltamogramas por onda quadrada de DMQ $2x10^{-8}$M para diferentes frequências, sem (—) e com (—) dez minutos de passagem de azoto pela solução. (acumulação a -200mV durante 30s; degrau de potencial= 2mV; amplitude de impulso= 20mV, tampão fosfato 0,1M, pH=7). 342

Figura 2.31- Determinação de diacetilo na aguardente usando voltametria de onda quadrada. **a)-** efeito do tempo de acumulação, para frequência de 100Hz: i- sem acumulação; ii- 30s de acumulação (10min de desoxigenação). **b), c)-** Adição de padrão de DMQ, para frequência de 400Hz e sem acumulação: **1, 2, 3-** amostra, $5x10^{-7}$M, $10x10^{-7}$M, respectivamente **(b)-** 10min de desoxigenação; **c)-** sem desoxigenação). (Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV). 343

ÍNDICE DE TABELAS

pág.

PARTE I - *FUNDAMENTAÇÃO DO TEMA*

Tabela 1.1 - Valores de constantes de equilíbrio a 25°C para a reacção de hidratação de alguns aldeídos e cetonas. [Valores extraídos da tabela 8.1 da referência 2]. 3

Tabela 1.2 - Valores de constantes de equilíbrio a 0°C para a reacção de adição de hidrogenossulfito com alguns aldeídos e cetonas. [Valores extraídos da tabela 8.4 da referência 2]. 6

Tabela 1.3 - Valores de constantes para o equílibrio ceto-enol para alguns compostos carbonílicos. [Valores extraídos da tabela 8.8 da referência 2]. 11

Tabela 2.1 - Métodos de análise de diacetilo na cerveja. 27

Tabela 2.2 - Teores de α-cetoácidos no plasma humano. Comparação entre os teores normais e os obtidos com o plasma de um doente com cetonúria de cadeia ramificada. Valores expressos em nmol/mL. (Valores extraídos da ref^{a}. 43). 31

Tabela 2.3 - Algumas aplicações terapêuticas e profiláticas do ácido ascórbico[65]. 37

Tabela 2.4 - Teores de vitamina C típicos em algumas frutas e legumes crus[64]. 38

Tabela 2.5 - Vantagens e desvantagens de processos de derivatização integrados em metodologias analíticas. 42

Tabela 2.6 - Lista cronológica de métodos de análise de compostos α-dicarbonílicos baseados na reacção de derivatização com a o-fenilenodiamina ou com outras o-diaminas aromáticas. 45

Tabela 3.1 - Limites de detecção típcos da polarografia clássica, normal por impulsos e diferencial por impulsos[109]. 54

Tabela 3.2 - Comparação entre a forma das relações potencial - tempo obtidas em equipamento de polarografia / voltametria analógico e controlado por computador. 57

PARTE II - *COMPORTAMENTO POLAROGRÁFICO E VOLTAMÉTRICO DAS QUINOXALINAS*

Tabela 1.1 - Soluções tampão utilizadas como electrólito de suporte no estudo polarográfico das quinoxalinas. Reagentes e quantidades utilizadas na preparação das soluções. 62

Tabela 1.2 - Características gerais das quinoxalinas adquiridas utilizadas neste estudo e quantidades utilizadas na preparação das soluções de partida com concentração 10^{-3}M. 63

Tabela 1.3 - Condições operacionais utilizadas nos ensaios polarográficos e voltamétricos. 65
Tabela 1.4 - Limite anódico e catódico obtidos para as soluções tampão utilizadas como electrólito de suporte. 66
Tabela 1.5 - Condições operacionais utilizadas nos ensaios espectrofotométricos. 67
Tabela 2.1 - Valores dos declives obtidos nas representações do potencial de pico (Ep) com o pH, para as três quinoxalinas estudadas. 73
Tabela 2.2 - Valores dos declives obtidos nas representações do potencial de pico (Ep) com o pH, para as duas hidroxiquinoxalinas estudadas. 81
Tabela 2.3 - Valores dos declives obtidos nas representações do potencial de pico (Ep) com o pH, para a 2,3-di-hidroxiquinoxalina. 88
Tabela 2.4 - Comportamento polarográfico e voltamétrico observado para as quinoxalinas das três classes consideradas. Quadro resumo. 89

PARTE III - *ANÁLISE POLAROGRÁFICA DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS*

Tabela 1.1 - Características dos compostos α-dicarbonílicos da classe I e modo de preparação das soluções de partida com concentração 10^{-1}M. 97
Tabela 1.2 - Intervalos de tempo necessários para a conversão quantitativa de diacetilo e metilglioxal em 2,3-dimetilquinoxalina e 2-metilquinoxalina, respectivamente, em diferentes soluções tampão.(concentração de diacetilo=10^{-5}M; concentração de metilglioxal =$2x10^{-5}$M; concentração de OFDA=0,2%). 105
Tabela 1.3 - Estimativa do intervalo de tempo necessário para a conversão quantitativa dos compostos α-dicarbonílicos da classe I nas respectivas quinoxalinas para diferentes concentrações de OFDA. Dados obtidos através de ensaios espectrofotométricos (concentração de compostos α-dicarbonílicos =10^{-5}M). 114
Tabela 1.4 - Concentração de OFDA seleccionada para a realização da reacção de derivatização para cada um dos compostos α-dicarbonílicos da classe I. 118
Tabela 2.1 - Características dos α-cetoácidos utilizados e modo de preparação das soluções de partida com concentração $5x10^{-2}$M. 130
Tabela 2.2 - Variação do pH de uma solução de OFDA 1% em função do nº de moles de HCl adicionado (Vinicial = 25mL; nº de mmoles de OFDA inicial = 2,3). 135
Tabela 2.3 - Evolução da reacção de derivatização do ácido glioxílico com o tempo em diferentes condições de pH de meio reactivo (Conc. de ácido glioxílico = $2,5x10^{-4}$M; conc. OFDA = 0,5%; volume de solução retirada para análise = 0,250mL; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5). 138
Tabela 2.4 - Evolução da reacção de derivatização do ácido glioxílico com o tempo em função da concentração de OFDA (Conc. de ácido glioxílico = $2,5x10^{-4}$M; pH=0,8; volume de solução retirada para análise = 0,250mL; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5). 140
Tabela 2.5 - Evolução da reacção de derivatização do ácido pirúvico com o tempo em diferentes condições de pH de meio reactivo (Conc. de piruvato de sódio = $2,5x10^{-4}$M; conc. OFDA = 0,5%; volume de solução retirada para análise = 0,250mL; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5). 143
Tabela 3.1 - Avaliação da extensão da reacção de derivatização em função do tempo em reacção. (HCl 1M; %OFDA=1%; aquecimento em banho-maria à ebulição). 155
Tabela 3.2 - Grau de conversão de ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina em função da concentração de HCl usada na derivatização. Processo de derivatização até à evaporação da solução em reacção. (Conc. OFDA= 1%; conc. ácido oxálico= $5x10^{-5}$M). 163
Tabela 3.3 - Repetibilidade do processo de derivatização envolvendo o aquecimento da solução em reacção até à secura. (Concentração de HCl no meio reactivo = 0,5M; concentração de OFDA = 2%; concentração de ácido oxálico = $5x10^{-5}$M). 165

Tabela 3.4 - Influência dos volumes de solução a evaporar na extensão da reacção de derivatização. (Concentração de HCl= 0,5M; concentração de OFDA= 2%; quantidade de oxalato de sódio a derivatizar = $5x10^{-8}$moles). 166

Tabela 4.1 - Intervalo de tempo necessário para atingir o valor máximo de sinal polarográfico, em diferentes soluções tampão. (Concentração de AA oxidado na célula = $4,6x10^{-5}$M; concentração de OFDA= 0,1%). 175

Tabela 4.2 - Influência do meio no processo de oxidação do AA com carvão activado. (Volume de solução de AA tratada = 25,00mL; concentração da solução de AA = 0,25g/L; massa de carvão activado = 250mg). 183

Tabela 4.3 - Intensidade de corrente do pico interferente em função da concentração de NBSI na célula polarográfica. (Concentração de OFDA = 0,1%; tampão acetato 0,1M, pH=4,5). 188

Tabela 4.4 - Intensidade de corrente do pico interferente em função da quantidade de OFDA na célula polarográfica. (Concentração de NBSI = 20mg/L; tampão acetato 0,1M, pH=4,5). 189

PARTE IV - *APLICAÇÕES*

Tabela 1.1 - Destilação de diacetilo. Influência do volume de solução a destilar no grau de recuperação do diacetilo por destilação simples e por arrastamento de vapor. (número de moles de diacetilo em destilação = $5x10^{-8}$ moles; volume de destilado recolhido = 10mL). 213

Tabela 1.2 - Destilação de glioxal, metilglioxal e 2,3-pentanodiona. Grau de recuperação resultante da destilação simples e por arrastamento de vapor. (nº de moles em destilação = $5x10^{-8}$; volume de destilado recolhido = 10mL). 214

Tabela 1.3 - Determinação do teor de diacetilo na cerveja. Estimativa do grau de recuperação de diacetilo resultante da destilação. 226

Tabela 1.4 - Influência do metilglioxal na determinação de diacetilo na cerveja. (Processo de destilação simples). 228

Tabela 1.5 - Influência do metilglioxal na determinação de diacetilo na cerveja. (Processo de destilação por arrastamento de vapor). 229

Tabela 1.6 - Determinação do diacetilo na manteiga. Estimativa do grau de recuperação obtido na destilação do diacetilo. 237

Tabela 1.7 - Influência da presença de sulfito na reacção de derivatização do diacetilo. (Concentração de diacetilo = $2x10^{-5}$M). 241

Tabela 1.8 - Determinação do teor de diacetilo no vinho. Estimativa do grau de recuperação do diacetilo na destilação. 243

Tabela 3.1 - Avaliação da interferência de alguns compostos na determinação polarográfica de ácido oxálico. 251

Tabela 3.2 - Resultados da determinação do teor de ácido oxálico em rolhas utilizando o método polarográfico e o método enzimático com detecção espectrofotométrica. 258

Tabela 3.3 - Determinação polarográfica de oxalato nas soluções obtidas ao longo do tratamento da amostra referido no método espectrofotométrico proposto por Alavi e colaboradores[61]. Estimativa do grau de recuperação de oxalato. 268

Tabela 3.4 - Valores experimentais para o cálculo da concentração de oxalato na cerveja obtidos através do método de análise polarográfica. 270

Tabela 4.1 - Resultados da análise polarográfica de AA em sumos de fruta embalados (trinaranjus e compal) obtidos através do método da curva de calibração e do método de adição de padrão. 276

PARTE V - *FENÓMENOS DE ADSORÇÃO DE QUINOXALINAS NO ELÉCTRODO DE MERCÚRIO*

Tabela 2.1 - Valores de ip, Ep e b½ obtidos por voltametria de onda quadrada a diferentes frequências para uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M. Valores de intensidade de corrente da linha de base a -650mV e -900mV. (solução tampão fosfato 0,1M, pH=7; acumulação a -200mV durante 30s, degrau de potencial = 2mV; amplitude de impulso = 20mV). 308

Tabela 2.2 - Valores de ip, Ep e b½ para o pico de adsorção catódico obtido por voltametria cíclica para uma solução de 2-hidroxiquinoxalina $2,5x10^{-6}$M para diferentes velocidades de varrimento. (solução tampão acetato 0,1M, pH=5, acumulação a -200mV durante 30s). 322

Tabela 2.3 - Valores de ip, Ep e b½ obtidos por voltametria de onda quadrada para uma solução de 2HQ $2,5x10^{-6}$M, para diferentes frequências e para quatro valores de degrau de potencial (solução tampão acetato 0,1M, pH=5; acumulação a -100mV durante 30s, amplitude do impulso de onda quadrada = 20mV). 328

Tabela 2.4 - Valores de ip obtidos por voltametria de onda quadrada com soluções de DMQ com diferentes concentrações para diferentes frequências. Parâmetros da regressão linear entre os valores de ip e a concentração de DMQ para cada frequência testada. (meio tampão fosfato 0,1M, pH=7; amplitude do impulso = 20mV; degrau de potencial = 2mV). 330

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ι	intervalo de tempo correspondente ao período de um ciclo
χ	comprimento de onda
ΔE_s	degrau de potencial entre cada ciclo
ΔE_s	amplitude dos impulsos
δo	camada de difusão antes da aplicação do impulso
δp	camada de difusão após a aplicação do impulso
2HQ	2-hidroxiquinoxalina
AA	ácido ascórbico
Abs	absorvância
ADA	ácido desidroascórbico
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
$b_{1/2}$	largura a meia altura do pico
C	concentração molar
CTFF	cloreto de tetrafenilfosfónio
DME	eléctrodo de mercúrio gotejante
DMQ	2,3-dimetilquinoxalina
EBC	European Brewery Convention
E_i	potencial inicial
E_p	potencial de pico

HMDE	eléctrodo de mercúrio de gota suspensa
i	intensidade de corrente
i_a	intensidade de corrente anódica
i_c	intensidade de corrente catódica
i_p	intensidade de corrente de pico
N	número de pontos experimentais
NBSI	n-bromossuccinimida
OFDA	o-fenilenodiamina
Ø	diâmetro
SMDE	eléctrodo de mercúrio gotejante com crescimento de gota controlado ("static mercury drop electrode"
t_{gota}	tempo de vida da gota
t_o	intervalo de tempo antes da aplicação do impulso
tp	intervalo de tempo de aplicação do impulso
$t_{reacção}$	tempo em reacção

ANÁLISE VOLTAMÉTRICA, APÓS DERIVATIZAÇÃO, DE COMPOSTOS PASSÍVEIS DE CONDENSAÇÃO CÍCLICA

ANÁLISE EM ALIMENTOS

RESUMO

A reacção entre compostos α-dicarbonílicos e o-diaminas aromáticas dá origem à formação, em elevada extensão, de quinoxalinas. Esta reacção tem sido utilizada com fins analíticos, uma vez que as quinoxalinas apresentam características mais adequadas para a análise através de técnicas espectrofotométricas que os compostos originais. Neste trabalho estudou-se a aplicação da polarografia e da voltametria utilizando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa à determinação das quinoxalinas obtidas após derivatização de compostos α-dicarbonílicos com a o-fenilenodiamina.

Começou-se por fazer a caracterização do comportamento polarográfico e voltamétrico de um conjunto de quinoxalinas em diferentes soluções tampão, utilizando o varrimento de potencial diferencial por impulsos. Estudaram-se, seguidamente, as condições mais adequadas para a realização da reacção de derivatização de vários tipos de compostos α-dicarbonílicos com a o-fenilenodiamina para dar origem a quinoxalinas e desenvolveram-se os procedimentos para a análise das quinoxalinas resultantes dessa derivatização.

Os métodos de análise desenvolvidos foram aplicados à determinação dos respectivos compostos α-dicarbonílicos em amostras de produtos alimentares e afins. Neste contexto analisou-se: o diacetilo na cerveja, na aguardente, no vinho e na manteiga; o metilglioxal na aguardente; os α-cetoácidos no vinho; o oxalato em extratos de rolhas e na cerveja; o ácido ascórbico e o ácido desidroascórbico em sumos de frutos.

Pelo facto de se ter verificado que as quinoxalinas adsorvem no eléctrodo de mercúrio, estudou-se a possibilidade de as determinar por voltametria com adsorção.

Dadas as características da voltametria com adsorção foi possível utilizar técnicas por impulsos de varrimento de potencial muito rápidas, nas quais o intervalo de tempo que medeia entre a aplicação do impulso e a amostragem da intensidade de corrente é muito curto, como forma de aumentar a sensibilidade da determinação.

ABSTRACT

The chemical reaction between α-dicarbonyl compounds and o-phenylenediamines derivatives leads to the formation of quinoxalines in great extent. This chemical reaction has been used for the development of analytical methodologies based on the preparation of quinoxalines which show better characteristics for the spectrophotometric analysis than the original α-dicarbonyl compounds. In this work we have studied the application of polarography and voltammetry with the hanging mercury drop electrode to the determination of the quinoxalines formed by derivatization with o-phenylenediamine.

In first place the characterisation of the differential pulse polarographic and voltammetric behaviour for a group of quinoxalines was studied on different supporting electrolytes. Then, the more suitable conditions for the derivatization of different types of α-dicarbonyl compounds with o-phenylenediamine were developed, as well as the analytical procedures for the analysis of the resulting quinoxalines.

The analytical methods developed have been applied to the following determinations of α-dicarbonyl compounds in food samples: diacetyl in beer, in brandy, in wine and in butter; methylglyoxal in brandy; α-ketoacids in wine; oxalate in corks and in beer; ascorbic acid and dehidroascorbic acid in fruit juice.

As a consequence of the detection of adsorption effects of the quinoxalines on the mercury electrode, the possibility of using adsorption voltammetry to do the analysis was investigated. Due to the characteristics of adsorption voltammetry, it was possible to

apply pulse techniques with very fast scanning of potential, in which the pulse time is very low and the current sampling time is very short, in order to improve the sensitivity of the determination.

RÉSUMÉ

La reáction entre composés α-dicarbonyles et o-diamines aromatiques conduit à la formation de quinoxalines à un degré élevé. Cette réaction a été souvent utilisée avec des finalités analytiques, étant donné que les quinoxalines présentent des caractéristiques plus adéquates que les composés de depart pour l'analyse utilisant des techniques spectrophotometriques. Dans ce travail, on a etudié l'application de la polarographie et de la voltampérometrie en utilisant l'electrode à goutte de mercure stationnaire pour la détermination des quinoxalines obtenues à la suite de la derivatization de composés α-dicarbonyles avec la o-phenylenediamine.

On a commencé par la caractérization du comportement polarographique et voltampérometrique d'un ensemble de quinoxalines en des différentes conditions de milieu, en utilizant le balayage impulsionelle différentielle du potentiel. Par la suite, on a étudié les conditions les plus adéquates à la réalisation de la reaction de dérivatisation de plusiers types de composés α-dicarbonyles avec la o-phenylenediamine pour obtenir des quinoxalines et on a développé les procédés d'analyse de quinoxalines résultantes de la derivatisation mentionné.

Les méthodes d'analyse développés ont été appliquées à la détermination des composés α-dicarbonyles respectifs dans des ´chantillons de produits alimentaires et similaires. Dans ce contexte, on a analysé: le diacetyle dans la bière, l'eau de vie, le vin et le beurre; le méthylglyoxal dans l'eau de vie; les cétoacides dans le vin; le oxalate dans des extraits de bouchons et dans la bière; l'acide ascorbique et l'acide desidroascorbique dans du jus de fruits.

Ayant vérifié que les quinoxalines adsorbent dans l'électrode de mercure, on a envisagé la possibilité de les déterminer par voltampérometrie avec adsorption. Les caractéristiques de la voltampérometrie avec adsorption on rendu possible l'utilization de techniques très rapides de balayage impulsionelle différentielle du potentiel (dans lesquelles il y a na intervalle de temps très court entre le moment de l'application du pulse et celui de la mensuration de l'intensité du courant) comme moyen d'augmenter la sensibilité de la détermination.

INTRODUÇÃO

A modificação de uma espécie química por forma a dar origem a um derivado com características mais adequadas a um dado processo analítico é um procedimento bastante comum em análise química. Essa modificação é, em geral, conseguida através da realização de uma ou mais reacções químicas, utilizando um ou mais reagentes apropriados por forma a que o composto resultante possa ser relacionado com o composto original que se pretende analisar. Tal procedimento, denomina-se genericamente derivatização e os reagentes químicos responsáveis pela formação dos derivados denominam-se agentes derivatizantes.

Apesar de praticamente toda a análise química qualitativa clássica, quer inorgânica, quer orgânica, se basear em processos de transformações químicas, mais ou menos complexos, por forma a fazer surgir, por exemplo, precipitados, colorações ou cheiros que permitam inferir sobre a composição das amostras, o termo derivatização só surgiu muito mais tarde no âmbito do desenvolvimento da cromatografia gasosa. A cromatografia gasosa revelou-se como uma técnica de extrema utilidade na separação, detecção e análise de misturas complexas de compostos orgânicos; no entanto, verificou-se que a sua utilidade na separação de compostos orgânicos que possuem grupos polares é muito limitada porque, em geral, esses compostos têm baixa volatilidade e são instáveis às temperaturas elevadas necessárias para a sua volatilização. Desta forma, a aplicação da cromatografia gasosa à determinação de compostos orgânicos polares fez surgir um intenso esforço de investigação na procura de reagentes e de métodos de derivatização que permitissem obter derivados com características de volatilidade, de estabilidade térmica e de separação mais adequados à técnica de análise; os termos derivatização e

agentes derivatizantes viriam a surgir por esta altura. Os agentes de sililação e de acilação, actualmente muito utilizados como agentes derivatizantes em processos de análise por cromatografia gasosa, são bons exemplos do sucesso do esforço dessa pesquisa.

É, no entanto, claro que o uso de processos de derivatização não é exclusivo da cromatografia gasosa. Este tipo de procedimento é extremamente vulgar em análise química, desde os ensaios qualitativos da análise química clássica, até às técnicas instrumentais mais comuns da análise química quantitativa, como por exemplo as múltiplas reacções de desenvolvimento de cor, características da análise espectrofotométrica. O objectivo pelo qual se realiza um dado processo de derivatização depende bastante da técnica de análise que se pretende utilizar. Na cromatografia gasosa, como já foi referido, o objectivo mais comum é o de aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade dos compostos porque, em geral, a detecção é realizada em detectores quasi-universais. No entanto, na cromatografia líquida, a maior parte dos processos de derivatização são orientados para a detecção, o que é uma consequência de maior dificuldade em utilizar detectores universais. Da mesma forma, na espectrofotometria de ultravioleta, na fluorimetria e em outras técnicas instrumentais, o uso de processos de derivatização é, quase sempre, orientado para o aumento da sensibilidade da análise. Mas para além do aspecto de aumento de sensibilidade procura-se, cada vez mais, encontrar processos de derivatização rápidos e simples que tirem partido da selectividade da resposta das técnicas de análise, no sentido de se conseguir, de forma expedita, a análise específica de componentes de amostras de elevada complexidade.

Em técnicas electroanalíticas, como a voltametria e a polarografia, não existe uma grande tradição de utilização de reacções de derivatização; isto não significa, contudo, que não existam alguns bons exemplos de métodos de análise voltamétrica ou polarográfica que se baseiam em processos de derivatização. A voltametria com adsorção de catiões metálicos, recentemente desenvolvida, baseia-se na formação de complexos entre catiões metálicos e ligandos que adsorvam na superfície do eléctrodo de trabalho. Contudo, a situação mais habitual é aplicar as técnicas de voltametria e polarografia na determinação directa dos compostos a analisar.

O objectivo do trabalho que se descreve nesta dissertação foi o estudo da aplicação de técnicas polarográficas e voltamétricas à determinação de compostos α-dicarbonilo após derivatização com a o-fenilenodiamina para dar origem a derivados heterocíclicos do tipo quinoxalinas.

Considera-se como compostos α-dicarbonilo todas as espécies orgânicas que possuam ligações duplas carbono-oxigénio em posições adjacentes. Sendo assim, incluem-se nesta definição para além das espécies que possuem pelo menos dois grupos funcionais carbonilo adjacentes, também aquelas em que o grupo carbonilo é substituído por um grupo carboxilo, considerando-se este como o resultado da associação entre os grupos funcionais carbonilo e hidroxilo. Desta forma, o conjunto de compostos orgânicos que podem ser classificados como compostos α-dicarbonilo é muito vasto: α-dicetonas, α-cetoaldeídos, α-cetoácidos, o ácido oxálico (como único ácido dicarboxílico com os dois grupos adjacentes) e outros compostos com cadeias carbonadas mais complexas e estruturas cíclicas, tais como os carbo-hidratos α-dicarbonilados resultantes da oxidação de carbo-hidratos.

Neste trabalho foi necessário restringir o estudo a um conjunto limitado de compostos α-dicarbonilo. A selecção desse conjunto foi feita por forma a ficarem representados os vários tipos de estruturas gerais referidas acima. A escolha dentro de cada grupo teve em atenção principalmente dois factores: a simplicidade estrutural dos compostos e, simultaneamente, a sua relevância sob o ponto de vista químico e bioquímico, sobretudo em química alimentar.

O trabalho iniciou-se pelo estudo polarográfico de algumas quinoxalinas em diferentes electrólitos de suporte, com diferentes pH. Em simultâneo fez-se o estudo da estabilidade das soluções aquosas de quinoxalinas, recorrendo a técnicas de espectrofotometria de U.V. Na segunda fase do trabalho estudaram-se as características da reacção de derivatização para cada um dos compostos α-dicarbonilo seleccionados por forma a seleccionar as melhores condições para a realização da análise dessas espécies. Fez-se, depois, a aplicação dos métodos de análise desenvolvidos à determinação de compostos α-dicarbonilo em amostras de produtos alimentares e afins. A terceira fase deste trabalho surgiu na sequência da obtenção de certos comportamentos polarográficos atípicos no estudo de certas quinoxalinas quando adsorvidas no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Nesta parte do trabalho tira-se partido de um equipamento de voltametria/polarografia de elevada versatilidade e potencialidade, recém-adquirido, que permitiu efectuar ensaios para caracterizar os fenómenos de adsorção responsáveis por essa atipicidade de comportamento.

PARTE I

FUNDAMENTAÇÃO DO TEMA

Quando se desenvolvem novas metodologias de análise química englobando a derivatização das espécies a analisar deve-se procurar conhecer, o melhor possível, a importância para o processo dos três seguintes aspectos fundamentais: (1) a reactividade química do agente derivatizante e as condições de meio reactivo óptimas para a realização da derivatização que, mesmo na sua forma mais simples, envolverá pelo menos uma reacção química; (2) o conjunto potencial de espécies que podem derivatizar e formar derivados com características adequadas à determinação pela técnica analítica que se vai utilizar; e (3) a avaliação da técnica de análise para a realização da análise pretendida.

Neste primeiro capítulo faz-se uma revisão dos aspectos referidos no parágrafo anterior como fundamentação para o desenrolar do trabalho experimental. Começar-se-á por caracterizar de forma sucinta alguns aspectos sobre a reactividade do grupo carbonilo em meios aquosos, importantes para a definição das propriedades químicas dos compostos α-dicarbonílicos. De seguida referir-se-á as características da reacção de derivatização entre a o-fenilenodiamina e as várias classes de compostos α-dicarbonílicos estudados e evidenciar-se-á a importância que o processo de derivatização seleccionado tem para a realização da análise polarográfica deste tipo de compostos. Salientar-se-á, também, a importância a nível alimentar e industrial dos compostos que foram estudados

e, na parte final, abordar-se-á de uma forma breve e genérica as principais características da técnica de análise polarográfica.

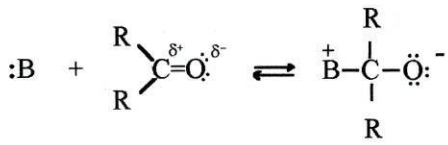
1 - REACÇÕES DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS

1.1 - ESTRUTURA E REACTIVIDADE DO GRUPO CARBONÍLICO[1,2,3]

Os compostos carbonílicos são compostos polares devido à maior electronegatividade do átomo de oxigénio relativamente à do átomo de carbono. Desta forma, vai existir um efeito de atracção de densidade electrónica por parte do átomo de oxigénio. A estrutura geral de um grupo carbonilo pode ser representada através das duas estruturas híbridas:

$$R_2C{=}O \longleftrightarrow R_2C^{+}{-}O^{-}$$

As moléculas que possuem grupos carbonílicos podem reagir com agentes nucleófilos; o ataque nucleófilo vai ocorrer através do átomo de carbono do grupo carbonílico, podendo o processo ser representado por:



Esta reacção fica a dever-se à deficiência electrónica no átomo de carbono do grupo carbonílico que o torna num aceitador de densidade electrónica. Desta forma pode-se prever que os grupos R, ligados ao átomo de carbono carbonílico, desfavorecerão a reacção se forem electrodoadores, uma vez que tornam o átomo de carbono menos electrófilo, mas favorecem a reacção se forem electroaceitadores. Para além destes factores de natureza electrónica, também os factores estereoquímicos têm grande influência na reactividade destes compostos; assim, quanto maiores forem os grupos, R, ligados ao átomo de carbono carbonílico e/ou o tamanho do agente nucleófilo, mais desfavorecida será a reacção de adição nucleófila devido a impedimentos de natureza estereoquímica.

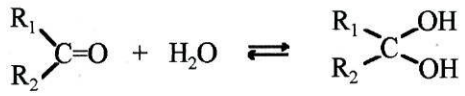
Estas reacções de adição nucleófila são, em geral, reversíveis. A possibilidade de coordenação do átomo de oxigénio ligado ao grupo carbonílico com H^{+}, ou outro ácido de Lewis, acentua o carácter electrófilo do átomo de carbono desse grupo e, desta

forma, será de esperar que a adição de agentes nucleófilos seja favorecida. Quer isto dizer que, neste tipo de reacções, é necessário atender aos efeitos de catálise, quer por ácidos, quer por bases.

1.2 - ALGUMAS REACÇÕES DE ADIÇÃO NUCLEÓFILA AO GRUPO CARBONILO

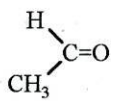
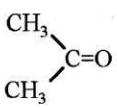
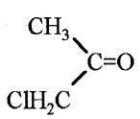
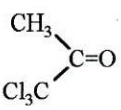
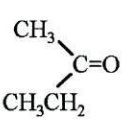
1.2.1 - HIDRATAÇÃO E ADIÇÃO DE HIDROGENOSSULFITO

A molécula de água pode actuar como agente nucleófilo e reagir com o grupo carbonilo formando hidratos. A reacção pode ser representada por:



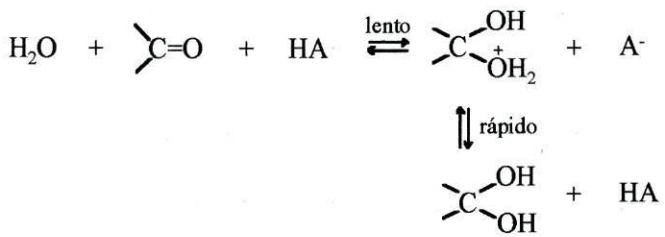
Na tabela 1.1, pode observar-se os valores de algumas constantes de equilíbrio para a reacção de hidratação de alguns aldeídos e cetonas com estruturas simples.

Tabela 1.1 - Valores de constantes de equilíbrio a 25°C para a reacção de hidratação de alguns aldeídos e cetonas. [Valores extraídos da tabela 8.1. da referência 2].

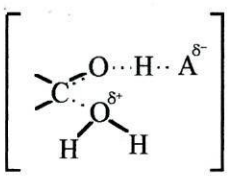
Composto carbonílico	$K_{[H_2O]} = \frac{[R_1R_2C(OH)_2]}{[R_1R_2C=O]}$
	$2x10^3$
	1,3
	$2x10^{-3}$
	37
	$2,8x10^4$
	0,71

Verifica-se que a constante de equilíbrio para esta reacção é tanto maior quanto mais simples é a estrutura dos compostos carbonílicos; por outro lado, os grupos que podem ceder densidade electrónica ao átomo de carbono do grupo carbonílico estabilizam a molécula na sua forma carbonílica, ao passo que os grupos atractores de densidade electrónica favorecem a hidratação.

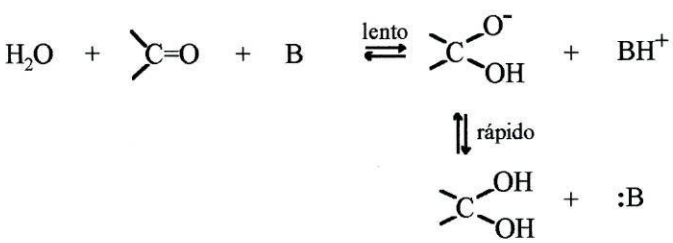
O mecanismo do processo de hidratação-desidratação do grupo carbonílico é altamente influenciado pelo pH do meio, já que o processo pode ocorrer através de catálise ácida ou básica. No esquema a seguir representado apresenta-se o mecanismo provável para a hidratação envolvendo catálise ácida.



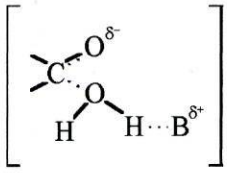
No passo lento de transição, pode admitir-se a formação da seguinte estrutura:



O passo determinante da velocidade será, então, a protonação do átomo de oxigénio do grupo carbonílico e o ataque nucleófilo da molécula de água ao átomo de carbono do grupo carbonílico. O processo pode, também, ocorrer através de catálise básica, admitindo-se, nesse caso, como mecanismo provável, o processo representado no seguinte esquema:

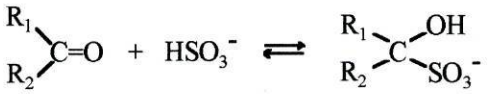


No passo lento de transição admite-se que se forma a seguinte estrutura:



Neste caso o passo determinante da velocidade será a desprotonação da molécula de água e o ataque nucleófilo do grupo hidroxilo ao átomo de carbono do grupo carbonilo.

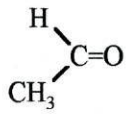
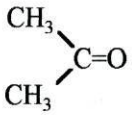
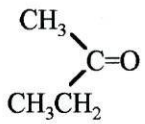
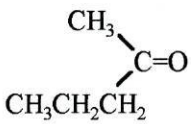
À semelhança da molécula de água, também o anião hidrogenossulfito, HSO_3^-, pode reagir com o grupo carbonilo, formando compostos de adição. A reacção pode ser representada da seguinte forma:



Esta reacção tem grande importância em tecnologia alimentar, particularmente em enologia, já que a adição de sulfito nos vinhos é habitualmente utilizada como forma de retardar fenómenos de oxidação e ataques microbiológicos[4,5].

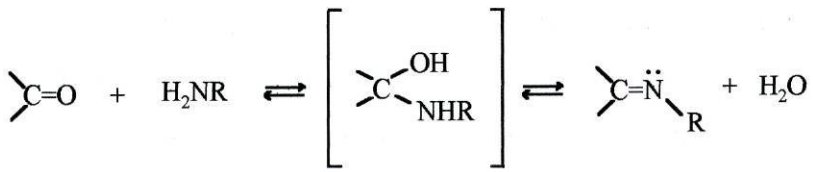
Na tabela 1.2 referem-se alguns exemplos de valores de constante de equilíbrio para a reacção de adição do anião hidrogenossulfito com aldeídos e cetonas. Verifica-se que os valores da constante de equilíbrio são tanto maiores quanto menor é a cadeia carbonada ligada ao átomo de carbono carbonílico. O agente nucleófilo responsável pela reacção é, muito provavelmente, o anião sulfito, uma vez que se trata de um agente nucleófilo mais poderoso que o anião hidrogenossulfito e que o dióxido de enxofre. O anião sulfito é um agente nucleófilo forte, não necessitando que o átomo de carbono do grupo carbonílico seja activado por protonação do átomo de oxigénio, ou seja, não é necessária a existência de catálise ácida para que esta reacção tenha lugar. Porém, como se trata de uma espécie volumosa, irão existir barreiras estereoquímicas ao ataque nucleófilo, razão pela qual a reacção de adição do hidrogenossulfito só ocorre em extensão apreciável com compostos carbonílicos que possuem estruturas simples.

Tabela 1.2 - Valores de constantes de equilíbrio a 0°C para a reacção de adição de hidrogenossulfito com alguns aldeídos e cetonas. [Valores extraídos da tabela 8.4. da referência 2].

Composto carbonílico	$K_{[HSO_3^-]} = \frac{[R_1R_2C(OH)(SO_3^-)]}{[R_1R_2C=O]}$
	800
	200
	40
	8

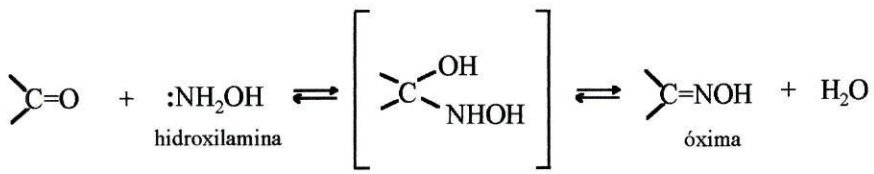
1.2.2 - ADIÇÃO DE AMINAS PRIMÁRIAS E SEUS DERIVADOS

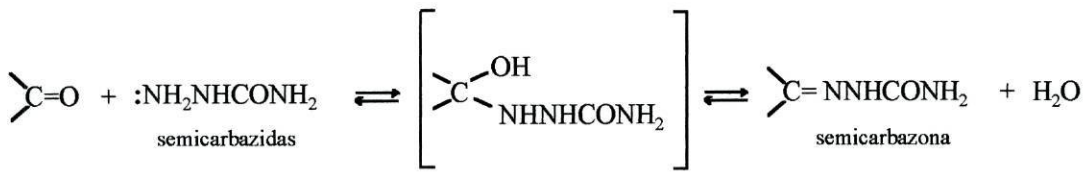
As aminas primárias são agentes nucleófilos que podem reagir com compostos carbonílicos formando espécies intermediárias de estrutura tetraédrica, semelhante à dos compostos de adição obtidos por acção da molécula de água ou do anião hidrogenossulfito. O processo pode, contudo, prosseguir com a eliminação de uma molécula de água, dando origem a um processo global mais complexo, envolvendo um passo de adição nucleófila ao átomo de carbono do grupo carbonílico, seguido de um passo de eliminação. Para o caso das aminas primárias este processo pode ser representado da seguinte forma:

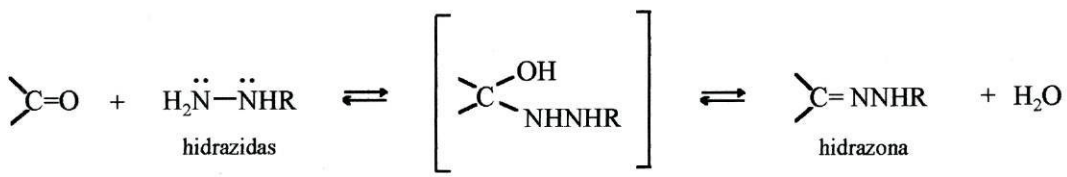


Como resultado da reacção de adição entre o grupo amina e o grupo carbonílico forma-se, num passo intermédio, uma carbinolamina, ocorrendo posteriormente a eliminação de uma molécula de água e a formação de iminas. As iminas resultantes do processo são, em geral, compostos muito reactivos, sobretudo se os grupos ligados ao átomo de carbono forem átomos de hidrogénio ou grupos alquilo simples. Se esses

grupos forem do tipo arilo, a estabilidade das iminas aumenta e os compostos resultantes têm estabilidade suficiente para poderem ser isolados, sendo denominados por bases de Schiff. São, igualmente, estáveis os compostos que possuem ligado ao átomo de azoto grupos atractores de densidade electrónica, tais como o grupo hidroxilo ou grupos em que a ligação se estabelece através de um átomo de azoto, como se exemplifica nos casos seguintes:

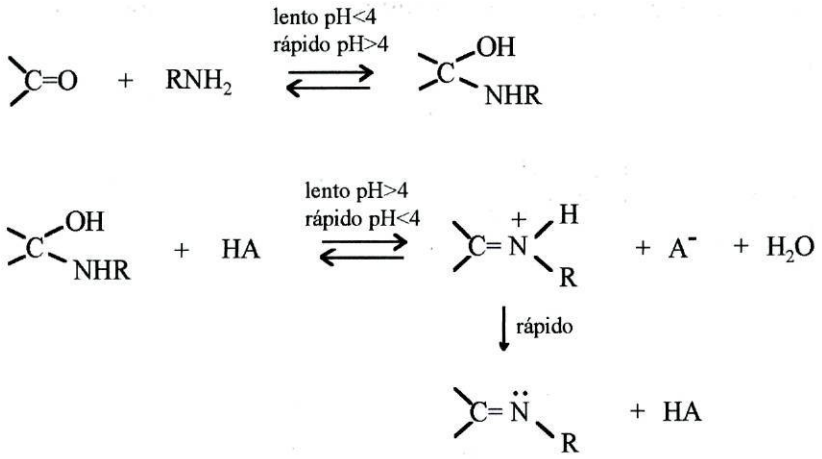






A reacção de adição de aminas primárias ao grupo carbonilo tem sido objecto de variados estudos e um dos aspectos que tem merecido maior atenção é o modo como varia a cinética dessa reacção com o pH. Em geral, a velocidade da reacção de adição aumenta à medida que o pH diminui; no entanto, a partir de um dado valor de pH essa tendência inverte-se e a velocidade começa a diminuir. A interpretação que é dada a este facto experimental baseia-se na existência de efeitos opostos do pH sobre os dois passos em que o mecanismo desta reacção pode ser dividido. De facto, verifica-se que tanto o passo de adição, para dar origem à carbinolamina, como o passo subsequente de eliminação, para dar origem à imina, podem ser o passo limitante da velocidade da reacção, conforme o pH do meio. Em meio fracamente alcalino, neutro ou ligeiramente ácido o passo de eliminação da molécula de água é o passo limitante da velocidade. Com o aumento da acidez do meio a velocidade do processo de desidratação aumenta como resultado da catálise ácida; porém, para valores de pH muito baixos, apesar do processo

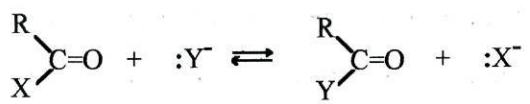
de desidratação ser mais rápido, o grupo amina sofre protonação e baixa o seu poder nucleófilo. Nessas condições de meio, o passo inicial correspondente à adição nucleófila passa a ser o passo limitante da velocidade da reacção. O processo pode ser globalmente representado por:



1.3 - ALGUMAS REACÇÕES DE ADIÇÃO NUCLEÓFILA AO GRUPO CARBOXÍLICO E SEUS DERIVADOS

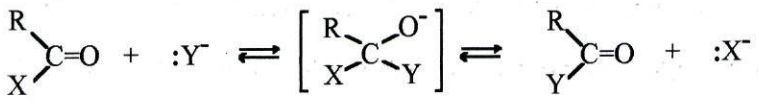
O grupo carboxílico, -COOH, pode ser considerado como o resultado da associação de um grupo carbonilo com um grupo hidroxilo, ligados a um mesmo átomo de carbono. Embora seja através do grupo hidroxilo que irão ocorrer quase todas as reacções do grupo carboxílico - desprotonação e substituição por outro grupo nucleófilo - a reactividade desse grupo resulta da combinação dos efeitos do grupo carbonilo e do grupo hidroxilo. Se ao grupo carbonilo estiver ligado um outro substituinte com características de base de Lewis, ao invés do grupo hidroxilo, estaremos em presença dos denominados derivados de ácidos carboxílicos, que poderão ser ésteres, anidridos, haletos de acilo ou amidas.

Todos estes compostos participam em reacções de substituição com agentes nucleófilos, cujo processo geral pode ser representado por:



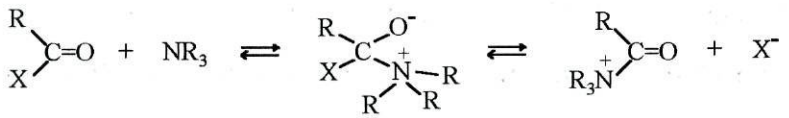
em que X e Y representam agentes nucleófilos.

O mecanismo desta reacção de substituição pode ser representado através do seguinte esquema:

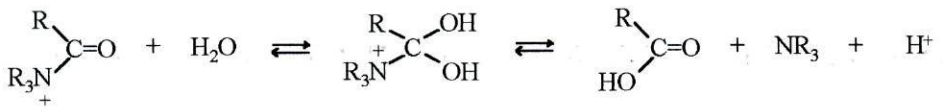


Trata-se de um processo que envolve a adição de um agente nucleófilo ao átomo de carbono do grupo carbonilo, dando origem a um estado de transição onde se forma um derivado de adição com estrutura tetraédrica. No estado de transição tanto pode acontecer que o processo reverta para a situação inicial, como pode ocorrer a eliminação do outro grupo nucleófilo, dando origem a um novo derivado, resultando globalmente numa reacção de substituição nucleófila. Este tipo de reacções são catalisadas por intermédio de ácidos ou de bases. A catálise básica ocorre através da desprotonação do agente nucleófilo, tornando-o mais activo. A catálise ácida tem lugar, em geral, através da protonação do átomo de oxigénio do grupo carbonílico, o que irá favorecer o ataque nucleófilo. Mas o processo pode também ser catalisado na presença de agentes nucleófilos. Por exemplo, a hidrólise pode ser catalisada utilizando para tal uma amina terciária. O processo global pode ser representado por:

1º passo

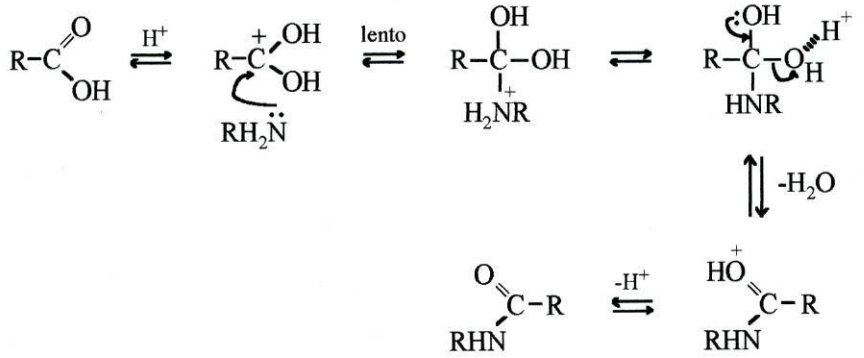


2º passo



Nesta situação, a amina terciária funciona como agente nucleófilo mais activo que a molécula de água e ataca inicialmente o derivado carboxílico. Desse ataque resulta um composto intermediário que possui um átomo de azoto deficiente em densidade electrónica ligado ao átomo de carbono do grupo carbonílico. Nestas condições o átomo de carbono torna-se muito reactivo e acessível ao ataque nucleófilo da molécula de água, em meio ácido.

As reacções de adição nucleófila no átomo de carbono carboxílico são bastante difíceis de efectuar. Em geral, os agentes nucleófilos mais activos são espécies protonáveis, pelo que em presença do grupo carboxílico haverá tendência a ocorrer a desprotonação do grupo carboxílico e a protonação do agente nucleófilo; em ambos os casos os compostos, sob essa forma, são muito pouco reactivos. Assim, o ataque nucleófilo de uma amina primária a um átomo de carbono de um grupo carboxílico deverá ser pouco favorecido e essa reacção deverá ter pouca tendência a ocorrer. Uma reacção deste tipo poderá ser representada da seguinte forma:



Esta reacção é muito pouco provável se RH_2N representar uma amina primária alifática, pois nas condições de meio ácido, necessárias para activar o átomo de carbono do grupo carbonílico, a amina encontrar-se-á fortemente protonada e, dessa forma, não pode actuar como agente nucleófilo[1]. Se RH_2N representar uma amina primária aromática a reacção terá maior tendência a ocorrer, dado que as aminas aromáticas primárias são partículas bastante menos básicas que as correspondentes aminas alifáticas primárias, podendo actuar como nucleófilos mesmo em condições de meio ácidas.

1.4 - EQUILÍBRIOS TAUTOMÉRICOS EM COMPOSTOS CARBONÍLICOS

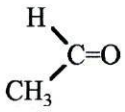
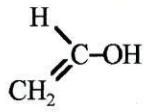
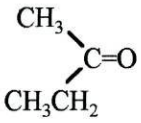
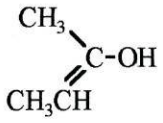
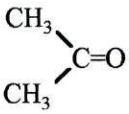
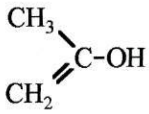
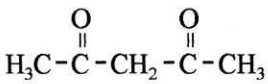
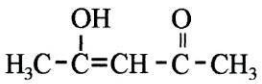
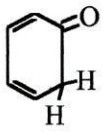
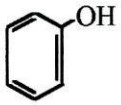
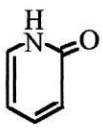
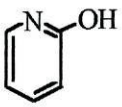
O grupo carbonilo provoca um aumento de acidez nas ligações carbono-hidrogénio nos átomos de carbono adjacentes a esse grupo. Por perda desse protão forma-se um ião enolato cuja posterior protonação pode ocorrer na posição inicial,

[1] A preparação de amidas a partir de ácidos carboxílicos envolve, em geral, uma primeira conversão do ácido carboxílico utilizando um agente nucleófilo activo em meio ácido (como, por exemplo, o cloreto de tionilo, $SOCl_2$) e só depois a transformação do composto resultante em amida, por acção da amina primária em meio alcalino[3].

dando origem ao composto inicial com a forma carbonílica, ou no átomo de oxigénio do grupo carbonilo, dando origem a um enol.

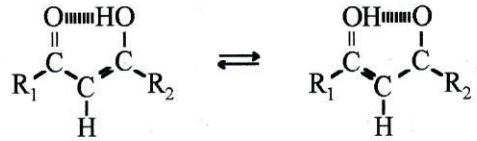
O processo de interconversão da forma carbonílica na forma enólica pode ser catalisado por ácidos ou por bases, dando origem ao estabelecimento de um equilíbrio ceto-enol, em que a predominância de uma dada forma tautomérica vai depender da estrutura do composto. Na tabela 1.3 referem-se valores de constantes para o equilíbrio ceto-enol, em alguns compostos carbonílicos.

Tabela 1.3 - Valores de constantes para o equilíbrio ceto-enol para alguns compostos carbonílicos. [Valores extraídos da tabela 8.8. da referência 2].

Composto carbonílico		
Forma cetónica	**Forma enólica**	$K = \frac{[enol]}{[ceto]}$
		$5,0x10^{-6}$
		$1,2x10^{-6}$
		$6,3x10^{-8}$
		3,2
		$4x10^{13}$
		$1,1x10^{-3}$

Através destes valores pode observar-se que no caso de aldeídos e cetonas alifáticas simples, a forma tautomérica predominante é a forma carbonílica. No entanto, no caso das β-dicetonas ou β-cetoésteres a forma enólica é favorecida relativamente à forma carbonílica, pois nestes compostos podem estabelecer-se ligações π conjugadas

entre os átomos de carbono e, para além disso, pode ocorrer o estabelecimento de ligações por pontes de hidrogénio intramoleculares, que contribuem para a estabilização da forma enólica, conforme se pode apreciar no esquema seguinte:

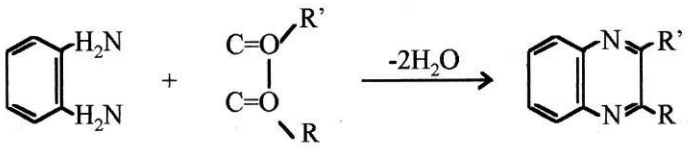


No caso dos fenóis verifica-se igualmente a predominância da forma enólica, como resultado da estabilidade adicional conferida pela aromaticidade do anel formado. Contudo, no caso do composto heterocíclico 2-hidroxipiridina a forma predominante é a forma carbonílica pois, apesar de neste composto também se estabelecer um anel aromático, o efeito de estabilização dessa estrutura não é suficiente para favorecer a forma enólica.

2 - REACÇÕES DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS COM A o-FENILENODIAMINA

2.1 - ASPECTOS GERAIS

Os compostos α-dicarbonílicos são caracterizados por possuírem dois grupos carbonílicos adjacentes. Tal como os compostos com um único grupo carbonilo, também estes podem reagir facilmente com agentes nucleófilos. A sua reacção com o-diaminas aromáticas é, no entanto, característica, já que dá origem a compostos heterocíclicos aromáticos, denominados genericamente por quinoxalinas, que se podem considerar como o resultado de dois processos consecutivos de adição nucleófila e desidratação[6]. A reacção entre a o-fenilenodiamina e os compostos α-dicarbonílicos pode ser traduzida pela seguinte equação:



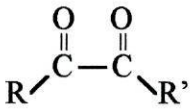
Esta reacção é conhecida por reacção de Hinsberg, já que foi este o primeiro químico a verificar, ainda nos fins do século passado, que a o-fenilenodiamina reagia com

compostos α-dicarbonílicos para formar compostos heterocíclicos, a que deu o nome de quinoxalinas[7,8].

Esta reacção, para além do interesse que despertou em síntese orgânica, como meio simples de preparação de quinoxalinas, revelou-se, também, muito interessante para a análise química de compostos α-dicarbonílicos pois permite obter, através de um conjunto de operações simples, derivados característicos dos compostos iniciais com propriedades mais adequadas para a detecção por técnicas instrumentais de análise comuns, como por exemplo, a detecção por espectrofotometria no ultravioleta.

2.2 - ESTRUTURA DOS COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS. DISTRIBUIÇÃO EM CLASSES.

Podem ser considerados como compostos α-dicarbonílicos todos os compostos que possuam dois grupos carbonílicos adjacentes. Sendo assim, a sua fórmula genérica pode ser representada por:



De acordo com esta definição, o número de compostos que podem ser englobados na classificação de compostos α-dicarbonílicos é enorme, já que não existe restrição para a estrutura dos grupos R e R', podendo mesmo incluir outros grupos funcionais característicos. Assim, na execução deste trabalho impôs-se a necessidade de restringir o âmbito deste estudo a um conjunto seleccionado de compostos α-dicarbonílicos. A selecção que se efectuou baseou-se, essencialmente, na importância dos compostos na química dos alimentos e afins, na sua simplicidade estrutural e na disponibilidade de obter comercialmente os compostos puros. Para além destes aspectos, procurou-se englobar neste estudo um conjunto de compostos que permitisse a maior representatividade possível das classes de compostos α-dicarbonílicos que podem ser estabelecidas a partir da fórmula de estrutura geral, representada acima.

Foram, assim, consideradas durante a realização deste trabalho as quatro seguintes classes de compostos α-dicarbonílicos:

Classe I

R e R' = H ou grupos alquilo simples

(nesta classe considera-se englobados o glioxal , os α-cetoaldeídos e as α-dicetonas mais simples)

Classe II

R = HO e R' = H ou grupo alquilo simples

(este classe engloba os denominados α-cetoácidos)

Classe III

R e R' = HO

(neste classe só é possível considerar o ácido oxálico; o único ácido α-dicarboxílico estruturalmente possível)

Classe IV

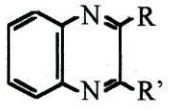
R e R' = grupos ligados ao átomo de carbono carbonílico através de um átomo de carbono, com estruturas complexas, não englobadas na classe I

De salientar que na definição destas quatro classes não se pretendeu incluir todo o conjunto de compostos α-dicarbonílicos que podem ser estabelecidos a partir da fórmula geral. A classificação em classes definida desta forma serviu, sobretudo, para distinguir os diferentes tipos de quinoxalinas que resultam da reacção entre os compostos α-dicarbonílicos e a o-fenilenodiamina e para distinguir, também, as condições de meio mais apropriadas para a realização da reacção de derivatização que, conforme se verificou, variam conforme as classes definidas.

2.3 - REACÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

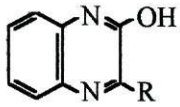
Atendendo às quatro classes de compostos α-dicarbonílicos que foram definidas, pode-se agora caracterizar para cada uma dessas classes o tipo de quinoxalinas que, nas situações mais comuns, irão resultar da reacção entre a o-fenilenodiamina e os compostos α-dicarbonílicos:

Classe I



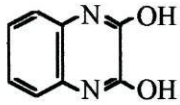
quinoxalinas

Classe II



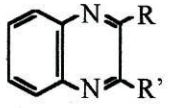
2-hidroxiquinoxalinas

Classe III



2,3-di-hidroxiquinoxalinas

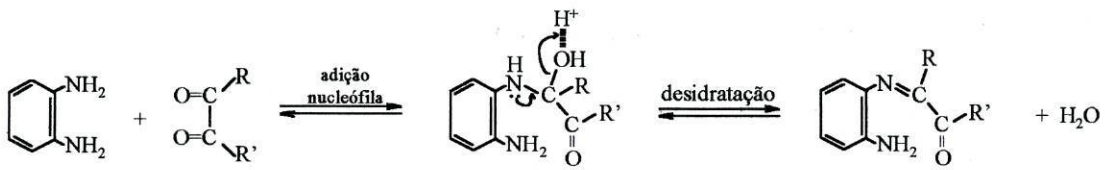
Classe IV



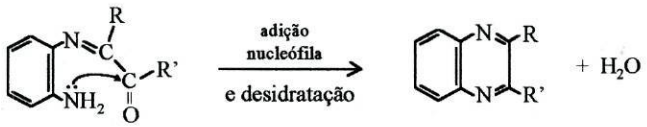
quinoxalinas

Admite-se habitualmente que o mecanismo destas reacções decorre através de um processo de adição nucleófila, seguido da eliminação de uma molécula de água e, logo após, um novo processo de adição nucleófila e um novo passo de eliminação de uma outra molécula de água[6]. O mecanismo proposto para estas reacções encontra-se representado a seguir:

1º PROCESSO:

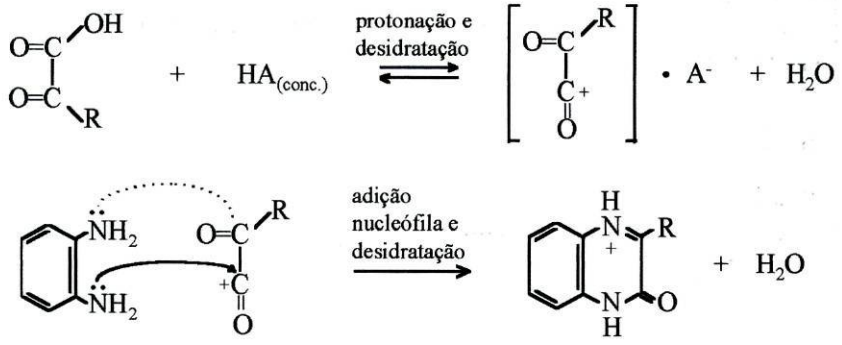


2ºPROCESSO:



No entanto, quando ao átomo de carbono que possui o grupo carbonilo se encontra ligado a um grupo nucleófilo, como sucede nos compostos dos grupos II e III onde ao carbono do grupo carbonilo se encontram ligados grupos hidroxilo, existe a

possibilidade de a reacção ocorrer de forma distinta, envolvendo em primeiro lugar um passo de desidratação resultante da protonação do grupo hidroxilo e consequente perda de uma molécula de água e, só depois, o ataque nucleófilo ao átomo de carbono que se encontrará, nestas circunstâncias, com características fortemente electrófilas. Este processo pode ser representado através dos dois passos seguintes:



Esta reacção só pode, contudo, ocorrer por esta via se o meio se encontrar fortemente acidulado através da adição de um ácido muito forte, representado no esquema acima por HA. Nessas condições pode ocorrer a protonação do grupo hidroxilo, a cisão da sua ligação ao átomo de carbono do grupo carboxílico e a estabilização do carbocatião como resultado do elevado poder ionizante do meio reactivo[1,2,9].

O facto de o meio ser fortemente ácido tem, porém, a desvantagem de aumentar o grau de protonação dos dois grupos amina da o-fenilenodiamina, o que torna o seu ataque nucleófilo muito mais lento e difícil.

2.3.1 - INFLUÊNCIA DO pH NA REACÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

Como se referiu anteriormente, existe um mecanismo de reacção comum às quatro classes de compostos α-dicarbonílicos que permite explicar a formação dos quatro tipos distintos de quinoxalinas. No entanto, a influência das condições experimentais em que a reacção decorre, particularmente do pH, sobre a cinética e a extensão da reacção vai ser dependente da classe de compostos considerada.

Relativamente ao agente derivatizante, a o-fenilenodiamina tem dois grupos amina adjacentes ligados a um anel aromático; trata-se, portanto, de uma amina aromática. Esses grupos amina têm características básicas, embora fracas (pKa_1=1,3 e pKa_2=4,7 [10]) e, por isso, em meio fortemente ácido ocorre a sua protonação. Como os

grupos amina protonados não podem actuar como agentes nucleófilos, o aumento da acidez desfavorece o ataque nucleófilo do agente derivatizante.

Em relação aos compostos α-dicarbonílicos das classes I e IV, atendendo a que os átomos de carbono directamente ligados aos átomos de carbono dos grupos carbonílicos não vão apresentar características ácido-base acentuadas, o efeito da acidez deverá influenciar pouco a reactividade desses grupos relativamente à sua influência sobre o ataque nucleófilo; porém, o aumento da acidez irá favorecer francamente o passo de desidratação.

No caso dos compostos da classe II, o processo de derivatização vai ocorrer num grupo carbonílico e num grupo carboxílico. O ataque nucleófilo no grupo carbonílico vai ter características idênticas às referidas para os compostos das classes I e IV; no grupo carboxílico porém, devido às características ácidas desse grupo e ao facto de o ataque nucleófilo só poder ocorrer se os grupos amina estiverem desprotonados e o grupo carboxílico estiver protonado, o ajuste da acidez vai ser crucial para que a reacção de ciclização possa ocorrer e, previsivelmente, o seu efeito irá ser bastante complexo.

No caso do ácido oxálico (classe III), atendendo às características ácidas dos grupos carboxílicos, pKa_1= 1,23 e pKa_2= 4,19[11] e ao facto de o ataque nucleófilo só poder ocorrer quando esses grupos estiverem protonados, será de prever que seja necessária uma elevada acidez no meio reactivo para que a reacção possa ter lugar.

Do que foi referido, resulta que a variação da acidez do meio reactivo tem efeitos antagónicos sobre as reactividades do agente derivatizante (OFDA) e dos diferentes compostos α-dicarbonílicos. Esta situação é, conforme já foi referido na secção 1.2.2., característica das reacções entre compostos carbonílicos e aminas e é responsável pelo aparecimento de máximos nas representações dos valores das constantes de velocidade das reacções em função do valor do pH do meio reactivo, para estas reacções.

2.3.2 - INFLUÊNCIA DA CICLIZAÇÃO NA REACÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

O efeito de estabilização resultante da aromaticidade dos derivados heterocíclicos do tipo quinoxalinas, que se formam como resultado da reacção entre a o-fenilenodiamina e os compostos α-dicarbonílicos, é o principal factor responsável pela elevada extensão da reacção e pela elevada estabilidade das quinoxalinas resultantes.

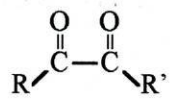
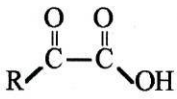
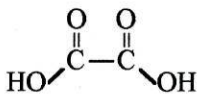
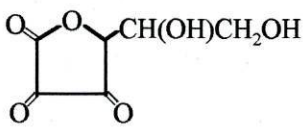
O carácter aromático de um composto cíclico está relacionado com uma acentuada diminuição na reactividade desse composto, ou seja, os compostos aromáticos possuem uma estabilidade termodinâmica adicional relativamente aos compostos similares não aromáticos[2,6]. Nos anos 30, Hückel[12,13,14] fez a aplicação da teoria das orbitais moleculares a este tipo de sistemas, tendo conseguido mostrar que a energia das orbitais moleculares do tipo π para sistemas cíclicos planos seguia uma evolução característica. Segundo a teoria de Hückel, sempre que o número de pares de electrões π é impar (ou seja, n°total de electrões $\pi = 4n+2$, em que $n = 0, 1, 2,...$), a camada de orbitais moleculares π ligantes está totalmente preenchida e há um efeito adicional de estabilização da molécula. Essa diferença de energia ficou conhecida como energia de ressonância ou energia de deslocalização.

No caso particular da reacção de derivatização considerada, a estabilidade adicional que é conferida às quinoxalinas torna-as bastante estáveis e torna o segundo processo da reacção irreversível. Desta forma, ao contrário do que é habitual nos ataques nucleófilos a compostos carbonílicos, como por exemplo nos processos de hidratação e adição de hidrogenossulfito que são processos reversíveis, esta reacção será globalmente irreversível. Para além destes dois aspectos, ao analisar-se o esquema que foi apresentado na secção 2.3, onde se representa o mecanismo provável para estas reacções de derivatização, verifica-se que poderá existir, igualmente, uma contribuição estereoquímica que contribui para a ocorrência do 2°processo. Após o ataque nucleófilo inicial, o composto α-dicarbonílico irá ficar ligado à molécula do agente derivatizante e os grupos amina e carbonílico restantes irão ficar bastante próximos. Essa aproximação irá contribuir para a ocorrência do segundo processo correspondente ao ataque nucleófilo, desidratação e ciclização.

A conjugação de todos estes aspectos permite compreender a forma como uma reacção deste tipo que envolve globalmente dois passos de desidratação, que são naturalmente pouco favorecidos em meios aquosos, pode ocorrer com elevada velocidade e extensão. Permite, também, compreender a ocorrência do ataque nucleófilo do 2°grupo amina do agente derivatizante ao átomo de carbono do grupo carboxílico (no caso dos compostos das classes II e III), que em condições normais em meio aquoso é pouco favorecido e muito lento[1].

2.4 - COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS ESTUDADOS NAS VÁRIAS CLASSES

Dentro de cada classe estabelecida na secção anterior existe, naturalmente, um conjunto de compostos sobre os quais se encontra um maior número de trabalhos científicos publicados e que, por esse motivo, foram seleccionados como os compostos cujo desenvolvimento de novas metodologias de análise poderia apresentar maior interesse. O conjunto de compostos estudado dentro de cada classe foi, assim, o seguinte:

CLASSE I	
glioxal	R=H e R'=H
metilglioxal	R=H e R'=CH_3
diacetilo	R= CH_3 e R'=CH_3
2,3-pentanodiona	R= CH_3 e R'= CH_2CH_3
CLASSE II	
ácido glioxílico	R=H
ácido pirúvico	R= CH_3
ácido α-cetoglutárico	R= CH_2CH_2COOH
CLASSE III	
ácido oxálico	
CLASSE IV	
ácido desidroascórbico	

De seguida ir-se-á referir alguns aspectos relativos à importância desses compostos na química dos processos biológicos e na química dos alimentos.

2.4.1 - COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE I

De uma forma geral, os compostos da classe I estão implicados no funcionamento celular dos organismos vivos. Contudo, o composto que apresenta maior interesse sob o ponto de vista da química dos processos biológicos é o metilglioxal que tem vindo desde há bastante tempo a ser referenciado como tendo papéis importantes a nível do funcionamento celular. Em química alimentar, o composto mais relevante desta classe é o diacetilo, responsável por um importante problema organoléptico da cerveja.

2.4.1.1 - Papel do metilglioxal na química dos processos biológicos

O interesse dos bioquímicos pelo papel do metilglioxal a nível dos processos biológicos nas células remonta à descoberta, em 1913, do sistema enzimático conhecido como sistema glioxalase[15], cujo principal substrato é o metilglioxal e que veio a verificar-se estar disseminado por praticamente todos os sistemas vivos, quer animais, quer vegetais. A disseminação deste sistema enzimático por quase todos os sistemas vivos fez suspeitar que ele deveria ter uma função essencial à vida, pelo que a descoberta da sua função biológica constituiu, a partir daí, um grande desafio para os bioquímicos. Os inúmeros estudos que foram realizados sobre este sistema enzimático deram origem a uma evolução efectiva na compreensão dos mecanismos de formação bioquímica do metilglioxal a nível celular e da sua metabolização. Sabe-se que o sistema glioxalase é constituído por duas enzimas, as glioxalases I e II, cuja actuação consiste na catálise da conversão do metilglioxal em D-lactato, na presença de glutationa na forma reduzida[15]. O processo enzimático está esquematizado na figura 2.1.

Apesar destes estudos, não existe ainda hoje um consenso acerca da essência do papel biológico do metilglioxal a nível celular. Uma das tentativas mais interessantes de interpretar a função biológica do metilglioxal ficou a dever-se a Albert Szent-Györgyi que, como corolário de uma série de trabalhos sobre o metilglioxal e o sistema enzimático glioxalase, que realizou durante a década de 60[16,17], sugeriu que o metilglioxal poderia ser o factor regulador do crescimento celular. Esta hipótese resultou de vários trabalhos experimentais em que verificou que o crescimento celular em variados tipos de amostras de origem biológica era inibido na presença de pequenas concentrações de metilglioxal (ou de outros α-cetoaldeídos estruturalmente similares) no

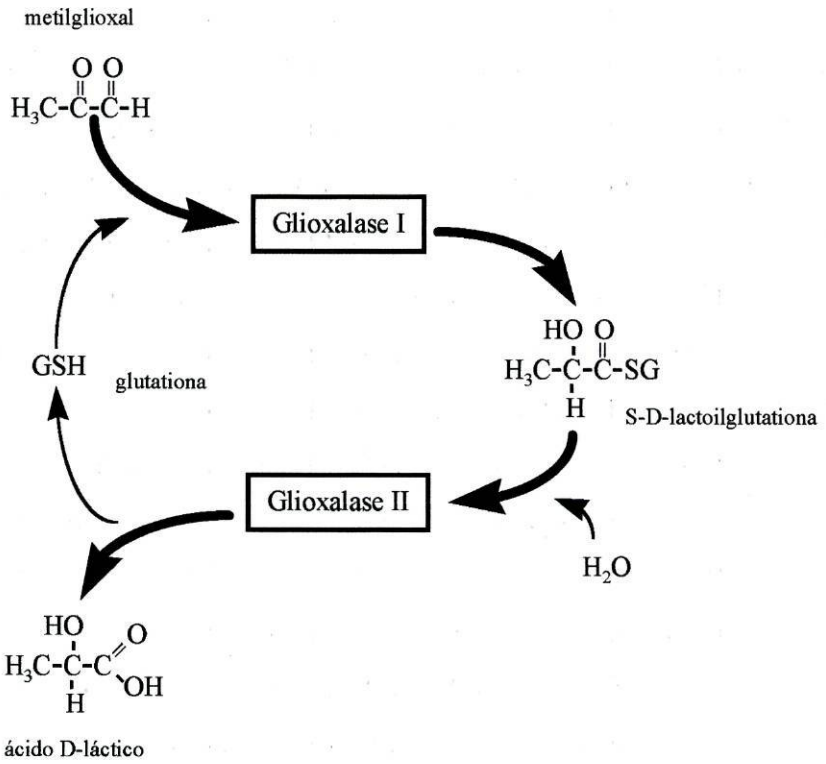


Figura 2.1 - Esquema do processo enzimático do sistema glioxalase.

meio de cultura. Com base nestas observações experimentais Szent-Györgyi[16] admitiu que o metilglioxal e o seu antagonista biológico, a enzima glioxalase I, seriam responsáveis pela regulação dos processos de crescimento celular, admitindo, também, que o descontrolo desse sistema poderia ser responsável pelo crescimento celular desorganizado, típico dos tumores cancerígenos. A comprovar esta hipótese, Szent-Györgyi demonstrou que era possível parar o crescimento de certos tumores por aplicação directa de metilglioxal sobre as células afectadas[16], o que o levou a considerar a hipótese de utilizar este composto na terapia de doenças do foro oncológico. Esta possibilidade não veio contudo a tornar-se viável pois verificou que as concentrações de metilglioxal necessárias para parar o crescimento celular eram demasiado tóxicas para as células normais e, para além disso, causavam problemas nas funções respiratória e cardíaca. A sua aplicação *in vivo* era, também, pouco eficaz pois o sistema enzimático glioxalase tendia a fazer baixar rapidamente o teor de metilglioxal nos fluídos biológicos.

Recentemente, Thornalley e colaboradores[18] fizeram a determinação do teor de metilglioxal em células normais e concluíram que o seu nível era muito baixo (entre 0,1 e 2μM), cerca de mil vezes inferior à concentração utilizada por Szent-Györgyi para inibir

o crescimento celular normal. Perante estes resultados, Thornalley admitiu que, atendendo à toxicidade do metilglioxal a nível celular, a função do sistema enzimático glioxalase poderia estar relacionada com a desintoxicação da célula do metilglioxal que se forma como resultado do metabolismo normal da célula. A função biológica do sistema glioxalase e do metilglioxal está, contudo, ainda envolta em muita controvérsia.

A importância do aspecto analítico é realçada por Thornalley[15,18] e por Ohmori e colaboradores[19] que consideram que um dos factores que é responsável pela deficiente compreensão da função do metilglioxal em sistemas biológicos se deve à não existência de métodos de análise bem estabelecidos e cujos resultados sejam fiáveis. Por esta razão, aliás, estes investigadores desenvolveram recentemente novas metodologias de análise do metilglioxal para aplicação a amostras biológicas, envolvendo processos de derivatização com compostos do tipo da o-fenilenodiamina[18,19]. Segundo estes investigadores o principal problema dos métodos de análise do metilglioxal tem origem na dificuldade em evitar a conversão dos precursores biológicos do metilglioxal, o gliceraldeído 3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato, durante o passo de derivatização (figura 2.2).

O uso de agentes derivatizantes do tipo da o-fenilenodiamina - Thornalley utiliza o DDB, 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenzeno, e Ohmori e colaboradores utilizam o DCFDA, 4,5-dicloro-1,2-fenilenodiamina - permite-lhes, segundo alegam, contornar essa dificuldade.

2.4.1.2 - Papel do diacetilo em química alimentar

Em química alimentar, de entre os compostos da classe I, o composto com maior importância é o diacetilo. O diacetilo é, em geral, encontrado em teores apreciáveis nos alimentos obtidos através de fermentação, como por exemplo nos produtos lácteos (manteiga, queijo, yogurt), no vinho, no vinagre, na cerveja, etc, e resulta do metabolismo das leveduras. A importância do diacetilo em química alimentar decorre do facto deste composto conferir aos alimentos um aroma e um paladar amanteigado característico que, consoante o alimento em questão e a sua concentração, pode ser apreciado ou rejeitado[20,21,22,23,24]. O limite de percepção do diacetilo nos

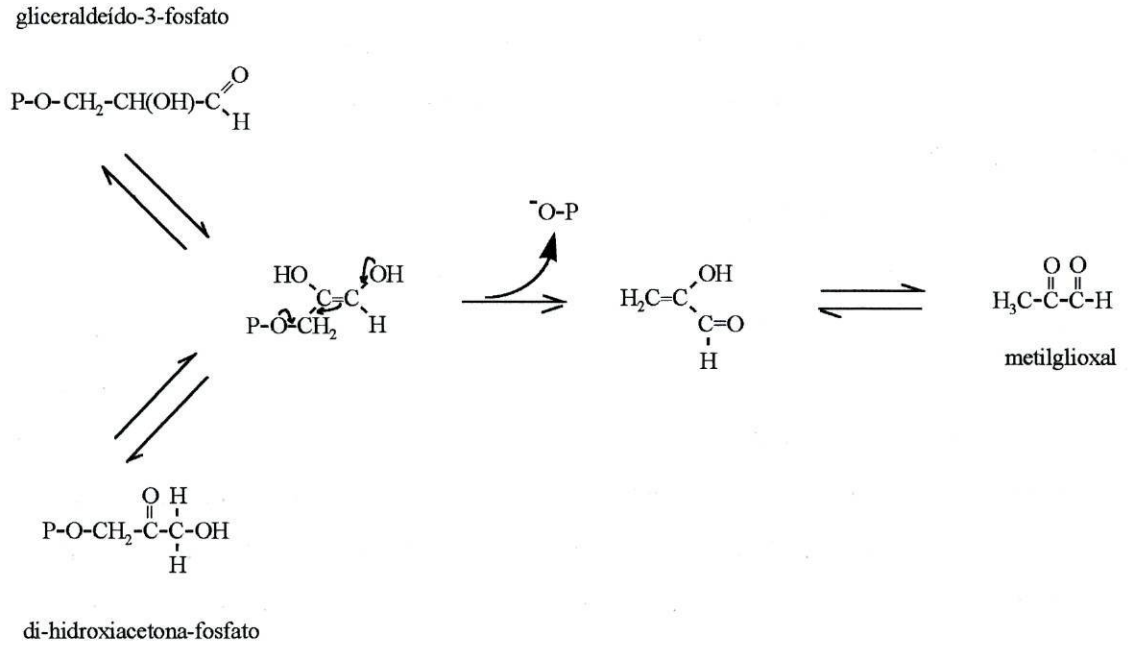


Figura 2.2 - Esquema do processo de formação do metilglioxal em sistemas biológicos, resultante da eliminação de fosfato, que pode ter lugar por via enzimática ou química a partir de gilceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato.

diferentes alimentos varia bastante. Tal facto é atribuído à elevada reactividade do diacetilo, que possibilita que ele reaja com outros componentes dos alimentos, alterando-se os seus limites de percepção. Por exemplo, a reacção entre o diacetilo e o sulfito para formar compostos de adição pouco voláteis é bem conhecida e faz aumentar o limite de percepção do diacetilo na cerveja[24].

De entre os vários alimentos que são obtidos por fermentação, a cerveja é aquele onde a problemática da presença do diacetilo tem maior importância. A cerveja é uma bebida onde a presença de diacetilo é facilmente detectada - o limite de percepção habitual de provadores não treinados situa-se entre 50 e 100μg/L - e a sua percepção na cerveja torna esta bebida desagradável. A primeira referência a este defeito organoléptico da cerveja foi feita por Pasteur, nos seus "Études sur la bière", publicados em 1876[25]. Contudo só em 1939 é que Shimwell e colaboradores[26] referem que esse defeito se fica a dever à percepção de diacetilo na cerveja. A partir dessa altura os trabalhos sobre a problemática do diacetilo na cerveja passaram a constituir um dos temas fundamentais para os investigadores da indústria cervejeira. A essência desses trabalhos desenvolveu-se em três campos: (1) na compreensão do mecanismo de formação bioquímica do diacetilo durante as etapas de preparação da cerveja; (2) na procura de meios que

permitam controlar e fazer diminuir esse teor; e (3) no desenvolvimento de métodos de análise de diacetilo que permitam a determinação do teor desse composto durante a fase de preparação da cerveja e no produto final.

Relativamente ao primeiro aspecto, logo após se ter identificado o diacetilo como composto responsável pelo gosto amanteigado da cerveja, também ficou claro que a formação do diacetilo resultava da actividade metabólica das leveduras usadas na fermentação cervejeira. Em consequência disso, foram inúmeros os trabalhos que, desde os anos 40, contribuíram para esclarecer o mecanismo de biossíntese do diacetilo pelas leveduras[23]. Actualmente o mecanismo de formação do diacetilo que é aceite[20,23,27, 28] está esquematizado na figura 2.3. De acordo com esse mecanismo o diacetilo não é produzido pela levedura, mas resulta da decomposição não enzimática do ácido α-acetoláctico, que é um composto intermediário da biossíntese dos aminoácidos valina e leucina. O mesmo processo é responsável pelo aparecimento da 2,3-pentanodiona, um composto com características e estrutura similares ao diacetilo, mas cuja percepção só ocorre para níveis de concentração cerca de 10 vezes superiores relativamente ao diacetilo. O aparecimento deste composto resulta da decomposição não enzimática do ácido α-aceto-hidroxibutírico, um composto intermediário da biossíntese do aminoácido isoleucina. O esquema da figura 2.3 mostra, também, que a levedura tem capacidade de metabolizar o diacetilo e a 2,3-pentanodiona que se vão formando ao longo da fermentação para os transformar, respectivamente em 2,3-butanodiol e 2,3-propanodiol.

Uma outra vertente destes estudos sobre a problemática do diacetilo na cerveja centrou-se no acompanhamento da evolução do teor de diacetilo (e 2,3-pentanodiona) e dos seus respectivos precursores (ácido α-acetoláctico e ácido α-aceto-hidroxibutírico) durante a fermentação cervejeira. Wainwright[23] apresenta uma representação da evolução do teor das α-dicetonas vizinhas (considerando-as como a soma dos teores de diacetilo e 2,3-pentanodiona) que se transcreve na figura 2.4. Nessa representação pode-se observar as discrepâncias entre os valores de concentração de α-dicetonas quando a determinação é feita através de métodos espectrofotométricos ou por cromatografia gasosa, o que traduz a dificuldade em analisar estes compostos durante a fermentação sem que ocorra a conversão de precursores. As razões para esta discrepância de

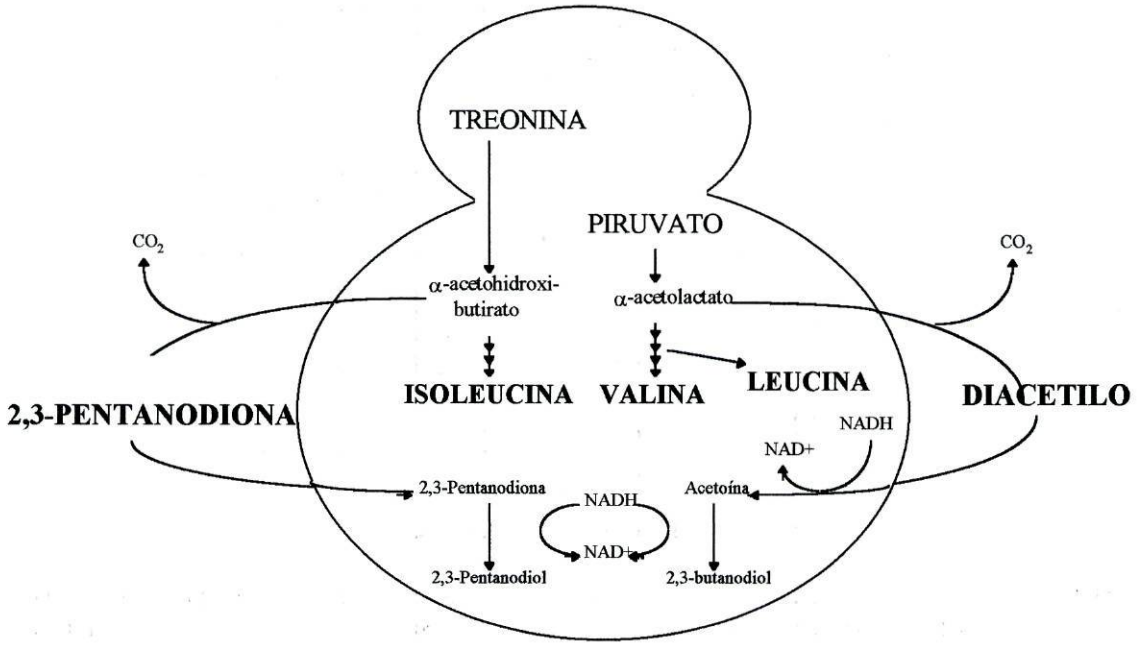


Figura 2.3 - Formação de diacetilo e 2,3-pentanodiona durante o processo de fermentação cervejeira. Relação com o processo de biossíntese da isoleucina e valina resultante da actividade da levedura.

resultados irão ser discutidas mais adiante. A linha que traduz a concentração tida como a representação mais provável do teor de α-dicetonas ao longo da fermentação mostra que esse valor é bastante baixo e reflecte a elevada capacidade da levedura para metabolizar as α-dicetonas que surgem durante a fermentação. Deste modo a levedura tem capacidade de eliminar as α-dicetonas que se vão formando e a obtenção de cerveja com elevado teor em α-dicetonas só ocorre se o processo de fermentação for interrompido cedo demais, numa altura em que a conversão dos precursores ainda está incompleta. Nessa situação pode ocorrer a posterior conversão dos precursores nas respectivas α-dicetonas sem que exista levedura para realizar a metabolização.

Actualmente existe um conhecimento bastante profundo dos factores que dão origem ao aparecimento de diacetilo na cerveja e consegue-se controlar a fermentação cervejeira por forma a obter-se uma cerveja com um teor de diacetilo abaixo do limite de percepção. Contudo, a problemática do diacetilo na cerveja continua a ser um tema de grande importância para a indústria cervejeira. A necessidade de reduzir o teor de precursores de diacetilo e 2,3-pentanodiona abaixo de um certo nível é o parâmetro que condiciona o fim da fermentação. Desta forma são as α-dicetonas que efectivamente limitam a tempo de fermentação e impedem que ele possa ser diminuído.

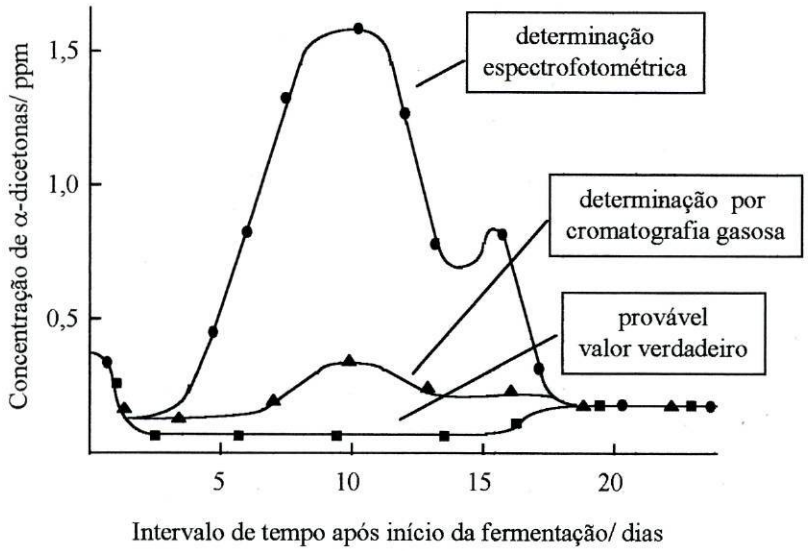


Figura 2.4 - Evolução da concentração das α-dicetonas durante a fermentação. O tipo de curva obtido depende da temperatura em que a fermentação decorre bem como do modo de fermentação. Os valores obtidos dependem, ainda, do método de análise utilizado na determinação. (Adaptação da figura 2 da referência 22).

A possibilidade de diminuir o tempo de fermentação tem, obviamente, enorme importância económica para a indústria cervejeira e, por isso, constitui uma das áreas que tem merecido maior atenção e se encontra em desenvolvimento permanente. São, essencialmente, duas as técnicas que têm vindo a ser ensaiadas com o objectivo de acelerar a decomposição dos α-aceto-hidroxiácidos, particularmente do ácido α-acetoláctico, durante a primeira fase da fermentação: uma delas recorre às técnicas mais recentes de biotecnologia no sentido de obter leveduras geneticamente modificadas com capacidade de metabolizar rapidamente o α-acetolactato transformando-o em acetoína[29]; a outra recorre à adição, durante a primeira fase da fermentação, de uma solução contendo uma enzima (uma α-acetolactato descarboxilase) capaz de catalizar a descarboxilação do ácido α-acetoláctico em acetoína[30]. Estas técnicas conseguem, efectivamente, acelerar a conversão do ácido α-acetoláctico, evitando o problema do diacetilo. Contudo, o paladar da cerveja final obtida é ligeiramente diferente do paladar tradicional da cerveja, sendo este o principal obstáculo ao uso generalizado destas técnicas de fermentação mais rápidas.

A determinação do teor de diacetilo durante a preparação da cerveja é essencial, como se referiu anteriormente, como forma de controlo da altura ideal para terminar a fermentação, de modo a garantir a qualidade organoléptica da cerveja final. Para dar resposta a essa necessidade foram desenvolvidos vários métodos de análise, alguns dos quais estão referidos na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Métodos de análise de diacetilo na cerveja.

Métodos espectrofotométricos	
-- Destilação e reacção com cloridrato de hidroxilamina para formar dimetilglióxima. Medição da absorvância no U.V.	Brenner *et al.* (1963)[2]
-- Destilação e reacção com cloridrato de hidroxilamina. Medição da coloração desenvolvida pela dimetilglióxima em presença de ferro (II).	Katô *et al.* (1960)[1]
-- Destilação simples ou por arrastamento de vapor. Medição da coloração desenvolvida por reacção com α-naftol e creatinina	Owades *et al.* (1960)[1]
-- Destilação simples ou por arrastamento de vapor. Reacção com o-fenilenodiamina. Medição da absorvância no U.V.	Esser *et al.* (1970)[1]

Métodos por cromatografia gasosa com detecção por captura electrónica	
-- Técnica "headspace", pH=7, uma hora a 35ºC	Harrison *et al.* (1965)[2]
-- Técnica "headspace", trinta minutos a 35ºC	Rankine *et al.* (1969)[2]
-- Técnica "headspace", pH=7, trinta minutos a 35ºC (determinação de α-dicetonas)	Haukeli *et al.* (1972)[2]
-- Técnica "headspace", pH=4,2, 48h a 60ºC (determinação de α-dicetonas e respectivos precursores)	

Métodos por cromatografia líquida (HPLC)	
-- Reacção com o-fenilenodiamina. Detector U.V. Tampão acetato, pH=5/metanol como fase móvel	De Jon *et al.* (1987)[2]

[1]Dados extraídos da tabela I da referência 22
[2]Dados extraídos da tabela I da referência 19

Os métodos referidos na tabela 2.1 recorrem, essencialmente, a duas técnicas de análise instrumental: a espectrofotometria e a cromatografia gasosa com detecção por captura electrónica. Os métodos espectrofotométricos utilizam agentes de derivatização para formar derivados característicos com bandas de absorção no visível ou no U.V. Todos os métodos espectrofotométricos referidos apresentam em comum um passo prévio de separação do diacetilo (e da 2,3-pentanodiona) da amostra por destilação. O uso da destilação como técnica de separação resulta da elevada volatilidade das α-dicetonas que, quando a amostra é aquecida à ebulição, são quantitativamente

recuperadas na porção inicial de destilado recolhido. O processo de destilação para além de separar as α-dicetonas permite, também, concentrá-las. Este efeito de concentração é muito importante para se conseguir realizar a análise espectrofotométrica pois os teores de α-dicetonas nas amostras são, em geral, muito baixos, próximos dos limites de detecção dos métodos espectrofotométricos. Os métodos que recorrem à cromatografia gasosa com detecção por captura electrónica utilizam, habitualmente, a técnica de preparação de amostra conhecida como "headspace"[31]. Esta técnica, na sua forma mais simples, consiste no aquecimento de uma ampola fechada contendo a amostra a analisar, a qual é mantida num banho com temperatura rigorosamente controlada. Após um certo período de tempo, que é necessário para que se atinja o equilíbrio entre a fase aquosa e a fase gasosa no interior da ampola, recolhe-se uma amostra da fase gasosa e injecta-se na coluna cromatográfica.

Comparativamente com os métodos espectrofotométricos, os métodos cromatográficos têm um conjunto de vantagens sob o ponto de vista analítico: são mais sensíveis, permitem determinar separadamente o diacetilo e a 2,3-pentanodiona e estão menos sujeitos a compostos interferentes. O aspecto das interferências que podem afectar os dois métodos é, aliás, de grande importância uma vez que permite compreender as diferenças nos teores de α-dicetonas que são obtidos quando se realizam análises de uma mesma amostra proveniente da fermentação cervejeira utilizando os dois métodos. Conforme se observa na figura 2.4 , os teores de α-dicetonas obtidos com amostras provenientes do processo de fermentação depende da técnica de análise que se utiliza e, de acordo com a interpretação de Wainwright[23], nenhum desses resultados corresponde ao valor real. A razão para esta discrepância nos resultados foi atribuída à conversão dos precursores das α-dicetonas (os α-aceto-hidroxiácidos). Nos métodos espectrofotométricos durante a fase de destilação a amostra é aquecida à ebulição na presença de ar, o que favorece a decomposição dos precursores. Sendo assim, nestes métodos determina-se, efectivamente, o denominado teor potencial de α-dicetonas vizinhas. Na cromatografia gasosa a temperatura requerida pela técnica de "headspace" é mais baixa e a amostra é mantida numa cápsula fechada ao abrigo do ar; desta forma, a decomposição dos precursores é menor, obtendo-se valores de α-dicetonas mais baixos, mais próximos dos valores reais. Os métodos baseados na cromatografia gasosa foram particularmente importantes nos estudos acerca da evolução do teor de diacetilo e 2,3-

pentanodiona ao longo da fermentação cervejeira, tendo contribuído decisivamente para a compreensão do mecanismo bioquímico de formação desses compostos.

No controlo do processo de fermentação, durante a preparação da cerveja, continua-se, porém, a utilizar habitualmente os métodos espectrofotométricos[32,33]. O método oficial da EBC (European Brewery Convention)[34] baseia-se na destilação das α-dicetonas, na derivatização com a o-fenilenodiamina e na medição da absorvância resultante no U.V. A principal razão para a escolha deste método, por parte dos industriais cervejeiros, tem a ver com a maior rapidez na obtenção de resultados que os métodos espectrofotométricos possibilitam. De facto, para o controlo do processo de fermentação cervejeira é essencial saber com rapidez a altura em que esta pode ser dada como concluída, que corresponde à altura em que o teor de precursores das α-dicetonas está abaixo de um dado nível na cerveja em fermentação. Desta forma, o facto de ocorrer a conversão rápida dos precursores durante o processo de análise representa mesmo uma vantagem do método pois permite rapidamente conhecer o teor potencial de α-dicetonas vizinhas que se podem formar na cerveja final, se a fermentação fosse interrompida no instante da amostragem. Nos métodos cromatográficos a conversão dos precursores é mais lenta e, por isso, a obtenção de resultados é mais lenta. De referir que os métodos espectrofotométricos são, em geral, de difícil aplicação a este tipo de amostras, dando resultados pouco reprodutíveis e estando sujeitos a interferências de certos constituintes da cerveja. Por esta razão os valores de α-dicetonas que se obtêm através dos métodos espectrofotométricos e cromatográficos não são em geral concordantes, mesmo quando a conversão dos precursores é completa, nos dois casos.

Devido a estas dificuldades analíticas na determinação de α-dicetonas e seus precursores, a questão do controlo do teor destes compostos durante a fermentação mantém-se em aberto. O principal desafio que se coloca actualmente aos químicos analíticos é o desenvolvimento de metodologias que permitam o controlo em fluxo do teor desses compostos durante a fermentação cervejeira. Recentemente, Mathis e colaboradores[35] procuraram desenvolver um sistema de determinação de α-dicetonas em fluxo usando a cromatografia gasosa com detecção por captura electrónica e acoplando um processo de amostragem de α-dicetonas em linha baseado numa membrana microporosa hidrofóbica. Não conseguiram, porém, fazer a conversão em fluxo dos precursores, tendo tido necessidade de recorrer a uma conversão prévia da

amostra, para o que a tiveram que aquecer durante 90min a 65°C. O método que desenvolveram não apresentava, assim, as vantagens em termos de rapidez de resposta dos processos em fluxo.

2.4.2 - COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE II. α-CETOÁCIDOS

Os compostos da classe II constituem a classe dos α-cetoácidos. Estes compostos participam como intermediários em vários ciclos bioquímicos essenciais à vida, como a glicólise, o ciclo de Krebs e o metabolismo de aminoácidos[36,37]. A determinação analítica de α-cetoácidos em amostras de origem biológica, como o sangue e a urina, tem vindo a merecer o maior interesse, já que certas doenças metabólicas estão associadas a disfunções enzimáticas a nível desses ciclos bioquímicos essenciais que impedem que esses processos possam decorrer normalmente. Como resultado de algumas dessas disfunções ocorre a acumulação de α-cetoácidos em fluídos orgânicos, como é o caso de doenças como a cetonúria de cadeia ramificada ("maple syrup urine desease"), a fenilcetonúria ("phenylketonuria"), a tirosinose ("tyrosinosis"), a deficiência da piruvato desidrogenase("pyruvate dehydrogenase deficiency") entre outras[36,38]. A análise de α-cetoácidos em fluídos biológicos é importante como meio de diagnóstico destas doenças e como forma de acompanhar a evolução da resposta do paciente a uma dada terapia. Em geral algumas destas doenças do foro metabólico são de origem hereditária e manifestam-se à nascença; como se trata de disfunções enzimáticas em ciclos bioquímicos essenciais à vida, essas doenças têm, em geral, consequências extremamente graves.

O ácido pirúvico é o α-cetoácido com o papel biológico mais relevante, pois é o composto que resulta da glicólise em condições aeróbicas e é, também, a chave para a formação da acetilcoenzima A, o composto que é metabolizado no ciclo de Krebs[37].

O controlo analítico do teor de α-cetoácidos tem muita importância a nível biológico e clínico. As análises de α-cetoácidos com objectivos clínicos são efectuadas, em geral, em amostras de sangue e de urina. Por exemplo, Hayashi e colaboradores[39] encontraram num doente com cetonúria de cadeia ramificada teores excepcionalmente elevados de alguns α-cetoácidos no plasma sanguíneo (tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Teores de α-cetoácidos no plasma humano. Comparação entre os teores normais e os obtidos no plasma de um doente com cetonúria de cadeia ramificada.
Valores expressos em nmol/mL. (extraídos da ref[a].43).

	teores normais de α-cetoácidos	**teores de α-cetoácidos num doente com cetonúria de cadeia ramificada**	**Aumento relativamente ao teor normal**
ácido α-cetoglutárico	6,0	16,1	+2,7 vezes
ácido pirúvico	58,8	109	+1,9 vezes
ácido α-cetoisovalérico	14,6	164	+11 vezes
ácido α-cetoisocapróico	38,8	1230	+32 vezes
ácido α-ceto-β-metilvalérico	26,2	327	+12 vezes

Para a realização destas análises são requeridas técnicas analíticas que possibilitem a identificação e a quantificação de teores bastantes baixos de α-cetoácidos. Devido às exigências a nível de sensibilidade e selectividade destas análises, só a partir dos anos 60, com o desenvolvimento da cromatografia gasosa, começaram a surgir métodos capazes de as efectuar. Em 1975, Langenbeck[40] e colaboradores desenvolveram um método de determinação de α-cetoácidos por GC-MS, baseado na derivatização com o-fenilenodiamina para formar hidroxiquinoxalinas que eram depois convertidas nos respectivos ésteres trimetilsilicilados, por forma a originarem derivados voláteis. Este método é, ainda, considerado como um dos mais adequados para realizar este tipo de análise por cromatografia gasosa[41,42].

Nos anos 80 surgiram vários métodos de análise de α-cetoácidos baseados na técnica de cromatografia líquida. Hayashi e colaboradores[43] desenvolvem um método por cromatografia líquida com detecção fluorimétrica, aproveitando o facto de como resultado da derivatização dos α-cetoácidos com o-fenilenodiamina se formarem hidroxiquinoxalinas fluorescentes[44]. Mais tarde Ohkura e colaboradores[45] utilizaram a 1,2-diamino-4,5-metilenodioxobenzeno (DMB) como agente derivatizante. Este derivado da o-fenilenodiamina apresenta a vantagem de dar origem a compostos do tipo das hidroxiquinoxalinas mas mais intensamente fluorescentes, pelo que o método desenvolvido é apreciavelmente mais sensível que o anterior baseado na reacção com a o-fenilenodiamina. Estes métodos baseados na cromatografia líquida apresentam a vantagem, relativamente aos métodos por cromatografia gasosa, de só envolverem um processo de derivatização, pelo que são mais simples e mais rápidos de realizar.

A nível da química alimentar, os α-cetoácidos não apresentam qualquer problema toxicológico ou organoléptico especial. Para além disso, o seu teor habitual nos alimentos é relativamente baixo, pelo que mesmo a sua contribuição para a acidez global dos alimentos não é muito importante. Contudo, conforme refere Curvelo-Garcia[4] em relação ao vinho, a determinação de α-cetoácidos em alimentos fermentados, particularmente do ácido pirúvico e do ácido α-cetoglutárico, pode servir como factor de controlo da qualidade do processo de preparação desses alimentos. Por exemplo, o aparecimento de teores elevados de ácido pirúvico e α-cetoglutárico no vinho indica que a fermentação decorreu com carência de tiamina (vitamina B1), já que esta vitamina é essencial ao funcionamento normal das enzimas piruvato e α-cetoglutarato desidrogenase, o que pode indiciar que na preparação desse vinho foram utilizadas quantidades elevadas de mostos de uvas apodrecidas[4].

Na realização de análises de α-cetoácidos em alimentos não é, em geral, essencial a determinação individual do teor dos diferentes α-cetoácidos. Nestas análises a determinação do teor total de α-cetoácidos pode dar informação suficiente sobre a qualidade do processo de preparação do alimento. Por isso, os métodos de análise não necessitam de incluir processos complexos de separações cromatográficas. No vinho as análises de ácido pirúvico e α-cetoglutárico são habitualmente realizadas com base em métodos de conversão enzimática dos compostos e posterior determinação espectrofotométrica dos produtos dessa conversão[5].

2.4.3 - ÁCIDO OXÁLICO

O ácido oxálico é um ácido dicarboxílico relativamente forte, com $pKa_1 = 1,23$ e $pKa_2 = 4,19$[11]. Este composto pode ser encontrado em muitas plantas, geralmente em concentrações baixas; contudo, em algumas que são utilizadas na alimentação humana e animal pode atingir concentrações apreciáveis, como é o caso do espinafre (0,78g/100g de espinafre) e o ruibarbo (0,46g/100g de ruibarbo) [46]. Nas plantas o ácido oxálico pode surgir sob a forma de anião hidrogenooxalato ($HC_2O_4^-$, solúvel) e sob a forma de anião oxalato ($C_2O_4^{2-}$, que forma sais insolúveis com os catiões cálcio e magnésio), dependendo as quantidades relativas de cada uma dessas formas do pH da seiva das plantas[47].

Sob o ponto de vista toxicológico, a ingestão de oxalato em excesso é preocupante quer para o homem, quer para os animais, uma vez que pode ocasionar o aumento do teor de oxalato nos fluídos orgânicos. Como o oxalato de cálcio é pouco solúvel no intervalo de pH habitualmente encontrado na urina (entre 4,5 e 7,5), se ocorrer a ingestão de grande quantidade de alimentos ricos em oxalato, pode ocorrer a deposição de oxalato de cálcio em diversos tecidos, com particular incidência nos rins, onde pode dar origem à formação de cálculos renais de oxalato de cálcio. A quantidade de oxalato que é encontrada nos fluídos orgânicos não é, contudo, directamente correlacionável com a quantidade ingerida: a capacidade de absorção intestinal, a produção endógena resultante do metabolismo e a capacidade de excreção de oxalato[48] são, igualmente, factores responsáveis pelos níveis deste composto nos fluídos orgânicos. A sua determinação nesses fluídos, particularmente na urina, assume um interesse clínico importante, já que alterações dos teores considerados normais pode indicar a existência de estados patológicos[11]. Por exemplo, níveis elevados de oxalato na urina podem indicar uma tendência para a formação de cálculos renais de oxalato de cálcio[49]. As dificuldades desta determinação na urina, resultantes da complexidade da matriz, tem sido referida por vários investigadores[48,49,50,51]. Atendendo à relevância desta determinação em bioquímica fundamental e em química clínica foram desenvolvidas variadas metodologias analíticas por forma a medir com a maior precisão possível o teor de oxalato em fluídos orgânicos.

Os primeiros métodos de análise desenvolvidos utilizavam um processo de separação prévia de oxalato baseado na sua precipitação com catião cálcio[52], sendo as determinações, em geral, realizadas por titulação permanganométrica. Verifica-se, contudo, que na urina existem espécies que interagem com o processo de precipitação, tornando-a não quantitativa[11]. Várias modificações a esta metodologia de separação de oxalato foram propostas, como por exemplo, o uso de métodos de diluição isotópica, que consistem na adição à amostra de ácido oxálico marcado com ^{14}C e que permitem avaliar o grau de recuperação do oxalato após a separação[52]. O uso de processos de extracção líquido-líquido, prévios à separação por precipitação, para eliminar as espécies que inibem a precipitação do oxalato de cálcio[53], e o uso de métodos colorimétricos

mais selectivos e sensíveis que a titulação permanganométrica foram, igualmente, desenvolvidos como forma de ultrapassar as dificuldades desta determinação[54,55]. Estes métodos têm, contudo, a desvantagem de o processo de precipitação ser muito demorado: tipicamente a precipitação necessita de decorrer durante pelo menos 16h para se tornar quantitativa, e só após se pode proceder à separação, por centrifugação, do oxalato de cálcio precipitado[52]. A partir dos anos 60, começaram a surgir métodos enzimáticos que permitem fazer a determinação directa do oxalato na urina, sem necessidade de separação prévia[56]. A rapidez destes métodos e a sua simplicidade tornou-os desde logo preferidos para a realização de análises rotineiras de oxalato na urina. O êxito destes métodos foi tal que em 1984, a *Sigma Diagnostics* iniciou a comercialização de um conjunto de reagentes, que incluía as soluções com as enzimas adequadas, especialmente concebido para a determinação rápida de oxalato na urina (Kit Sigma Diagnostics, processo nº590). Estes métodos enzimáticos não estão, no entanto, isentos de algumas dificuldades experimentais, resultantes da existência de substâncias na matriz da urina que podem interferir com o processo enzimático[50,57]. Mais recentemente começaram a surgir métodos baseados em técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa[58,59], a cromatografia líquida (HPLC)[60] e a cromatografia iónica[49]. Utilizando estas técnicas conseguem-se fazer determinações de oxalato directamente na urina com níveis de precisão elevados, sem necessidade de recorrer a procedimentos de preparação da amostra complicados.

O método de cromatografia líquida (HPLC) referido acima[60] foi desenvolvido por Hughes e colaboradores e baseia-se na reacção de derivatização do ácido oxálico com a o-fenilenodiamina para dar origem a 2,3-di-hidroxiquinoxalina que é depois detectada espectrofotometricamente num detector U.V. ao comprimento de onda de 312nm.

A análise do teor de oxalato em alimentos é, naturalmente, importante; contudo, como a origem do oxalato nos alimentos é endógena, não existe necessidade de controlar sistematicamente o teor de oxalato nos alimentos, pois esses níveis estão caracterizados e não variam apreciavelmente. Existem, porém, duas situações particulares onde a determinação sistemática de oxalato é importante: na indústria cervejeira e no controlo de qualidade das rolhas de cortiça.

Na indústria cervejeira o controlo do teor de oxalato é realizado durante a fase de preparação da cerveja e no produto final, pronto a ser embalado. As fontes de oxalato na cerveja são, essencialmente, o malte e o lúpulo usados como matéria-prima. Como na cerveja existe, igualmente, catião cálcio, que provém da água, e como a solubilidade do oxalato de cálcio é muito baixa, atinge-se com facilidade o nível de saturação, existindo a partir daí condições para a precipitação de oxalato de cálcio. Essa precipitação decorre lentamente mas, geralmente, acontece durante as fases de preparação da cerveja, o que possibilita que os cristais formados sejam removidos na filtração que antecede a fase de embalagem. Contudo, se essa remoção não for eficiente ou se o nível de oxalato se mantiver elevado, podem surgir cristais de oxalato de cálcio na cerveja após a fase de embalagem o que, para além de turvações ou sedimentações, origina a sobreformação de espuma quando a embalagem é aberta; admite-se que este fenómeno se fique a dever à rápida libertação do dióxido de carbono, resultante da actuação como núcleos de formação de bolhas gasosas dos pequenos cristais de oxalato de cálcio[11,61].

A principal fonte de oxalato em rolhas de cortiça resulta do uso de ácido oxálico numa das fases de preparação industrial das rolhas. Uma das fases do tratamento das rolhas de cortiça consiste na denominada lavagem ou lavação, a qual é realizada utilizando um agente oxidante e tem dois objectivos: branquear a rolha para melhorar o seu aspecto e desinfectá-la. Actualmente existem vários modos alternativos de realizar a lavagem; contudo, a forma dita tradicional consiste no uso como agente oxidante do hipoclorito de cálcio (industrialmente denominado cal clorada) e, no fim da lavagem, o uso de ácido oxálico, cuja principal função é remover o excesso de oxidante porém, simultaneamente, devido à precipitação do oxalato de cálcio na superfície e nos poros da rolha, existe uma contribuição para a melhoria do aspecto da rolha[62]. Por esta razão, o controlo do teor de oxalato nas rolhas de cortiça tem vindo a ser objecto de uma atenção crescente por parte dos fabricantes de rolhas de cortiça que, dessa forma, pretendem assegurar que o seu produto não vai constituir uma fonte de contaminação por oxalato dos produtos alimentares com os quais essas rolhas vão estar em contacto, principalmente com o vinho.

Os métodos para a análise de oxalato durante a fase de preparação da cerveja têm vindo a desenvolver-se em paralelo com os métodos de análise de oxalato em fluídos biológicos. Assim, os primeiros métodos para a realização desta análise envolviam a

separação de oxalato por precipitação; posteriormente, surgiram os métodos enzimáticos que apresentavam a vantagem de ser mais rápidos que os primeiros e, actualmente, existe um conjunto de métodos baseados em técnicas cromatográficas. A determinação de oxalato em rolhas só recentemente começou a ser requerida de forma sistemática e a técnica que tem vindo a ser eleita para essa determinação é o processo enzimático utilizando o conjunto comercializado pela Sigma Diagnostics (Kit Sigma Diagnostics, processo nº590)[63].

2.4.4 - ÁCIDO DESIDROASCÓRBICO

O ácido desidroascórbico e a sua forma reduzida, o ácido ascórbico, constituem em conjunto a denominada vitamina C, uma vez que ambas as formas possuem idêntica actividade vitamínica[64]. A vitamina C é um agente anti-escorbútico, foi identificada e isolada em 1926 por Szent-Györgi e, em 1934, T. Reichstein desenvolveu um método para a sua síntese, que ficou conhecido como a síntese clássica de Reichstein, e que continua a ser o principal processo de produção industrial do ácido ascórbico[65].

Só no final do século XIX é que a terrível doença denominada como escorbuto, uma doença que incidia em indivíduos cuja dieta não incluía suficientes alimentos frescos, e que atingia particularmente os marinheiros, foi reconhecida como sendo o resultado de uma deficiência nutricional. Durante as grandes expedições marítimas do século XV e XVI, o escorbuto foi a causa de morte de inúmeros marinheiros. Por exemplo, reza a história que na viagem em que Vasco da Gama descobriu o caminho marítimo para a Índia, cerca de 100 dos 160 marinheiros que compunham a expedição pereceram, a maior parte deles devido ao escorbuto[65].

O papel da vitamina C nos processos bioquímicos humanos ainda não está completamente esclarecido. Sabe-se, contudo, que a vitamina C tem um papel essencial na formação de colagénio, a proteína envolvida na coesão dos tecidos. Desta forma a vitamina C é essencial para manter a normal agregação dos tecidos, para a regeneração e reparação dos tecidos que sofreram ferimentos, para a normal formação dos tecidos ósseos (cuja matriz orgânica é essencialmente formada por colagénio) e para o fortalecimento dos capilares sanguíneos[36]. No entanto, muitos outros papéis têm sido atribuídos à vitamina C, o que levou ao seu uso terapêutico e profilático em múltiplas situações (tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Algumas aplicações terapêuticas e profiláticas do ácido ascórbico[65].

Aplicação	Dose recomendada
Escorbuto e doença de Moeller-Barlow (escorbuto em crianças)	500-1000mg/dia, para adultos e 200-500mg/dia, para crianças. Administrados oralmente durante uma semana. Depois metade da dose até os sintomas desaparecerem
Constipações e outros estados infecciosos	1g/dia
Profilaxia de tumores na presença de agentes cancerígenos	4x250mg/dia em conjunto com as refeições
Cancro do pulmão	500mg/dia
Tumores cancerígenos malignos (em estados avançados)	10g/dia, para prolongar a sobrevivência
Pólipos no intestino grosso	3g/dia
Arteriosclerose	Dosagem não estabelecida
Cirurgias: regeneração de feridas e fracturas	0,5-1g/dia durante os três primeiros dias, depois 100mg/dia como dose de manutenção
Queimaduras nos olhos com agentes alcalinos	Aplicação local e intravenosa de ácido ascórbico
Glaucoma	Aplicação intravenosa de solução com 20% de ascorbato de sódio, 0,5-1g/Kg de peso do doente
Desportistas de alta competição	150-300mg/dia
Doentes renais hemodialisados	1,5g/por sessão de hemodiálise, para repor a vitamina perdida durante o tratamento

Uma das utilizações terapêuticas da vitamina C envolta na maior controvérsia é o seu uso na prevenção e cura da constipação vulgar. Estudos recentes parecem indicar que a ingestão de suplementos regulares de vitamina C não faz diminuir a incidência da doença mas que a duração e a gravidade dos sintomas parecem diminuir. De referir que o uso de doses elevadas de vitamina C não parece ter contra-indicações; no entanto, como o ácido oxálico é um dos principais metabolitos do ácido ascórbico, a ingestão de grandes quantidades de vitamina C pode, pelo menos teoricamente, aumentar o risco de formação de cálculos renais.

A principal fonte de vitamina C na dieta humana são as frutas e os legumes, muito embora o teor de vitamina C nesses produtos varie muito. Na tabela 2.4, encontram-se valores típicos dos teores de vitamina C encontrados em algumas frutos e legumes mais vulgares.

Tabela 2.4 - Teores de vitamina C típicos em algumas frutas e legumes crus[64].

Frutos	Teor em vitamina C (mg/100g)	Legumes, tubérculos, cereais	Teor em vitamina C (mg/100g)
Figos	2	Beterrabas	7
Uvas	4	Cenouras	8
Maças	6	Cebolas	10
Pêssegos	7	Milho	10
Melões	12	Batatas	21
Framboesas	25	Tomates	25
Ananases	34	Espargos	30
Mangas	42	Espinafres	45
Limões	45	Couve-flor	80
Laranjas	46	Couve de Bruxelas	90
Papaias	52	Pimentos doces	140

Normalmente um adulto necessita de ingerir entre 45 e 80mg de vitamina C por dia[66]. É possível detectar se a ingestão da vitamina C de um indivíduo está dentro dos níveis mínimos requeridos, através da determinação do teor de vitamina C no sangue. Níveis inferiores a 0,4mg/100mL indicam que a ingestão de vitamina C tem sido insuficiente.

Nos alimentos frescos a vitamina C encontra-se quase exclusivamente sob a forma de ácido ascórbico (I)[64]. O grupo enodiol existente nesta molécula é, no entanto, facilmente oxidável, originando o ácido desidroascórbico (II). Esta oxidação constitui o início da principal via de degradação da vitamina C, que se encontra representada na figura 2.5. Este processo de oxidação do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico e a posterior degradação deste último composto são facilitados por um conjunto de factores tais como a presença de oxigénio, a diminuição da acidez do meio, o aumento de temperatura e a presença de certos iões metálicos, como o Cu(II) e o Fe(III), que catalisam a oxidação do ácido ascórbico. De salientar que o ácido desidroascórbico encontra-se em solução aquosa essencialmente com a configuração de monómero biclíclico hidratado (IV)[67] e que a actividade vitamínica desaparece quando, por hidrólise, a forma cíclica do ácido desidroascórbico se abre de forma irreversível, dando origem ao ácido 2,3-dicetogulónico (III)[66].

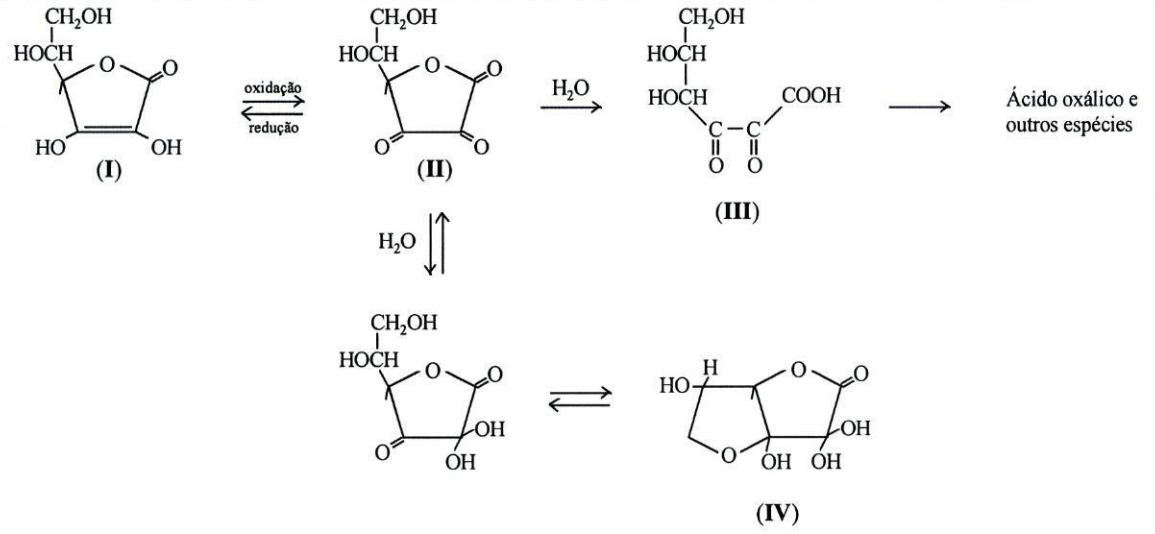


Figura 2.5 - Principal via de degradação do ácido ascórbico na presença de oxigénio[65]. (I)- ácido ascórbico; (II)- ácido desidroascórbico; (III)- ácido 2,3-dicetogulónico; (IV)- ácido desidroascórbico (configuração de monómero bicíclico hidratado).

Na indústria alimentar o ácido ascórbico é um aditivo muito utilizado. As suas características redutoras fazem dele um bom agente anti-oxidante, o que, aliado ao seu preço acessível, à sua importância nutricional e à boa aceitação pelos consumidores, faz deste composto um aditivo de eleição para preservar os alimentos de processos oxidativos. Em geral a sua utilização é feita em conjunto com o ácido cítrico, cuja função principal é actuar como agente complexante de iões metálicos, contribuindo, dessa forma, para aumentar a estabilidade do ácido ascórbico.

O desenvolvimento de metodologias de análise da vitamina C em fluídos orgânicos e em produtos alimentares mereceu um grande interesse logo após Szent-Györgi ter conseguido isolar a vitamina C, em 1926, e ter conseguido mostrar que se tratava do agente nutricional com características anti-escorbúticas que se sabia estar presente em muitas plantas e frutos. O facto de o ácido ascórbico ser um bom agente redutor possibilitou o desenvolvimento de uma série de métodos baseados na titulação do ácido ascórbico com agentes oxidantes. Alguns dos agentes oxidantes utilizados são: o hexacianoferrato (III) de potássio, o anião triiodeto, o nitrato de cobre (II), a N-bromossucinimida, o 2,6-diclorofenolindofenol, o iodato de potássio, entre outros[64,65]. Estes métodos volumétricos apresentam, porém, duas dificuldades principais: só determinam a forma reduzida da vitamina C (o ácido ascórbico) e estão sujeitos à interferência de espécies com propriedades redutoras. De entre os vários

métodos propostos, o método de Tillman publicado em 1927[68], baseado na titulação do ácido ascórbico com o corante 2,6-diclorofenolindofenol foi aquele que conheceu maior aceitação, mantendo-se em uso frequente até aos nossos dias. Mantém-se, ainda, como método recomendado pela AOAC ("Association of Official Analytical Chemists") para a determinação de vitamina C em preparações vitamínicas e sumos, na edição de 1984 do "Official Methods of Analysis of the AOAC"[69].

A problemática da determinação da vitamina C depende, contudo, do tipo de amostra onde a análise vai ser efectuada. Conforme já foi referido, a vitamina C é encontrada nos alimentos frescos sob a forma de ácido ascórbico, no entanto como esta molécula é facilmente oxidável a ácido desidroascórbico, no decurso da conservação dos alimentos ou durante o processamento industrial dos alimentos pode ocorrer essa oxidação e, como o teor de vitamina C é a soma do teor das duas espécies, o resultado das determinações pode ser enganador. A determinação selectiva de ácido ascórbico e ácido desidroascórbico tem vindo a merecer um interesse crescente pois a razão entre as concentrações dessas duas espécies permite acompanhar, por exemplo, o processo de alteração oxidativa de um alimento[66] e a evolução de certos estados patológicos no homem, através do controlo dessa razão no sangue[70].

Para dar resposta a estas necessidades analíticas foram surgindo novas metodologias[64] baseadas em técnicas como a espectrofotometria, a polarografia e a fluorimetria. Mais recentemente, com o desenvolvimento das técnicas cromatográficas, surgiram também métodos baseados em cromatografia gasosa e em cromatografia líquida (HPLC). De entre os inúmeros métodos propostos, o método fluorimétrico desenvolvido por Deutsch e Weeks[71], baseado na oxidação prévia do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico e na reacção deste último composto com a o-fenilenodiamina para formar um composto do tipo quinoxalina com características fluorescentes, é um dos métodos que tem merecido maior aceitação para a determinação do teor global de vitamina C em variados produtos alimentares. Trata-se do método recomendado pelo AOAC[69] para a determinação de vitamina C em preparações vitamínicas. Recentemente foi, igualmente, seleccionado em França como método oficial para a determinação da vitamina C em produtos dietéticos e de regime[72]. Este método fluorimétrico foi alterado por Salpeter e colaboradores[73] por forma a conseguirem a determinação semi-automatizada do teor de vitamina C em alimentos. A principal

alteração introduzida por estes investigadores foi no passo de oxidação prévia do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico que passou a ser realizado com uma solução de N-bromossucinimida, enquanto que no método de Deutsch e Weeks se utiliza carvão activado que, por ser um sólido, implica um passo lento e laborioso de filtração da solução antes da análise. Este método semi-automático é recomendado pelo AOAC para a determinação de vitamina C em alimentos[69].

A determinação selectiva de ácido desidroascórbico tem, conforme foi referido, bastante interesse. A determinação de ácido desidroascórbico é, no entanto, mais difícil do que a análise de ácido ascórbico porque, normalmente, existe em muito menor quantidade nas amostras e a sua determinação directa não é facilmente realizável, pois ao contrário do ácido ascórbico não absorve apreciavelmente no U.V.[74]. A reacção do ácido desidroascórbico com a o-fenilenodiamina tem como resultado, como se referiu anteriormente, um derivado fluorescente, o que permite a realização da análise do ácido desidroascórbico com elevada sensibilidade e com selectividade relativamente ao ácido ascórbico, já que este composto não reage com a o-fenilenodiamina. Esta reacção foi utilizada por vários investigadores para desenvolverem métodos de análise selectiva de ácido desidroascórbico[73,74,75].

2.5 - MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS BASEADOS NA REACÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO COM o-DIAMINAS AROMÁTICAS

Em quase todas as técnicas instrumentais de análise química é possível encontrar exemplos de processos de derivatização que permitem estender a gama de aplicabilidade dessas técnicas a conjuntos de compostos que directamente seriam dificilmente analisáveis. A utilização de um processo de derivatização tem como objectivo tornar mais eficaz um dado processo analítico; contudo, o modo como é conseguido esse aumento de eficácia depende da metodologia seguida para a análise e do tipo de técnica instrumental utilizada. Nas técnicas instrumentais orientadas para o processo de detecção, como a espectrofotometria UV-VIS, a fluorimetria, e os métodos electroanalíticos, o aumento de eficácia da análise está, quase sempre, relacionado com o aumento da sensibilidade da análise, ou seja, com o processo de derivatização procura-se originar compostos cuja resposta analítica para a técnica instrumental em questão seja superior e que daí resulte um efectivo aumento de sensibilidade. Porém, se

o método de análise envolver um processo de separação, a derivatização pode ser utilizada para obter compostos mais facilmente separáveis. Este tipo de situação é particularmente importante na cromatografia gasosa onde é habitual fazer a derivatização dos compostos, sobretudo dos compostos polares, por forma a aumentar a sua volatilidade, tornando possível a sua separação em fase gasosa[42].

Qualquer processo de derivatização englobado numa dada metodologia analítica implica um passo que envolve a transformação dos compostos a analisar através de uma ou mais reacções químicas. Sendo assim, durante o processo de derivatização, a amostra será sujeita à adição de compostos que lhe irão provocar alterações a nível da sua composição química, pelo que o processo deve ser avaliado relativamente às vantagens e às desvantagens que podem resultar da sua implementação. Na tabela 2.5 enumeram-se algumas das vantagens e desvantagens que habitualmente se encontram em processos de derivatização.

Tabela 2.5 - Vantagens e desvantagens de processos de derivatização integrados em metodologias analíticas.

Vantagens	● Alargamento da gama de compostos analisáveis ● Aumento da sensibilidade ● Possibilidade de obtenção de brancos da matriz ● Aumento da selectividade da análise
Desvantagens	● Aumento da complexidade da análise ● Reacções de derivatização incompletas ● Processos morosos e/ou laboriosos ● Reacções indesejáveis ● Aparecimento de outros tipos de interferências

O processo de derivatização que foi estudado ao longo deste trabalho consistiu na reacção da o-fenilenodiamina com compostos α-dicarbonílicos, para darem origem a quinoxalinas. A necessidade de implementar técnicas de derivatização para a análise de compostos α-dicarbonílicos resulta de não se conseguir obter, com a maioria dos compostos desta classe, uma boa resposta analítica quando se realiza a sua análise directa utilizando as técnicas de análise instrumental mais habituais, como é o caso da espectrofotometria e da polarografia/voltametria. O processo de derivatização com a o-fenilenodiamina permite transformar esses compostos em quinoxalinas que apresentam

características mais adequadas para a realização da análise através dessas técnicas. A reacção de derivatização em questão pode decorrer em solução aquosa, é razoavelmente rápida e o seu grau de conversão é elevado; por isso, não é de estranhar que existam na literatura bastantes propostas de metodologias de análise de compostos α-dicarbonílicos que se baseiam neste tipo de reacção de derivatização. Na tabela 2.6 apresenta-se uma lista cronológica, não exaustiva, de métodos de análise de compostos α-dicarbonílicos desenvolvidos desde os anos 60, baseados na derivatização com a o-fenilenodiamina e outras o-diaminas aromáticas.

As metodologias de análise de compostos α-dicarbonílicos, baseadas na formação de derivados do tipo quinoxalinas, têm vindo a evoluir, fundamentalmente, sob três aspectos: diminuição dos limites de detecção; tendência para a utilização de técnicas de separação cromatográfica prévias ao processo de detecção (nos anos 70 utilização da cromatografia gasosa e mais recentemente da cromatografia líquida); e procura de agentes derivatizantes com propriedades similares à o-fenilenodiamina, mas cujas quinoxalinas resultantes possuam características mais adequadas para processos de detecção mais sensíveis que a espectrofotometria U.V., tal como a detecção por fluorescência ou por quimioluminescência.

A polarografia clássica surge também citada na tabela 2.6. A utilização de técnicas polarográficas para analisar compostos α-dicarbonílicos após derivatização com a o-fenilenodiamina foi estudada por Tamotsu Wasa e colaboradores[76,77,82,99] durante a década de 60 e inícios dos anos 70. Embora muitos compostos α-dicarbonílicos possam ser directamente reduzidos num eléctrodo de mercúrio gotejante, as ondas de redução que apresentam são pequenas, mal definidas e de natureza cinética, devido ao processo ser parcialmente controlado pela desidratação dos compostos[99]. Como resultado, a utilização dessas ondas com fins analíticos obrigava a um controlo rigoroso das condições experimentais em que a análise era efectuada. Como forma de contornar essa dificuldade da determinação polarográfica de compostos α-dicarbonílicos, Tamotsu Wasa e colaboradores utilizaram a derivatização desses compostos com a o-fenilenodiamina para formar quinoxalinas e verificaram que as ondas de redução que resultavam eram bem definidas e que o processo era controlado por difusão. Com base nesta reacção de derivatização desenvolveram processos de análise polarográfica de vários tipos de compostos α-dicarbonílicos. Estes métodos de

análise polarográfica nunca foram, contudo, muito utilizados para a determinação de compostos α-dicarbonílicos em amostras reais, o que pode ser explicado pelos elevados limites de detecção que possuíam.

Tabela 2.6 - Lista cronológica da publicação de métodos de análise de compostos α-dicarbonílicos baseados na reacção de derivatização com a o-fenilenodiamina ou com outras o-diaminas aromáticas.

Ano	Composto α-dicarbonílico (classe)[#]	Quantidade de derivatizante	Meio reactivo	Temperatura de reacção	tempo de reacção	Técnica de análise	Limite de detecção	Referência bibliográfica
1961	ácido ascórbico e ácido desidroascórbico **(classe IV)**	2mM OFDA[1]	tampão McIlvain's, pH=4,7.	25°C	50min	Polarografia clássica		76
1962	ácido pirúvico, oxaloacético e α-cetoglutárico **(classe II)**	0,3mM OFDA	H_2SO_4 1M ou 50% (9M)	banho-Maria a 90°C	durante 2h	Fluorimetria	$1x10^{-6}$M	44
1965	vitamina C **(classe IV)**	2mM OFDA	oxidação prévia do ácido ascórbico a ácido desidroascórbico com carvão activado. Reacção em meio acetato de sódio.	temperatura ambiente	35min	Fluorimetria		71
1967	metilglioxal e diacetilo **(classe I)**	10-20mM OFDA	meio aquoso com pH entre 3 e 10.	temperatura ambiente	durante 60min.	Polarografia clássica	$5x10^{-5}$M	77
1967	metilglioxal **(classe I)**	80mM OFDA	tampão isobutilamina 1M, pH=10,4	temperatura ambiente	durante 10min.	Polarografia clássica	$1x10^{-4}$M	78
1968	glioxal **(classe I)**	20mM OFDA	tampão Britton-Robinson's, pH=6-8,5	temperatura ambiente	20-40min	Polarografia clássica	$1x10^{-4}$M	79
1969	ácido pirúvico e α-cetoglutárico **(classe II)**	45mM OFDA	ácido acético 10%	temperatura ambiente	15min	Cromatografia gasosa		80
1970	ácido pirúvico, oxaloacético e α-cetoglutárico **(classe II)**	2mM OFDA em HCl 12M	HCl 2M	37°C	1-3h	Cromatografia em placa fina. Detecção das manchas por flourescência.	$5x10^{-6}$M	81
1970	α-cetoácidos **(classe II)**	20-40mM OFDA	HCl 0,1-1M	25°C	60min	Polarografia clássica	$5x10^{-5}$M	82
1977	α-cetoácidos alifáticos **(classe II)**	50mM OFDA	HCl 2M	70°C	1h (depois transformação em derivados sililizados)	Cromatografia gasosa com detector FID ou MS		41

Tabela 2.6- Continuação

Ano	Composto α-dicarbonílico (classe)[#]	Quantidade de derivatizante	Meio reactivo	Temperatura de reacção	tempo de reacção	Técnica de análise	Limite de detecção	Referência bibliográfica
1977	ácidos pirúvico e α-cetoglutárico **(classe II)**	500mM OFDA	HCl 1M	banho de óleo a 130ºC	5min	Cromatografia líquida (HPLC) com detector UV	0,5ppm	83
1979	α-cetoácidos ramificados **(classe II)**	250mM OFDA	HCl 1,2M	B.M.	30min (depois transformação em derivados sililizados)	Cromatografia gasosa com detector FID	$2x10^{-6}$M	84
1981	glioxal, metilglioxal, diacetilo e 2,3-pentanodiona **(classe I)**	5mM OFDA	meio aquoso, sem controlo específico de pH	temperatura ambiente	2horas	Cromatografia líquida (HPLC) com detector UV		85
1982	α-cetoácidos **(classe II)**	120mM OFDA	H_3PO_4 4M	40ºC	90min (depois transformação em derivados sililizados)	Cromatografia gasosa com detector FID		86
1982	ácido oxálico **(classe III)**	500mM OFDA	HCl 1M.	Aquecimento em tubo fechado em banho de óleo a 130ºC	15min.	Cromatografia líquida (HPLC) com detector UV	5ppm	60
1983	α-cetoácidos **(classe II)**	10mM OFDA	HCl 2M	80ºC	2h	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência	$4x10^{-6}$M	43
1984	ácido ascórbico e ácido desidroascórbico **(classe IV)**	OFDA	Separação prévia dos dois compostos e depois introdução do oxidante (para converter o ácido ascórbico em ácido desidroascórbico)e do agente derivatizante no sistema em fluxo			Cromatografia líquida (HPLC) com reacção de derivatização pós-coluna com detector de fluorescência	cerca de 2ppm	75
1985	α-cetoácidos **(classe II)**	0,12mM DDB[2]	HCl 0,25M	B.M. à ebulição	2,5h	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência	$2x10^{-9}$M	87
1985	metilglioxal **(classe I)**	7mM OFDA e 3% ácido tricloroacético	1ªderivatização com OFDA em meio aquoso, sem controlo específico de pH. 2º derivatização do produto obtido com ácido tricloroacético em clorofórmio	1ªderivatização a 37ºC e 2ªderivatização a 150ºC	1ªderivatização durante 30min e 2ªderivatização durante 1h	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência	$2x10^{-6}$M	88

Tabela 2.6 - Continuação

Ano	Composto α-dicarbonílico (classe)[#]	Quantidade de derivatizante	Meio reactivo	Temperatura de reacção	tempo de reacção	Técnica de análise	Limite de detecção	Referência bibliográfica
1985	diacetilo **(classe I)**	0,1mM DAA[3]	Meio alcalino (conc. HO- =0,005M), na presença de etanol.	Aquecimento em refluxo	durante 40min.	Fluorimetria	$1x10^{-8}$M	89
1987	metilglioxal **(classe I)**	10mM OFDA	$HClO_4$ 0,5M	25ºC	1h	Cromatografia líquida (HPLC) com detector UV	$1x10^{-5}$M	19
1987	metilglioxal **(classe I)**	15mM DCFDA[4]	$HClO_4$ 0,5M	25ºC.	1h	Cromatografia gasosa com detector ECD	$5x10^{-9}$M	90
1988	α-cetoácidos **(classe II)**	2,5mM DMB[5]	HCl 0,2M	B.M. à ebulição	50min	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência	$2x10^{-9}$M	45
1988	glioxal, metilglioxal, diacetilo, 2,3-pentanodiona, ciclohexano-1,2-diona, fenilglioxal e 1-fenilpropano-1,2-diona **(classe I)**	3,5mM DMB	Meio aquoso, sem controlo específico de pH	60ºC	40min	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência	$1x10^{-8}$M	91
1988	diacetilo **(classe I)**	0,6mM DAN[6]	meio HCl 0,01M	temperatura ambiente	15min	Fluorimetria e cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência		92
1989	metilglioxal **(classe I)**	7mM DMB	meio aquoso, sem controlo específico de pH	60ºC	40min	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência	$4x10^{-7}$M	93
1989	ácido ascórbico e ácido desidroascórbico **(classe IV)**	2mM OFDA	0,1% ácido mtafosfórico	60ºC	1h	Cromatografia líquida (HPLC) com detector espectrofotométrico e com detector amperométrico colocados em linha	cerca de 10ppb	74
1991	ácido ascórbico **(classe IV)**	15mM OFDA	método automatizado em que a formação do composto fluorescente é monitorizada ao longo do tempo.			Fluorescência em fluxo	20ppb	94

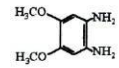
Tabela 2.6 - Continuação

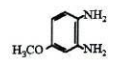
Ano	Composto α-dicarbonílico (classe)[#]	Quantidade de derivatizante	Meio reactivo	Temperatura de reacção	tempo de reacção	Técnica de análise	Limite de detecção	Referência bibliográfica
1992	α-cetoácidos **(classe II)**	0,8mM DFH[7]	HCl 0,3M	B.M. à ebulição	45min	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de quimiluminescência	$2x10^{-10}$M	95
1992	diacetilo e acetoína (após prévia oxidação a diacetilo) **(classe I)**	6mM DCFDA	HCl 0,5M	40ºC	90min	Cromatografia gasosa com detector ECD	$1x10^{-8}$M	96
1992	metilglioxal **(classe I)**	0,11mM DDB	$HClO_4$ 0,6M	temperatura ambiente	4h	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de fluorescência	$1x10^{-8}$M	18
1992	fenilglioxal, diacetilo, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona **(classe I)**	0,4mM DFH	HCl 0,1M	B.M. à ebulição	45min	Cromatografia líquida (HPLC) com detector de quimiluminescência	$1x10^{-10}$M	97
1993	diacetilo **(classe I)**	0,5mM OFDA	tampão acetato 0,1M, pH=5	temperatura ambiente	10min	Voltametria diferencial por impulsos em eléctrodo de carbono vítreo	$6x10^{-7}$M	98

[#] a definição destas classes foi estabelecida na secção 2.2

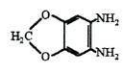
Compostos derivatizantes referidos na tabela 2.6

[1]OFDA = o-fenilenodiamina 

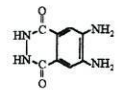
[2]DDB =1,2-diamino-4,5-dimetoxibenzeno 

[3]DAA = 3,4-diaminoanisol 

[4]DCFDA = 4,5-dicloro-1,2-fenilenodiamina 

[5]DMB = 1,2-diamino-4,5-metilenodioxobenzeno 

[6]DAN = 2,3-diaminonaftaleno 

[7]DFH = 4,5-diaminoftalhidrazida 

3 - EVOLUÇÃO DA POLAROGRAFIA. TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS MODERNAS

3.1 - ENQUADRAMENTO HISTÓRICO DA POLAROGRAFIA

A polarografia surgiu no início dos anos 20 e resultou dos trabalhos de Heyrovsky sobre a medição da intensidade de corrente que fluía através de uma célula electrolítica constituída por um eléctrodo de trabalho de mercúrio gotejante e por um eléctrodo constituído por uma piscina de mercúrio (que tinha a função de eléctrodo de referência) quando, entre eles, era aplicada uma diferença de potencial conhecida. Utilizando um potenciómetro, que permitia variar a diferença de potencial aplicado entre os dois eléctrodos, e um galvanómetro, que permitia medir a intensidade de corrente que entre eles fluía, foi possível a Heyrovsky obter um conjunto de valores de intensidade de corrente - potencial aplicado e, a partir deles, construir uma representação a que deu o nome de polarograma[100,101]. Os primeiros polarogramas foram obtidos em equipamentos deste tipo, sendo o registo dos pontos efectuado manualmente, ponto por ponto. Em 1925, Heyrovsky com a colaboração de Shikata[102] desenvolveu um equipamento que denominou por polarógrafo e que permitia fazer a variação do potencial de forma contínua e, simultaneamente, efectuar o registo da intensidade de corrente resultante, através de um processo fotográfico.

Heyrovsky reconheceu, a partir dos primeiros polarogramas que obteve, que existia um patamar nas curvas de intensidade de corrente - potencial quando em solução existiam espécies oxidáveis ou redutíveis que era facilmente detectável porque, tipicamente, a intensidade de corrente a partir de um dado valor de potencial aplicado tendia a variar rapidamente atingindo um valor limite a partir do qual a intensidade de corrente se mantinha praticamente inalterada com a variação do potencial. À diferença entre a intensidade de corrente da linha de base e a intensidade de corrente desse patamar foi dado o nome de intensidade de corrente limite (figura 3.1). Heyrovsky conseguiu aperceber-se que essas curvas de intensidade de corrente - potencial podiam fornecer informação analítica acerca da composição e propriedades da solução em estudo. Com este trabalho, Heyrovsky lançou as bases fundamentais da polarografia.

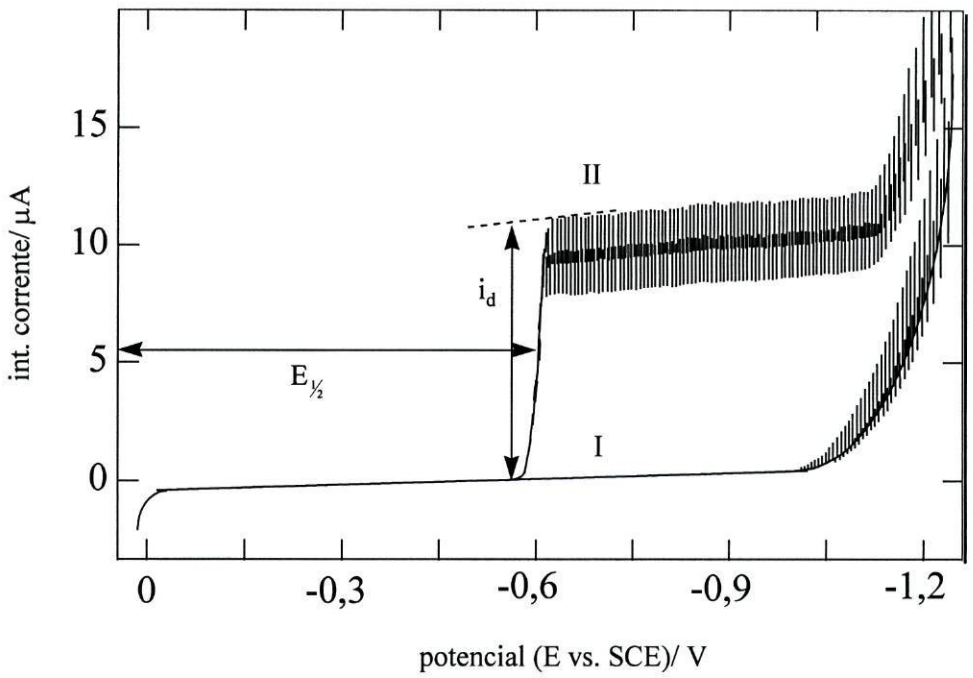


Figura 3.1 - Polarogramas clássicos de (I) HCl 1M (electrólito de suporte); (II) $5{,}0\times10^{-4}$M Cd (II) em HCl 1M. I_d = intensidade de corrente limite de difusão; $E_{1/2}$ = potencial de meia-onda.

Durante os anos 30, a polarografia conheceu um grande interesse como técnica analítica, o que conduziu ao rápido estabelecimento das suas bases teóricas fundamentais e ao aparecimento de variados métodos de análise baseados na utilização da polarografia. A nível do desenvolvimento dos fundamentos teóricos da técnica salienta-se o reconhecimento de que o transporte de massa da espécie electroactiva para o eléctrodo pode ocorrer por três mecanismos distintos - difusão, migração e convecção - e que na análise polarográfica é conveniente minimizar o efeito do transporte de massa por migração e por convecção. A minimização do transporte de massa por migração é conseguida por adição à solução a analisar de um electrólito de suporte ou electrólito de base; a minimização do transporte de massa por convecção é conseguida evitando a agitação da solução durante o ensaio polarográfico. Também a expressão conhecida por equação de Ilkovic[103,104] foi derivada durante o período inicial de desenvolvimento da técnica e veio permitir estabelecer a relação entre a intensidade de corrente de difusão medida com as propriedades do eléctrodo de mercúrio gotejante (tempo de vida da gota e fluxo de mercúrio), a composição da solução (concentração da espécie electroactiva, o seu coeficiente de difusão e o nº de electrões transferidos na reacção electroquímica). A equação de Ilkovic pode ser expressa da seguinte forma:

$$\bar{I}_d = 607nCD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}$$

Em que:

$\bar{I}_d$ = intensidade de corrente de difusão média, expressa em μA

n = nº de electrões transferidos na reacção electroquímica

C = concentração da espécie electroactiva, expressa em $mmol.dm^{-3}$

D = coeficiente de difusão, expresso em $cm^2.s^{-1}$

m= fluxo de mercúrio, expresso em $mg.s^{-1}$

t = tempo de vida da gota, expresso em s.

No modelo utilizado para derivar esta equação Ilkovic considerou que a difusão para o eléctrodo de mercúrio gotejante é linear e que a área superficial aumenta com o tempo[105,106]. Embora o rigor da equação de Ilkovic tenha sido questionado por alguns investigadores devido às aproximações utilizadas na sua derivação, esta equação tem grande utilidade em análise química pois permite prever e compreender os resultados experimentais obtidos[106].

Sob o ponto de vista da análise química a polarografia representou, naquela época, uma grande inovação pois, até ao seu aparecimento, não eram habitualmente utilizadas técnicas instrumentais de análise. Pela primeira vez existia uma técnica instrumental que podia substituir com vantagens em termos de sensibilidade e simplicidade as técnicas volumétricas e gravimétricas. O reconhecimento da importância da polarografia e da contribuição que teve para o avanço da análise química está bem patente no facto de ter sido atribuído a Heyrovsky o prémio Nobel da Química em 1950, como reconhecimento pelo seu trabalho de criação e desenvolvimento da polarografia[107].

A sensibilidade da técnica polarográfica clássica permite fazer determinações para níveis de concentrações entre $10^{-3}\underline{M}$ e $10^{-5}\underline{M}$, com uma precisão de cerca de ±3%. Esta sensibilidade era considerada muito boa e respondia às principais necessidades da análise química durante os anos 30 e 40. No entanto, com o desenvolvimento de novas técnicas de análise instrumental, como a espectrofotometria, que permitem realizar análises para níveis de concentrações mais baixos, o interesse analítico da polarografia esmoreceu. A razão fundamental que limita a possibilidade de diminuir a sensibilidade das determinações polarográficas clássicas para níveis de concentração inferiores a $10^{-5}\underline{M}$ é a componente

capacitiva da intensidade de corrente que é medida. Essa componente capacitiva, ao contrário da intensidade de corrente faradaica que provém de fenómenos de transferência electrónica resultantes da reacção electroquímica no eléctrodo, corresponde à carga eléctrica que tem de ser transferida para o eléctrodo para que este atinja o valor de potencial imposto. Esta intensidade de corrente não envolve fenómenos de transferência electrónica e é observada mesmo em soluções que não contenham quaisquer espécies oxidáveis ou redutíveis no intervalo de potencial imposto. Para além disso, a intensidade de corrente capacitiva é, praticamente, independente da concentração das espécies electroactivas. Em geral, quando a concentração da espécie electroactiva em solução é superior a 10^{-4}M a intensidade de corrente faradaica é francamente maior que a intensidade de corrente capacitiva e a medição da intensidade de corrente limite é fácil de realizar. Para concentrações de espécie electroactiva da ordem dos 10^{-5}M as duas componentes da intensidade de corrente têm valores da mesma ordem de grandeza, sendo a medição da intensidade de corrente limite ainda possível com razoável precisão. Para concentrações mais baixas, contudo, a distinção das intensidades de corrente devidas aos processos faradaico e capacitivo é muito difícil e errónea.

Em consequência destas dificuldades, em meados dos anos 50 o uso de técnicas polarográficas em laboratórios de análise química estava quase posto de lado. Curiosamente, porém, durante esse mesmo período, estavam a ter lugar desenvolvimentos muito importantes a nível de aspectos técnicos fundamentais da polarografia que visavam ultrapassar os problemas associados com a técnica polarográfica clássica. Esses desenvolvimentos começaram em 1952 com o trabalho pioneiro de Barker[108] sobre polarografia de onda quadrada. Barker modificou a técnica polarográfica clássica utilizando duas estratégias inovadoras: substituiu a rampa linear de variação do potencial com o tempo por uma variação de potencial em onda quadrada; e substituiu a forma como a intensidade de corrente é medida na polarografia clássica - na polarografia clássica a medição é efectuada durante todo o tempo de vida da gota - por uma medição durante um curto intervalo de tempo muito próximo do fim do tempo de vida da gota. O tipo de variação de potencial e o modo como a intensidade de corrente é medida podem ser observados na figura 3.2.

Barker conseguiu, ao fazer a modulação da variação do potencial sobre a forma de impulsos, tirar partido do facto de a intensidade de corrente capacitiva decrescer muito

rapidamente após a aplicação do impulso. Desta forma, ao realizar a amostragem da intensidade de corrente no período final da vida da gota conseguiu discriminar a

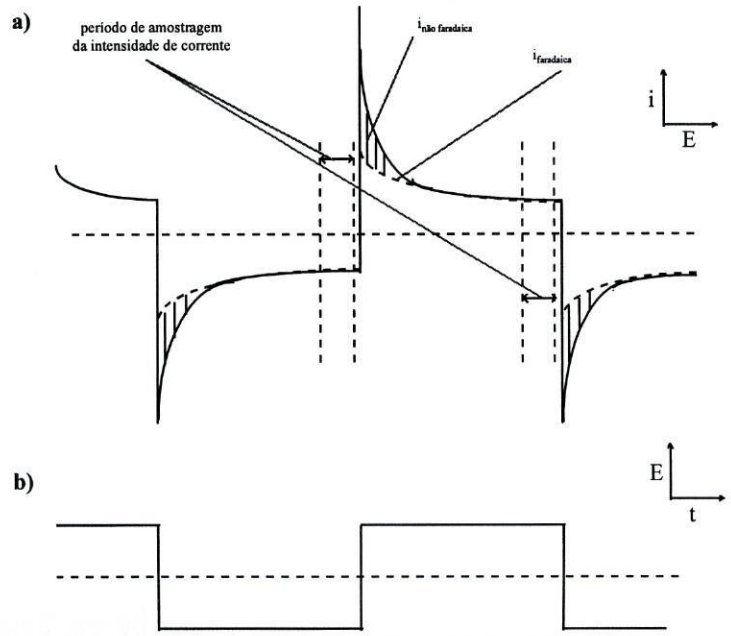


Figura 3.2 - Representação da **a)** intensidade de corrente resultante de uma **b)** variação de potencial em onda quadrada. De notar os diferentes decréscimos no tempo das intensidades de corrente faradaica e capacitiva após a aplicação do impulso e os instantes onde é realizada a amostragem da intensidade de corrente.

componente capacitiva na intensidade de corrente medida. Utilizando esta estratégia Barker e colaboradores conseguiram estender a sensibilidade da técnica polarográfica para níveis de concentrações da ordem dos 10^{-7}M.

Estes desenvolvimentos que estavam a ser conseguidos em alguns laboratórios de investigação muito especializados não foram imediatamente incorporados nos sistemas de polarografia comerciais, pelo que estas novas técnicas mantiveram-se inacessíveis à maior parte dos laboratórios de análise química, durante esse período. Só no final dos anos 60 é que começaram a surgir sistemas de polarografia e voltametria que incorporavam essas técnicas modernas baseadas em varrimentos de potencial por impulsos. Esses equipamentos tiravam partido do aparecimento recente dos amplificadores operacionais e da tecnologia de integração de circuitos, tratando-se de sistemas muito compactos e de preço bastante acessível, com enorme poder para aplicações no âmbito da análise química.

Este novo conjunto de equipamentos veio dar origem a um interesse renovado pelas técnicas polarográficas e voltamétricas como técnicas de análise química[107].

3.2 - TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS USANDO O ELÉCTRODO DE MERCÚRIO

Nos anos 70, as técnicas electroanalíticas por impulsos, particularmente as técnicas normal por impulsos e diferencial por impulsos, vieram aumentar consideravelmente a sensibilidade da polarografia / voltametria, reacendendo o interesse nestas técnicas analíticas (tabela 3.1)

Tabela 3.1 - Limites de detecção típicos da polarografia clássica, normal por impulsos e diferencial por impulsos[109].

Polarografia clássica	10^{-5}M
Polarografia normal por impulsos	10^{-6}M
Polarografia diferencial por impulsos	10^{-7}M

Para conseguir aplicar as novas técnicas electroanalíticas por impulsos ao eléctrodo de mercúrio gotejante foi necessário desenvolver novos postos de polarografia que permitissem o controlo rigoroso do tempo de vida da gota de mercúrio através do sistema electroquímico, por forma que os instantes da queda da gota de mercúrio e a sequência de potencial aplicado estivessem perfeitamente sincronizados. Essa sincronização foi conseguida através da colocação no posto de polarografia de um dispositivo denominado martelo, cuja função consiste em provocar a queda da gota de mercúrio em intervalos de tempo precisos, controlados pelo sistema electroquímico. Os postos de polarografia actuais já não recorrem às clássicas colunas de mercúrio, apresentando arquitecturas muito mais compactas, como é o caso do eléctrodo multimodo (MME) da *Metrohm*[114] (figura 3.3).

Neste eléctrodo o mercúrio é confinado dentro de um reservatório fechado, mantido sob pressão de azoto. O fluxo do mercúrio pelo capilar é controlado através de uma agulha de aço que se pode movimentar longitudinalmente relativamente ao eixo do eléctrodo, obstruindo ou desobstruindo a passagem de mercúrio pelo capilar. O movimento da agulha é impulsionado por um diafragma que responde com movimentos ascendentes ou descendentes ao disparo de uma electroválvula controlada pelo sistema electroquímico. Este tipo de eléctrodo apresenta boa repetibilidade da área de gota de mercúrio[112] e é

facilmente automatizável; para além disso, tem a possibilidade de poder funcionar como eléctrodo de mercúrio gotejante e como eléctrodo de gota suspensa.

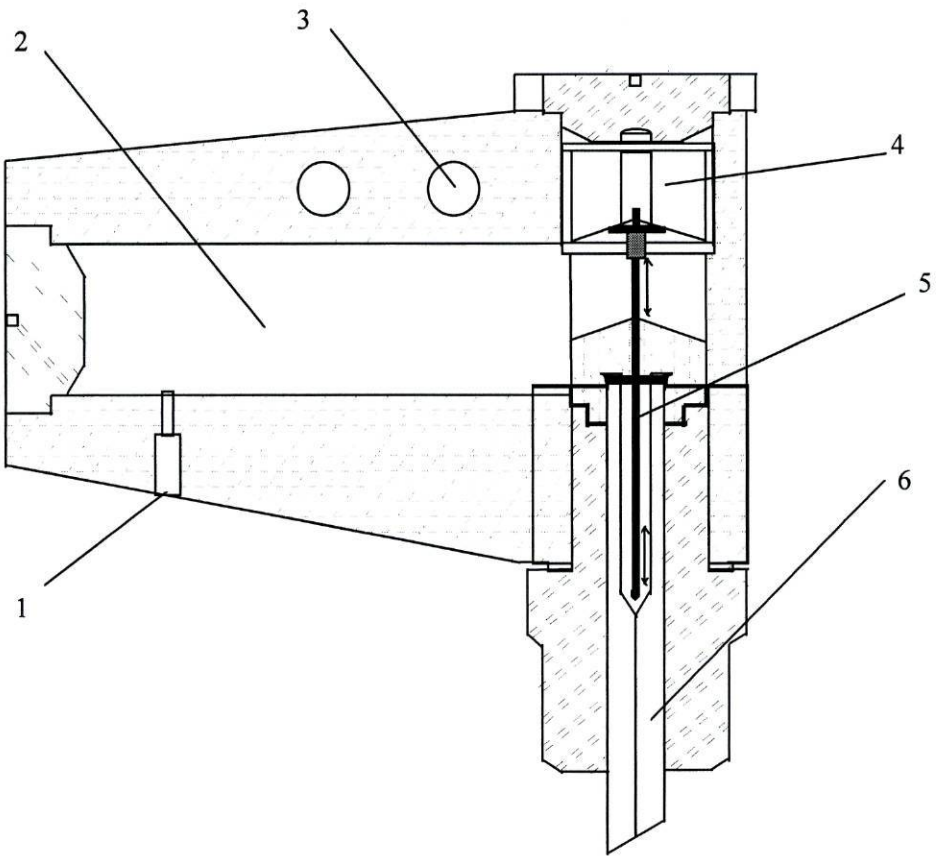


Figura 3.3 - Esquema do eléctrodo de mercúrio multimodo (MME) *Metrohm*[110,111]. **1**- contacto eléctrico para ligação do eléctrodo ao equipamento electroquímico; **2**- depósito de mercúrio; **3**- ligação do gás inerte (azoto) sob pressão; **4**- diafragma que faz movimentar a agulha de aço; **5**- agulha de aço que pode obstruir a passagem de mercúrio pelo capilar; **6**- capilar de vidro.

O progresso a nível instrumental veio, entretanto, sofrer um novo estímulo durante a década de 80 e início dos anos 90 com o aparecimento de equipamentos comerciais incorporando os mais recentes desenvolvimentos a nível de electrónica digital e de computação. Estes equipamentos são, basicamente, sistemas para medições electroquímicas controladas por computador; na figura 3.4 pode observar-se o esquema das partes constituintes de um sistema com estas características fabricado pela *EcoChimie BV*, da marca *Autolab*[113,101].

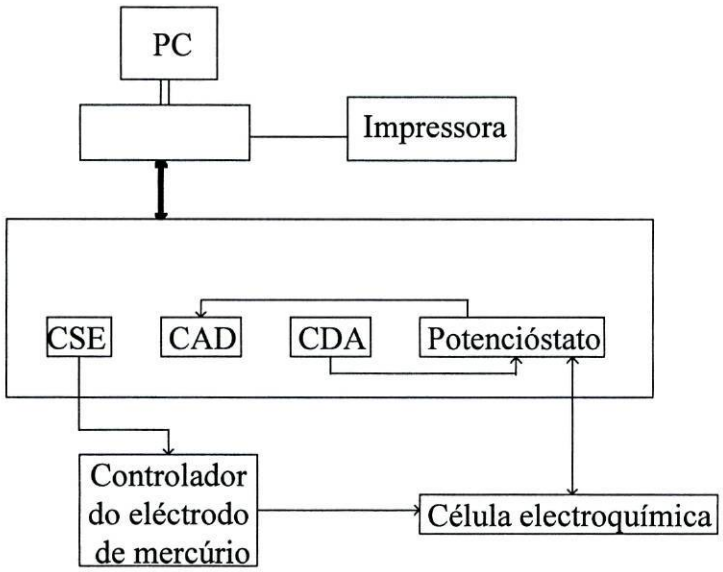
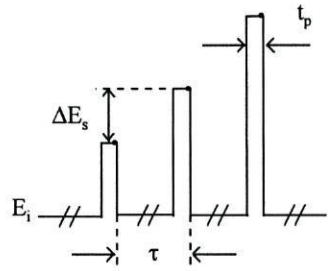
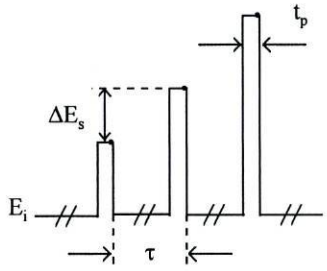
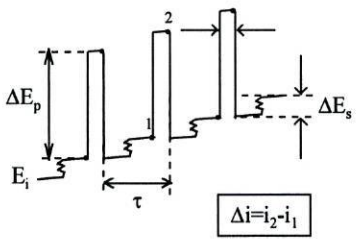
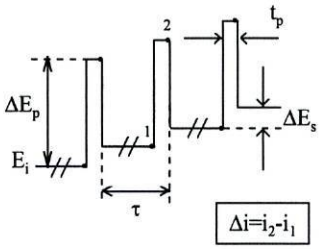
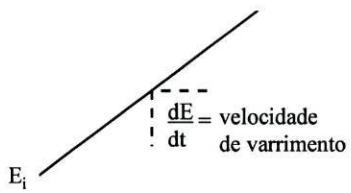
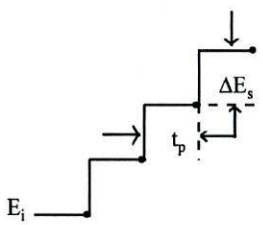
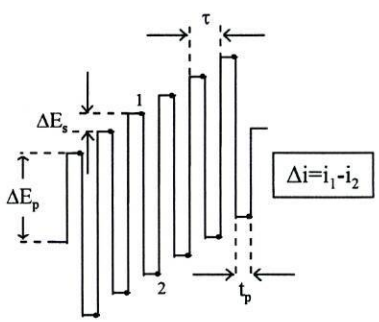


Figura 3.4 - Esquema de um sistema de medição electroquímica controlado por computador. CAD = conversor analógico-digital; CDA = conversor digital - analógico; CSE = controlador de sistemas externos (posto de polarografia, buretas automáticas, etc.).[114]

Nestes sistemas a relação potencial - tempo é gerada numa base digital pelo computador sendo depois convertida num sinal analógico, através de conversores digital - analógico (CDA), e aplicada ao potencióstato. A intensidade de corrente medida é convertida da forma analógica na forma digital, através de conversores analógico - digital(CAD), e fornecida ao computador.

Na tabela 3.2 pode observar-se as formas das relações potencial - tempo e dos respectivos parâmetros experimentais que caracterizam algumas das técnicas de polarografia / voltametria por impulsos mais comuns e de maior aplicação analítica. Pode, igualmente, fazer-se a comparação entre as relações potencial - tempo que são obtidas em equipamentos controlados por computador e em equipamentos analógicos.

Tabela 3.2 - Comparação entre a forma das relações potencial - tempo obtidas em equipamento de polarografia / voltametria analógico e controlado por computador.

Técnica de polarografia/voltametria	**Forma da relação potencial - tempo**	
	Equipamento analógico	**Equipamento controlado por computador**
normal por impulsos		
diferencial por impulsos		
varrimento em escada/linear*		
onda quadrada**		

* A denominação varia consoante a técnica é realizada num equipamento em que a relação potencial-tempo é gerada numa base digital (varrimento em escada) ou através de um gerador analógico (varrimento linear).

** Esta técnica só se tornou habitual em equipamentos de electroquímica controlados por computador pois, embora este tipo de relação potencial-tempo tenha sido desenvolvido por Barker em 1952[115], a complexidade dos circuitos analógicos capazes de gerar este tipo de relação tornava esses equipamentos extremamente complexos e onerosos, só acessíveis a laboratórios muito especializados.

Significado dos símbolos da tabela 3.2:

• os pontos a cheio representam os instantes de medição de intensidade de corrente;

E_i - potencial inicial;

ΔE_s - degrau de potencial entre cada ciclo;

ΔE_p - amplitude dos impulsos;

t_p - intervalo de tempo em que o impulso é aplicado;

τ - intervalo de tempo correspondente ao período de um ciclo.

Conforme se observa na tabela 3.2, as relações potencial - tempo obtidas, em todas as técnicas, com o equipamento controlado por computador o potencial mantém-se sempre constante no tempo e os impulsos correspondem a pontos de descontinuidade nessas relações; para além disso, a amostragem da intensidade de corrente, nessas técnicas, só é realizada algum tempo após a aplicação do potencial. Estas relações potencial - tempo e esta forma de medição da intensidade de corrente apresentam vantagens relativamente às congéneres analógicas na diminuição do efeito da intensidade de corrente capacitiva. A vantagem destas técnicas é, ainda, mais acentuada se forem utilizadas num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa pois, neste caso, a área do eléctrodo é constante durante todo o varrimento de potencial e não existe, por isso, a componente de intensidade de corrente capacitiva resultante do crescimento da gota. Para além destes aspectos, os equipamentos de electroquímica controlados por computador mais modernos apresentam outras vantagens importantes relativamente aos equipamentos analógicos tradicionais, como por exemplo:

(i) controlam automaticamente a experiência, através de "software" apropriado;

(ii) os dados são obtidos sob a forma digital, o que permite o seu rápido armazenamento, visualização e tratamento;

(iii) os dados obtidos podem ser facilmente manipulados por forma a serem rapidamente interpretados;

(iv) a resposta experimental de um dado sistema pode ser facilmente comparada com modelos teóricos, através de simulação digital.

O aspecto mais inovador dos sistemas electroquímicos controlados por computador é, contudo, a sua enorme versatilidade relativamente ao estabelecimento de parâmetros característicos nas várias técnicas por impulsos. Estes equipamentos permitem, alterar parâmetros como o tempo de aplicação de impulso e os instantes em que a amostragem de

intensidade de corrente é realizada, ao contrário do que acontecia nos equipamentos analógicos onde tais parâmetros eram fixos. Como a intensidade de corrente medida num dado instante representa a velocidade do processo de transferência electrónica nesse instante ou seja, a velocidade do processo de oxidação-redução que fornece ou consome electrões na região interfacial (esta suposição pressupõe que a intensidade de corrente medida resulta unicamente do processo de transferência electrónica e que não existe contribuição de fenómenos não faradaicos), então a voltametria por impulsos fornece informação cinética[116]. Como as medições electroquímicas são realizadas da mesma forma, nos mesmos instantes e com a mesma sequência de variação de potencial, a intensidade de corrente medida pode ser utilizada para determinações quantitativas, sendo esta a base analítica da técnica.

A possibilidade de variar parâmetros como o tempo de aplicação de impulso e os instantes em que a amostragem de intensidade de corrente é realizada durante o impulso pode ser explorada para se conseguir distinguir processos de transferência electrónica com base em diferenças na suas constantes de velocidade. Este princípio foi utilizado pela *Metrohm*[110] no equipamento electroquímico 646-VA PROCESSOR, para implementar dois novos modos na técnica diferencial por impulsos: o modo diferencial por impulsos reversível e o modo diferencial por impulsos irreversível[111]. Estes dois modos têm a capacidade de modificar a sensibilidade das respostas de processos de eléctrodo reversíveis e irreversíveis relativamente às respostas obtidas utilizando a técnica diferencial por impulsos na forma habitual. A implementação destes dois novos modos baseia-se na realização de dois períodos de amostragem distintos durante a aplicação de um único impulso e no registo da combinações distintas entre as intensidades de corrente que são medidas nesses dois instantes, consoante se usa o modo reversível ou irreversível. A discussão das bases fundamentais destes dois modos foi realizada por Bard e colaboradores[117]. Recentemente Forster[118] conseguiu mostrar que é possível distinguir a resposta voltamétrica de duas espécies adsorvidas num microeléctrodo de mercúrio com base nas diferentes constantes de velocidade dos seus processos de transferência de carga. Contudo, apesar destes exemplos, a exploração em termos analíticos das novas potencialidades dos equipamentos de electroquímica controlados por computador nesta área permanece, quase completamente, por realizar.

PARTE II

COMPORTAMENTO POLAROGRÁFICO E VOLTAMÉTRICO DAS QUINOXALINAS

O desenvolvimento de novas metodologias de análise polarográfica de espécies orgânicas deverá envolver um conhecimento prévio de alguns aspectos gerais caracterizadores do seu comportamento polarográfico como, por exemplo, qual a reacção de eléctrodo e qual a influência das condições de meio, como o pH e a composição do electrólito de suporte, na resposta polarográfica dessas espécies.

Deste modo, neste capítulo descrevem-se os estudos que foram desenvolvidos no sentido de avaliar a resposta das quinoxalinas em diferentes soluções tampão, que simultaneamente controlavam o pH do meio e serviam como electrólito de suporte, quando submetidas à análise por polarografia / voltametria diferencial por impulsos utilizando o eléctrodo de mercúrio em duas configurações distintas: gotejante e em gota suspensa. A selecção das soluções tampão foi feita por forma a cobrir um intervalo de pH desde a zona ácida até à zona alcalina. Estes estudos tiveram como objectivo principal fixar as condições de meio mais favoráveis para a determinação polarográfica / voltamétrica das quinoxalinas.

Na parte final referem-se os breves estudos realizados por espectrofotometria que tiveram por objectivo a avaliação da estabilidade das soluções aquosas das quinoxalinas que foram estudadas nos ensaios polarográficos/ voltamétricos. Para tal, fez-se o traçado

de espectros das várias soluções de quinoxalinas ao longo de vários dias, no sentido de detectar eventuais alterações nesses espectros.

1- EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

1.1- SOLVENTE E REAGENTES

A água utilizada na preparação das soluções e na lavagem do material foi obtida através de um sistema de purificação, que envolvia a passagem da água da rede de abastecimento público por permutadores iónicos, sendo depois destilada.

Para os estudos polarográficos com diferentes soluções tampão foram preparadas oito soluções de composição simples. O modo de preparação dessas soluções (e o respectivo pH) encontra-se descrito na tabela 1.1.

Tabela 1.1- Soluções tampão utilizadas como electrólito de suporte no estudo polarográfico das quinoxalinas. Reagentes e quantidades utilizadas na preparação das soluções.

Solução tampão	**pH**	**Reagentes e quantidades utilizadas (para 500mL de solução)**
Cloreto de hidrogénio 0,1M	1	Cerca de 4,2mL de solução de cloreto de hidrogénio concentrado (cerca de 12M)
Cloreto de hidrogénio 0,001M em cloreto de sódio 0,1M	3	2,9g de cloreto de sódio e 5mL de solução de cloreto de hidrogénio 0,1M
Tampão acetato 0,1M	4	6,8g de acetato de sódio e adição gota a gota de solução de cloreto de hidrogénio 1M para ajustar o valor de pH
Tampão acetato 0,1M	5	6,8g de acetato de sódio e adição gota a gota de solução de cloreto de hidrogénio 1M para ajustar o valor de pH
Tampão fosfato 0,1M	7	7,1g de hidrogenofosfato de sódio e adição gota a gota de solução de cloreto de hidrogénio 1M para ajustar o valor de pH
Tampão amoniacal 0,1M	9	2,7g de cloreto de amónio e adição gota a gota de solução de hidróxido de sódio 1M para ajustar o valor de pH
Hidróxido de sódio 0,001M em cloreto de sódio 0,1M	11	2,9g de cloreto de sódio e 5mL de solução de hidróxido de sódio 0,1M
Hidróxido de sódio 0,1M	13	2,0g de hidróxido de sódio

Foram utilizados na preparação destas soluções reagentes *Merck* com qualidade p.a.

Todas as quinoxalinas estudadas foram adquiridas comercialmente (*Aldrich*) e foram utilizadas ao longo do trabalho sem purificação adicional. No estado puro, as quinoxalinas adquiridas eram sólidas, com excepção da 2-metilquinoxalina que, à temperatura ambiente, era líquida. Na tabela 1.2 estão indicadas as quinoxalinas que foram estudadas nesta fase, o respectivo grau de pureza dos compostos adquiridos e o modo de preparação das soluções aquosas de partida[1] dessas quinoxalinas. Essas soluções aquosas de partida das quinoxalinas foram preparadas com concentração 10^{-3}M já que a solubilidade em água destas quinoxalinas é pequena, o que não permitiu obter soluções aquosas mais concentradas.

Tabela 1.2- Características gerais das quinoxalinas adquiridas utilizadas neste estudo e quantidades utilizadas na preparação das soluções de partida com concentração 10^{-3}M.

Composto	Grau de pureza	classe *	Quantidades utilizadas de preparação da solução 10^{-3}M (250mL de solução)
Quinoxalina	99%	I	0,0325g dissolvida em água com auxílio de ultra-sons.
2-metilquinoxalina	97%	I	0,0360g dissolvida em água com auxílio de ultra-sons.
2,3-dimetilquinoxalina	97%	I	0,0396g dissolvida em água com auxílio de ultra-sons.
2-hidroxiquinoxalina	99%	II	0,0365g dissolvida em água com auxílio de ultra-sons.
2-metil-3-hidroxiquinoxalina	97%	II	0,0400g em água, adição de 5mL de NaHO 0,1M# e dissolução com auxílio de ultra-sons.
2,3-di-hidroxiquinoxalina	98%	III	0,0405g em água, adição de 5mL de NaHO 0,1M# e dissolução com auxílio de ultra-sons.

*Conforme a divisão em classes definida na parte I na secção 2.2.
#Esta adição serve para aumentar a solubilidade da quinoxalina respectiva, facilitando a sua dissolução completa.

O azoto gasoso utilizado nos ensaios polarográficos tinha qualidade U (*Ar Líquido*) e, antes de borbulhar na célula polarográfica, borbulhava num frasco lavador

[1] Ao longo deste trabalho denomina-se como soluções de partida as soluções preparadas a partir dos compostos puros adquiridos comercialmente e que foram utilizadas ao longo do trabalho como soluções com concentração conhecida.

contendo solvente, com o propósito de saturar a corrente gasosa no solvente utilizado nos ensaios.

O mercúrio utilizado no eléctrodo de trabalho foi purificado no laboratório, através de uma sequência de operações descrita na bibliografia[119] que envolveu sucessivamente: uma filtração prévia do mercúrio a tratar, um tratamento químico do mercúrio com ácido nítrico 3M, a lavagem com água para remover o excesso de ácido nítrico, a secagem do mercúrio e a destilação a pressão reduzida. Foi utilizado um destilador de mercúrio da marca Gallenkamp; a destilação do mercúrio foi repetida três vezes consecutivamente.

1.2- MATERIAL UTILIZADO

A adição de volumes inferiores a 1,00mL das soluções de quinoxalinas directamente na célula polarográfica foi realizada com micropipetas *Gilson*, modelo Pipetman, com possibilidade de ajuste do volume e com capacidade máxima de 0,200mL ou 1,00mL. A célula polarográfica utilizada foi uma célula de vidro *Metrohm*, de parede dupla termostatizável.

1.3-INSTRUMENTAÇÃO

O controlo potenciométrico do pH das soluções tampão utilizadas como electrólito de suporte e outras foi realizado utilizando um milivoltímetro *Beckman*, modelo 4500 Digital pH Meter, ao qual se encontrava ligado um eléctrodo de vidro combinado *Metrohm*.

O controlo de temperatura e a circulação de água pela célula polarográfica foram realizadas através de uma unidade de controlo de temperatura *GFL*, modelo Thermed 5002.

Os ensaios polarográficos foram realizados num sistema de voltametria *Metrohm*, modelo VA Processor 646, que controlava um posto de polarografia *Metrohm*, modelo VA Stand 647; sendo este último constituído por um eléctrodo multimodo de mercúrio (como eléctrodo de trabalho, figura 3.3 da secção 3.2 da parte I), por um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, KCl 3M e por um eléctrodo auxiliar de platina.

Os ensaios espectrofotométricos foram realizados num espectrofotómetro *Shimadzu* UV-VIS-NIR, modelo 3101PC, de feixe duplo, utilizando células espectrofotométricas *Hellman* de quartzo com espessura de 1,001cm.

1.4-CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

1.4.1. ENSAIOS POLAROGRÁFICOS E VOLTAMÉTRICOS

Os ensaios polarográficos e voltamétricos utilizando o varrimento de potencial diferencial por impulsos foram realizados com um volume de electrólito de suporte de 25,00mL, após um período prévio de passagem de azoto de 10min. Para cada electrólito de suporte utilizado começou-se por fazer o respectivo ensaio em branco, que consistiu no registo dos polarogramas e voltamogramas do electrólito, utilizando o eléctrodo de mercúrio multimodo como eléctrodo de mercúrio gotejante ou como eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Após os ensaios em branco adicionava-se, 0,250mL de solução da quinoxalina em estudo e, após um período de passagem de azoto de 2min, registava-se um novo polarograma e o voltamograma da solução resultante (concentração de quinoxalina na célula = $1x10^{-5}$M).

As condições operacionais que foram utilizadas nos ensaios polarográficos e voltamétricos encontram-se descritas na tabela 1.3.

Tabela 1.3- Condições operacionais utilizadas nos ensaios polarográficos e voltamétricos.

	Polarografia	**Voltametria**
Tipo de eléctrodo	eléctrodo de mercúrio gotejante	eléctrodo de mercúrio de gota suspensa
Potencial inicial e final	limite anódico/ limite catódico*	limite anódico/ limite catódico*
Amplitude de impulso	50mV (impulso catódico)	50mV (impulso catódico)
Velocidade do varrimento do potencial	6mV/s	6mV/s
Intervalo de tempo entre impulsos consecutivos	1s (tempo de vida da gota)	1s

* Dependente da composição e pH da solução tampão utilizada como electrólito (tabela 1.4)

Na tabela 1.4 encontram-se registados os valores dos potenciais que limitam o varrimento do potencial na zona anódica e na zona catódica, obtidos através dos ensaios em branco de cada uma das soluções tampão.

Tabela 1.4- Limite anódico e catódico obtidos para as soluções tampão utilizadas como electrólito de suporte.

Solução de electrólito de suporte	pH	Intervalo de potencial (mV)
Cloreto de hidrogénio 0,1M	1	0 a -1200
Cloreto de hidrogénio 0,001M em cloreto de sódio 0,1M	3	+50 a -1350
Tampão acetato 0,1M	5	+100 a -1650
Tampão fosfato 0,1M	7	+100 a -1850
Tampão amoniacal 0,1M	9	0 a -1850
Hidróxido de sódio 0,001M em em cloreto de sódio 0,1M	11	0 a -1900
Hidróxido de sódio 0,1M	13	-100 a -1900

1.4.2. ENSAIOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Os ensaios espectrofotométricos foram realizados com soluções $2x10^{-5}$M para todas as quinoxalinas estudadas. Essas soluções foram obtidas por diluição de 1,00mL das soluções 10^{-3}M de partida a 50,0mL. O espectro de absorção U.V. das quinoxalinas foi obtido usando na célula de referência água destilada.

A evolução dos espectros das soluções de quinoxalinas foi acompanhada durante cerca de um mês, através do traçado regular dos espectros das soluções durante esse período. As condições operacionais típicas utilizadas no traçado dos espectros encontram-se descritas na tabela 1.5.

Tabela 1.5- Condições operacionais utilizadas nos ensaios espectrofotométricos.

Tipo de célula:	de quartzo com espessura interna de 1,001cm
Comprimento de onda inicial:	500nm
Comprimento de onda final:	200nm
Velocidade de varrimento:	100nm/min

2- RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. ENSAIOS POLAROGRÁFICOS E VOLTAMÉTRICOS

Com estes ensaios procurou-se fazer a caracterização das respostas polarográficas e voltamétricas das quinoxalinas num conjunto de soluções tampão com diferentes valores de pH, em relação, principalmente, ao efeito dessas soluções sobre o potencial do pico (E_p) e sobre a intensidade de corrente do pico (i_p). Os resultados obtidos permitiram verificar que o comportamento das diferentes quinoxalinas se distingue em função das classes a que essas quinoxalinas pertencem, conforme a classificação que foi estabelecida na secção 2.2 na parte I. Desta forma a apresentação dos resultados será subdividida em três partes, em função da classe em que se inserem as quinoxalinas que estão a ser estudadas. No final apresenta-se um quadro global em que se resume os comportamentos polarográficos e voltamétricos essenciais observados com as diferentes quinoxalinas.

2.1.1 CLASSE DAS QUINOXALINAS (CLASSE I)

Pertencentes a esta classe foram estudadas a quinoxalina, a 2-metilquinoxalina e a 2,3-dimetilquinoxalina. O comportamento polarográfico e voltamétrico destas quinoxalinas não segue um perfil de variação simples com a variação do pH das soluções tampão utilizadas como electrólito de suporte. Nas figuras 2.1 e 2.2 representam-se, respectivamente, os polarogramas e os voltamogramas obtidos na análise da solução de

2,3-dimetilquinoxalina, como exemplo do comportamento polarográfico e voltamétrico observado para estas três quinoxalinas. Conforme se verifica, o processo de redução destas quinoxalinas não tem uma interpretação simples, uma vez que a resposta polarográfica e voltamétrica destes compostos varia acentuadamente consoante o pH do electrólito de suporte. Assim, pode observar-se que na redução da 2,3-dimetilquinoxalina surgem três picos bem distintos em HCl 0,1M, situando-se o pico mais catódico próximo da zona de libertação do hidrogénio. As duas primeiras ondas tendem a fundir-se à medida que o pH aumenta e, em tampão acetato 0,1M, pH=4, já só se observam dois picos. Em tampão fosfato 0,1M, pH=7, e nos outros tampões com valores de pH superiores a 7, só se observa o aparecimento de um pico bem definido e bastante intenso, desaparecendo o pico que surgia próximo da zona de libertação do hidrogénio.

A forma como o potencial dos picos (E_p) e a intensidade de corrente do picos (i_p) varia com o pH, para as soluções tampão ensaiadas pode ser observada na figura 2.3 (ensaios polarográficos) e na figura 2.4 (ensaios voltamétricos). Nessas figuras verifica-se que o potencial de pico torna-se mais catódico com o aumento de pH, tendo-se obtido o mesmo tipo de variação nos ensaios polarográficos e voltamétricos. Para além disso, consegue-se distinguir claramente duas zonas de variação de potencial de pico com o pH, com declives distintos: as zonas entre pH=1 e 5 e entre pH=5 e 13 (tabela 2.1). De notar ainda que as três quinoxalinas estudadas têm potenciais de pico característicos ligeiramente diferentes uns dos outros e que essas diferenças se mantêm aproximadamente constantes em todos as soluções tampão estudadas.

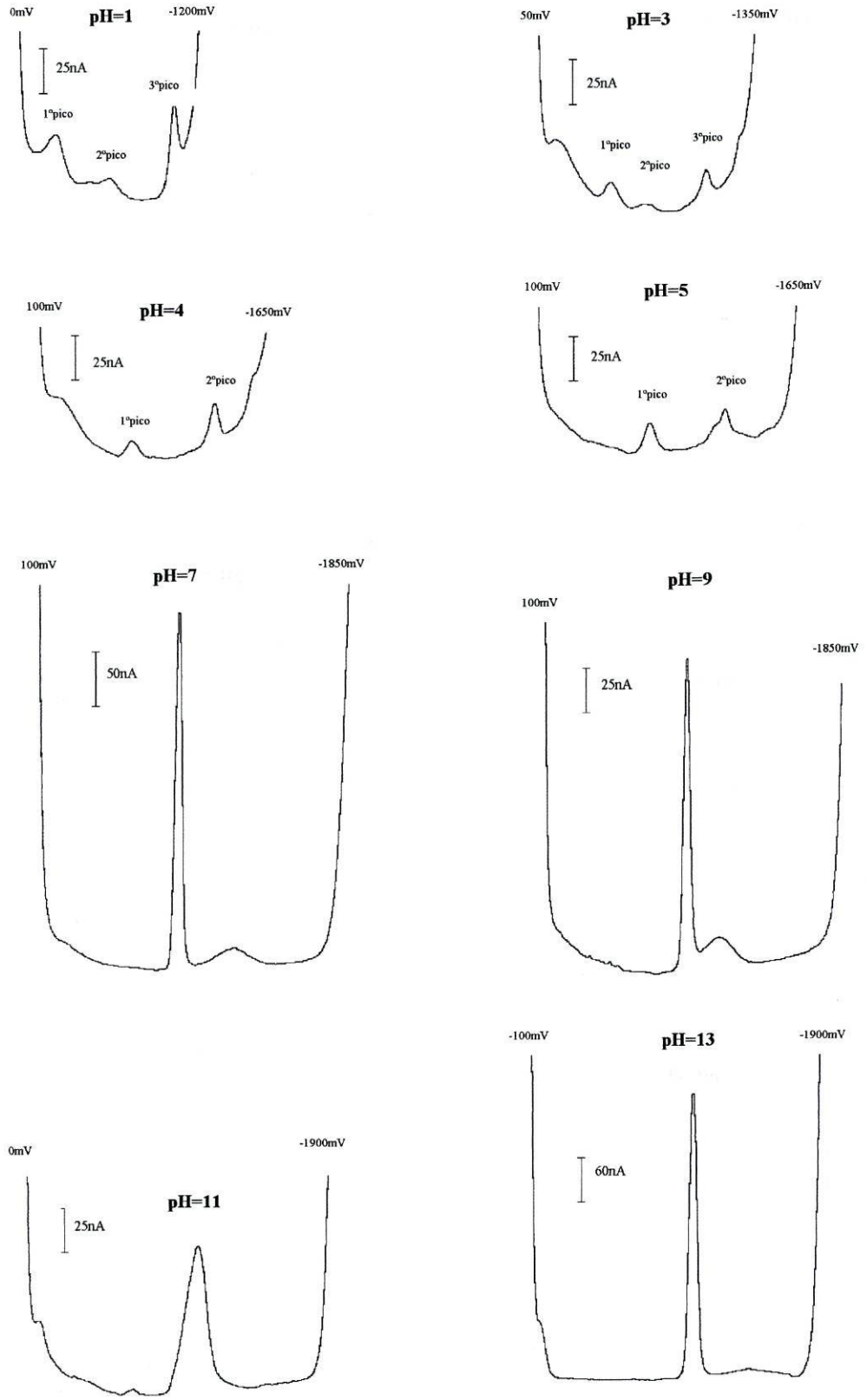


Figura 2.1- Efeito do pH nos polarogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$M de 2,3-dimetilquinoxalina nas várias soluções tampão estudadas.

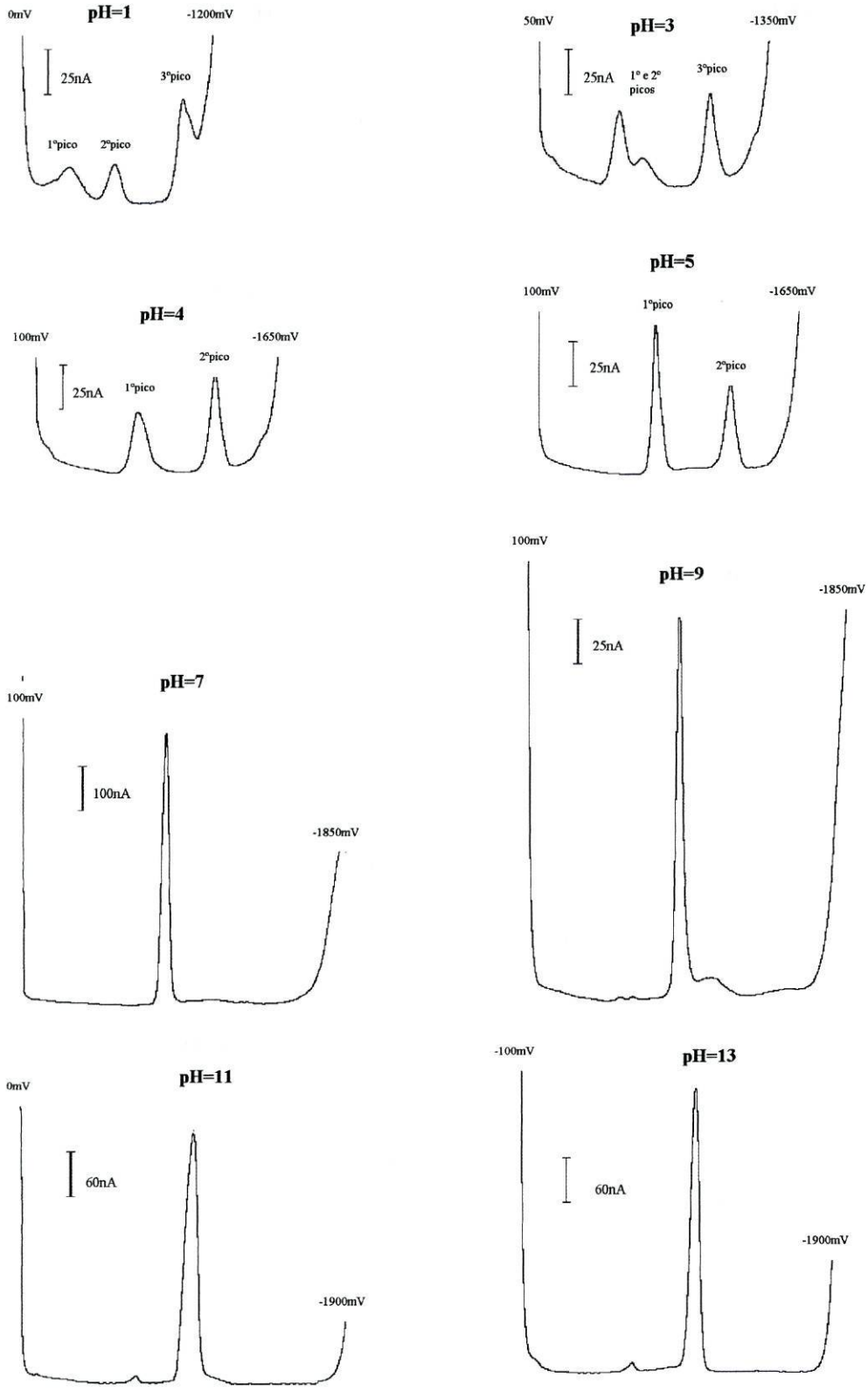


Figura 2.2- Efeito do pH nos voltamogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$M de 2,3-dimetilquinoxalina nas várias soluções tampão estudadas.

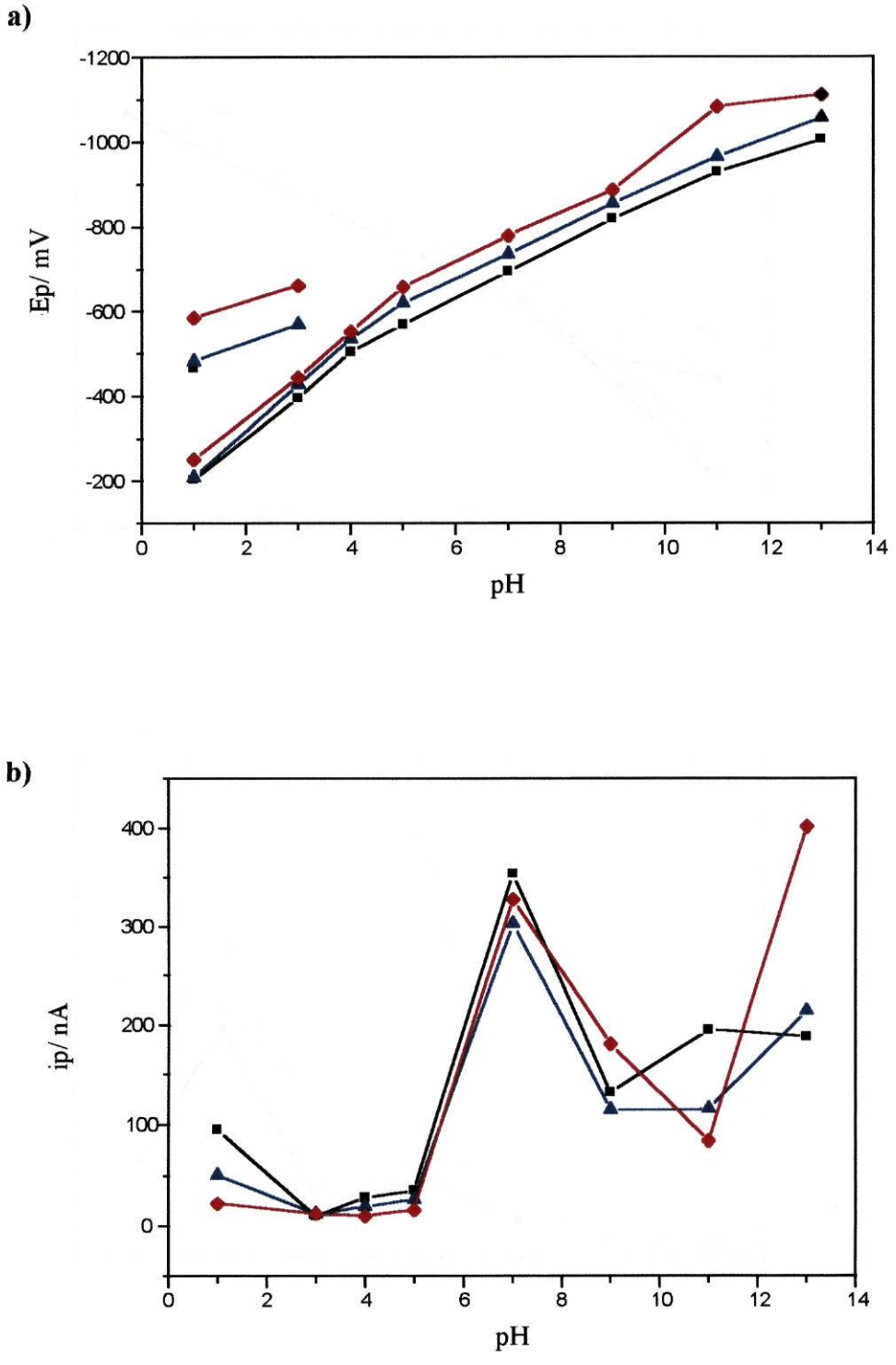


Figura 2.3- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da quinoxalina (■), da 2-metilquinoxalina (▲) e da 2,3-dimetilquinoxalina (◆) nos ensaios realizados por polarografia diferencial por impulsos.

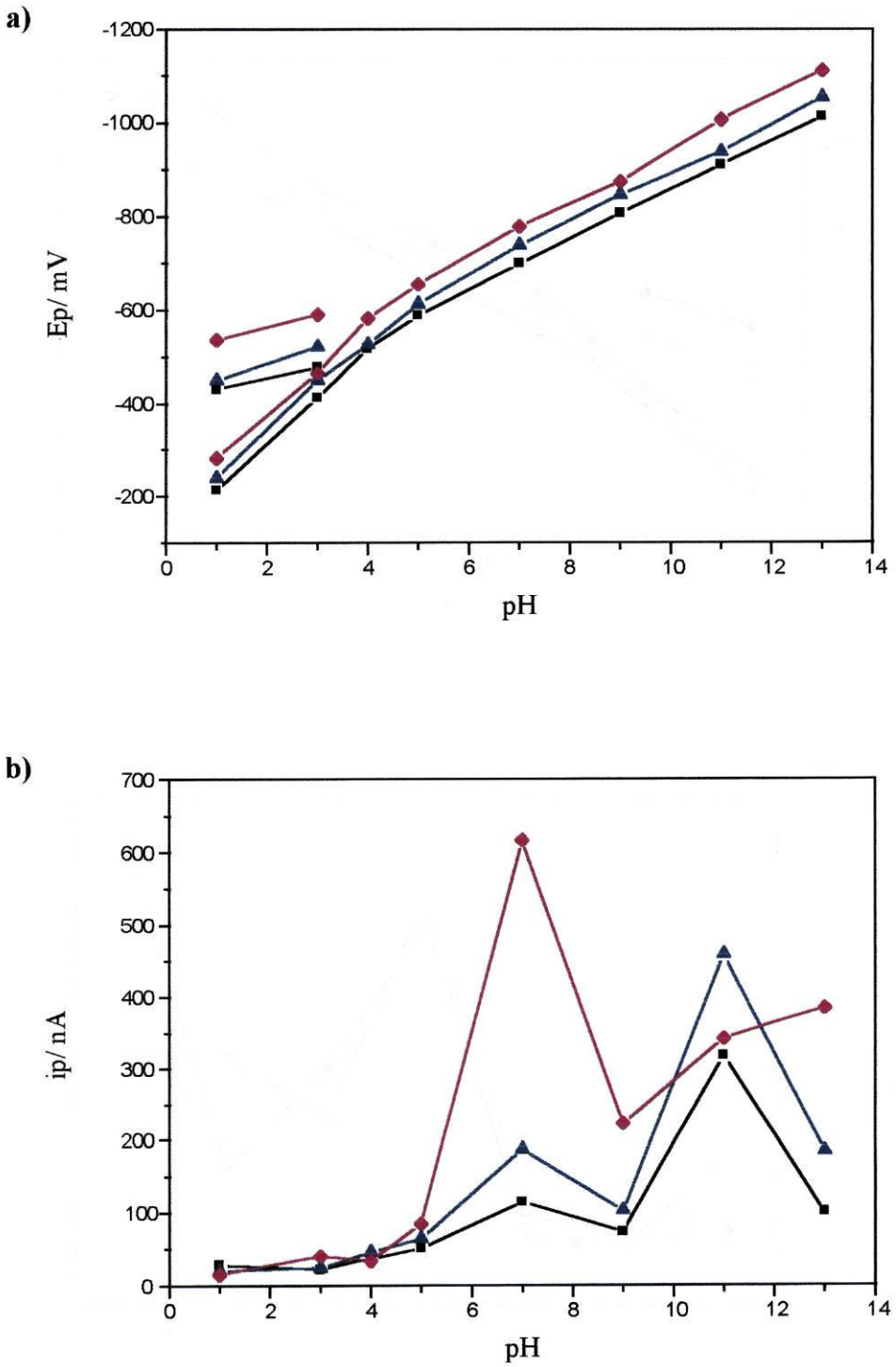


Figura 2.4- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da quinoxalina (■), da 2-metilquinoxalina (▲) e da 2,3-dimetilquinoxalina (◆) nos ensaios realizados por voltametria diferencial por impulsos num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

Relativamente à variação da intensidade de corrente do pico nas diferentes soluções tampão observa-se, nas figuras 2.3 e 2.4, que o valor da intensidade de corrente do pico é altamente dependente da solução tampão utilizada, existindo uma tendência para os sinais serem significativamente maiores em meio neutro ou alcalino, o que se verifica quer nos ensaios polarográficos, quer nos voltamétricos.

Tabela 2.1 - Valores dos declives obtidos nas representações do potencial de pico (Ep) com o pH, para as três quinoxalinas estudadas.

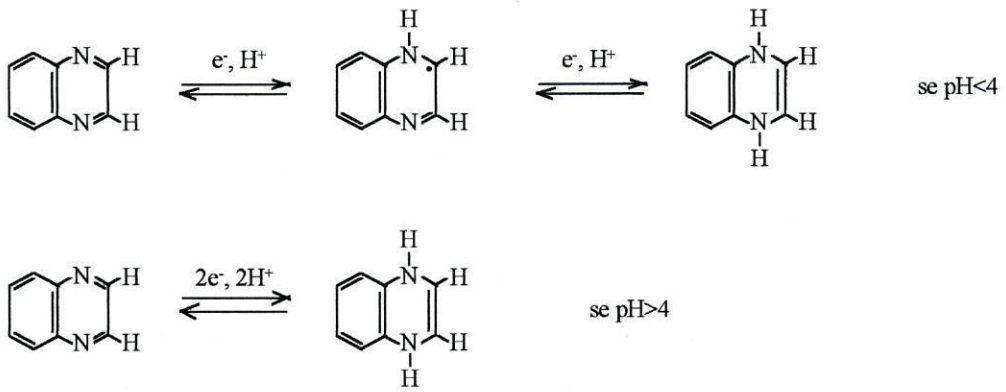
Composto	Intervalo de pH	declive (polarografia)	declive (voltametria)
quinoxalina	1-5	93,5	95,1
	5-13	55,3	53,0
2-metilquinoxalina	1-5	103,9	92,9
	5-13	55,0	54,1
2,3-dimetilquinoxalina	1-5	101,7	94,8
	5-13	56,2*	57

* Não foi considerado o ponto correspondente ao potencial de pico obtido com a solução de electrólito de suporte com pH=11.

De uma forma geral, o comportamento observado para a redução destas três quinoxalinas coincide com o comportamento encontrado por Strier e Cavagnol[120] no estudo que realizaram acerca do processo de redução da quinoxalina no eléctrodo de mercúrio gotejante. Estes investigadores admitiram que os compostos resultantes da redução deste tipo de quinoxalinas eram as respectivas 1,4-di-hidroquinoxalinas, tendo proposto um processo de redução que variava conforme o pH do meio. Em meio fortemente ácido admitiram que a redução tinha lugar através de dois passos sucessivos envolvendo a troca de um electrão, o que significa que como fase intermédia se formava um radical. A formação e a estabilidade desse radical não é surpreendente, já que este tipo de comportamento tem sido encontrado em diversas situações, na redução de compostos heterocíclicos possuindo sistemas conjugados de ligações duplas, quando os heteroátomos no anel são átomos de oxigénio ou de azoto[121,122]. Por exemplo, Wiberg e Lewis[123] avaliaram a reactividade de alguns radicais resultantes da redução

de compostos heterocíclicos contendo átomos de azoto no anel e, no caso da quinoxalina concluíram que o radical resultante do primeiro passo de redução é razoavelmente estável. Esse desdobramento do processo de redução em dois passos envolvendo cada um a troca de um electrão só foi observado por Strier e Cavagnol em meio fortemente ácido. Para soluções com pH igual a quatro ou superior, a redução ocorria através de um processo único envolvendo dois electrões. Estes investigadores referem-se, também, ao pico observado na zona de libertação do hidrogénio, sugerindo que essa onda seja resultante de um abaixamento da sobretensão na libertação do hidrogénio, catalisada pela presença do produto de redução da quinoxalina, a 1,4-di-hidroquinoxalina. O facto dessa onda só surgir em condições de meio ácidas foi justificado por aqueles investigadores admitindo que esse efeito catalítico era induzido pela 1,4-di-hidroquinoxalina na forma protonada, ou seja, pelo ião 1,4-di-hidroquinoxalínio, que só existe em meio ácido. Este fenómeno de abaixamento de sobretensão na libertação de hidrogénio é, também, típico de muitos compostos heterocíclicos que possuem átomos de azoto no anel[121].

A reacção de eléctrodo que é proposta por Strier e Cavagnol[120] para a redução electroquímica destas quinoxalinas é a seguinte:



Estes investigadores admitem que o processo de redução a pH<4 não é completamente reversível, mas que para valores de pH>4 o processo passa a ocorrer reversivelmente.

De salientar que a existência de duas zonas distintas de variação do potencial de pico com o pH, que se podem observar nas figuras 2.3 e 2.4, não foi assinalada por Strier e Cavagnol; no entanto, uma variação deste tipo foi observada por Wasa e Musha[77], num trabalho publicado posteriormente ao trabalho de Strier e Cavagnol, onde estudaram a variação do potencial de meia-onda polarográfico da 2-metilquinoxalina e a 2,3-dimetilquinoxalina com o pH.

Os resultados que foram obtidos neste trabalho, em que se utilizou o varrimento de potencial na forma diferencial por impulsos e os resultados obtidos por Strier e Cavagnol e por Wasa e Musha, que utilizaram a técnica polarográfica clássica, distinguem-se, principalmente, pela enorme dependência na intensidade de corrente do pico com o pH que se obteve, enquanto que nos trabalhos publicados por aqueles autores surge referido que a intensidade de corrente limite de difusão não varia praticamente com o pH, nem com a composição da solução utilizada como electrólito de suporte. Estas diferenças de comportamento podem encontrar explicação no facto de na técnica de varrimento de potencial por impulsos a amostragem da intensidade de corrente, durante a aplicação do impulso, só ocorrer num período muito curto, imediatamente antes do fim do impulso. Desta forma, o sinal analítico que se obtém através desta técnica é altamente dependente da cinética do processo de eléctrodo[117]; para além deste aspecto, também, a existência de fenómenos de adsorção podem contribuir para um abaixamento da concentração da espécie electroactiva em torno do eléctrodo e para um acentuado aumento da sua concentração no eléctrodo[124]. A discussão acerca da forma como estes dois factores podem influenciar os resultados obtidos através das técnicas de varrimento de potencial por impulsos irá ser abordada na parte final desta tese (Parte V).

2.1.2 Classe das hidroxiquinoxalinas (classe II)

Pertencentes a esta classe foram estudadas a 2-hidroxiquinoxalina e a 2-hidroxi-3-metilquinoxalina. Ao contrário do que se verifica no caso das quinoxalinas, o comportamento polarográfico e voltamétrico destas hidroxiquinoxalinas não se altera tanto nas várias condições de pH ensaiadas. Nas figuras 2.5 e 2.6 pode observar-se que o processo de redução destas hidroxiquinoxalinas faz surgir um único pico em todas as condições de pH ensaiadas, mantendo-se o mesmo tipo de resposta polarográfica e voltamétrica nas soluções tampão cujo pH é igual ou inferior a nove. Para as soluções tampão cujo pH é maior que nove, o pico obtido é largo e mal definido. De salientar, também, o comportamento diferenciado que é possível observar entre as respostas polarográficas e voltamétricas. Enquanto que nos ensaios polarográficos se obtêm picos bem definidos, nos ensaios voltamétricos similares os picos obtidos são mais largos, aparentando a existência de dois processos de eléctrodo distintos parcialmente

sobrepostos; este efeito, contudo, vai-se atenuando à medida que o pH do meio vai aumentando, conforme se pode observar na figura 2.6.

O efeito do pH sobre os valores de potencial de pico (Ep) e os valores da intensidade de corrente do pico (ip), para estas duas hidroxiquinoxalinas, pode ser observado na figura 2.7 (ensaios polarográficos) e na figura 2.8 (ensaios voltamétricos). Nestas figuras pode observar-se que o potencial do pico se torna mais negativo à medida que o pH aumenta, observando-se o mesmo tipo de variação quer nos ensaios polarográficos, quer voltamétricos. A variação de Ep com o pH apresenta um comportamento linear, encontrando-se os valores dos respectivos declives, obtidos através da regressão linear dos pontos correspondentes à variação entre pH=1 e 9, na tabela 2.2. Para valores de pH superiores a nove as respostas polarográficas e voltamétricas alteram-se acentuadamente e o declive da representação anterior varia. Tal comportamento poderá ser explicado pela desprotonação destas hidroxiquinoxalinas a qual, atendendo a que o valor das constantes de acidez (pKa) é cerca de nove[10], ocorre para valores de pH de cerca de nove e pode ser responsável pela alteração observada no processo de redução destes compostos no eléctrodo de mercúrio. De notar que as duas hidroxiquinoxalinas estudadas apresentam potenciais de pico característicos afastados cerca de 110mV, para as mesmas condições de meio, em todo o intervalo de pH testado. Essa diferença é, em geral, suficiente para se obter resolução dos picos correspondentes à redução da 2-hidroxiquinoxalina e à redução da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina, através da técnica de varrimento de potencial na forma diferencial por impulsos, sem que ocorra uma acentuada interferência de um pico no outro.

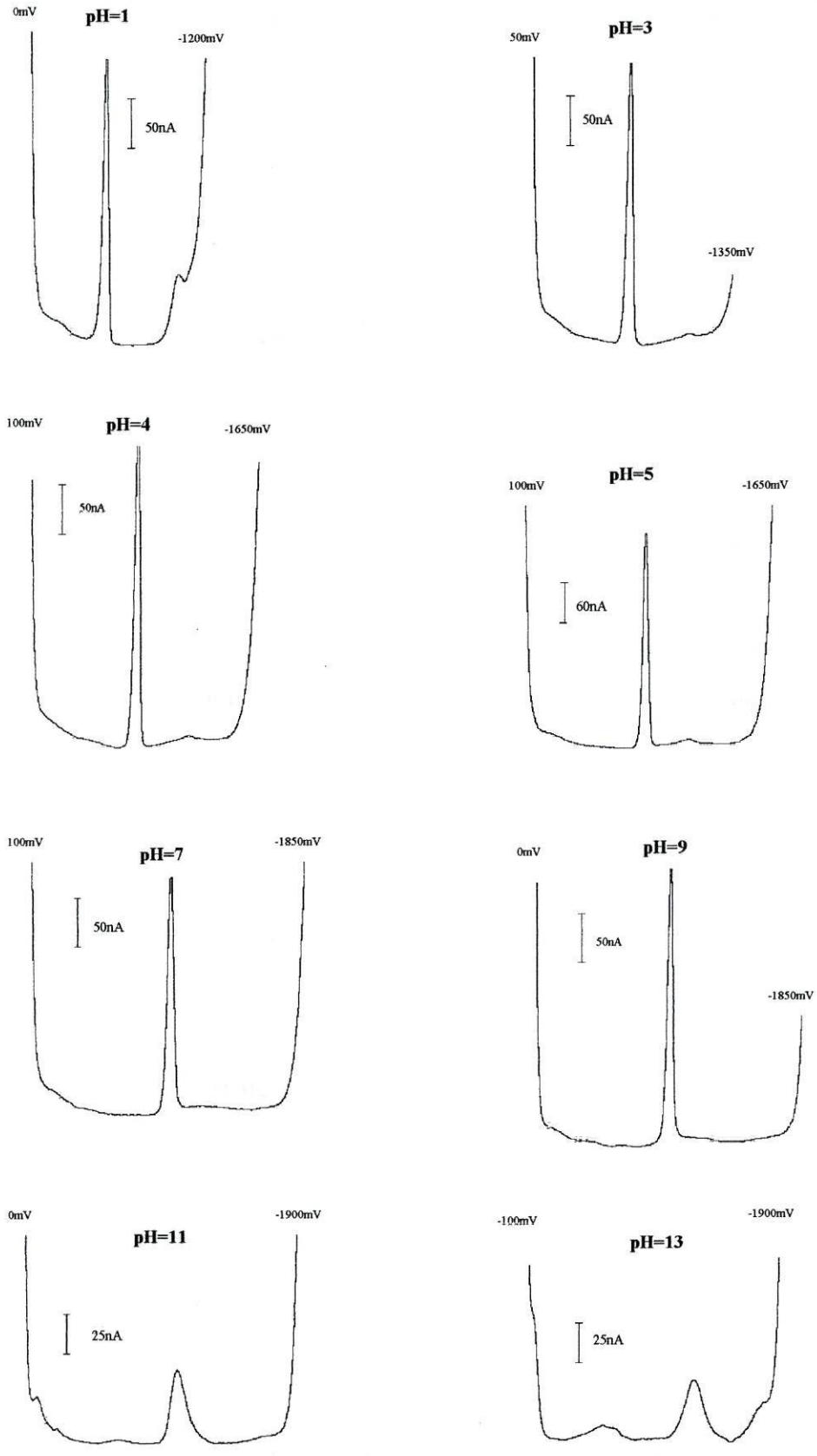


Figura 2.5- Polarogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$M de 2-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH.

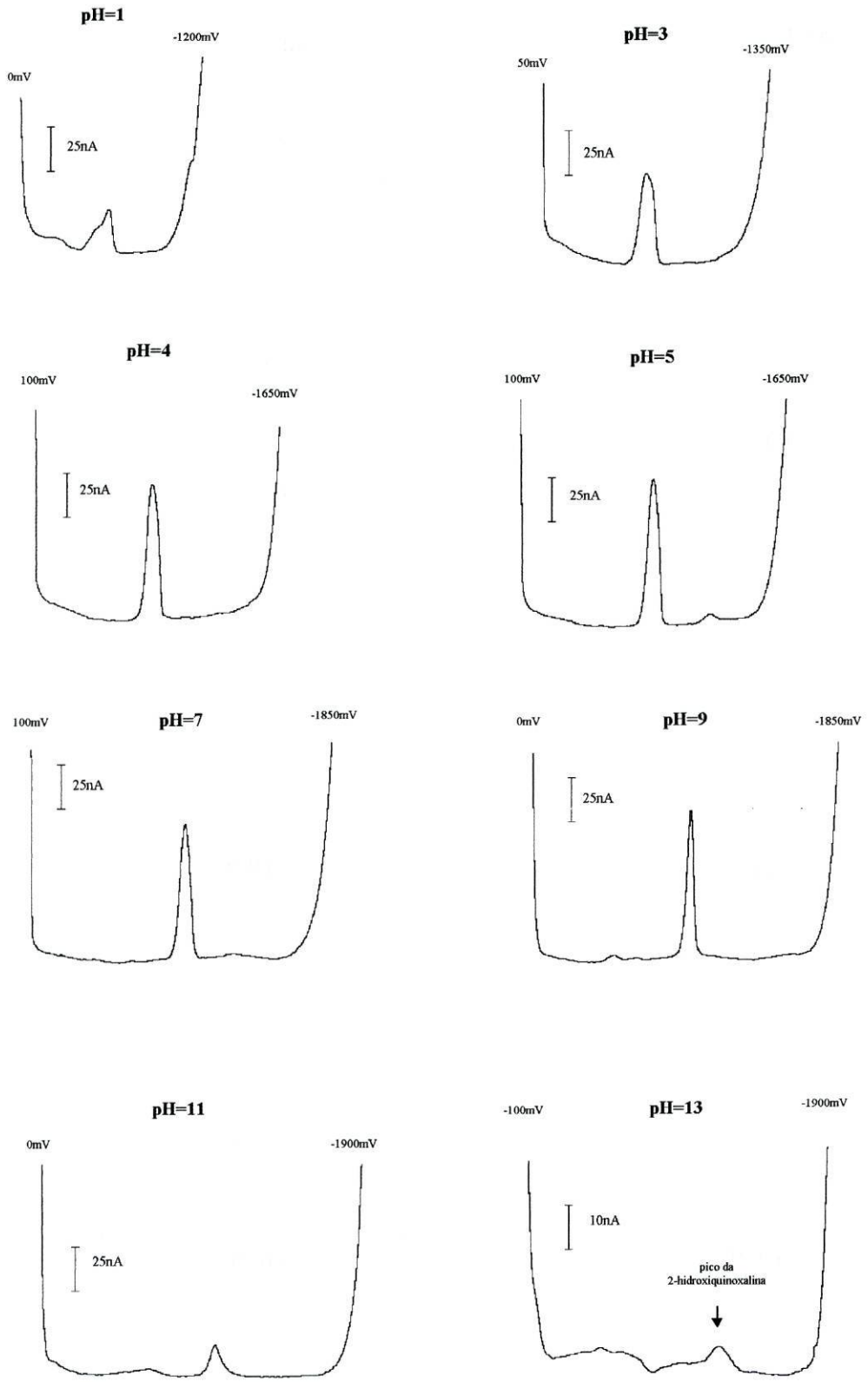


Figura 2.6- Voltamogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$M de 2-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH.

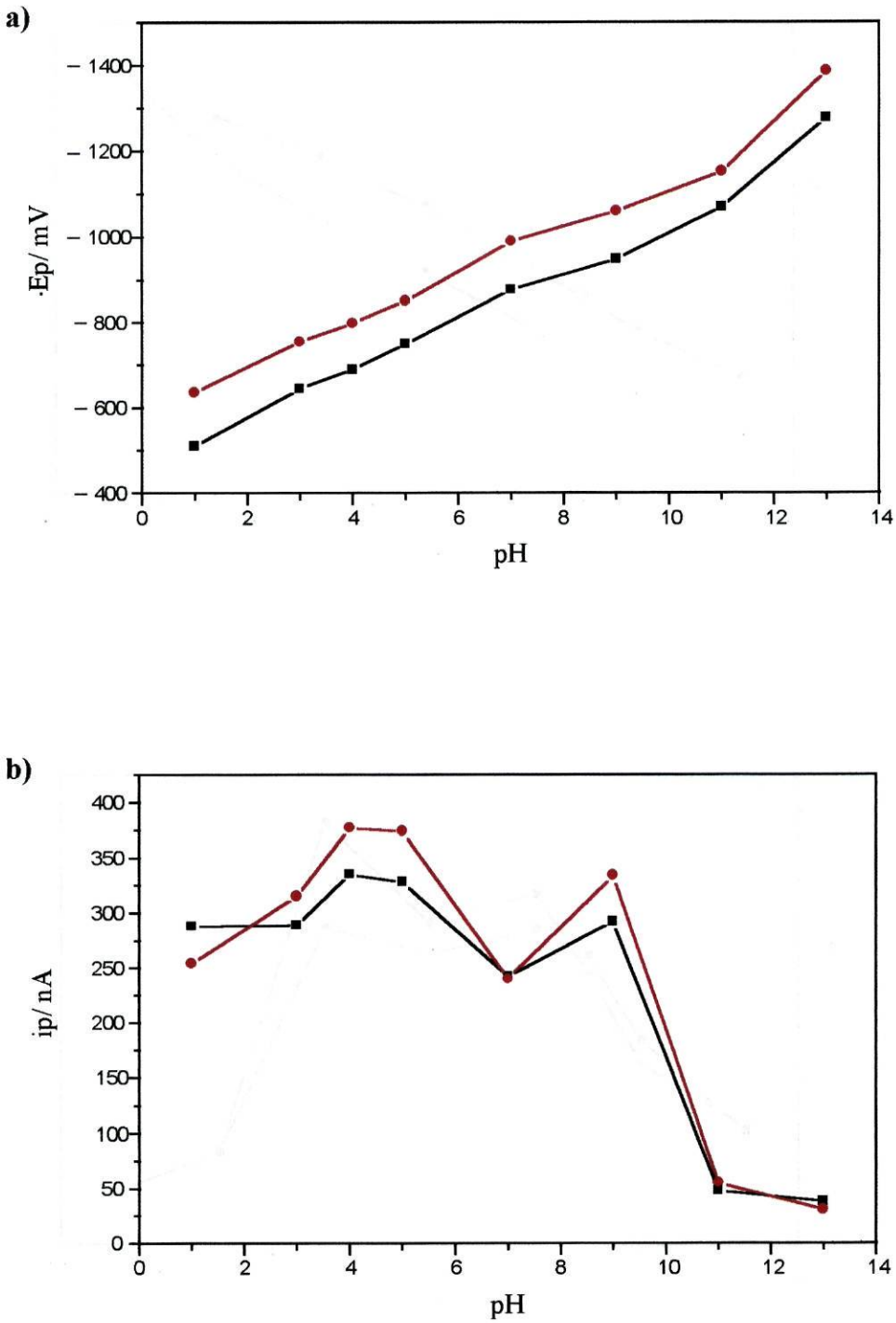


Figura 2.7- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2-hidroxiquinoxalina (■) e da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina (●) nos ensaios realizados por polarografia diferencial por impulsos.

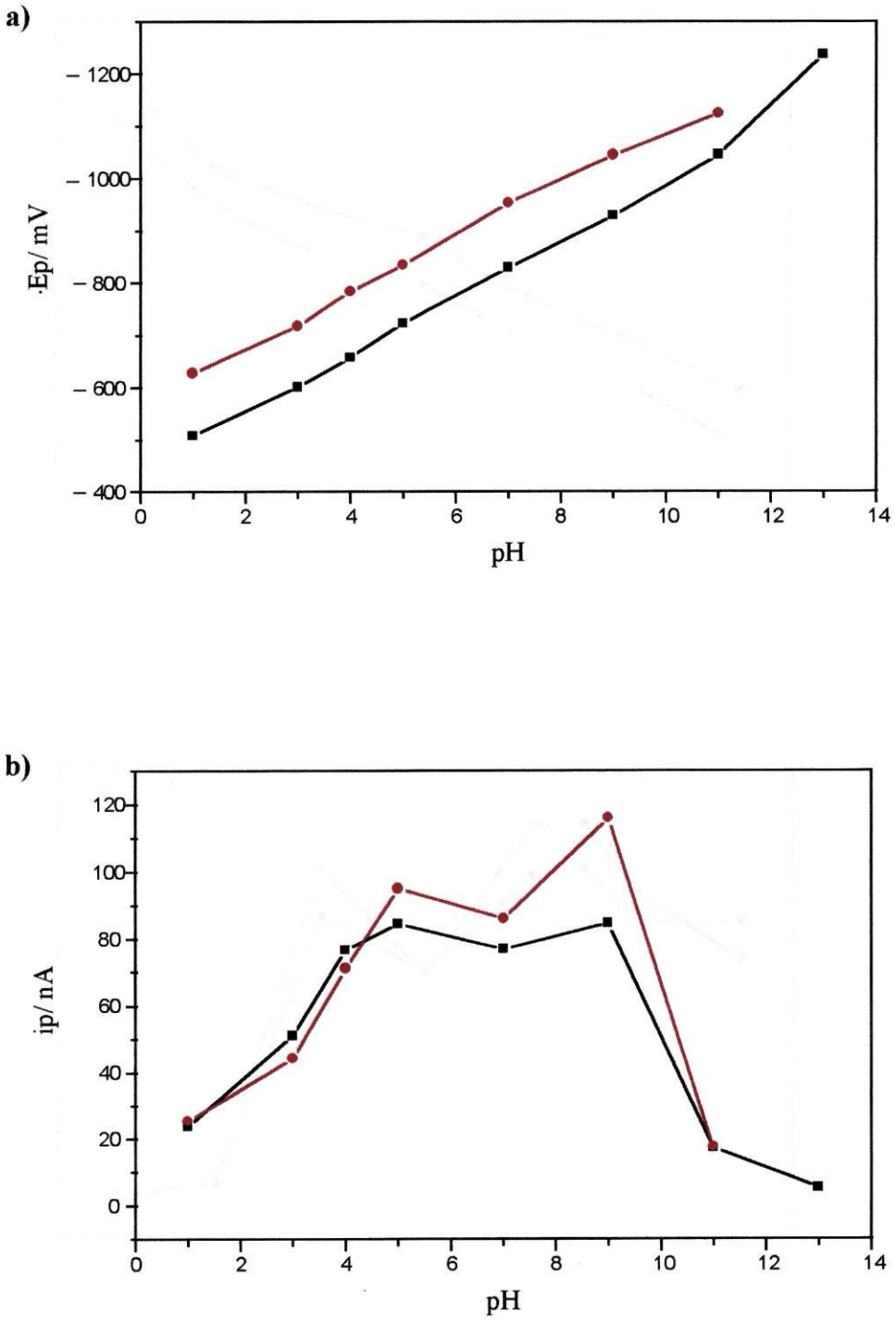


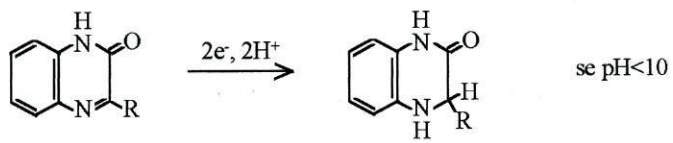
Figura 2.8- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2-hidroxiquinoxalina (■) e da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina (●) nos ensaios realizados por voltametria diferencial por impulsos num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

Tabela 2.2- Valores dos declives obtidos nas representações do potencial de pico (Ep) com o pH, para as duas hidroxiquinoxalinas estudadas.

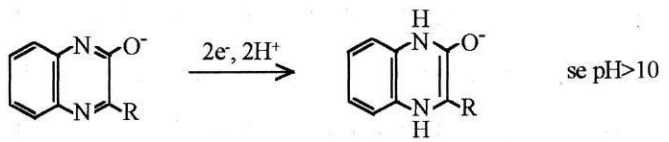
Composto	Intervalo de pH	declive (polarografia)	declive (voltametria)
2-hidroxiquinoxalina	1-9	55,5	54,1
2-hidroxi-3-metilquinoxalina	1-5	54,5	51,1

Relativamente à variação da intensidade de corrente do pico nas diferentes soluções tampão estudadas observa-se, nas figuras 2.7 e 2.8, que esse valor depende da solução tampão utilizada na determinação polarográfica ou voltamétrica. No caso das determinações voltamétricas verifica-se que existe uma certa estabilização em torno de um valor máximo de intensidade de corrente do pico para as soluções tampão cujo valor de pH se encontra no intervalo entre 4 e 9; no caso das determinações polarográficas os valores de intensidade de corrente do pico não seguem nenhuma tendência monótona com a variação de pH no intervalo de pH entre 1 e 9, variando ligeiramente conforme se altera a solução tampão em estudo.

Ao contrário do que acontece com o mecanismo de redução das quinoxalinas no eléctrodo de mercúrio, para o qual é possível encontrar vários trabalhos publicados que abordam esse assunto, o mecanismo de redução das hidroxiquinoxalinas no eléctrodo de mercúrio não tem merecido tanta atenção e o conjunto de trabalhos que foi possível encontrar sobre o assunto foi muito restrito[125,82,126]. O mecanismo para a redução das hidroxiquinoxalinas que é proposto por Wasa e colaboradores[82] pode ser representado da seguinte forma:



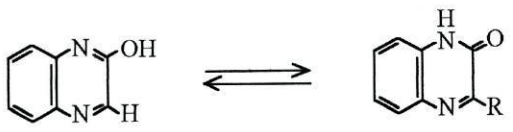
se pH<10



se pH>10

Neste mecanismo existem dois aspectos que merecem saliência: o primeiro, é a representação das hidroxiquinoxalinas sob a forma das respectivas quinoxalinonas; o segundo, é a simplicidade do mecanismo de eléctrodo que é proposto, que não permite explicar a irreversibilidade do processo observada experimentalmente.

Relativamente ao primeiro aspecto existem, efectivamente, vários estudos que mostram que, em solução aquosa, se pode estabelecer o equilíbrio tautomérico que se representa a seguir:



I II

Sendo a forma II largamente predominante, pelo que a representação mais exacta destas hidroxiquinoxalinas deverá ser a forma II, correspondendo à estrutura das quinoxalinonas[127,128,129].

Relativamente ao mecanismo de redução das hidroxiquinoxalinas que é proposto por Wasa e colaboradores, são estes mesmos investigadores que questionam a sua validade, pois observaram experimentalmente que o processo de redução electroquímico era irreversível[82] e consideram que a partir do esquema de redução simples que propõem, não é possível encontrar justificação para essa irreversibilidade. Admitem como hipótese, embora não tenham realizado trabalho experimental no sentido de a confirmar, que o mecanismo de redução no eléctrodo possa ser explicado através de um processo de transferência electrónica reversível envolvendo dois electrões, seguido de uma transformação química muito rápida e irreversível do produto formado no eléctrodo.

Um dos aspectos mais inesperados nestes resultados foram as diferenças na forma dos picos obtidos nos ensaios realizados utilizando o eléctrodo de mercúrio gotejante (ensaios polarográficos) e o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (ensaios voltamétricos). No primeiro caso, conforme se observa na figura 2.5, os picos são bem definidos e estreitos, no segundo caso os picos são largos e, em meio ácido é mesmo possível distinguir a existência de dois picos sobrepostos. Estas observações

experimentais podem ser explicadas pela existência de fenómenos de adsorção das hidroxiquinoxalinas no eléctrodo de mercúrio associados ao processo de difusão que, naturalmente, são mais acentuados no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, visto não haver renovação da gota ao longo do varrimento de potencial. Esses fenómenos de adsorção podem provocar o aparecimento de um pré-pico de adsorção, antes do pico correspondente ao processo de difusão. A discussão da influência da adsorção na resposta voltamétrica e polarográfica das hidroxiquinoxalinas irá ser abordada na parte final desta tese (Parte V).

2.1.3 Classe das di-hidroxiquinoxalinas (classe III)

O único composto desta classe é a 2,3-di-hidroxiquinoxalina. O comportamento polarográfico e voltamétrico deste composto é bastante diferente do que foi observado para as quinoxalinas (classe I) e hidroxiquinoxalinas (classe II). Nas figuras 2.9 e 2.10 pode observar-se que o processo de redução da 2,3-di-hidroxiquinoxalina faz surgir um único pico que se situa numa zona de potencial próxima do início da zona de libertação de hidrogénio. A intensidade de corrente do pico que se obtém nos ensaios polarográficos e voltamétricos é bastante elevada quando se utiliza HCl 0,1M como electrólito de suporte. Nos outros tampões estudados a intensidade de corrente é muito menor e em NaHO 0,1M, pH=13, o sinal é dificilmente distinguível uma vez que surge parcialmente sobreposto com o sinal correspondente à libertação de hidrogénio.

O efeito do pH sobre os valores de potencial de pico (Ep) e os valores de intensidade de corrente de pico (ip) para a 2,3-di-hidroxiquinoxalina pode ser observado na figura 2.11 (ensaios polarográficos) e na figura 2.12 (ensaios voltamétricos). Nestas figuras observa-se que à medida que o pH vai aumentando o potencial de pico vai-se tornando mais catódico. A evolução do potencial do pico com o pH é aproximadamente linear, se se abstrair o comportamento anómalo que é observado com a solução tampão fosfato 0,1M, com pH=7. O valor do declive da representação do Ep em função do pH encontra-se na tabela 2.3.

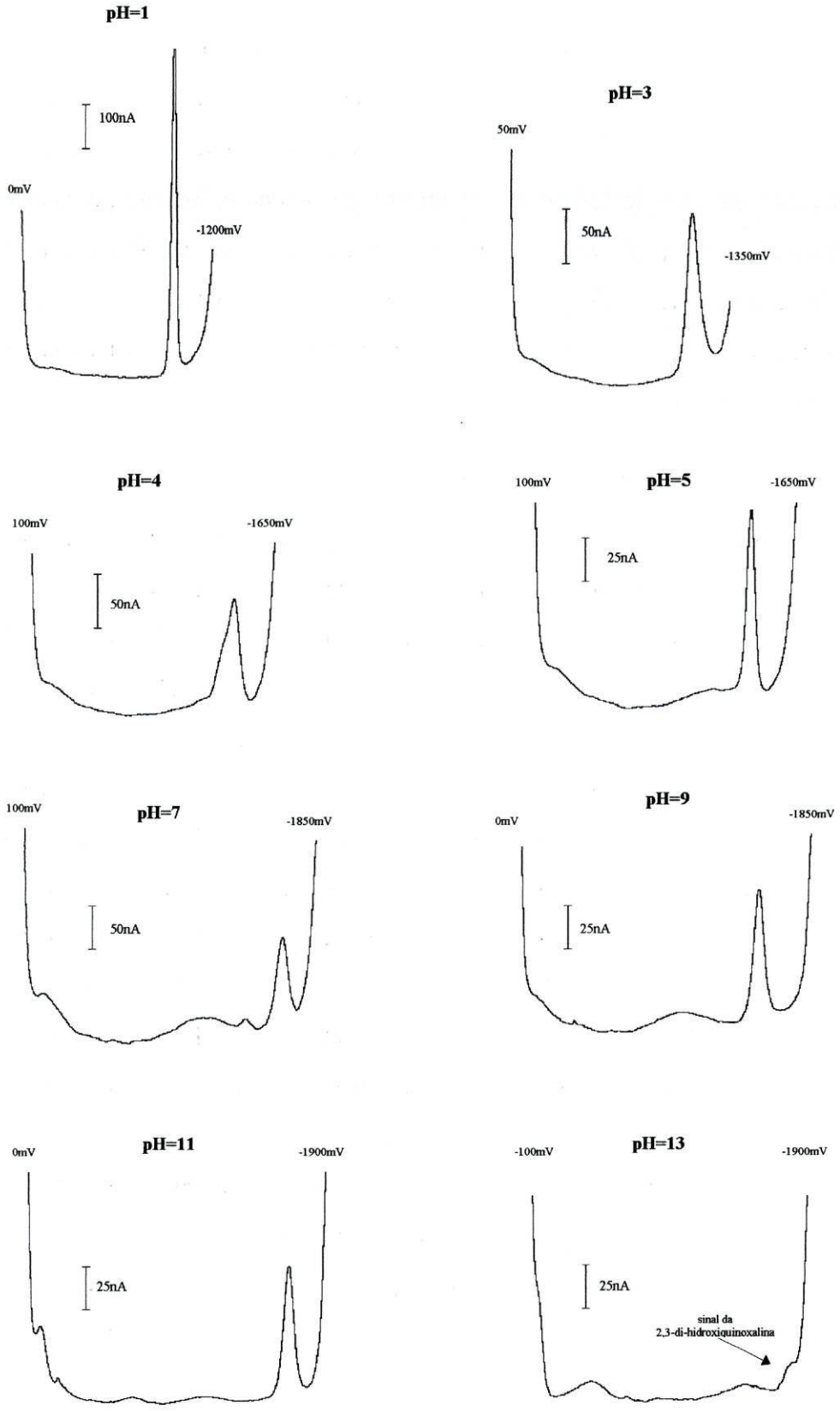


Figura 2.9- Polarogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$M de 2,3-di-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH.

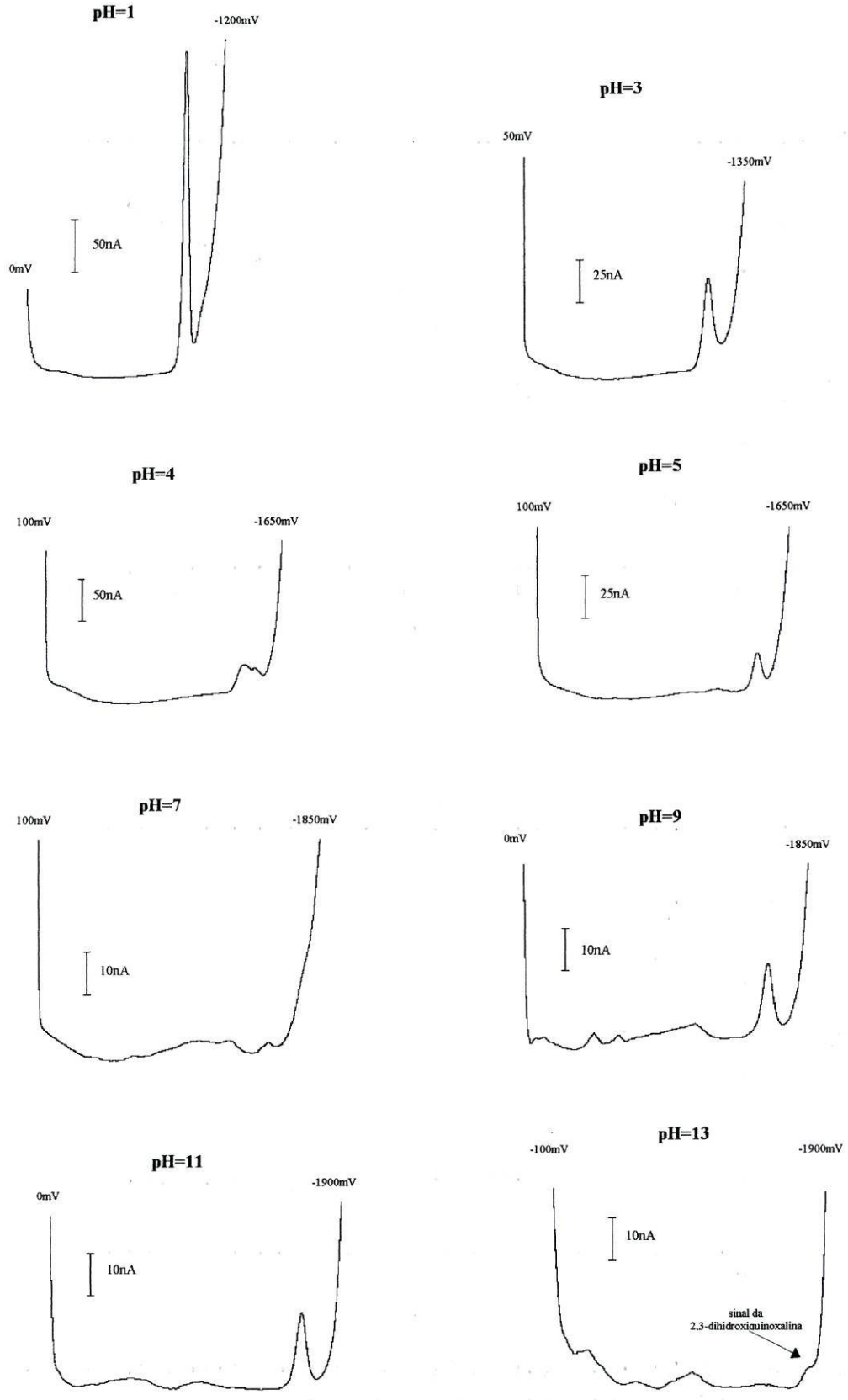


Figura 2.10- Voltamogramas diferenciais por impulsos de uma solução $1x10^{-5}$M de 2,3-di-hidroxiquinoxalina nas várias soluções de electrólito de suporte estudadas, com diferentes valores de pH.

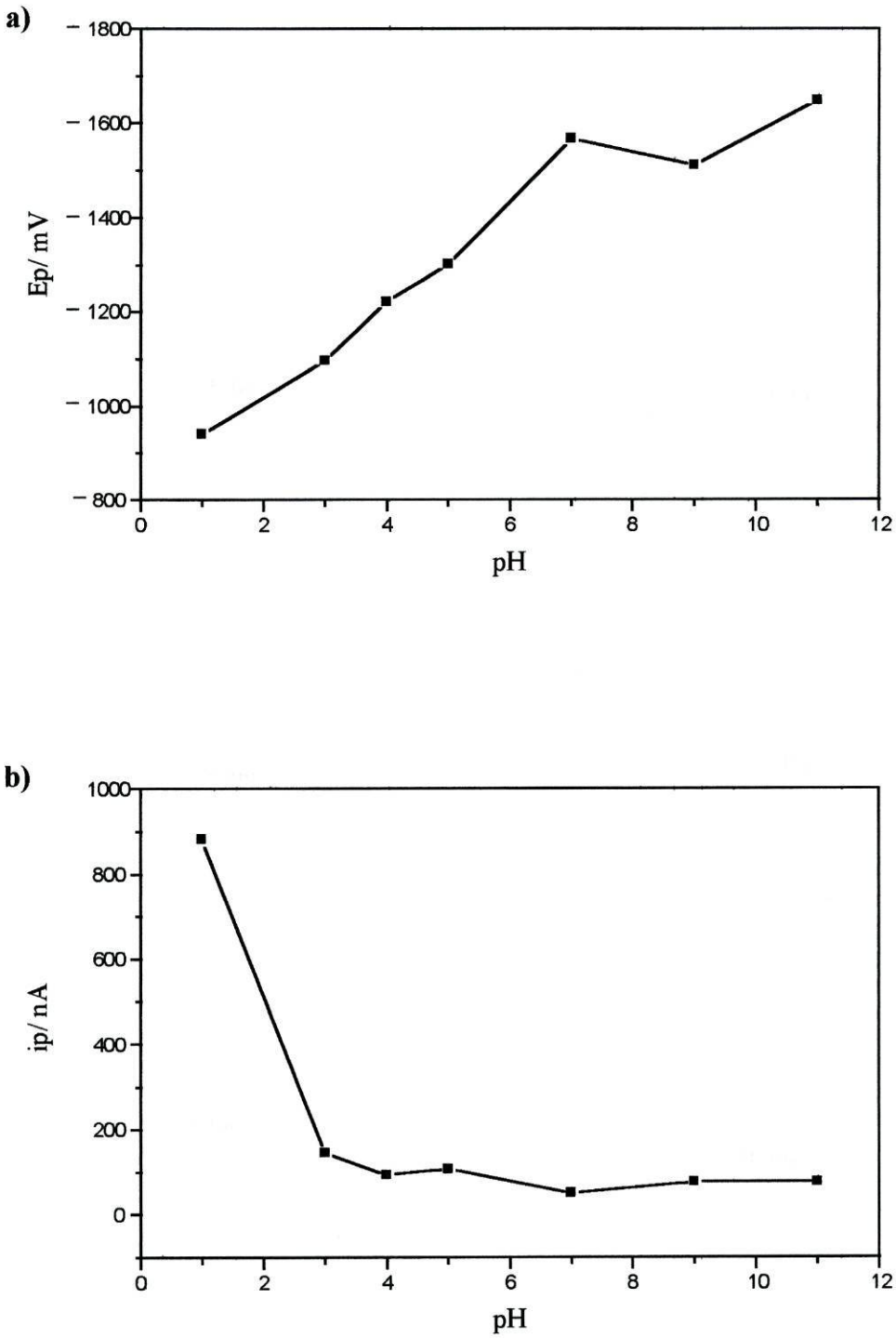


Figura 2.11- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2,3-di-hidroxiquinoxalina nos ensaios realizados por polarografia diferencial por impulsos.

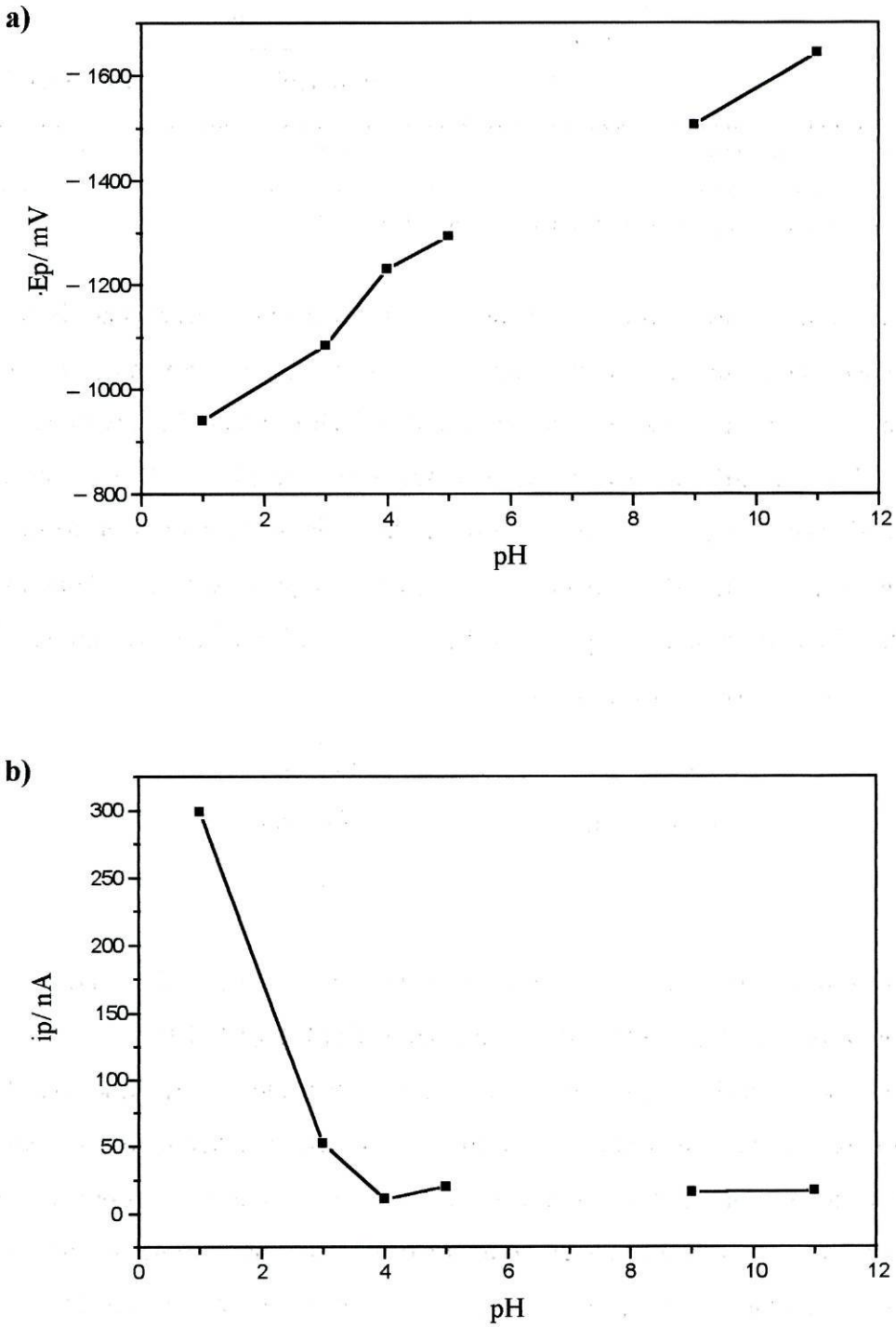


Figura 2.12- Efeito do pH sobre os valores de **a)** Ep e **b)** ip da 2,3-di-hidroxiquinoxalina nos ensaios realizados por voltametria diferencial por impulsos num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

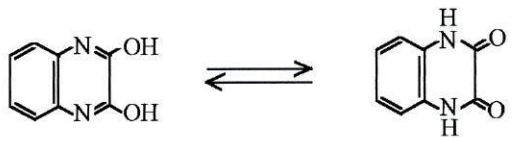
Tabela 2.3- Valores dos declives obtidos nas representações do potencial de pico (Ep) com o pH, para a 2,3-di-hidroxiquinoxalina.

Composto	Intervalo de pH	declive	
		polarografia	voltametria
2,3-di-hidroxiquinoxalina	1-11*	68,5	68,1

* Desprezando o valor de Ep relativo ao tampão fosfato 0,1M, pH=7.

Tal como sucede com as hidroxiquinoxalinas, também o mecanismo da redução electroquímica da 2,3-di-hidroxiquinoxalina no eléctrodo de mercúrio não tem merecido muita atenção e só se conseguiu encontrar um trabalho, publicado nos anos 50, da autoria de Furlani[126], abordando este assunto. Nesse trabalho Furlani admite que a redução pode ocorrer através de um processo de eléctrodo envolvendo 4 electrões.

De salientar que, tal como sucede para as hidroxiquinoxalinas, também no caso da 2,3-di-hidroxiquinoxalina se pode estabelecer em solução aquosa um equilíbrio tautomérico, que se pode representar por:



I II

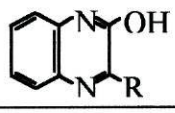
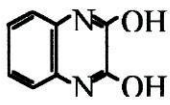
Vários estudos apontam para uma larga predominância da forma II (quinoxalina-2,3-diona) relativamente à forma I (2,3-di-hidroxiquinoxalina)[128,129,130].

O aspecto mais importante relativo ao mecanismo da redução da 2,3-di-hidroxiquinoxalina no eléctrodo de mercúrio é a irreversibilidade do processo, à semelhança do que havia sido observado para a redução das hidroxiquinoxalinas. A irreversibilidade desse processo sugere que a redução electroquímica deste composto no eléctrodo de mercúrio é um processo complexo que envolverá, provavelmente uma transformação química rápida e irreversível associada ao processo de redução electroquímica, à semelhança do que foi proposto por Wasa e colaboradores[82] para a redução das hidroxiquinoxalinas.

Em termos analíticos, a grande diferença que é observada entre a intensidade de corrente do pico quando se utiliza como electrólito de suporte HCl 0,1M, relativamente às outras soluções tampão, torna esta solução, no meio mais conveniente para a realização de análises polarográficas e voltamétricas da 2,3-di-hidroxiquinoxalina, já que nessas condições se obtém uma sensibilidade muito maior. Com os estudos que até este momento foram realizados não é possível dar uma explicação para o aumento do sinal observado em meio ácido relativamente às outras condições de meio menos ácidas.

Na tabela 2.4 resume-se e sistematiza-se alguns dos aspectos mais relevantes sobre o comportamento polarográfico e voltamétrico das quinoxalinas das três classes que foram estudadas.

Tabela 2.4- Comportamento polarográfico e voltamétrico observado para as quinoxalinas das três classes consideradas. Quadro resumo.

Quinoxalinas	Comportamento típico	Comentários
Classe I 	• pH< 3 → 3 picos de pequena amplitude • pH entre 4 e 5 → 2 picos de amplitude intermédia • pH≥ 7 → pico único de amplitude elevada	• Picos adicionais em meio ácido: - 2ºpico → resultante do desdobramento do processo de redução - 3º pico → resultante da catálise da redução do hidrogénio • Processo reversível para pH≥ 7 • Melhor sensibilidade pH≥ 7
Classe II 	• Pico único de elevada amplitude (excepto para pH=11 e 13)	• A desprotonação dificulta a redução • Processo totalmente irreversível • Melhor sensibilidade para pH entre 4 e 9
Classe III 	• Pico único próximo da zona de libertação de hidrogénio • Pico de elevada amplitude só em meio muito ácido (pH=1)	• Processo totalmente irreversível • Melhor sensibilidade para pH=1

2.2 ESTUDOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Através destes estudos espectrofotométricos pretendeu-se avaliar a estabilidade das soluções de partida das quinoxalinas que foram estudadas. Com esse objectivo fez-se o acompanhamento da evolução dos espectros de absorção entre 200nm e 500nm das várias soluções aquosas de quinoxalinas (para cada composto estudado testaram-se soluções $2x10^{-5}$M e $1x10^{-3}$M) ao longo de cerca de um mês. Para as várias soluções de quinoxalinas estudadas não se observaram alterações nos espectros ao longo desse período de tempo, o que nos levou a admitir que essas quinoxalinas eram apreciavelmente estáveis, mesmo em solução aquosa diluída.

Os espectros típicos das várias soluções de quinoxalinas estudadas podem ser observados nas figuras 2.13, 2.14 e 2.15. Conforme se verifica nessas figuras, à semelhança do que acontecia a nível do comportamento polarográfico e voltamétrico, existe uma clara distinção nos espectros das quinoxalinas consoante a classe a que essas quinoxalinas pertencem. O comportamento espectrofotométrico das quinoxalinas estudadas e as diferenças entre os espectros das várias classes de quinoxalinas, que foram observados neste estudo, estão de acordo com um trabalho anterior publicado por Cheeseman[127]. Este investigador foi um dos primeiros a admitir que as hidroxiquinoxalinas e a 2,3-di-hidroxiquinoxalina podiam estabelecer equilíbrios tautoméricos em solução, baseando-se precisamente nas diferenças existentes nos espectros de absorção desses compostos relativamente às quinoxalinas da classe I[127].

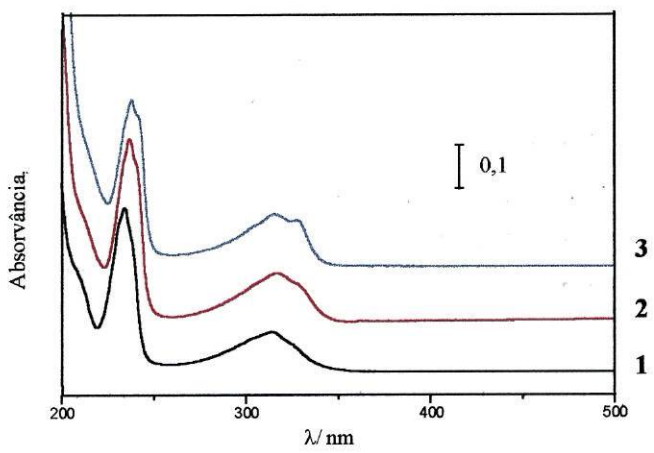


Figura 2.13- Espectro de absorção de soluções $2x10^{-5}$M de: **1)** quinoxalina; **2)** 2-metilquinoxalina; e **3)** 2,3-dimetilquinoxalina.

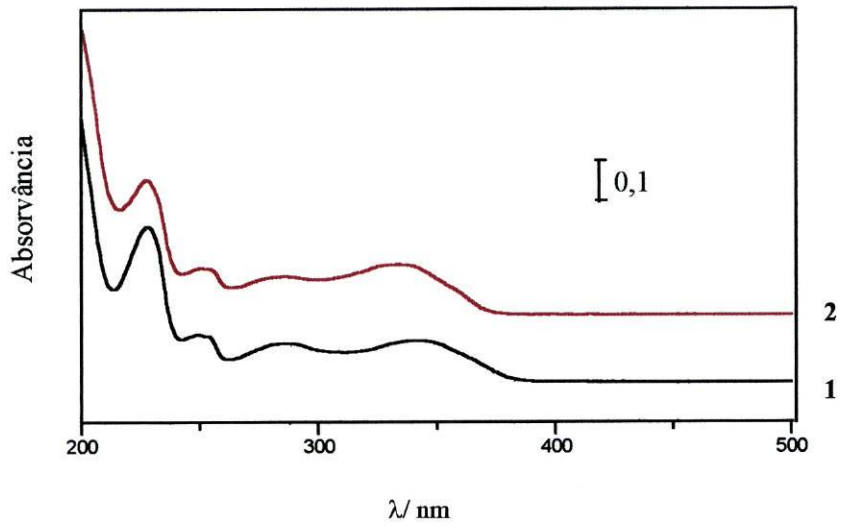


Figura 2.14- Espectro de absorção de soluções $2x10^{-5}$M de: **1)** 2-hidroxiquinoxalina; **2)** 2-hidroxi-3-metilquinoxalina.

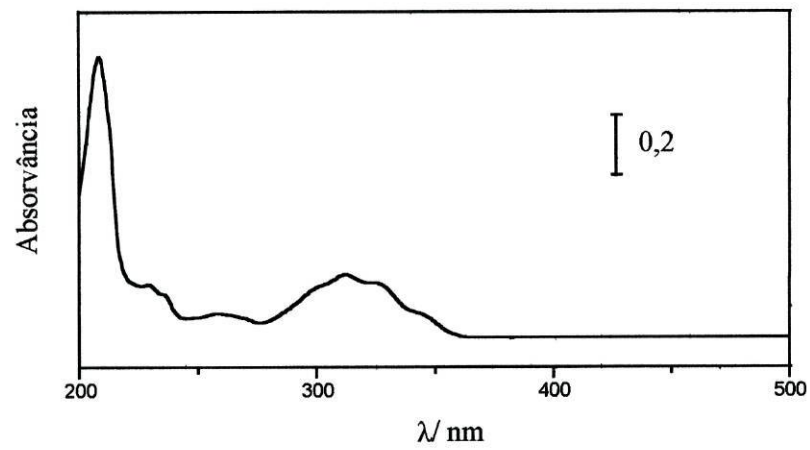
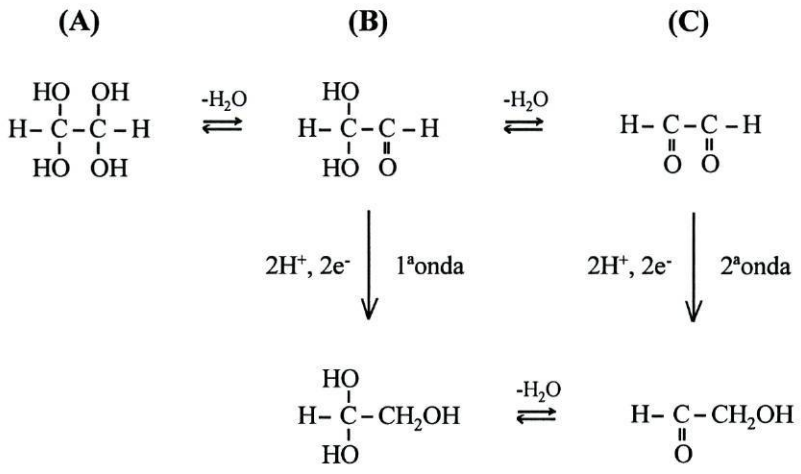


Figura 2.15- Espectro de absorção de uma solução $2x10^{-5}$M de 2,3-di-hidroxiquinoxalina.

PARTE III

ANÁLISE POLAROGRÁFICA DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS

Os compostos α-dicarbonílicos considerados neste trabalho são, de uma forma geral, espécies que podem ser reduzidas directamente no eléctrodo de mercúrio. Este facto indica que a técnica polarográfica poderá ser utilizada para o desenvolvimento de métodos de análise baseados na redução directa destes compostos no eléctrodo de mercúrio gotejante. Na pesquisa bibliográfica realizada sobre esse tema verificou-se, contudo, que, apesar de existirem inúmeros trabalhos publicados sobre a problemática do processo de redução de compostos α-dicarbonílicos no eléctrodo de mercúrio gotejante, em todos eles aparece referido que esse processo de redução é bastante complexo [131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142]. A origem dessa complexidade é, geralmente, atribuída à existência desses compostos em solução aquosa sob várias formas devido ao estabelecimento de vários tipos de equilíbrios químicos em solução: tautomérico (equilíbrio entre as formas cetónica e enólica); hidratação - desidratação; e ácido - base. Essas diferentes formas podem apresentar características de redução diversas. Por exemplo, no caso do glioxal admite-se que ocorram os equilíbrios químicos em solução que se representam a seguir, entre as formas hidratadas e a forma livre:



Estes equilíbrios dão origem ao aparecimento de duas ondas de redução distintas. Porém, este processo torna-se ainda mais complexo devido ao facto do glioxal ter tendência a formar dímeros em solução aquosa[143]. Este exemplo retrata a situação que em geral se observa quando se estudam processos de redução de compostos α-dicarbonílicos no eléctrodo de mercúrio gotejante: esses processos de redução são, muitas vezes, bastante complexos, altamente dependentes do pH e da temperatura e, devido à coexistência em equilíbrio de espécies electroactivas e espécies não-electroactivas, as ondas polarográficas obtidas são de origem cinética, muito influenciadas pelas condições experimentais, o que as torna pouco apropriadas para fins analíticos. Por esta razão não é de estranhar que não tenham sido desenvolvidos muitos métodos de análise polarográfica directa de compostos α-dicarbonílicos[144,145,146].

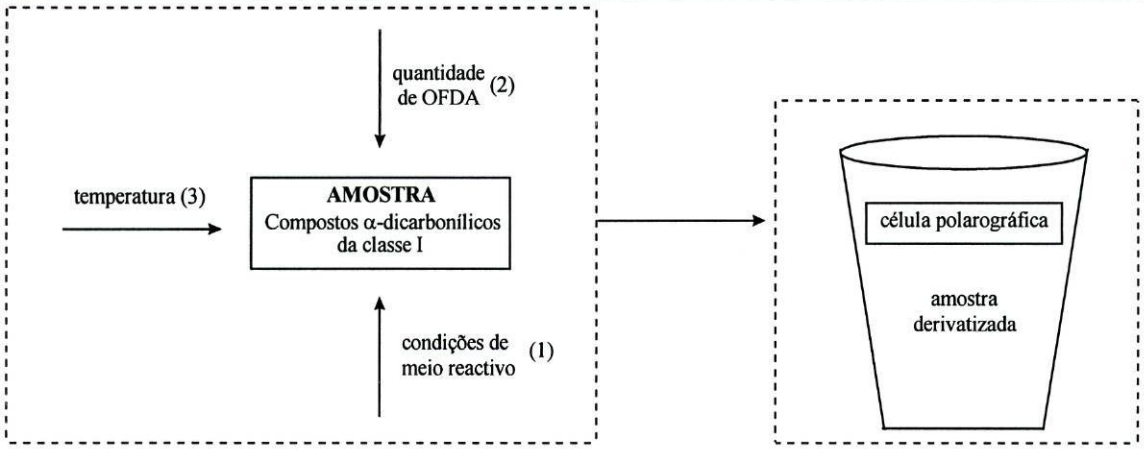
Durante os anos 60 Tamotsu Wasa e colaboradores desenvolveram, conforme já foi referido atrás, um conjunto de estudos acerca do comportamento polarográfico dos produtos de derivatização da o-fenilenodiamina (OFDA) com compostos α-dicarbonílicos[76,77,82,99]. Verificaram que as quinoxalinas resultantes davam origem a ondas de redução bem definidas e controladas por difusão, apropriadas para a determinação analítica dos compostos α-dicarbonílicos originais. Desta forma desenvolveram um conjunto de métodos de análise de compostos α-dicarbonílicos baseados na polarografia clássica, após derivatização prévia dos compostos com o-fenilenodiamina.

No trabalho realizado no âmbito desta dissertação, procurou-se desenvolver métodos de análise de compostos α-dicarbonílicos baseados na técnica polarográfica, mas utilizando a polarografia diferencial por impulsos. Conforme se verificou no capítulo anterior, existe uma grande diferença no comportamento polarográfico das quinoxalinas quando se utiliza a técnica polarográfica clássica e a polarografia diferencial por impulsos. Essa diferença reside, particularmente, no modo como o sinal polarográfico varia quando se altera a solução tampão e o pH. Conforme se mostrou na Parte II, enquanto que na técnica polarográfica clássica o sinal é, praticamente, independente do pH, na polarografia diferencial por impulsos a variação do sinal com o pH é muito acentuada e a sensibilidade é bastante maior. Devido a estas diferenças realizou-se para cada classe de compostos α-dicarbonílicos considerada um estudo preliminar das condições mais apropriadas para a realização da derivatização, uma vez que os níveis de concentrações que são estudados neste trabalho são bastante inferiores aos que foram estudados por Tamotsu Wasa.

O desenvolvimento dos métodos de análise dos compostos α-dicarbonílicos envolveu deste modo, para cada classe de compostos α-dicarbonílicos considerada, um estudo exploratório com vista à selecção das condições experimentais mais adequadas à realização da reacção de derivatização. Após essa selecção procedeu-se à avaliação das características analíticas dos métodos de análise polarográfica desenvolvidos.

1 - ANÁLISE DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE I

O processo de análise de compostos α-dicarbonílicos da classe I envolve um primeiro passo de derivatização dos compostos e só depois a realização da análise das quinoxalinas resultantes. A sequência de operações envolvidas na análise pode ser representada da seguinte forma:



Desta forma começou-se por estudar a influência (1) das condições de meio reactivo e (2) da quantidade de OFDA na extensão e velocidade do processo de derivatização. A (3) temperatura foi, igualmente, um parâmetro experimental considerado neste estudo; porém o facto de se ter conseguido condições experimentais em que a reacção de derivatização era suficientemente rápida à temperatura ambiente (25°C), fez com que a avaliação da influência desse parâmetro experimental tivesse sido realizada de forma marginal.

Após a selecção das condições mais apropriadas para a realização da reacção de derivatização e levando em linha de conta o comportamento polarográfico que foi observado para as quinoxalinas que resultam deste processo (Parte II), fez-se a avaliação das características analíticas dos métodos de análise desenvolvidos para a determinação de glioxal, metilglioxal, diacetilo e 2,3-pentanodiona.

1.1 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES AQUOSAS

Foram preparadas soluções aquosas de partida com concentrações 10^{-1}M dos quatro compostos α-dicarbonílicos estudados. As características dos reagentes (*Aldrich*) e o modo de preparação das soluções de partida encontram-se descritos na tabela 1.1. Os reagentes foram utilizados como recebidos, sem qualquer purificação adicional.

Tabela 1.1 - Características dos compostos α-dicarbonílicos da classe I e modo de preparação das soluções de partida com concentração 10^{-1}M.

Composto	Características do reagente comercial	Modo de preparação da solução de partida 10^{-1}M
glioxal	solução aquosa 40%	pesou-se rigorosamente cerca de 1,45g da solução concentrada de glioxal e diluiu-se rigorosamente a 100mL.*
metilglioxal	solução aquosa 40%	pesou-se rigorosamente cerca de 1,80g da solução concentrada de metilglioxal e diluiu-se rigorosamente a 100mL.
diacetilo	97% (líquido)	pesou-se rigorosamente cerca de 0,86g de diacetilo e diluiu-se rigorosamente a 100mL.
2,3-pentanodiona	98% (líquido)	pesou-se rigorosamente cerca de 1,00g de 2,3-pentanodiona e diluiu-se rigorosamente a 100mL.

* A solução aquosa 40% de glioxal tem tendência a formar resíduos sólidos, quando em repouso, que se depositam no fundo do frasco. Tais resíduos resultam da lente polimerização do glioxal pelo que se deve, antes de se utilizar a solução de glioxal dissolver esse resíduo; para isso é necessário aquecer a solução em banho-maria a 60°C.

Soluções mais diluídas destes compostos α-dicarbonílicos foram obtidas por diluição das soluções de partida e preparadas frescas no dia de utilização.

As soluções de o-fenilenodiamina foram preparadas a partir do sólido puro, com qualidade *zur sinthese* (*Merck*), por dissolução da quantidade pretendida em água ou em solução tampão, conforme as situações. Esta solução foi preparada fresca na altura da utilização.

1.2 - Optimização das condições de análise

Conforme se referiu na Parte I, na secção 2.3.1, dos quatro compostos α-dicarbonílicos da classe I considerados, aqueles que apresentam maior relevância a nível alimentar e biológico são o metilglioxal e o diacetilo. Por esta razão a optimização das condições de meio reactivo e da quantidade de OFDA para a realização da reacção de derivatização foi estudada com base no comportamento do diacetilo, tendo, posteriormente, sido feito um estudo do mesmo tipo para o metilglioxal. As condições

de derivatização seleccionadas foram depois aplicadas aos dois outros compostos desta classe: o glioxal e a 2,3-pentanodiona.

1.2.1 - SELECÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO

Ao estudar o comportamento polarográfico das quinoxalinas desta classe I em várias soluções tampão com diferentes valores de pH (Parte II, secção 2.1.1), verificou-se que esses compostos eram activos polarograficamente em todos os meios, embora apresentassem sensibilidades diferentes consoante o meio em estudo. Desta forma foi possível realizar a reacção de derivatização na própria célula polarográfica e acompanhar a evolução da reacção ao longo do tempo através do registo de polarogramas da solução. As soluções tampão estudadas foram as mesmas utilizadas nos estudos sobre o comportamento polarográfico das quinoxalinas, uma vez que o comportamento polarográfico das quinoxalinas resultantes da reacção de derivatização já se encontrava caracterizado.

Neste estudo efectuado com o diacetilo utilizaram-se mais duas soluções tampão - solução tampão fosfato 0,1M, pH=2,5 e solução tampão fosfato 0,1M, pH=11,5. O seu uso deveu-se ao facto de as soluções utilizadas como tampão na zona de pH=3 (solução HCl 10^{-3}M com NaCl 0,1M) e pH=11 (solução NaHO 10^{-3}M com NaCl 0,1M) não possuírem uma boa capacidade de resistir a variações de pH. Como neste estudo se ia juntar às soluções tampão a OFDA, que apresenta características alcalinas, considerou-se ser importante utilizar soluções como meio reactivo capazes de controlar eficazmente o pH. Contudo, como no estudo realizado com o diacetilo não se constatou existir diferenças significativas nos resultados obtidos com a solução tampão fosfato 0,1M, pH=2,5, e a solução tampão fosfato 0,1M, pH=11,5, relativamente aos resultados obtidos com a solução de HCl 10^{-3}M com NaCl 0,1M, pH=3, e com a solução NaHO 10^{-3}M com NaCl 0,1M, pH=11, no estudo realizado com o metilglioxal já não se efectuou o estudo com essas duas novas soluções tampão.

Como a polarografia não permite um controlo contínuo da evolução da reacção de derivatização, pois cada varrimento polarográfico demora cerca de 3½ minutos, e como as quinoxalinas resultantes da reacção de derivatização absorvem radiação no U.V., decidiu-se efectuar nestes ensaios com o diacetilo, ensaios espectrofotométricos de acompanhamento da evolução da absorvância da reacção de derivatização ao longo

do tempo, como complemento dos ensaios polarográficos ao longo do tempo, por forma a obter-se uma perspectiva mais detalhada da evolução da reacção de derivatização. No caso do estudo levado a cabo com o metilglioxal, o acompanhamento da evolução da reacção só foi realizado por polarografia.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Preparação das soluções de meio reactivo

A preparação destas soluções foi realizada do modo descrito na Parte II, secção 1.1. As duas novas soluções tampão fosfato 0,1M, com pH=2,5 e 11,5, foram preparadas tal como a solução tampão fosfato 0,1M, pH=7; o controlo do valor de pH foi feito potenciometricamente e o ajuste foi feito, no primeiro caso, através da adição de HCl 1M e, no segundo caso, através da adição de NaHO 1M.

(B1) Ensaios com o diacetilo

Preparação da solução de derivatização

(i) Dissolveram-se, em 100mL da solução tampão em estudo, 0,2g de OFDA (solução tampão contendo 0,2% de OFDA). Verificou-se potenciometricamente o valor de pH da solução resultante e quando necessário ajustou-se o valor do pH por adição de HCl 0,1M.

Ensaios polarográficos

(ii) Da solução de derivatização mediram-se, rigorosamente, 25mL para a célula polarográfica e, após 10min de passagem de azoto pela solução, registou-se o respectivo polarograma (polarograma do branco com OFDA).

(iii) Juntaram-se 500μL de solução de diacetilo $5x10^{-4}$M (concentração de diacetilo na célula = $1x10^{-5}$M) e, após passar azoto durante 1min, procedeu-se ao registo de polarogramas em função do tempo, com o primeiro polarograma a iniciar-se 1min após a adição da solução de diacetilo e os restantes com uma periodicidade de 5minutos.

(iv) No final dos ensaios adicionaram-se 250μL de solução de 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-3}$M e, após passar azoto durante 1min, registou-se um último polarograma.

Ensaios espectrofotométricos

(v) Encheram-se dois balões volumétricos de 25mL com a solução de derivatização.

(vi) Para um dos balões adicionaram-se 250μL de solução de 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-3}$M e após homogeneizar a solução, registou-se um conjunto de espectros correspondentes às seguintes situações:

	Célula com a amostra	**Célula com a referência**
1	Solução tampão com OFDA 0,2% e 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M	Água destilada
2	Solução tampão com OFDA 0,2%	Água destilada
3	Solução tampão com OFDA 0,2% e 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M	Solução tampão com OFDA 0,2%

(vii) Ao segundo balão adicionaram-se 500μL de solução de diacetilo $5x10^{-4}$M, homogeneizou-se a solução e transferiu-se uma parte para a célula espectrofotométrica; de imediato iniciou-se o registo da evolução da absorvância da solução em função do tempo, utilizando na célula de referência a solução de derivatização.

(B2) Ensaios com o metilglioxal

Preparação da solução de derivatização e ensaios polarográficos

(i) Dissolveram-se, em 25mL da solução tampão em estudo, 50mg de OFDA (solução tampão contendo 0,2% de OFDA). Verificou-se potenciometricamente o valor de pH da solução resultante e quando necessário ajustou-se o valor de pH por adição de HCl 0,1M.

(ii) Transferiu-se a solução para a célula polarográfica e, após 10min de passagem de azoto pela solução, registou-se o respectivo polarograma (polarograma do branco com OFDA).

(iii) Juntaram-se 50μL de solução de metilglioxal $1x10^{-2}$M (concentração de metilglioxal na célula = $2x10^{-5}$M) e, após passar azoto durante 1min, procedeu-se ao registo de polarogramas em função do tempo, com o primeiro polarograma a iniciar-se 1min após a adição da solução de metilglioxal e os restantes com uma periodicidade de 5minutos.

(iv) Após a estabilização do sinal adicionaram-se 500μL de solução de 2-metilquinoxalina $1x10^{-3}$M, deixou-se passar azoto durante 1min e registou-se um último polarograma.

Neste estudo com o metilglioxal, paralelamente a estes ensaios, realizou-se um outro conjunto de ensaios em que se obtiveram os polarogramas correspondentes à análise directa de metilglioxal $2x10^{-4}$M, em cada um dos meios ensaiados para a derivatização. Estes ensaios foram preparados da seguinte forma: a 25mL de meio em estudo adicionaram-se 500μL de solução de metilglioxal $1x10^{-2}$M e, após 10min de passagem de azoto pela solução, registou-se o respectivo polarograma.

Os parâmetros polarográficos utilizados na obtenção dos polarogramas nos ensaios anteriores com o diacetilo e metilglioxal foram os seguintes:

- t_{gota} = 1s;
- Amplitude do impulso = 50mV (impulso catódico);
- Velocidade de varrimento = 6mV/s.

O intervalo de potencial varrido variou conforme a solução tampão em estudo, uma vez que o potencial do pico polarográfico depende do pH dessa solução.

A sequência dos polarogramas tirados ao longo do tempo era controlada pelo sistema polarográfico; a periodicidade entre polarogramas foi de 5minutos.

Relativamente aos ensaios espectrofotométricos realizados no âmbito do estudo efectuado com o diacetilo, o primeiro conjunto de espectros permitiu seleccionar o comprimento de onda mais adequado para realizar o acompanhamento da variação da absorvância em função do tempo e verificar qual a absorvância resultante de uma solução de 2,3-dimetilquinoxalina com uma concentração idêntica à da solução de diacetilo que ia ser sujeita à derivatização, por forma a poder avaliar-se a extensão da conversão. O varrimento espectrofotométrico foi realizado na zona do U.V. entre 400nm e 280nm, com uma velocidade de varrimento de 200nm/min. A selecção do comprimento de onda para a realização do ensaio em função do tempo foi ajustado por forma a minimizar-se a interferência da OFDA, e a obter-se a sensibilidade máxima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através deste estudo pretendeu-se: (1)- caracterizar e seleccionar as condições de meio reactivo mais apropriadas para a realização da reacção de derivatização; (2)- estimar a velocidade do processo de derivatização; e (3)- quantificar a extensão do processo de derivatização. Através dos polarogramas dos meios reactivos contendo OFDA e dos estudos espectrofotométricos realizados com o diacetilo foi possível

também: (4)- avaliar a resposta polarográfica e espectrofotométrica da OFDA nos diferentes meios reactivos testados e verificar a interferência que o agente derivatizante introduz no processo de análise através dessas duas técnicas.

Na figura 1.1 representa-se a resposta polarográfica obtida nos ensaios de derivatização do diacetilo nas diferentes soluções tampão utilizadas, após a estabilização do sinal polarográfico. Em todos os casos observa-se o aparecimento do pico característico da redução da 2,3-dimetilquinoxalina, o que indica que a reacção de derivatização ocorre em todas essas condições de meio. O mesmo comportamento foi observado nos ensaios similares realizados com o metilglioxal. Através destes ensaios polarográficos verifica-se que a reacção de derivatização é rápida, tanto para o diacetilo como para o metilglioxal. Na tabela 1.2 registam-se os intervalos de tempo necessários para a estabilização dos sinais polarográfico e espectrofotométrico para o diacetilo e para o sinal polarográfico para o metilglioxal, verificando-se que a reacção de derivatização é bastante rápida em todos os meios. Para o diacetilo a estabilização do sinal polarográfico ocorre mais rapidamente nas soluções tampão mais ácidas, enquanto que para o metilglioxal existe uma tendência para a reacção ser mais rápida nas soluções tampão menos ácidas. No entanto, globalmente, verifica-se que para ambos os compostos a reacção de derivatização é bastante rápida em qualquer das soluções tampão ensaiadas.

Os ensaios espectrofotométricos realizados com o diacetilo permitiram caracterizar de forma mais detalhada a evolução da reacção de derivatização com o tempo nas várias soluções tampão ensaiadas. Conforme se pode observar nas figuras 1.2 e 1.3 , a solução de OFDA absorve fortemente no U.V. e o comprimento de onda para o qual a sua absorção se inicia depende do pH. Em meio ácido, a banda de absorção característica da 2,3-dimetilquinoxalina surge bem distinta da banda de absorção da OFDA; contudo, à medida que o meio se vai tornando menos ácido observa-se que a banda de absorção da OFDA se desloca ligeiramente para comprimentos de onda superiores e começa a sobrepor-se com a banda da 2,3-dimetilquinoxalina. Este facto torna esses meios menos favoráveis para a análise espectrofotométrica de diacetilo após derivatização com OFDA. Em todas as soluções tampão ensaiadas o espectro da solução de 2,3-dimetilquinoxalina na presença de 0,2% de OFDA, quando na célula de referência se usa a solução tampão em estudo contendo 0,2% de OFDA, faz surgir um máximo de absorção a cerca de 327nm, com excepção do meio HCl 0,1M, para o qual a

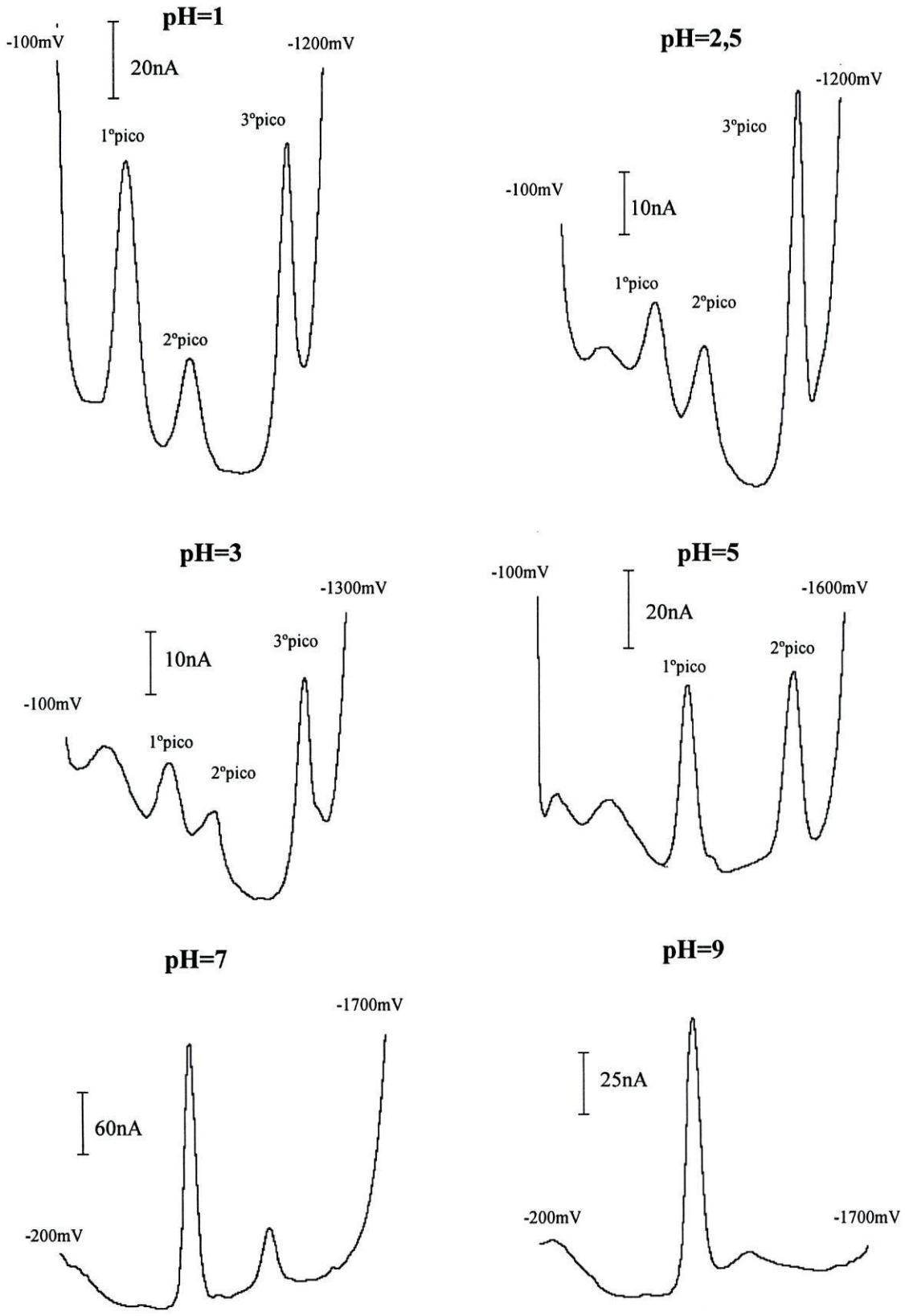


Figura 1.1 - Continua (legenda na página seguinte)

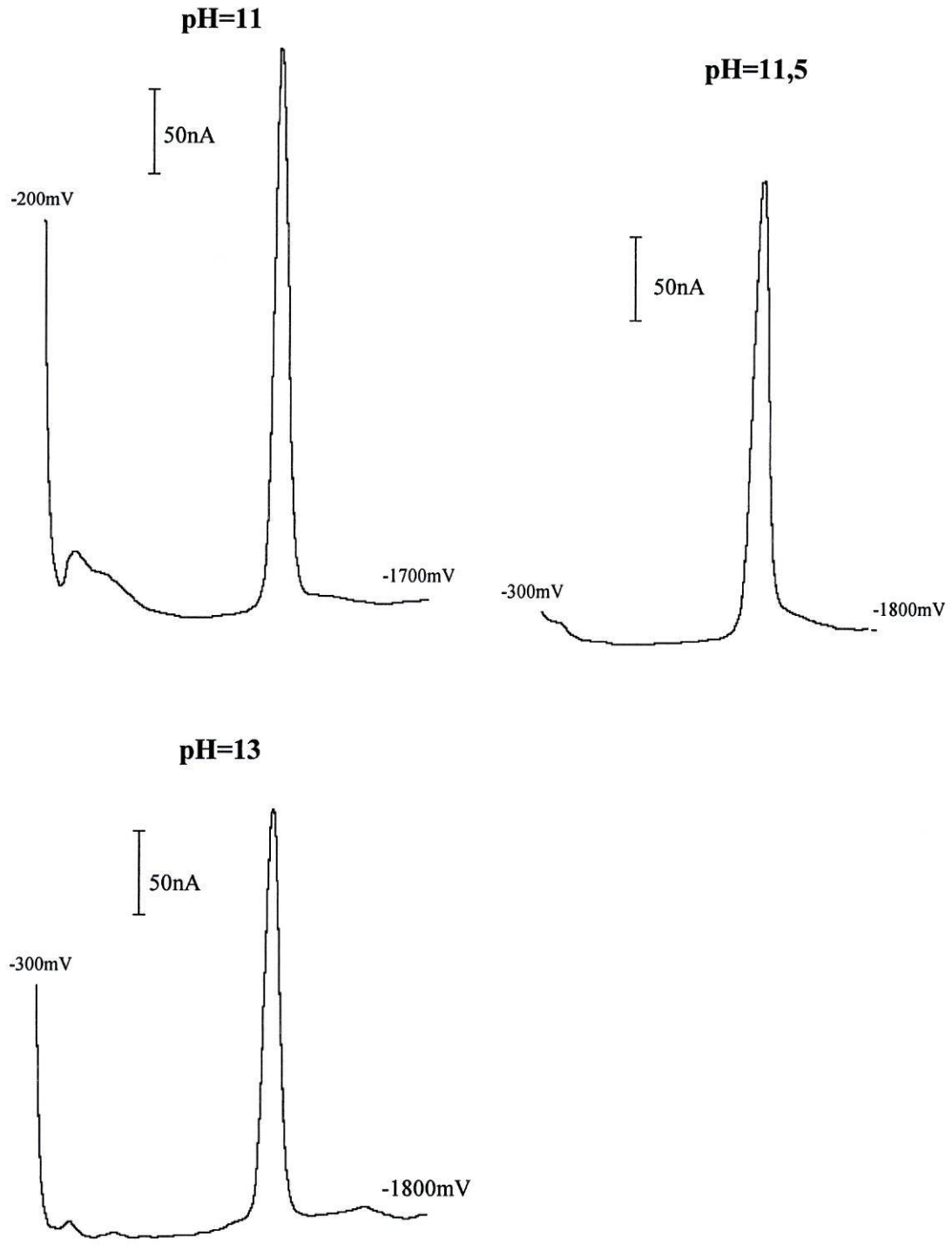


Figura 1.1 - Polarogramas resultantes da derivatização de uma solução $1x10^{-5}$M de diacetilo com OFDA 0,2% em diferentes soluções tampão com diferentes valores de pH.

Tabela 1.2 - Intervalos de tempo necessários para a conversão quantitativa de diacetilo e metilglioxal em 2,3-dimetilquinoxalina e 2-metilquinoxalina, respectivamente, em diferentes soluções tampão (concentração de diacetilo=10^{-5} M; concentração de metilglioxal =$2x10^{-5}$ M; concentração de OFDA=0,2%).

		DIACETILO		METILGLIOXAL
		Estabilização do sinal		Estabilização do sinal
solução tampão	**pH**	**espectrofotometria*/ s**	**polarografia****	**polarografia****
HCl 0,1M	1	>30	ao fim do 1°polarograma	ao fim do 2°polarograma
tampão fosfato 0,1M	2,5	>90	ao fim do 1°polarograma	_____
HCl 10^{-3}M em NaCl 0,1M	3	>90	ao fim do 1°polarograma	ao fim do 3°polarograma
tampão acetato 0,1M	5	>90	ao fim do 1°polarograma	ao fim do 2°polarograma
tampão fosfato 0,1M	7	>30	ao fim do 1°polarograma	ao fim do 2°polarograma
tampão amoniacal 0,1M	9	>150	ao fim do 2°polarograma	ao fim do 1°polarograma
NaHO 10^{-3}M em NaCl 0,1M	11	>600	ao fim do 3°polarograma	ao fim do 2°polarograma
tampão fosfato 0,1M	11,5	>600	ao fim do 3°polarograma	_____
NaHO 0,1M	13	>150	ao fim do 2°polarograma	ao fim do 1°polarograma

* Nesta estimativa do tempo estão incluídos 1min que correspondem aproximadamente ao tempo que medeia entre a adição do diacetilo à solução no balão volumétrico e o início do registo espectrofotométrico da evolução da absorvância da solução em derivatização.

** O primeiro polarograma foi iniciado 30s após a adição da solução do composto α-dicarbonílico, os restantes polarogramas eram registados com uma periodicidade de 5minutos.

banda de absorção da 2,3-dimetilquinoxalina se estende para valores de comprimento de onda superiores. Devido à interferência da banda da OFDA, os comprimentos de onda seleccionados para a realização dos ensaios em função do tempo foram ligeiramente

maiores que os máximos de absorção; os valores de comprimentos de onda escolhidos para acompanhar a evolução da absorvância ao longo do tempo encontram-se indicados na figura 1.3. Os ensaios espectrofotométricos em função do tempo confirmaram a rapidez da reacção de derivatização que havia sido observada através dos ensaios polarográficos. A estimativa do intervalo de tempo necessário para a conversão quantitativa de diacetilo em 2,3-dimetilquinoxalina obtido nos ensaios espectrofotométricos, para as várias soluções tampão testadas como meio reactivo, encontra-se referida na tabela 1.2.

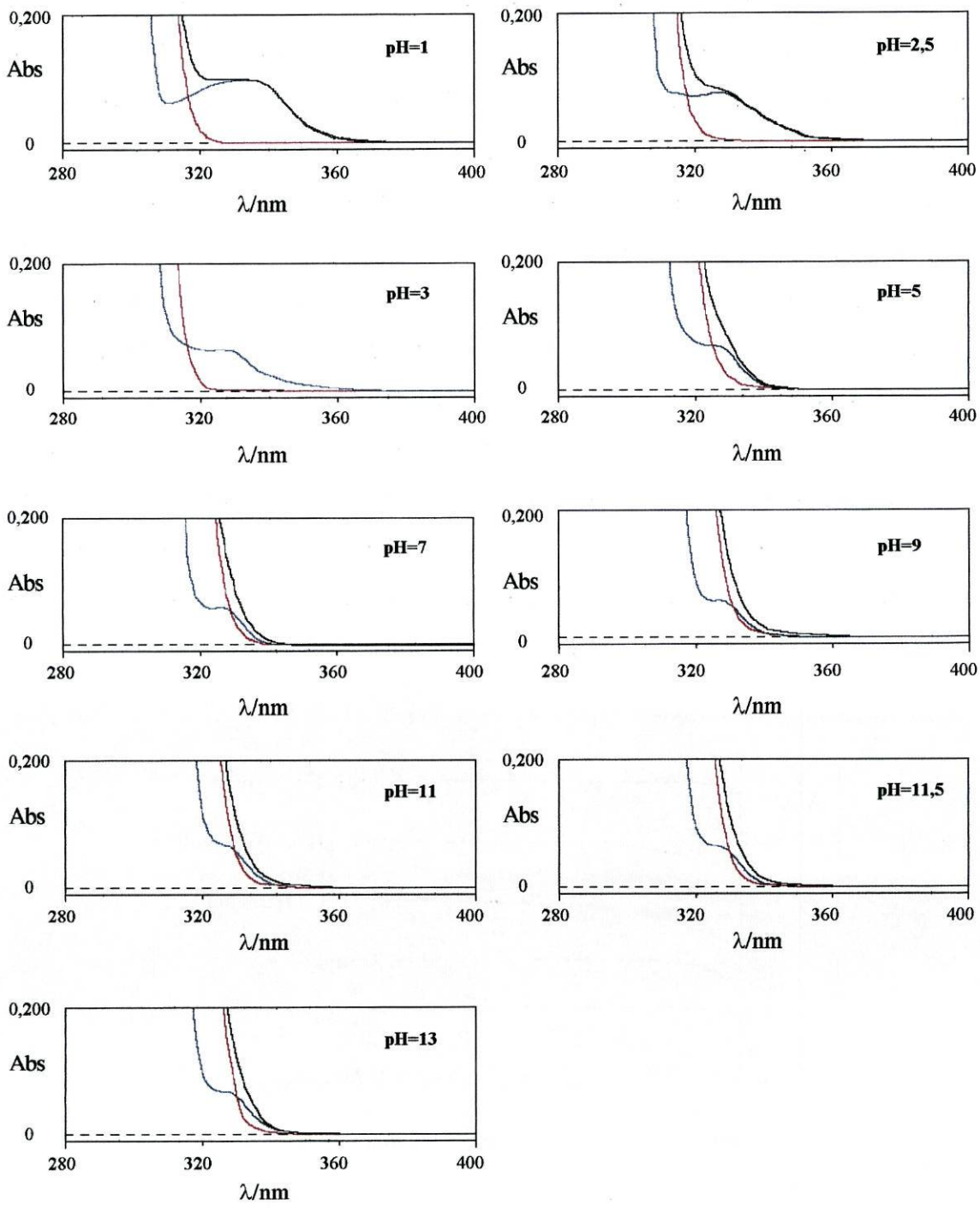


Figura 1.2 - Espectros obtidos em várias soluções tampão, com diferentes valores de pH.

——— - Solução tampão com OFDA 0,2% e 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M vs. água destilada;

——— - Solução tampão com OFDA 0,2% vs. água destilada;

——— - Solução tampão com OFDA 0,2% e 2,3.-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M vs. solução tampão com OFDA 0,2%.

A quantificação da extensão da reacção foi avaliada polarograficamente, através da verificação do aumento do pico polarográfico quando, após a estabilização desse sinal, se adicionava à célula polarográfica solução de 2,3-dimetilquinoxalina contendo um número de moles equivalente ao número de moles de composto α-dicarbonílico que foi sujeito à derivatização; para o diacetilo a quantificação foi também realizada por espectrofotometria, através da comparação entre a absorvância desenvolvida pela solução de diacetilo $1x10^{-5}$M submetida à derivatização e a absorvância de uma solução de 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M na presença de 0,2% de OFDA. Através destes ensaios verificou-se que a reacção de derivatização ocorre em elevada extensão, podendo considerar-se que a conversão é quantitativa em todos os meios ensaiados.

Relativamente à interferência que a OFDA introduz na análise polarográfica e espectrofotométrica verificou-se que, enquanto na polarografia a OFDA não faz surgir qualquer pico no polarograma do branco, pelo que directamente não é responsável pelo aparecimento de interferências na análise polarográfica, na espectrofotometria as soluções contendo OFDA começam a absorver intensamente para comprimentos de onda

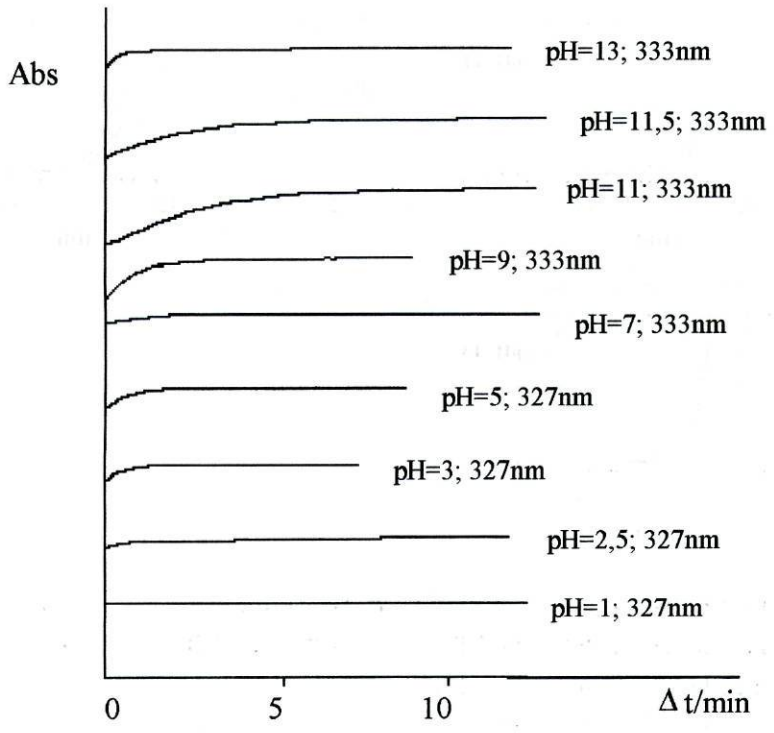


Figura 1.3 - Evolução da absorvância com o tempo da solução de diacetilo $1x10^{-5}$M em derivatização com OFDA 0,2%, em diferentes soluções tampão com pH diferentes.

próximos do máximo de absorção da 2,3-dimetilquinoxalina; para além disso, essa zona de absorção da OFDA sobrepõe-se cada vez mais com a banda da 2,3-dimetilquinoxalina à medida que se utilizam soluções tampão menos ácidas. Por isso, a OFDA constitui uma interferência a ter em conta na análise espectrofotométrica, só se conseguindo evitar essa interferência realizando a determinação espectrofotométrica em meio ácido, conforme se pode observar nos espectros da figura 1.3.

De acordo com estes resultados concluiu-se que a influência do pH da solução tampão na reacção de derivatização do diacetilo e do metilglioxal é pequena, já que com todas as soluções tampão ensaiadas se obtém conversão quantitativa num intervalo de tempo curto. Este facto permite realizar a reacção em quaisquer condições de meio, pelo que se optou por seleccionar como meio reactivo aquele que é mais favorável para a determinação polarográfica da 2,3-dimetilquinoxalina, pois assim tornou-se possível realizar todo o processo envolvendo a reacção de derivatização e a análise polarográfica na própria célula polarográfica, sem haver necessidade de modificação das condições de meio entre essas duas fases. Como se verificou na Parte II, o sinal polarográfico máximo para estas quinoxalinas era obtido para pH≥7; deste modo, seleccionou-se o meio tampão fosfato 0,1M, pH=7 para a realização da reacção de derivatização.

Relativamente à resposta polarográfica obtida com a solução de metilglioxal $2x10^{-4}$M, que não foi sujeita a derivatização, nas diferentes soluções tampão ensaiadas, só se observa o aparecimento de um pequeno sinal nos electrólitos em que o pH é igual ou superior a 7. O sinal obtido é, contudo, muito pequeno quando comparado com o sinal que se obtém com a solução de metilglioxal $2x10^{-5}$M após derivatização, o que significa que a análise directa do metilglioxal por polarografia é bastante menos sensível.

1.2.2 - Efeito da quantidade de OFDA

Com este estudo pretendeu-se caracterizar a influência que a quantidade de OFDA utilizada no processo de derivatização tem sobre a velocidade e a extensão da reacção de derivatização. O estudo foi realizado para os quatro compostos considerados, embora o procedimento experimental tenha sofrido ajustamentos consoante o composto estudado, como consequência dos resultados experimentais entretanto obtidos. O diacetilo foi o composto examinado com maior pormenor, tendo-se avaliado o efeito da

quantidade de OFDA em três soluções tampão distintas: a solução tampão fosfato 0,1M, pH=7 (o meio seleccionado para a realização da reacção de derivatização e análise polarográfica), solução HCl 0,1M e solução NaHO 0,1M. A inclusão destas duas últimas soluções nos ensaios com o diacetilo deveu-se ao facto de a solução de HCl ser utilizada no método espectrofotométrico de determinação de diacetilo na cerveja[19,147] e de se ter encontrado um método polarográfico recentemente publicado em que é utilizado meio fortemente alcalino para a determinação directa de diacetilo[146].

Para os outros três compostos - metilglioxal, 2,3-pentanodiona e glioxal - o estudo foi somente realizado em solução tampão fosfato 0,1M, pH=7 e em HCl 0,1M.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Ensaios com o diacetilo

O estudo do efeito da quantidade de OFDA na derivatização do diacetilo foi realizado para cinco concentrações distintas de OFDA: 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2%.

O estudo foi realizado em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, em meio HCl 0,1M e em meio NaHO 0,1M. Os ensaios com HCl 0,1M só foram acompanhados por espectrofotometria, os ensaios nos dois outros meios foram acompanhados por polarografia e espectrofotometria.

HCl 0,1M

(i) Prepararam-se 100mL de HCl 0,1M contendo a percentagem de OFDA em estudo;

(ii) Encheu-se um balão volumétrico de 25mL com a solução preparada em (i), adicionaram-se 250μL de solução de 2,3-dimetilquinoxalina 10^{-3}M e após homogeneizar a solução, registou-se um conjunto de espectros correspondentes às seguintes situações:

	Célula com a amostra	Célula com a referência
1	HCl 0,1M com OFDA e 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M	Água destilada
2	Solução HCl 0,1M com OFDA	Água destilada
3	HCl 0,1M com OFDA e 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-5}$M	HCl 0,1M com OFDA

(iii) Encheu-se outro balão volumétrico de 25mL com a solução preparada em (i) e adicionaram-se 250μL de solução de diacetilo 10^{-3}M. Homogeneizou-se a solução e

transferiu-se para a célula espectrofotométrica; iniciou-se, então, o registo da evolução da absorvância da solução em função do tempo, utilizando na célula de referência a solução preparada em (i).

Tampão fosfato 0,1M, pH=7 e NaHO 0,1M

(v) Prepararam-se ensaios espectrofotométricos de forma idêntica à descrita para a solução de HCl 0,1M.

(vi) Fizeram-se ensaios polarográficos para o que se pipetou 25mL da solução contendo a percentagem de OFDA em estudo para a célula polarográfica e, após 10min de passagem de azoto, registou-se o polarograma da solução (branco com OFDA).

(vii) Adicionou-se, depois, 250μL de diacetilo 10^{-3}M e, após 1min de passagem de azoto, iniciou-se o registo de polarogramas da solução em função do tempo nas mesmas condições descritas em 1.2.1 (ensaios polarográficos).

(viii) Por fim, adicionou-se à célula polarográfica um número de moles de 2,3-dimetilquinoxalina equivalentes ao número de moles de diacetilo utilizados na derivatização, após o que se registou um novo polarograma.

(B) Ensaios com o metilglioxal

O estudo do efeito da quantidade de OFDA na derivatização do metilglioxal foi realizado para três concentrações distintas de OFDA no caso dos ensaios espectrofotométricos - 0,05%, 0,1% e 0,2% de OFDA - e para seis concentrações distintas de OFDA no caso dos ensaios polarográficos - 0,001%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,2% e 1%.

Os ensaios com solução HCl 0,1M só foram acompanhados por espectrofotometria; os ensaios com solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, foram acompanhados por polarografia e espectrofotometria.

Os ensaios espectrofotoméricos foram efectuados da mesma forma descrita para os ensaios similares realizados com o diacetilo.

Os ensaios polarográficos foram efectuados da seguinte forma:

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL (pipeta volumétrica) de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo a percentagem de OFDA em estudo.

(ii) Após 10min de passagem de azoto pela solução, adicionaram-se 50μL de metilglioxal 10^{-2}M (na célula ficou uma concentração de metilglioxal de $2x10^{-5}$M) e,

após passagem de azoto durante 1min pela solução, iniciou-se o registo de polarogramas ao longo do tempo nas mesmas condições descritas em 1.2.1 (ensaios polarográficos).

(iii) Finalmente, adicionou-se à solução resultante 500μL de 2-metilquinoxalina 10^{-3}M (que corresponde a adicionar na célula polarográfica um número de moles de 2-metilquinoxalina equivalente ao número de moles de metilglioxal usados na derivatização) e, após passagem de azoto durante 1min, registou-se o polarograma da solução resultante.

(C) Ensaios com o glioxal

O estudo do efeito da quantidade de OFDA na derivatização do glioxal foi realizado para três concentrações distintas de OFDA - 0,05%, 0,1% e 0,2%. Neste estudo, quer os ensaios com solução HCl 0,1M, quer os ensaios com solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, foram acompanhados por espectrofotometria e por polarografia.

Os ensaios espectrofotométricos foram efectuados da mesma forma que os ensaios anteriores com o diacetilo e metilglioxal.

Os ensaios polarográficos foram realizados da forma seguinte:

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL (pipeta volumétrica) de solução a ensaiar contendo a percentagem de OFDA em estudo.

(ii) Após 10min de passagem de azoto pela solução registou-se o respectivo polarograma (polarograma do branco c/OFDA). Adicionaram-se, depois, 250μL de glioxal 10^{-3}M (na célula ficou uma concentração de glioxal $1x10^{-5}$M) e, após passagem de azoto durante 1min pela solução, iniciou-se o registo de polarogramas da solução em função do tempo nas mesmas condições descritas em 1.2.1 (ensaios polarográficos).

(iii) Por fim, fez-se a adição à célula polarográfica de um número de moles de quinoxalina equivalente ao número de moles de glioxal que se utilizou na derivatização, após o que se procedeu ao registo de um novo polarograma.

(D) Ensaios com a 2,3-pentanodiona

O estudo do efeito da quantidade de OFDA na derivatização da 2,3-pentanodiona foi realizado para três concentrações distintas de OFDA- 0,05%, 0,1% e 0,2%. Para este composto, quer os ensaios com solução HCl 0,1M, quer os ensaios com solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, foram acompanhados somente por espectrofotometria. Os ensaios espectrofotométricos foram preparados da mesma forma que os ensaios similares realizados anteriormente.

Relativamente às condições polarográficas e espectrofotométricas, utilizadas nos ensaios com estes quatro compostos, foram as mesmas que as referidas em 1.2.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nestes ensaios procurou-se caracterizar a influência que a concentração de OFDA tem sobre (1) a velocidade do processo de derivatização e sobre (2) a extensão dessa reacção. Tornou-se, ainda, possível (3) verificar a influência que a concentração de OFDA tem sobre a sensibilidade do processo de análise polarográfica e, no caso particular do diacetilo, foi possível (4) comparar a sensibilidade da sua resposta polarográfica directa com a sensibilidade da sua resposta obtida após derivatização, em duas situações de meio distintas.

Na tabela 1.3, apresenta-se a estimativa do intervalo de tempo necessário para a conversão quantitativa dos compostos α-dicarbonílicos nas respectivas quinoxalinas para diferentes concentrações de OFDA. Observa-se que a reacção de derivatização para a 2,3-pentanodiona e para o diacetilo é rápida e quantitativa para qualquer das concentrações de OFDA testadas. A estabilização do sinal é ligeiramente mais demorada para o metilglioxal e, claramente, mais demorada para o glioxal. Como seria de esperar, para todos os compostos estudados verifica-se que o aumento da concentração de OFDA faz aumentar a rapidez com que se atinge a estabilidade do sinal analítico; é, no entanto, para o glioxal que este efeito se torna mais evidente e importante.

Nas figuras 1.4, 1.5 e 1.6 pode observar-se que, para o diacetilo e para o metilglioxal, a evolução do sinal polarográfico ao longo do tempo está de acordo com a evolução obtida através dos ensaios espectrofotométricos, confirmando a rapidez do processo de derivatização. Para o glioxal, contudo, há diferenças assinaláveis na estimativa do intervalo de tempo necessário para a estabilização do sinal nos ensaios realizados por espectrofotometria e por polarografia, tendo-se obtido, sistematicamente, valores de tempo de estabilização mais elevados nos ensaios espectrofotométricos. A razão subjacente a este facto deverá ser a diferença na temperatura em que os dois ensaios foram realizados; enquanto que os ensaios polarográficos foram realizados em célula termostatizada a 25°C, os ensaios espectrofotométricos foram realizados à temperatura ambiente do laboratório, que era inferior a 25°C.

Tabela 1.3 - Estimativa do intervalo de tempo necessário para a conversão quantitativa dos compostos α-dicarbonílicos da classe I nas respectivas quinoxalinas para diferentes concentrações de OFDA. (Dados obtidos através de ensaios espectrofotométricos, excepto para o glioxal; concentração de compostos α-dicarbonílicos $=10^{-5}$ M).

	Intervalo de tempo para estabilização do sinal								
	Diacetilo			**Metilglioxal**		**2,3-pentanodiona**		**Glioxal****	
% OFDA	HCl 0,1M	Tampão fosfato 0,1M, pH=7	NaHO 0,1M	HCl 0,1M	Tampão fosfato 0,1M, pH=7	HCl 0,1M	Tampão fosfato 0,1M, pH=7	HCl 0,1M	Tampão fosfato 0,1M, pH=7
0,01	210s	270s	600s	—	—	—	—	—	—
0,05	60s	60s	270s	360s	360s	120s	180s	>32min	>32min
0,1	<30s*	<30s*	150s	300s	300s	<30s*	120s	—	20min
0,2	<30s*	<30s*	150s	240s	240s	<30s*	90s	15min	15min

*Corresponde ao intervalo de tempo que se estima que demora as operações de adição da solução de composto α-dicarbonílico ao balão volumétrico, a homogenização e a transferência dessa solução para a célula espectrofotométrica e o início das leituras da absorvância. Desta forma pretende-se indicar que na altura do início da determinação espectrofotométrica o sinal já estava estabilizado.

**Intervalo de tempo estimado a partir dos resultados obtidos nos ensaios polarográficos.

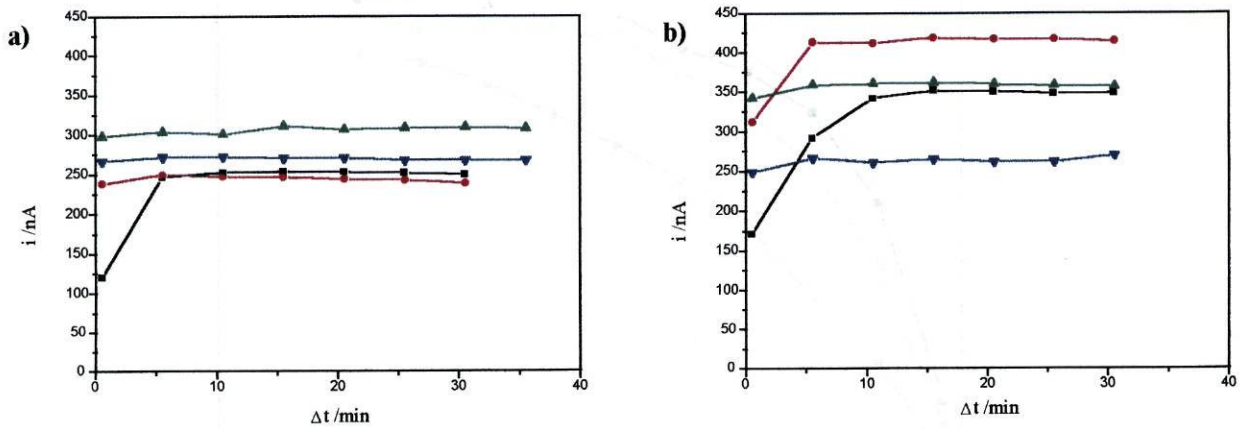


Figura 1.4 - Influência da concentração de OFDA na evolução com o tempo do sinal polarográfico para uma solução de diacetilo $1x10^{-5}$M em derivatização.
a) Solução tampão fosfato 0,1M, pH=7; **b)** Solução de NaHO 0,1M, pH=13.
Concentração de OFDA na solução em reacção: ■- 0,01%; ●- 0,05%, ▲- 0,1%; ▼- 0,2%.

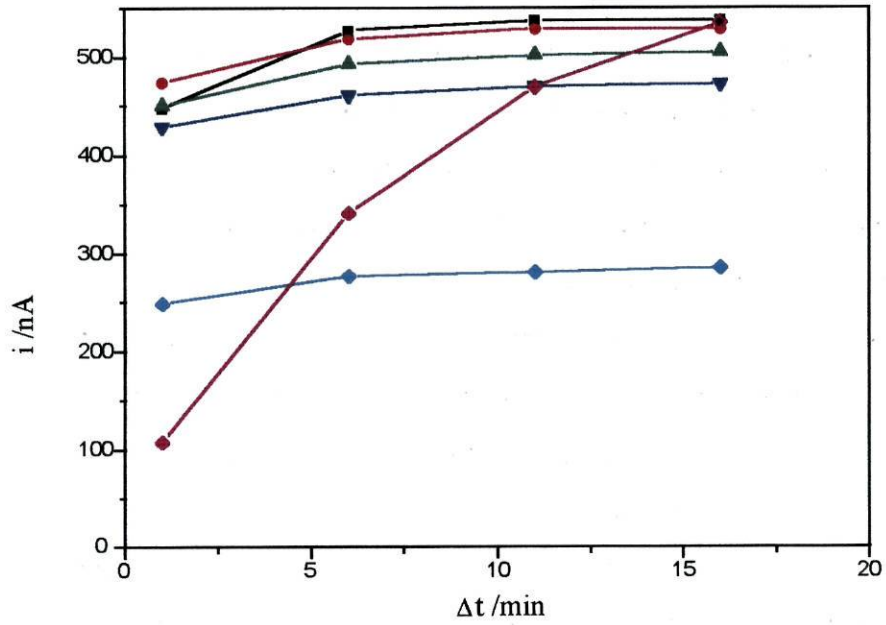


Figura 1.5 - Influência da concentração de OFDA na evolução no tempo do sinal polarográfico do metilglioxal $1x10^{-5}$M em derivatização, em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7.
Concentração de OFDA na solução em reacção: ◆- 0,001%; ■- 0,01%; ●- 0,05%, ▲- 0,1%; ▼- 0,2%; ◆- 1%.

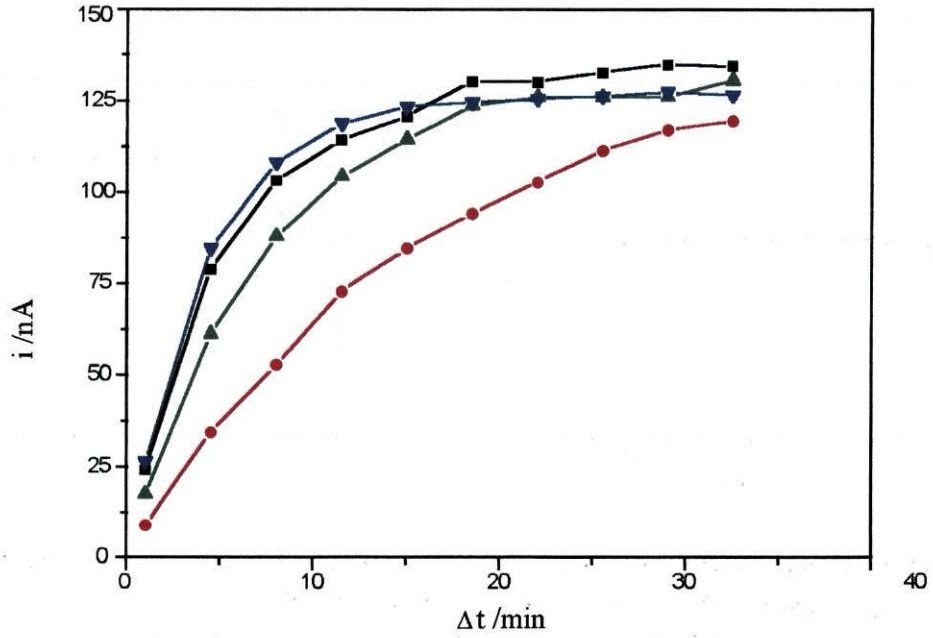


Figura 1.6 - Influência da concentração de OFDA e da temperatura na evolução no tempo do sinal polarográfico do glioxal $1x10^{-5}$M em derivatização, em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7.
Temperatura e concentração de OFDA na solução em reacção:
- Ensaios realizados a 25°C <> ●- 0,05%, ▲- 0,1%; ▼- 0,2%.
- Ensaios realizados a 37°C <> ■- 0,05%.

Embora essa diferença na temperatura também existisse nos ensaios realizados com o diacetilo e o metilglioxal, nesses casos não existiu grande diferença na estimativa do tempo de estabilização do sinal analítico, já que as reacções eram bastante rápidas. Para o glioxal, como a reacção é bastante mais lenta, a variação de temperatura tem uma influência muito mais evidente sobre a velocidade do processo de derivatização, como se verifica na figura 1.6 para os ensaios polarográficos utilizando 0,05% de OFDA, quando realizados à temperatura de 25°C e à temperatura de 37°C. Por esta razão decidiu-se, no caso do glioxal, apresentar os resultados obtidos através dos ensaios polarográficos, à temperatura de 25°C, na elaboração da tabela 1.3.

Através destes ensaios espectrofotométricos e polarográficos foi possível avaliar a extensão da reacção de derivatização. Nos ensaios espectrofotométricos comparou-se a absorvância obtida após a estabilização do sinal relativo à derivatização do composto α-dicarbonílico com a absorvância de uma solução da respectiva quinoxalina, para a mesma concentração, nas mesmas condições de meio. Nos ensaios polarográficos, após a estabilização do sinal polarográfico, adicionou-se um número de moles da quinoxalina respectiva equivalente ao número de moles de composto α-dicarbonílico sujeito a

derivatização e verificou-se qual o aumento da intensidade de corrente de pico resultante dessa adição. Em todas as situações ensaiadas observou-se que a conversão podia ser considerada quantitativa. Para a 2,3-pentanodiona não foi avaliada a extensão da reacção pois não se possuía a quinoxalina que resulta do processo de derivatização, a 2-etil-3-metilquinoxalina. Contudo, por analogia com os outros compostos estudados e atendendo ao seu comportamento muito semelhante ao do diacetilo, parece legítimo admitir-se que a reacção de derivatização deste composto com a OFDA deverá, também, ser quantitativa.

As figuras 1.4, 1.5 e 1.6 permitem também verificar que a intensidade de corrente do pico polarográfico depende ligeiramente da concentração de OFDA presente na solução a analisar. Desta forma, a concentração de OFDA influencia a sensibilidade da técnica polarográfica. No entanto, a problemática do uso da OFDA como agente derivatizante tem outras implicações importantes a nível experimental que resultam da sua relativa instabilidade em solução aquosa. De facto, nestes ensaios foi visível que ao longo do tempo as solução de OFDA amareleciam. Esse amarelecimento pode ser atribuído à lenta decomposição da OFDA para dar origem a compostos do tipo fenazina [84,148,149]. Essa decomposição é suficientemente lenta para se poder utilizar a solução de OFDA no espaço de algumas horas, e pode ser retardada, se necessário, se a solução aquosa de OFDA for guardada ao abrigo da luz, se for mantida a temperatura baixa e se for preparada em meio ácido. De qualquer modo é conveniente que a solução de OFDA seja preparada na altura da utilização. No método espectrofotométrico de análise de diacetilo na cerveja, baseado na reacção de derivatização do diacetilo com a OFDA, os problemas relativos à decomposição da OFDA são minimizados através da realização da reacção em meio ácido forte, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente [19,147]; em alguns métodos envolvendo separação cromatográfica e detecção U.V., a solução de OFDA é estabilizada através da adição de agentes estabilizantes, como por exemplo o 2-mercaptoetanol. Nestes métodos baseados na espectrofotometria o amarelecimento da solução constitui um problema pois a banda da OFDA tende a alargar-se e a sobrepor-se à banda da quinoxalina, mesmo em meio ácido forte. Por tal motivo, nos ensaios espectrofotométricos em função do tempo que se realizou procurou-se compensar a influência da decomposição da solução através da utilização na célula de referência da solução de meio reactivo contendo a mesma quantidade de OFDA utilizada na célula onde a reacção de derivatização estava a decorrer.

Nos ensaios polarográficos em que se utilizaram concentrações de OFDA mais elevadas verificou-se que, ao fim de um certo intervalo de tempo, a solução amarelecia; apesar disso, não se detectou qualquer alteração significativa da resposta polarográfica da solução. Contudo a selecção da concentração de OFDA a utilizar para a realização da reacção de derivatização foi feita atendendo quer ao aumento da velocidade do processo de derivatização com o aumento da concentração de OFDA, quer ao aumento dos problemas associados com a decomposição da solução de OFDA à medida que a concentração do agente derivatizante no meio reactivo aumentava. Na tabela 1.4 referem-se as concentrações de OFDA seleccionadas para a derivatização de cada um dos compostos α-dicarbonílicos da classe I.

Tabela 1.4 - Concentração de OFDA seleccionada para a realização da reacção de derivatização para cada um dos compostos α-dicarbonílicos da classe I.

Composto α-dicarbonílico	Concentração de OFDA (%)
Glioxal	0,1
Metilglioxal	0,05
Diacetilo	0,05
2,3-pentanodiona	0,05

Através dos ensaios em que se realizou a análise polarográfica directa do diacetilo, verificou-se, conforme se observa na figura 1.7, que o diacetilo é um composto activo polarograficamente nesses três meios e, que, em cada um deles, apresenta um único pico. A sensibilidade da análise directa do diacetilo em meio HCl 0,1M e em tampão fosfato 0,1M, pH=7, é semelhante mas em meio NaHO 0,1M aumenta consideravelmente. Mesmo assim, neste último meio, a intensidade de corrente relativa ao pico do diacetilo é cerca de $\frac{1}{4}$ da intensidade do pico correspondente à 2,3-dimetilquinoxalina, para concentrações similares, conforme se pode observar na figura 1.7. De acordo com estes resultados, verifica-se que a determinação polarográfica directa de diacetilo é mais sensível em meio alcalino. Não surpreende, assim, que Sadler e colaboradores[146] tenham escolhido condições de meio fortemente alcalinas para a realização da determinação directa de diacetilo por polarografia diferencial por impulsos, num trabalho recentemente publicado, onde desenvolveram um método polarográfico de

análise de diacetilo em sumos de frutos comerciais. O uso de solução fortemente alcalina apresenta, contudo, certas dificuldades experimentais relacionadas com a pouca estabilidade do diacetilo em meio fortemente alcalino, conforme se verificará nos estudos acerca da estabilidade das soluções de compostos α-dicarbonílicos realizados na Parte IV.

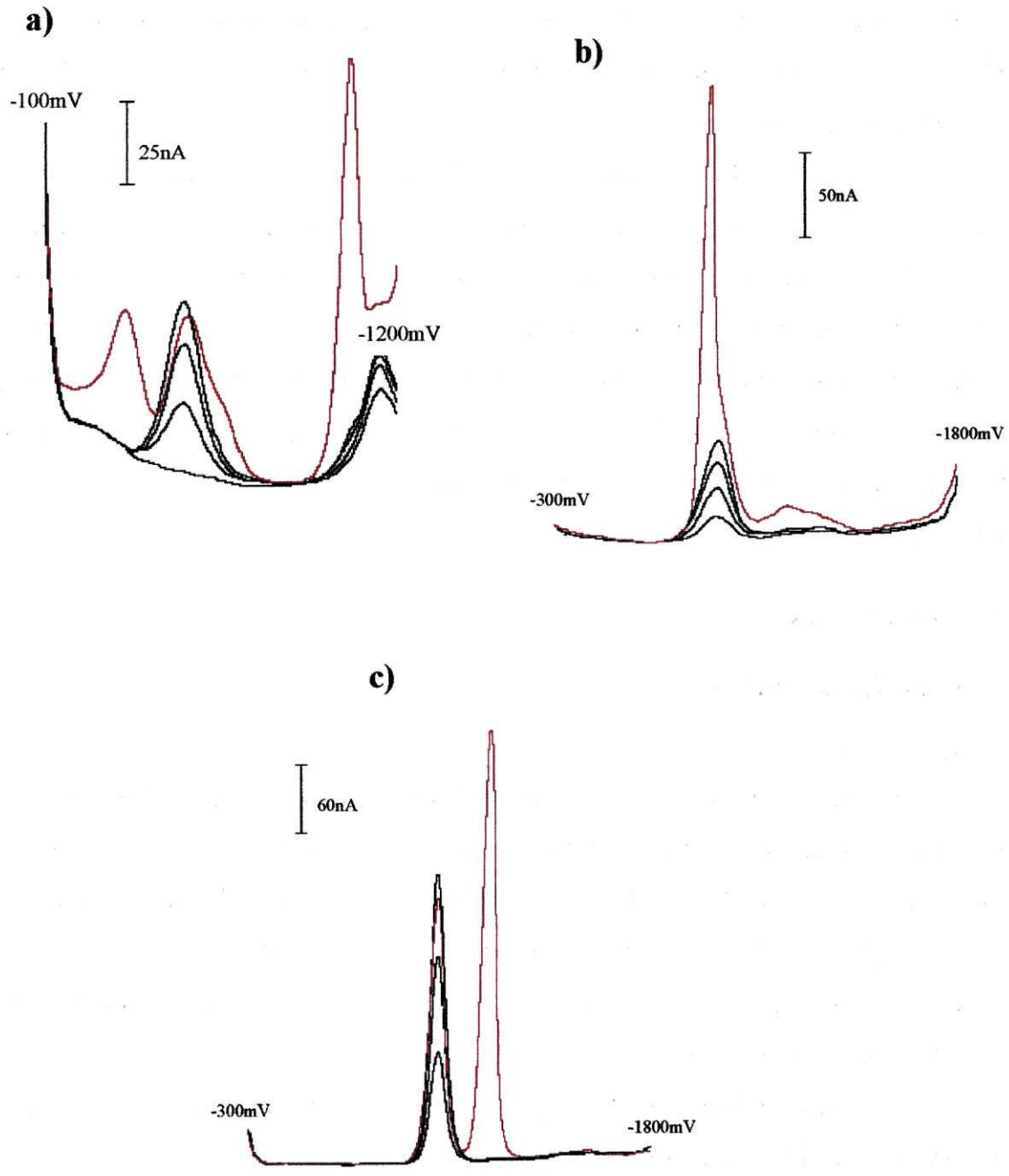


Figura 1.7- Polarogramas obtidos através da adição sucessiva de solução de diacetilo a três soluções tampão distintas com diferentes pH:

a) - HCl 0,1M, pH=1; **b)** - Tampão fosfato 0,1M, pH=7; **c)** - NaHO 0,1M, pH=13.

—— - adições sucessivas de diacetilo ($1x10^{-5}$M, cada adição);

—— - adição de 2,3-dimetilquinoxalina ($1x10^{-5}$M, após adições de diacetilo).

1.2.3 - AVALIAÇÃO DO PROCESSO POLAROGRÁFICO DE ANÁLISE

No sentido de avaliar as características dos processos de análise polarográfica dos quatro compostos α-dicarbonílicos da classe I que foram estudados, elaboraram-se curvas de calibração abrangendo um intervalo de concentrações bastante alargado. Para o diacetilo, o metilglioxal e o glioxal, as curvas de calibração obtidas após derivatização foram comparadas com as obtidas com as respectivas quinoxalinas utilizando como electrólito de suporte a solução tampão contendo a mesma concentração de OFDA utilizada para realizar a derivatização.

Para o diacetilo o estudo foi aprofundado no sentido de comparar as características do método polarográfico desenvolvido com as do método espectrofotométrico que é recomendado pelo EBC ("European Brewing Convention") como método de referência para a análise de diacetilo na cerveja[34], que é baseada na mesma reacção de derivatização, embora a reacção seja realizada em meio ácido. Ainda para o diacetilo, fizeram-se ensaios voltamétricos complementares aos ensaios polarográficos, utilizando o eléctrodo de mercúrio multimodo como eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Ensaios com o diacetilo

Espectrofotometria

Utilizou-se o método espectrofotométrico recomendado pelo EBC ("European Brewing Convention") para a determinação de diacetilo na cerveja, que utiliza como agente derivatizante a OFDA. O método foi adaptado para ser utilizado na análise de soluções aquosas de diacetilo. O procedimento seguido foi o seguinte:

(i) Prepararam-se em balões volumétricos de 25mL várias soluções diluídas com concentração conhecida de diacetilo.

(ii) Dessas soluções retiraram-se 10mL para gobelés de 50mL e adicionaram-se 0,5mL de solução de OFDA 1% em HCl 0,1M.

(iii) Deixou-se a mistura em repouso ao abrigo da luz durante 20 a 30 min.

(iv) Adicionaram-se com uma pipeta volumétrica 2mL de HCl 4M à mistura.

(v) Mediu-se a absorvância da solução resultante a 335nm, utilizando água destilada na célula de referência.

(vi) Preparou-se, da mesma forma, um ensaio em branco em que os 10mL de solução de diacetilo foram substituídos por água destilada.

Polarografia e voltametria

Obtiveram-se gráficos de calibração da 2,3-dimetilquinoxalina em solução tampão fosfato 0,1M com OFDA (0,05%) e sem OFDA, utilizando o eléctrodo de mercúrio multimodo como eléctrodo gotejante (polarografia) e como eléctrodo de gota suspensa (voltametria). Em seguida, procedeu-se ao estabelecimento da curva de calibração de diacetilo em duas fases: em primeiro lugar registaram-se os polarogramas e voltamogramas da solução de diacetilo em solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, antes de juntar a OFDA; de seguida juntou-se a solução de OFDA e, após deixar a solução em reacção durante 10min, registou-se os polarogramas e voltamogramas dessa solução.

Calibração da 2,3-dimetilquinoxalina

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o polarograma e o voltamograma da solução (branco).

(ii) De seguida adicionou-se um dado volume de solução de 2,3-dimetilquinoxalina de concentração conhecida e, após passar azoto durante 1min, registou-se o polarograma e o voltamograma dessa solução.

(iii) Este processo de adição de solução de 2,3-dimetilquinoxalina foi repetido várias vezes por forma a obter um aumento gradual da concentração da espécie na solução em análise.

(iv) Um outro gráfico de calibração de 2,3-dimetilquinoxalina foi obtido numa solução tampão contendo 0,05% de OFDA, utilizando o mesmo procedimento descrito acima,

Calibração de diacetilo

(i) Em balões volumétricos de 25mL, prepararam-se, em tampão fosfato 0,1M, pH=7, várias soluções diluídas de diacetilo com concentração conhecida.

(ii) Para a célula polarográfica mediram-se 20mL de solução a ensaiar, borbulhou-se azoto durante 10min e registou-se o polarograma da solução.

(iii) Adicionaram-se, de seguida, 5mL de solução de OFDA 0,25% em tampão fosfato 0,1M, pH=7 e, após borbulhar azoto durante 10min, registaram-se o polarograma e voltamograma da solução resultante.

(B) Ensaios com o metilglioxal

Calibração da 2-metilquinoxalina

Esta calibração foi realizada pela adição sucessiva de solução de 2-metilquinoxalina à solução tampão fosfato 0,1M, pH=7. Fizeram-se dois ensaios, num a solução continha 0,05% de OFDA e no outro a solução não continha OFDA. O procedimento seguido foi análogo à calibração da 2,3- dimetilquinoxalina.

Calibração de metilglioxal

(i) Para a célula polarográfica mediram-se, rigorosamente, 25mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,05% de OFDA.

(ii) Adicionou-se um volume rigoroso de solução de metilglioxal com concentração conhecida, por forma a que na célula polarográfica ficasse a concentração desejada; borbulhou-se azoto na solução durante 10min e registou-se o polarograma da solução.

(iii) Borbulhou-se azoto, mais 10min, pela solução e registou-se um novo polarograma.

(iv) Por fim adicionou-se à solução uma quantidade de 2-metilquinoxalina equivalente, em número de moles, à quantidade de metilglioxal que foi derivatizada e, após passar 1min de azoto pela solução, registou-se um novo polarograma.

(C) Ensaios com o glioxal

Calibração da quinoxalina

A calibração foi realizada através da adição sucessiva de solução de quinoxalina à solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,1% de OFDA, analogamente à calibração da 2,3-dimetilquinoxalina descrita acima.

Calibração de glioxal

O procedimento experimental utilizado foi idêntico ao seguido na calibração do metilglioxal; contudo, neste caso utilizou-se 0,1% de OFDA em vez de 0,05%; o tempo de reacção foi também diferente, tendo-se registado um primeiro polarograma ao fim de 20min de reacção e um segundo ao fim de 30min em reacção, para verificar se existia variação no sinal polarográfico durante esse período.

(D) Ensaios com a 2,3-pentanodiona

Como não se possuía a quinoxalina que resulta da derivatização da 2,3-pentanodiona com a OFDA, só se realizou a calibração da 2,3-pentanodiona. O procedimento experimental seguido foi idêntico ao descrito para a calibração do metilglioxal.

As condições polarográficas utilizadas para a obtenção da curva de calibração foram as seguintes:

tgota = 1s;

amplitude de impulso = 50mV (impulso catódico);

velocidade de varrimento = 6mV/s;

intervalo de potencial: -400mV a -1400mV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas figuras 1.8 e 1.9 estão representadas as curvas de calibração para o diacetilo obtidas através do método polarográfico e através do método espectrofotométrico. Na figura 1.10 estão representadas as curvas de calibração polarográficas e voltamétricas para a 2,3-dimetilquinoxalina na ausência e na presença de 0,05% de OFDA; o uso de OFDA, neste último caso, serve para simular as condições de meio que resultam num ensaio em que se realiza a derivatização. A partir dessas curvas é possível verificar que:

(1) para a extensa gama de concentrações de diacetilo testada verifica-se que existe proporcionalidade directa entre o sinal analítico medido instrumentalmente e a concentração da espécie na solução a analisar nas determinações polarográficas, voltamétricas e espectrofotométricas;

(2) as representações gráficas obtidas na análise polarográfica da solução de diacetilo após derivatização e com a solução de 2,3-dimetilquinoxalina, nas mesmas condições de meio, são praticamente coincidentes;

(3) pela comparação dos resultados obtidos através do método espectrofotométrico e através dos métodos polarográfico e voltamétrico, verifica-se que estes dois últimos métodos são apreciavelmente mais sensíveis;

(4) a presença de OFDA afecta muito mais a sensibilidade do método voltamétrico do que a sensibilidade do método polarográfico, para a análise da 2,3-dimetilquinoxalina.

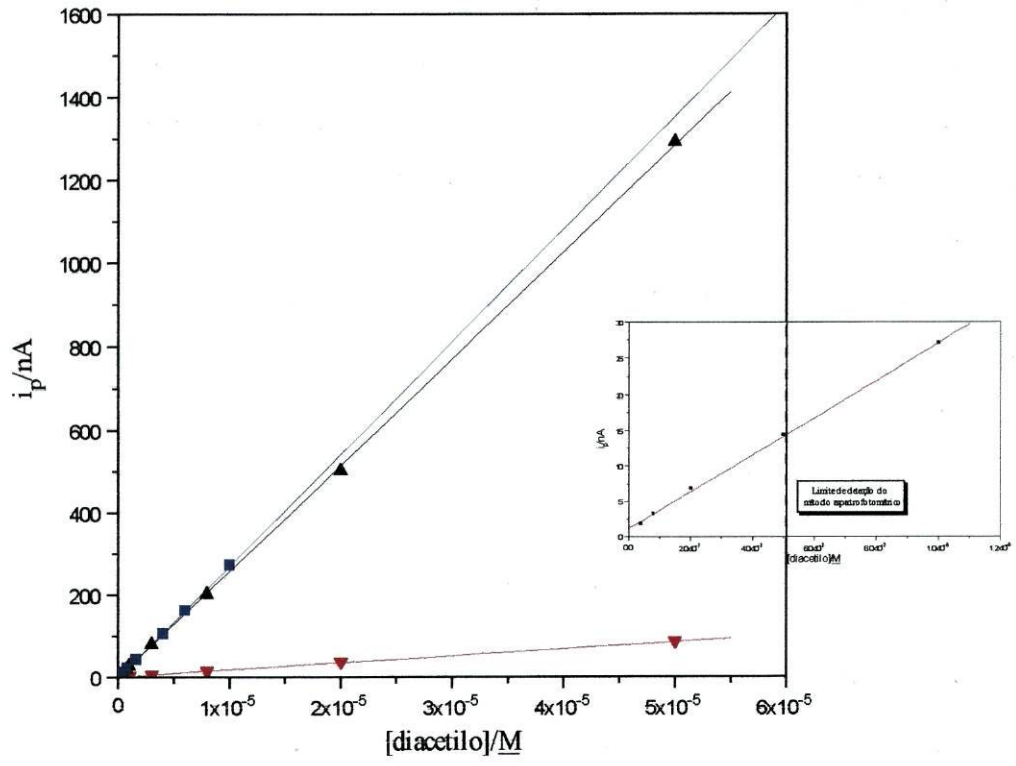


Figura 1.8 - Curvas de calibração de diacetilo obtidas por polarografia: (▲) após derivatização e (▼) análise directa.
Curva de calibração da 2,3-dimetilquinoxalina obtida por polarografia: (■) em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,05% de OFDA.
Em destaque a representação dos pontos da curva de calibração polarográfica de diacetilo cuja concentração é inferior ao limite de detecção do método espectrofotométrico.

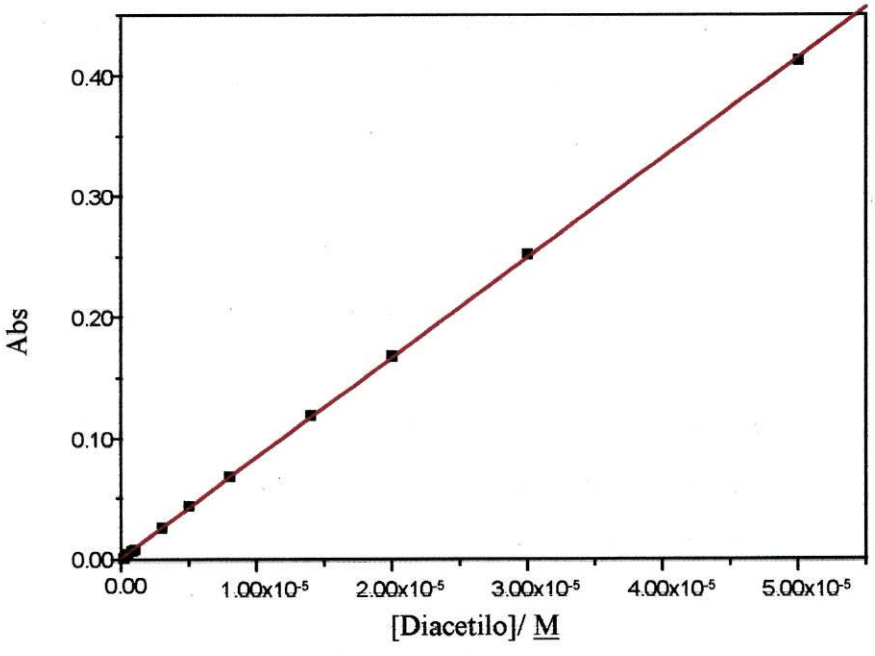
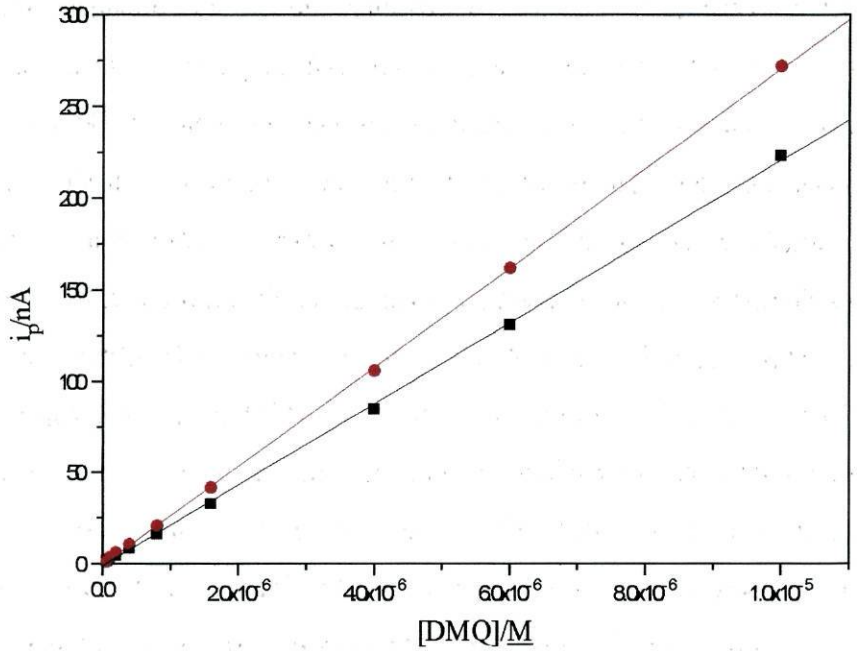


Figura 1.9 - Curva de calibração de diacetilo obtida através do método de análise espectrofotométrica recomendado pelo EBC ("European Brewing Convention")[34].

Relativamente ao aspecto (1), a existência de proporcionalidade directa entre o sinal analítico e a concentração da espécie em análise permite que a quantificação da concentração numa amostra seja realizada através de métodos de quantificação de aplicação generalizada em análise química como são o método da curva de calibração e o método de adição sucessiva de solução padrão. O aspecto (2) permite concluir que em toda a gama de concentrações testada a conversão de diacetilo em 2,3-dimetilquinoxalina se pode considerar quantitativa. Relativamente ao aspecto (3), obteve-se um limite de detecção do método polarográfico de cerca de $5x10^{-8}\underline{M}$ (a que corresponde uma pico polarográfico com uma intensidade de corrente de cerca de 1,5nA) e um limite de detecção do método espectrofotométrico de cerca de $5x10^{-7}\underline{M}$ (a que corresponde um valor de absorvância de cerca de 0,004); quer isto dizer que o método polarográfico é cerca de 10 vezes mais sensível que o método espectrofotométrico. O aspecto (4) realça a importância das condições experimentais na sensibilidade das técnicas electroquímicas, justificando os cuidados que se devem ter quando se selecciona o método mais apropriado para fazer a quantificação.

Conforme se observa através da figura 1.10, a sensibilidade da determinação de 2,3-dimetilquinoxalina no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa diminui acentuadamente na presença de 0,05% OFDA; no entanto, quando se utiliza o eléctrodo de mercúrio gotejante, na presença de OFDA verifica-se um ligeiro aumento de sensibilidade. Estes resultados mostram que os resultados obtidos com o eléctrodo de mercúrio gotejante não são tão afectados pela presença de OFDA no meio em análise. Contudo, a sensibilidade da técnica de análise polarográfica não é independente das características do meio; deste modo, como na análise de amostras reais é, na maioria das vezes, impossível reproduzir nas soluções padrão utilizadas as mesmas propriedades físicas e químicas das amostras - como por exemplo, a viscosidade, a força iónica, o pH - será de esperar que o método da curva de calibração possa vir a dar origem a resultados com exactidão duvidosa[150,151,152]. Nestas situações o método de adição sucessiva de padrão é mais apropriado, podendo ser aplicado em diversas modalidades[150]: (i) variação do volume da solução padrão e volume constante de solução problema, mantendo constante o volume total; (ii) variação dos volumes totais de solução padrão e de solução problema, de forma que a soma desses dois volumes permaneça constante; e (iii) variação do volume de solução padrão e manutenção do volume de solução problema constante, obtendo-se um volume total variável.

a)



b)

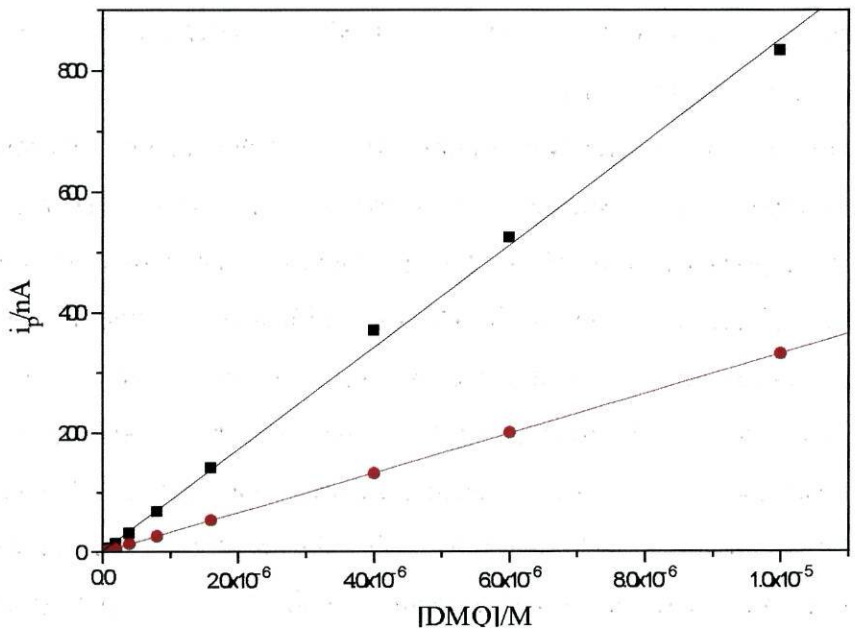


Figura 1.10 - Curva de calibração da 2,3-dimetilquinoxalina em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7: (■) sem OFDA e (●) com 0,05% de OFDA no meio.
a) Utilizando o eléctrodo de mercúrio gotejante (DME);
b) Utilizando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE).

O método da adição directa de solução padrão à solução amostra contida na célula polarográfica será o processo de quantificação mais adequado nas técnicas polarográficas. Para que os resultados obtidos sejam representativos existem, contudo, alguns cuidados que devem ser observados: o volume da solução padrão adicionada deve ser pequeno relativamente ao volume total de solução, para evitar que ocorram alterações significativas nas propriedades da solução a analisar; os incrementos de concentração da espécie em análise resultantes da adição da solução padrão devem situar-se num intervalo de concentrações em que se verifique existir linearidade entre a intensidade de corrente de pico e a concentração da espécie.

Nas figuras 1.11, 1.12 e 1.13 estão representadas as curvas de calibração para o metilglioxal, o glioxal e a 2,3-pentanodiona obtidas por polarografia. Tal como para o diacetilo, também para estes três compostos existe proporcionalidade directa entre a intensidade de corrente do pico polarográfico e a concentração da espécie a analisar, para uma extensa gama de concentrações. Igualmente se verifica que as curvas de calibração obtidas com o metilglioxal e o glioxal após derivatização e com as correspondentes quinoxalinas são praticamente coincidentes, o que demonstra que a reacção de derivatização é quantitativa em toda a gama de concentrações testada. Constata-se, também, que a sensibilidade da técnica polarográfica para os quatro compostos α-dicarbonílicos desta classe é semelhante, pelo que os seus limites de detecção são idênticos ao valor estimado para o diacetilo, ou seja $5x10^{-8}$M.

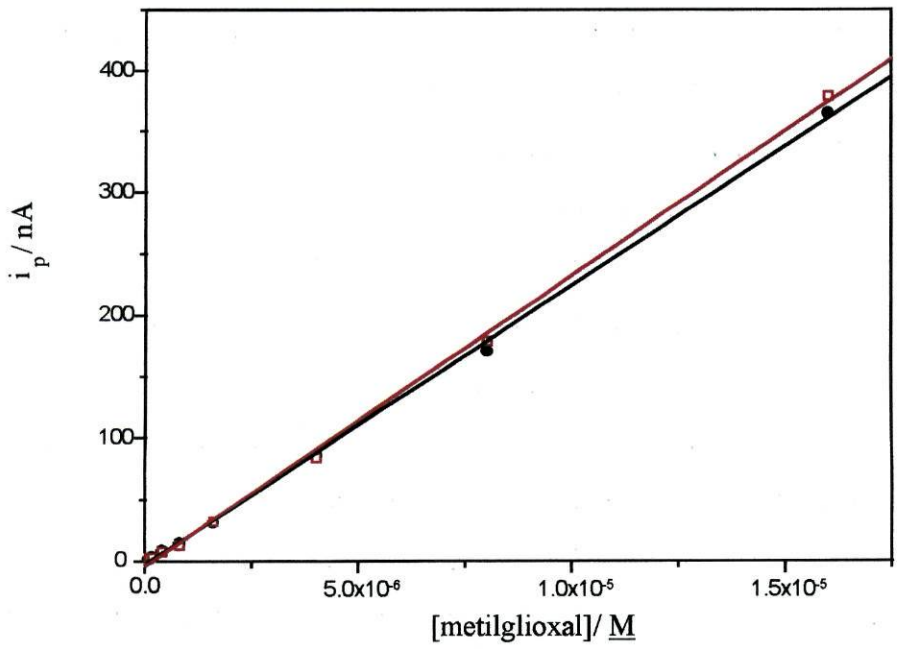


Figura 1.11 - Curvas de calibração obtidas por polarografia: (□) de metilglioxal após derivatização com 0,05% de OFDA e: (●)de 2-metilquinoxalina em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,05% de OFDA.

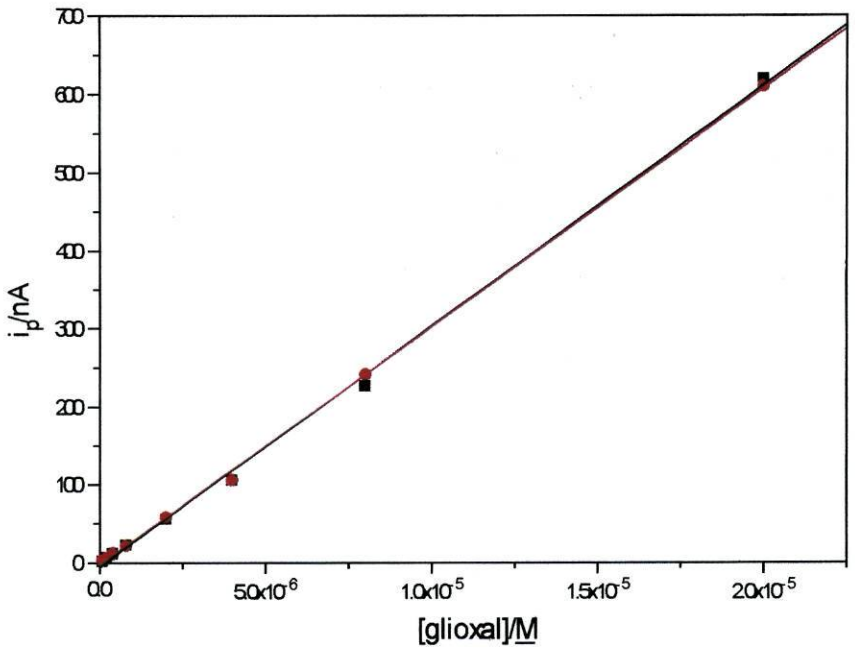


Figura 1.12 - Curvas de calibração obtidas por polarografia: (●) de glioxal após derivatização com 0,1% de OFDA e: (■) da quinoxalina em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,1% de OFDA.

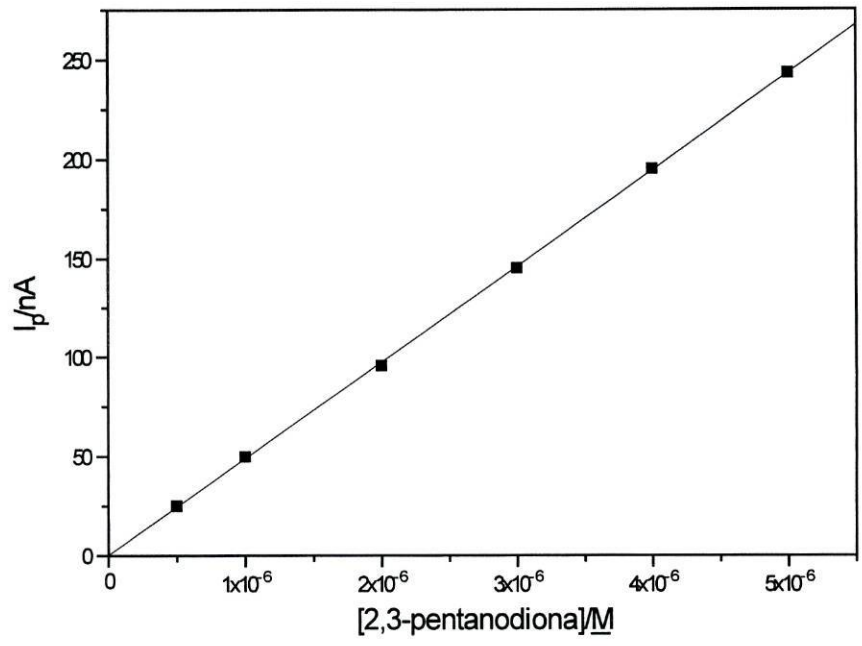


Figura 1.13 - Curva de calibração da 2,3-pentanodiona obtida por polarografia após derivatização com 0,05% de OFDA.

2 - ANÁLISE DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE II

A sequência de operações para a análise polarográfica dos compostos α-dicarbonílicos desta classe envolve, tal como para os compostos da classe I, um primeiro passo de derivatização e só depois a realização da análise das hidroxiquinoxalinas resultantes.

O desenvolvimento das condições mais adequadas para a realização da reacção de derivatização abrangeu, tal como aconteceu para os compostos α-dicarbonílicos da classe I, o estudo da (1) influência das condições de meio reactivo e da (2) quantidade de OFDA na extensão e na velocidade do processo de derivatização. A temperatura é, igualmente, um parâmetro experimental importante, com reflexo, sobretudo, na velocidade da reacção de derivatização; contudo, devido ao aumento da instabilidade da OFDA a temperatura elevada, decidiu-se fixar a temperatura em 25°C.

Após a selecção das condições de reacção mais adequadas para a derivatização dos α-cetoácidos ensaiados neste estudo (ácido glioxílico, ácido pirúvico e ácido α-cetoglutárico), procedeu-se à selecção das condições mais adequadas para a realização da análise polarográfica das hidroxiquinoxalinas resultantes. Por fim, fez-se a avaliação das características analíticas dos métodos de análise polarográfica desenvolvidos para cada um dos três compostos considerados.

2.1 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES AQUOSAS

Prepararam-se soluções aquosas de partida dos três α-cetoácidos estudados com concentração $5x10^{-2}$M. As características dos reagentes (*Aldrich*) e o modo de preparação das soluções aquosas de partida estão descritos na tabela 2.1.

Os reagentes foram utilizados como recebidos, não tendo sofrido qualquer purificação adicional.

As soluções mais diluídas foram obtidas por diluição rigorosa das soluções de partida. Quer as soluções de partida, quer as soluções diluídas eram relativamente pouco estáveis e, por isso, decidiu-se prepará-las no dia de utilização.

Tabela 2.1 - Características dos α-cetoácidos utilizados e modo de preparação das soluções de partida com concentração $5x10^{-2}$M.

Composto	**Características do reagente comercial**	**Modo de preparação das soluções de partida $5x10^{-2}$M**
ácido glioxílico	Solução aquosa 50% (m/m)	pesou-se rigorosamente cerca de 0,74g de solução concentrada de ácido glioxílico e diluiu-se rigorosamente a 100mL
piruvato de sódio	Sólido 99%	pesou-se rigorosamente cerca de 0,55g de piruvato de sódio e diluiu-se rigorosamente a 100mL
α-cetoglutarato de sódio	Sólido 99%	pesou-se rigorosamente cerca de 0,95g de α-cetoglutarato de sódio e diluiu-se rigorosamente a 100mL

2.2 - OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE

2.2.1 - SELECÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO

A selecção das condições de derivatização dos compostos α-dicarbonílicos da classe II começou por ser realizada utilizando como composto de referência o ácido glioxílico, que é o composto com estrutura mais simples desta classe. As condições seleccionadas foram depois aplicadas ao ácido pirúvico

No estudo realizado sobre as características de redução polarográfica das hidroxiquinoxalinas verificou-se que elas eram activas polarograficamente em todas as soluções tampão que foram testadas como electrólito de suporte, muito embora para as soluções tampão cujo valor de pH era superior a 9 se tenha verificado que o sinal tendia a tornar-se mais pequeno e o pico a tornar-se mais largo.

Neste estudo, ao contrário do que aconteceu com os compostos α-dicarbonílicos da classe I, em que a evolução da reacção de derivatização foi acompanhada na própria célula polarográfica, através do registo periódico de polarogramas da solução em reacção, realizou-se a reacção de derivatização fora da célula polarográfica e acompanhou-se a evolução da reacção através da amostragem periódica da solução em reacção, para ser analisada polarograficamente. A razão que motivou o uso deste tipo de procedimento foi o facto de se ter verificado que para estes compostos a reacção só ocorria em meio bastante ácido e que a acidez do meio influenciava fortemente a evolução da reacção. Desta forma, modificando as condições de pH do meio era possível, por um lado manter aproximadamente constantes as condições para a análise polarográfica nos diferentes ensaios e por outro lado, parar a reacção de derivatização na altura da amostragem.

2.2.1.1 - Derivatização do ácido glioxílico com a OFDA em diferentes condições de meio

Neste estudo pretendeu-se testar a importância das condições de meio reactivo, particularmente do pH, no decurso da reacção entre o ácido glioxílico e a OFDA. Para tal ensaiaram-se quatro soluções tampão distintas: HCl 1M; tampão acetato 1M, pH=5; tampão amoniacal 1M, pH=9; e NaHO 1M. A concentração de OFDA no meio reactivo foi fixada em 1% e a concentração de ácido glioxílico foi fixada em $2{,}5 \times 10^{-4}$M. A

evolução da reacção foi acompanhada polarograficamente retirando pequenas porções da solução em reacção que eram analisadas em meio HCl 0,1M.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Derivatização do ácido glioxílico

(i) Para um balão de fundo redondo de 250mL, colocado num banho termostático a 25ºC, adicionaram-se 50mL da solução tampão em estudo e juntaram-se 0,5g de OFDA.
(ii) Após deixar a solução em repouso no banho durante cerca de 5min, para equilibrar a temperatura, adicionaram-se 250μL de solução de ácido glioxílico $5x10^{-2}$M, agitou-se para homogeneizar a solução e colocou-se de novo no banho.
(iii) Periodicamente fizeram-se recolhas de 1,00mL dessa solução para análise polarográfica.

Análise polarográfica

Para a célula polarográfica mediram-se rigorosamente 25mL de solução HCl 0,1M e deixou-se borbulhar azoto durante 10min. Adicionou-se 1,00mL da solução que se encontrava em reacção, deixou-se borbulhar azoto durante mais 1min e registou-se o polarograma da solução.

A evolução da reacção com o tempo foi acompanhada pelo registo periódico de polarogramas. Após se verificar a estabilização do sinal em dois polarogramas consecutivos adicionaram-se, à solução na célula polarográfica, 250μL de solução de 2-hidroxiquinoxalina 10^{-3}M, o que correspondeu a adicionar um número de moles de 2-hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido glioxílico que eram retirados da solução em reacção, com o objectivo de verificar a percentagem de conversão obtida na derivatização, a partir do incremento de sinal observado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com este estudo pretendeu-se avaliar as condições de meio para as quais ocorria a reacção de derivatização. Nos quatro meios ensaiados só se verificou a ocorrência da reacção de derivatização em extensão apreciável em meio HCl 1M. Este resultado está de acordo com as considerações fundamentais relativas ao mecanismo desta reacção que foram feitas na parte I; nessa altura referiu-se que a derivatização envolvia um ataque nucleófilo ao grupo carboxílico que tinha que se encontrar protonado, o que implicava que o meio reactivo teria que ser ácido (Parte I, secção 2.3.1.). Nos outros três meios

ensaiados observou-se o aparecimento de um pequeno sinal, idêntico nos três meios, com a particularidade de não aumentar ao longo do tempo, conforme se ia procedendo a recolhas da solução em reacção. Devido a este comportamento admitiu-se que a origem desse pico resultasse da ocorrência da reacção de derivatização na própria célula polarográfica, já que o meio utilizado na análise polarográfica era solução HCl 0,1M e a solução recolhida para a análise continha ácido glioxílico e OFDA. Desta forma verificou-se que o uso de solução HCl 0,1M como electrólito de suporte para a análise polarográfica não foi a escolha mais adequada, já que a reacção de derivatização podia continuar a ocorrer nessas condições de meio. Tal situação não inviabilizou, contudo, as conclusões sobre a ocorrência da reacção de derivatização nas diferentes soluções tampão ensaiadas.

No ensaio em que a derivatização foi realizada em meio HCl 1M avaliou-se a extensão da reacção através da verificação do aumento do pico polarográfico quando, após a estabilização do sinal, se adicionou um número de moles de 2-hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido glioxílico recolhidos da solução em reacção. Através desse ensaio verificou-se que o aumento do pico polarográfico era menor que o esperado aumento para o dobro. Deste modo este ensaio indicava que o grau de conversão seria superior a 100%, desde que se verificasse proporcionalidade entre a altura do pico e a concentração de 2-hidroxiquinoxalina em solução, o que não havia sido ainda verificado.

2.2.1.2 - Calibração preliminar da 2-hidroxiquinoxalina

Em face dos resultados obtidos nos ensaios precedentes relativos ao grau de conversão obtidos na derivatização, decidiu-se estabelecer preliminarmente uma curva de calibração da 2-hidroxiquinoxalina em duas condições de meio distintas:

- em HCl 0,1M, a solução utilizada nos ensaios anteriores;
- em tampão acetato 0,1M, pH=5.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25,00mL de electrólito, deixou-se borbulhar azoto pela solução durante 10min e registou-se o polarograma dessa solução (branco).

(ii) Adicionou-se, de seguida, um dado volume de solução de 2-hidroxiquinoxalina com concentração conhecida e, após deixar borbulhar azoto durante 1min, registou-se o polarograma dessa solução.

(iii) O mesmo procedimento foi utilizado para as adições de solução de 2-hidroxiquinoxalina seguintes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2.1 representam-se os dois gráficos de calibração obtidos. Conforme se constata, a relação que se estabelece entre a concentração da 2-hidroxiquinoxalina e a intensidade de corrente do pico polarográfico não é uma relação linear mas sim, uma relação curvilínea. O encurvamento é mais acentuado para os ensaios realizados em meio HCl 0,1M, embora também seja notório no ensaio realizado com a solução tampão acetato 0,1M, pH=5. Esta falta de linearidade pode explicar os valores de grau de conversão superiores a 100% que foram observados nos ensaios anteriores.

Para além da falta de linearidade observou-se, igualmente, que os picos polarográficos obtidos alargavam à medida que a concentração de 2-hidroxiquinoxalina aumentava na solução em análise.

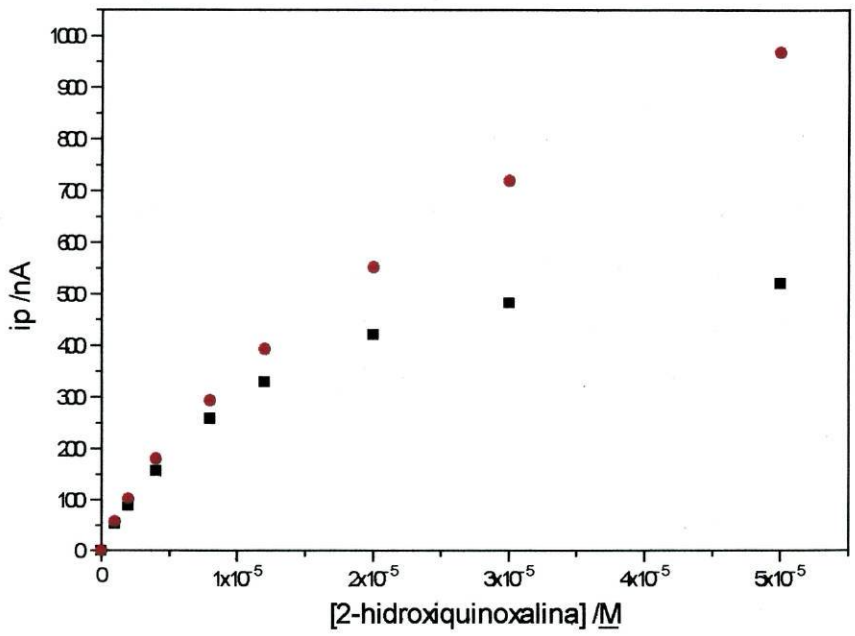


Figura 2.1 - Curvas de calibração da 2-hidroxiquinoxalina obtidas por polarografia: (■) em solução HCl 0,1M; (●) em solução tampão acetato 0,1M, pH=5.

2.2.1.3 - Influência da acidez no processo de derivatização do ácido glioxílico

Nestes ensaios procurou-se caracterizar a influência da acidez na velocidade e na extensão da reacção de derivatização. A principal dificuldade encontrada na realização destes ensaios foi arranjar um modo eficaz de controlar a acidez da solução onde iria decorrer a reacção de derivatização dado que, sendo a OFDA uma base diprótica, a adição deste composto ao meio reactivo modifica a concentração de $H^+(aq)$. Através de um conjunto de ensaios muito simples fez-se a caracterização do modo como varia o pH da solução de OFDA 1% com a adição de HCl. Esses ensaios consistiram na adição sucessiva de solução de HCl a um gobelé contendo 25mL de uma solução de OFDA 1% (esta solução continha, desta forma, cerca de 2,3mmoles de OFDA) e na medição do pH da solução resultante dessas adições. O conjunto de valores obtidos encontra-se registado na tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Variação do pH de uma solução de OFDA 1% em função do nº de moles de HCl adicionado (Vinicial = 25mL; nº de mmoles de OFDA inicial = 2,3).

nº mmoles de HCl adicionadas	pH
0	8,04
0,025	6,99
0,050	6,68
0,30	5,86
1,30	5,05
2,30	4,41
5,0	1,4
10,0	0,9

Estes resultados mostram que a acidez do meio em que decorre a reacção de derivatização tem de ser bem controlada. Para tal decidiu-se efectuar a medição potenciométrica do pH, utilizando um eléctrodo de vidro, apesar de poder existir uma certa falta de exactidão na medição do pH de soluções fortemente ácidas devido ao denominado erro ácido[153].

Atendendo às curvas de calibração obtidas para a 2-hidroxiquinoxalina realizou-se a análise polarográfica em meio tampão acetato 0,1M, pH=5, e reduziu-se a porção da

solução em reacção que era recolhida para a análise polarográfica para 0,250mL, por forma a que a concentração na célula se encontrasse numa zona de concentração menos afectada pela curvatura do gráfico de calibração. Dessa forma, conseguia-se obter uma estimativa mais aproximada do grau de conversão do ácido glioxílico em 2-hidroxiquinoxalina.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Derivatização do ácido glioxílico

(i) Para um gobelé deitaram-se 20mL de água e juntaram-se 0,125g de OFDA (concentração de OFDA no meio reactivo = 0,5%).

(ii) De uma bureta adicionou-se solução de HCl 1M até se obter o valor de pH pretendido, medido potenciometricamente.

(iii) Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 25mL, diluiu-se e transferiu-se para um balão de fundo redondo que era colocado num banho termostático a 25°C.

(iv) Após deixar a solução em repouso durante 5min para equilibrar a temperatura, adicionaram-se 125μL de solução de ácido glioxílico $5x10^{-2}$M, homogeneizou-se a solução e periodicamente procedeu-se à recolha de 0,250mL dessa solução para a realização da análise polarográfica.

Análise polarográfica

Para a célula polarográfica mediram-se rigorosamente 25mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=5, e deixou-se borbulhar azoto durante 10min. Adicionou-se 0,250mL da solução que se encontrava em reacção, deixou-se borbulhar azoto durante mais 1min e registou-se o polarograma dessa solução.

A evolução da reacção com o tempo foi acompanhada pelo registo periódico de polarogramas. Após se verificar a estabilização do sinal em dois polarogramas consecutivos adicionaram-se 250μL de solução de 2-hidroxiquinoxalina 10^{-3}M, correspondentes à adição de um número de moles de 2-hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido glioxílico que se retiraram da solução em reacção, com o objectivo de verificar a percentagem de conversão obtida na derivatização, a partir do incremento de sinal resultante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2.3 podem observar-se os resultados obtidos em condições de pH distintas, relativos à evolução da reacção de derivatização com o tempo. Em quase todas as situações de pH ensaiadas, fizeram-se recolhas da solução em reacção em três instantes de tempo. Conforme se pode comprovar na figura 2.2, onde se representa o grau de conversão obtido ao fim de três intervalos de tempo em reacção para distintas condições de pH do meio ensaiadas, a reacção atinge mais rapidamente um valor estável nos ensaios com pH maiores; porém, o grau de conversão nessas condições é bastante baixo. O grau de conversão aumenta à medida que o pH do meio reactivo diminui. Para valores de pH muito baixos, embora a extensão da reacção obtida se mantenha elevada, a velocidade da reacção tem tendência para diminuir. A partir destes resultados conclui-se que as condições de pH de meio reactivo mais apropriadas para a realização da reacção de derivatização se situam no intervalo entre 1,5 e 0,5.

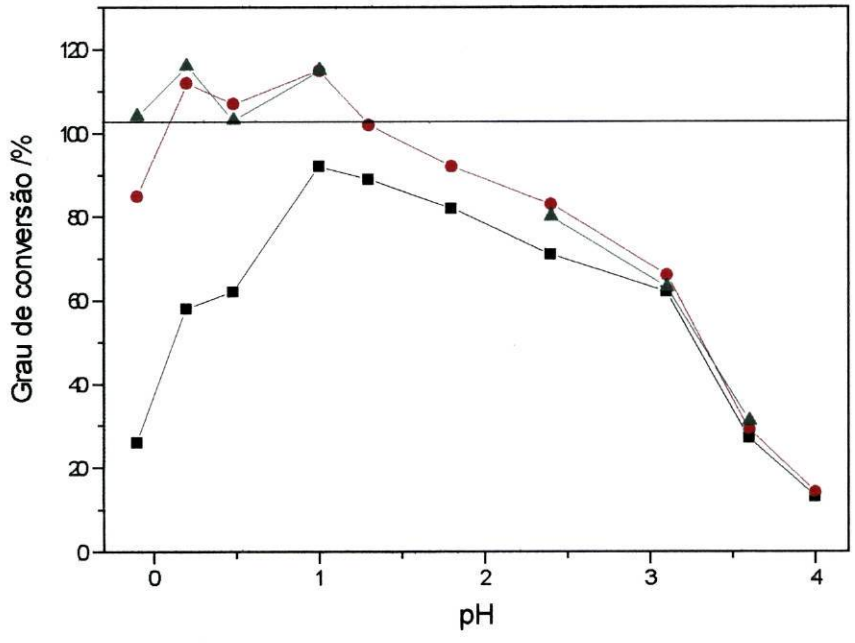


Figura 2.2 - Estimativa do grau de conversão do ácido glioxílico em 2-hidroxiquinoxalina para diferentes condições de pH. Recolhas de amostras da solução em reacção realizadas ao fim de (■) 3, de (●) 20 e de (▲) 40 min em reacção.
(Concentração de OFDA no meio reactivo = 0,5%; concentração de ácido glioxílico = $2{,}5 \times 10^{-4}$M; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

Tabela 2.3 - Evolução da reacção de derivatização do ácido glioxílico com o tempo em diferentes condições de pH de meio reactivo (Conc. de ácido glioxílico = $2,5x10^{-4}$M; conc. OFDA = 0,5%; volume de solução retirada para análise = 0,250mL; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

pH	tempo em reacção (min)	int. corrente pico (nA)	% conversão
4,85	3;20;40	-	-
4,0	3	12,5	13
	20	14,1	14
3,6	3	24,8	27
	20	26,7	29
	40	28,5	31
3,1	3	56,4	62
	20	60,9	66
	40	58,3	63
2,4	3	65,0	71
	20	72,8	83
	40	71,7	80
1,8	3	71,6	82
	20	80,1	92
1,3	3	77,1	89
	20	87,9	102
1,0	3	80,4	92
	20	96,4	115
	40	96,3	115
0,5	3	58,8	62
	20	89,3	107
	40	90,8	103
0,2	3	49,6	58
	20	95,2	112
	40	97,7	116
-0,10	3	22,3	26
	20	72,6	85
	40	89,1	104

Os graus de conversão obtidos devem, contudo, ser observados com alguma cautela relativamente à sua exactidão, pois, devido à falta de proporcionalidade entre a concentração da 2-hidroxiquinoxalina e a altura dos picos polarográficos, o valor obtido conterá um certo erro por excesso. Este facto não impede, no entanto, que se tirem conclusões, em termos relativos, quanto à velocidade da reacção de derivatização e à sua extensão nas diferentes condições de pH ensaiadas; porém, o valor do grau de conversão em termos absolutos é impossível de determinar através destes ensaios.

2.2.1.4 - Influência da concentração de OFDA no processo de derivatização do ácido glioxílico

Nestes ensaios pretendeu-se caracterizar a influência da concentração de OFDA na velocidade e extensão da reacção de derivatização. Tal como nos ensaios anteriores, para se poder comparar os resultados foi necessário controlar a acidez do meio, para o que se voltou a utilizar o eléctrodo de vidro. O procedimento experimental foi idêntico ao utilizado nos ensaios anteriores, com a excepção de que a quantidade de OFDA variou consoante o ensaio e o pH foi ajustado para o valor 0,8. O acompanhamento da evolução da reacção ao longo do tempo foi feito do mesmo modo que nos ensaios anteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2.4 resume-se o conjunto de resultados obtidos para as várias concentrações de OFDA ensaiadas. Na figura 2.3, representa-se o grau de conversão obtido nos três instantes de tempo em que a solução em reacção foi analisada polarograficamente, para as várias percentagens de OFDA que foram ensaiadas na solução em derivatização. Conforme se pode verificar, a velocidade da reacção é muito influenciada pela concentração de OFDA no meio reactivo. Os resultados obtidos permitem, igualmente, concluir que a reacção decorre em grande extensão, para todas as concentrações de OFDA ensaiadas, verificando-se que o intervalo de tempo necessário para atingir a estabilidade do sinal é maior para as concentrações de OFDA mais baixas, tal como seria de esperar.

Tabela 2.4 - Evolução da reacção de derivatização do ácido glioxílico com o tempo em função da concentração de OFDA (Conc. de ácido glioxílico = $2{,}5 \times 10^{-4}$M; pH=0,8; volume de solução retirada para análise = 0,250mL; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

%OFDA	tempo em reacção/ min	int. corrente pico/ nA	% conversão
0,02	3	7,05	8
	20	30,5	33
	40	50,3	54
0,1	3	28,6	33
	20	85,9	99
	40	96,9	111
0,2	3	49,1	59
	20	92,1	110
	40	92,7	108
0,5	3	68,5	77
	20	92,7	110
	40	92,4	109
1	3	81,8	102
	20	89,3	113
	40	87,1	109
2	3	85,1	108
	20	85,7	109

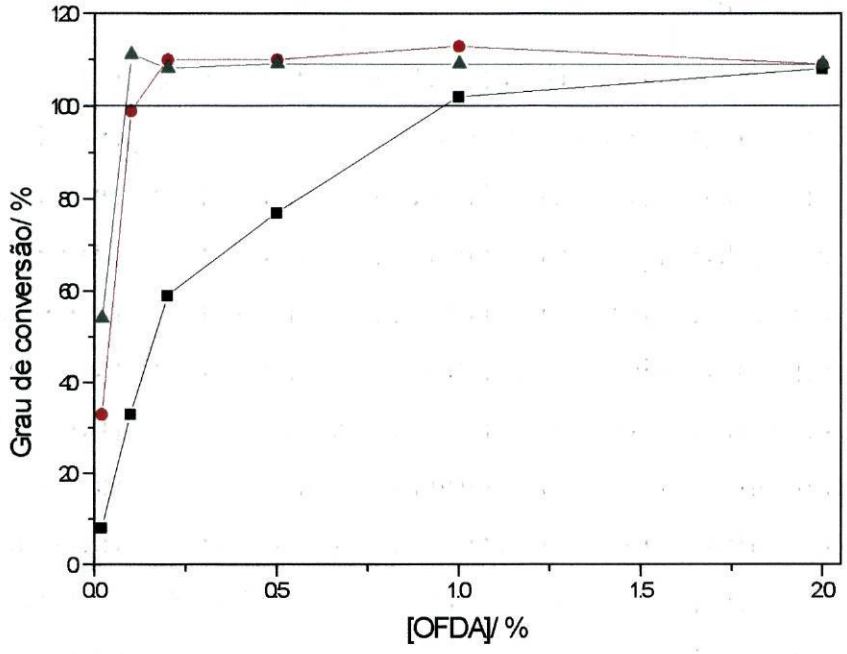


Figura 2.3 - Estimativa do grau de conversão do ácido glioxílico em 2-hidroxiquinoxalina para diferentes percentagens de OFDA no meio em reacção. Recolhas realizadas ao fim de (■) 3, de (●) 20 e de (▲) 40 min em reacção.
(Concentração de ácido glioxílico = $2{,}5 \times 10^{-4}$M; pH=0,8; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

2.2.1.5 - Influência da acidez no processo de derivatização do ácido pirúvico

Com estes ensaios pretendeu-se verificar se a influência da acidez na velocidade e extensão da reacção de derivatização do ácido pirúvico com a OFDA era similar à observada com o ácido glioxílico. Na preparação destes ensaios seguiu-se o procedimento experimental utilizado nos ensaios similares com o ácido glioxílico. Da mesma forma se procedeu ao controlo de pH do meio reactivo por potenciometria, utilizando o eléctrodo de vidro. Tal como nos ensaios realizados com o ácido glioxílico, também nestes ensaios se procurou estimar o grau de conversão da derivatização através da adição de um número de moles de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina equivalentes ao número de moles de ácido pirúvico que se retirou da solução em reacção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2.5 resumem-se os resultados obtidos para as diferentes condições de pH de meio reactivo ensaiadas. Conforme se pode observar através da figura 2.4, na qual se representa o grau de conversão ao fim de 3min e de 30min em várias condições de pH do meio reactivo, a reacção atinge valores de conversão elevados para o intervalo de pH entre 1,5 e 0,5. Os resultados obtidos mostram também que, para meios muito ácidos, existe uma tendência para a diminuição da velocidade da reacção, embora a extensão da reacção se mantenha elevada. O comportamento do ácido pirúvico é idêntico ao obtido nos ensaios similares realizados com o ácido glioxílico, o que parece indicar que ambos os compostos se comportam de forma semelhante perante o processo de derivatização.

Os valores de grau de conversão que foram obtidos são, nalguns casos, francamente superiores a 100%. Tal facto, que já havia sido observado nos ensaios com o ácido glioxílico, poderá ser devido à não existência de uma relação linear entre a

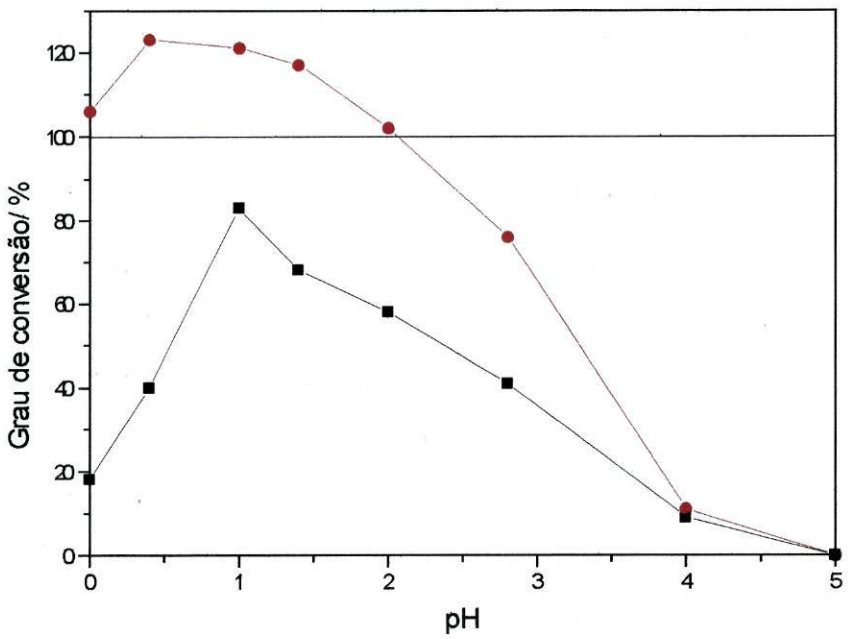


Figura 2.4 - Estimativa do grau de conversão do ácido pirúvico em 2-hidroxi-3-metilquinoxalina para diferentes condições de pH. Recolhas realizadas ao fim de (■) 3 e de (●) 30min em reacção.
(Concentração de OFDA no meio reactivo = 0,5%; concentração de piruvato de sódio = $2{,}5 \times 10^{-4}$M; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

concentração da 2-metil-3-hidroxiquinoxalina e a altura do pico polarográfico. Desta forma os valores de grau de conversão obtidos só têm um significado relativo, permitindo fazer a comparação entre o grau de conversão obtido em diferentes ensaios, não reflectindo o grau de conversão verdadeiro.

Tabela 2.5 - Evolução da reacção de derivatização do ácido pirúvico com o tempo em diferentes condições de pH de meio reactivo (Conc. de piruvato de sódio = $2{,}5 \times 10^{-4}$M; conc. OFDA = 0,5%; volume de solução retirada para análise = 0,250mL; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=5).

pH	tempo em reacção/ min	int. corrente pico/ nA	% conversão
5,0	3 e 30	—	—
4,0	3	11,6	9
	30	15,0	11
2,8	3	52,1	41
	30	90,6	76
2,0	3	70,0	58
	30	116	102
1,4	3	76,0	68
	30	130	117
1,0	3	105	83
	30	139	121
0,4	3	52,1	40
	30	140	123
0	3	31,2	18
	30	128	106

2.2.2 - SELECÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POLAROGRÁFICA

Os ensaios anteriores permitiram caracterizar a influência do pH e da concentração de OFDA na velocidade e extensão da reacção de derivatização. Relativamente ao processo de análise polarográfica das hidroxiquinoxalinas resultantes da reacção de derivatização dos compostos α-dicarbonílicos da classe II existiam, contudo, alguns aspectos que tiveram que ser estudados com maior detalhe, uma vez que se verificou que não se estabelecia uma relação linear entre a concentração da 2-

hidroxiquinoxalina e o respectivo pico polarográfico, nas duas curvas de calibração preliminares que foram estabelecidas em 2.2.1.2.

Como a sensibilidade dos métodos de análise polarográfica é, em geral, muito afectada pelas características da matriz, o método de quantificação mais conveniente é, geralmente, o método da adição sucessiva de padrão. Nas aplicações mais habituais deste método pressupõe-se que existe um comportamento linear entre o sinal analítico e a concentração da espécie em análise. Nas duas curvas de calibração preliminares estabelecidas para a 2-hidroxiquinoxalina, em que se utilizaram como electrólitos de suporte a solução HCl 0,1M e a solução tampão acetato 0,1M, pH=5, obteve-se um comportamento não linear entre a concentração da 2-hidroxiquinoxalina e a intensidade de corrente do pico polarográfico. Por essa razão, no sentido de caracterizar o efeito que o pH do meio tem sobre as curvas de calibração das soluções das hidroxiquinoxalinas, obteve-se uma série de curvas de calibração para um conjunto variado de electrólitos de suporte, cobrindo uma gama de pH alargada. Utilizou-se a 2-hidroxi-3-metilquinoxalina como composto base nestes ensaios. Às soluções utilizadas como electrólitos de suporte juntou-se OFDA de modo a obter uma concentração de 0,05% desse composto, por forma a reproduzir as condições que irão ser utilizadas em situações de análise de α-cetoácidos após derivatização.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL de electrólito de suporte contendo 0,05% de OFDA, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o polarograma dessa solução (branco).

(ii) De seguida adicionou-se um dado volume, medido rigorosamente, de solução de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina de concentração conhecida e, após deixar passar azoto pela solução durante 2min, registou-se o respectivo polarograma da solução.

(iii) Este processo de adição de um volume rigoroso de solução de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina e o registo do respectivo polarograma foi repetido sucessivamente por forma a obter-se um aumento sucessivo da concentração do composto em solução.

As soluções ensaiadas como electrólitos de suporte foram as seguintes:

Solução tampão	**pH**
(1) HCl 0,1M	1
(2) tampão acetato 0,1M	4,5
(3) tampão fosfato 0,1M	7
(4) tampão amoniacal 0,1M	9
(5) tampão carbonato 0,1M*	9,5
(6) tampão carbonato 0,1M*	10
(7) tampão carbonato 0,1M*	10,5
(8) tampão fosfato 0,1M	12

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme se observa na figura 2.5, as curvas de calibração obtidas utilizando como electrólitos de suporte a solução de HCl 0,1M, a solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, e a solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, apresentam um comportamento claramente não linear. Pelo contrário, para os electrólitos de suporte com pH igual ou superior a 9, as curvas de calibração são lineares, conforme se verifica na figura 2.6.

O aparecimento de curvas de calibração não lineares para concentrações baixas de composto electroactivo não é habitual em polarografia, se o processo de eléctrodo for controlado por difusão. Nesses casos é normal obterem-se curvas de calibração lineares para intervalos de concentração alargados. Por isso, a razão para o comportamento não linear, observado para algumas curvas de calibração obtidas em alguns electrólitos de suporte, não tem uma explicação simples. A razão para esse comportamento pode estar relacionada com a existência de fenómenos de adsorção das hidroxiquinoxalinas no eléctrodo de mercúrio, o que torna mais complexa a evolução da resposta polarográfica com a concentração e, algumas vezes, faz surgir curvas de calibração não lineares. A discussão da influência de fenómenos de adsorção na análise polarográfica destes compostos irá ser discutida na parte final desta tese (Parte V).

* Solução preparada por diluição de 5,3g de carbonato de sódio e ajuste do valor de pH pretendido (controlo potenciométrico) através de adição de HCl 1M. Volume final de 500mL.

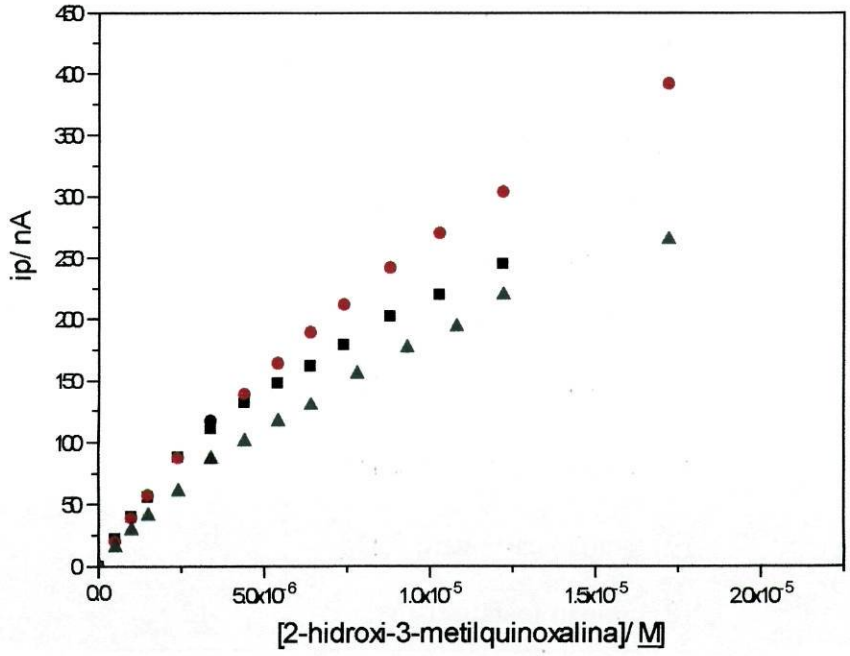


Figura 2.5 - Curvas de calibração da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina obtidas por polarografia: (■) em solução HCl 0,1M; (●) em solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5; (▲) em solução tampão fosfato 0,1M, pH=7.

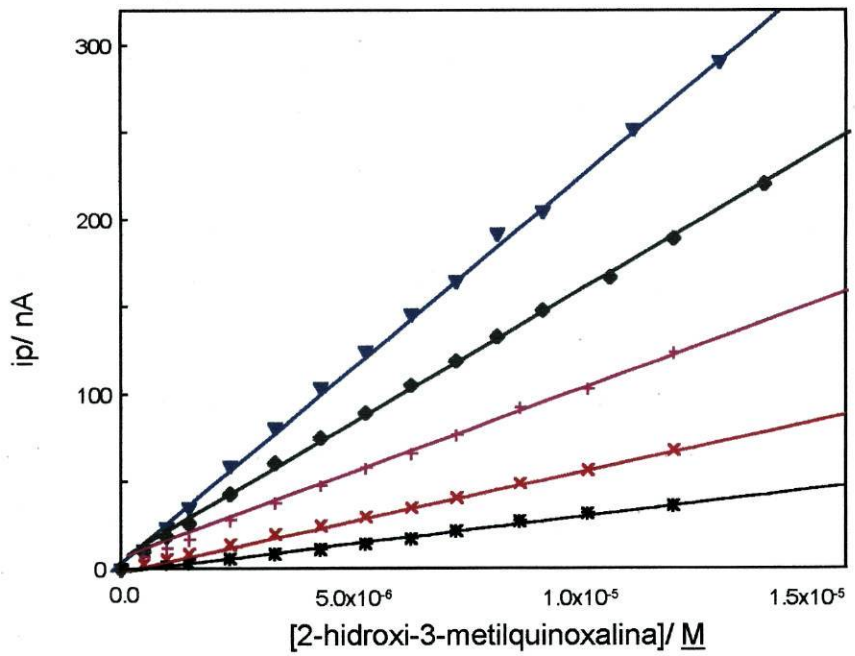


Figura 2.6 - Curvas de calibração da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina obtidas por polarografia: (▼) em solução tampão amoniacal 0,1M, pH=9; (◆), (+) e (×) em solução tampão carbonato 0,1M, pH=9,5; 10 e 10,5, respectivamente; (✱) em solução tampão fosfato 0,1M, pH=12.

Em termos analíticos, o aspecto mais importante destes resultados é a existência de electrólitos de suporte onde é possível obter curvas de calibração lineares para intervalos de concentração alargados. De acordo com os resultados obtidos, seleccionou-se como electrólito de suporte a solução tampão amoniacal com pH=9 dado que, para valores de pH abaixo de 9 obteve-se curvas de calibração não lineares e para valores acima de 9 existe um decréscimo de sensibilidade.

2.2.3 - AVALIAÇÃO DO PROCESSO POLAROGRÁFICO DE ANÁLISE

De acordo com os ensaios precedentes as condições de meio mais adequadas para a realização da reacção de derivatização dos α-cetoácidos e para a análise polarográfica das hidroxiquinoxalinas resultantes são diferentes. O processo de derivatização deverá decorrer em condições de meio ácidas com pH entre 1,5 e 0,5, devendo a concentração de OFDA a utilizar na reacção de derivatização ser elevada pois, dessa forma, a velocidade da reacção de derivatização é maior; contudo, o uso de uma concentração muito elevada de OFDA é desaconselhado devido aos problemas associados com a decomposição da OFDA, conforme se referiu na secção 1.2.2. Na prática a concentração de OFDA na célula polarográfica não deve exceder 0,1%. Em relação às condições de análise polarográfica, após a reacção de derivatização o pH do meio deve ser modificado, de forma a criar em solução as condições de uma solução tampão amoniacal com um valor de pH=9. Já que nessas condições de pH obtêm-se relações lineares entre a concentração das hidroxiquinoxalinas e a intensidade de corrente do pico polarográfico. Utilizando estas condições experimentais obtiveram-se curvas de calibração para três α-cetoácidos: o ácido glioxílico, o ácido pirúvico e o ácido α-cetoglutárico. Para os dois primeiros estimou-se o grau de conversão obtido, através da adição de um número de moles da hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles do α-cetoácido que foi submetido a derivatização.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Calibração do ácido glioxílico e do ácido pirúvico

(i) Para um gobelé de 50mL adicionaram-se 10mL de solução de HCl 0,1M contendo 0,2% de OFDA, cujo pH, controlado potenciometricamente, era cerca de 1, e adicionou-se um dado volume rigorosamente medido da solução de α-cetoácido com concentração conhecida.

(ii) Após deixar a reacção de derivatização decorrer durante 30min, adicionaram-se 5mL de solução de NH_4Cl 0,2M e 5mL de solução de NaHO 0,2M (o pH da solução resultante medido potenciometricamente passou para cerca de 9) e diluiu-se a solução rigorosamente a 25mL.

(iii) Transferiu-se a solução para a célula polarográfica, borbulhou-se azoto durante 10min e registou-se o respectivo polarograma da solução.

(iv) Adicionou-se, depois, directamente na célula, um número de moles de solução da hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles de α-cetoácido que foi submetido à derivatização e, após borbulhar 1min de azoto pelas soluções, registou-se um novo polarograma.

Calibração do ácido α-cetoglutárico

(i), (ii) e (iii) Procedimento idêntico ao anterior.

(iv) Após o registo do polarograma adicionou-se na célula um número de moles de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido α-cetoglutárico que foi derivatizado e, após passar 10min de azoto, registou-se o correspondente polarograma.

As condições de análise polarográfica utilizadas nestes ensaios foram as seguintes:

- t_{gota}=1s;
- Amplitude de impulso= 50mV (impulso catódico);
- Velocidade de varrimento= 6mV/s;
- Intervalo de potencial varrido: entre -400mV e -1400mV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas figuras 2.7, 2.8 e 2.9 representam-se as curvas de calibração obtidas para o ácido glioxílico, para o ácido pirúvico e para o ácido α-cetoglutárico, respectivamente. Em cada uma delas representa-se, também, o incremento de sinal resultante da adição à solução de um número de moles de hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles do α-cetoácido que foi submetido à derivatização; no ensaio com o ácido α-cetoglutárico optou-se por adicionar a 2-hidroxi-3-metilquinoxalina, uma vez que não se possuía a hidroxiquinoxalina que resultava da derivatização. A partir das curvas de

calibração obtidas é possível extrair um conjunto de conclusões relevantes para a aplicação analítica destes métodos a amostras reais:

(1) nas condições de análise polarográfica utilizadas podem estabelecer-se relações lineares entre a intensidade de corrente de pico e a concentração da espécie a analisar para uma gama de concentração até cerca de $4x10^{-5}$M, para os três α-cetoácidos ensaiados;

(2) através da adição de 2-hidroxiquinoxalina e de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina verificou-se que para toda a gama de concentrações de ácido glioxílico e de ácido pirúvico testadas o grau de conversão é bastante elevado;

(3) a sensibilidade polarográfica da hidroxiquinoxalina resultante da derivatização do ácido α-cetoglutárico, a 3-carboxietil-2-hidroxiquinoxalina, é inferior à da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina, admitindo que a extensão da reacção de derivatização se mantém, igualmente, elevada para este α-cetoácido.

O aspecto referido em (1) é analiticamente importante pois o facto de se estabelecer uma relação linear entre a intensidade de corrente do pico polarográfico e a concentração do α-cetoácido vai possibilitar a quantificação pelo método da adição sucessiva de padrão. O aspecto (2) é igualmente muito importante sob o ponto de vista analítico, uma vez que pelo facto da conversão do α-cetoácido ser quantitativa é possível realizar o método de adição sucessiva de padrão através da adição da respectiva hidroxiquinoxalina, o que simplifica e torna mais rápida a análise. No aspecto referido em (3) pretendeu-se efectuar uma comparação da sensibilidade polarográfica da 3-carboxietil-2-hidroxiquinoxalina, a hidroxiquinoxalina que resulta da derivatização do ácido α-cetoglutárico, com a da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina, que resulta da derivatização do ácido pirúvico. O interesse prático deste ensaio reside no facto de se verificar que estas duas hidroxiquinoxalinas têm potenciais de pico muito próximos, o que as torna polarograficamente indistinguíveis. Como será de esperar que em amostras reais de produtos alimentares existam misturas desses dois α-cetoácidos, vai ser impossível distinguí-los através da técnica polarográfica, sem recorrer a processos de separação prévios. Contudo, como muitas vezes é suficiente obter um valor da concentração global desses compostos, procurou-se através deste ensaio

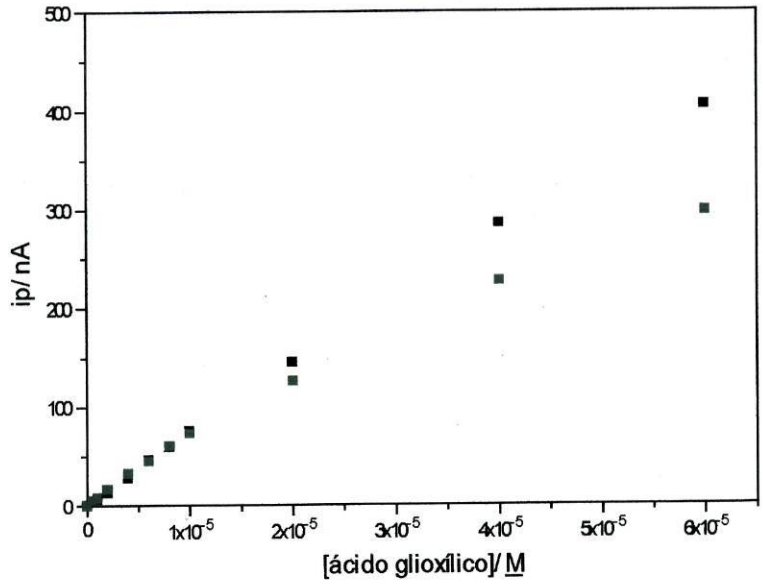


Figura 2.7 - Curva de calibração de ácido glioxílico obtida por polarografia (■) após derivatização em meio HCl 0,1M com 0,2% de OFDA e pH≈1; análise polarográfica efectuada em meio tampão amoniacal com pH≈9.
(■)incremento de sinal polarográfico correspondente à adição na célula de um número de moles de 2-hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido glioxílico submetidos a derivatização.

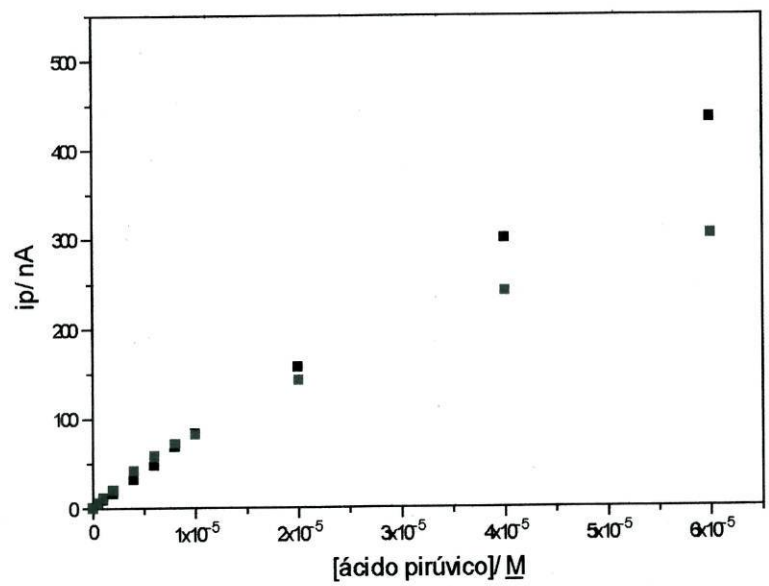


Figura 2.8 - Curva de calibração de ácido pirúvico obtida por polarografia (■) após derivatização em meio HCl 0,1M com 0,2% de OFDA e pH≈1; análise polarográfica efectuada em meio tampão amoniacal com pH≈9.
(■)incremento de sinal polarográfico correspondente à adição na célula de um número de moles de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido pirúvico submetidos a derivatização.

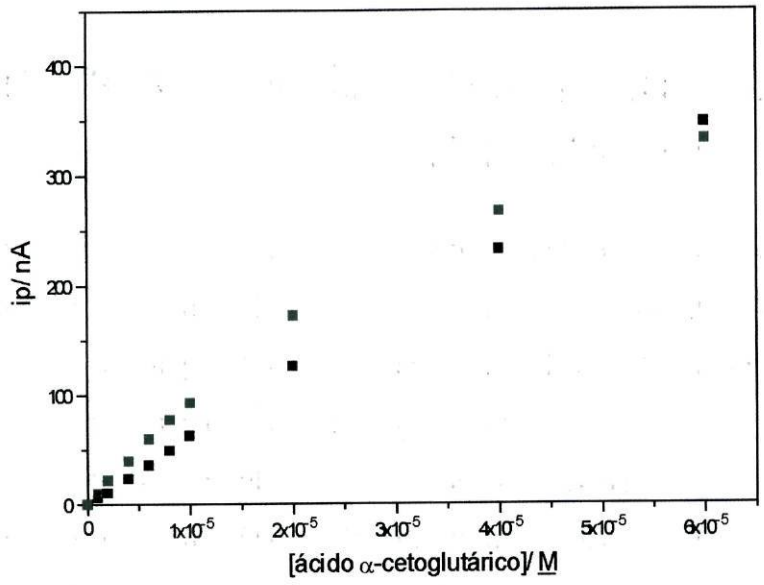


Figura 2.9 - Curva de calibração de ácido α-cetoglutárico obtida por polarografia (■) após derivatização em meio HCl 0,1M com 0,2% de OFDA e pH≈1; análise polarográfica efectuada em meio tampão amoniacal com pH≈9.
(■)incremento de sinal polarográfico correspondente à adição na célula de um número de moles de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido α-cetoglutárico submetidos a derivatização.

averiguar acerca da possibilidade de quantificar globalmente esses dois compostos através da adição da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina. Conforme se verifica como, as sensibilidades polarográficas das duas hidroxiquinoxalinas são diferentes, a quantificação global não é correctamente realizada desta forma.

Os limites de detecção dos métodos de análise polarográfica desenvolvidos para estes três α-cetoácidos podem ser estimados em cerca de $2x10^{-7}$M (o que corresponde a uma intensidade de corrente de pico entre 1 e 2nA). Verificou-se, deste modo, que os métodos polarográficos desenvolvidos são menos sensíveis para a análise destes α-cetoácidos do que para os compostos α-dicarbonílicos da classe I.

3 - ANÁLISE DE ÁCIDO OXÁLICO (COMPONENTE ÚNICO DA CLASSE III)

O desenvolvimento do processo de análise polarográfica de ácido oxálico após derivatização com a OFDA para formar a 2,3-di-hidroxiquinoxalina envolveu o estudo da (1) influência das condições de meio reactivo e da (2) quantidade de OFDA- no decurso da reacção de derivatização. Dado que se constatou que a reacção de derivatização só ocorre quando a solução em reacção é aquecida a temperaturas elevadas, (3) o modo de efectuar o aquecimento foi também um parâmetro experimental estudado em detalhe. Após se ter caracterizado a influência destes parâmetros experimentais fez-se a avaliação das características analíticas do método de análise polarográfica de ácido oxálico que foi desenvolvido.

A referência a este trabalho de desenvolvimento do método de análise polarográfica de ácido oxálico, após derivatização com OFDA, surge referido nesta fase, dado que se entendeu fazer a apresentação das várias partes que compreenderam o trabalho experimental realizado, utilizando a sequência das classes de compostos α-dicarbonílicos que foram consideradas. No entanto, o desenvolvimento do processo de análise polarográfica de ácido oxálico constituiu o primeiro trabalho experimental a ser desenvolvido no âmbito desta tese e foi o ponto de partida para todo o posterior trabalho experimental. Foi através da pesquisa bibliográfica realizada para o desenvolvimento do método de análise polarográfica do oxalato que se tornaram claras as potencialidades da OFDA como agente derivatizante de compostos α-dicarbonílicos e o interesse que essa reacção poderia ter para o desenvolvimento de métodos de análise polarográfica de compostos α-dicarbonílicos em produtos alimentares. O enquadramento no tempo da realização deste trabalho tem importância, pois na fase inicial em que os ensaios que se descrevem a seguir foram realizados não se dispunha, ainda, do equipamento de voltametria Metrohm VA Processor 646 e, por isso, estes ensaios foram realizados num equipamento polarográfico diferente do utilizado no resto do trabalho.

3.1 - INSTRUMENTAÇÃO

Os ensaios polarográficas foram realizados num sistema de voltametria Metrohm, constituído por um potenciostato Metrohm VA 611, ligado a um gerador de ondas Metrohm VA 612 e a um controlador Metrohm VA 608. Este sistema controlava um posto de polarografia Metrohm VA Stand 663* , que possuía como eléctrodo de trabalho o eléctrodo de mercúrio multimodo, um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, KCl 3M e um eléctrodo auxiliar de carbono vítreo. Esse sistema encontrava-se ligado a um registador x-y *Houston Instruments*, modelo 2000.

3.2 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE ÁCIDO OXÁLICO

Prepararam-se soluções aquosas de partida de ácido oxálico com concentração $5x10^{-2}$M, utilizando oxalato de sódio p.a. (*Merck*). Para tal pesaram-se rigorosamente cerca de 0,67g de oxalato de sódio e diluiu-se rigorosamente a 100mL.

As soluções mais diluídas foram obtidas por diluição rigorosa da solução de partida.

3.3 - OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE

3.3.1 - SELECÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO

A reacção do ácido oxálico com a OFDA para dar origem à 2,3-di-hidroxiquinoxalina foi caracterizada por Phillips em 1928[154]. Este autor constatou que quando aquecia à ebulição quantidades equimolares de ácido oxálico e de OFDA em meio ácido clorídrico ocorria a formação de 2,3-di-hidroxiquinoxalina em extensão elevada. O processo de derivatização que se utilizou neste estudo baseia-se nessa mesma reacção; contudo, uma vez que a reacção é realizada com o objectivo de proceder à análise do ácido oxálico, será de esperar que as quantidades de ácido oxálico envolvidas na reacção sejam muito pequenas e que a quantidade de OFDA utilizada se encontre em excesso. Desta forma, para a adaptação desta reacção ao processo analítico foi

* O posto de polarografia VA Stand 663 é semelhante ao posto de polarografia VA Stand 647que foi utilizado nos ensaios realizados com o sistema de voltametria VA Processor 646. A diferença reside no facto de o primeiro poder ser actuado manualmente pelo operador em algumas funções, enquanto que o segundo é para ser utilizado especificamente pelo sistema de voltametria VA Processor 646 e é totalmente controlado através desse equipamento.

necessário proceder à realização de estudos prévios no sentido de seleccionar as condições de meio reactivo e de concentração de OFDA mais adequadas para a realização da derivatização. Nestes estudos o acompanhamento da evolução da reacção foi realizado por polarografia em meio HCl 0,1M já que, conforme se verificou na secção 2.1.3. da Parte II, em condições de meio fortemente ácidas a sensibilidade da determinação polarográfica da 2,3-di-hidroxiquinoxalina era consideravelmente maior.

3.3.1.1 - Derivatização em diferentes condições de meio

Conforme se referiu na secção 2.3.1 na Parte I, a existência de dois grupos carboxílicos na molécula de ácido oxálico e o facto de o ataque nucleófilo só ter lugar se esses grupos estiverem protonados, dava a indicação que a reacção de derivatização só decorre se as condições de meio forem bastante ácidas e que o controlo da acidez do meio é um factor crucial para a evolução da reacção. No sentido de confirmar experimentalmente tais suposições realizou-se a reacção de derivatização em quatro meios diferentes: HCl 1M; tampão acetato 1M, pH=5; tampão amoniacal 1M, pH=9; e NaHO 1M. A concentração de OFDA no meio reactivo foi fixada em 1% e a concentração de ácido oxálico foi fixada em $5x10^{-4}$M. As análises polarográficas para acompanhamento da evolução da reacção foram realizadas utilizando como electrólito de suporte a solução HCl 0,1M.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Derivatização do ácido oxálico

(i) Para um balão de fundo redondo de 250mL adicionaram-se 50mL da solução tampão em estudo e juntaram-se 0,5g de OFDA.

(ii) Colocou-se o balão a aquecer num banho-maria à ebulição e adicionou-se 0,5mL de solução de oxalato de sódio $5x10^{-2}$M, agitou-se a solução para homogeneizar e colocou-se de novo no banho-maria.

(iii) Periodicamente recolheu-se 1mL da solução em reacção no balão e analisou-se polarograficamente.

Análise polarográfica

Para a célula polarográfica mediram-se rigorosamente 25mL de solução HCl 0,1M e deixou-se borbulhar azoto durante 10min. Adicionou-se, então, 1mL da solução

do balão em reacção, deixou-se borbulhar azoto durante mais 1min e registou-se o polarograma da solução.

A evolução da reacção ao longo do tempo foi seguida através do registo de polarogramas da solução que se encontrava a reagir no balão, recolhendo amostras em instantes de tempo precisos. A estimativa da grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina foi feita através da comparação do aumento de sinal que se obtinha quando à solução contida na célula polarográfica se adicionava um número de moles de 2,3-di-hidroxiquinoxalina equivalente ao número de moles de ácido oxálico que era recolhido da solução em reacção, para análise polarográfica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através deste estudo pretendeu-se confirmar que a reacção de derivatização entre o ácido oxálico e a OFDA só decorria em condições de meio fortemente ácido. Atendendo à proposta de mecanismo para esta reacção que foi apresentada na secção 2.3.1 da Parte I, das quatro classes de compostos α-dicarbonílicos definidas, a reacção entre o ácido oxálico e a OFDA é aquela que se antevê como a mais difícil de ocorrer. Tal previsão foi efectivamente confirmada experimentalmente pois, para além da reacção só ocorrer em meio fortemente ácido, tornou-se necessário aquecer a solução em reacção à ebulição, para que a reacção ocorresse.

Dos quatro meios ensaiados só se detectou a formação de 2,3-di-hidroxoquinoxalina nos ensaios realizados em HCl 1M. Nesse meio foi possível fazer a estimativa da extensão da reacção, tendo-se obtido os valores registados na tabela 3.1. para o grau de conversão de ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina para diferentes intervalos de tempo em reacção.

Tabela 3.1 - Avaliação da extensão da reacção de derivatização em função do tempo em reacção. (HCl 1M; %OFDA=1%; aquecimento em banho-maria à ebulição).

$t_{reacção}$ /min	21	43	66	87	108	200
Grau de conversão/ %	29	62	72	81	87	100

A partir dos valores obtidos para o grau de conversão pode-se concluir que a reacção de derivatização decorre lentamente, sendo necessário um intervalo de tempo de reacção longo para que o grau de conversão atinja valores elevados. Estes resultados

salientam a necessidade de se optimizarem as condições de derivatização no sentido de tornar a reacção mais rápida e o processo experimental mais simples.

3.3.1.2 - Influência da concentração de HCl no processo de derivatização

Com a realização destes ensaios pretendeu-se caracterizar a influência da concentração de ácido clorídrico sobre a reacção de derivatização, particularmente sobre a sua rapidez e extensão. Com esse objectivo preparou-se um conjunto de ensaios utilizando o mesmo procedimento experimental que foi seguido nos ensaios anteriores, com a diferença de que, nesta ocasião, a concentração da solução de HCl foi modificada de ensaio para ensaio. O acompanhamento da evolução da reacção foi realizado tal e qual como nos ensaios anteriores, com base na colheita de 1mL da solução em reacção em instantes de tempo precisos, para ser analisada polarograficamente. Procedeu-se, igualmente, à estimativa do grau de conversão ao longo dos ensaios realizados, através da adição de um número de moles de 2,3-di-hidroxiquinoxalina equivalentes ao número de moles de ácido oxálico que eram recolhidos para análise polarográfica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 3.1 pode observar-se a influência que a concentração de HCl tem na reacção de derivatização. De acordo com estes resultados, a reacção é mais rápida quando a concentração de HCl se encontra no intervalo entre 0,5 e 4M; no entanto, mesmo nesses casos, a extensão da reacção só se torna elevada se o intervalo de tempo em reacção for elevado. Para concentrações de HCl superiores a 2M verifica-se que a velocidade da reacção apresenta uma tendência para diminuir.

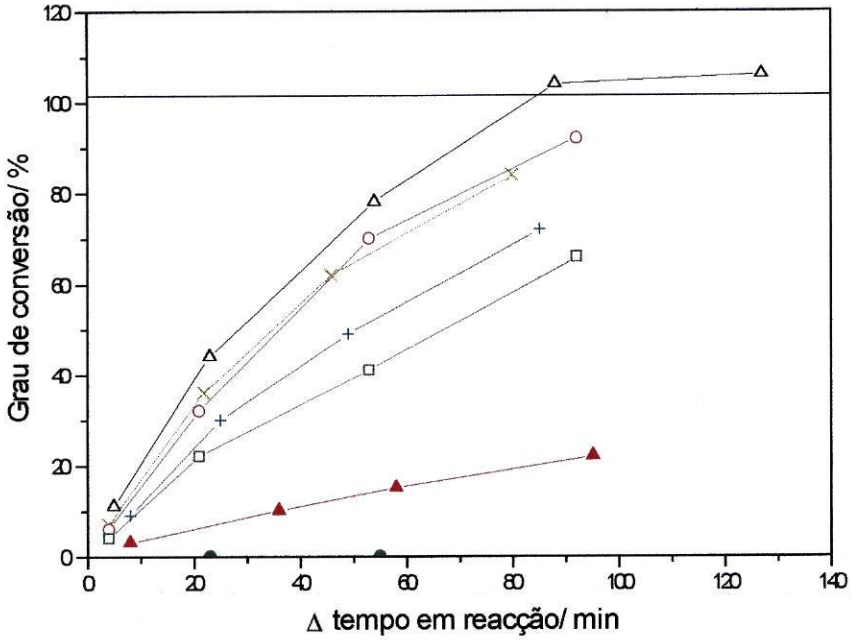


Figura 3.1 - Estimativa do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina para diferentes concentrações de HCl no meio em reacção, para diferentes intervalos de tempo em reacção. Concentração de HCl no meio em reacção: (●) 0,01M; (▲) 0,1M; (+) 0,5M; (×) 1M; (Δ) 2M; (○) 4M; (□) 6M.
(Concentração de ácido oxálico = $5x10^{-4}$M; concentração de OFDA= 1%; reacção realizada num balão mergulhado em banho-maria à ebulição; análise polarográfica em solução HCl 0,1M).

3.3.1.3 - Influência da concentração de OFDA no processo de derivatização

Nestes ensaios procurou-se caracterizar a influência da concentração de OFDA na velocidade e na extensão da reacção de derivatização. Este estudo foi realizado em meio HCl 2M, tendo-se variado as quantidades de OFDA nos diferentes ensaios efectuados. A preparação dos ensaios, o acompanhamento da evolução da reacção de derivatização e a estimativa do grau de conversão foram feitos do mesmo modo que para os ensaios anteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 3.2 pode apreciar-se a influência da concentração da OFDA na velocidade do processo de derivatização. Os resultados obtidos mostram que a velocidade da reacção é bastante influenciada pela concentração de OFDA, aumentando com o aumento da concentração de OFDA. Nos ensaios em que se utiliza as

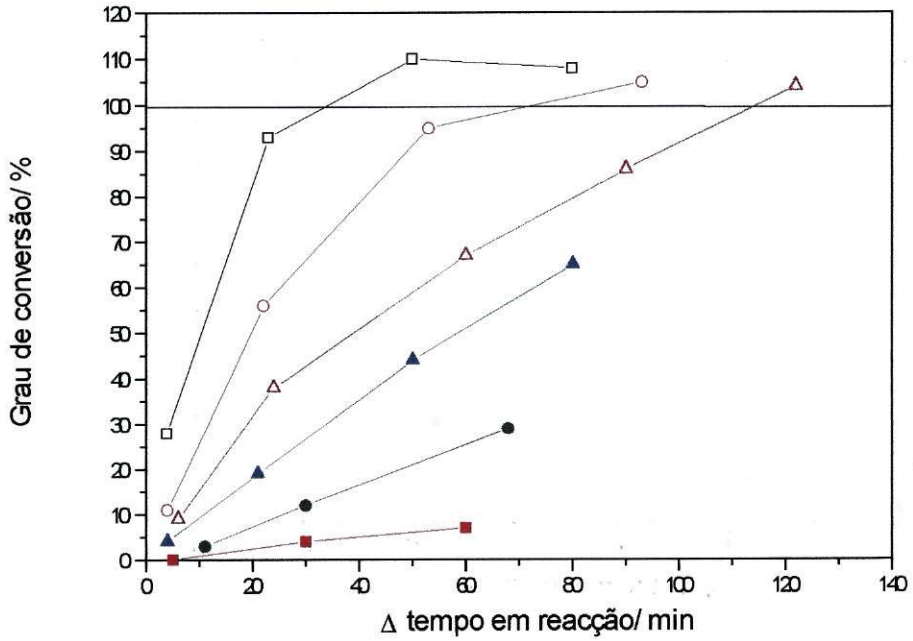


Figura 3.2 - Estimativa do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina para diferentes concentrações de OFDA no meio em reacção, para diferentes intervalos de tempo em reacção. Concentração de OFDA no meio em reacção: (■) 0,04%; (●) 0,2%; (▲) 0,5%; (△) 1%; (○) 2%; (□) 5%.
(Concentração de ácido oxálico = $5x10^{-4}$M; concentração de HCl= 2M; reacção realizada num balão mergulhado num banho-maria à ebulição; análise polarográfica em solução HCl 0,1M).

concentrações mais elevadas de OFDA verifica-se o desenvolvimento de uma coloração amarela na solução devida à decomposição da OFDA. Apesar de em meio fortemente ácido a OFDA ser mais estável, o facto de a solução em reacção ter de ser aquecida contribui para a aceleração da degradação da OFDA. Na prática verificou-se que com 5% de OFDA no meio reactivo se obtinha uma coloração francamente amarelada ao fim de um intervalo de tempo curto. Este facto não foi, contudo, impeditivo da realização do estudo, uma vez que para a realização da análise polarográfica a solução era diluída 25 vezes, o que atenuava os problemas associados com a decomposição da OFDA. Estes ensaios demonstram que, para que a reacção de derivatização do ácido oxálico ocorra em extensão apreciável e com velocidade apreciável é necessário utilizar concentrações de OFDA bastante elevadas, bastante superiores às usadas na derivatização dos compostos α-dicarbonílicos das classes I e II, o que é reflexo das dificuldades na ocorrência desta reacção de derivatização.

3.3.1.4 - Influência do modo de aquecimento da solução em reacção. Comparação entre aquecimento directo e em banho-maria

Para que a reacção de derivatização do ácido oxálico com a OFDA ocorra é necessário aquecer a solução até à temperatura de ebulição. Nos ensaios anteriores o aquecimento da solução em reacção foi realizado colocando o balão num banho-maria à ebulição. Neste estudo pretendeu-se comparar duas formas distintas de aquecimento da solução em reacção: uma delas consiste no aquecimento directo do balão utilizando uma manta eléctrica e a outra no aquecimento do balão num banho-maria à ebulição (o mesmo processo de aquecimento utilizado nos ensaios anteriores).

Nestes ensaios utilizou-se como meio reactivo uma solução de HCl 2M com uma concentração de OFDA 1%. O procedimento experimental foi idêntico ao utilizado nos ensaios anteriores com a excepção que num dos casos o aquecimento do balão foi realizado numa manta eléctrica e a solução em reacção entrava em ebulição durante a fase de aquecimento (a adição de oxalato foi feita após a solução entrar em ebulição), enquanto que, no outro ensaio o aquecimento foi realizado em banho-maria à ebulição, pelo que a solução no interior do balão nunca chegou a entrar em ebulição. O acompanhamento da evolução da reacção nas duas situações e a estimativa da respectivo grau de conversão ao longo da reacção foram feitas através do mesmo procedimento utilizado nos ensaios anteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 3.3 pode-se comparar o modo como os dois processos distintos de aquecimento da solução influenciavam a evolução da reacção de derivatização com o tempo. De acordo com estes resultados o aquecimento directo da solução até à ebulição na manta eléctrica é mais favorável, já que a reacção atinge mais rapidamente valores de conversão mais elevados. A principal diferença entre os dois modos de aquecimento reside no facto da temperatura que se atinge no aquecimento directo com a manta eléctrica ser maior que a temperatura que se obtém com o aquecimento em banho-maria à ebulição; o que aliás é fácil de verificar, pois a solução aquecida com a manta entra em ebulição, enquanto que a solução aquecida no banho-maria não chega a entrar em ebulição. Estes resultados mostram a importância que o modo de aquecimento da solução tem para o decurso da reacção de derivatização.

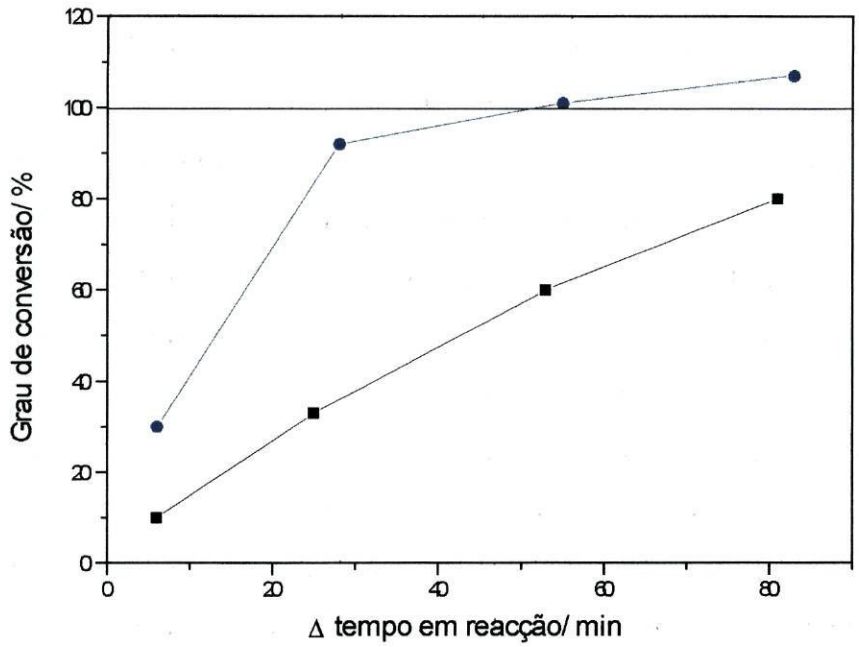


Figura 3.3 - Evolução do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina com o tempo de reacção em duas condições distintas de aquecimento: (■) aquecimento em banho-maria à ebulição; (●) aquecimento directo à ebulição.
(Concentração de ácido oxálico = $5x10^{-4}$M; concentração de HCl= 2M; concentração de OFDA= 1%; análise polarográfica em solução HCl 0,1M).

3.3.2 - SELECÇÃO E AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POLAROGRÁFICA

Os ensaios precedentes permitiram obter uma perspectiva sobre a influência do pH, da concentração de OFDA e da temperatura na velocidade e extensão da reacção de derivatização do ácido oxálico com a OFDA. As condições experimentais utilizadas na realização desses ensaios não são, contudo, as que melhor se adaptam para o estabelecimento de um procedimento para a análise de oxalato em amostras reais, uma vez que a análise polarográfica foi realizada sobre uma pequena porção da solução que se encontrava em derivatização. Numa análise a uma amostra real, em geral, toda a solução que é submetida a derivatização é utilizada na análise e, por isso, a quantidade de OFDA que se utilizar na derivatização vai, posteriormente, surgir na solução que é analisada. Deste modo, os problemas associados com a utilização de uma quantidade elevada de OFDA têm que ser levados em conta. Os graus de conversão de ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina obtidos nos ensaios anteriores foram elevados, mas para que isso acontecesse foi necessário manter a solução em aquecimento durante um

um período relativamente longo. No sentido de desenvolver um procedimento analítico que fosse experimentalmente simples e que não dependesse demasiado de um controlo severo das condições experimentais utilizadas decidiu-se ensaiar a possibilidade de levar a cabo a reacção de derivatização num gobelé aberto e de efectuar o aquecimento da solução num banho-maria à ebulição. Nessas condições, ao fim de algum tempo de aquecimento, a solução em reacção no gobelé evaporar-se-á completamente e essa altura marcará a conclusão do processo de derivatização; desta forma cria-se um critério objectivo para dar por concluída a derivatização. O resíduo resultante será depois retomado com solução de HCl 0,1M e analisado polarograficamente. As principais vantagens e desvantagens que se podem prever na utilização deste processo de realização da reacção de derivatização são as seguintes:

Vantagens	**Desvantagens** [1]
• Controlo experimental das condições de reacção pouco exigente. • Critério de fim de reacção objectivo. • Menor tempo de reacção. • Condições de meio variáveis ao longo do processo. • Como o meio é cada vez mais ácido os problemas com a decomposição da OFDA diminuem. • Aumento da concentração de OFDA e de ácido oxálico à medida que a solução vai evaporando. - Condições de análise polarográfica mais bem definidas.	• Possibilidade de ocorrerem perdas de ácido oxálico por volatilização ou por decomposição. • Possibilidade de excessiva decomposição da OFDA. • Conversão de ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina incompleta. • Maior incidência de interferências.

[1]Os aspectos referidos como desvantagens que poderão resultar deste processo de derivatização vão ser testados seguidamente para avaliar a sua influência na análise.

Utilizando este processo de derivatização fez-se um novo conjunto de ensaios por forma a seleccionar, para estas novas condições experimentais, as melhores condições de meio reactivo e a quantidade de OFDA mais adequada para a realização da reacção de derivatização.

3.3.2.1 - Influência da concentração de HCl

Os estudos realizados inicialmente permitiram caracterizar a influência da concentração de HCl na reacção de derivatização; contudo, nas novas condições de realização do processo de derivatização, em que pelo facto de ocorrer a evaporação do solvente será de esperar que se modifique a acidez do meio reactivo ao longo do

processo, será de esperar que ocorra uma alteração das condições de acidez mais favoráveis para a realização da reacção de derivatização. Assim, procedeu-se à reavaliação da influência desse factor experimental, nestas novas condições de realização do processo de derivatização.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Derivatização do ácido oxálico

(i) Para um gobelé de 25mL juntaram-se 10,0mL de solução de HCl com a concentração em estudo, contendo 1% de OFDA.

(ii) A essa solução adicionaram-se 100μL de solução de oxalato de sódio $2{,}5 \times 10^{-3}$M e colocou-se o gobelé em aquecimento em banho-maria à ebulição.

(iii) Após o conteúdo do gobelé estar seco, o resíduo resultante foi retomado e diluído rigorosamente a 25,0mL com HCl 0,1M.

Análise polarográfica

A solução obtida foi transferida para a célula polarográfica, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o polarograma dessa solução. A estimativa do grau de conversão foi realizada através da avaliação do aumento de sinal resultante da adição à solução na célula polarográfica de um número de moles de 2,3-di-hidroxiquinoxalina equivalentes ao número de moles de ácido oxálico que sofreu derivatização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com estes ensaios foi possível caracterizar a influência que a concentração de HCl tinha no decurso da reacção de derivatização, quando a solução era aquecida em banho-maria até à secura. Na tabela 3.2 estão registados os valores de grau de conversão resultante do processo de derivatização realizado para diferentes concentrações de HCl no meio reactivo. De acordo com estes resultados, a extensão da reacção mantém-se muito elevada para o intervalo de concentrações iniciais de HCl entre 0,5 e 3M.

Tabela 3.2 - Grau de conversão de ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina em função da concentração de HCl usada na derivatização. Processo de derivatização até à evaporação da solução em reacção, através de aquecimento em banho-maria à ebulição. (Conc. OFDA= 1%; conc. ácido oxálico= $5x10^{-5}$M).

Concentração de HCl/ M	Grau de conversão/ %
0.1	60
0.5	102
1	99
2	105
3	96

3.3.2.2 - Influência da concentração de OFDA

A concentração de OFDA é um parâmetro experimental com reflexos importantes no decurso da reacção de derivatização, particularmente na velocidade e extensão da reacção; porém, a decomposição da OFDA é um factor limitante da quantidade de OFDA que se pode utilizar na derivatização. Neste estudo fixou-se a concentração de HCl no meio em reacção em 0,5M e variou-se as quantidades de OFDA presentes no meio reactivo. O estudo foi realizado para quatro concentrações distintas de ácido oxálico em solução. Os ensaios e a análise polarográfica das soluções resultantes após retoma dos resíduos foram realizados da mesma forma descrita para os ensaios anteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 3.4 representa-se o grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina em função da quantidade de OFDA para as quatro concentrações distintas de ácido oxálico ensaiadas. Conforme se verifica nessa figura, a extensão da reacção é fortemente dependente da concentração de OFDA utilizada na derivatização e, para concentrações de OFDA superiores a 0,4%, a conversão de ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina pode-se considerar quantitativa.

A obtenção de graus de conversão elevados nestes ensaios mostra que, quer o ácido oxálico, quer a 2,3-di-hidroxiquinoxalina não sofrem qualquer tipo de perdas por volatilização ou decomposição quando a reacção de derivatização é realizada em sistema

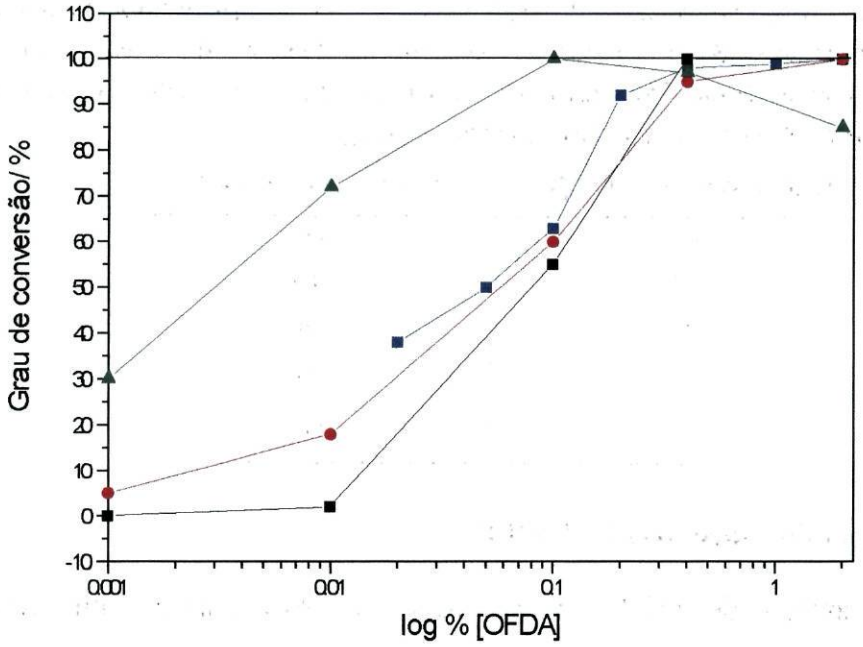


Figura 3.4 - Evolução do grau de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina em função da concentração de OFDA no meio em reacção, para diferentes concentrações de ácido oxálico. Concentração de ácido oxálico no meio em reacção: (■) $1x10^{-6}$M; (■) $4x10^{-6}$M; (●) $4x10^{-5}$M; (▲) $2x10^{-4}$M.
(Concentração de HCl= 0,5M; análise polarográfica em solução HCl 0,1M).

aberto e a solução em reacção é levada à secura num banho-maria. Por seu lado, devido ao facto de o processo de derivatização e análise decorrer em condições de meio fortemente ácidas, a decomposição da OFDA não é tão acentuada como a que se havia verificado nos ensaios com os compostos α-dicarbonílicos das classes I e II. Por tal motivo, atendendo à grande influência que a concentração de OFDA tem na velocidade e extensão da reacção de derivatização, decidiu-se utilizar uma quantidade de OFDA na derivatização mais elevada do que a que foi utilizada para a derivatização dos compostos das outras classes.

Através destes ensaios foi possível, testar algumas das desvantagens hipotéticas referidas em 3.3.2. Com excepção das questões relativas à incidência de interferências, sobre todas os outros aspectos verificou-se que essas desvantagens não se confirmaram.

3.3.2.3 - Teste de repetibilidade do processo de análise

Para testar a repetibilidade deste processo de análise que envolvia a derivatização através do aquecimento da solução em reacção em banho-maria até à secura, prepararam-se cinco ensaios iguais, com a concentração de HCl no meio reactivo de

de 0,5M, a quantidade de OFDA de 2% e a concentração de oxalato no meio em reacção de $5x10^{-5}$M. Os ensaios foram realizados utilizando o mesmo procedimento experimental dos ensaios anteriores. Na tabela 3.3 apresentam-se as intensidades de corrente do pico obtidas nesses cinco ensaios.

Tabela 3.3- Repetibilidade do processo de derivatização envolvendo o aquecimento da solução em reacção até à secura.
(Concentração de HCl no meio reactivo = 0,5M; concentração de OFDA = 2%; concentração de ácido oxálico = $5x10^{-5}$M).

Ensaio	1	2	3	4	5	Média ± intervalo de confiança*
Int. corrente de pico (nA)	444	442	426	446	423	436 ± 14
% conversão	108	104	102	107	102	105 ± 4

* Nível de significância de 95%

Conforme se observa através dos valores da tabela 3.3, os resultados obtidos apresentam valores próximos, pelo que se confirma que o processo apresenta boa repetibilidade.

3.3.2.4 - Influência do volume de solução a evaporar

Nestes ensaios em que o processo de derivatização decorre durante o período de tempo em que a solução evapora, uma condição que não é directamente controlada, mas que tem influência sobre o decurso da reacção é o intervalo de tempo que demora a evaporação. Esse intervalo de tempo depende de vários factores entre os quais o volume de solução a evaporar e o formato do gobelé utilizado na evaporação: quanto menor o volume de solução a evaporar e maior o diâmetro do gobelé onde a solução está contida, menor será o tempo necessário para evaporar a solução. Este aspecto essencialmente prático tem de facto muita importância para esta análise pois se o intervalo de tempo para a evaporação for curto, a reacção de derivatização pode dar-se em pequena extensão. Desta forma, no sentido de esclarecer a influência do formato do gobelé utilizado e do volume de solução a evaporar na extensão da reacção de derivatização realizaram-se ensaios em que se utilizaram dois tipos de gobelés com formatos diferentes- gobelés de 25mL de capacidade e gobelés de 100mL de capacidade - para a realização da reacção de derivatização. Para cada tipo de gobelé fez-se a evaporação de volumes distintos de solução, de tal forma que o intervalo de tempo para levar a solução

à secura foi diferente consoante o volume de solução inicial e do tipo de gobelé utilizado na derivatização.

Estes ensaios foram preparados da mesma forma que os ensaios precedentes, tendo-se mantido constantes as condições iniciais de reacção em todos os ensaios: concentração de HCl = 0,5M; 2% de OFDA no meio reactivo e 0,200mL de solução de oxalato de sódio $2,5x10^{-3}$M. Após se levar as soluções à secura, o resíduo foi retomado com 25mL de HCl 0,1M e foi analisado polarograficamente.

As características dos dois tipos de gobelés utilizados eram as seguintes:

	gobelé de 25mL	**gobelé de 100mL**
∅	3cm	4,5cm
altura	5cm	6,5cm

Na tabela 3.4 encontram-se registados os valores de grau de conversão estimados através do aumento de sinal resultante da adição à solução em análise de um número de moles de 2,3-di-hidroxoquinoxalina equivalente ao número de moles de oxalato que foram submetidos a derivatização.

Tabela 3.4- Influência dos volumes de solução a evaporar na extensão da reacção de derivatização. (Concentração de HCl= 0,5M; concentração de OFDA= 2%; quantidade de oxalato de sódio a derivatizar = $5x10^{-8}$moles).

		Volume de solução a evaporar/ mL					
		1	**5**	**10**	**20**	**30**	**40**
Gobelé 25mL ∅=3cm	**grau de conversão/ %**	54	97	105	103	-	-
Gobelé 100mL ∅=4,5cm	**grau de conversão/ %**	16	58	75	97	102	98

A partir dos valores referidos na tabela 3.4 pode observar-se que quando a evaporação é realizada nos gobelés mais pequenos e estreitos os graus de conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina, para os mesmos volumes de solução em reacção, são maiores que os obtidos nos ensaios realizados com os gobelés maiores e mais largos. Entre esses dois ensaios a diferença mais assinalável é o facto de a

evaporação ser muito mais rápida quando decorre nos gobelés de 100mL do que quando decorre nos gobelés de 25mL. Na prática verifica-se que o intervalo de tempo para evaporar um dado volume de solução num gobelé de 25mL é mais do que o dobro do tempo que leva a evaporar esse mesmo volume num gobelé de 100mL. Desta forma nos ensaios realizados nos gobelés mais pequenos o tempo em reacção é efectivamente maior, o que pode explicar as diferenças observadas nos graus de conversão que foram obtidos. Verifica-se, igualmente, que à medida que se aumenta o volume de solução a evaporar (e, consequentemente, a quantidade de OFDA no resíduo resultante da evaporação que vai ser analisado), o pico correspondente à 2,3-di-hidroxiquinoxalina vai sofrer cada vez maior influência da banda correspondente à libertação de hidrogénio e, por isso, existe uma maior dificuldade em efectuar a medição da altura do pico polarográfico, devido à maior dificuldade em definir a linha de base. Contudo, o factor que é responsável pelo deslocamento anódico da banda correspondente à libertação de hidrogénio não é directamente a quantidade de OFDA presente na solução, mas sim a dos produtos resultantes da decomposição da OFDA, pois tal efeito manifesta-se de forma distinta nos ensaios em que apesar de existir a mesma quantidade de OFDA na solução a analisar, o tempo para levar a solução à secura foi distinto.

A principal conclusão que se pode retirar destes ensaios é que mesmo utilizando este processo de levar a solução à secura continua a ser preciso controlar o intervalo de tempo em que decorre a evaporação pois, se a evaporação for rápida, a conversão do ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina pode não ser quantitativa; porém, se o tempo de aquecimento for muito longo, a OFDA pode decompor-se em extensão apreciável e provocar interferência na análise.

3.3.2.5 - Influência da concentração de HCl na análise polarográfica

Como se referiu na secção 2.1.3 na Parte II, a sensibilidade da técnica polarográfica para a determinação da 2,3-di-hidroxiquinoxalina é bastante dependente do electrólito de suporte utilizado na análise; dos electrólitos de suporte ensaiados o HCl 0,1M foi aquele onde se obteve maior sensibilidade polarográfica. Nos estudos realizados até agora, utilizou-se sempre para retomar o resíduo resultante do processo de derivatização, solução de HCl 0,1M; contudo, verificou-se que a utilização de solução de HCl ainda mais concentrada tinha duas vantagens: por um lado, aumentava ainda mais a sensibilidade da análise polarográfica e, por outro lado, melhorava a separação

entre o pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina e a banda correspondente à libertação do hidrogénio. Por esta razão, decidiu-se passar a utilizar solução HCl 1M para a retoma do resíduo proveniente da derivatização nos ensaios seguintes.

3.3.3 - AVALIAÇÃO DO PROCESSO POLAROGRÁFICO DE ANÁLISE DO ÁCIDO OXÁLICO

Nos ensaios anteriores seleccionaram-se as condições de meio mais adequadas para a realização da análise polarográfica do ácido oxálico. As condições de derivatização seleccionadas consistem no aquecimento de cerca de 10mL de solução contendo a amostra em meio HCl 0,5M, na presença de OFDA 2%. O aquecimento dessa solução deve ser realizado em banho-maria à ebulição até levar a solução à secura. A retoma do resíduo faz-se com solução HCl 1M e a solução resultante é analisada polarograficamente. Utilizando este procedimento foi estabelecida uma curva de calibração para uma gama de concentrações alargada de ácido oxálico. Essa curva de calibração foi comparada com a obtida para a 2,3-di-hidroxiquinoxalina, nas mesmas condições de análise, isto é, fazendo adições sucessivas de solução de 2,3-di-hidroxiquinoxalina sobre um branco preparado tal e qual os ensaios contendo ácido oxálico e submetido ao mesmo processo de derivatização.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Derivatização das soluções de ácido oxálico

(i) Para vários gobelés de 25mL adicionaram-se 10mL de solução de HCl 0,5M contendo 2% de OFDA e quantidades variáveis de solução de oxalato de sódio.

(ii) Colocaram-se os gobelés em aquecimento num banho-maria à ebulição, até à evaporação completa da solução.

(iii) O resíduo resultante foi retomado com solução HCl 1M. As soluções obtidas foram transferidas para balões volumétricos de 25mL e foi feita a diluição rigorosa a 25mL com solução HCl 1M.

Análise polarográfica

Para a análise polarográfica das soluções referidas, transferiu-se o conteúdo desses balões volumétricos para a célula polarográfica, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o polarogramas de cada uma dessas soluções.

A curva de calibração da 2,3-di-hidroxiquinoxalina foi obtida através da adição sucessiva de 2,3-di-hidroxiquinoxalina a uma solução que resultou da aplicação do

processo de derivatização a uma amostra que não continha ácido oxálico (ensaio em branco).

As condições de análise polarográfica utilizadas nestes ensaios foram as seguintes:

t_{gota} = 1s;

amplitude de impulso = 30mV (impluso catódico);

velocidade de varrimento = 3mV/s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 3.5 apresentam-se as curvas de calibração obtidas para o ácido oxálico após derivatização e para a 2,3-di-hidroxiquinoxalina. A partir dessas curvas é possível verificar que existe uma extensa gama de concentração onde é possível estabelecer uma relação linear entre a intensidade de corrente do pico polarográfico obtido e a concentração das espécies, em ambos os casos. Conforme se observa na figura 3.5, as curvas de calibração obtidas para o ácido oxálico e para a 2,3-di-hidroxiquinoxalina possuem declives ligeiramente diferentes. Essas diferenças podem ser devidas ao facto do grau de conversão resultante da derivatização do ácido oxálico ser inferior a 100% (nestes ensaios, fazendo a razão entre os dois declives das duas rectas obtém-se um valor de 94%); no entanto, não é de excluir a possibilidade de existir um erro na concentração assumida como verdadeira para a solução de 2,3-di-hidroxiquinoxalina utilizada como padrão, pois esta solução é difícil de preparar com uma concentração rigorosa dada a baixa solubilidade em água deste composto e, por isso, existe uma apreciável imprecisão na pesagem da pequena massa de 2,3-di-hidroxiquinoxalina necessária para a preparação dessa solução.

As diferenças de sensibilidade encontradas nas duas curvas de calibração podem condicionar a utilização da solução de 2,3-di-hidroxiquinoxalina como solução padrão para a quantificação do teor de oxalato de sódio em amostras reais através do método de adição de padrão, através da sua adição directa à solução proveniente da derivatização. Contudo, a simplicidade deste procedimento e a possibilidade de o aferir, pode torná-lo preferível à alternativa que corresponde à realização do método de adição de padrão através da adição de oxalato de sódio à amostra e derivatização de todas essas soluções. Esta alternativa é, como é evidente, muito mais laboriosa e morosa, embora em termos de exactidão seja mais fiável.

A partir dos gráficos de calibração estabelecidos pode estimar-se o limite de detecção do método polarográfico para a análise de ácido oxálico em cerca de $1x10^{-7}$M, a que corresponde uma intensidade de corrente de pico de cerca de 2nA.

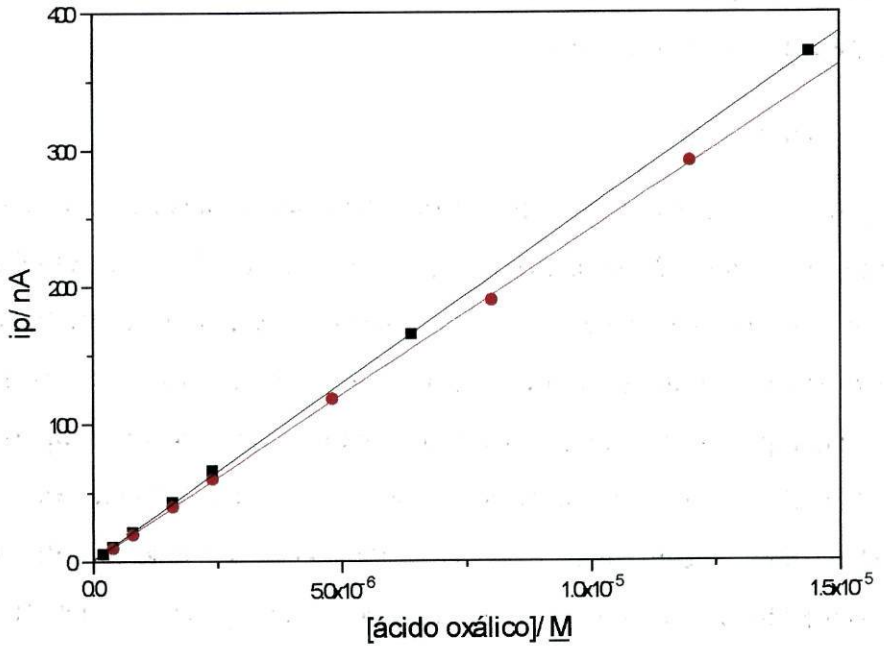
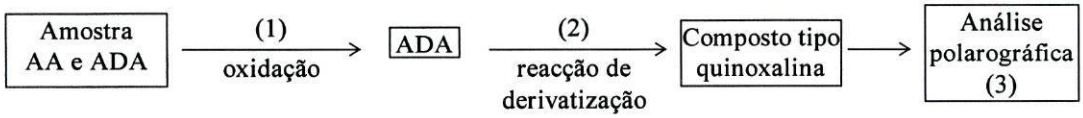


Figura 3.5 - Curva de calibração de ácido oxálico obtida por polarografia (●) após derivatização nas seguintes condições: meio HCl 0,5M; concentração de OFDA= 2%; processo de derivatização até à evaporação da solução em reacção; análise polarográfica efectuada em HCl 1M.
Curva de calibração de 2,3-di-hidroxiquinoxalina obtida por polarografia (■) através da adição sucessiva de solução padrão de 2,3-di-hidroxiquinoxalina a um branco que foi submetido ao mesmo processo de derivatização utilizado para as amostras.

4 - ANÁLISE DE ÁCIDO DESIDROASCÓRBICO, COMPOSTO α-DICARBONÍLICO DA CLASSE IV

Nesta classe de compostos com estruturas mais complexas foi estudado o ácido desidroascórbico. A facilidade em promover a oxidação do ácido ascórbico (AA) a ácido desidroascórbico (ADA) possibilita a derivatização global desses dois compostos desde que, previamente, se promova essa oxidação antes de realizar a reacção de derivatização com a OFDA. O interesse na determinação desses dois compostos reside no facto de, como se referiu, constituírem em conjunto a denominada vitamina C[64]. O processo polarográfico de análise da vitamina C, baseado na derivatização do ADA com a OFDA implicará, assim, as seguintes fases:



Utilizando este procedimento determina-se, simultaneamente, as quantidades de AA e de ADA. Em paralelo pode-se fazer outra determinação, em que se suprime o passo de oxidação, pelo que se determina unicamente o ADA. A diferença entre os dois resultados permite calcular a concentração de AA.

O desenvolvimento de uma metodologia para a realização da análise polarográfica da vitamina C envolve, assim, o estudo e a selecção das condições mais apropriadas para a realização dos vários processos envolvidos em cada uma das fases referidas.

O conhecimento do comportamento polarográfico do produto da reacção entre a ADA e a OFDA em diferentes condições de meio é fundamental para se poder avaliar os resultados obtidos nos estudos relacionados com o processo de oxidação do AA a ADA e com o processo de derivatização do ADA. No entanto, ao contrário do que sucedeu para as quinoxalinas resultantes da derivatização dos compostos α-dicarbonílicos das classes I, II e III, para esta não se realizou previamente esse estudo, pelo facto de o produto desta reacção de derivatização não se encontrar bem caracterizado. Desta forma, os estudos iniciais incidiram sobre a caracterização do comportamento polarográfico da solução resultante da reacção entre o ADA e a OFDA em diferentes condições de meio

que, simultaneamente, era utilizado como meio reactivo e como electrólito de suporte para a análise polarográfica. Numa fase posterior estudaram-se as condições para a realização do processo de oxidação do AA a ADA, utilizando dois processos distintos de oxidação: no primeiro caso empregou-se carvão activado ("Norit") e no segundo caso empregou-se uma solução aquosa de N-bromossuccinimida (NBSI). Procedeu-se, também, ao estudo da influência da concentração de OFDA na reacção de derivatização. Finalmente, fez-se a avaliação das características analíticas dos métodos de análise de vitamina C desenvolvidos.

4.1 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES AQUOSAS

Prepararam-se soluções de ácido ascórbico (AA) por dissolução do composto (*Merck*, p.a.) em água. As soluções da ácido ascórbico foram preparadas na altura em que iam ser utilizadas devido à sua baixa estabilidade. Tipicamente preparou-se uma solução de ácido ascórbico 1g/L, através da pesagem rigorosa de cerca de 100mg de ácido ascórbico sólido e dissolução rigorosa a 100mL. As soluções mais diluídas eram preparadas por diluição rigorosa desta.

Como agentes oxidantes foram utilizados o "norit", o nome comercial da *Merck* para carvão activado com qualidade *pro analisi*, e a N-bromossuccinimida (NBSI).

O "norit" antes de ser utilizado foi previamente lavado com solução de ácido clorídrico 0,1M. A lavagem foi realizada adicionando a 20g de "norit", 500mL de solução de ácido clorídrico 0,1M; essa mistura foi agitada durante 5min através de um agitador magnético, procedendo-se depois à filtração através de um funil de buckner. O carvão activado retido no filtro foi lavado com três porções, de cerca de 100mL, de água destilada e transferido para uma placa de petri, sendo colocado a secar na estufa a 110°C durante uma noite.

A solução de N-bromossuccinimida (NBSI) foi preparada por dissolução em água do reagente (*Merck*, p.a.), que foi utilizado sem qualquer purificação adicional. Esta solução foi preparada fresca no dia em que ia ser utilizada.

4.2 - INSTRUMENTAÇÃO

As determinações polarográficas foram realizadas no sistema de voltametria da marca Metrohm, descrito na secção 1.3 na Parte III, constituído pelo sistema de voltametria Metrohm, modelo VA Processor 646, que controlava um posto de polarografia também Metrohm, modelo VA Stand 647.

4.3 - ESTUDO DA VELOCIDADE DA REACÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO E DO COMPORTAMENTO POLAROGRÁFICO DO PRODUTO DA REACÇÃO

Este estudo teve por objectivo a avaliação do comportamento polarográfico da solução resultante da reacção de derivatização entre o ADA e a OFDA em diferentes meios. Nestes ensaios a derivatização e a análise polarográfica decorreram nas mesmas condições de meio, o que permitiu, por um lado, avaliar de forma simples o comportamento polarográfico do composto resultante da derivatização e, por outro lado, estimar a velocidade do processo de derivatização em diferentes condições de meio. Para a realização destes ensaios foi necessário obter previamente uma solução de ácido desidroascórbico. Essa solução foi obtida através da acção do "norit" (carvão activado purificado) sobre uma solução do ácido ascórbico. A utilização do "norit" para promover a oxidação deveu-se ao facto deste modo de oxidação do AA ter sido utilizado por Deutsch e colaboradores[71], no método microfluorimétrico que desenvolveram, para a análise da vitamina C, baseado na reacção do ADA com a OFDA para originar uma quinoxalina com características fluorescentes.

Neste estudo utilizaram-se como meio reactivo e, simultaneamente, como electrólito de suporte as mesmas soluções tampão que foram utilizadas nos estudos polarográficos referidos na tabela 2.1, na Parte II; utilizou-se neste estudo tampão acetato 0,1M, pH=4,5 ao invés das duas soluções tampão acetato com pH=4 e com pH=5.

Para a realização destes ensaios adicionou-se à solução de electrólito de suporte contendo OFDA, que se encontrava na célula polarográfica, uma dada quantidade de solução de ADA, previamente preparada por oxidação prévia de uma solução de AA utilizando como oxidante "norit", e fez-se o acompanhamento da evolução da reacção ao longo do tempo, através do registo periódico de polarogramas dessa solução.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Oxidação prévia da solução de AA

Prepararam-se 100mL de solução de AA 1g/L. Dessa solução retiraram-se 25,00mL que foram transferidos para um gobelé de 100mL. Adicionaram-se 0,5g de "norit" lavado e manteve-se a mistura em agitação magnética durante 5min. Filtrou-se a solução através de um funil de buckner e a solução resultante foi utilizada como solução de ADA. Para cada solução tampão ensaiada foi preparada uma nova solução de ADA.

Ensaios polarográficos

(i) Dissolveu-se em cerca de 40mL de solução tampão em estudo, cerca de 40mg de OFDA (resultando solução tampão contendo 0,1% de OFDA). Controlou-se potenciometricamente o valor do pH da solução obtida e, quando necessário, ajustou-se o valor do pH por adição gota a gota de HCl 0,1M.

(ii) Da solução anterior mediram-se, rigorosamente, 25mL para a célula polarográfica e, após 10min de passagem de azoto, obteve-se o respectivo polarograma (branco com OFDA).

(iii) Juntaram-se 25µL de solução de ácido desidroascórbico recém-preparada e, após passar azoto durante 2min, iniciou-se o registo de polarogramas em função do tempo. O início do registo do primeiro polarograma ocorreu 2min após a adição da solução de ADA; os polarogramas seguintes foram registados 15, 30, 45 e 60min após a adição da solução de ADA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através destes ensaios pretendeu-se caracterizar a resposta polarográfica dos produtos da reacção entre a OFDA e o ADA em diferentes soluções tampão com diferentes valores de pH. O modo como estes ensaios foram realizados permitiu, igualmente, fazer a estimativa da velocidade do processo de derivatização em cada uma dessas soluções tampão e avaliar a evolução do comportamento polarográfico das soluções em derivatização ao longo do tempo. Contudo, uma vez que não se possuía o composto resultante da derivatização, não foi possível estimar o grau de conversão resultante dos processos de oxidação e derivatização.

Em todas as soluções tampão testadas detectou-se o aparecimento de picos polarográficos após a adição da solução de ADA, o que significava que a reacção de

derivatização decorria em todas as condições de meio testadas. Na tabela 4.1 pode observar-se a estimativa do intervalo de tempo necessário para a obtenção do sinal polarográfico máximo nos diferentes meios ensaiados.

Tabela 4.1 - Intervalo de tempo necessário para atingir o valor máximo de sinal polarográfico, em diferentes soluções tampão.
(Concentração de AA na célula = $4{,}6 \times 10^{-5}$M; concentração de OFDA= 0,1%).

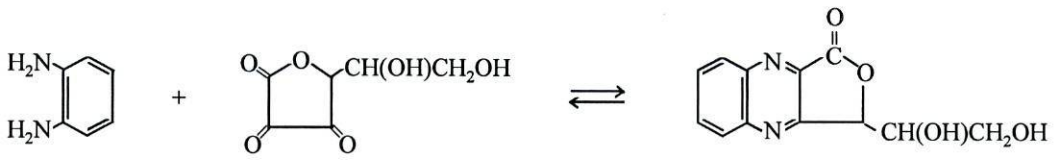
Solução tampão	pH	Estabilização do sinal (min)	Sinal obtido (nA)	Potencial do pico (mV)
HCl 0,1M	1	<30 (3°polarograma)	86	-440
HCl 10^{-3}M em NaCl 0,1M	3	<15 (2°polarograma)	92	-580
tampão acetato 0,1M	4,5	<15 (2°polarograma)	118	-680
tampão fosfato 0,1M	7	<15 (2°polarograma)	89	-820
tampão amoniacal 0,1M	9	*	*	*
NaHO 10^{-3}M em NaCl 0,1M	11	<30 (3°polarograma)	48	-930
NaHO 0,1M	13	<15 (2°polarograma)	45	-845

* Neste ensaio, contrariamente ao que aconteceu nos outros meios, surgiram dois picos que se mantiveram em crescimento durante as 2h45min em que a evolução dessa reacção foi acompanhada.

Através dos valores da tabela verifica-se que os ensaios realizados nas soluções tampão com pH entre 3 e 7 são aqueles que dão origem ao aparecimento de sinais polarográficos mais elevados e em que o crescimento do pico ocorre mais rapidamente; para além disso, o sinal polarográfico mantinha-se estabilizado nos polarogramas registados posteriormente, só se detectando um ligeiro decréscimo do sinal nos polarogramas registados uma hora após o início da reacção. Assim, como as soluções de ácido ascórbico e de ácido desidroascórbico são mais estáveis para valores de pH entre 3 e 5, decidiu-se escolher a solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, para a realização da reacção de derivatização e da análise polarográfica.

O comportamento polarográfico observado quando a reacção de derivatização e a respectiva análise é realizada para valores de pH superiores a sete é diferente do observado em condições de meio ácido. Nesses meios observa-se o aparecimento de dois picos: em meio tampão amoniacal 0,1M, pH=9, esses dois picos surgem bem distintos; nas duas outras soluções tampão mais alcalinas esses dois picos surgem sobrepostos, sob a forma de um pico largo.

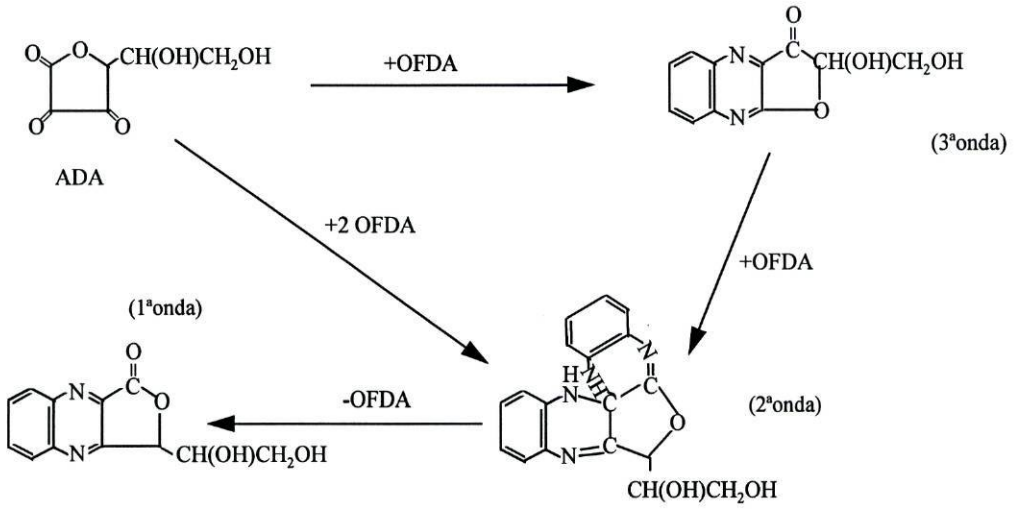
A reacção de derivatização entre o ADA e a OFDA é bem conhecida e serve de base a um conjunto de métodos de análise da vitamina C, devido ao facto de o produto dessa reacção ter características fluorescentes[64,69,71,72,73,94,155]; contudo, na pesquisa bibliográfica que foi efectuada não foram encontrados muitos trabalhos em que a caracterização do mecanismo desta reacção fosse abordada. Nos trabalhos de índole analítica envolvendo a fluorimetria, o composto ao qual é atribuída a fluorescência exibida pela solução onde decorre a reacção de derivatização entre o ADA e a OFDA é a 3-(1,2-di-hidroxietil)furo[3,4-b]quinoxalina-1-ona e a equação que representa a reacção de derivatização é habitualmente apresentada da forma seguinte[71,74]:



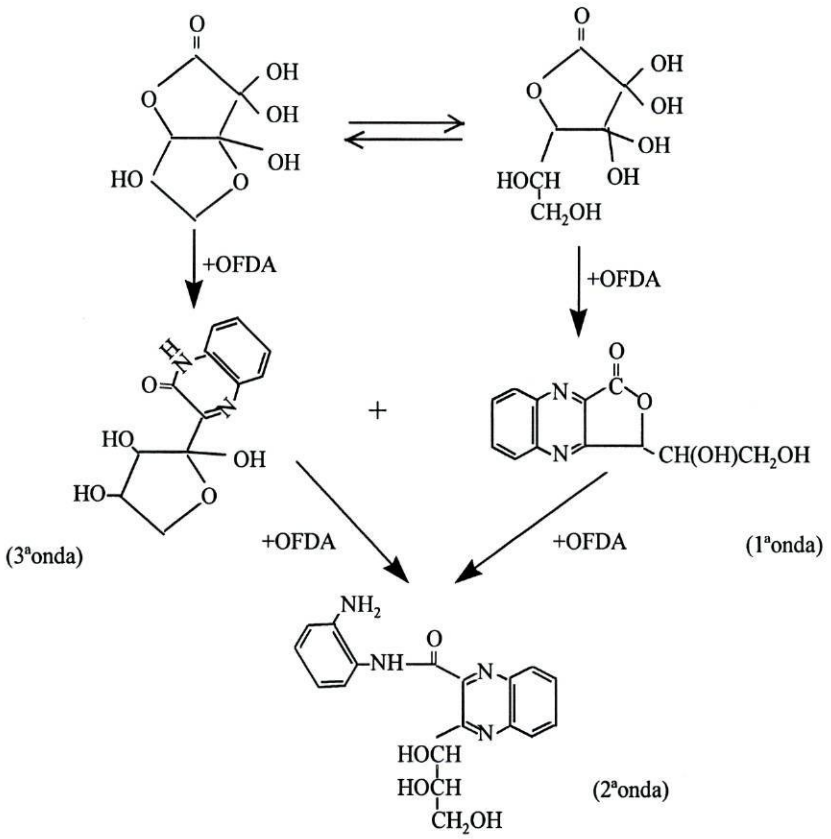
OFDA ADA 3-(1,2-di-hidroxietil)furo[3,4-b]quinoxalina-1-ona

Esta reacção de derivatização foi utilizada por Ono e colaboradores[76] para estudar e desenvolver um método de análise polarográfica do ácido desidroascórbico, baseado na polarografia clássica. Esse trabalho, publicado em 1961, não despertou muito interesse analítico pois o método desenvolvido tinha limites de detecção muito elevados relativamente ao método fluorimétrico que se baseava no mesmo processo de derivatização. No entanto esse trabalho apresenta bastante interesse pois Ono e colaboradores, para além de terem desenvolvido a metodologia analítica, procuraram estudar a reacção de derivatização e, neste contexto, apresentaram uma proposta de mecanismo para essa reacção em meio ácido. Mostraram que, como resultado da reacção entre a OFDA e o ADA surgiam duas ou três ondas polarográficas, consoante existia ou não um excesso de número de moles de ADA relativamente ao número de moles de OFDA - esta situação será aquela que se deverá encontrar num processo de análise de ADA. Verificaram, também, que consoante o pH do meio em que a reacção de derivatização e a análise polarográfica eram realizadas, as alturas relativas dessas três ondas tendiam a modificar-se, muito embora a altura total permanecesse quase constante. Assim, enquanto que em condições de meio com pH até sete a onda que predominava era a onda mais catódica, em condições de meio com valor de pH superior a sete observaram que as ondas mais anódicas passavam a ser as mais importantes.

Essas observações experimentais são similares às que foram obtidas neste trabalho utilizando a polarografia diferencial por impulsos. Com base no aparecimento das três ondas polarográficas, Ono e colaboradores propuseram o mecanismo para a reacção de derivatização que se esquematiza a seguir:



Mais tarde, já nos anos 80, esta interpretação para o mecanismo da reacção veio a ser revista por Takagi[156] um dos colaboradores no trabalho de Ono. Essa revisão do mecanismo da reacção de derivatização ficou-se a dever ao facto de entretanto terem surgido desenvolvimentos experimentais que indicavam que o ADA se apresentava em solução aquosa predominantemente numa forma hidratada com estrutura bicíclica. Com base nessa nova estrutura do ADA, Takagi e colaboradores apresentaram uma nova proposta de mecanismo de reacção entre o ADA e a OFDA em condições de meio ácidas, que se esquematiza a seguir:



O composto que se forma em maior extensão, como resultado da reacção entre o ADA e a OFDA é o composto responsável pela terceira onda que, conforme se pode observar pela estrutura indicada no esquema acima, se trata de uma 2-quinoxalinona, do mesmo tipo das quinoxalinas que resultam da reacção entre a OFDA e os compostos α-dicarbonílicos da classe II. Os compostos responsáveis pela 1ª e 2ª onda são quinoxalinas, do tipo das obtidas quando se faz reagir OFDA com compostos α-dicarbonílicos da classe I. Atendendo a estas características será de esperar que, por analogia com as características polarográficas das quinoxalinas resultantes da derivatização de compostos dessas duas classes, o composto responsável pela terceira onda se reduza irrreversivelmente e os outros dois sejam reduzidos reversivelmente. Estas características foram efectivamente confirmadas por Takagi e colaboradores, através de estudos por voltametria cíclica num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

Esta proposta de mecanismo contém dois aspectos que merecem ser realçados: por um lado assume que como resultado do processo de derivatização se formam três compostos cujas quantidades relativas podem variar ao longo do tempo; por outro lado, o composto que se forma predominantemente não é aquele que habitualmente surge indicado nos trabalhos em que é utilizada a técnica fluorimétrica. Note-se que, sobre

este último aspecto, atendendo a que as 2-quinoxalinonas são em geral compostos com características fluorescentes é, na realidade, mais provável que o composto responsável pela fluorescência seja o referido por Takagi e não o que foi referido no trabalho de Deutsch e Weeks[71], e que continua a surgir como responsável pela fluorescência em trabalhos recentemente publicados[74,94].

Em face destas considerações e do comportamento polarográfico obtido nos ensaios polarográficos efectuados, as melhores condições para a realização da reacção de derivatização são condições de meio ácido já que, como resultado do processo de derivatização, surge um pico polarográfico bem distinto e característico do ADA. Relativamente às condições de análise polarográfica, a sensibilidade do processo polarográfico é maior em condições ácidas, pelo que é possível realizar a análise polarográfica nas mesmas condições da reacção de derivatização. Este facto é muito vantajoso pois torna possível realizar o processo de derivatização e análise directamente na célula polarográfica.

4.4 - SELECÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OXIDAÇÃO DO AA A ADA E OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE

Neste trabalho foram ensaiados dois processos distintos de oxidação do AA a ADA. O primeiro envolveu a utilização de "norit" (carvão activado de elevado grau de pureza), idêntico ao processo de oxidação utilizado por Deutsch e Weeks[71] no método de análise fluorimétrica da vitamina C que desenvolveram e que se baseava igualmente na reacção do ADA com a OFDA. O segundo processo envolveu a utilização de uma solução de N-bromossuccinimida, o oxidante utilizado por Salpeter e colaboradores[73] na adaptação do método fluorimétrico de Deutsch e Weeks para um sistema de análise semi-automatizado da vitamina C em produtos alimentares. A necessidade de um agente oxidante alternativo ao carvão activado resultou do facto de existir nesse sistema semi-automatizado, a necessidade de incorporar o agente oxidante em fluxo. A selecção da N-bromossuccinimida deveu-se às características fracamente oxidantes deste composto que, no entanto, consegue oxidar quantitativamente o AA a ADA. É, aliás, um dos reagentes propostos[157] como titulante directo do AA, o que naturalmente significa que a reacção entre essas duas espécies deverá ser rápida e quantitativa.

4.4.1 - OXIDAÇÃO USANDO CARVÃO ACTIVADO

O processo de oxidação de AA a ADA utilizando carvão activado implica a adição de uma certa massa de carvão activado a um volume medido rigorosamente de solução contendo AA. Essa mistura é, depois, agitada durante um certo período de tempo e filtrada. A solução resultante é utilizada para a análise de ADA. Neste procedimento, existem algumas condições experimentais que podem influenciar a oxidação, tais como a massa de carvão activado usada e as condições do meio onde a oxidação decorre, que, por essa razão, se decidiu testar.

4.4.1.1 - Influência da quantidade de carvão activado

Nestes ensaios testou-se a variação da amplitude do sinal polarográfico obtido com uma solução de AA com concentração conhecida quando submetida a oxidação com diferentes quantidades de carvão activado. Neste estudo começou-se, porém, por fazer a verificação do desaparecimento do sinal polarográfico do AA na solução que foi sujeita ao tratamento com o carvão activado, através da análise polarográfica directa do AA em solução. Só depois se procedeu aos ensaios envolvendo a oxidação das soluções de AA, utilizando massas diferentes de carvão activado.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Teste da eficiência da oxidação do AA

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25,00mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o respectivo polarograma.

(ii) À solução anterior juntou-se 1,00mL de solução de AA 1g/L e, após passar azoto pela solução durante 2min, registou-se um novo polarograma da solução.

(iii) Repetiu-se o procedimento anterior (i + ii) usando 1,00mL de solução de AA resultante do tratamento de 25,00mL de solução de AA com 250mg de carvão activado, utilizando o procedimento descrito na secção 4.3.

Variação da quantidade de carvão activado

(i) Procedeu-se à oxidação de 25,00mL de solução de AA 1g/L utilizando diferentes massas de carvão activado. As massas de carvão activado utilizadas na oxidação foram: 100mg, 250mg, 1,00g e 2,00g.

(ii) Na célula polarográfica deitaram-se 25,00mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, contendo 0,1% de OFDA e deixou-se borbulhar azoto pela solução durante 10min.

(iii) Adicionou-se 200μL de solução proveniente de (i) à célula polarográfica, deixou-se a reacção decorrer durante 15min e registou-se o respectivo polarograma.

(iv) Estes ensaios foram repetidos utilizando uma solução de AA 0,25g/L.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise polarográfica directa do AA verificou-se o aparecimento de um pico, numa zona de potencial bastante próxima da banda correspondente à oxidação do mercúrio, correspondente à oxidação do AA no eléctrodo de mercúrio. Após o tratamento da solução de AA com carvão activado o pico deixou de ser detectado, pelo que se concluiu que a oxidação do AA ocorreu em elevada extensão.

Conforme se constata através do gráfico representado na figura 4.1, onde se representa o sinal polarográfico em função da massa de carvão activado, existe uma certa tendência para o sinal variar com a massa de carvão activado utilizada para promover a oxidação. Tal facto salienta a necessidade de controlar rigorosamente a massa de carvão activado que é utilizada no processo de oxidação.

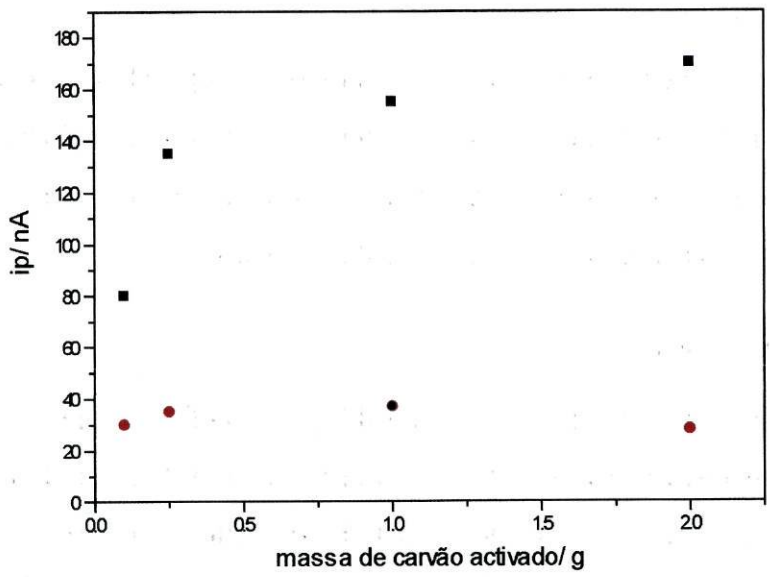


Figura 4.1 - Análise polarográfica de AA. Influência da massa de carvão activado utilizado na oxidação na intensidade de corrente de pico. Concentração de AA na célula polarográfica: (■) 8mg/L; (●) 2mg/L. (concentração de OFDA= 0,1%; análise polarográfica em solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5).

4.4.1.2 - Influência das condições do meio

Estes ensaios foram realizados com o objectivo de verificar a influência das condições de meio no processo de oxidação com carvão activado. Pelo facto das soluções de AA e ADA serem relativamente pouco estáveis, é de esperar que as condições de meio em que o processo de oxidação decorre seja um factor importante. Para a realização destes ensaios as soluções de AA 0,250g/L foram preparadas em diferentes soluções tampão. As soluções tampão utilizadas foram as mesmas sete soluções com pH entre 1 e 13, que foram utilizadas nos ensaios referidos na secção 4.3. Cada solução, após a preparação, foi tratada com o carvão activado e, após o tratamento realizou-se a análise da solução resultante através da recolha de uma pequena amostra que era analisada em tampão acetato 0,1M, pH=4,5.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(i) Pesaram-se rigorosamente 25mg de ácido ascórbico e dissolveram-se na solução tampão em estudo. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100mL e diluiu-se rigorosamente com solução tampão.
(ii) Mediram-se 25,00mL dessa solução para um gobelé e juntaram-se 250mg de carvão activado. Deixou-se a solução em agitação magnética durante 5min e filtrou-se através de um funil de buckner.
(iii) Colocaram-se 25,00mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, contendo 0,1% de OFDA na célula polarográfica e deixou-se borbulhar azoto durante 10min.
(iv) Adicionaram-se 200μL da solução resultante do processo de oxidação e após deixar reagir durante 15min registou-se o polarograma dessa solução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos dados registados na tabela 4.2 pode verificar-se que o sinal obtido depende fortemente das condições de meio em que o processo de oxidação tem lugar. O sinal polarográfico obtido foi máximo no ensaio em que o processo de oxidação decorreu em meio tampão acetato 0,1M, pH=4,5. Não se detectou sinal polarográfico na zona do potencial característico do pico do ADA derivatizado quando o processo de oxidação decorreu em meio alcalino. Estes resultados estão de acordo com as

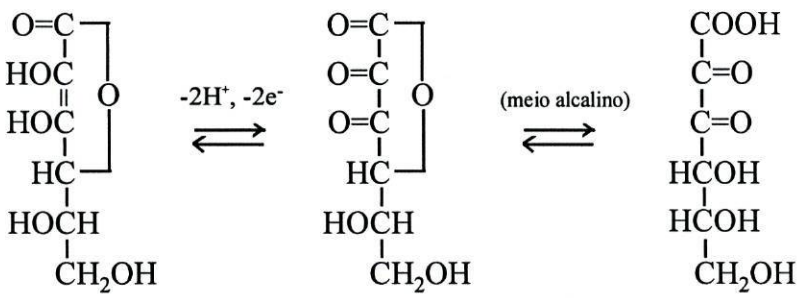
Tabela 4.2 - Influência do meio no processo de oxidação do AA com carvão activado.
(Volume de solução de AA tratada = 25,00mL; concentração da solução de AA = 0,25g/L; massa de carvão activado = 250mg).

Condições do meio	pH	sinal polarográfico/ nA
HCl 0,1M	1	13,4
HCl 10^{-3}M com NaCl 0,1M	3	17,8
Tampão acetato 0,1M	4,5	31,6
Tampão fosfato 0,1M	7	17,0
Tampão amoniacal 0,1M	9	__*
NaHO 10^{-3}M com NaCl 0,1M	11	__*
NaHO 0,1M	13	__*

* não surge sinal polarográfico na zona do potencial característico do pico do ADA derivatizado.

indicações encontradas na bibliografia, relativas à estabilidade do AA e do ADA, referindo que estes compostos são mais estáveis em condições de meio fracamente ácidas[155,158,159].

Nos ensaios em que a oxidação decorreu em meio alcalino não surgiu o pico característico do ADA após derivatização; apareceu, no entanto, um pico de menor dimensão, numa zona de potencial mais anódica. Admite-se que esse pico seja o resultado de, nessas condições de pH, o processo de oxidação do AA ocorrer de forma diversa, dando origem a ácido dicetogulónico, segundo o esquema[74]:



AA ADA Ácido dicetogulónico

De acordo com o trabalho de Ono e colaboradores que se referiu atrás[76], o ácido dicetogulónico pode também reagir com a OFDA; contudo o seu pico característico surge numa zona de pH menos catódica que a do pico do ADA.

4.4.2 - OXIDAÇÃO UTILIZANDO A N-BROMOSSUCCINIMIDA

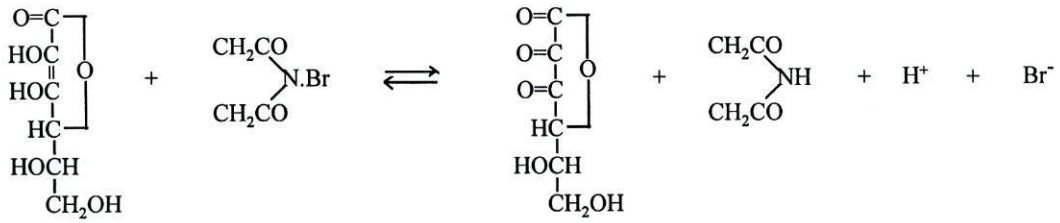
O uso de carvão activado para realizar a oxidação do AA a ADA colocou algumas dificuldades de índole experimental pelo facto de exigir a filtração das soluções para eliminar o carvão activado e exigir um controlo rigoroso das condições de realização da oxidação, o que tornou o processo de oxidação laborioso, como se depreende da descrição experimental e dos resultados obtidos nos ensaios anteriores. O uso de um agente oxidante em solução será, claramente, vantajoso pois permite que todo o processo de oxidação seja realizado sem ter que se recorrer à separação do agente oxidante.

De entre os inúmeros agentes oxidantes capazes de fazer a oxidação do AA referidos na bibliografia decidiu-se seleccionar a N-bromossuccinimida pelo facto de ser este o agente oxidante utilizado por Salpeter e colaboradores[73] no método semi-automatizado de análise fluorimétrica de vitamina C que desenvolveram, baseado, tal como o método flourimétrico de Deutsch e Weeks, nas características fluorescentes do composto formado por reacção entre o ADA e a OFDA.

No estudo efectuado para testar a N-bromossuccinimida como agente oxidante realizaram-se alguns ensaios preliminares, que se iniciaram pela verificação da resposta polarográfica da N-bromossuccinimida (NBSI) em várias soluções tampão, em primeiro lugar sem OFDA e, posteriormente, na presença de OFDA. De seguida, nessas mesmas soluções tampão, fez-se a análise de uma solução de AA, realizando a oxidação prévia com NBSI, acompanhando a evolução da reacção de derivatização ao longo do tempo através do registo periódico de polarogramas dessa solução. As soluções tampão utilizadas nestes ensaios foram as seguintes: HCl 0,1M, pH=1; HCl 10^{-3}M em NaCl 0,1M, pH=3; tampão acetato 0,1M, pH=4,5; tampão fosfato 0,1M, pH=7; e tampão amoniacal 0,1M, pH=9. Como se verificou que em presença de OFDA existia um pequeno sinal polarográfico na zona de potencial característico do pico do ADA após derivatização, estudou-se a influência que a quantidade de NBSI e a quantidade de OFDA tinham sobre a amplitude desse pico interferente. Por fim, estudou-se a influência da quantidade de OFDA na reacção de derivatização do AA oxidado.

4.4.2.1 - Características polarográficas da NBSI e análise polarográfica de AA, após oxidação com NBSI, em diferentes soluções tampão

A N-bromossuccinimida é um agente oxidante fraco que apresenta uma acção oxidante selectiva para certos grupos de compostos; entre eles encontra-se o AA que em solução aquosa é rapidamente e quantitativamente oxidado a ADA[91]. A reacção química que traduz o processo de oxidação pode ser esquematizada da seguinte forma:



A utilização deste composto como agente oxidante no processo de análise polarográfica só é possível, no entanto, se não fizer surgir sinais polarográficos que interfiram na análise pretendida. Estes ensaios tiveram por objectivo fazer essa verificação.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(i) Para a célula polarográfica deitaram-se 25,00mL da solução tampão em estudo e adicionaram-se 0,25mL de solução de NBSI 2g/L (concentração na célula = 20mg/L). Deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o respectivo polarograma (branco na presença de NBSI 20mg/L).

(ii) À solução anterior adicionaram-se 2,0mL de solução de OFDA 1,25% (concentração na célula = 0,1%), deixou-se borbulhar 2min de azoto e registou-se um novo polarograma (branco de NBSI 20mg/L na presença de OFDA 0,1%).

(iii) Repetiu-se o procedimento anterior, adicionando 0,250mL de solução de AA 0,10g/L (concentração de AA na célula= 1mg/L) à solução inicial. Igualmente se registou o polarograma desta solução após borbulhar azoto durante 10min.

(iv) Após adicionar a solução de OFDA e de se ter deixado borbulhar azoto pela solução durante 2min, iniciou-se o registo de polarogramas da solução em função do tempo, com uma periodicidade de quatro minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através destes ensaios foi possível caracterizar o comportamento polarográfico da NBSI em várias soluções tampão na ausência e na presença de OFDA. Utilizou-se depois a NBSI para oxidar uma solução de AA, com concentração 1,0mg/L, nas soluções tampão estudadas, e acompanhou-se a evolução do processo de derivatização ao longo do tempo por polarografia. Em todas as soluções tampão ensaiadas verificou-se que a NBSI não fazia surgir nenhum pico nos polarogramas; com a adição de OFDA à solução que continha NBSI, os polarogramas alteravam-se apreciavelmente e surgiam vários picos de pequena amplitude. Atendendo a que nem a OFDA nem a NBSI são responsáveis pela origem desses picos, o seu aparecimento só poderá ser explicado através da acção da NBSI sobre a OFDA. O efeito da adição de OFDA na solução que continha NBSI era, aliás, bem visível pois a mistura ficava amarelada. Um dos picos polarográficos surgia na zona do potencial do composto resultante da derivatização do ADA, pelo que constituía uma interferência directa no processo de análise. No entanto, a amplitude desse pico é bastante inferior à do pico obtido com a solução de AA 1mg/L, quando o ensaio é realizado em condições de meio ácidas, pelo que a sensibilidade desses dois processos é muito diferente. Relativamente ao comportamento polarográfico evidenciado pelas soluções de AA, que foram sujeitas a oxidação com NBSI e posterior derivatização, verificou-se que nos ensaios realizados com soluções tampão com pH ácido se obtinha um pico polarográfico de grande amplitude, numa zona de potencial onde se tinha verificado existir um pequeno sinal no branco. Em condições de meio neutro e de meio alcalino o comportamento polarográfico obtido foi distinto do observado em meio ácido, verificando-se que, nestas soluções tampão, o pico polarográfico surgia numa zona de potencial menos catódica e era menor. Estes resultados mostraram que o processo de oxidação e de análise do AA deve ser realizado em condições de meio ácidas. Na figura 4.2 pode observar-se a forma como variaram os picos polarográficos ao longo do tempo nos ensaios realizados em condições de meio ácidas. Nestes ensaios denota-se que existe uma tendência para o sinal polarográfico atingir um valor máximo e depois, lentamente, começar a diminuir ao longo do tempo. O decréscimo de sinal observado é, porém, pequeno durante os 60 minutos em que se acompanhou a evolução da reacção. Com base na evolução do sinal polarográfico com o tempo é possível observar que a velocidade da reacção é maior quando o processo decorre em maio tampão acetato.

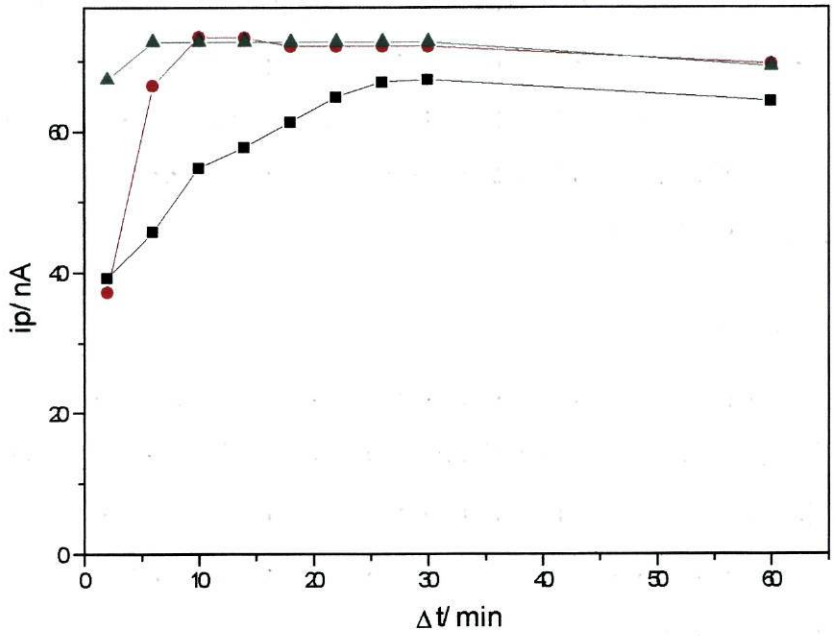


Figura 4.2 - Evolução com o tempo do sinal polarográfico de uma solução de AA 1mg/L, submetida a oxidação prévia com NBSI e a derivatização, nos seguintes meios: (■) HCl 0,1M; (●) HCl 10^{-3}M com NaCl 0,1M; e (▲) tampão acetato 0,1M, pH=4,5.
(Concentração de OFDA= 0,1%; concentração de NBSI= 20mg/L).

4.4.2.2 - Efeito da concentração da NBSI e OFDA no sinal interferente

Como nos ensaios anteriores se verificou que a NBSI e a OFDA reagiam entre si fazendo aparecer um pico polarográfico na mesma zona de potencial onde surgia o pico do ADA derivatizado, decidiu-se avaliar a influência da quantidade de NBSI na intensidade desse pico, para uma quantidade fixa de OFDA. Num outro ensaio similar avaliou-se a influência da quantidade de OFDA para uma quantidade fixa de NBSI.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

Efeito da concentração de NBSI

Para a célula polarográfica mediram-se 25,00mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, juntaram-se 2,00mL de solução de OFDA 1,25% (concentração de OFDA na célula polarográfica = 0,1%) e um dado volume de solução de NBSI 0,5g/L, variável de ensaio para ensaio. Após borbulhar azoto pela solução durante 10min, registaram-se os respectivos polarogramas das soluções.

Efeito da concentração de OFDA

Para a célula polarográfica mediram-se 25,00mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, juntaram-se 0,25mL de solução de NBSI 2g/L (concentração de NBSI na célula polarográfica = 20mg/L) e um dado volume, que variou de ensaio para ensaio, de solução de OFDA 1,25%. Após borbulhar azoto pela solução durante 10min, registaram-se os polarogramas das soluções.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 4.3 encontram-se registados os valores de intensidade de corrente do pico polarográfico que resulta da interacção entre a NBSI e a OFDA e que, pelo facto de surgir na zona de potencial do pico resultante da derivatização do ADA com a OFDA, pode interferir na análise do AA; nestes ensaios fixou-se a quantidade de OFDA e variou-se a quantidade de NBSI.

Tabela 4.3 - Intensidade de corrente do pico interferente em função da concentração de NBSI na célula polarográfica.
(Concentração de OFDA = 0,1%; tampão acetato 0,1M, pH=4,5).

Volume de solução de NBSI 0,5g/L / mL	Concentração de NBSI na célula/ mg/L	Intensidade de corrente do pico interferente/ nA
0	0	-
0,050	1	sem significado
0,10	2	sem significado
0,20	4	3,4
0,50	10	8,2
1,00	20	21
2,50	50	85

De acordo com os valores da tabela 4.3, quando a concentração de NBSI na célula polarográfica é inferior a cerca de 4mg/L, a influência do pico interferente é praticamente nula. Quando se utiliza uma concentração de NBSI na célula polarográfica superior a esse valor surge um pico na zona de potencial característica do ADA derivatizado que aumenta conforme aumenta a concentração de NBSI na célula.

Relativamente ao efeito da concentração de OFDA no pico interferente verifica-se através dos valores registados na tabela 4.4 que o aumento da quantidade de OFDA não faz aumentar a amplitude do pico interferente. Pelo contrário, o aumento da

concentração de OFDA origina um decréscimo desse pico. Este decréscimo de sinal poderá querer significar que, pelo facto de a quantidade de OFDA estar em bastante excesso relativamente à de NBSI, o aumento da quantidade de OFDA na célula não influencia grandemente a formação do composto interferente. O decréscimo no sinal verificado com o aumento da concentração de OFDA poderá ser interpretado como o reflexo da variação da sensibilidade polarográfica com o aumento da concentração de OFDA na solução a analisar.

Estes resultados salientam a necessidade de controlar a quantidade de NBSI que se adiciona à solução em análise por forma a minimizar esta interferência.

Tabela 4.4 - Intensidade de corrente do pico interferente em função da quantidade de OFDA na célula polarográfica.
(Concentração de NBSI = 20mg/L; tampão acetato 0,1M, pH=4,5).

Volume de solução de OFDA 1,25% (mL)	Concentração de OFDA na célula (%)	Intensidade de corrente do pico interferente (nA)
0	0	-
0,50	0,025	37,1
1,0	0,050	34,6
2,0	0,10	25,1
3,0	0,15	21,1
4,0	0,20	18,3
5,0	0,25	19,0

4.4.2.3 - Influência da quantidade de OFDA no processo de análise do AA

Através deste estudo pretendeu-se averiguar a influência da concentração de OFDA na velocidade do processo de derivatização. O processo de oxidação foi realizado do mesmo modo que nos ensaios anteriores, utilizando as mesmas quantidades de NBSI e de AA em solução. Variou-se, somente, a quantidade de OFDA utilizada na reacção de derivatização.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25,00mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, adicionaram-se 0,250mL de solução de AA 0,1g/L (concentração de AA na célula polarográfica = 1mg/L) e 0,125mL de solução de NBSI 2g/L (concentração de NBSI na célula = 10mg/L).

(ii) Deixou-se borbulhar azoto pela solução durante 10min, ao fim dos quais se adicionou um dado volume de solução de OFDA 1,25%, que variou de ensaio para ensaio. Após borbulhar mais 2min de azoto iniciou-se o registo de polarogramas ao longo do tempo, com a periodicidade de 4minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 4.3 representa-se a evolução do sinal polarográfico com o tempo de reacção para as várias concentrações de OFDA ensaiadas. Como seria de esperar, o aumento da concentração de OFDA resultou num aumento da velocidade da reacção de

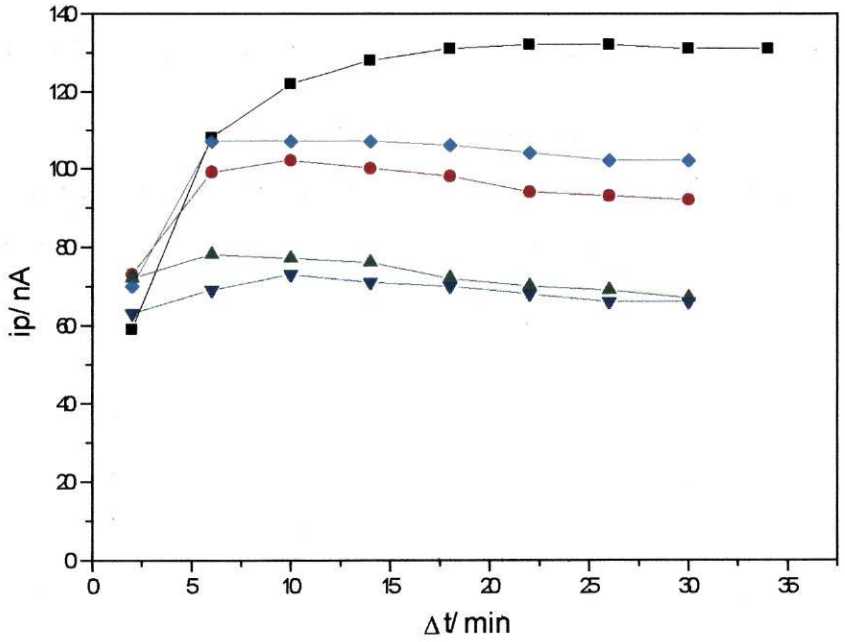


Figura 4.3 - Evolução com o tempo do sinal polarográfico de uma solução de AA 1mg/L, submetida a oxidação prévia com NBSI e a derivatização na presença da diferentes concentrações de OFDA: (■) 0,025%; (◆) 0,05%; (●) 0,1%; (▲) 0,15%; e (▼) 0,2%.
(Oxidação, derivatização e análise em meio tampão acetato 0,1M, pH=4,5; concentração de NBSI= 10mg/L).

derivatização e numa diminuição ligeira da sensibilidade da determinação. Estes resultados são semelhantes aos observados em ensaios similares com os compostos α-dicarbonílicos das outras classes. Verificou-se, igualmente, que a reacção de derivatização é bastante rápida, atingindo-se o valor de intensidade de corrente de pico máxima para intervalos de tempo inferiores a 6minutos (máximo obtido ao fim do segundo polarograma), quando a concentração de OFDA na célula polarográfica é igual ou superior a 0,05%. Denota-se através destes ensaios a existência de uma tendência

para o sinal polarográfico atingir um valor máximo e, depois, decrescer com o tempo; contudo tal diminuição de sinal decorre de forma muito lenta.

4.5 - AVALIAÇÃO DO PROCESSO POLAROGRÁFICO DE ANÁLISE DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Os ensaios precedentes permitiram seleccionar as condições mais apropriadas para fazer a determinação polarográfica do AA, envolvendo uma prévia oxidação a ADA e a derivatização deste último composto com OFDA. Foram estudados dois processos para a realização da oxidação: com carvão activado e com N-bromossuccinimida. Pretende-se, agora, avaliar as características do processo de análise polarográfica de AA, para o que se elaboraram curvas de calibração no sentido de verificar o tipo de relação existente entre o sinal polarográfico e a concentração de AA. Foram estabelecidas curvas de calibração utilizando os dois modos de oxidação do AA referidos.

4.5.1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AA, UTILIZANDO COMO OXIDANTE O CARVÃO ACTIVADO

Nos ensaios preliminares verificou-se que o sinal polarográfico obtido na análise de uma dada solução de AA dependia da massa de carvão activado que se utilizava para promover a oxidação. Por isso, nestes ensaios utilizou-se sempre a mesma massa de carvão activado nos vários ensaios.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(i) Em balões volumétricos de 25mL prepararam-se várias soluções diluídas de AA com concentração conhecida, em meio tampão acetato 0,1M, pH=4,5.

(ii) Dessas soluções retiraram-se 10mL para um gobelé de 25mL, adicionaram-se 250mg de carvão activado e manteve-se em agitação magnética durante 5min.

(iii) Filtrou-se a solução através de um funil de buckner, lavou-se o filtro com 10mL de solução tampão acetato 0,1M, pH=4,5, e transferiu-se a solução recolhida para um balão volumétrico de 25mL.

(iv) A essa solução adicionaram-se 2,00mL de OFDA 1,25% (concentração na célula = 0,1%) e perfez-se o volume do balão com solução tampão. Transferiu-se a solução para

a célula polarográfica e, após borbulhar azoto durante 10min, registou-se o respectivo polarograma.

As condições de análise polarográfica utilizadas nestes ensaios foram as seguintes:

- t_{gota}=1s;
- Amplitude de impulso= 50mV (impulso catódico);
- Velocidade de varrimento= 6mV/s;
- Intervalo de potencial varrido: entre -400mV e -1400mV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 4.4 representa-se a curva de calibração obtida no processo de determinação de AA baseado na oxidação prévia com carvão activado. A partir dessa curva de calibração verifica-se a existência uma extensa gama de concentrações de AA para a qual é possível estabelecer uma relação linear entre o sinal analítico e a concentração da espécie em solução. A partir dos resultados obtidos é possível estimar o limite de detecção em cerca de 25μg/L (cerca de $1{,}5\times10^{-7}$M), correspondente a um sinal polarográfico com uma amplitude de cerca de 2,5nA.

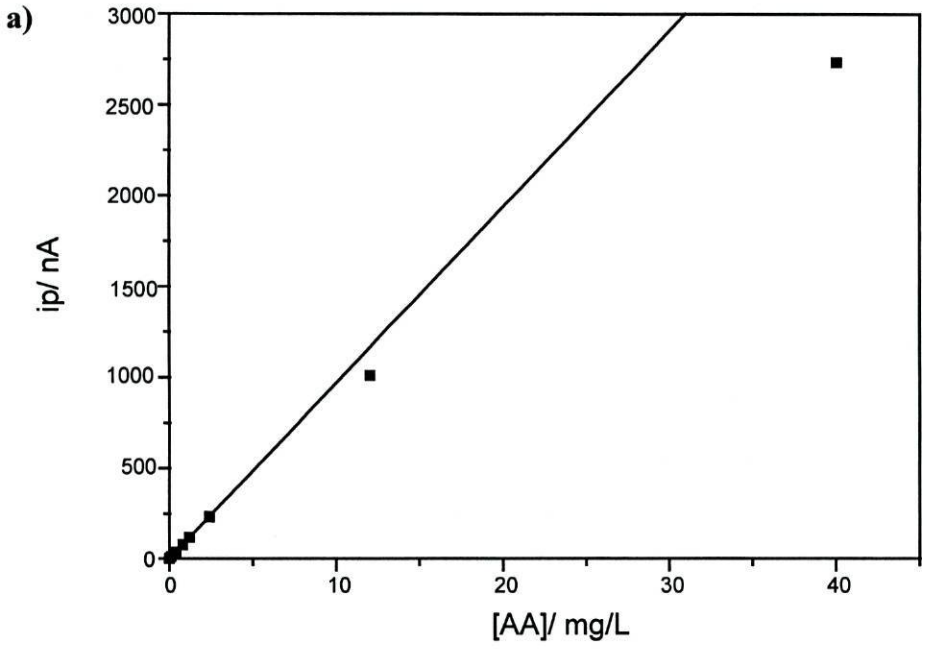


Figura 4.4 - Continua (legenda na página seguinte).

b)

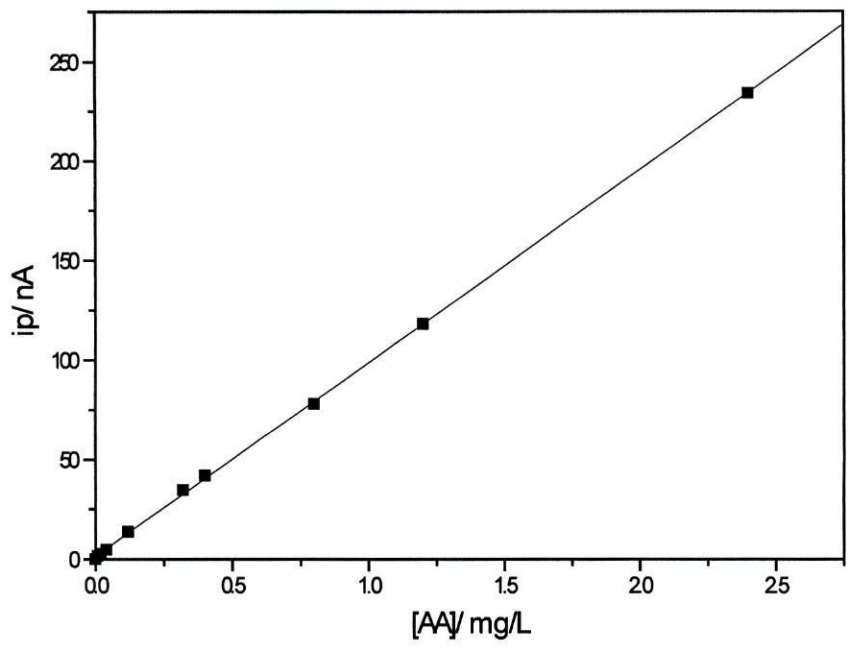


Figura 4.4 - Curva de calibração de AA obtida por polarografia após oxidação com carvão activado. **a)**- curva de calibração entre 0 e 40mg/L; **b)**- curva de calibração entre 0 e 2,5mg/L, evidenciando a zona de calibração linear.
(oxidação a ADA, derivatização e análise em tampão acetato 0,1M, pH=4,5; derivatização com 0,1% de OFDA).

Na curva de calibração obtida verifica-se que a relação entre o sinal polarográfico e a concentração de AA deixa de ser linear, para concentrações elevadas de AA. Essa perda de linearidade poderá reflectir a necessidade de se ter que adaptar as condições experimentais utilizadas, nomeadamente a quantidade de carvão activado e o tempo de contacto da solução de AA com o carvão activado, para que também, para essas concentrações mais elevadas, se possa obter uma resposta linear.

4.5.2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AA, UTILIZANDO COMO OXIDANTE A N-BROMOSSUCCINIMIDA

Como se assinalou nos ensaios preliminares em que se utilizou a NBSI como agente oxidante, a acção deste composto sobre a OFDA faz surgir um pico polarográfico na zona de potencial característica do ADA derivatizado. A intensidade de corrente desse pico depende essencialmente da concentração de NBSI e, como se referiu, a sua sensibilidade é bastante inferior à sensibilidade do ADA. Desta forma, a utilização de NBSI como agente oxidante fica condicionada à possibilidade da reacção de oxidação

do AA não necessitar de um grande excesso de NBSI para ocorrer com rapidez e em elevada extensão.

A caracterização da influência da quantidade de NBSI no processo de análise de AA constituiu, assim, um aspecto essencial para o estabelecimento destas curvas de calibração. Deste modo estabeleceram-se curvas de calibração utilizando três quantidades diferentes de NBSI em solução: 2mg/L, 5mg/L e 20mg/L de NBSI, respectivamente.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL de tampão acetato 0,1M, pH=4,5, juntou-se um dado volume medido rigorosamente de solução de ácido ascórbico com concentração conhecida e 0,1mL de solução de NBSI 0,5g/L (concentração de NBSI na célula = 2mg/L).

(ii) Deixou-se borbulhar azoto durante 10min e adicionou-se 2mL da solução de OFDA 1,25%. Deixou-se borbulhar azoto durante mais 5min e registou-se o polarograma da solução.

(iii) Procedeu-se de igual forma para outras concentrações de ácido ascórbico, para obter os outros pontos da curva de calibração.

(iv) O mesmo procedimento experimental foi seguido para a obtenção de curvas de calibração na presença de 5mg/L de NBSI e de 20mg/L de NBSI, tendo-se adicionado nesses casos, respectivamente, 0,25mL e 1mL de NBSI 0,5g/L.

As condições polarográficas utilizadas nestes ensaios foram as mesmas referidas na obtenção da curva de calibração com o carvão activado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 4.5 estão representadas as três curvas de calibração de AA obtidas utilizando as três concentrações distintas de NBSI para provocar a oxidação prévia do AA a ADA. A partir das curvas de calibração obtidas verifica-se que nas três diferentes situações ensaiadas podem estabelecer-se relações lineares entre a amplitude dos picos polarográficos e a concentração de AA. Estes ensaios mostram que a reacção entre o AA e a NBSI é rápida e quantitativa, não sendo necessário um grande excesso de NBSI em solução para se conseguir promover a oxidação do AA. Quando deixa de existir excesso de NBSI o sinal polarográfico atinge um valor limite, a partir do qual o sinal

polarográfico estabiliza. O facto de surgir um sinal polarográfico na zona do pico do composto resultante da reacção entre o AA e a NBSI tem como consequência que o excesso de NBSI deve ser minimizado para diminuir essa interferência. Por isso, a quantidade que se deve utilizar de NBSI num dado processo analítico deve ser ponderada consoante a concentração aproximada de AA na amostra. Para concentrações de AA inferiores a 1mg/L recomenda-se o uso de uma concentração de NBSI de 2mg/L, dado que para este nível de concentração de NBSI não surge qualquer sinal no branco com NBSI. Para concentrações de AA mais elevadas tem que utilizar-se quantidades de NBSI mais elevadas, para as quais o sinal no branco com NBSI deixa de ser nulo; contudo, como as sensibilidades polarográficas dos dois processos são muito diferentes, desde que o excesso de NBSI não seja muito grande, a influência do sinal do branco pode ser facilmente controlada.

O limite de detecção deste método de análise polarográfica pode ser estimado em cerca de 25μg/L (aproximadamente $1{,}5\times10^{-7}$M), correspondente a uma intensidade de corrente de cerca de 2,5nA.

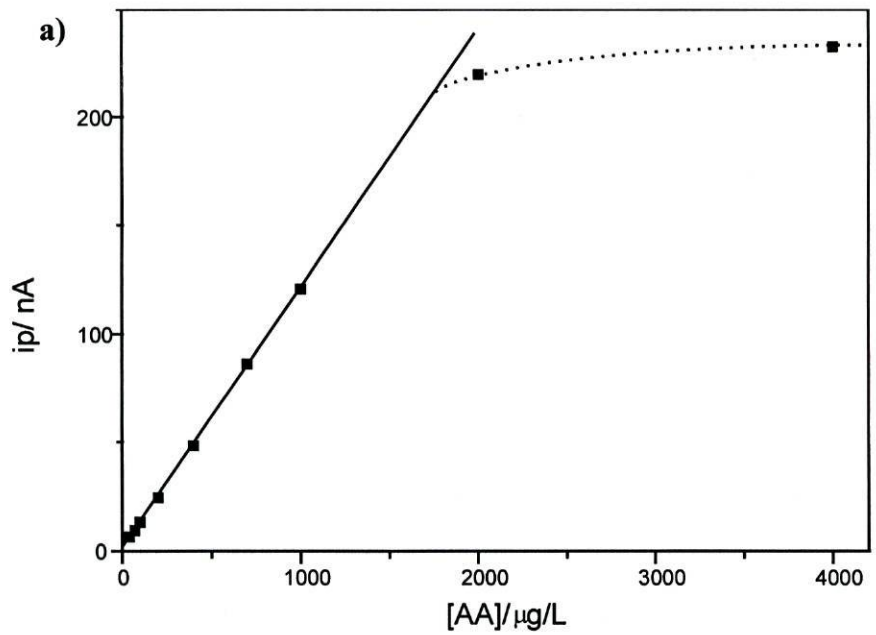


Figura 4.5 - Continua (legenda na página seguinte).

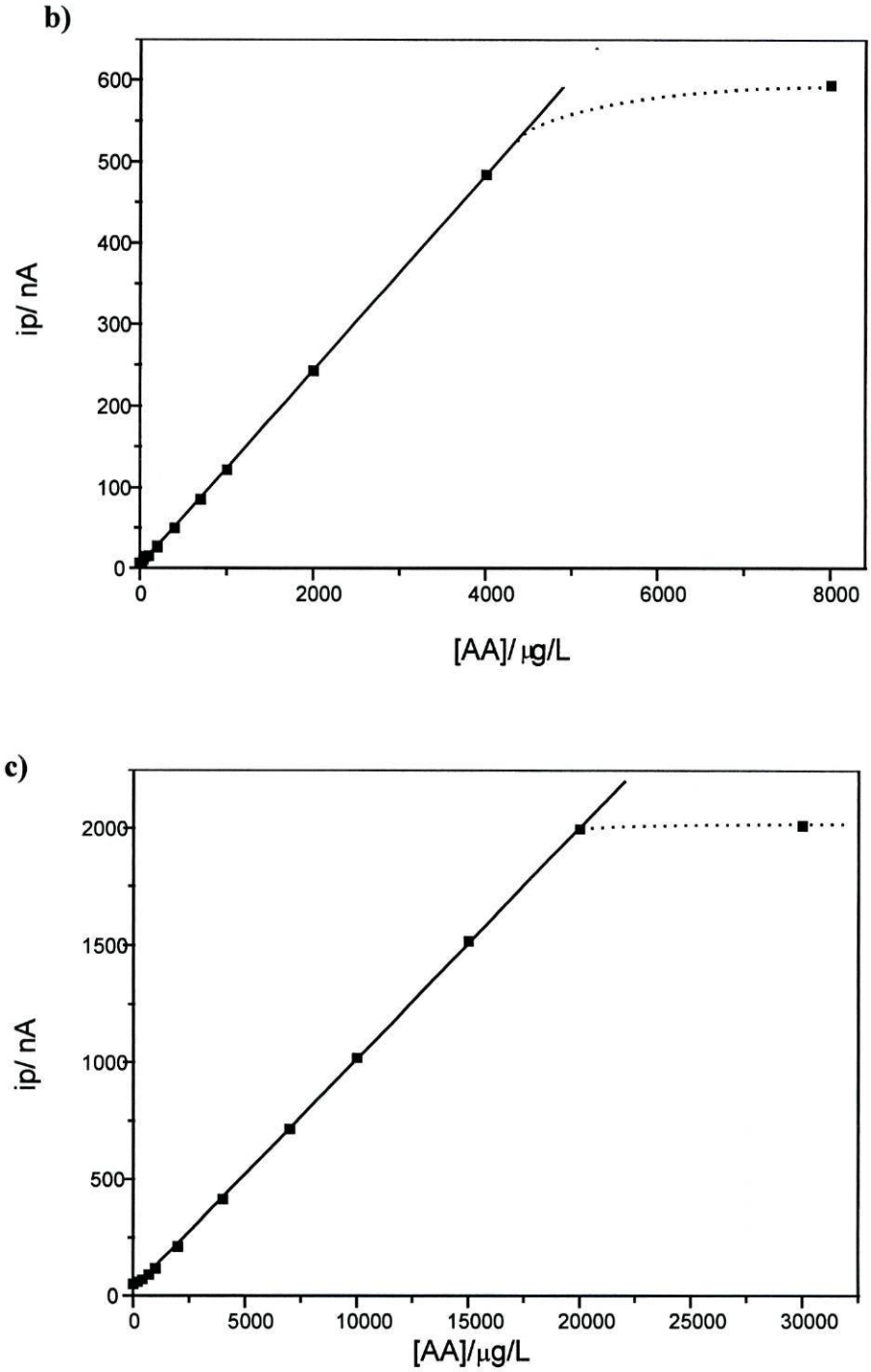


Figura 4.5 - Curvas de calibração de AA obtidas por polarografia após oxidação com diferentes concentrações de NBSI. **a)**- curva de calibração entre 0 e 4mg/L de AA utilizando 2mg/L de NBSI; **b)**- curva de calibração entre 0 e 8mg/L de AA utilizando 5mg/L de NBSI; **c)**- curva de calibração entre 0 e 30mg/L de AA utilizando 20mg/L de NBSI. (oxidação a ADA, derivatização e análise em tampão acetato 0,1M, pH=4,5; derivatização com 0,1% de OFDA).

PARTE IV

APLICAÇÕES

Como modo de exemplificar o interesse prático e a simplicidade dos métodos de análise polarográfica desenvolvidos, estudou-se a aplicação desses métodos a um conjunto de amostras de produtos alimentares e afins.

Para os compostos α-dicarbonílicos da classe I, o método de análise polarográfica foi utilizado para a realização de estudos sobre a estabilidade das soluções aquosas desses compostos em várias condições de pH e para a análise de diacetilo e, em certos casos, de metilglioxal em produtos alimentares tais como cerveja, vinho, manteiga e aguardente. Para os compostos α-dicarbonílicos da classe II (α-cetoácidos), o método polarográfico foi aplicado na determinação desses compostos em vinho. O método polarográfico desenvolvido para o ácido oxálico foi aplicado à determinação desse composto em rolhas de cortiça e na cerveja. Finalmente, o método polarográfico de análise de ácido ascórbico foi aplicado à determinação desse composto em sumos de frutos comerciais.

Nestas aplicações a amostras reais procurou-se, sempre que possível, comparar o resultado obtido através do método polarográfico com o resultado obtido através de métodos de análise alternativos. Quando tal não foi possível, optou-se por apresentar os valores de concentração típicos para o composto em questão encontrados na bibliografia.

1 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE I

1.1 - APLICAÇÃO AO ESTUDO DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES DESSES COMPOSTOS

O método polarográfico foi utilizado no estudo da estabilidade de soluções aquosas dos quatro compostos α-dicarbonílicos considerados nesta classe. O motivo pelo qual se realizou este estudo foi o facto de se ter encontrado indicações contraditórias na bibliografia sobre a estabilidade das soluções aquosas destes compostos[133,136].

Para a realização deste estudo prepararam-se, para cada composto α-dicarbonílico, várias soluções aquosas em diferentes soluções tampão, com valores de pH distintos. Ao longo do tempo, retirou-se uma amostra dessas soluções e analisou-se polarograficamente, por forma a acompanhar a evolução do sinal ao longo do tempo, o que permitiu inferir sobre a variação da concentração dessa espécie em solução e, consequentemente sobre a estabilidade da solução. Numa primeira fase estudaram-se soluções com a concentração 10^{-3}M de composto α-dicarbonílico; posteriormente, foi realizado um estudo similar com soluções com concentração $2x10^{-5}$M.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Ensaios com soluções de concentração 10^{-3}M

Para cada um dos quatro compostos α-dicarbonílicos considerados prepararam-se seis soluções com concentração 10^{-3}M em balões volumétricos de 100mL. As soluções foram preparadas em água destilada e nas seguintes cinco soluções tampão:

- HCl 0,1M;
- tampão acetato 0,1M, pH=5;
- tampão fosfato 0,1M, pH=7;
- tampão amoniacal 0,1M, pH=9;
- NaHO 0,1M.

O acompanhamento polarográfico da evolução da concentração dos compostos α-dicarbonílicos foi realizado utilizando o seguinte procedimento:

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25,00mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,05% de OFDA (0,1% de OFDA nos ensaios com o glioxal);

(ii) Após passagem de azoto pela solução durante 10min, registou-se o respectivo polarograma (branco com OFDA);

(iii) Adicionou-se, de seguida, 1mL, medido rigorosamente, de solução de composto α-dicarbonílico 10^{-3}M em estudo e, após passagem de azoto durante 5min (30min para os ensaios com o glioxal), registou-se o polarograma dessa solução.

A medição do sinal polarográfico das diferentes soluções foi realizada durante vários dias.

(B) Ensaios com soluções de concentração $2x10^{-5}$M

Para cada um dos compostos α-dicarbonílicos considerados prepararam-se quatro soluções com concentração $2x10^{-5}$M em balões volumétricos de 100mL. As soluções foram preparadas em água destilada e nas três soluções tampão seguintes:

- HCl 0,1M;
- tampão acetato 0,1M, pH=5;
- tampão fosfato 0,1M, pH=7.

Nos ensaios com o diacetilo testou-se, igualmente, uma solução preparada em NaHO 0,1M.

Para a realização destes ensaios utilizaram-se amostras de 5mL, medidos rigorosamente, da solução em estudo. Utilizou-se o seguinte procedimento experimental:

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 20mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,0625% de OFDA (0,125% de OFDA nos ensaios com o glioxal);

(ii) após passagem de azoto pela solução durante 10min, registou-se o respectivo polarograma (branco c/ OFDA);

(iii) adicionou-se, de seguida, 5mL da solução do composto α-dicarbonílico $2x10^{-5}$M em estudo e, após 5min de passagem de azoto (30min nos ensaios com o glioxal), registou-se o polarograma da solução.

A medição do sinal polarográfico das diferentes soluções foi, tal como nos ensaios anteriores, realizada durante vários dias, exceptuando a solução de diacetilo

preparada em NaHO 0,1M, para a qual o acompanhamento da resposta polarográfica foi feito no espaço de algumas horas, porque o decréscimo do sinal até zero decorria num espaço de tempo inferior a um dia.

As condições de análise polarográfica utilizadas nestes ensaios foram as referidas para a obtenção das curvas de calibração do composto referidas na Parte III.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pretendeu-se testar a estabilidade das soluções aquosas de compostos α-dicarbonílicos e avaliar a influência do meio, particularmente do pH, nessa estabilidade. Estes estudos foram feitos em soluções com duas concentrações distintas de compostos α-dicarbonílicos: $1x10^{-3}$M, para representar a concentração típica utilizada nas soluções de partida destes compostos; e $2x10^{-5}$M, para representar uma concentração provável dos compostos α-dicarbonílicos em amostras reais.

Na figura 1.1 representa-se a evolução do sinal polarográfico das várias soluções de compostos α-dicarbonílicos que foram testadas em diferentes soluções tampão e em água, ao longo de alguns dias após a sua preparação. Através dessas representações gráficas verifica-se que as soluções de compostos α-dicarbonílicos com concentração 10^{-3}M são apreciavelmente estáveis em solução ácida (HCl 0,1M e tampão acetato 0,1M, pH=5) e em água. Em soluções básicas (meio NaHO 0,1M e meio tampão amoniacal 0,1M, pH=9) as soluções são pouco estáveis, existindo, logo após a preparação das soluções, um decréscimo monótono do sinal polarográfico. A solução de diacetilo preparada em NaHO 0,1M desenvolve uma coloração amarela ao fim de pouco tempo após a preparação; a solução de 2,3-pentanodiona preparada em NaHO 0,1M, igualmente desenvolve uma coloração amarela, contudo, mais lentamente do que as soluções de diacetilo. As soluções de glioxal e metilglioxal preparadas em NaHO 0,1M permanecem incolores. Em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, as soluções de metilglioxal e glioxal são estáveis; por seu lado, as soluções de diacetilo e de 2,3-pentanodiona apresentam menor estabilidade, verificando-se um decréscimo lento do sinal polarográfico ao longo dos cerca de quinze dias em que a solução foi analisada. O decréscimo do sinal é mais acentuado para a solução de 2,3-pentanodiona .

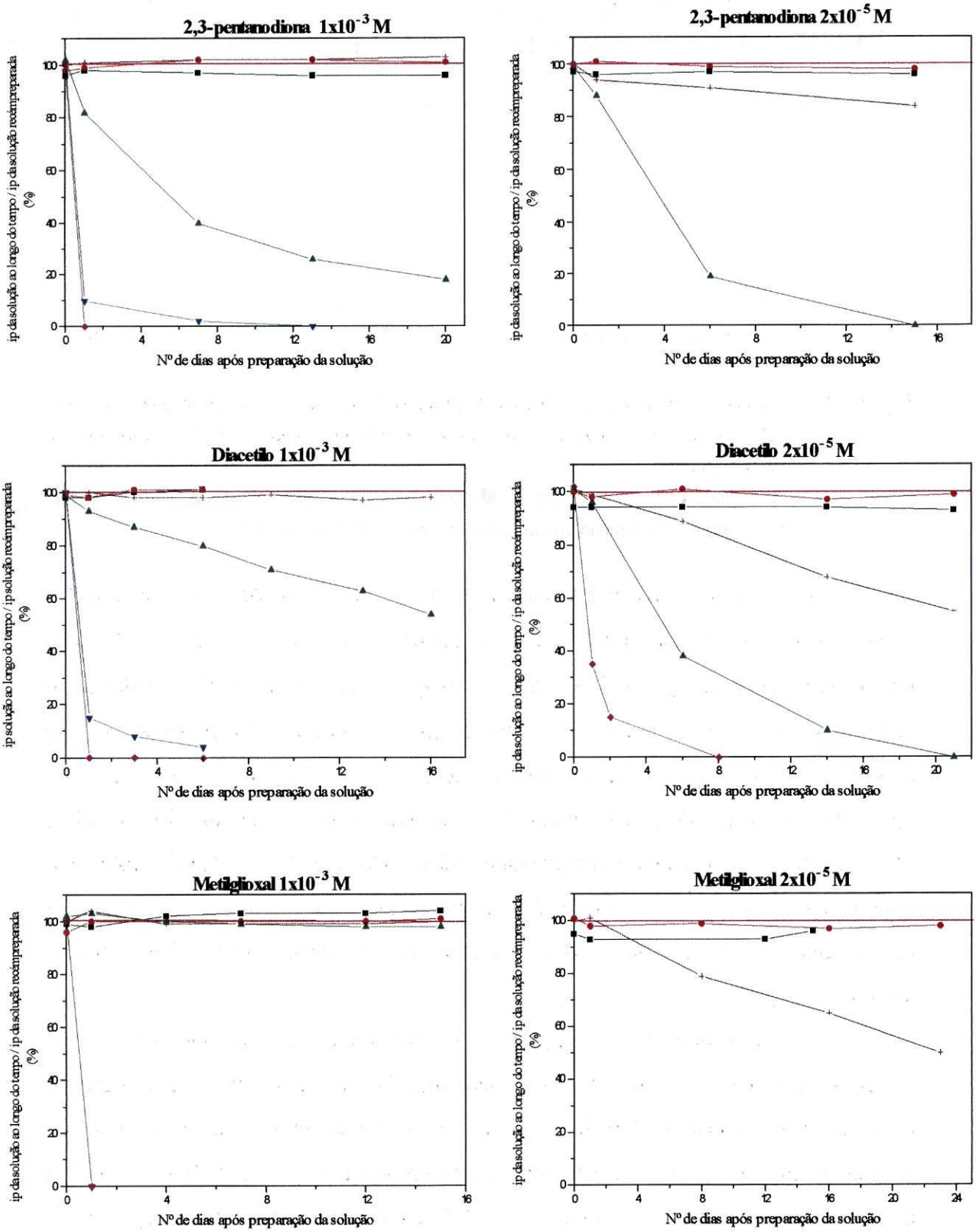


Figura 1.1 - Continua (legenda na página seguinte).

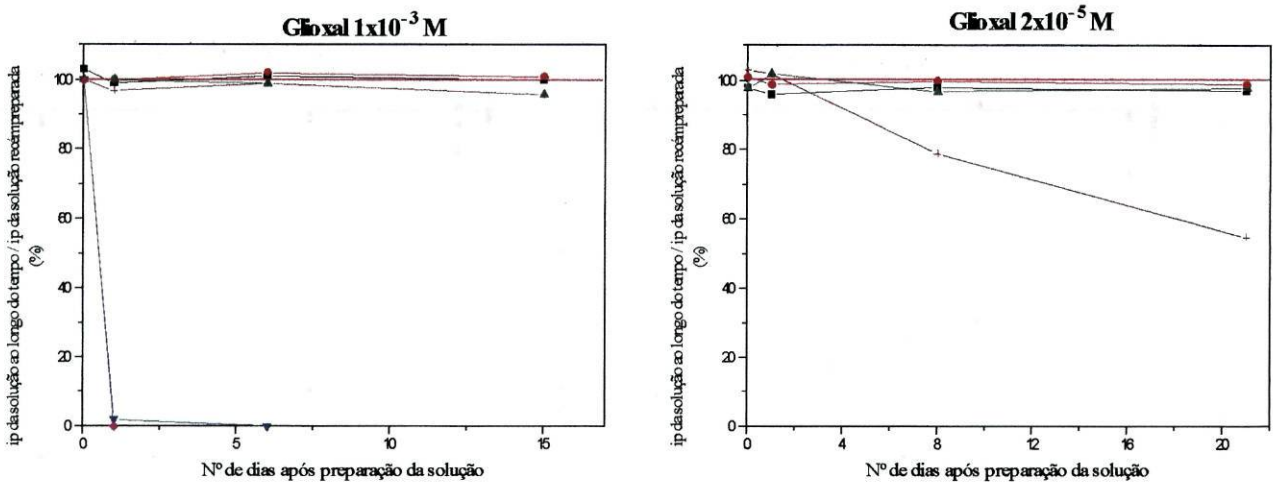


Figura 1.1 - Sinais polarográficos de soluções de compostos α-dicarbonílicos preparadas em várias soluções tampão e em água em função do tempo após a preparação da solução. Solução preparada em:
✚- água; ■- HCl 0,1M, pH=1; ●- tampão acetato 0,1M, pH=5; ▲- tampão fosfato 0,1M, pH=7; ▼- tampão amoniacal 0,1M, pH=9; ◆- NaHO 0,1M, pH=13.

Relativamente ao comportamento evidenciado pelas soluções destes compostos α-dicarbonílicos com concentração $2x10^{-5}$M, verifica-se que tanto em HCl 0,1M, como em tampão acetato 0,1M, pH=5 as soluções dos quatro compostos α-dicarbonílicos são bastante estáveis. No entanto, ao contrário do que sucede com as soluções com concentração 10^{-3}M, as soluções com concentração $2x10^{-5}$M preparadas em água apresentam um ligeiro decréscimo do sinal ao longo do tempo. Em tampão fosfato 0,1M, pH=7, observa-se que a solução de glioxal é estável (não se realizou o estudo neste meio para o metilglioxal); para as soluções de diacetilo e 2,3-pentanodiona $2x10^{-5}$M existe um abaixamento do sinal ao longo do tempo, à semelhança do que se verificara com as soluções 10^{-3}M.

A conclusão principal que se pode retirar dos resultados destes ensaios é que as soluções de compostos α-dicarbonílicos são estáveis em meio ácido e relativamente instáveis em meio alcalino. Em função destes resultados conclui-se que as soluções de partida destes compostos devem ser preparadas em solução acidulada. Por seu lado, a instabilidade observada para as soluções $2x10^{-5}$M em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, não é de tal modo importante que possa ocasionar alterações na composição da solução durante o período em que decorre a reacção de derivatização e a análise polarográfica.

Estes ensaios permitiram esclarecer, igualmente, até que ponto se pode efectuar a análise polarográfica directa de diacetilo, nas condições de meio fortemente alcalinas que foram propostas por Sadler e colaboradores[146], sem que ocorra a decomposição significativa de diacetilo. Conforme se pode apreciar na figura 1.2, existe uma diminuição relativamente rápida do sinal do diacetilo ao longo do tempo em meio alcalino (10% durante o espaço de uma hora), o que significa que se não existir um controlo rigoroso do tempo de realização da análise, poderão surgir alterações nos resultados obtidos. Convém, no entanto, ter em conta que os resultados relativos à estabilidade do diacetilo em NaHO 0,1M foram obtidos em soluções aquosas simples; em amostras reais a decomposição pode ocorrer de forma bastante diversa, uma vez que a complexidade da matriz pode dar origem a efeitos sinergéticos entre os vários componentes que podem favorecer ou desfavorecer a estabilização do diacetilo.

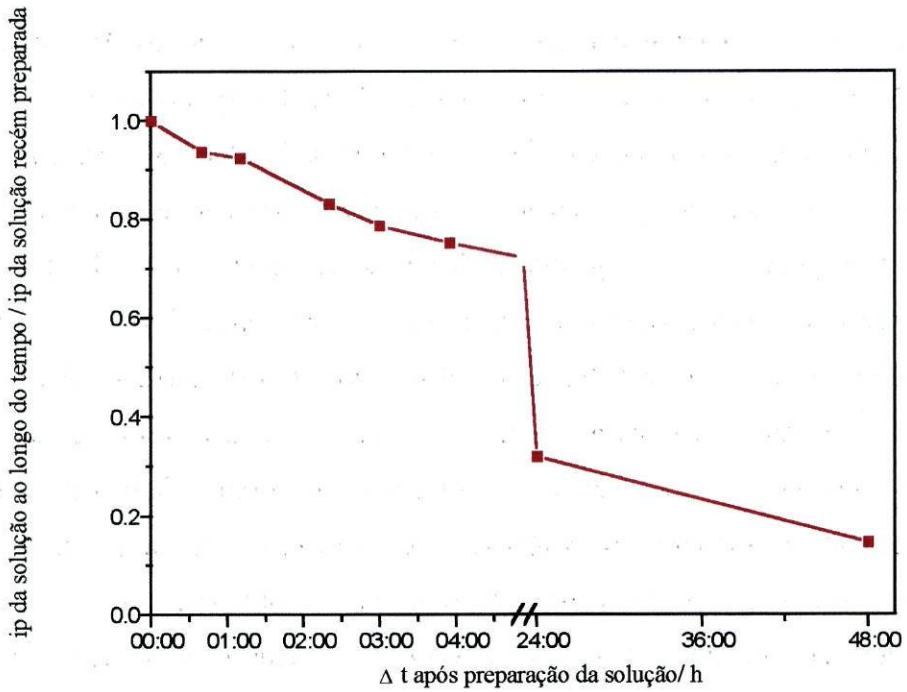


Figura 1.2 - Evolução do sinal polarográfico de uma solução de diacetilo $2x10^{-5}$M em NaHO 0,1M, após a sua preparação.

1.2 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE DIACETILO NA CERVEJA

Conforme se referiu na secção 2.3.1.2 da Parte I, o diacetilo é um composto de origem natural presente em variados produtos alimentares preparados através de processos de fermentação. Na cerveja a determinação do diacetilo assume particular importância, pois a partir de um certo nível de concentração - em geral, entre 50 a 100ppb - perturba o paladar característico da cerveja, conferindo-lhe um gosto amanteigado desagradável; assim, o controlo do teor de diacetilo na cerveja tem de ser efectuado sistematicamente. Não é habitual existir um controlo rotineiro do teor de diacetilo presente noutros produtos alimentares, para além da cerveja, e só recentemente começou a existir algum interesse neste composto como factor importante na definição do aroma e paladar de alguns alimentos, particularmente dos vinhos[20]. Começaram, também, a surgir alguns trabalhos em que o controlo do teor de diacetilo nos alimentos produzidos à escala industrial é utilizado como factor do controlo da qualidade de produção desses alimentos. Por exemplo, Damiani e Burini[160] afirmam que o controlo do teor de diacetilo na manteiga pode servir como indicador da qualidade do seu processo de preparação, já que, segundo estes investigadores, é possível mascarar defeitos organolépticos da manteiga através da adição de diacetilo; contudo, em tal caso, o teor de diacetilo presente passa a ser superior ao normal, podendo-se inferir, assim, a existência dessa adição. Também Sadler e colaboradores[146] utilizam a determinação de diacetilo em sumos de laranja produzidos à escala industrial como modo de testar a qualidade do seu processo de preparação. Neste caso, a presença de diacetilo no sumo embalado, que em condições normais não se deve verificar, indica que durante a fase de preparação do sumo poderão ter ocorrido fenómenos de proliferação microbiológica não desejados que, embora possam não se reflectir no paladar final do sumo e na sua qualidade microbiológica, uma vez que esses sumos são esterilizados antes de ser embalados, são um sinal da necessidade de tomar medidas de higiene na unidade de produção do sumo.

Na análise de diacetilo em amostras de produtos alimentares utilizando o método polarográfico desenvolvido é necessário ter em consideração a complexidade da matriz das amostras e a consequente possibilidade da ocorrência de interferências na análise.

Sobre este aspecto a polarografia é uma técnica de análise bastante sensível à existência de compostos interferentes; estes podem alterar a resposta polarográfica, chegando mesmo, nas situações mais extremas, a suprimi-la[161]. A situação é particularmente problemática se algum dos constituintes da amostra tiver actividade polarográfica na zona de potencial de pico do composto que se pretende analisar. Neste contexto, a existência de uma reacção de derivatização prévia no método de análise pode ser bastante favorável já que através desse processo vai surgir um derivado em solução que não existia na amostra; desta forma a amostra pode funcionar como branco, desde que as condições de análise polarográfica antes e após a realização da derivatização não variem consideravelmente. No entanto, é necessário assegurar que o sinal polarográfico obtido após a realização da reacção de derivatização é proporcional à quantidade do composto original existente na amostra e que não existem na amostra outras espécies que igualmente derivatizem.

Relativamente ao modo de realizar a análise, a adição de uma pequena porção da amostra directamente na célula polarográfica, se for exequível, é o processo mais simples e o menos sujeito a perdas, por não envolver nenhuma fase de preparação da amostra; assim, em geral, a análise directa deverá ser tentada em primeiro lugar. No caso da análise directa não ser possível, é necessário recorrer a técnicas de separação que possibilitem a simplificação da matriz e a realização da análise. É importante referir que a aplicação do método a amostras de diferente natureza poderá obrigar a adaptar o processo de preparação de amostra.

Dada a importância que a determinação do teor de diacetilo assume na cerveja, foi este o primeiro produto alimentar a ser ensaiado neste trabalho. Para o desenvolvimento do processo de análise polarográfica de diacetilo começou-se por testar a análise polarográfica directa do diacetilo na cerveja e, de seguida, perante o insucesso da análise directa, realizou-se a análise após a destilação prévia da cerveja. A destilação foi realizada por dois processos distintos: por destilação simples e por destilação por arrastamento de vapor. A selecção da destilação como modo de preparação da amostra resultou de ser este o modo de separação utilizado na maior parte dos métodos de determinação de diacetilo em alimentos que se encontraram publicados na literatura[33,92,98,146,147,162,163,164,165,166], todos eles indicando que o grau

de recuperação do diacetilo no destilado é muito elevado. Atendendo às potencialidades evidenciadas pelo método polarográfico para fazer a discriminação entre o diacetilo e o metilglioxal, já que os potenciais dos picos da 2,3-dimetilquinoxalina e da 2-metilquinoxalina estão ligeiramente afastados, decidiu-se comparar os dois processos de destilação e estudar as características de destilação dos quatro compostos α-dicarbonílicos considerados neste trabalho.

1.2.1 - ENSAIOS PRELIMINARES

Nestes ensaios preliminares começou-se por tentar fazer a determinação directa de diacetilo na cerveja, adicionando directamente 1mL de cerveja na célula polarográfica. Os ensaios seguintes envolveram a realização da destilação prévia da cerveja e a recolha do destilado obtido. A quantidade de cerveja utilizada na destilação e o volume de destilado recolhido foram adaptados do método espectrofotométrico recomendado pelo EBC ("European Brewing Convention")[34]. Utilizaram-se, quer a destilação directa quer a destilação por arrastamento de vapor porque ambos os processos são aplicados em métodos descritos na literatura, não existindo um consenso relativamente ao tipo de destilação mais vantajoso.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Análise directa da cerveja

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 20mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o polarograma da solução (branco).

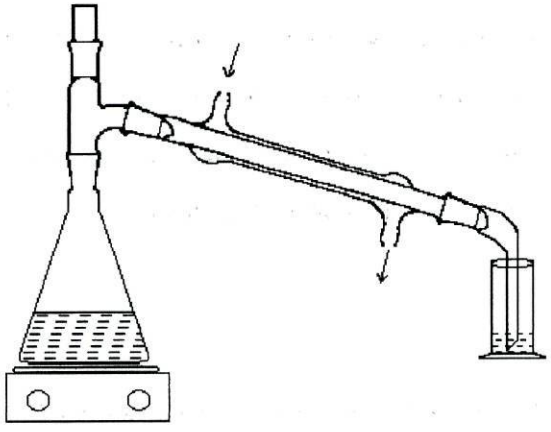
(ii) De seguida adicionou-se 1,00mL de cerveja e, após 5min de passagem de azoto pela solução, registou-se um novo polarograma (polarograma da cerveja sem derivatização).

(iii) Adicionaram-se, então, 5mL de OFDA 0,25% em tampão fosfato 0,1M, pH=7, e após borbulhar azoto durante 5min, registou-se o polarograma dessa solução (polarograma da cerveja após derivatização).

(iv) Por fim fizeram-se adições sucessivas de solução padrão de 2,3-dimetilquinoxalina, borbulhando azoto durante 1min após cada adição, antes de registar os polarogramas respectivos.

(B) Análise da cerveja após destilação simples

No esquema seguinte exemplifica-se o sistema utilizado na destilação simples:



(i) Destilaram-se 25,0mL de cerveja, tendo-se recolhido um volume de destilado de cerca de 10mL. Note-se que, conforme se representa no esquema do sistema de destilação, o bico do recebedor está mergulhado em cerca de 5mL de água destilada.

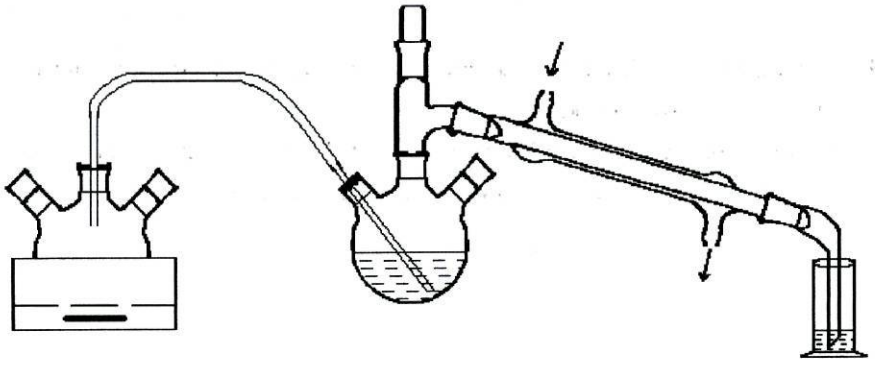
(ii) A solução recolhida na destilação foi transferida para um balão volumétrico de 25mL, adicionaram-se 5mL de OFDA 0,25% em tampão fosfato 0,5M, pH=7, e diluiu-se a solução a 25mL.

(iii) Transferiu-se a solução para a célula polarográfica e, após 10 min de passagem de azoto, registou-se o respectivo polarograma.

(iv) Por fim fizeram-se adições sucessivas de solução padrão de 2,3-dimetilquinoxalina, borbulhando azoto durante 1min após cada adição, antes de registar os polarogramas respectivos.

(C) Análise da cerveja após destilação por arrastamento de vapor

O esquema representado abaixo exemplifica o sistema de destilação utilizado:



No processo de análise da cerveja utilizando a destilação por arrastamento de vapor usou-se um procedimento análogo ao utilizado nos ensaios com destilação simples.

Os parâmetros polarográficos utilizados foram os mesmos utilizados para a obtenção das curvas de calibração, com a excepção de que, pelo facto de surgirem dois picos parcialmente sobrepostos, se utilizou uma amplitude de impulso de 20mV (impulso catódico), no sentido de melhorar a resolução dos picos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1.3 podem observar-se os polarogramas obtidos na análise directa da cerveja, sem e com derivatização. O polarograma da cerveja antes da derivatização

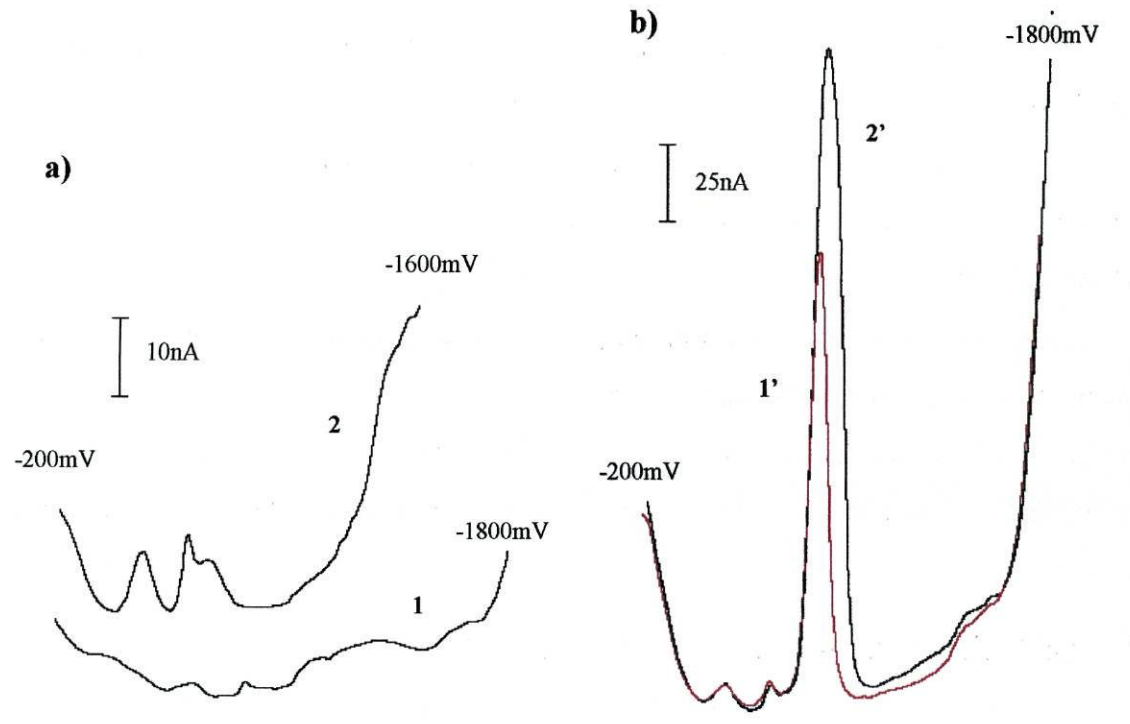


Figura 1.3 - Polarogramas obtidos na análise directa da cerveja, sem qualquer tratamento prévio, sem **a)** e após **b)** derivatização:
1- branco (solução tampão fosfato 0,1M, pH=7); **2-** solução anterior + 1mL de cerveja; 1'- 1mL de cerveja após derivatização; 2'- +adição de DMQ $8x10^{-6}$M.

apresenta três picos de pequena amplitude, cuja origem se desconhece mas que não deverão ser provenientes da redução polarográfica directa do diacetilo, uma vez que, atendendo às concentrações típicas de diacetilo na cerveja e à diluição da amostra, não é de supor que apareça um sinal polarográfico bem definido do diacetilo, quer na análise polarográfica directa, quer mesmo na análise polarográfica após derivatização. Após a derivatização surge um pico de grande amplitude na zona de potencial das quinoxalinas que resultam da derivatização dos compostos α-dicarbonílicos da classe I que, uma vez que só surge após derivatização será de admitir que resulte de um processo de derivatização semelhante ao que ocorre com o diacetilo e com os outros compostos α-dicarbonílicos da classe I. No entanto, como os teores habituais na cerveja dos quatro compostos α-dicarbonílicos da classe I considerados são baixos[22,167] não é de esperar que sejam estes compostos os responsáveis pelo pico polarográfico intenso observado. Após a adição de 2,3-dimetilquinoxalina na célula polarográfica não se observou o aumento do pico, mas o seu alargamento, o que indica que o potencial do pico da 2,3-dimetilquinoxalina é ligeiramente diferente do potencial do pico que resulta da derivatização directa da cerveja. O potencial desse pico é semelhante ao da 2-metilquinoxalina embora, como foi referido atrás, não possa ser atribuído somente à presença de metilglioxal na amostra. Vários trabalhos recentes [168,169,170,171] que abordam o mecanismo de degradação de hidratos de carbono têm vindo a mostrar que, em condições de meio neutras ou ácidas, esses compostos podem dar origem a hidratos de carbono com dois grupos carbonilo adjacentes, formando α-cetoaldeídos. Estes compostos são estruturalmente semelhantes ao metilglioxal e podem igualmente reagir com a OFDA para formar quinoxalinas com características de redução polarográfica que deverão assemelhar-se às da 2-metilquinoxalina. A presença na amostra destes compostos poderá explicar a origem do pico observado. Em termos analíticos a principal conclusão que se pode extrair destes resultados é que a determinação directa do diacetilo não é viável, devido à presença de compostos interferentes na análise.

Na figura 1.4 apresentam-se os polarogramas obtidos após a derivatização dos destilados resultantes da destilação simples e por arrastamento de vapor da amostra de cerveja. Conforme se pode observar, os polarogramas contêm dois picos parcialmente

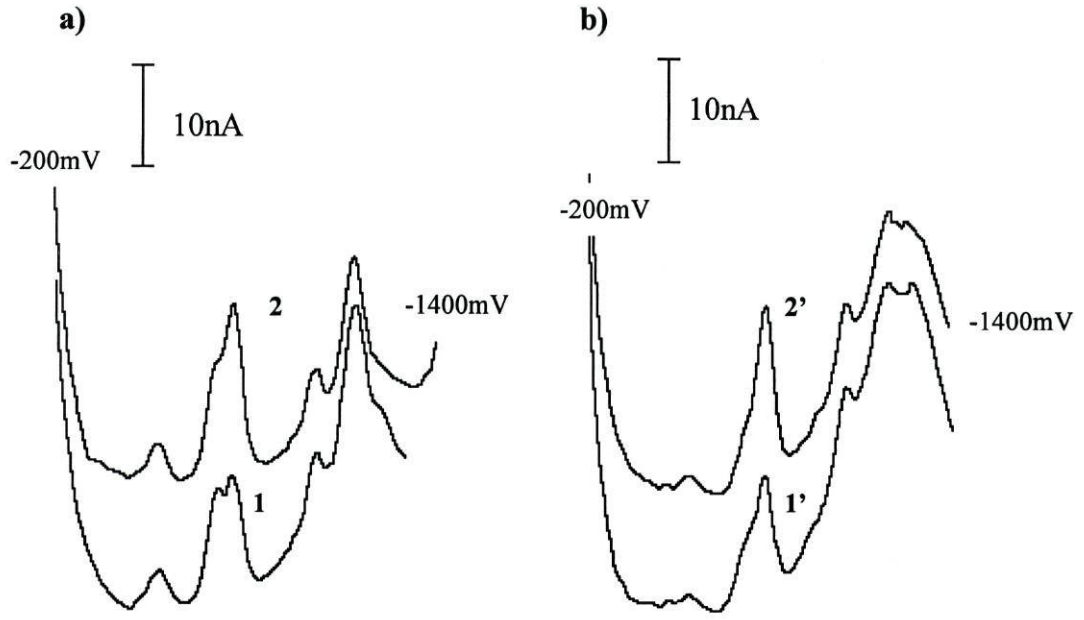


Figura 1.4 - Polarogramas obtidos na análise da cerveja após destilação simples **a)** e por arrastamento de vapor **b).**
1- destilado de 25mL de cerveja (destilação simples); **2**- adição de DMQ $2x10^{-7}$M; 1'- destilado de 25mL de cerveja (destilação por arrastamento de vapor); **2**- adição de DMQ $2x10^{-7}$M.

sobrepostos, situados na zona de potencial dos picos característicos das quinoxalinas resultantes da derivatização dos compostos α-dicarbonílicos da classe I. Ao adicionar 2,3-dimetilquinoxalina na célula polarográfica verifica-se um aumento no pico mais catódico, pelo que esse pico parece estar associado à presença de diacetilo. O outro pico, ligeiramente mais anódico, surge num potencial correspondente à 2-metilquinoxalina.

Por comparação entre os polarogramas obtidos com as soluções resultantes da destilação simples e da destilação por arrastamento de vapor da amostra de cerveja verifica-se que a altura do pico atribuído à 2,3-dimetilquinoxalina tem sensivelmente a mesma amplitude nos dois processos de destilação. Relativamente ao pico que surge na zona do potencial da 2-metilquinoxalina verifica-se que ele é maior quando se utiliza a destilação simples, pelo que, uma vez que há sobreposição parcial dos dois picos, se conclui que a interferência desse pico no pico correspondente ao diacetilo é menor quando a destilação é realizada por arrastamento de vapor.

A principal conclusão que se pode retirar destes ensaios preliminares é que não é possível analisar directamente o diacetilo na cerveja. De acordo com estes resultados a destilação permite remover as causas de interferência existentes na determinação directa e, por isso, pode ser utilizada para o tratamento prévio da amostra com vista à análise através do método polarográfico. A obtenção de dois picos parcialmente sobrepostos como resultado da análise do destilado, evidencia alguma selectividade do método polarográfico relativamente às quinoxalinas formadas em solução. Este facto é importante pois no método espectrofotométrico recomendado pelo EBC, baseado igualmente na destilação da amostra por arrastamento de vapor e derivatização do destilado recolhido com OFDA, não existe a possibilidade de distinguir as quinoxalinas que se formam em solução.

1.2.2 - DESTILAÇÃO DE COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE I

Os ensaios preliminares mostraram que a destilação prévia da cerveja permite realizar a determinação do diacetilo pelo método polarográfico. A destilação é o meio habitualmente utilizado para a separação do diacetilo em amostras de produtos alimentares e em vários trabalhos publicados surge referido que o grau de recuperação de diacetilo resultante da destilação é muito elevado; contudo, não existem indicações relativas à destilação dos outros três compostos α-dicarbonílicos, que igualmente surgem na cerveja. Por tal motivo, decidiu-se estudar o comportamento dos quatro compostos α-dicarbonílicos da classe I em solução aquosa relativamente à destilação simples e à destilação por arrastamento de vapor.

Este estudo foi conduzido com o objectivo de seleccionar as condições mais adequadas de destilação do diacetilo, aplicando-se, depois, o processo de destilação desenvolvido aos outros compostos, por forma a verificar se destilam conjuntamente e se interferem na análise de diacetilo. Um aspecto importante relacionado com o processo de destilação é a possibilidade de concentrar o diacetilo no destilado; em vários trabalhos publicados os autores referem que é possível recuperar quantitativamente o diacetilo num volume de destilado inferior ao volume de amostra sujeita a destilação.

1.2.2.1 - Destilação de soluções de diacetilo

Realizaram-se três tipos de ensaios:

(1) ensaios cujo objectivo foi verificar a repetibilidade do processo de destilação;

(2) ensaios em que se variou o volume de solução submetido a destilação para se verificar qual o grau de recuperação de diacetilo;

(3) ensaios em que se variou a fracção de destilado recolhido.

Em todos os ensaios adicionou-se a mesma quantidade de diacetilo à solução que foi submetida a destilação (50μL de solução de diacetilo $1x10^{-3}$M); nos ensaios (1) e (2) recolheu-se sempre o mesmo volume de destilado (10mL). O grau de recuperação de diacetilo foi obtido através da análise polarográfica de uma quantidade de diacetilo idêntica à adicionada à solução que foi submetida a destilação. O processo de derivatização e análise polarográfica foi realizado do modo descrito na secção 1.2.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios em que se testou a repetibilidade dos processos de destilação simples e por arrastamento de vapor verifica-se que ambos os processos de destilação apresentam boa repetibilidade e graus de recuperação bastante elevados, acima de 90%.

Relativamente ao modo como varia o grau de recuperação com o volume de solução que é submetida a destilação, pode observar-se na tabela 1.1 que é possível obter graus de recuperação de diacetilo bastante elevados mesmo quando a fracção de destilado recuperado é pequena relativamente ao volume de solução que foi submetido a destilação.

De acordo com os resultados registados na tabela 1.1, só nos ensaios em que o volume de solução colocada a destilar é de 250mL é que o grau de recuperação é claramente inferior a 90%. Atendendo a estes resultados decidiu-se adoptar nos ensaios subsequentes a destilação de um volume de 25mL de amostra e a recolha de cerca de 10mL de destilado para análise.

Tabela 1.1 - Destilação de diacetilo. Influência do volume de solução a destilar no grau de recuperação do diacetilo por destilação simples e por arrastamento de vapor.
(número de moles de diacetilo em destilação = $5x10^{-8}$ moles; volume de destilado recolhido = 10mL).

	Grau de recuperação (%)		
	Modo de destilação		
Volume de solução a destilar (mL)	B/A*	simples	arrastamento de vapor
25	2/5	96	93
50	1/5	96	95
100	1/10	89	91
250	1/25	68	72

*B/A = razão entre volume destilado recolhido e volume de solução a destilar.

1.2.2.2 - Destilação de soluções de glioxal, metilglioxal e 2,3-pentanodiona

Com estes ensaios pretendeu-se avaliar o comportamento dos três restantes compostos α-dicarbonílicos nas condições de destilação adoptadas para o diacetilo. O procedimento experimental seguido foi o mesmo utilizado nos ensaios com o diacetilo ou seja, destilaram-se 25mL de solução contendo $5x10^{-8}$moles do composto em estudo e recolheu-se 10mL de destilado para a análise polarográfica. O grau de recuperação foi obtido através da análise polarográfica de uma quantidade de composto idêntica à adicionada à solução submetida a destilação. O processo de derivatização e análise polarográfica foi realizado nas mesmas condições utilizadas para a obtenção das curvas de calibração (Parte III), com excepção da amplitude de impulso que foi alterada para 20mV (impulso catódico).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1.2 encontram-se registados os valores de grau de recuperação que foram obtidos para soluções de glioxal, metilglioxal e 2,3-pentanodiona resultantes dos processos de destilação simples e por arrastamento de vapor, quando se utiliza um volume de solução em destilação de 25mL e se recolhem 10mL de destilado.

Tabela 1.2 - Destilação de glioxal, metilglioxal e 2,3-pentanodiona. Grau de recuperação resultante da destilação simples e por arrastamento de vapor.
(nº de moles em destilação = $5x10^{-8}$; volume de destilado recolhido = 10mL).

	Grau de recuperação (%)	
	Modo de destilação	
Composto	simples	arrastamento de vapor
Glioxal	nulo	nulo
Metilglioxal	27	17
2,3-pentanodiona	97	98

De acordo com os resultados indicados na tabela, verifica-se que a 2,3-pentanodiona apresenta um comportamento semelhante ao observado para o diacetilo. Para o metilglioxal, o grau de recuperação é baixo e existe uma diferença assinalável no valor de recuperação obtido consoante se realiza a destilação simples ou por arrastamento de vapor. O glioxal não é detectado no destilado recolhido em ambos os processos de destilação.

1.2.2.3 - Destilação de misturas diacetilo/ metilglioxal e diacetilo/ glioxal

Atendendo às características de destilação evidenciadas pelo glioxal, pelo metilglioxal e pela 2,3-pentanodiona, decidiu-se avaliar o comportamento de misturas de diacetilo com metilglioxal e de diacetilo com glioxal, no sentido de verificar se o seu comportamento verificado individualmente para estes compostos se modificava pela facto de ocorrer a destilação conjunta desses compostos. O procedimento experimental seguido foi o mesmo utilizado nos ensaios precedentes, tendo-se adicionado $5x10^{-8}$ moles de diacetilo e $5x10^{-8}$ moles de metilglioxal ou de glioxal aos 25mL de solução que iam ser submetidos a destilação. Este estudo só se realizou para o processo de destilação simples.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1.5 pode-se apreciar os polarogramas obtidos com soluções de diacetilo analisadas directamente e após o processo de destilação simples, e polarogramas obtidos com misturas de diacetilo com glioxal e de diacetilo com

metilglioxal, igualmente analisadas directamente e após o processo de destilação simples. Conforme se pode observar, as características de destilação dos compostos não se alteram pelo facto de estarem misturados. Estes ensaios mostram que através da destilação recupera-se em elevada extensão o diacetilo, eliminando-se completamente o glioxal e parcialmente o metilglioxal. De salientar que a simplicidade na obtenção destas conclusões acerca do processo de destilação se deve ao facto de o método polarográfico de análise utilizado permitir diferenciar parcialmente os sinais destes três compostos α-dicarbonílicos e, desta forma distinguir o comportamento individualizado de cada um deles.

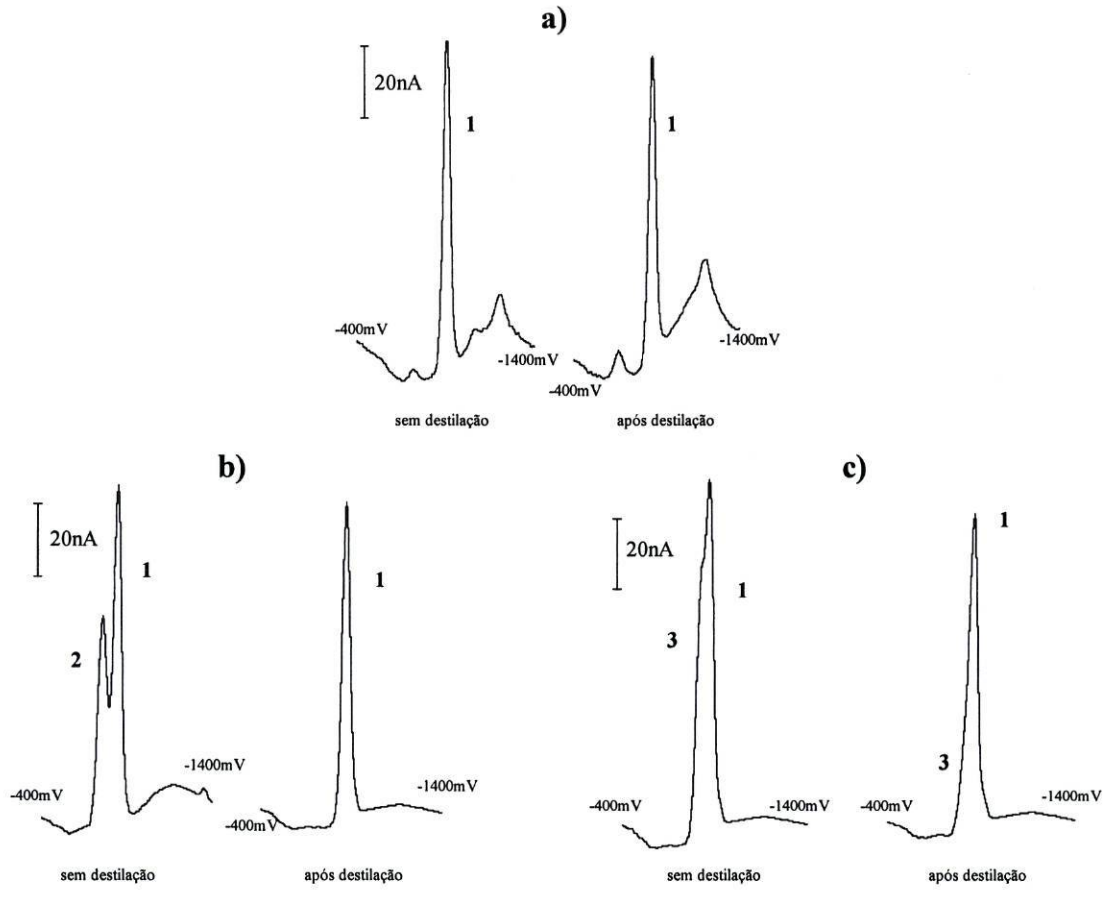


Figura 1.5 - Polarogramas obtidos na análise sem destilação e após destilação simples de: **a)** solução de diacetilo $2x10^{-6}$M; **b)** e **c)** misturas de solução de diacetilo $2x10^{-6}$M com glioxal $2x10^{-6}$M e com metilglioxal $2x10^{-6}$M, respectivamente.
1- pico polarográfico do diacetilo; 2- pico polarográfico do glioxal; 3- pico polarográfico do metilglioxal.

1.2.3 - DETERMINAÇÃO DE DIACETILO NA CERVEJA APÓS DESTILAÇÃO

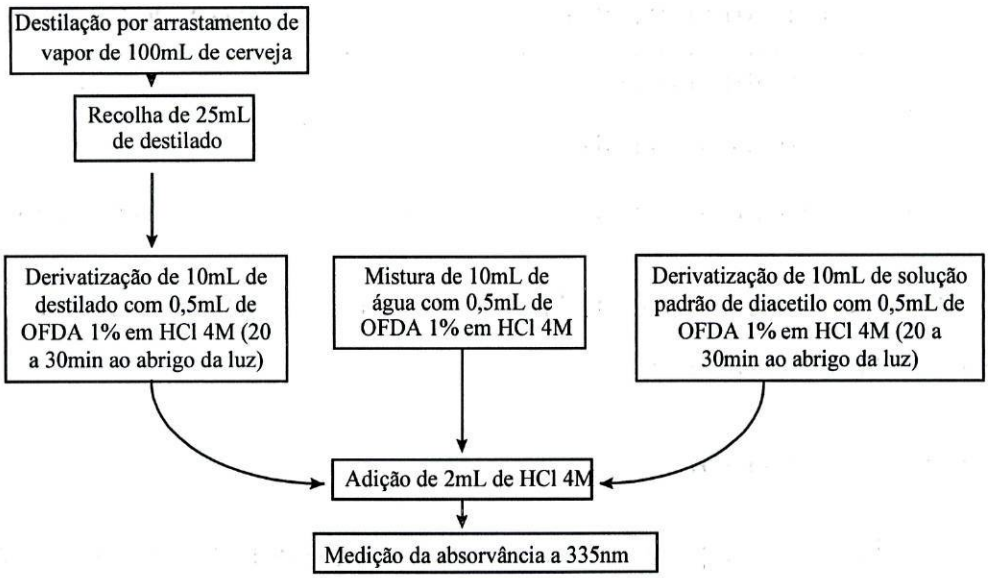
Através dos ensaios anteriores ficou claro que o método polarográfico desenvolvido permite distinguir parcialmente o pico do metilglioxal do pico do diacetilo. Esta possibilidade de distinção dos compostos não existe no método espectrofotométrico dado que as duas quinoxalinas que resultam da derivatização têm características de absorção no U.V. similares. Desta forma será de esperar que a análise de diacetilo realizada através dos dois métodos dê origem a valores de concentração de diacetilo diferentes.

Na determinação de diacetilo na cerveja procurou-se, assim, evidenciar essas diferenças e, com esse objectivo, começou-se por proceder à determinação de diacetilo numa amostra de cerveja utilizando o método espectrofotométrico recomendado pelo EBC. Em seguida fez-se a aplicação, à mesma amostra de cerveja, do método polarográfico por forma a poder comparar os resultados obtidos pelos dois métodos. Para finalizar avaliou-se a possibilidade de variar o volume de destilado recolhido como forma de diminuir a influência do pico polarográfico do metilglioxal no pico polarográfico do diacetilo.

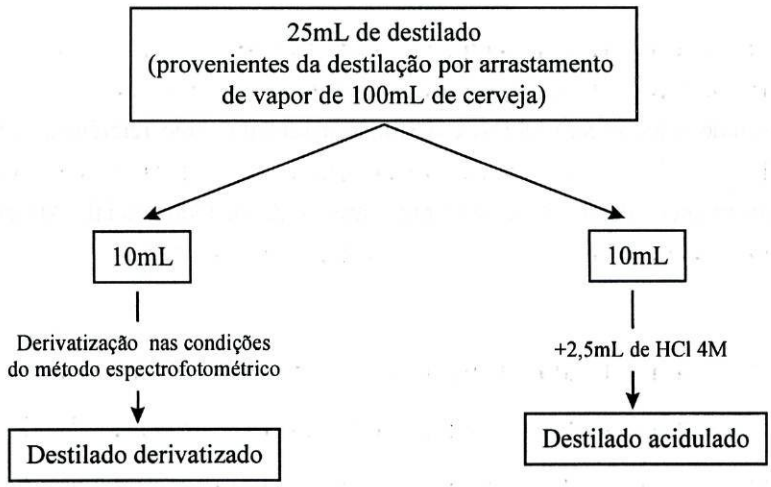
1.2.3.1 - Determinação espectrofotométrica de diacetilo na cerveja (método recomendado pelo EBC)

O método espectrofotométrico recomendado pelo EBC para a determinação de diacetilo na cerveja utiliza como método de quantificação, o método da curva de calibração. As medições fotométricas são efectuadas a 335nm e, para a realização experimental, preparam-se três tipos de soluções: a solução que resulta da derivatização do destilado; o ensaio em branco, em que o destilado é substituído por água; e as soluções de calibração, que são derivatizadas do mesmo modo que o destilado. O processo de destilação indicado no método é a destilação por arrastamento de vapor; contudo, em alguns trabalhos publicados posteriormente surge referida a destilação simples como modo de destilação. Por esta razão decidiu-se proceder à destilação utilizando esse dois modos, por forma a poder comparar a influência desse factor experimental nos resultados obtidos.

A sequência de operações experimentais para a realização do método espectrofotométrico encontra-se esquematizada a seguir:



Na análise das soluções resultantes em vez de fazer a determinação fotométrica a 335nm, fez-se o registo de espectros na zona do U.V. entre 280 e 400nm. Estes ensaios permitiram verificar que os espectros obtidos com os destilados derivatizados são sensivelmente diferentes dos espectros das soluções aquosas da 2,3-dimetilquinoxalina na presença de OFDA. Perante tais resultados decidiu-se realizar um conjunto de espectros da solução resultante da destilação, dividindo o destilado recolhido em duas partes: uma foi derivatizada da forma descrita acima, à outra adicionou-se somente HCl 4M. A forma como se realizaram estes ensaios encontra-se esquematizada a seguir:



A partir destas soluções registou-se o seguinte conjunto de espectros:

	compartimento da amostra		compartimento de referência
a)	destilado acidulado	**vs.**	água
b)	destilado derivatizado	**vs.**	água
c)	destilado derivatizado	**vs.**	destilado acidulado

Ensaios idênticos foram realizados utilizando os destilados provenientes da destilação simples do destilado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1.6 representam-se os vários espectros obtidos nestes ensaios. Conforme se pode verificar, os destilados obtidos já apresentam absorção na zona de

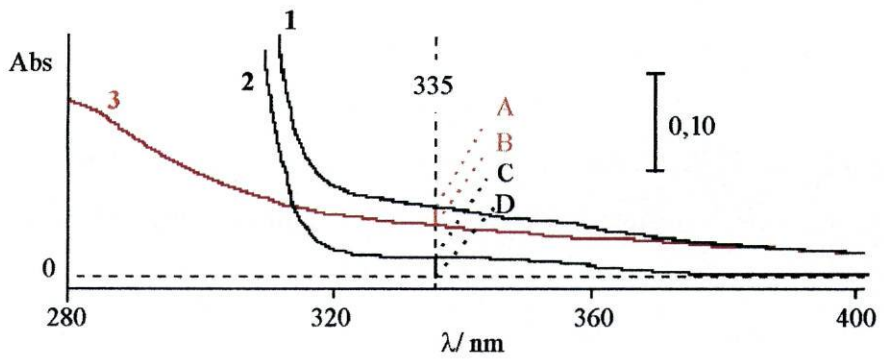


Figura 1.6 - Correcção dos resultados espectrofotométricos tomando em consideração a absorção do destilado da cerveja. 1, 2- espectros de absorção de destilado da cerveja derivatizado usando solução com OFDA e destilado acidulado como referência, respectivamente; 3- destilado da cerveja antes da derivatização usando água como referência. AD- leitura de absorvância incorrecta considerada através do método oficial; AB ou CD- leitura de absorvância corrigida para a absorvância própria do destilado.

comprimento de onda em que é feita a determinação espectrofotométrica da 2,3-dimetilquinoxalina, mesmo antes de serem submetidos a derivatização. Esta constatação é surpreendente pois indica que existe um erro sistemático no método espectrofotométrico recomendado pelo EBC: pelo facto de se utilizar como branco a solução de OFDA e dado que o destilado já absorve na zona de comprimento de onda

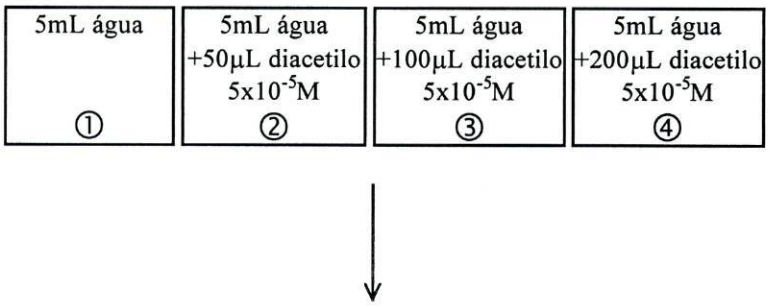
em que é feita a determinação, a absorvância obtida é igual à soma da absorvância da 2,3-dimetilquinoxalina que resulta da derivatização com a absorvância do próprio destilado (figura 1.6). Existe, deste modo, um erro sistemático no procedimento experimental que origina resultados errados por excesso. O modo de ultrapassar essa causa de erro sistemático não parece, contudo, ser muito difícil de conseguir. Conforme se verifica no espectro 2 da figura 1.6, a determinação espectrofotométrica utilizando na célula de referência o destilado acidulado em vez da solução de OFDA permite obter um espectro que se assemelha ao espectro de uma solução aquosa de diacetilo derivatizada em relação a água, indicando que desta forma se consegue compensar a absorvância própria do destilado.

Os espectros obtidos com os destilados resultantes da destilação simples da cerveja apresentaram um comportamento semelhante, mantendo-se igualmente a mesma causa de erro sistemático.

1.2.3.2 - Comparação entre os métodos espectrofotométrico e polarográfico

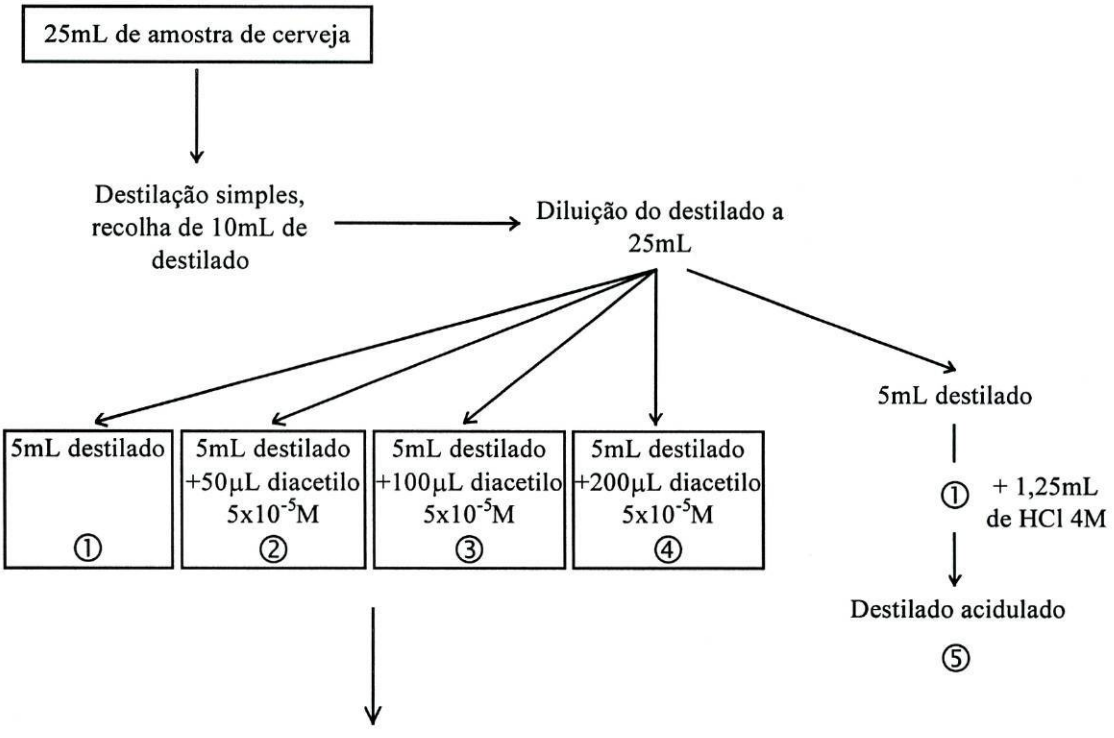
Para poder comparar os resultados obtidos através dos métodos polarográfico e espectrofotométrico decidiu-se utilizar exactamente as mesmas condições de destilação na obtenção do destilado. Assim fez-se a destilação simples de 25mL da amostra de cerveja e recolheram-se cerca de 10mL de destilado, ou seja, foi utilizado o processo de destilação escolhido anteriormente para a determinação polarográfica. A análise polarográfica das soluções foi efectuada da forma descrita para os ensaios similares realizados anteriormente. A quantificação foi realizada utilizado o método de adição de padrão, através da adição sucessiva de pequenos volumes de solução de diacetilo com concentração conhecida à célula polarográfica. Após cada adição borbulhou-se azoto durante 3min, com o objectivo de permitir que a derivatização ocorresse, efectuando-se de seguida, o registo do polarograma. Com o objectivo de verificar o grau de recuperação de diacetilo resultante da destilação, fez-se a adição de quantidades conhecidas de diacetilo aos 25mL de cerveja antes de iniciar a destilação, comparando o aumento na concentração de diacetilo obtido experimentalmente, através do método de adição de padrão, com a quantidade de diacetilo adicionada à cerveja.

O procedimento experimental para a análise espectrofotométrica foi adaptado por forma a permitir realizar a quantificação através do método da curva de calibração e através do método de adição de padrão; foram mantidas, contudo, as condições para a derivatização e análise referidas no método recomendado pelo EBC. Para a obtenção da curva de calibração procedeu-se à preparação dos seguintes quatro ensaios:



Derivatização das soluções nas condições referidas no método do EBC

O procedimento experimental utilizado para a análise de diacetilo na cerveja e o modo como se procedeu à quantificação pelo método da adição de padrão encontra-se esquematizado a seguir:



Derivatização das soluções nas condições referidas no método do EBC

Utilizando este conjunto de soluções registaram-se os seguintes espectros:

	compartimento da amostra		**compartimento de referência**	**Método de quantificação**
a)	destilado acidulado	**vs.**	água c/OFDA	
b)	destilado derivatizado e destilado derivatizado c/adição de padrão	**vs.**	destilado acidulado	adição de padrão (alteração proposta)
c)	destilado derivatizado e destilado derivatizado c/adição de padrão	**vs.**	água c/OFDA	adição de padrão (Método EBC)
d)	soluções de diacetilo derivatizado com concentrações conhecidas	**vs.**	água c/OFDA	curva de calibração

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1.7 apresenta-se os espectros identificados acima como b), c) e d). Estes ensaios mostram que a utilização da solução de OFDA na célula de referência dá origem a valores de concentração de diacetilo na cerveja bastante elevados, por não haver compensação da absorção intrínseca do destilado no comprimento de onda utilizado para a determinação. O uso de destilado acidulado na célula de referência permite fazer essa compensação.

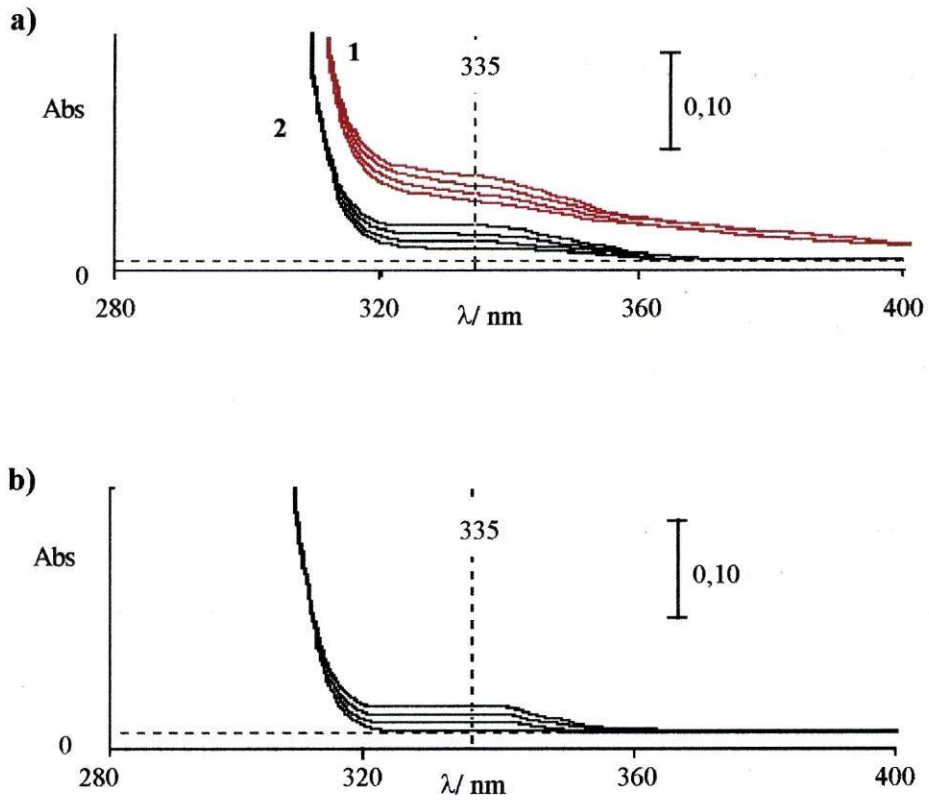


Figura 1.7 - **a)** Espectros de destilado da cerveja com adição de padrão: 1- usando solução com OFDA como referência; 2- usando destilado acidulado como referência.
b) Espectros correspondentes à curva de calibração de diacetilo usando solução com OFDA como referência.

A quantificação do diacetilo na cerveja foi efectuada a partir dos valores de absorvância obtidos a 335nm utilizando o método de adição de padrão e o método da curva de calibração. Os gráficos obtidos a partir dos pontos experimentais e as características das relações lineares que foram obtidas por regressão desses pontos encontram-se representados na figura 1.8.

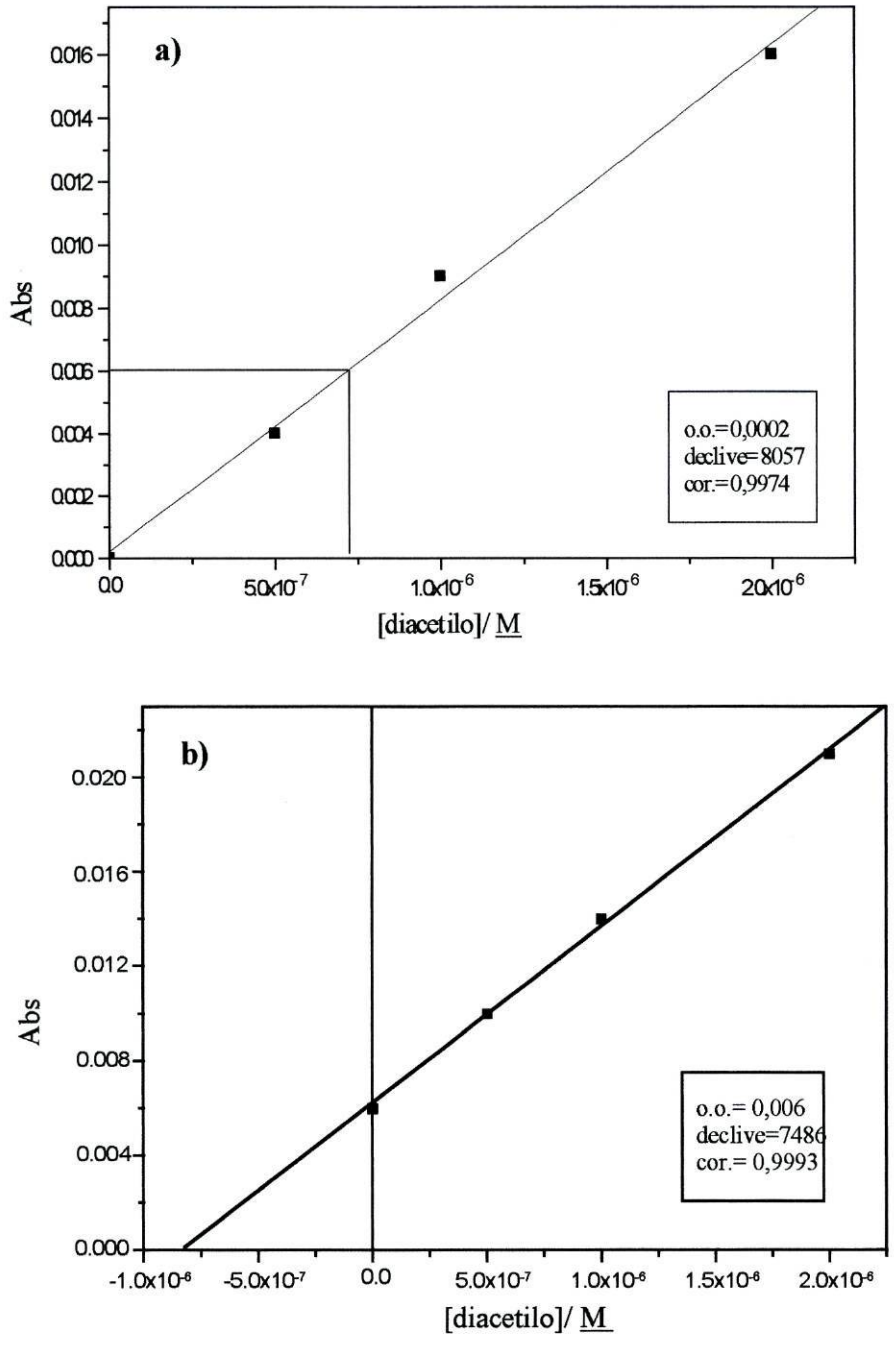


Figura 1.8 - Análise espectrofotométrica de diacetilo na cerveja após destilação. **a)**- método da curva de calibração; **b)**- método da adição de padrão.

O teor de diacetilo obtido pelo método espectrofotométrico na amostra de cerveja foi (valores médios de um conjunto de três ensaios independentes):

Método de adição de padrão	$8{,}0\times10^{-7}$M (69ppb)
Método da curva de calibração	$7{,}2\times10^{-7}$M (62ppb)

Nos ensaios polarográficos realizados sobre a mesma amostra de cerveja e utilizando as mesmas condições de destilação, a quantificação do teor de diacetilo foi feita através do método de adição de padrão, fazendo a adição de pequenos volumes de solução de diacetilo com concentração conhecida. Na figura 1.9 pode observar-se um conjunto de polarogramas típicos obtidos nestes ensaios. No sentido de se obter uma estimativa do grau de recuperação do diacetilo da amostra de cerveja realizaram-se ensaios em amostras de cerveja em que se adicionou, antes de proceder à destilação, uma quantidade rigorosamente conhecida de diacetilo. Na figura 1.10 representam-se os

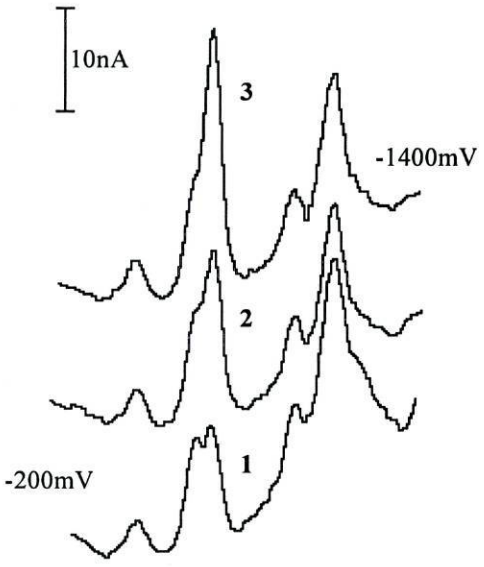


Figura1.9 - Polarogramas obtidos na análise da cerveja após destilação simples; quantificação através do método de adição de padrão.
1- destilado de 25mL de cerveja; **2-** destilado de 25mL de cerveja com adição de 4×10^{-7}M de diacetilo; **3-** destilado de 25mL de cerveja com adição de 8×10^{-7}M de diacetilo.

gráficos obtidos a partir dos pontos experimentais e as características das relações lineares obtidas por regressão linear para um conjunto de amostras de cerveja sem e com diacetilo adicionado à amostra de cerveja, antes de proceder à destilação.

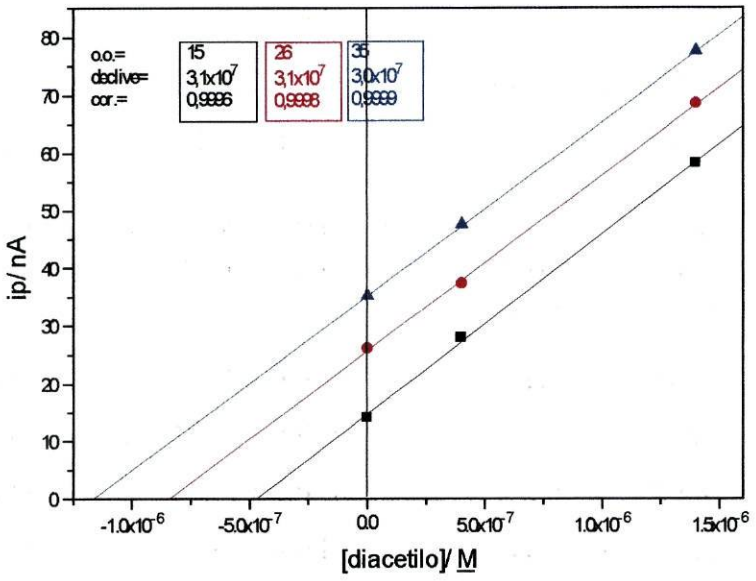


Figura 1.10 - Análise polarográfica de diacetilo na cerveja após destilação, pelo método de adição de padrão. (■) cerveja; (●) cerveja + 4,0x10^{-7}M de diacetilo; (▲) cerveja + 8,0x10^{-7}M de diacetilo.

Na tabela 1.3 estão indicados os valores de concentração de diacetilo obtidos para a amostra de cerveja e para a amostra de cerveja com adição prévia de diacetilo. Indicam-se, igualmente, os valores do grau de recuperação obtidos.

Os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico são francamente mais elevados que os obtidos através do método polarográfico, mesmo com a alteração da solução utilizada na célula de referência. Tal situação poderá resultar do facto do método espectrofotométrico não distinguir o sinal do diacetilo do sinal do metilglioxal, ao contrário do que acontece no método polarográfico. Nos ensaios em que se faz a medição da absorvância da amostra relativamente ao destilado acidulado consegue-se compensar a absorvância do destilado; no entanto, o valor de absorvância que se obtém está muito próximo do limite de determinação da técnica espectrofotométrica

Tabela 1.3 - Determinação do teor de diacetilo na cerveja. Estimativa do grau de recuperação de diacetilo resultante da destilação.

Amostra + adição de padrão	Conc. de diacetilo no destilado		Grau de recuperação*
	M	ppb	(%)
cerveja	$4,7x10^{-7}$	41	
cerveja + $4,0x10^{-7}$M	$8,5x10^{-7}$	73	98
cerveja + $8,0x10^{-7}$M	$1,20x10^{-6}$	101	97

*Razão entre a concentração de diacetilo obtida experimentalmente nos ensaios em que se adicionou previamente diacetilo à amostra de cerveja e o somatório da concentração obtida com a amostra de cerveja e a concentração de padrão adicionado.

(a absorvância da amostra registada nestes ensaios foi de 0,006). Note-se, no entanto, que no processo de destilação utilizado no método EBC faz-se a destilação por arrastamento de vapor de 100mL de amostra e recolhem-se 25mL de destilado, ou seja, utilizando esse procedimento a concentração de diacetilo no destilado será quatro vezes superior à da cerveja. Este facto pode contribuir para minorar, em parte, a falta de sensibilidade do método espectrofotométrico.

Nos ensaios realizados por polarografia o metilglioxal não interfere apreciavelmente no ensaio uma vez que o seu teor no destilado é relativamente baixo (o metilglioxal só destila parcialmente) e os picos polarográficos da 2-metilquinoxalina e 2,3-dimetilquinoxalina estão ligeiramente separados. Para além desta vantagem relativamente ao método espectrofotométrico, a intensidade de corrente do pico obtido é cerca de dez vezes superior ao limite de determinação, pelo que, também nesta perspectiva, o método polarográfico é mais favorável que o método espectrofotométrico.

Relativamente ao processo de destilação, estes ensaios mostram que o grau de recuperação de diacetilo é bastante elevado, tal qual como se havia verificado nos ensaios com as soluções aquosas, apresentando valores de recuperação acima de 90%.

1.2.3.3 - Estudo da interferência do metilglioxal na determinação polarográfica

Tal como já foi referido, verifica-se que os potenciais dos picos da 2-metilquinoxalina e da 2,3-dimetilquinoxalina estão ligeiramente desviados um do outro. Este facto possibilita a quantificação do diacetilo na presença de metilglioxal desde que o

teor deste último composto não seja muito maior do que o do diacetilo. Conforme se verificou nos estudos acerca das características de destilação destes compostos, o diacetilo é facilmente destilado, sendo suficiente recolher uma pequena fracção de destilado para se obter um elevado grau de recuperação de diacetilo. Por seu lado a fracção de metilglioxal que é recolhida nessas condições é relativamente pequena e varia consoante se procede à destilação simples ou por arrastamento de vapor.

Nestes estudos pretendeu-se avaliar a influência do sinal do metilglioxal na determinação polarográfica do diacetilo na cerveja e as diferenças existentes entre a destilação simples e a destilação por arrastamento de vapor relativamente à quantidade de metilglioxal que destila. Para a execução destes ensaios procedeu-se à destilação simples e por arrastamento de vapor de várias amostras de cerveja e variou-se o volume de destilado recolhido. Num outro conjunto de ensaios fez-se a adição de metilglioxal à cerveja antes da destilação, por forma a verificar o aumento do pico do metilglioxal no destilado e a avaliar o aumento da interferência que tal aumento provoca na determinação do diacetilo. Através destes ensaios procurou-se optimizar as condições de destilação por forma a minimizar a influência do metilglioxal na análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1.11 pode observar-se a evolução dos polarogramas de destilados da cerveja derivatizados obtidos por destilação simples e por arrastamento de vapor, respectivamente, à medida que aumenta o volume de destilado recolhido. Verifica-se que o pico do metilglioxal aumenta com o volume de destilado recolhido, enquanto que o pico do diacetilo se mantém praticamente inalterado. Na tabela 1.4 encontram-se registadas as concentrações de diacetilo resultantes da análise de amostras de cerveja em ensaios realizados por destilação simples, e na tabela 1.5 encontram-se registadas as concentrações de diacetilo resultantes da análise de amostras de cerveja em ensaios realizados por destilação por arrastamento de vapor.

Estes ensaios evidenciam que a possibilidade de realizar a análise de diacetilo está condicionada à quantidade de metilglioxal presente. De acordo com estes resultados quanto maior o volume de destilado recolhido na destilação, maior a fracção de metilglioxal que destila e, consequentemente, maior a sua interferência na análise. Estes ensaios mostram igualmente que na destilação por arrastamento por vapor a fracção de

metilglioxal que destila para os mesmos volumes de amostra a destilar e de destilado recolhido é sensivelmente menor do que na destilação simples, sem que o grau de recuperação do diacetilo seja afectado. Deste modo, a realização da destilação por arrastamento de vapor é mais favorável pois faz diminuir a fracção de metilglioxal que é destilada conjuntamente com o diacetilo. Neste contexto, a destilação por arrastamento de vapor de um volume de cerveja de 25mL e a recolha de cerca de 10mL de destilado parecem ser condições adequadas para evitar a interferência do metilglioxal e obter graus elevados de recuperação de diacetilo.

Tabela 1.4 - Influência do metilglioxal na determinação de diacetilo na cerveja. (Processo de destilação simples).

	A	B			
Ensaio	**Volume de amostra (mL)**	**Volume de destilado (mL)**	**B/A**	**Concentração de diacetilo**	
				M	**ppb**
1	25,00	cerca de 5	1/5	$4,1x10^{-7}$	35
2	25,00	cerca de 5	1/5	$3,6x10^{-7}$	31
3	50,00	cerca de 10	1/5	$3,9x10^{-7}$	34
4	50,00	cerca de 15	3/10	$4,3x10^{-7}$	37
5	25,00	cerca de 10	2/5	$5,4x10^{-7}$	47
6	25,00	cerca de 10	2/5	$5,4x10^{-7}$	47
7	25,00	cerca de 10	2/5	$5,2x10^{-7}$	45
8	50,00	cerca de 20	2/5	$4,9x10^{-7}$	42
9	50,00	cerca de 25	1/2	$5,4 x10^{-7}$	46
10	25,00	cerca de 15	3/5	*	*
11	50,00	cerca de 30	3/5	*	*
$12^{\#}$	25,00	cerca de 10	2/5	$5,7 x10^{-7}$	49
$13^{\#\#}$	25,00	cerca de 10	2/5	*	*

* O pico do metilglioxal sobrepõe-se ao pico do diacetilo impedindo a sua medição

$^{\#,\#\#}$ Adição de, respectivamente, $1x10^{-6}$M e $2x10^{-6}$M de metilglioxal à cerveja, antes da destilação.

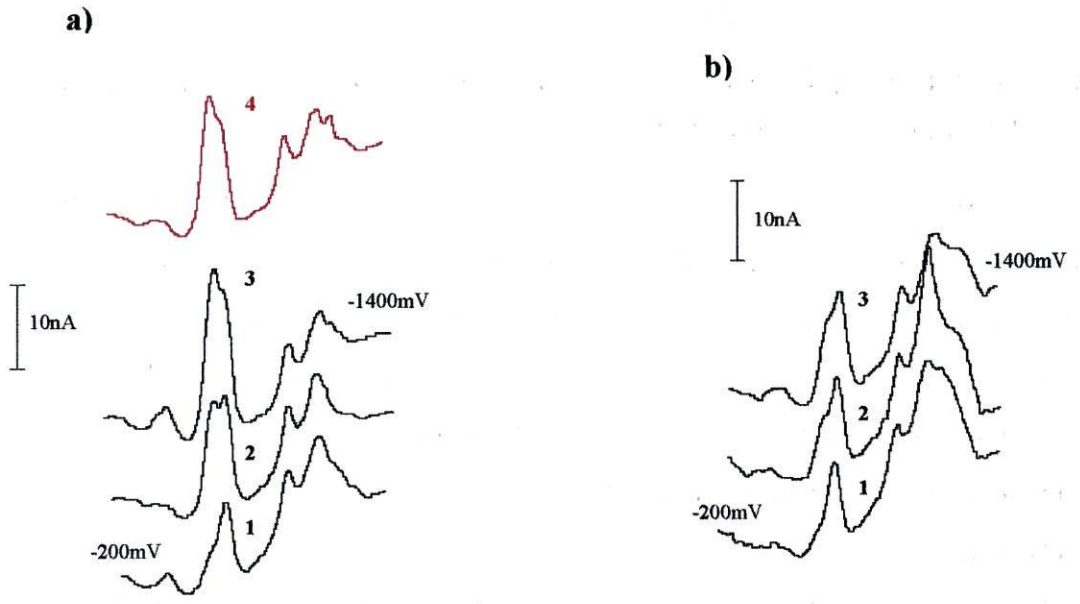


Figura 1.11 - Análise polarográfica de diferentes fracções de destilado da cerveja: **a)** destilação simples; **b)** destilação por arrastamento de vapor. Fracção de destilado recolhida (25mL de cerveja): **1**- 5mL; **2**- 10mL; **3**- 15mL. No ensaio **4**- adicionou-se à cerveja, antes da destilação, $1x10^{-6}$M de metilglioxal (10mL de destilado recolhido).

Tabela 1.5 - Influência do metilglioxal na determinação de diacetilo na cerveja.
(Processo de destilação por arrastamento de vapor).

	A	B			
Ensaio	**Volume de amostra / mL**	**Volume de destilado / mL**	**B/A**	**Concentração de diacetilo M**	**ppb**
1	25,00	cerca de 5	1/5	$3,4x10^{-7}$	29
2	25,00	cerca de 10	2/5	$4,4x10^{-7}$	38
3	25,00	cerca de 10	2/5	$4,3x10^{-7}$	37
4	25,00	cerca de 15	3/5	$4,6x10^{-7}$	40
5	50,00	cerca de 30	3/5	$4,5x10^{-7}$	39

O teor de diacetilo obtido está dentro dos valores habitualmente encontrados na cerveja quando se utiliza para análise a cromatografia gasosa. Os valores encontrados são apreciavelmente mais baixos do que os habitualmente obtidos através do método espectrofotométrico recomendado pelo EBC. O valor obtido no método polarográfico representa, no entanto, a soma das concentrações de diacetilo e 2,3-pentanodiona (α-dicetonas vizinhas) já que através deste método não é possível distinguir os dois compostos[167].

1.3 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE DIACETILO NA AGUARDENTE, NA MANTEIGA E NO VINHO

Após o desenvolvimento do procedimento para a análise polarográfica de diacetilo na cerveja, a aplicação do método a outros produtos alimentares é relativamente simples e envolve um pequeno conjunto de ensaios de ajuste das condições de realização da análise às características particulares da nova amostra. Neste âmbito procedeu-se, sempre que praticável, aos seguintes ensaios:

(1) análise directa da amostra sem derivatização;

(2) análise directa da amostra após derivatização;

(3) se necessário, separação do diacetilo por destilação por arrastamento de vapor e análise do destilado sem e após derivatização.

Nos casos em que se efectuou a destilação por arrastamento de vapor, fez-se a estimativa do grau de recuperação de diacetilo através da adição de uma quantidade conhecida de diacetilo à amostra antes de proceder à destilação.

1.3.1 - DETERMINAÇÃO DO DIACETILO E DO METILGLIOXAL NA AGUARDENTE

A aguardente utilizada nestes ensaios foi uma aguardente bagaceira adquirida comercialmente. Começou-se por realizar ensaios directamente na aguardente, utilizando o seguinte procedimento:

i) Para a célula polarográfica mediram-se 20mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, borbulhou-se azoto durante 10min e registou-se o polarograma da solução (branco).

(ii) Directamente à célula polarográfica juntaram-se 5,00mL de aguardente e, após 5min de passagem de azoto, registou-se um novo polarograma (branco com aguardente).

(iii) Acrescentaram-se 5,00mL de OFDA 0,25% em tampão fosfato 0,5M, pH=7, e após borbulhar azoto durante 5min, registou-se um terceiro polarograma.

Na figura 1.12 podem observar-se os polarogramas resultantes da análise directa da aguardente, antes e após a realização da reacção de derivatização. No polarograma obtido com a aguardente antes de proceder à derivatização não surge nenhum pico intenso e bem definido; após a derivatização surge um conjunto de dois picos bem definidos e parcialmente sobrepostos, nos potenciais típicos da 2-metilquinoxalina e 2,3-

dimetilquinoxalina. Como a aguardente é um produto alimentar em cuja preparação está envolvida uma destilação, pode-se admitir que os picos obtidos sejam devidos ao metilglioxal e ao diacetilo existentes na aguardente. Desta forma, estes ensaios indicam que a análise pode ser realizada directamente sobre a amostra de aguardente, sem haver necessidade de recorrer a qualquer tipo de tratamento prévio da amostra.

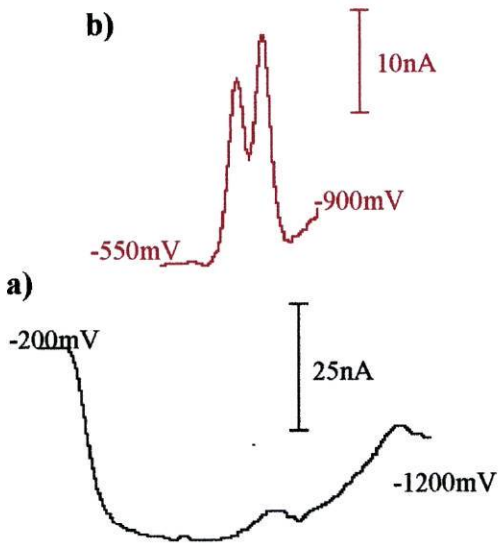


Figura 1.12 - Polarogramas obtidos na análise directa da aguardente, sem qualquer tratamento prévio, sem **a)** e após **b)** derivatização.

Em função destes resultados preliminares, parece ser possível determinar não só o diacetilo, mas também o metilglioxal directamente na aguardente. De facto, viu-se anteriormente que é possível distinguir, em determinadas condições, os picos das espécies resultantes da derivatização desses dois compostos, utilizando a técnica polarográfica. Como no caso particular desta amostra não há perdas de metilglioxal pois não existe preparação prévia da amostra, pode-se quantificar não só o diacetilo, mas também o metilglioxal. A quantificação pode ser realizada pelo método de adição de padrão, com adição de pequenos volumes de solução padrão de 2,3-dimetilquinoxalina (para quantificar o diacetilo) e de solução padrão de 2-metilquinoxalina (para quantificar o metilglioxal). Os ensaios foram efectuados da seguinte forma:

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 20,00mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, adicionaram-se 5,00mL de solução de OFDA 0,25% e, por fim, juntaram-se 5,00mL de aguardente.

(ii) Borbulhou-se azoto durante 10min e efectuou-se a análise polarográfica.

(iii) A quantificação foi feita polarograficamente, pela adição sucessiva de pequenos volumes de solução 2-metilquinoxalina $5x10^{-4}$M (para a quantificação do teor de metilglioxal) ou de 2,3-dimetilquinoxalina $5x10^{-4}$M (para a quantificação do teor de diacetilo).

Na figura 1.13 pode observar-se o conjunto de polarogramas obtidos nos ensaios realizados para a quantificação do metilglioxal e do diacetilo na aguardente pelo método de adição de padrão.

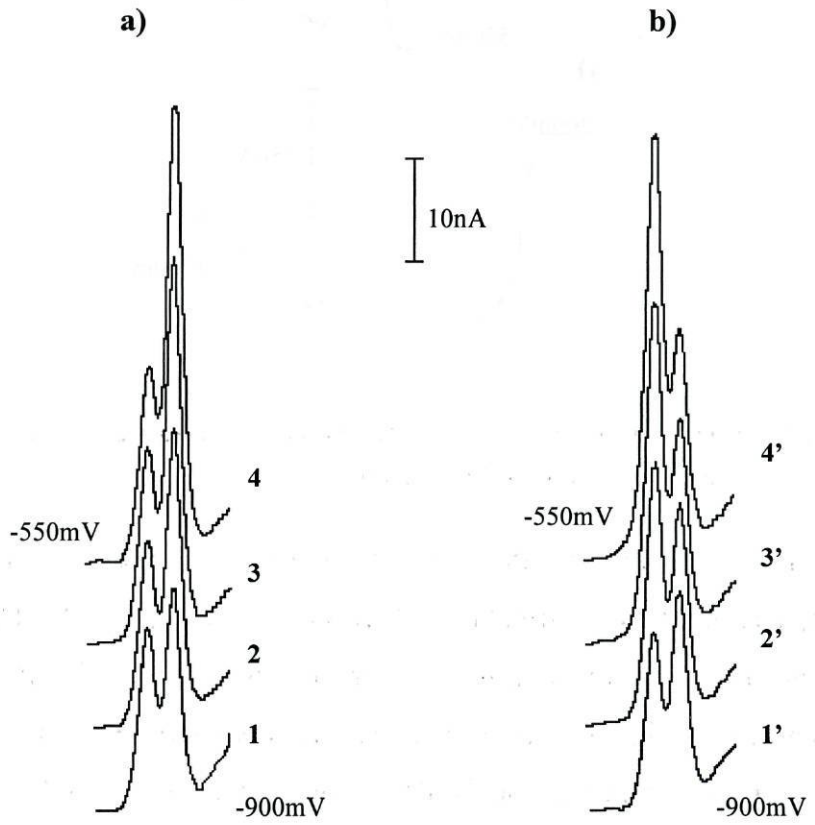


Figura 1.13 - Polarogramas obtidos na análise da aguardente após derivatização (sem prévio tratamento da amostra); quantificação através do método de adição de padrão.
a) quantificação de diacetilo: **1**- 5mL de aguardente; **2**, **3**, **4**- adições sucessivas de $2x10^{-6}$M de dimetilquinoxalina.
b) quantificação de metilglioxal: **1'**- 5mL de aguardente; **2'**, **3'**, **4'**- adições sucessivas de $2x10^{-6}$M de metilquinoxalina.

Nesses polarogramas pode verificar-se que, dado que as alturas dos picos do metilglioxal e o diacetilo são semelhantes, a interferência de um pico na altura do pico adjacente não é muito significativa. Os gráficos obtidos a partir dos pontos experimentais e as características das relações lineares obtidas por regressão linear são apresentados na figura 1.14.

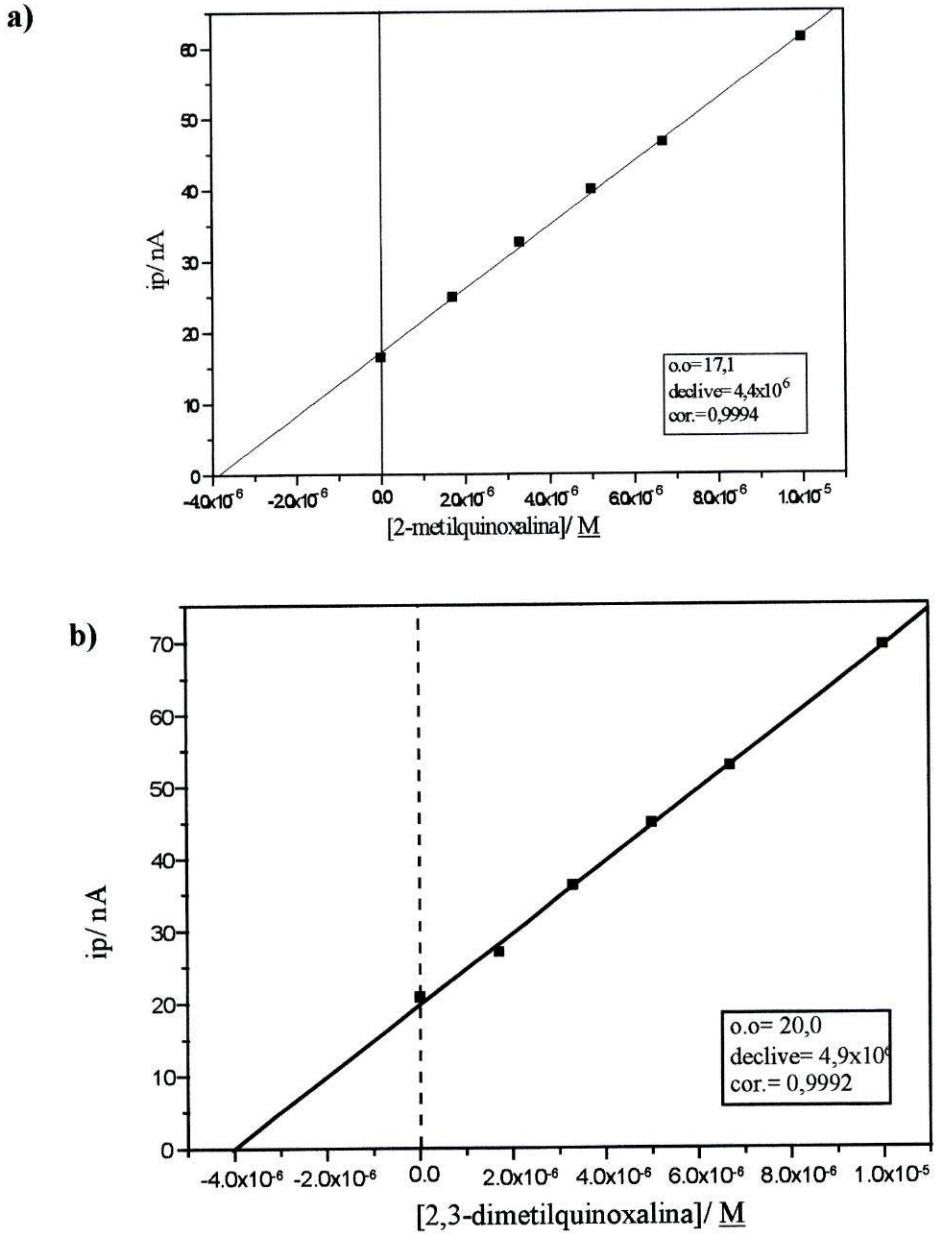


Figura 1.14 - Análise polarográfica de metilglioxal **a)** e de diacetilo **b)** em aguardente, utilizando na quantificação o método de adição de padrão através da adição de: **a)** 2-metilquinoxalina; **b)** 2,3-dimetilquinoxalina.

Os resultados obtidos para o teor de metilglioxal e de diacetilo na aguardente analisada foram os seguintes:

Metilglioxal	$2{,}3\times10^{-5}$M (1,7ppm)
Diacetilo	$2{,}4\times10^{-5}$M (2,1ppm)

Estes ensaios demonstram a simplicidade do método de análise polarográfica na determinação simultânea de diacetilo e de metilglioxal na aguardente.

1.3.2 - DETERMINAÇÃO DO DIACETILO NA MANTEIGA

O aroma do diacetilo é normalmente assinalado pelos provadores como amanteigado e a manteiga e outros produtos lácteos são produtos alimentares onde o diacetilo pode ser encontrado[92,165]. A determinação do teor de diacetilo na manteiga coloca, contudo, algumas dificuldades à análise pelo facto de a amostra não ser líquida à temperatura ambiente e não ser totalmente miscível com a água. Para uma amostra desta natureza não é possível realizar a análise directamente, sendo necessário recorrer a um tratamento prévio. O tratamento utilizado foi, na sequência dos estudos com a cerveja, a destilação por arrastamento de vapor. Nos primeiros ensaios adoptou-se o seguinte procedimento:

(i) Pesaram-se rigorosamente cerca de 10g de manteiga, transferiram-se para um balão de destilação e adicionaram-se 50mL de água.

(ii) Destilou-se essa mistura por arrastamento de vapor recolhendo-se cerca de 10mL de destilado.

(iii) Transferiu-se o destilado para um balão volumétrico, adicionaram-se 5mL de solução tampão fosfato 0,5M, pH=7, e diluiu-se até à marca.

(iv) Borbulhou-se azoto durante 10min e registou-se o polarograma da solução (polarograma do destilado não derivatizado).

(v) Procedeu-se a um novo ensaio, preparado da mesma forma mas em que à solução de destilado se adicionou 5mL de solução tampão fosfato 0,5M, pH=7, contendo 0,25% de OFDA.

Na figura 1.15 pode observar-se o conjunto de polarogramas obtidos na quantificação do diacetilo na manteiga através do método de adição de padrão, após derivatização.

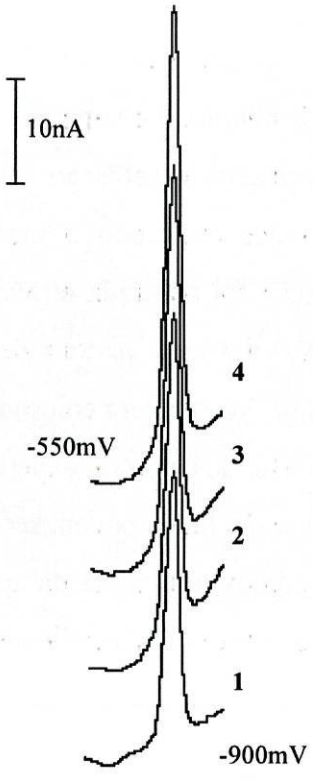


Figura 1.15 - Polarogramas obtidos na análise da manteiga após destilação por arrastamento de vapor; quantificação através do método de adição de padrão:
1- destilado de manteiga derivatizado com OFDA; **2**, **3**, **4**- adições sucessivas de $2x10^{-6}$M de dimetilquinoxalina.

No polarograma do destilado da manteiga após derivatização surge um pico bem definido que através da adição de solução de 2,3-dimetilquinoxalina se verifica que aumenta, indicando que na sua origem deve estar a derivatização do diacetilo existente no destilado. Ao contrário do que sucedeu com a cerveja e a aguardente, na manteiga só se detectou um pico bem definido após a derivatização do destilado, não surgindo qualquer sinal relativo à presença de metilglioxal. No sentido de verificar se essa ausência de sinal era ocasionada pela modificação das características de destilação do metilglioxal nesta situação em particular, adicionou-se à manteiga uma certa quantidade de metilglioxal antes da destilação. Após a destilação surgiu o sinal relativo ao metilglioxal, o que indica que o metilglioxal não deve existir em quantidades apreciáveis na manteiga.

A quantificação do teor de diacetilo na manteiga foi realizada pelo método de adição de padrão, fazendo a adição de pequenos volumes de solução de 2,3-dimetilquinoxalina. No sentido de avaliar o grau de recuperação do diacetilo no destilado

fez-se a adição de quantidades conhecidas de diacetilo à manteiga contida no balão de destilação, antes de se iniciar a destilação, e comparou-se o aumento da concentração de diacetilo obtida experimentalmente após a destilação.

Os ensaios foram realizados utilizando o mesmo procedimento descrito nos ensaios anteriores. A quantificação foi realizada através da adição de solução de 2,3-dimetilquinoxalima $5x10^{-4}$M. A adição de padrão de diacetilo à manteiga foi feita juntando solução de diacetilo $5x10^{-4}$M à mistura colocada no balão de destilação.

Os gráficos obtidos a partir dos pontos experimentais e as características das relações lineares obtidas por regressão linear podem ser observados na figura 1.16, onde se encontram representados os pontos resultantes da aplicação do método de adição de padrão nas amostras de manteiga sem e com diacetilo adicionado.

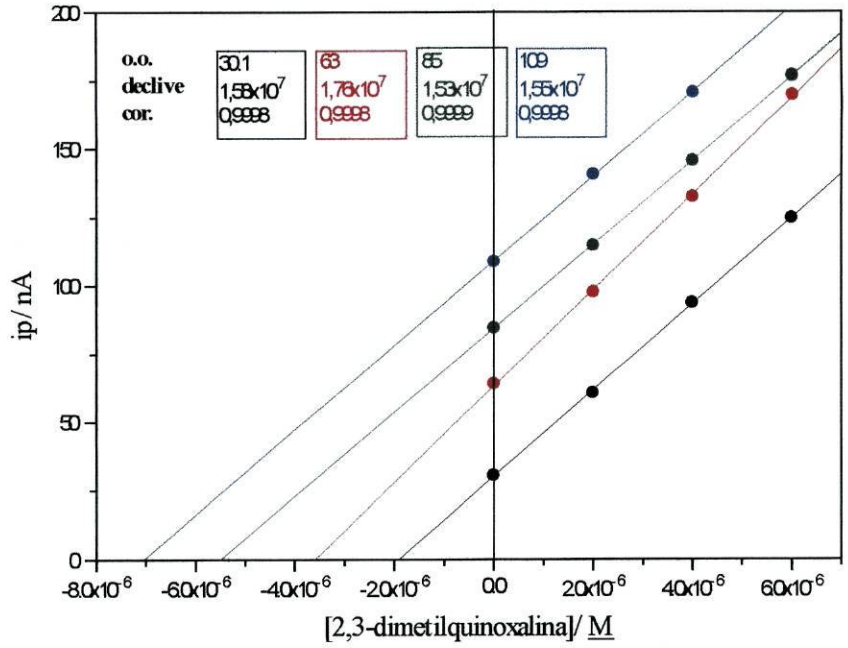


Figura 1.16 - Análise polarográfica de diacetilo na manteiga, pelo método de adição de padrão. (●) manteiga; (●) manteiga + $2,0x10^{-6}$M de diacetilo; (●) manteiga + $4,0x10^{-6}$M de diacetilo; (●) manteiga + $6,0x10^{-6}$M de diacetilo.

Estes ensaios permitiram, por um lado, determinar o teor de diacetilo na manteiga e, por outro lado, estabelecer o grau de recuperação de diacetilo após a destilação da manteiga por arrastamento de vapor. Na tabela 1.6 estão indicadas as concentrações de diacetilo obtidas para as várias amostras testadas, bem como o grau de recuperação obtido.

Tabela 1.6 - Determinação do diacetilo na manteiga. Estimativa do grau de recuperação obtido na destilação do diacetilo.

Amostra + adição de padrão	**Conc. de diacetilo no destilado (M)**	**Grau de recuperação* (%)**
manteiga	$1{,}9\times10^{-6}$	
manteiga + 2×10^{-6}M	$3{,}6\times10^{-6}$	92
manteiga + 4×10^{-6}M	$5{,}5\times10^{-6}$	93
manteiga + 6×10^{-6}M	$7{,}1\times10^{-6}$	90

*Razão entre a concentração de diacetilo obtida experimentalmente nos ensaios em que se adicionou diacetilo e o somatório da concentração de diacetilo obtida na manteiga com o incremento de concentração resultante da adição de padrão.

Com base nestes ensaios e considerando que se usou uma massa de amostra de cerca de 10g e que o destilado foi diluído a 25mL antes da análise polarográfica, a concentração de diacetilo obtida foi de 0,41mg/kg de manteiga (0,41ppm), valor que se encontra dentro dos teores de diacetilo habitualmente encontrados na manteiga[92].

De notar que os declives das várias representações gráficas patentes na figura 1.16 são ligeiramente diferentes, particularmente no segundo ensaio, embora tal facto não se reflicta, aparentemente, nos resultados finais obtidos através do método da adição de padrão. Admite-se que tais diferenças de sensibilidade possam ser devidas a ligeiras mudanças na composição do destilado recolhido, e portanto da composição da solução que é analisada polarograficamente, como resultado do volume de destilado recolhido poder ter variado de ensaio para ensaio, pois não foi controlado rigorosamente.

Estes ensaios demonstram a exequibilidade da análise do diacetilo na manteiga pelo método polarográfico, desde que previamente se faça a extracção do diacetilo por destilação. A quantidade de diacetilo recuperada após a destilação é bastante elevada, da ordem dos 90%.

1.3.3 - ANÁLISE DO TEOR DE DIACETILO NO VINHO

No vinho, tal como na cerveja, a presença de diacetilo é bem conhecida, resultando da actividade das leveduras durante o processo de fermentação. A influência do diacetilo na qualidade organoléptica da cerveja, que constitui um problema

importante para a indústria cervejeira, não tem a mesma importância nos vinhos. Apesar de os teores típicos de diacetilo nos vinhos serem mais elevados que na cerveja, o seu limiar de percepção é consideravelmente mais elevado, dada a maior complexidade do aroma e paladar dos vinhos. Bertrand e colaboradores referem níveis de percepção de diacetilo de 4,5ppm em vinhos brancos e 12ppm em vinhos tintos [20]. A capacidade de combinação do diacetilo com o anião sulfito para formar compostos de adição reversíveis e menos voláteis (secção 1.2.1 da Parte I) ajuda a explicar a razão porque os níveis de percepção de diacetilo nos vinhos são mais elevados do que na cerveja: nos vinhos o uso de dióxido de enxofre como aditivo é habitual, pois a sua aplicação tem um conjunto de benefícios para o processo de vinificação e conservação dos vinhos[5]; na cerveja a adição de dióxido de enxofre não é vulgar porque altera o paladar típico da cerveja, embora existam trabalhos que indicam que essa adição pode contribuir para mascarar o aroma e paladar do diacetilo. Desta forma, a análise do teor de diacetilo no vinho deve ter em conta a provável presença do sulfito e o seu efeito no processo de destilação e de derivatização. Na destilação, a estratégia experimental seguida para verificar o grau de recuperação do diacetilo foi idêntica à utilizada na cerveja e na manteiga, ou seja, a adição de diacetilo à amostra antes da realização da destilação e a verificação do grau de recuperação. Adicionalmente, estudou-se a influência do sulfito na extensão e na velocidade da reacção de derivatização.

Este estudo foi efectuado com um vinho branco adquirido comercialmente. Começou-se por realizar alguns ensaios preliminares em que se pretendeu observar a resposta polarográfica do vinho analisado directamente antes e depois de ser submetido a derivatização. Igualmente se realizaram ensaios em que se pretendeu estudar a influência que o anião sulfito tinha sobre a reacção de derivatização; para tal realizou-se a análise de soluções de compostos α-dicarbonílicos contendo sulfito e comparou-se com as respostas polarográficas das mesmas soluções sem sulfito. Estes ensaios foram realizados do modo descrito a seguir:

(A) Determinação directa de diacetilo no vinho antes e após derivatização

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 20,00mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, juntou-se 1,00mL de vinho , borbulhou-se azoto durante 10min e analisou-se polarograficamente.

(ii) De seguida juntaram-se 5,00mL de OFDA 0,25% em tampão fosfato 0,1M, pH=7, e após borbulhar azoto durante 5min, procedeu-se a uma nova análise polarográfica.

(B) Estudo da influência do anião sulfito na reacção de derivatização

Começou-se por fazer a análise de uma solução de sulfito em três electrólitos de suporte diferentes: HCl 0,1M, tampão acetato 0,1M, pH=5 e tampão fosfato 0,1M, pH=7. Estes ensaios foram executados da seguinte forma:

(i) Para a célula mediram-se 25,00mL do electrólito em estudo e adicionaram-se 0,5mL de solução de sulfito de sódio 2,5g/L (2500ppm), recém-preparada.

(ii) Borbulhou-se azoto durante 10min e procedeu-se à análise polarográfica.

Para verificar o efeito do anião sulfito sobre o processo de derivatização prepararam-se três soluções de diacetilo $2x10^{-5}$M, contendo 50ppm, 5ppm e 0ppm de sulfito de sódio. Os ensaios foram realizados da seguinte forma:

(i) Para a célula mediram-se 20,00mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,062% de OFDA e borbulhou-se azoto durante 10min.

(ii) De seguida adicionaram-se 5,00mL de solução de diacetilo em estudo e borbulhou-se azoto pela solução durante 5min.

(iii) Iniciou-se, então, o registo de polarogramas em função do tempo, com uma periodicidade de 5min.

Ensaios do mesmo tipo foram realizados com soluções de metilglioxal e glioxal.

Na análise directa do vinho obteve-se um conjunto de polarogramas idêntico ao obtido em ensaios semelhantes com a cerveja: antes da derivatização não surge nenhum pico bem distinto, após a derivatização verifica-se o aparecimento de um pico intenso e bem definido na zona de potencial da 2-metilquinoxalina. Este comportamento é idêntico ao observado com a cerveja em ensaios do mesmo tipo e, tal como se referiu nessa situação, também para o vinho não é provável que o pico obtido corresponda somente ao metilglioxal. Tal como na cerveja, é natural que existam no vinho outros α-cetoaldeídos com cadeias carbonadas mais complexas, que possam contribuir para o pico obtido. Analogamente ao tratamento prévio que se fez para a cerveja, estes resultados mostram que, também para o vinho será necessário proceder à destilação, para se poder efectuar a análise de diacetilo.

Relativamente ao efeito do sulfito no processo de derivatização, pode observar-se na figura1.17 que em HCl 0,1M, pH = 1, e em tampão acetato 0,1M, pH = 5, o sulfito dá origem a picos polarográficos intensos e bem definidos. Pelo contrário, em tampão fosfato 0,1M, pH = 7, não surge nenhum pico bem definido. Este resultado é bastante importante pois mostra que o sulfito não constitui uma interferência directa na determinação polarográfica das quinoxalinas, desde que o electrólito de suporte utilizado nessa determinação seja a solução tampão fosfato 0,1M, pH = 7.

Na tabela 1.7, referem-se os valores de intensidade de corrente dos picos obtidos após derivatização das solução de diacetilo $2x10^{-5}$M contendo 50ppm, 5ppm e na ausência de sulfito.

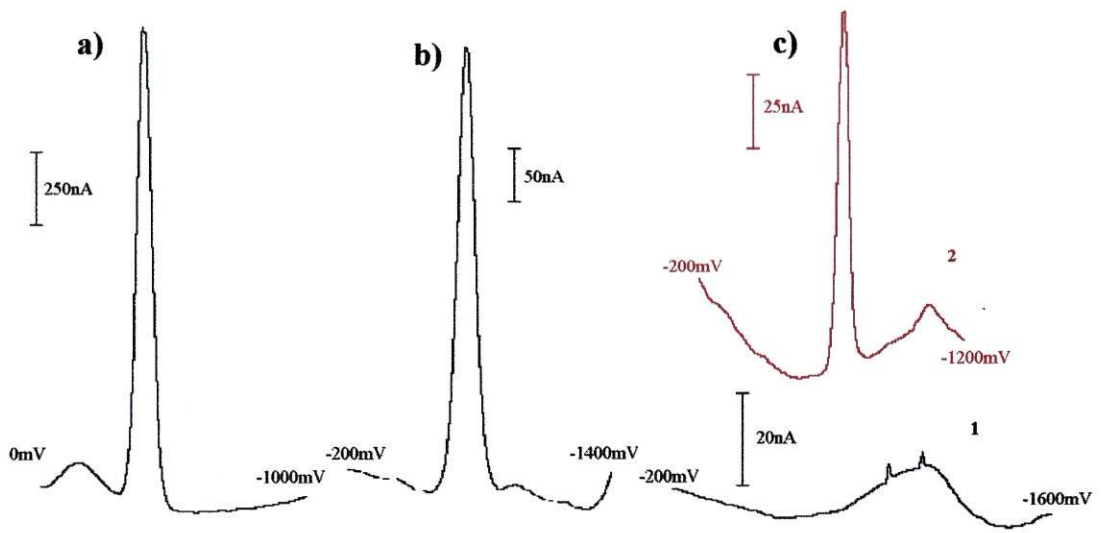


Figura 1.17 - Polarogramas obtidos com três soluções tampão distintas na presença de 50mg/L (50ppm) de sulfito: **a)** HCl 0,1M; **b)** tampão acetato 0,1M, pH=5; **c)** 1-tampão fosfato 0,1M, pH=7 e 2-diacetilo $2x10^{-5}$M derivatizado em presença de sulfito (50ppm).

Tabela 1.7 - Influência da presença de sulfito na reacção de derivatização do diacetilo. (Concentração de diacetilo = $2x10^{-5}$M).

Concentração de sulfito /ppm	Amplitude do pico/ nA (após preparação da solução)	Amplitude do pico/ nA (24h após preparação da solução)
0	106	108
5	101	107
50	105	106

De acordo com os resultados registados na tabela, a presença de sulfito não tem influência significativa sobre o sinal polarográfico obtido. Do mesmo modo não foram detectadas variações significativas na velocidade da reacção de derivatização no caso do diacetilo e do metilglioxal quando realizada na presença de sulfito; em ambos os casos a reacção estava completa na altura de obtenção do primeiro polarograma (ao fim de 5min em reacção). No caso do glioxal observou-se uma diminuição no tempo necessário para a estabilização do sinal polarográfico na presença do sulfito, ou seja, neste caso a presença de sulfito até é benéfica, já que torna a reacção de derivatização mais rápida. Perante estes resultados concluiu-se que o sulfito, apesar de formar compostos de adição com os compostos α-dicarbonílicos, não afecta significativamente o decurso da reacção de derivatização.

Atendendo a estes resultados a determinação do teor de diacetilo no vinho foi realizada após destilação por arrastamento de vapor do vinho, utilizando um procedimento experimental análogo ao que foi utilizado para a análise de diacetilo na cerveja. A quantificação foi realizada através do método de adição de padrão, por adição de solução de 2,3-dimetilquinoxalina $5x10^{-4}$M. Fez-se a avaliação do grau de recuperação do diacetilo no destilado através da destilação de amostras de vinho às quais se adicionaram quantidades de diacetilo conhecidas, utilizando a mesma estratégia usada nos ensaios realizados com a manteiga e cerveja.

A destilação e análise polarográfica do vinho foi realizada da seguinte forma:

(i) Mediram-se 10,00mL de amostra para o balão de destilação, adicionou-se cerca de 15mL de água e procedeu-se à destilação por arrastamento de vapor até se recolher cerca de 10mL de destilado.

(ii) O destilado foi transferido para um balão volumétrico de 25,00mL, ao qual se adicionaram 5mL de solução tampão fosfato 0,5M, pH=7, e se diluiu até à marca.

(iii) A solução foi transferida para a célula polarográfica e analisada da mesma forma referida para os ensaios anteriores.

Na figura 1.18 pode observar-se os polarogramas obtidos na análise do vinho após destilação, pelo método da adição de padrão. Tal como na análise da cerveja na análise do destilado do vinho após destilação por arrastamento de vapor igualmente se obtém um conjunto de dois picos parcialmente sobrepostos, admitindo-se que correspondam ao metilglioxal (o pico menos catódico) e ao diacetilo (o pico mais catódico). Os gráficos obtidos pela aplicação do método de adição de padrão e as características das relações lineares obtidas por regressão linear podem ser observados na figura 1.19.

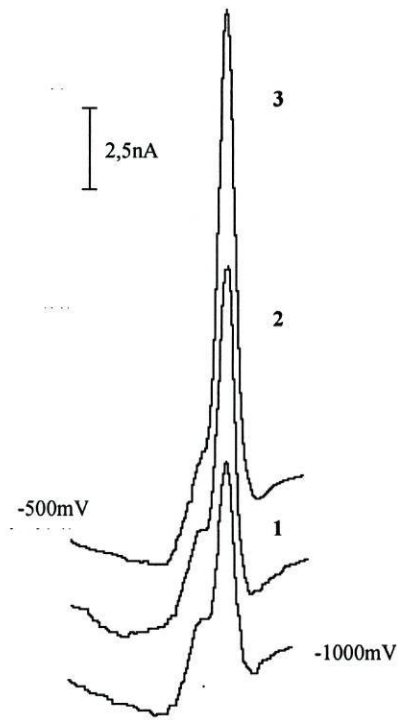


Figura 1.18 - Polarogramas obtidos na análise de vinho após destilação por arrastamento de vapor e derivatização com OFDA; quantificação através do método de adição de padrão:
1- destilado de vinho; **2**, **3**- adições sucessivas de $2x10^{-7}$M de dimetilquinoxalina.

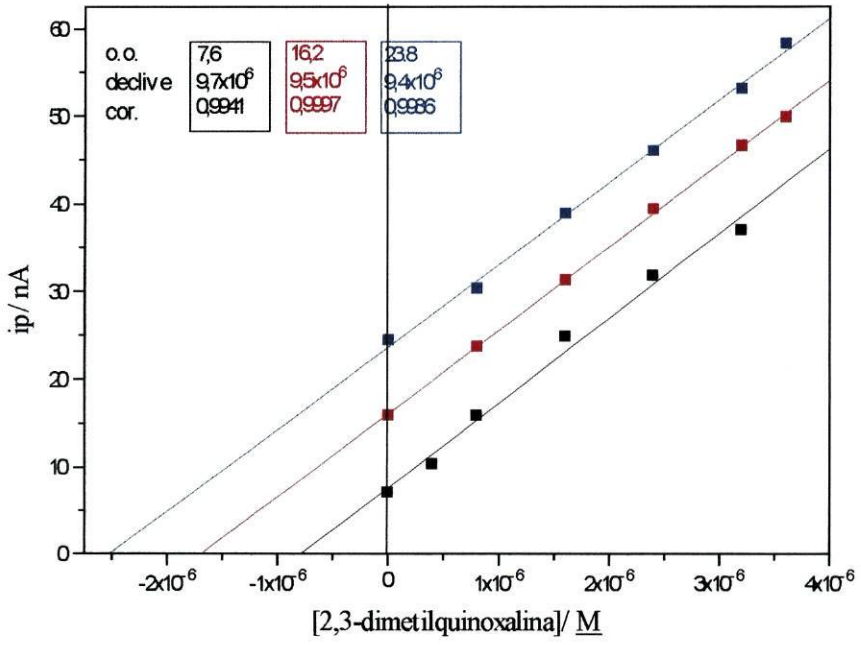


Figura 1.19 - Análise polarográfica de diacetilo no vinho, pelo método de adição de padrão. (■) vinho; (■) vinho + $1{,}0\times10^{-6}$M de diacetilo; (■) vinho + $2{,}0\times10^{-6}$M de diacetilo.

Os ensaios efectuados permitiram obter o teor de diacetilo no vinho e avaliar o grau de recuperação desse composto após o processo de destilação da amostra por arrastamento de vapor. Na tabela 1.8 encontram-se indicadas as concentrações de diacetilo obtidas para os vários ensaios realizados, bem como os graus de recuperação da destilação.

Tabela 1.8 - Determinação do teor de diacetilo no vinho. Estimativa do grau de recuperação do diacetilo na destilação.

Amostra	**Adição de padrão***	**Concentração de diacetilo na célula polarográfica**		**Grau de recuperação**
	/ M	**/ M**	**/ ppm**	**/ %**
vinho	---	$7{,}9\times10^{-7}$	0,068	---
vinho	$1{,}0\times10^{-6}$	$1{,}7\times10^{-6}$	0,15	94
vinho	$2{,}0\times10^{-6}$	$2{,}6\times10^{-6}$	0,22	93

*Para um volume de 25mL correspondente ao volume final de destilado após diluição efectuada para a análise polarográfica.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios polarográficos e atendendo à diluição realizada durante o procedimento experimental, obteve-se a concentração de $2{,}0x10^{-6}$M (0,17ppm) de diacetilo no vinho analisado.

Verificou-se, assim, que é possível realizar a análise polarográfica de diacetilo no vinho, após prévia destilação. No processo de destilação obteve-se um grau de recuperação de diacetilo superior a 90%, idêntico ao obtido na manteiga, na cerveja e nas soluções aquosas de diacetilo. O teor de diacetilo determinado no vinho está dentro do intervalo de teores habitualmente referidos como normais nos vinhos, embora se trate de um vinho com uma concentração baixa de diacetilo[20].

2 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE α-CETOÁCIDOS (COMPOSTOS α-DICARBONÍLICOS DA CLASSE II)

Para ilustrar o interesse prático do método de determinação polarográfica de α-cetoácidos que se desenvolveu, fez-se a aplicação do método à determinação desses compostos no vinho. O desenvolvimento do procedimento experimental envolveu a realização do seguinte conjunto de ensaios preliminares:

(1) análise directa do vinho sem derivatização;

(2) análise directa do vinho após derivatização;

(3) Identificação dos picos obtidos após derivatização por adição de padrão das quinoxalinas.

Para a execução destas análises seguiu-se o mesmo procedimento experimental utilizado na elaboração das curvas de calibração, ou seja, a realização da reacção de derivatização em solução HCl 0,1M contendo 0,2% de OFDA, com pH cerca de 1; após 30min em reacção, a adição de solução de NH_4Cl 0,2M e de NaHO 0,2M, por forma a fazer surgir em solução o sistema tampão NH_4^+/NH_3, resultando uma solução com pH próximo de 9; e, finalmente, a realização da análise polarográfica.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Ensaio em branco e análise do vinho sem derivatização

(i) Para um gobelé de 50mL adicionaram-se 10mL de solução de HCl 0,1M contendo 0,2% de OFDA, cujo pH, medido potenciometricamente era cerca de 1.

(ii) Adicionaram-se 5mL de solução de NH_4Cl 0,2M e 5mL de solução de NaHO 0,2M, tendo-se confirmado potenciometricamente que o pH da solução resultante era cerca de 9; transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 25mL e diluiu-se até à marca.

(iii) Essa solução foi colocada na célula polarográfica, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o respectivo polarograma (ensaio em branco).

(iv) Num outro ensaio juntaram-se para um gobelé de 50mL, 10mL de HCl 0,1M (sem conter OFDA) e 0,5mL de vinho. O ensaio foi completado realizando os mesmos procedimentos descritos em (ii) e (iii) (ensaio do vinho sem derivatização).

(B) Análise do vinho após derivatização

(i) Para um gobelé de 50mL adicionaram-se 10mL de solução de HCl 0,1M contendo 0,2% de OFDA, com pH cerca de 1, e juntaram-se 0,5mL de vinho.

(ii) Após deixar a reacção de derivatização decorrer durante 30min, adicionaram-se 5mL de solução de NH_4Cl 0,2M e 5mL de solução de NaHO 0,2M, ficando a solução com pH cerca de 9; a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25mL e diluída até à marca.

(iii) Essa solução foi colocada na célula polarográfica, deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o respectivo polarograma.

(iv) Adicionou-se, então, sucessivamente à célula polarográfica (1) solução de 2,3-dimetilquinoxalina e (2) solução de 2-metilquinoxalina, registando o polarograma da solução após cada adição.

(v) Num outro ensaio preparado da mesma forma, fez-se a adição sucessiva de (3) solução de 2-hidroxiquinoxalina e (4) de solução de2-hidroxi-3-metilquinoxalina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2.1 estão representados os vários polarogramas obtidos nestes ensaios. A partir desse conjunto de polarogramas verifica-se que o vinho antes da derivatização

não origina qualquer pico polarográfico de amplitude apreciável. Após a realização do processo de derivatização do vinho em condições de meio ácidas surgem dois picos bem distintos. O pico que surge num potencial menos catódico foi identificado como o resultado da derivatização de compostos α-dicarbonílicos da classe I. O segundo pico foi identificado como o resultado da derivatização de α-cetoácidos que deverão ser principalmente constituídos pelo ácido pirúvico e ácido α-cetoglutárico. Como resultado da adição da 2-hidroxiquinoxalina verifica-se que surge um novo pico polarográfico que se distingue do pico dos compostos α-dicarbonílicos da classe I e do pico do ácido pirúvico e ácido α-cetoglutárico; este ensaio demonstra que através deste método de análise polarográfica é possível distinguir o pico correspondente ao ácido glioxílico, que não se detectou no vinho, dos picos correspondentes ao ácido pirúvico e ao ácido α-cetoglutárico.

Estes ensaios mostram que a aplicação do método polarográfico à determinação de α-cetoácidos no vinho é bastante simples de realizar. A análise do ácido glioxílico pode ser feita na presença do ácido pirúvico e do ácido α-cetoglutárico, sem necessidade de recorrer à separação prévia dos compostos.

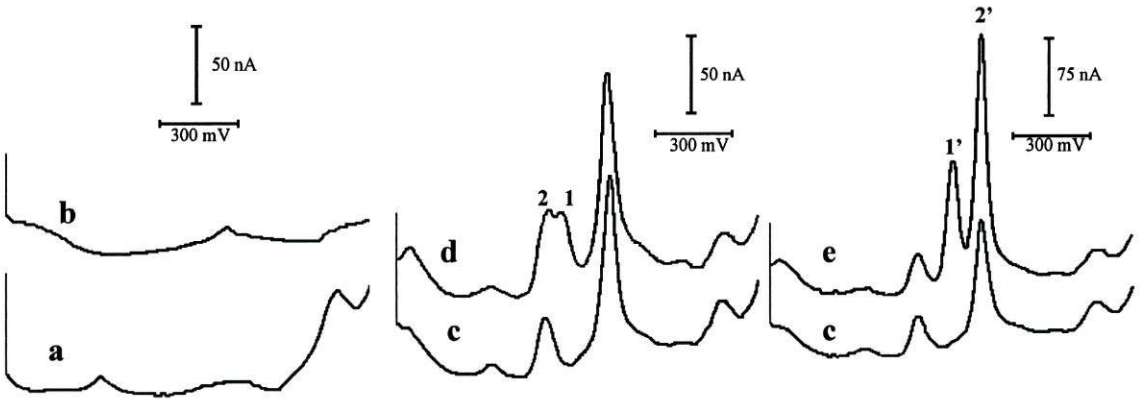


Figura 2.1 - Análise polarográfica de α-cetoácidos no vinho, sem tratamento prévio da amostra.
a- vinho sem adição de OFDA (sem derivatização); **b**- solução de OFDA sem adição de vinho; **c**- vinho após derivatização; **d**- adição de $4x10^{-6}$M de 2,3-dimetilquinoxalina (pico **1**) e de $2x10^{-6}$M de 2-metilquinoxalina (pico **2**); **e**- adição de $6x10^{-6}$M de 2-hidroxiquinoxalina (pico **1'**) e de $5x10^{-6}$M de 2-hidroxi-3-metilquinoxalina (pico **2'**).

Pelo contrário, o ácido pirúvico e o ácido α-cetoglutárico originam picos sobrepostos, pelo que o pico obtido representará a soma desses dois compostos no vinho. Deste modo, o método desenvolvido apresenta interesse pois trata-se de uma forma simples e expedita de caracterizar o teor global de α-cetoácidos. Sempre que seja desejável a distinção do teor de ácido pirúvico e de ácido α-cetoglutárico terá que se proceder ao tratamento prévio da amostra, no sentido de evitar a interferência de um composto na análise do outro.

3 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE ÁCIDO OXÁLICO (COMPOSTO α-DICARBONÍLICO DA CLASSE III)

3.1 - ESTUDO DE INTERFERÊNCIAS NO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DE ÁCIDO OXÁLICO

A realização de um estudo de interferências num método de análise polarográfica pode ter muitas vertentes, dada a diversidade de compostos que podem interferir. Desde logo todos os compostos que tenham actividade polarográfica na zona de potencial da espécie que se pretende analisar podem constituir interferências na análise. No método que é proposto utiliza-se um processo de derivatização, o que apresenta a vantagem de a análise polarográfica ser realizada sobre uma espécie que originalmente não se encontra presente na solução. Nestas condições é possível testar a existência na amostra de compostos activos polarograficamente na zona do composto que vai resultar da derivatização, bastando para isso analisar a amostra sem proceder à derivatização. Contudo, o processo de derivatização pode ser responsável pelo aparecimento de um novo conjunto de espécies interferentes, constituídas pelos compostos que, tal como o que se pretende analisar, originam, por reacção com o agente derivatizante, compostos activos polarograficamente na mesma zona de potencial.

Neste processo de análise podem também constituir interferências aqueles compostos que induzem a degradação da OFDA, já que tal ocasiona que a onda de libertação do hidrogénio surja a um potencial menos catódico e, eventualmente, se

sobreponha ao pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina. Os compostos que têm esta característica são, principalmente, os agentes oxidantes. Finalmente, podem interferir na análise aqueles compostos que modificam a sensibilidade da técnica polarográfica, sem contudo a inviabilizarem.

Do que atrás foi referido, torna-se claro que a caracterização exaustiva das interferências num dado processo de análise polarográfica é praticamente impossível. Deste modo, um estudo de interferências terá sempre que servir um objectivo claro, bem determinado e relacionado com a análise de uma dada amostra específica. O estudo de interferências que foi realizado neste trabalho teve por objectivo a verificação da influência da presença de alguns compostos durante o processo de derivatização do ácido oxálico, em que a solução é levada à secura. Os compostos que foram estudados foram os seguintes:

(i) Aniões - nitrato, sulfato, acetato, fosfato, formiato e nitrito;

(ii) Ácidos dicarboxílicos - ácido malónico (ácido propanodióico) e ácido succínico (ácido butanodióico);

(iii) Compostos α-dicarbonílicos e carbonílicos - diacetilo, ácido glioxílico e ácido pirúvico, ácido ascórbico e formaldeído.

O estudo da interferência de alguns aniões neste método de determinação deveu-se ao facto de se ter verificado, ao longo do processo de desenvolvimento do método, que quando se utilizava ácido sulfúrico ou ácido nítrico em vez de ácido clorídrico para acidular o meio nos ensaios que iam ser sujeitos ao processo de derivatização, a solução obtida após a retoma do resíduo proveniente da derivatização ficava fortemente corada, sobretudo quando se utilizava ácido nítrico, resultando num deslocamento anódico da zona de libertação do hidrogénio que se sobrepunha ao pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina. A explicação que se encontrou para esse facto baseou-se nas características oxidantes do anião nitrato e do anião sulfato em meio fortemente ácido e a quente, condições que se estabelecem quando a solução em derivatização é levada à secura em banho-maria à ebulição. A selecção do ácido clorídrico como o ácido forte mais adequado para acidular a solução a ser derivatizada deveu-se, deste modo, ao facto desse ácido não ter características oxidantes e ser um ácido volátil. Para além desses dois aniões, decidiu-se alargar o estudo de interferências a alguns outros aniões, como o

fosfato, o acetato e o formiato. Os dois primeiros aniões foram testados pois são constituintes habituais de soluções tampão; a interferência do anião formiato foi estudada pois esta espécie é referida como um interferente importante no método de análise espectrofotométrica de oxalato na cerveja desenvolvido por Alavi e colaboradores[61] que foi utilizado para a comparação dos resultados obtidos na determinação polarográfica de ácido oxálico na cerveja. O nitrito foi estudado pelo facto de ser uma espécie que pode reagir directamente com a OFDA para formar um composto heterocíclico que, embora de natureza distinta das quinoxalinas[7], poderá constituir uma interferência na análise polarográfica de ácido oxálico.

Estudou-se, também, a interferência dos dois ácidos dicarboxílicos que se seguem ao ácido oxálico nesse grupo de ácidos, ou seja, o ácido malónico e o ácido succínico. Pretendeu-se confirmar a especificidade da reacção de derivatização para o ácido oxálico dentro desse grupo de ácidos, já que, de acordo com o que foi referido na secção 2.3.2 na Parte I, a formação de um anel heterocíclico aromático com 6 átomos só pode ocorrer se os dois grupos carbonílicos estiverem em posições adjacentes e isso só acontece para o ácido oxálico.

Estudou-se, igualmente, um conjunto de compostos representantes daqueles que podem reagir com a OFDA, da mesma forma que o ácido oxálico, para formar quinoxalinas. O formaldeído, o mais simples composto carbonílico, foi incluído neste estudo para se verificar a interferência das iminas resultantes da reacção entre o grupo carbonilo e os grupos amina constituintes da OFDA[2].

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental que foi utilizado para ensaiar a interferência de cada um dos compostos no processo de análise polarográfica do ácido oxálico consistiu na preparação de dois ensaios em paralelo: num dos ensaios adicionou-se à solução que ia ser derivatizada uma dada quantidade da espécie a testar como interferente e no outro a derivatização foi realizada na ausência da espécie interferente. Deste modo, para dois gobelés de 25mL adicionaram-se 10mL de solução de HCl 0,5M, contendo 2% de OFDA e uma dada quantidade de ácido oxálico; a um deles adicionou-se uma dada quantidade de substância interferente. Estas soluções foram colocadas num banho-maria

à ebulição e a reacção de derivatização decorreu no período de tempo em que a solução evaporou. Os resíduos foram retomados com solução de HCl 1M e as soluções resultantes foram analisadas polarograficamente.

Em todos os ensaios foram ensaiadas duas concentrações diferentes de ácido oxálico - $2x10^{-5}$M e $2x10^{-6}$M - e uma mesma concentração de composto interferente na solução em derivatização, $1x10^{-3}$M. Através deste ensaio foi possível caracterizar a interferência de cada composto para duas proporções distintas entre espécie a analisar e composto interferente. Em todos os casos, após a obtenção dos picos da 2,3-di-hidroxiquinoxalina resultante da derivatização, adicionou-se um número de moles de 2,3-di-hidroxiquinoxalina idêntico ao número de moles de ácido oxálico que foi sujeito à derivatização, para se avaliar a extensão da conversão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 3.1 faz-se a avaliação qualitativa da influência da presença dos compostos estudados como interferências na resposta polarográfica do oxalato após derivatização; na tabela encontram-se registadas de forma resumida as diferenças de sensibilidade polarográfica verificadas nos ensaios realizados na presença e na ausência da espécie interferente. Refere-se, ainda, se ocorreu o aparecimento de sinais polarográficos novos como resultado da presença do composto interferente e avalia-se qualitativamente a importância da interferência de cada composto na análise polarográfica do ácido oxálico.

Dos vários compostos estudados, concluiu-se que aqueles que apresentam maior interferência na determinação polarográfica do ácido oxálico são aqueles que, tal qual o ácido oxálico, também reagem com a OFDA para formar compostos do tipo quinoxalinas. Das espécies ensaiadas estão nessas condições o ácido pirúvico, o ácido glioxílico e o diacetilo. De entre esses compostos, a forte interferência do diacetilo era previsível pois a 2,3-dimetilquinoxalina, que resulta da derivatização do diacetilo, apresenta três picos polarográficos em meio ácido, o último dos quais na zona do potencial do pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina. A forte interferência do ácido glioxílico

Tabela 3.1 - Avaliação da interferência de alguns compostos na determinação polarográfica de ácido oxálico.

Composto	$C_{oxalato}$	$C_{interferência}$	$C_{interferência}$ / $C_{oxalato}$	variação sinal (%)	Aparecimento de novo sinal polarográfico	Descrição da interferência
Nitrato	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(-20) (-5)	não	- Ligeira diminuição da sensibilidade - Zona de libertação do hidrogénio surge a potenciais menos catódicos - A influência da sobreposição do pico polarográfico na zona de libertação do hidrogénio é maior para a concentração mais baixa de ácido oxálico
Sulfato	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(-12) (-3)	não	- Ligeira diminuição da sensibilidade
Acetato	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(-15) (-9)	não	- Ligeira diminuição da sensibilidade
Formiato	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(-3) (-10)	não	- Ligeira diminuição da sensibilidade
Fosfato	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(-0) (-0)	não	- Não se detectou alteração nos polarogramas
Nitrito	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(+357) (-0)	sim	- Interferência muito intensa no pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina, impedindo a determinação - Zona de libertação do hidrogénio surge a potenciais menos catódicos
Ácido malónico	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(-18) (-22)	não	- Ligeira diminuição da sensibilidade
Ácido succínico	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(-36) (-29)	não	- Ligeira diminuição da sensibilidade

Tabela 3.1 - Avaliação da interferência de alguns compostos na determinação polarográfica de ácido oxálico (continuação).

Composto	$C_{oxalato}$	$C_{interferência}$	$C_{interferência} / C_{oxalato}$	variação sinal (%)	Aparecimento de novo sinal polarográfico	Descrição da interferência
Ácido pirúvico	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(+92) (-18,7)	sim	- Ligeira diminuição da sensibilidade - Surge um pico muito intenso adjacente ao pico da 2,3-di-hidroquinoxalina, que não interfere - Incremento no pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina que altera o sinal particularmente para a concentração mais baixa de ácido oxálico.
Ácido glioxílico	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(+1187) (+76)	sim	- Interferência muito intensa no pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina, impedindo a determinação - Surge um pico muito intenso adjacente ao pico da 2,3-di-hidroquinoxalina, que é distinguível desse pico.
Diacetilo	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(+668) (-30)	sim	- Surge um pico intenso adjacente ao pico da 2,3-di-hidroquinoxalina, que é distinguível desse pico - Interferência muito intensa no pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina, impedindo a determinação
Ácido ascórbico	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	*	**	- Zona de libertação do hidrogénio surge a potenciais menos catódicos, impedindo a determinação
Formaldeído	$2x10^{-6}$M $2x10^{-5}$M	$1x10^{-3}$M	500 50	(+53) (-13)	não	- Variação de sensibilidade - Incremento ligeiro no pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina que altera o sinal particularmente para a concentração mais baixa de ácido oxálico.

* O sinal surge completamente distorcido impedindo a medição da altura do pico.

** Não surge nenhum pico característico, aparece somente uma banda na zona de libertação do hidrogénio que distorce o pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina

não era esperada já que a 2-hidroxiquinoxalina não dá origem a qualquer pico polarográfico na zona do pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina; desta forma o pico intenso obtido poderá ser o resultado da oxidação do ácido glioxílico a ácido oxálico nas condições em que a derivatização é realizada, já que o ácido glioxílico é um precursor do oxalato nas plantas[172]. Para o ácido pirúvico o pico polarográfico obtido surge na zona correspondente ao pico da 2-hidroxi-3-metilquinoxalina, suficientemente afastado do pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina e, por isso, a interferência do ácido pirúvico na análise é menos acentuada.

Das outras espécies estudadas o anião nitrito, o ácido ascórbico e o aníão nitrato são as que apresentam maior interferência na análise. O anião nitrito faz surgir um pico polarográfico que se sobrepõe ao pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina, alterando-lhe o formato e impedindo a sua correcta quantificação. O ácido ascórbico perturba fortemente a análise do ácido oxálico pois, na sua presença, a onda de libertação do hidrogénio desloca-se anodicamente e sobrepõe-se com o pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina, impossibilitando a sua medição. O anião nitrato induz o amarelecimento da solução durante o processo de evaporação, obtendo-se, após a retoma do resíduo, uma solução bastante amarelada, verificando-se que a libertação do hidrogénio surge a potenciais mais anódicos e se sobrepõe em maior extensão ao pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina; este efeito é particularmente importante no ensaio em que a concentração de ácido oxálico é menor.

O formaldeído, apesar de poder reagir com a OFDA para formar compostos do tipo iminas em solução, não constitui uma interferência importante na análise, já que só provoca um ligeiro alargamento do pico polarográfico, o que perturba ligeiramente a medição da amplitude do pico polarográfico no ensaio em que a concentração de ácido oxálico é mais baixa.

Os dois ácidos dicarboxílicos que se seguem ao ácido oxálico nessa série de ácidos não fazem surgir qualquer pico adicional e a única influência que a sua presença provoca na determinação do ácido oxálico é uma ligeira variação na sensibilidade polarográfica. Em relação aos aniões estudados verifica-se que, com excepção do anião nitrato, não há interferência desses aniões, para além de ligeiras variações de sensibilidade dos picos polarográficos.

De acordo com estes resultados pode-se concluir que a reacção de derivatização do ácido oxálico com a OFDA é bastante selectiva para os compostos que possuem dois

grupos dicarbonílicos adjacentes. A interferência desses compostos na análise polarográfica do ácido oxálico deve ser sempre tida em conta pois, como resultado da derivatização desses compostos surgem sinais polarográficos que não existiam na amostra antes da derivatização. A importância da interferência desses compostos depende da sua concentração e da separação existente entre o ou os picos polarográficos que originam e o pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina. Nestes ensaios verifica-se, igualmente, que existe um outro tipo de interferência nesta análise que se fica a dever às espécies com características oxidantes capazes de oxidar a OFDA, já que, como resultado dessa oxidação, a zona de libertação do hidrogénio surge num potencial mais anódico, podendo sobrepor-se ao pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina e impossibilitar a sua quantificação. Se a concentração do agente oxidante for elevada, pode mesmo não ser possível quantificar a 2,3-di-hidroxiquinoxalina. De uma forma geral verifica-se nestes estudos que quase todas as espécies químicas estudadas, mesmo aquelas que não impedem a realização da análise nem fazem surgir picos polarográficos novos, afectam a sensibilidade da análise. Este tipo de interferência mostra que os métodos polarográficos são altamente influenciados pela composição da amostra e justifica a conveniência de se optar pelo método da adição de padrão como método de quantificação.

3.2 - DETERMINAÇÃO DE OXALATO EM ROLHAS DE CORTIÇA

A aplicação do método polarográfico à análise de oxalato em rolhas de cortiça resultou do interesse da indústria corticeira em seleccionar um método de determinação de oxalato em rolhas de cortiça. Como foi referido na secção 2.4.3 da Parte I, a presença de oxalato nas rolhas de cortiça deve-se à utilização do ácido oxálico na fase final do processo industrial de lavagem das rolhas. A presença de oxalato nas rolhas de cortiça tem vindo, por vezes, a ser invocada como causa de contaminação dos alimentos, particularmente dos vinhos, e por esta razão existe um grande interesse dos industriais corticeiros em controlar o teor de oxalatos nas rolhas que produzem, por forma a poderem contrariar essas acusações. O método de análise sugerido por uma comissão de peritos, que foi criada com o objectivo de estabelecer uma norma para a determinação de oxalatos em rolhas, foi a adaptação do método enzimático com detecção espectrofotométrica, que originalmente foi desenvolvido por Laker e colaboradores[173] para a análise de oxalato na urina e que, posteriormente, viria a ser adaptado pela *Sigma*

Diagnostics para a criação de um conjunto de diagnóstico (Kit Sigma Diagnostics, processo nº590), contendo os reagentes necessários para a execução de análises de oxalato na urina utilizando o referido método enzimático. Se por um lado a existência desse conjunto de diagnóstico simplifica o processo de análise de oxalato, já que nele se incluem todos os reagentes necessários e o modo operatório para a realização da análise está bem definido, por outro lado, os reagentes que são utilizados tornam as análises dispendiosas e, por isso, existe um interesse no desenvolvimento de métodos alternativos que permitam realizar esta análise de uma forma mais simples e igualmente fiável, mas com um custo por análise inferior.

Para o desenvolvimento desta aplicação contou-se com a colaboração de uma empresa corticeira que forneceu as amostras. Foram ensaiados quatro lotes distintos de rolhas: um lote era constituído por rolhas naturais, ou seja, rolhas que não tinham sido sujeitas ao processo de lavagem industrial; os outros três lotes eram constituídos por rolhas em que o processo de lavagem foi realizado através da lavagem tradicional, utilizando hipoclorito e ácido oxálico, diferindo, contudo, no modo como essa lavagem era executada. A responsabilidade da lavagem das rolhas e respectiva apartação por lotes ficou a cargo da empresa corticeira. Os quatro lotes de rolhas testados estavam identificados da seguinte forma:

- rolhas naturais;
- rolhas lavadas com pouco cloro;
- rolhas lavadas com muito cloro;
- rolhas lavadas com muito cloro e tratadas.

As rolhas pertencentes a estes quatro lotes foram analisadas através do método polarográfico desenvolvido e, para comparação de resultados, através do método enzimático com detecção espectrofotométrica utilizando o conjunto de diagnóstico da *Sigma Diagnostics*, utilizando a execução experimental indicada no projecto de norma Portuguesa em preparação[63]. A extracção de oxalatos das rolhas foi realizada utilizando o processo proposto pelo Centro Tecnológico da Cortiça (CTCOR), que consta do referido projecto de norma portuguesa, e está descrito na parte experimental.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Preparação de extractos de rolhas

A extracção de oxalato das rolhas foi realizada utilizando um conjunto de 5 rolhas do mesmo lote. Cada rolha foi cortada em três cilindros equivalentes e cada uma dessas partes foi cortada em quatro partes iguais. Os fragmentos de rolha resultantes foram colocados num matrás de 300mL com rolha esmerilada de vidro e adicionou-se solução de HCl 0,01M até encher quase completamente o matrás. Introduziu-se então um agitador magnético, tapou-se o matrás com a rolha de vidro e deixou-se a mistura em agitação magnética durante duas horas. Filtrou-se a solução para um balão de 500mL, lavou-se os fragmentos de rolha com solução de HCl 0,01M e completou-se o volume do balão com essa solução de HCl.

(B) Análise polarográfica

Mediram-se, rigorosamente, 5mL da solução resultante do processo de extracção de oxalato das rolhas para um gobelé de 25mL. Adicionaram-se 10mL de solução de OFDA 2% em HCl 0,5M. A solução foi colocada no banho-maria à ebulição até à evaporação completa do conteúdo do gobelé. O resíduo resultante foi dissolvido com 25,00mL de HCl 1M, transferido para a célula polarográfica e, após 10min de passagem de azoto, foi registado o polarograma dessa solução. A quantificação foi realizada pelo método de adição de padrão, adicionando solução de oxalato de sódio padrão à solução que continha o extracto de rolhas antes desta ser submetida ao processo de derivatização. As condições de análise polarográficas foram as mesmas utilizadas no estabelecimento da curva de calibração.

(C) Análise enzimática com detecção espectrofotométrica

O procedimento experimental seguido para a realização desta análise foi o indicado no projecto de norma Portuguesa que, por sua vez, era baseado no trabalho de Laker e colaboradores[173]. O método fundamenta-se na separação prévia de interferentes, através da extracção do anião oxalato da amostra utilizando uma resina permutadora aniónica. O oxalato retido na resina é depois eluído utilizando uma solução de hidróxido de sódio 0,2M. À solução resultante adiciona-se um conjunto de soluções que contêm duas enzimas, uma oxalato-oxidase e uma peroxidase, e dois reagentes, a 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) e o ácido 3-(dimetilamino)benzoíco

(DMAB). A determinação dos produtos da oxidação do oxalato resultantes da acção catalítica da enzima oxalato-oxidase, respectivamente o dióxido de carbono e o peróxido de hidrogénio, é feita espectrofotometricamente já que os dois reagentes referidos, MBTH e DMAB, na presença de peróxido de hidrogénio e da enzima peroxidase reagem formando um composto com uma coloração púrpura; a medição espectrofotométrica é realizada a 590nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através dos dois métodos podem ser comparados na tabela 3.2. Nas figuras 3.2 e 3.3 podem ser observados os gráficos obtidos a partir dos pontos experimentais e as relações lineares que foram estabelecidas por regressão linear. Apresentam-se, ainda, na figura 3.1 dois conjuntos de polarogramas, como exemplo dos polarogramas que foram obtidos na determinação de oxalato pelo método de adição de padrão; nessa figura estão representados os polarogramas obtidos na análise dos extractos das rolhas denominadas "naturais" e "lavadas com pouco cloro".

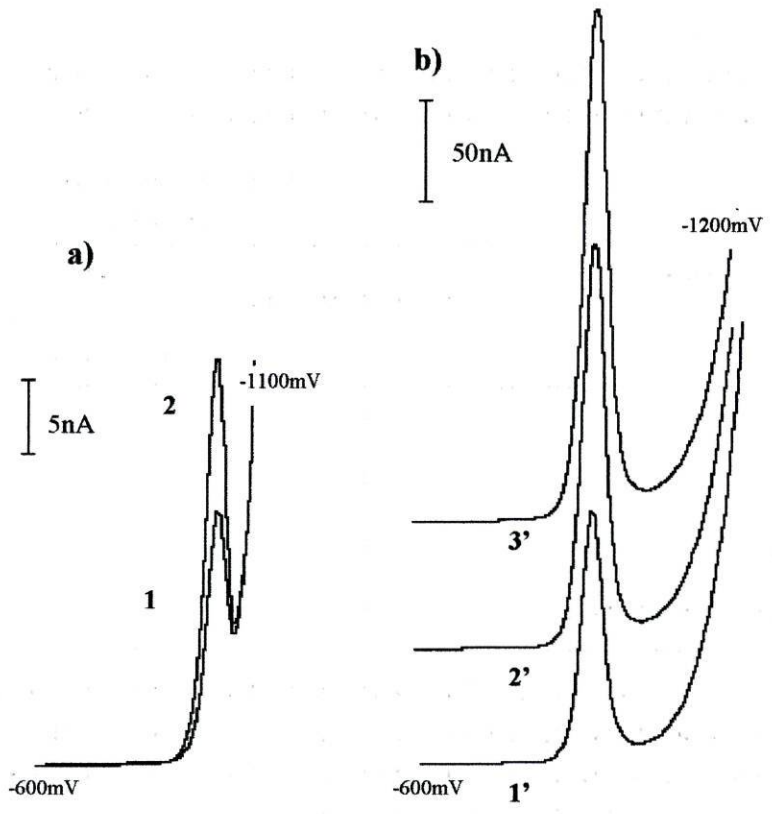


Figura 3.1 - Análise polarográfica de oxalato em extractos de rolhas utilizando o método de adição de padrão. **a)** extracto de rolhas naturais: 1- extracto, 2- adição de $2,5x10^{-6}$M de oxalato. b) extracto de rolhas "lavadas com pouco cloro": 1'- extracto; 2' e 3'- adição de $3,0x10^{-5}$M e de $6,0x10^{-5}$M de oxalato, respectivamente

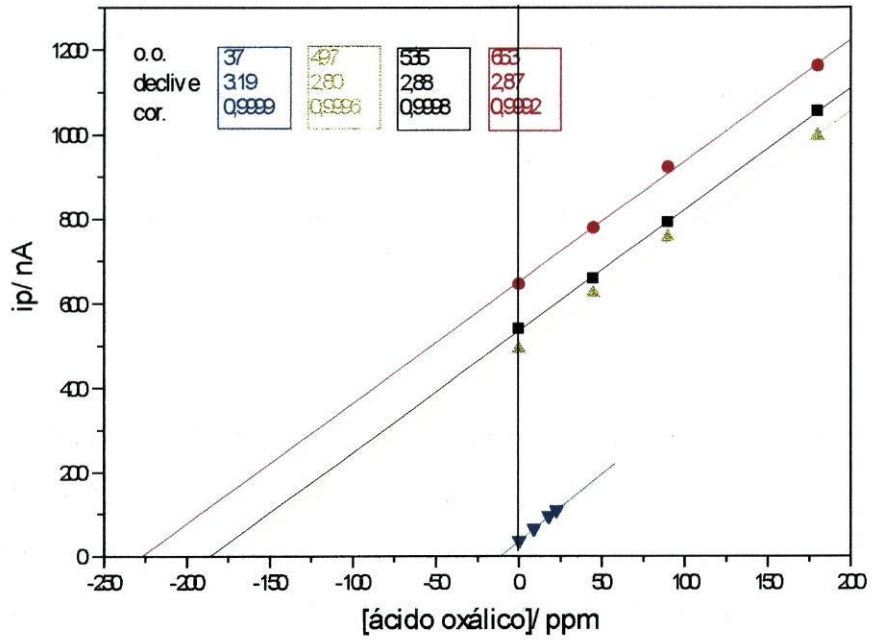


Figura 3.2 - Análise polarográfica de oxalato em rolhas de cortiça, pelo método de adição de padrão. Lote de rolhas: (▼) naturais; (▲) lavadas com muito cloro e tratadas; (●)lavadas com muito cloro; (■) lavadas com pouco cloro.

Tabela 3.2 - Resultados da determinação do teor de ácido oxálico em rolhas utilizando o método polarográfico e o método enzimático com detecção espectrofotométrica.

Tipo de rolhas	**Concentração de ácido oxálico mg/rolha**	
	Método polarográfico*	**Método enzimático com detecção espectrofotométrica****
naturais	0,23	0,35
lavadas com pouco cloro	3,70	4,41
lavadas com muito cloro	4,54	5,15
lavadas com muito cloro e tratadas	3,58	3,88

* A quantificação no método polarográfico foi realizada através do método de adição de padrão, adicionando uma quantidade conhecida de oxalato de sódio à solução que ia ser sujeita a derivatização.

** A quantificação foi realizada através do método de curva de calibração; o resultado apresentado representa a média de duas determinações independentes.

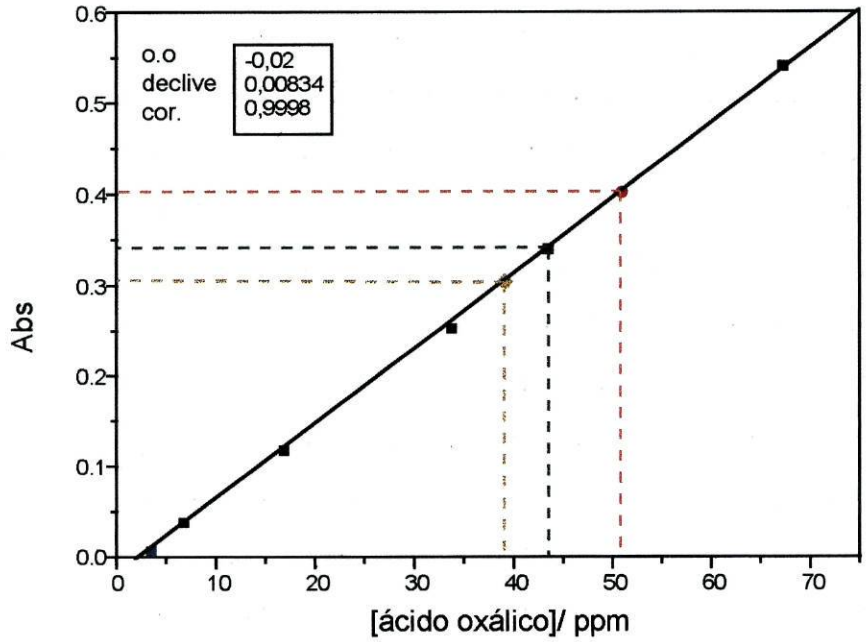


Figura 3.3 - Análise espectrofotométrica de ácido oxálico em rolhas de cortiça, utilizando o método enzimático. A tracejado representa-se a interpolação realizada para a obtenção da concentração de ácido oxálico nos quatro lotes de rolhas. Lotes de rolhas: (■) naturais; (◆) lavadas com muito cloro e tratadas; (●)lavadas com muito cloro; (■) lavadas com pouco cloro.

Os resultados obtidos através do método polarográfico são, para todas as amostras ensaiadas, ligeiramente inferiores aos resultados obtidos com o método enzimático com detecção espectrofotométrica, para análises efectuadas nos mesmos extractos. A razão desta discrepância nos resultados não foi averiguada exaustivamente, embora se admita que tal facto possa estar relacionado com a existência de interferências no método enzimático, já que a existência de tal situação tem sido referida na análise de ácido oxálico na urina [173,174,175]. A quantificação no método polarográfico foi realizada utilizando o método de adição de padrão através da adição de quantidades conhecidas de oxalato à solução que continha a amostra antes de a sujeitar ao processo de derivatização. Com este procedimento pretendeu-se salvaguardar qualquer efeito de matriz que pudesse ocasionar a diminuição do grau de conversão de ácido oxálico em 2,3-di-hidroxiquinoxalina. De referir, contudo, que foram obtidos resultados similares aos anteriores quando a quantificação foi feita através da adição de padrão de solução de 2,3-di-hidroxiquinoxalina à solução resultante da derivatização, directamente na célula

polarográfica. Desta forma verificou-se que o grau de conversão resultante do processo de derivatização realizado sobre a amostra era bastante elevado.

O método polarográfico revelou ser de fácil aplicação à análise do teor de oxalato em rolhas de cortiça. A análise dos extractos das rolhas pode ser realizada directamente, sem ser necessário recorrer a qualquer tratamento da amostra. Como se confirmou ser possível realizar a quantificação através da adição de solução de 2,3-di-hidroxiquinoxalina à solução resultante da derivatização, o processo de análise torna-se ainda mais rápido e simples de executar. Por seu turno o método enzimático é igualmente simples de realizar, uma vez que o conjunto de diagnóstico da *Sigma Diagnostics* contém todos os materiais e reagentes necessários para a realização do ensaios, incluindo as resinas permutadoras para a realização do passo prévio de separação do oxalato da amostra, o que simplifica bastante o processo analítico. O método polarográfico apresenta, contudo, duas vantagens importantes sobre o método enzimático: é mais sensível pois para a análise das rolhas naturais o método enzimático está praticamente no limite de determinação, enquanto que o método polarográfico está claramente acima desse limite (figura 3.3); e utiliza o método de adição de padrão para a quantificação, enquanto que no método enzimático utiliza o método da curva de calibração, que é mais sujeito à influência da matriz.

3.3 - DETERMINAÇÃO DE OXALATO NA CERVEJA

O método polarográfico foi também aplicado à determinação de oxalato na cerveja. Conforme se referiu na secção 2.4.3 na Parte I, o interesse na determinação do teor de oxalato na cerveja resulta do facto de, a partir de determinado nível de concentração de oxalato e de catião cálcio na cerveja, poder ocorrer a formação de cristais de oxalato de cálcio. Essa precipitação dá origem à turvação da cerveja e ocasiona o desprendimento rápido de espuma quando a cerveja é aberta pois os cristais de oxalato de cálcio actuam como núcleos de formação de bolhas gasosas que, nessas condições se libertam rapidamente e dão origem à formação abundante de espuma.

Nos primeiros ensaios que foram realizados, procurou-se avaliar a possibilidade de aplicar o método polarográfico à determinação directa de oxalato na cerveja, sem recorrer a qualquer tipo de tratamento prévio da amostra. Esses ensaios foram realizados adicionando 2mL de cerveja a 10mL de solução de OFDA 2% em HCl 0,5M (a solução

de derivatização) contidos num gobelé de 25mL. Essa solução foi sujeita ao processo de derivatização por aquecimento em banho-maria à ebulição até à evaporação completa; a retoma do resíduo resultante da derivatização foi feita com solução de HCl 1M e a análise polarografica da solução resultante foi realizada nas condições desenvolvidas. Nestes ensaios verificou-se que a solução que resultou da retoma apresentava-se fortemente corada e que não era possível distinguir o pico correspondente à presença de 2,3-di-hidroxiquinoxalina no polarograma obtido com essa solução já que a zona de libertação de hidrogénio iniciava-se antes da zona de potencial onde esse pico ocorria. Desta forma verificou-se que não era possível efectuar a análise polarográfica directa do oxalato na cerveja.

Para se realizar a análise polarográfica de oxalato na cerveja tornou-se, assim, necessário fazer um tratamento prévio da amostra antes de efectuar a análise. O processo de preparação de amostra que se decidiu utilizar foi o processo proposto por Alavi e colaboradores [61]. Estes investigadores desenvolveram um método espectrofotométrico para a determinação de oxalato na cerveja que incluía um modo de tratamento da amostra baseado na passagem da amostra de cerveja por um sistema de duas colunas permutadoras de iões, a eluição do oxalato retido, a sua precipitação sob a forma de oxalato de cálcio e a posterior separação e solubilização do precipitado. A solução resultante deste tratamento era submetida a reacção com indole (2,3-benzopirrole), para dar origem a um composto com coloração rosácea, verificando-se que a intensidade da coloração desenvolvida era proporcional à concentração de oxalato na amostra. A medição da absorvância da solução era efectuada a 525nm e a quantificação era realizada pelo método da curva de calibração.

Nesse processo de preparação da amostra é feita a passagem da cerveja por duas colunas montadas em série contendo resinas permutadoras de iões de dois tipos distintos (figura 3.4): a primeira coluna contém uma resina permutadora de catiões ("Amberlite IR-120 (H)"), cuja função consiste na retenção dos catiões presentes na amostra, promovendo, dessa forma, a dissociação dos sais metálicos e a libertação dos aniões; a segunda coluna contém uma resina permutadora aniónica ("Dowex 2 - X8"), cuja função consiste em reter os aniões, entre os quais o anião oxalato. Após a passagem da amostra as colunas são separadas e faz-se a eluição do oxalato retido na segunda coluna através da passagem de uma solução de HCl 1M.

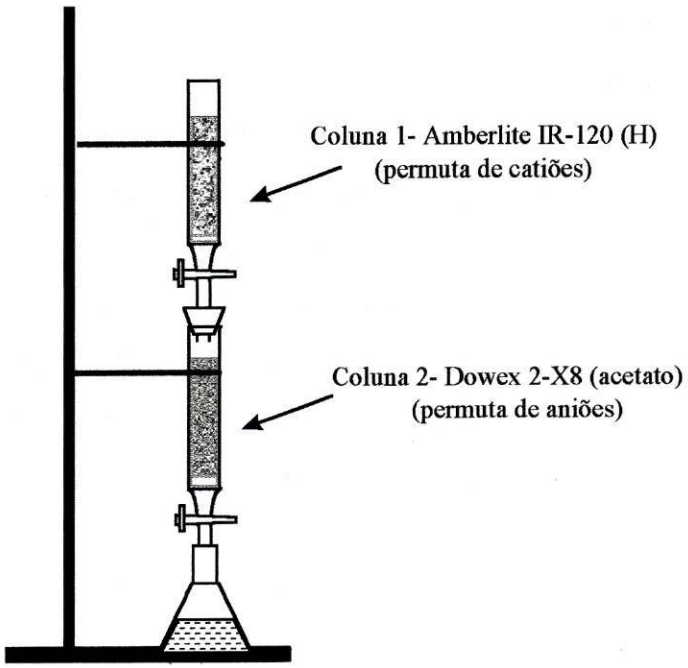


Figura 3.4 - Esquema do sistema de resinas permutadoras utilizado no processo de pré-tratamento da amostra de cerveja.

Este processo de separação do oxalato permite eliminar grande parte dos componentes da cerveja; contudo, alguns aniões derivados de ácidos orgânicos podem, tal como o oxalato, ficar retidos na resina permutadora aniónica, sendo eluídos conjuntamente com o oxalato através da passagem de HCl 1M. Na determinação espectrofotométrica de oxalato na cerveja Alavi e colaboradores verificaram que o ácido fórmico constituía uma interferência séria, pelo que tiveram que recorrer a um processo suplementar de separação do oxalato. O método utilizado foi a precipitação do oxalato sob a forma de oxalato de cálcio. A necessidade de realizar esta precipitação constituía um inconveniente experimental, pois o processo de precipitação é muito lento - a precipitação decorre durante um período de cerca de 15h, à temperatura de cerca de 4°C, havendo a possibilidade de ocorrer perda de oxalato durante o processo de precipitação devido à solubilidade, não desprezável, do oxalato de cálcio[11].

Antes de utilizar o processo de tratamento da amostra desenvolvido por Alavi e colaboradores para o tratamento da amostra de cerveja a ser submetida à análise polarográfica de oxalato decidiu-se realizar um estudo prévio sobre esse processo de tratamento da amostra com o objectivo de caracterizar as perdas de oxalato que resultam da aplicação dos dois modos de separação de oxalato utilizados. Fez-se, assim, a aplicação do processo de tratamento da amostra de cerveja a uma solução de oxalato de sódio com concentração conhecida. A solução resultante do primeiro tratamento

(passagem da amostra pelas colunas permutadoras e eluição) foi dividida em duas partes: uma parte serviu para fazer a análise polarográfica do teor de oxalato nessa solução e a outra parte serviu para se realizar o segundo tratamento (precipitação do oxalato sob a forma de oxalato de cálcio e posterior solubilização). A solução resultante desse segundo tratamento foi igualmente analisada, neste caso utilizando o método polarográfico e o método espectrofotométrico

O processo de passagem da amostra de cerveja pelas duas colunas permutadoras foi depois utilizado na purificação prévia da amostra de cerveja antes da realização da análise polarográfica, tendo-se verificado que já era possível analisar o oxalato na solução resultante sem que a onda de libertação do hidrogénio interferisse seriamente na medição do pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina.

3.3.1 - ESTUDO DO GRAU DE RECUPERAÇÃO DE OXALATO AO LONGO DO PROCESSO DE TRATAMENTO DA AMOSTRA

(A) Preparação das colunas permutadoras

O sistema de resinas permutadoras utilizado foi o referido por Alavi e colaboradores [61] e encontra-se representado na figura 3.4.

O processo de regeneração e lavagem das colunas, que deve ser realizado antes da primeira utilização e após cada passagem de uma amostra, foi realizado da seguinte forma: no caso da coluna I, fez-se passar sucessivamente 100mL de água desionizada, 150mL de HCl 1M e de novo 100mL de água desionizada; no caso da coluna II, fez-se passar 200mL de ácido acético 1M e de seguida 100mL de água desionizada.

(B) Passagem da solução de oxalato pelas resinas permutadoras

Prepararam-se as colunas permutadoras, montaram-se conforme o esquema da figura 3.4, regulou-se o fluxo de saída da coluna II para cerca de 3-4mL/min e iniciou-se a passagem da solução de oxalato de sódio com concentração conhecida ($2{,}3\times10^{-4}$M, ou seja, 20ppm em oxalato). Fez-se passar pela coluna 350mL, medidos rigorosamente, dessa solução, seguido de 100mL de água desionizada. Separou-se as colunas e fez-se a eluição do oxalato retido na coluna II fazendo passar 300mL de solução de HCl 1M e 100mL de água desionizada; a solução foi recolhida num balão volumétrico de 500mL, e efectuou-se a diluição da solução recolhida até à marca. Desta solução retiraram-se 100mL para serem analisados polarograficamente, no sentido de determinar o grau de recuperação resultante deste processo de separação.

(C) Separação do oxalato por precipitação

Aos restantes 400mL da solução resultante da passagem da solução de oxalato pelas colunas e eluição, adicionaram-se 5gotas de indicador vermelho de metilo e solução de amoníaco concentrado gota a gota até a solução ficar amarela. Juntaram-se 3mL de solução de acetato de amónio 500g/L e 1mL de ácido acético glacial; a solução resultante ficou com uma coloração rosada, indicando que o pH era cerca de 5. Aqueceu-se essa solução até cerca de 80°C e adicionaram-se 5mL de solução de cloreto de cálcio 100mg/L, agitando constantemente. Deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente, após o que se colocou no frigorífico a cerca de 4°C, durante 18h. Durante esse período de tempo formaram-se cristais de oxalato de cálcio que se depositaram. Efectuou-se, então, a filtração através de um funil de Buckner e lavaram-se os cristais retidos no filtro com 75mL de solução de amoníaco 1:50. Solubilizaram-se os cristais adicionando 35mL de solução de ácido sulfúrico 1M. Recolheu-se a solução resultante da solubilização para um balão de 50mL e diluiu-se com solução de ácido sulfúrico 1M.

(D) Determinação espectrofotométrica de oxalato na solução resultante da precipitação

Da solução anterior pipetaram-se 5mL para um tubo de ensaio. Para outro tubo de ensaio pipetaram-se 5mL de solução de ácido sulfúrico 1M. Arrefeceram-se ambos os tubos num banho de gelo durante cerca de 5min. Colocaram-se os tubos de ensaio num suporte com uma inclinação de 45° e adicionaram-se lentamente 5mL de solução de indole (preparado na altura da utilização por dissolução de 100mg de indole em 100mL de ácido sulfúrico concentrado), deixando escorrer essa solução reagente pela parede dos tubos de ensaio. Colocaram-se, cuidadosamente, os tubos no banho de gelo e só depois dos tubos estarem frios é que se agitou vigorosamente a mistura. Colocaram-se de novo os tubos a arrefecer mais um pouco no banho de gelo e, por fim, foram colocados a aquecer num banho-maria a 80° durante cerca de 45min. Após deixar arrefecer até à temperatura ambiente, transferiu-se parte da solução do tubo para a célula espectrofotométrica e mediu-se a absorvância a 525nm contra um branco.

Paralelamente a estes ensaios, procedeu-se à preparação de uma curva de calibração. Preparou-se uma solução de oxalato 1mg/mL em ácido sulfúrico 1M. Dessa solução pipetaram-se 2, 5, 10, 15, e 20mL para balões volumétricos de 100mL e diluiu-se até à marca com solução de ácido sulfúrico 1M. As soluções resultantes continham,

respectivamente, 2, 5, 10, 15 e 20mg de oxalato. De cada uma dessas soluções pipetaram-se 5mL para um tubo de ensaio, realizando a reacção com a solução de indole, da mesma forma descrita acima.

(E) Determinação polarográfica de oxalato

A análise polarográfica foi realizada ao longo dos dois processos que constituíam o tratamento prévio da solução. Obteve-se, assim, três tipos de solução para a análise polarográfica: (1) solução inicial (ensaio de referência); (2) solução resultante da passagem da solução pelas colunas permutadoras e eluição com solução de HCl 1M; e (3) solução resultante do processo de precipitação de oxalato de cálcio e respectiva solubilização.

As condições de derivatização e de análise polarográfica utilizadas nestes ensaios foram as seleccionadas para o estabelecimento da curva de calibração. Para a quantificação utilizou-se o método de adição de padrão, através da adição de pequenos volumes de solução padrão de oxalato de sódio ao gobelé de 25mL antes da derivatização. Atendendo à elevada sensibilidade do método polarográfico, o volume de solução necessário para a realização das análises foi muito pequeno: na análise da solução inicial e na análise da solução resultante da passagem da solução pelas colunas permutadoras e eluição com solução de HCl 1M utilizou-se 1mL de solução; na análise da solução resultante do processo de precipitação de oxalato de cálcio e respectiva solubilização, uma vez que existia um efeito de concentração potencial de oito vezes, se a recuperação fosse completa, utilizou-se 0,20mL de solução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio espectrofotométrico só foi realizado na solução final obtida após a precipitação do oxalato de cálcio, devido ao facto de o método não ter sensibilidade suficiente para a análise da solução inicial e da solução resultante do primeiro processo de separação. O aumento da concentração de oxalato decorrente do processo de separação por precipitação é, assim, essencial para que o método espectrofotométrico possa ter sensibilidade para a realização da análise de oxalato.

Na figura 3.5 apresenta-se o gráfico de calibração que foi obtido e as características da relação linear que foi estabelecida por regressão linear. Encontra-se,

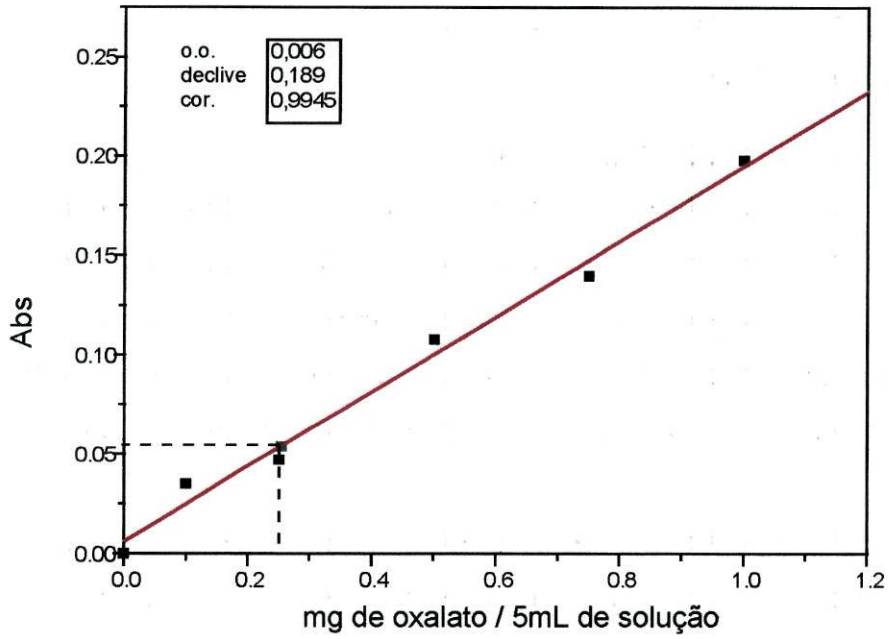


Figura 3.5 - Análise de uma solução de ácido oxálico, utilizando o método espectrofotométrico. A tracejado representa-se a interpolação realizada para a obtenção da massa de oxalato existente nos 5mL de solução analisada.

também, assinalada a interpolação gráfica que foi realizada para a obtenção da massa de oxalato existente nos 5mL de solução utilizada para a análise.

Atendendo ao volume de amostra, ao procedimento experimental e aos volumes utilizados ao longo do processo de tratamento de amostra estimou-se o grau de recuperação de oxalato resultante do tratamento efectuado à amostra. O grau de recuperação obtido através do ensaio espectrofotométrico foi de 45%.

Relativamente aos ensaios polarográficos, na figura 3.6 representam-se os vários gráficos resultantes da aplicação do método de adição de padrão às três soluções que foram sujeitas à análise polarográfica e as respectivas características das relações lineares obtidas por regressão linear. A concentração de oxalato é nestes casos obtida por extrapolação, conforme se exemplifica na figura.

Na tabela 3.3, apresenta-se a compilação dos resultados obtidos para a concentração de oxalato para as três soluções analisadas. Atendendo ao processo de tratamento da solução que foi seguido e aos volumes de solução que foram utilizados em cada fase do processo de preparação da amostra, foi possível determinar a massa total de oxalato existente nas soluções obtidas e, dessa forma, estimar o grau de recuperação de oxalato nas duas fases do processo. Esses valores encontram-se, igualmente, registados na tabela 3.3.

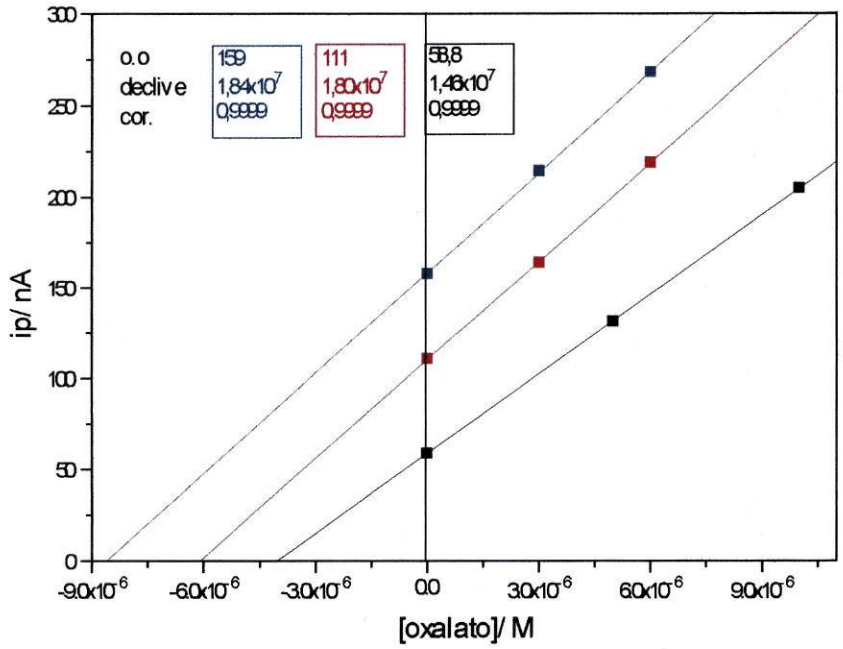


Figura 3.6 - Análise polarográfica utilizando o método de adição de padrão das várias soluções obtidas ao longo do processo de tratamento da amostra de uma solução de ácido oxálico, utilizando o procedimento referido no método espectrofotométrico. (■) solução inicial; (■) solução resultante da passagem nas colunas permutadoras e eluição; (■) solução resultante da precipitação e solubilização.

A primeira ilação que se pode retirar dos resultados obtidos nestes ensaios é que o método polarográfico é consideravelmente mais sensível que o método espectrofotométrico proposto por Alavi e colaboradores. Conforme se verifica através da curva de calibração respectiva, o método espectrofotométrico só tem sensibilidade para a realização da análise na solução final proveniente da precipitação do oxalato de cálcio, na qual existe um efeito de concentração do oxalato. No método polarográfico não existem problemas de sensibilidade do método e os volumes de amostra que são necessários para a realização da análise são bastante pequenos.

Tabela 3.3 - Determinação polarográfica de oxalato nas soluções obtidas ao longo do tratamento da amostra referido no método espectrofotométrico proposto por Alavi e colaboradores[61]. Estimativa do grau de recuperação de oxalato.

Solução	Concentração de oxalato na célula polarográfica/ M	Volume de solução usada na derivatização / mL	Concentração de oxalato na solução / M	Volume de solução utilizada/ mL	Massa de oxalato em solução/ mg	Grau de recuperação / %
inicial (ensaio de referência)	$8{,}6\times10^{-6}$M	1,00mL	$2{,}2\times10^{-4}$M	350mL	6,8mg	---
após passagem nas colunas permutadoras e eluição	$6{,}1\times10^{-6}$M	1,00mL	$1{,}5\times10^{-4}$M	500mL	6,6mg	97%
após precipitação e solubilização	$4{,}0\times10^{-6}$M	0,200mL	$5{,}0\times10^{-4}$M	50mL	2,8mg*	41%

* Valor corrigido devido ao facto de se ter utilizado somente 400mL dos 500mL que resultaram do primeiro processo de tratamento da amostra.

Relativamente aos graus de recuperação encontrados nas duas fases de preparação da amostra, verifica-se que a recuperação do oxalato após o primeiro processo de permuta iónica e subsequente eluição é muito elevada, enquanto que no segundo processo de precipitação e solubilização do precipitado as perdas de oxalato são elevadas. A obtenção de valores de recuperação baixos após a precipitação do oxalato de cálcio pode ser explicada pela solubilidade do oxalato de cálcio, que em água a 18°C é de 5,8mg/L[11], pelo que, quando a concentração de oxalato na amostra é baixa, podem ocorrer perdas apreciáveis de oxalato.

3.3.2 - ANÁLISE DE OXALATO NA CERVEJA

Considerando os resultados obtidos nos ensaios anteriores, fez-se a aplicação do método polarográfico desenvolvido à análise de oxalato na cerveja após separação pelo sistema das duas colunas permutadoras. Para tal mediram-se, rigorosamente, 200,0mL de cerveja que foi descarbonatada por aquecimento à ebulição, sendo de seguida diluída rigorosamente a 500,0mL. A passagem dessa solução pelas colunas permutadoras e a eluição do oxalato foi realizada da mesma forma descrita no ensaio anterior. A solução de HCl 1M e as águas de lavagem que foram utilizadas na eluição do oxalato retido na segunda coluna foram recolhidas num balão volumétrico de 500,0mL, tendo-se feito a diluição até à marca com água. A quantificação do teor de oxalato nessa solução foi realizada utilizando o método de adição de padrão, através da adição de solução de oxalato de sódio padrão antes da derivatização, para prevenir a possibilidade de existir efeito da matriz na extensão da reacção de derivatização; contudo, a adição de solução de 2,3-di-hidroxiquinoxalina directamente à célula polarográfica no fim do ensaio que continha só amostra, confirmou que a conversão era muito elevada e que, portanto, o método de adição de padrão podia ser realizado através da adição de 2,3-di-hidroxiquinoxalina directamente à célula polarográfica.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Na figura 3.7 representa-se o gráfico resultante da aplicação do método de adição de padrão à amostra de cerveja, após a passagem da amostra pelas resinas permutadoras e as características da relação linear obtida por regressão linear.

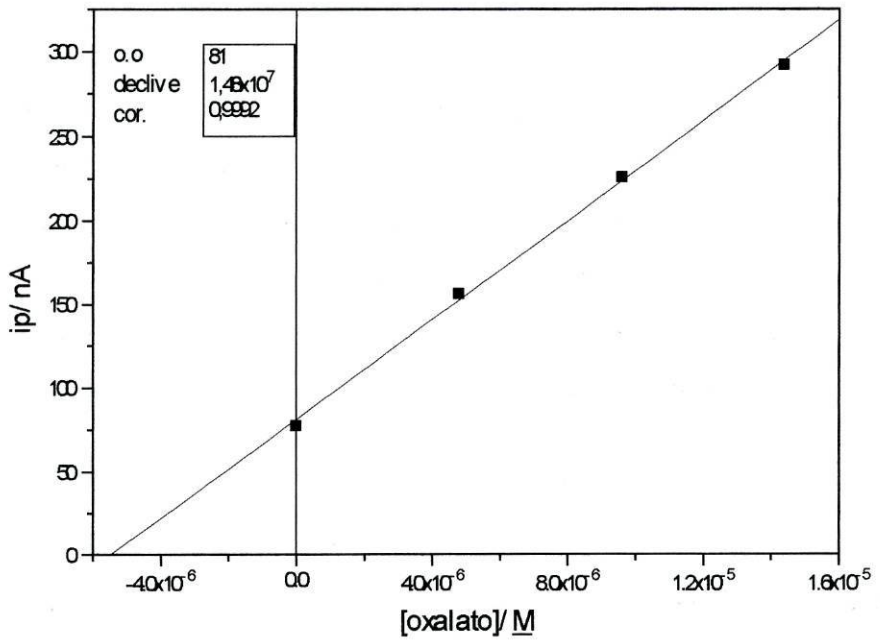


Figura 3.7 - Análise polarográfica de oxalato na cerveja, pelo método de adição de padrão.

A concentração de oxalato na célula polarográfica foi obtida por extrapolação; atendendo ao volume de cerveja utilizado para a análise, às diluições que foram efectuadas e ao volume de solução utilizado para análise, calculou-se o teor de oxalato na cerveja. Os valores obtidos estão registados na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Valores experimentais para o cálculo da concentração de oxalato na cerveja obtidos através do método de análise polarográfica.

Volume de cerveja utilizada no ensaio/ mL	Volume de solução resultante após tratamento/ mL	Volume de solução utilizada na derivatização / mL	Concentração de oxalato na célula polarográfica/ M	Concentração de oxalato na cerveja/ mg/L
200,0	500,0	3,00	$5,5x10^{-6}$	**10,1***

* (25,00/3,00) x (500,0/200,0) x $5,5x10^{-6}$ x 88 x1000

O conjunto de polarogramas obtidos nos ensaios polarográficos pode ser observado na figura 3.8.

O resultado obtido para a concentração de oxalato na cerveja está dentro dos valores típicos habitualmente referidos na bibliografia[61,167]. A passagem da amostra pelas colunas contendo as resinas permutadoras resolve o problema das interferências na determinação polarográfica que haviam sido detectadas na determinação directa.

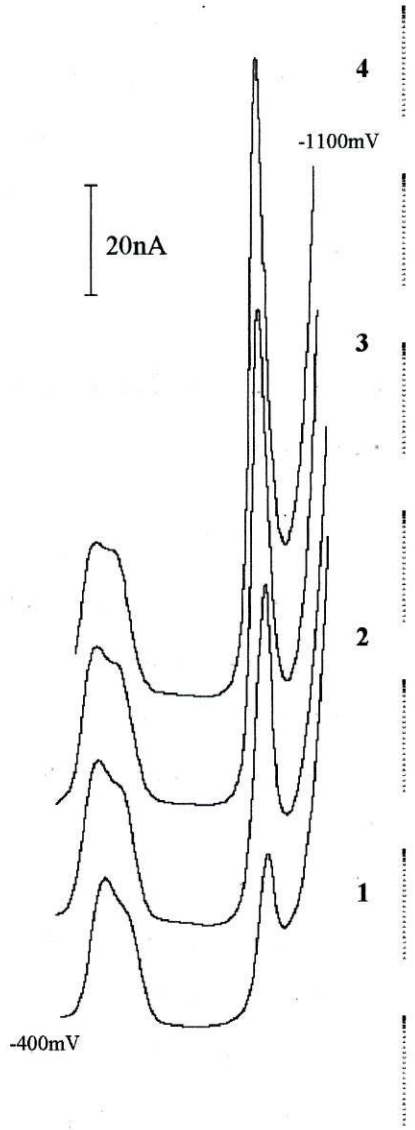


Figura 3.8 - Análise polarográfica de oxalato na cerveja, após passagem da cerveja no sistema de resinas permutadoras, utilizando o método de adição de padrão. **1**- amostra; 2, 3, 4- adições de $4{,}8\times10^{-6}$M, $9{,}6\times10^{-6}$M e $14{,}4\times10^{-6}$M de oxalato, respectivamente.

Conforme se verifica na figura 3.8, o pico da 2,3-di-hidroxiquinoxalina está ligeiramente sobreposto com a onda correspondente à libertação de hidrogénio; é, contudo, possível medir com boa precisão a intensidade de corrente relativa à altura desse pico. Desta forma pode-se afirmar que o método de análise polarográfica é bastante mais adequado para a realização da análise de oxalato na cerveja do que o método espectrofotométrico desenvolvido por Alavi e colaboradores. De facto, para além do método polarográfico ser bastante mais sensível, a selectividade da reacção de derivatização permite dispensar as etapas de precipitação e redissolução do oxalato, o que torna a análise mais rápida e mais simples de realizar.

O tratamento de amostra de cerveja utilizado neste ensaio polarográfico foi directamente adaptado do processo desenvolvido por Alavi e colaboradores. Atendendo, no entanto, ao pequeno volume de amostra necessária para a realização da análise polarográfica, parece claro que o processo de tratamento da amostra pode ser aperfeiçoado; particularmente parece possível reduzir o volume de amostra a tratar, tornando o processo mais simples e rápido.

4 - DETERMINAÇÃO POLAROGRÁFICA DA VITAMINA C EM SUMOS COMERCIAIS

Conforme se referiu na secção 2.4.4 da parte I, o ácido ascórbico (AA) é vulgarmente utilizado na indústria alimentar como aditivo no sentido de preservar os alimentos embalados de fenómenos de oxidação. O seu uso é, em geral, bem acolhido pelos consumidores, pois trata-se de um composto com uma actividade vitamínica importante. Decidiu-se, assim, fazer a aplicação do método polarográfico desenvolvido à determinação do teor de vitamina C em sumos de frutos embalados por serem produtos alimentares onde a adição de AA é habitual.

De acordo com a metodologia desenvolvida para a realização desta análise, em primeiro lugar ter-se-á que promover a oxidação do ácido ascórbico (AA) a ácido desidroascórbico (ADA) e só depois se adiciona a OFDA para formar a quinoxalina que vai ser analisada polarograficamente. Uma vez que neste trabalho não se dispôs nem da quinoxalina resultante da derivatização do ADA, nem do ADA para preparar soluções padrão, a quantificação teve que ser feita recorrendo a soluções padrão de AA. Deste modo a realização do método de adição de padrão envolveu a preparação de vários ensaios independentes, já que foi necessário proceder à oxidação do AA antes da derivatização, tornando o procedimento laborioso e demorado. Como, porém, o volume de sumo necessário para efectuar a análise era muito pequeno - utilizaram-se 50μL de sumo para um volume total de cerca de 27mL de solução na célula polarográfica - decidiu-se, igualmente, efectuar a análise pelo método da curva de calibração e comparar os resultados obtidos pelos dois métodos.

O método de análise polarográfica desenvolvido permite fazer a determinação global da vitamina C (AA + ADA) porque, antes de se proceder à derivatização com a

OFDA, se procede à oxidação do AA a ADA com a NBSI. Se, no entanto, se suprimir o passo de oxidação prévia, realizar-se-á somente a análise do ácido desidroascórbico, sem que o ácido ascórbico interfira na análise. Com o objectivo de confirmar este último aspecto, realizaram-se ensaios com a solução padrão de AA e com os sumos recém-abertos em que se suprimiu a adição de NBSI, no sentido de, por um lado verificar se o AA não interferia na análise do ADA e, por outro lado, se nos sumos comerciais se detectava a presença de ADA. Preliminarmente, realizaram-se ensaios em que se procurou demonstrar que, após a abertura de um sumo comercial se verifica uma variação na concentração de AA e o aparecimento de ADA com o tempo.

EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

(A) Método de adição de padrão

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL de tampão acetato 0,1M, pH=4,5, adicionaram-se 50μL de sumo e 75μL de NBSI 1,0g/L (concentração de NBSI na célula= 3ppm). Após borbulhar azoto durante 10min, adicionaram-se 2mL de OFDA 1,25%, borbulhou-se azoto durante mais 5min e registou-se o polarograma da solução.

(ii) O ensaio anterior foi repetido mais três vezes, adicionando-se em cada uma delas, respectivamente, 50μL, 100μL e 150μL de solução padrão de AA 100mg/L à solução tampão presente na célula polarográfica, antes de adicionar o sumo e os restantes reagentes.

(B) Método da curva de calibração

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL de tampão acetato 0,1M, pH=4,5, juntou-se um dado volume medido rigorosamente de solução padrão de AA e 75μL de solução de NBSI 1,0g/L (concentração de NBSI na célula= 3ppm).

(ii) Deixou-se borbulhar azoto durante 10minutos e adicionaram-se 2mL de solução de OFDA 1,25%. Borbulhou-se azoto durante mais 5min e registou-se o polarograma da solução.

(iii) Procedeu-se de igual forma para as outras concentrações de AA; a curva de calibração foi estabelecida para concentrações de AA entre 0 e 1,4ppm.

(iv) Fez-se a análise do sumo, substituindo a adição de padrão de AA por 50μL de sumo Para a amostra de sumo *Trinaranjus* procedeu-se a quatro ensaios utilizando quatro volumes de sumo diferentes: 25μL, 50μL, 75μL e 100μL.

(c) Análise do sumo e da solução padrão de AA sem oxidação prévia

(i) Para a célula polarográfica mediram-se 25mL de tampão acetato 0,1M, pH=4,5 e juntaram-se 2mL de solução de OFDA 1,25%. Deixou-se borbulhar azoto durante 10min e registou-se o respectivo polarograma da solução (branco com OFDA).

(ii) Adicionaram-se 50μL de solução padrão de AA 1,00g/L e, após borbulhar azoto durante 5min, registou-se o respectivo polarograma. Fizeram-se mais algumas adições de AA nesta solução, aguardando sempre o mesmo tempo com o azoto a borbulhar, antes de registar o polarograma.

(iii) Realizou-se um ensaio do mesmo tipo do anterior mas em que se substituiu a adição de AA por 50μL de sumo recém-aberto. O sumo foi mantido em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e foi analisado cinco dias depois.

As condições polarográficas utilizadas nestes ensaios foram as mesmas referidas no estabelecimento das curvas de calibração (Parte III).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 4.1 representa-se a intensidade de corrente de pico em função da concentração de AA adicionada à amostra submetida a análise, correspondente à aplicação do método de adição de padrão na análise do sumo; nessa figura encontra-se igualmente representada a extrapolação gráfica obtida a partir da regressão linear dos pontos experimentais. Na figura 4.2 representa-se a curva de calibração obtida e as interpolações gráficas realizadas para a obtenção da concentração de AA para os diferentes volumes de sumo utilizados na análise. Os valores para a concentração de AA em dois tipos distintos de sumos, obtidos pelos dois métodos de quantificação utilizados - método de adição de padrão e método da curva de calibração - encontram-se registados na tabela 4.1.

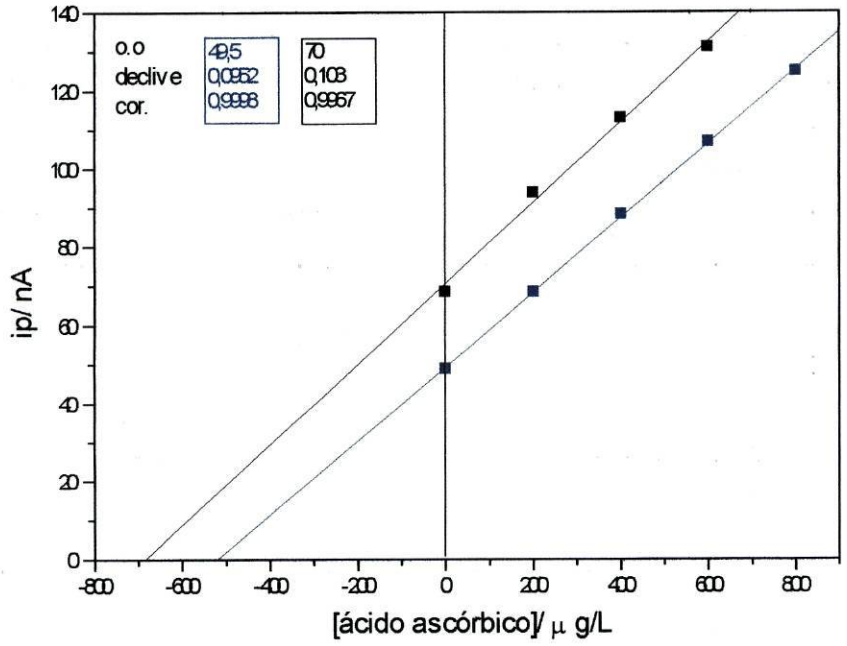


Figura 4.1 - Análise polarográfica de ácido ascórbico em sumos de fruta, pelo método de adição de padrão. Análise de: (■) trinaranjus (de laranja); (■) compal (de ananás).

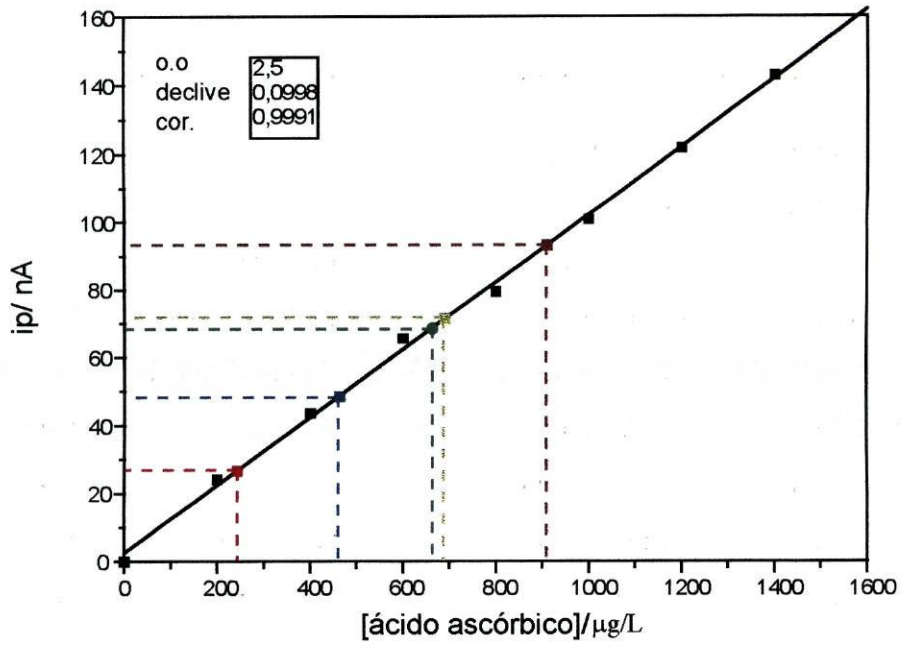


Figura 4.2 - Análise polarográfica de ácido ascórbico em sumos de fruta, utilizando a curva de calibração (■). As linhas representam a interpolação realizada para a obtenção da concentração de ácido ascórbico no sumo. Análise de: (■) 25μL, (■) 50μL, (■) 75μL e (■)100μL de trinaranjus (de laranja); (●) 50μL de compal (de ananás).

Tabela 4.1 - Resultados da análise polarográfica de AA em sumos de fruta embalados (trinaranjus e compal) obtidos através do método da curva de calibração e do método de adição de padrão.

TRINARANJUS (DE LARANJA)

	Volume de amostra/ μL	ip/ nA	Conc. AA no sumo/ mg/L
Método de curva de calibração	25	26,7	243
	50	48,6	231
	75	71,4	230
	100	93,3	228
Método de adição de padrão	50	49	260

COMPAL (DE ANANÁS)

	Volume de amostra/ μL	ip/ nA	Conc. AA no sumo/ mg/L
Método de curva de calibração	50	68,6	331
Método de adição de padrão	50	68,6	340

Conforme se pode verificar a partir dos resultados apresentados na tabela, existe uma ligeira diferença nos valores obtidos através dos dois métodos de quantificação. Essa diferença fica-se a dever essencialmente às ligeiras variações na sensibilidade das determinações polarográficas que foram obtidas consoante os ensaios, conforme se pode verificar através dos diferentes declives das representações gráficas obtidas. O método de adição de padrão é teoricamente aquele que é menos sujeito às variações de sensibilidade provocadas pela matriz; contudo, as representações gráficas da razões ip/C (método de curva de calibração) e (ipx-ip1)/C (método de adição de padrão em função de C, patentes na figura 4.3, mostram que existe uma tendência ligeira para uma diminuição dos valores dessas razões à medida que aumenta a concentração de AA. Tal facto significa que a variação da intensidade de corrente do pico polarográfico com a concentração de AA não é perfeitamente linear, apresentando uma ligeira tendência curvilínea. Como no método da adição de padrão se utiliza uma extrapolação em que se

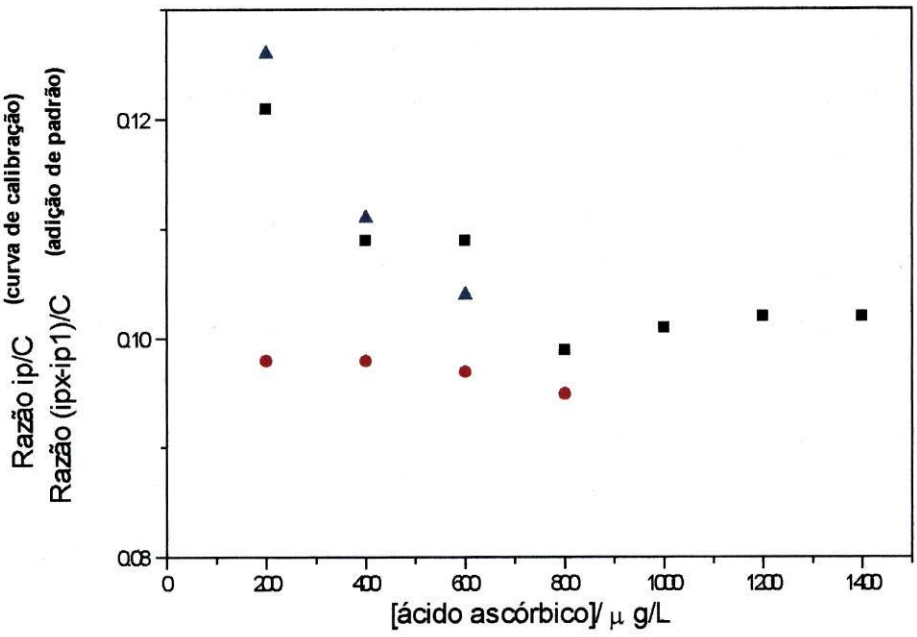


Figura 4.3 - Representação das razões ip/C (curva de calibração) e (ipx-ip1)/C (adição de padrão) em função da concentração de AA: (■) curva de calibração com AA padrão; (●) análise de AA no *Trinaranjus* por adição de padrão; (▲) análise de AA no *Compal* por adição de padrão.

admite a existência de um comportamento linear para o intervalo de concentrações testados, tal situação resulta num erro de quantificação por excesso. Por tal motivo, atendendo a que o volume de sumo necessário para a análise é muito pequeno, o que afecta pouco a composição da solução em análise, o método da curva de calibração parece poder ser o método de quantificação mais adequado, já que é experimentalmente o mais simples de realizar e, pelo facto de recorrer a uma interpolação, não é tão afectado por um eventual comportamento não linear da curva de calibração. Aliás, verificou-se que os valores obtidos para a concentração de AA no sumo Trinaranjus utilizando a curva de calibração eram pouco influenciados pelo volume de sumo analisado, quando se utilizou entre 25 e 100μL de sumo, o que indicava que a influência da matriz na sensibilidade polarográfica não era muito acentuada.

Procurou-se, igualmente, verificar se não ocorria interferência do AA na análise de ADA, através da realização de ensaios em solução de AA padrão e em sumos recém-

abertos em que se suprimiu a adição de NBSI. Na análise dessas soluções padrão de AA verificou-se o aparecimento de um pequeno sinal correspondente à presença de ADA. Na análise do sumo *Compal* recém-aberto não se detectou a presença do pico do ADA, só se tendo detectado esse pico após a oxidação da amostra com NBSI. Contudo, o mesmo sumo analisado cinco dias após ter sido aberto, mantido à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, já apresentava uma quantidade de ADA apreciável: o teor de AA tinha diminuído cerca de 30%, relativamente ao sinal obtido com o sumo recém-aberto, e cerca de 40% do sinal global era devido ao ADA. Estes resultados mostram que o método polarográfico pode ser utilizado para a análise do ADA na presença do AA, sem que este composto interfira na análise; os ensaios preliminares com o sumo permitiram verificar que o método polarográfico pode ser utilizado para acompanhar a evolução do teor de AA e ADA após a abertura de um alimento embalado, o que poderá ter grande interesse para a definição do tempo de estabilidade desses alimentos, quer quando embalados, quer após a sua abertura.

PARTE V

FENÓMENOS DE ADSORÇÃO DE QUINOXALINAS NO ELÉCTRODO DE MERCÚRIO

Quando se efectuou o estudo voltamétrico de algumas quinoxalinas (Parte II) procurou-se avaliar se existia aumento de sensibilidade na determinação, promovendo a acumulação prévia no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa dessas quinoxalinas, de acordo com o procedimento que é habitualmente recomendado na literatura[176,177]. Esse procedimento consiste na aplicação ao eléctrodo de mercúrio de gota suspensa de um potencial anódico relativamente ao potencial de redução característico dessas quinoxalinas durante um certo intervalo de tempo bem controlado, denominado habitualmente como tempo de acumulação. Como se pretende promover a adsorção, a solução é agitada durante esse período por forma a aumentar o transporte de massa de espécie para o eléctrodo. Após essa fase, procede-se ao varrimento de potencial no sentido catódico, utilizando um varrimento de potencial na forma diferencial por impulsos. Esta técnica electroanalítica, realizada desta forma, denomina-se por voltametria de adsorção ou voltametria com adsorção. Habitualmente admite-se que quando existe adsorção da espécie no eléctrodo o pico polarográfico obtido no ensaio com acumulação deverá ser maior do que aquele que é obtido num ensaio similar sem acumulação. Nos ensaios realizados utilizando o sistema de controlo voltamétrico

Metrohm VA Processor 646 não se obteve um aumento de sinal claro nos ensaios com acumulação relativamente aos ensaios similares realizados sem acumulação, pelo que não se encontrou, nessa altura, vantagens analíticas na realização de ensaios com acumulação.

No decorrer do trabalho experimental foi-se verificando que o comportamento polarográfico das quinoxalinas estudadas não se identificava com o comportamento esperado para um processo de redução electroquímico controlado por difusão. Algumas situações experimentais encontradas indiciavam a existência da contribuição de outros fenómenos, para além da difusão, no processo de redução electroquímico destas quinoxalinas, como por exemplo: as acentuadas variações da intensidade de corrente de pico observadas na análise polarográfica das quinoxalinas da classe I com o pH do electrólito de suporte; a obtenção de intensidades de corrente de pico cerca de oito vezes superiores quando a análise polarográfica das mesmas quinoxalinas era realizada no sistema Metrohm VA Processor 646, relativamente aos picos obtidos no sistema Metrohm VA 611 e VA612; a falta de linearidade observada na relação entre a concentração das hidroxiquinoxalinas e a intensidade de corrente de pico em algumas das condições de meio ensaiadas.

1 - EFEITOS DE ADSORÇÃO NA POLAROGRAFIA E NA VOLTAMETRIA POR IMPULSOS

Até há relativamente pouco tempo os varrimentos de potencial por impulsos em equipamentos de polarografia / voltametria comerciais estavam limitados às técnicas de varrimento normal e diferencial por impulsos. A versatilidade proporcionada ao operador para alterar as características temporais dos impulsos aplicados, como o tempo de aplicação do impulso e o instante e modo de amostragem de corrente após a aplicação do impulso, era inexistente; na maioria dos equipamentos vocacionados para aplicações electroanalíticas esse dois parâmetros eram invariáveis. É esta a situação encontrada no sistema Metrohm VA Processor 646 e no sistema Metrohm VA 611 e VA 612, que foram utilizados ao longo deste trabalho. O aparecimento recente de uma nova gama de equipamentos de voltametria apresentando maior versatilidade na selecção dos parâmetros temporais relativos aos varrimentos por impulsos veio possibilitar a

exploração de novas áreas em electroanálise. Esses equipamentos tornaram mais acessíveis técnicas voltamétricas por impulsos com enormes potencialidades analíticas e no estudo do mecanismo de reacções de eléctrodo, como é o caso da voltametria de onda quadrada[178].

1.1 - EFEITOS DE ADSORÇÃO NA POLAROGRAFIA POR IMPULSOS

A adsorção de compostos orgânicos no eléctrodo de mercúrio é um fenómeno muito comum[179] que pode modificar consideravelmente as respostas polarográficas habituais que são obtidas utilizando as técnicas de varrimento de potencial por impulsos em processos controlados por difusão. Num relatório técnico publicado em 1992 pela I.U.P.A.C. e preparado por H. P. VanLeeuwen, J. Baffle e M. Lovric[124], são discutidos os efeitos que a adsorção da espécie reagente tem nas respostas polarográficas obtidas através das técnicas de varrimento de potencial normal e diferencial por impulsos. De acordo com este trabalho, a detecção da influência da adsorção da espécie reagente no eléctrodo de mercúrio gotejante é mais fácil usando o varrimento normal por impulsos dado que, quando existe adsorção, o polarograma normal por impulsos apresenta um pico sobreposto à curva sigmoidal habitual, cuja magnitude aumenta conforme diminui a duração do impulso aplicado. No varrimento diferencial por impulsos a adsorção resulta num aumento do pico, se a adsorção da espécie não for muito intensa, ou numa deformação e mesmo, nalguns casos, num desdobramento do pico polarográfico se a adsorção for intensa. A amplitude do pico deverá aumentar com a diminuição da duração dos impulsos.

Segundo estes investigadores, quando num processo polarográfico existe adsorção, o processo de difusão pode ser decomposto em duas fases distintas: antes da aplicação do impulso, em que a difusão da espécie para o eléctrodo ocorre por acção das forças de adsorção e após o impulso, em que a difusão da espécie resulta do fenómeno electroquímico e respectivo gradiente de concentração. Como consequência da adsorção pode observar-se na figura 1.1 a alteração do perfil de concentração da espécie reagente durante a fase inicial antes da aplicação do impulso. De acordo com este esquema, a intensidade de corrente de difusão, na presença de adsorção, tende a diminuir já que no

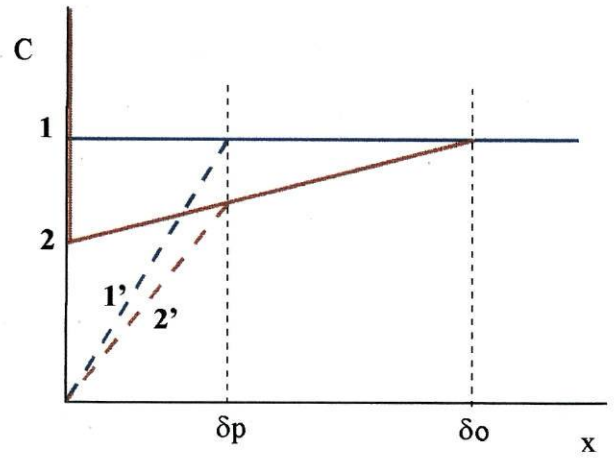


Figura 1.1 - Representação esquemática do perfil de concentração na vizinhança do eléctrodo:
- quando $t = t_0$
(**1**) na ausência; (**2**) na presença de adsorção
- quando $t = t_0 + t_p$
(**1'**) na ausência; (**2'**) na presença de adsorção
t_0 - intervalo de tempo antes da aplicação do impulso; t_p - intervalo de tempo de aplicação do impulso.

período antes do impulso cria-se uma zona de depressão de concentração da espécie reagente na vizinhança do eléctrodo. Contudo, para além deste efeito, existe um outro, quiçá mais importante, relativo às diferenças na dependência temporal do processo electroquímico controlado por difusão relativamente ao processo electroquímico controlado por adsorção; no primeiro a espécie reagente tem que movimentar-se por difusão para o eléctrodo, enquanto que no segundo a espécie reagente já se encontra na vizinhança do eléctrodo, como resultado da adsorção prévia. Desta forma, o decréscimo da intensidade de corrente de adsorção com o tempo de aplicação do impulso pode ser muito mais rápido, apresentando um comportamento por vezes designado de pseudo-capacitivo: a intensidade de corrente de adsorção tende efectivamente para zero, após a imposição de um impulso, conforme se encontra representado na figura 1.2, passando a existir unicamente a intensidade de corrente de difusão.

Num varrimento de potencial normal por impulsos a intensidade de corrente de difusão, após se atingir o patamar de difusão, não é apreciavelmente afectada pela variação do potencial aplicado, uma vez que a velocidade do processo é essencialmente controlada pela difusão da espécie reagente para o eléctrodo e não pela velocidade de

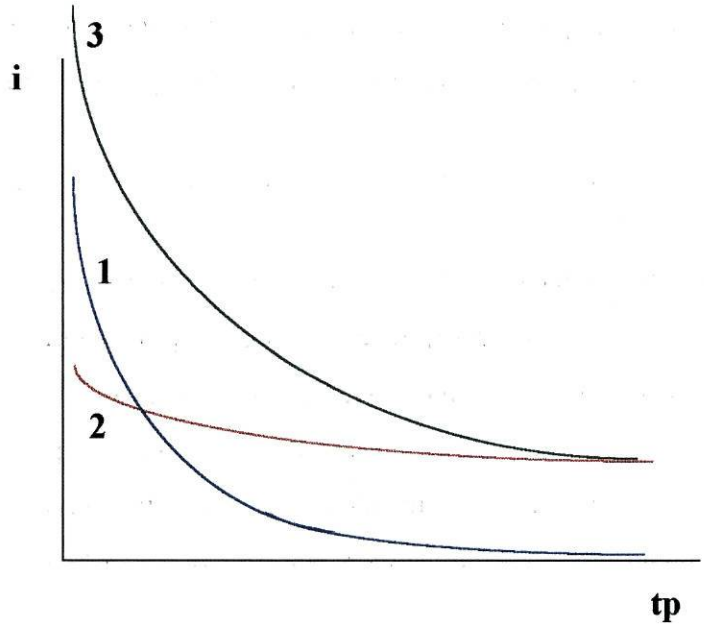


Figura 1.2 - Representação esquemática da dependência temporal das intensidades de corrente de adsorção (**1**) e de difusão (**2**), após a aplicação do impulso de potencial. Em (**3**) representa-se a intensidade de corrente resultante.

transferência electrónica. Sendo assim, a dependência temporal do processo de difusão, que se esquematiza na figura 1.2, mantém-se, praticamente, invariante com a variação do potencial. Relativamente ao processo de adsorção, a quantidade de espécie que pode ser acumulada no eléctrodo é relativamente pequena, pelo que quando se faz a aplicação de um impulso de potencial ao sistema, estabelecer-se-á instantaneamente uma intensidade de corrente de adsorção que pode ser estimada através de uma relação do tipo da equação de Butler-Volmer[179].

$$i = nFA\,Ks\left\{\tau_o \exp\left[-\frac{\alpha nF}{RT}\left(E-E^{o'}\right)\right]-\tau_R \exp\left[-\frac{(1-\alpha)nF}{RT}\left(E-E^{o'}\right)\right]\right\} \qquad (1)$$

representando:

Ks - constante de velocidade do processo de transferência electrónica da espécie adsorvida;

$E^{0'}$ - potencial formal superficial;

α - coeficiente de transferência;

τ_o , τ_R - concentrações superficiais da espécie reagente e produto, respectivamente;

A - área do eléctrodo.

Por efeito da reacção electroquímica o sistema tende a atingir o estado de equilíbrio, passando nessa altura a poder ser descrito pela equação de tipo Nernst:

$$\frac{\tau_O}{\tau_R} = \exp\left[\frac{nF}{RT}\left(E - E^{o'}\right)\right]$$ (equação que traduz a condição de estado de equilíbrio)

Quando esta situação se estabelece, a intensidade de corrente de adsorção passará a ser nula. Este modelo simplificado pressupõe que a contribuição da intensidade de corrente de difusão é negligível, que o fenómeno de adsorção deixa de influenciar o processo durante a fase da aplicação do impulso e que, sobretudo, quer a espécie reagente quer o respectivo produto permanecem confinados no eléctrodo durante o processo de varrimento de potencial, permitindo assim que se possa estabelecer o estado de equilíbrio.

As consequências práticas deste modelo em sistemas onde existe adsorção podem ser bastante importantes. Em primeiro lugar, a partir da relação do tipo da equação de Butler-Volmer, equação (1), pode deduzir-se que à medida que a diferença ($E-E^{0'}$) se torna mais negativa (E mais catódico) a intensidade de corrente de adsorção que se estabelece instantaneamente é maior, havendo, consequentemente, um mais rápido decréscimo da intensidade de corrente de adsorção com o tempo. Em segundo lugar pode admitir-se que, se o intervalo de tempo entre o início da aplicação do impulso e o instante de amostragem da intensidade de corrente for suficiente para o sistema atingir o equilíbrio, então o sinal de adsorção desaparecerá. Nas técnicas polarográficas por impulsos, como se utiliza o eléctrodo de mercúrio gotejante, a adsorção só é significativa se puder ocorrer num período de tempo muito curto (usualmente o tempo de vida da gota é $\leq$ 1s). No varrimento normal por impulsos a adsorção ocorre sempre do mesmo modo nas mesmas condições de potencial e, portanto, antes da aplicação do impulso cada gota estará, teoricamente, em condições similares à precedente. Desta forma, a justificação para o aparecimento do máximo característico do fenómeno de adsorção nos polarogramas normais por impulsos e para o seu desaparecimento para potenciais mais catódicos fundamenta-se no facto de à medida que o potencial do impulso aplicado é mais catódico, o decréscimo da intensidade de corrente de adsorção é mais rápido e, como a amostragem da intensidade de corrente resultante é realizada na fase final da aplicação do impulso, a partir de um dado valor de sobrepotencial essa intensidade de

corrente deixa de ser registada, enquanto que a intensidade de corrente de difusão se mantém (figura 1.3).

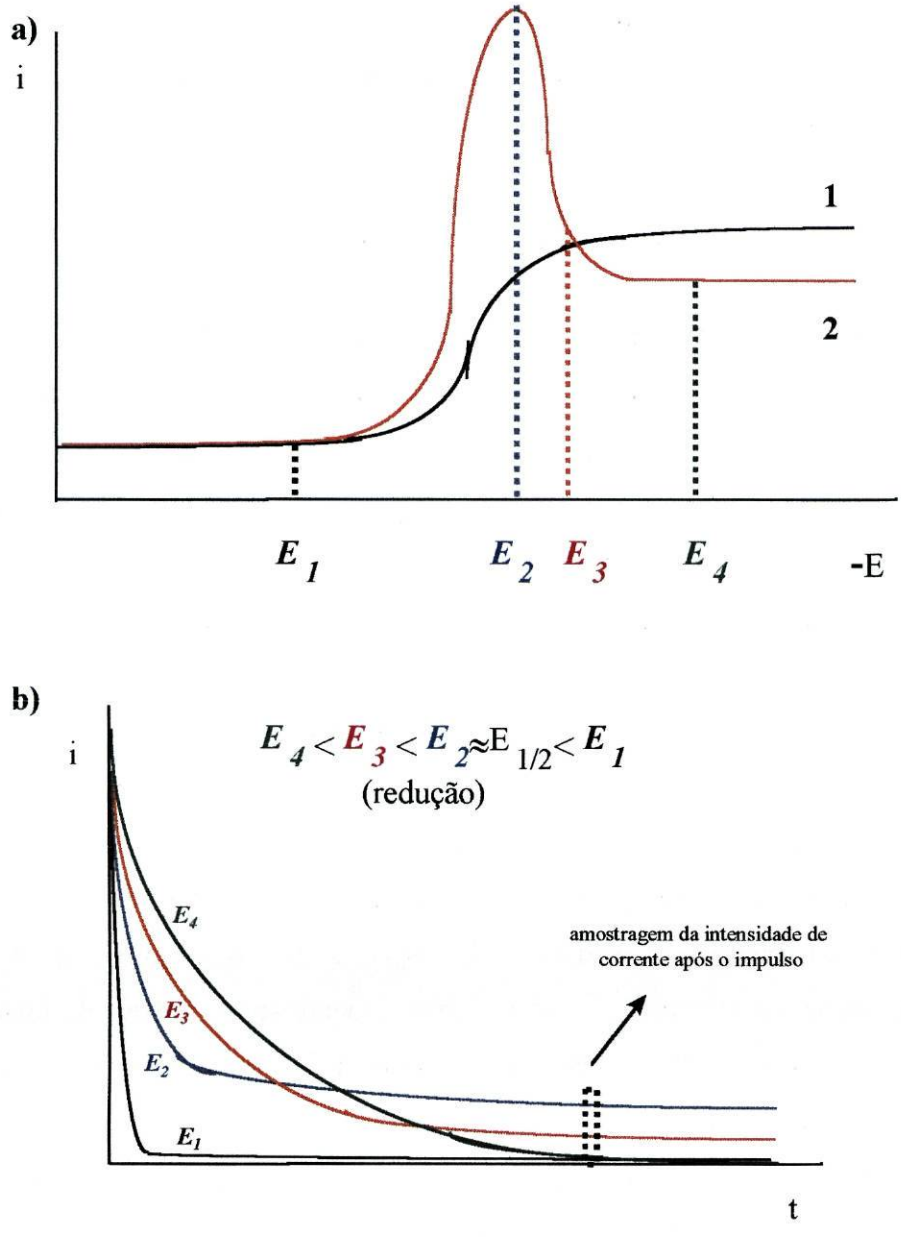


Figura 1.3 - a)- representação esquemática de um polarograma normal por impulsos na presença (**2**) e na ausência (**1**) de adsorção.

b)- representação das curvas cronoamperométricas resultantes da aplicação dos impulsos na polarografia normal por impulsos nos potenciais assinalados na figura acima, **a)**, na presença de adsorção.

Na polarografia diferencial por impulsos a interpretação do efeito da adsorção no pico polarográfico obtido é ainda mais complexa, uma vez que o potencial base entre impulsos sucessivos vai variando e, por isso, à medida que se avança no varrimento de potencial, o fenómeno de adsorção, pode sofrer alteração. Em termos qualitativos observa-se, porém, que a adsorção da espécie reagente faz aumentar a intensidade de corrente obtida, sendo esse aumento do pico o equivalente, nesta técnica, ao máximo que surge na polarografia normal por impulsos.

1.2 - EFEITOS DE ADSORÇÃO NA VOLTAMETRIA POR IMPULSOS

Os efeitos da adsorção nos métodos voltamétricos utilizando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa são ainda mais acentuados que nos métodos polarográficos e, pelo facto de todo o varrimento de potencial se fazer numa única gota, a adsorção pode ser deliberadamente promovida, como é o caso na voltametria com adsorção. Apesar de todo o interesse que a voltametria com adsorção tem despertado como técnica electroanalítica e de existirem inúmeros artigos científicos com aplicação analíticas diversas deste tipo de voltametria [177], os fundamentos da voltametria com adsorção, que a diferenciam da voltametria de processos controlados por difusão, não estão ainda bem consolidados. Por exemplo, num recente artigo científico de revisão da autoria de R. Kalvoda [177] sobre o estado de desenvolvimento da voltametria com adsorção, refere-se genericamente as dificuldades de criação de modelos teóricos que permitam interpretar o comportamento de adsorção das espécies, devido aos inúmeros factores que podem influenciar essa adsorção; contudo, relativamente aos aspectos relacionados com as diferenças a nível electroquímico do processo de eléctrodo e a sua influência na técnica, nada é discutido.

Desde os anos 80 que os grupos de J. Osteryoung e M. Lovric se têm destacado no estudo dos aspectos fundamentais sobre o modo como sistemas confinados na superfície de eléctrodos se comportam quando se aplicam varrimentos de potencial por impulsos. Estes grupos têm dado particular ênfase à voltametria de onda quadrada para o estudo da adsorção devido ao facto de se tratar de uma técnica por impulsos que, para além de conseguir discriminar a intensidade de corrente faradaica da intensidade de corrente capacitiva, permite, ainda, realizar varrimentos bastante rápidos. A perturbação

de potencial que é aplicada ao eléctrodo de trabalho na voltametria de onda quadrada tem a forma representada na figura 1.4.

Lovric considera o fenómeno de adsorção como um bom exemplo de uma situação em que a espécie reagente está confinada no eléctrodo[180,181], tendo considerado que tipicamente podem surgir duas situações como resultado da reacção electroquímica da espécie adsorvida: ou o produto formado continua adsorvido no eléctrodo; ou o produto formado desaparece do eléctrodo, quer por não ter tendência a adsorver e se afastar rapidamente do eléctrodo, quer por reagir imediatamente, tornando o processo totalmente irreversível.

Lovric conseguiu mostrar, através da criação de modelos e de cálculos teóricos, que na primeira situação, quando o produto resultante da reacção electroquímica permanece adsorvido no eléctrodo, a resposta do sistema a um varrimento de potencial em onda quadrada apresenta o denominado "máximo quasi-reversível".

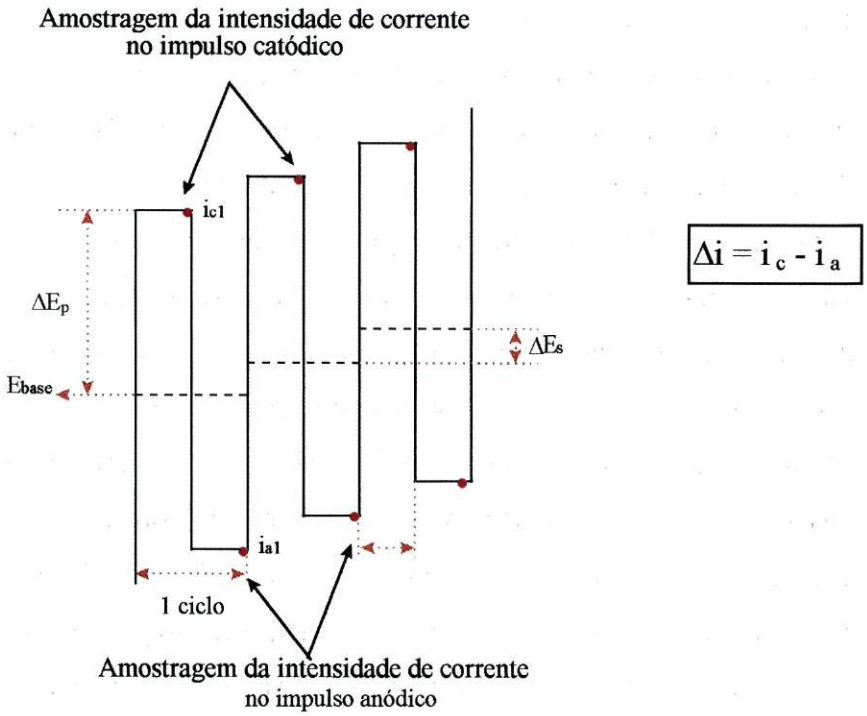


Figura 1.4 - Representação da perturbação de potencial em onda quadrada. ΔE_p- amplitude de potencial de onda quadrada; i_c- intensidade de corrente catódica; i_a- intensidade de corrente anódica; ΔE_s- incremento de potencial após um ciclo.

Em sistemas com este tipo de comportamento Lovric deduziu que a intensidade de corrente registada é maior para sistemas quasi-reversíveis do que para sistemas reversíveis. A explicação para este efeito tem a ver, segundo Lovric, com o facto de a amostragem da intensidade de corrente após a aplicação do impulso ser efectuada na fase final do impulso. Assim, após a aplicação de cada impulso a reacção electroquímica terá tendência a decorrer até que o equilíbrio nernstiano superficial seja alcançado. Se a velocidade da reacção da espécie adsorvida no eléctrodo for muito elevada, o equilíbrio pode ser atingido na fase inicial do impulso, dada a quantidade limitada de espécie, pelo que, na parte final do impulso, a intensidade de corrente medida será nula. Deste modo uma reacção de eléctrodo mais lenta pode ocasionar sinais de adsorção mais elevados, dependendo da frequência de onda quadrada do varrimento utilizado e do modo como a amostragem da intensidade de corrente é realizada[180]. Lovric afirma que a representação da razão entre a intensidade de corrente do pico e a frequência em função da frequência, tem um máximo que está relacionado com a constante de velocidade do processo de transferência electrónica do sistema oxido-redutor em questão. Sendo assim, para além do inerente interesse electroanalítico, estes estudos são importantes na caracterização da cinética de transferência electrónica desse tipo de sistemas.

Na segunda situação considerada por Lovric, o produto da reacção electroquímica não permanece no eléctrodo. Numa situação deste tipo, a intensidade de corrente do pico deverá ser directamente proporcional à frequência, ou seja, inversamente proporcional ao tempo de aplicação do impulso[182].

De acordo com esta interpretação do fenómeno de adsorção, vai existir uma grande diferença entre estas duas situações relativamente à intensidade de corrente que pode ser obtida através de um varrimento em onda quadrada. Este facto encontra-se directamente relacionado com o modo como é realizada a amostragem da intensidade de corrente nesta técnica e, também, com o facto de a intensidade de corrente resultante ser obtida por subtracção das intensidades de corrente obtidas no impulso catódico e no anódico. Para uma reacção electroquímica ideal em que a espécie reagente está adsorvida no eléctrodo, a intensidade de corrente faradaica que resulta da aplicação de um impulso apresenta um decaimento exponencial com o tempo que pode ser descrito através da equação:

$$i_F = kQ \exp(-kt)$$

em que:

k - constante de velocidade aparente para um dado valor de sobrepotencial;

Q - quantidade de carga transferida na reacção electroquímica.

Para um sistema em que quer a espécie reagente, quer o produto da reacção electroquímica permanecem adsorvidos no eléctrodo, a quantidade de espécie que vai reagir quando se aplica um impulso catódico vai depender do intervalo de tempo de aplicação do impulso: se este intervalo de tempo for curto, o que corresponde a uma frequência de onda quadrada elevada, a quantidade que reage será pequena e no impulso anódico seguinte o sinal de reoxidação será pequeno, não contribuindo apreciavelmente para o sinal total; se o intervalo de tempo for longo, o que corresponde a uma frequência de onda quadrada pequena, apesar da quantidade que reage ser elevada, o sistema tenderá a atingir o estado de equilíbrio, pelo que o sinal tenderá a anular-se. Desta forma vai existir uma frequência óptima onde esses dois factores antagónicos estão sincronizados de forma a obter-se um valor de intensidade de corrente de pico máximo. Nessa frequência o material adsorvido vai ser sucessiva e repetidamente reduzido e oxidado, durante uma certa fase do varrimento, resultando numa efectiva amplificação do sinal.

Para os sistemas do segundo tipo, em que o produto da reacção electroquímica não permanece no eléctrodo, o fenómeno de reutilização da espécie adsorvida não pode suceder. Neste caso vai ocorrer um efectivo consumo de espécie adsorvida durante o varrimento uma vez que não é possível ocorrer a reoxidação. Assim, a intensidade de corrente medida no impulso anódico será praticamente nula, pelo que não irá contribuir para a intensidade de corrente total. Desta forma, para estes sistemas a sensibilidade da voltametria de onda quadrada será bastante inferior à obtida com os sistemas quasi-reversíveis.

2 - EXECUÇÃO EXPERIMENTAL

2.1 - INSTRUMENTAÇÃO

A parte experimental foi efectuada utilizando um sistema voltamétrico e polarográfico Autolab PSTAT 10 (EcoChimie), controlado através de um computador pessoal equipado com "software" GPES for windows, versão 4.2. Um dos parâmetros experimentais mais importantes neste trabalho é o modo como é realizada a amostragem da intensidade de corrente. Neste equipamento, de acordo com o manual fornecido pelo fabricante[114], nas técnicas voltamétricas por impulsos como a voltametria diferencial e normal por impulsos e a voltametria de onda quadrada, quando o tempo de impulso é mais longo que 40ms, a amostragem da intensidade de corrente é feita através da integração da intensidade de corrente nos últimos 20ms de aplicação do impulso; se o tempo de impulso for menor que 40ms, a integração ocorre durante a última metade do impulso; na voltametria cíclica a amostragem da intensidade de corrente é realizada no último quarto de fracção do impulso.

Utilizou-se um posto de polarografia Metrohm VA 663, constituído por um eléctrodo de mercúrio multimodo, por um eléctrodo auxiliar de carbono vítreo e por um eléctrodo de referência de AgCl/Ag, KCl 3M.

2.2 - ENSAIOS POLAROGRÁFICOS

Estes ensaios tiveram por objectivo demonstrar experimentalmente a influência da adsorção das quinoxalinas nas respostas polarográficas. Para a realização destes ensaios utilizaram-se duas quinoxalinas pertencentes a classes distintas: a 2,3-dimetilquinoxalina (DMQ), pertencente à classe I ; e a 2-hidroxiquinoxalina (2HQ), pertencente à classe II. Fizeram-se ensaios polarográficos utilizando duas técnicas de varrimento de potencial: a polarografia diferencial por impulsos e a polarografia normal por impulsos.

2.2.1 - POLAROGRAFIA DIFERENCIAL POR IMPULSOS

Nestes ensaios procurou-se avaliar a influência do tempo de aplicação do impulso no pico polarográfico da DMQ e da 2HQ. Estes ensaios foram realizados nas seguintes condições experimentais:

- tampão fosfato 0,1M, pH=7 (ensaios com a DMQ) e tampão acetato 0,1M, pH=5 (ensaios com a 2HQ)
-potencial inicial = -200mV e potencial final = -1200mV;
- amplitude de impulso = 50mV (impulso catódico);
- t_{gota} = 1s;
- Incremento de potencial por gota = 6mV.

Na figura 2.1 pode observar-se a evolução do sinal polarográfico com o tempo de aplicação do impulso.

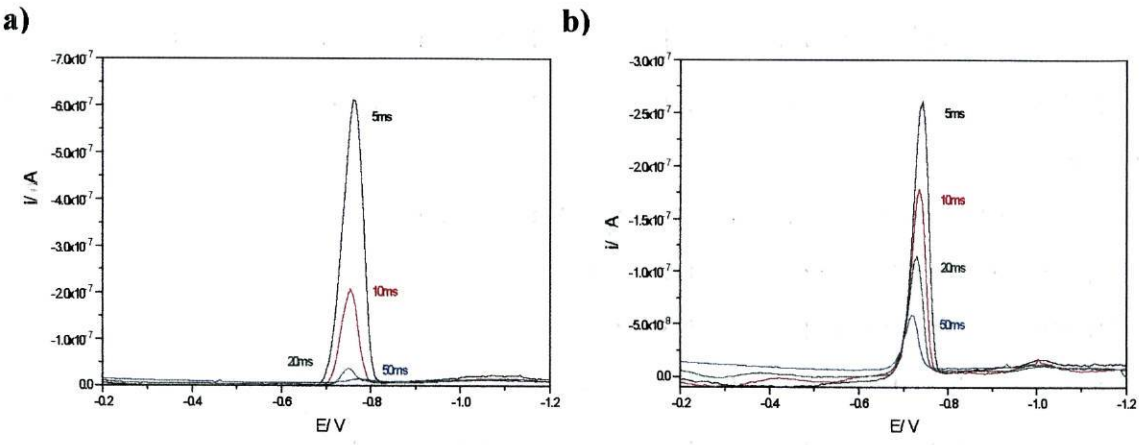


Figura 2.1 - Efeito do tempo de aplicação de impulso nos polarogramas diferenciais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M e da **b)** 2-hidroxiquinoxalina $1x10^{-6}$M.

Conforme se pode observar a altura dos picos polarográficos da DMQ e da 2HQ aumenta consideravelmente quando o tempo de aplicação do impulso diminui. O efeito é, no entanto, muito mais pronunciado para a DMQ do que para a 2HQ; para a DMQ, para tempos de aplicação de impulso mais longos, o sinal polarográfico diminui drasticamente. De realçar que, enquanto o potencial do pico da DMQ se mantém praticamente constante quando varia o tempo de aplicação do impulso, para a 2HQ o potencial do pico desloca-se catodicamente conforme diminui o tempo de aplicação de impulso.

Estes resultados são característicos de uma situação em que existe contribuição da adsorção das quinoxalinas na resposta polarográfica e permitem compreender as diferenças na sensibilidade observada na análise polarográfica quando se utilizam equipamentos de concepção diferente. Contudo a polarografia diferencial por impulsos não é a técnica mais adequada para a verificação dos efeitos de adsorção e, por isso, realizaram-se ensaios semelhantes a estes utilizando a polarografia normal por impulsos.

2.2.2 - POLAROGRAFIA NORMAL POR IMPULSOS

A polarografia normal por impulsos sendo uma técnica mais adequada para caracterizar fenómenos de adsorção, foi utilizada no sentido de evidenciar a importância da adsorção no comportamento polarográfico das quinoxalinas. Realizaram-se, com este objectivo, dois tipos de ensaios:

(a) verificação da influência do tempo de aplicação do impulso;

(b) verificação da influência do tempo de vida da gota.

As condições experimentais utilizadas nestes ensaios foram as seguintes:

- tampão fosfato 0,1M, pH=7 (ensaios com a DMQ) e tampão acetato 0,1M, pH=5 (ensaios com a 2HQ)
-potencial base e inicial = -200mV, potencial final = -1200mV;
- t_{gota} = 1s nos ensaios (a) e variável nos ensaios (b);
- incremento de potencial por gota = 6mV;
- tempo de aplicação de impulso = variável nos ensaios (a) e 5ms nos ensaios (b).

Na figura 2.2 pode observar-se o modo como variam os polarogramas normais por impulsos com o tempo de aplicação do impulso para a DMQ e para a 2HQ. Na figura 2.3 estão representados os polarogramas normais por impulsos obtidos para a DMQ e para a 2HQ para diferentes tempos de vida da gota; nestes últimos ensaios o tamanho da gota foi mantido constante, apesar do tempo de vida da gota ser diferente, através da utilização do eléctrodo gotejante no modo de crescimento controlado (SMDE).

Estes polarogramas normais por impulsos foram obtidos com as mesmas soluções utilizadas nos ensaios anteriores representados na figura 2.1. Nestes polarogramas normais por impulsos a detecção do fenómeno de adsorção é mais evidente que no caso anterior pois a presença de adsorção dá origem ao aparecimento de um pico que se

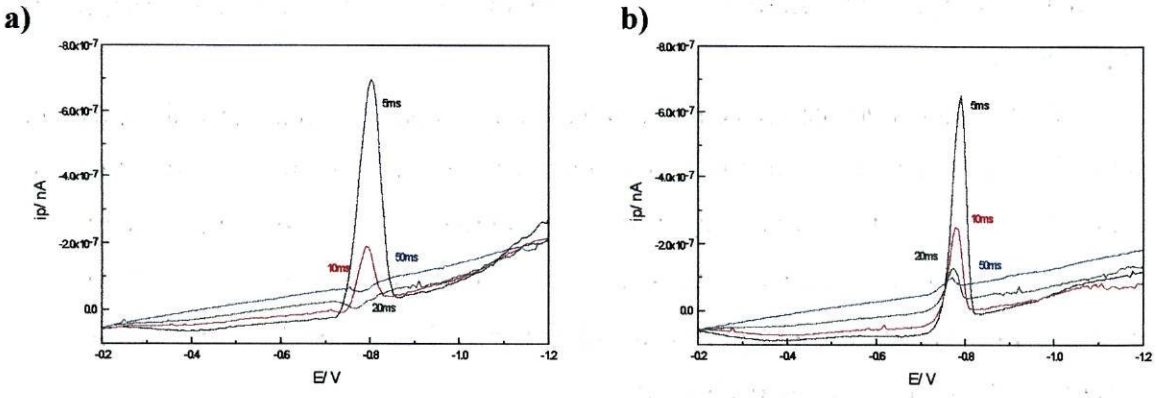


Figura 2.2 - Efeito do tempo de aplicação de impulso nos polarogramas normais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M e da **b)** 2-hidroxiquinoxalina $1x10^{-6}$M.

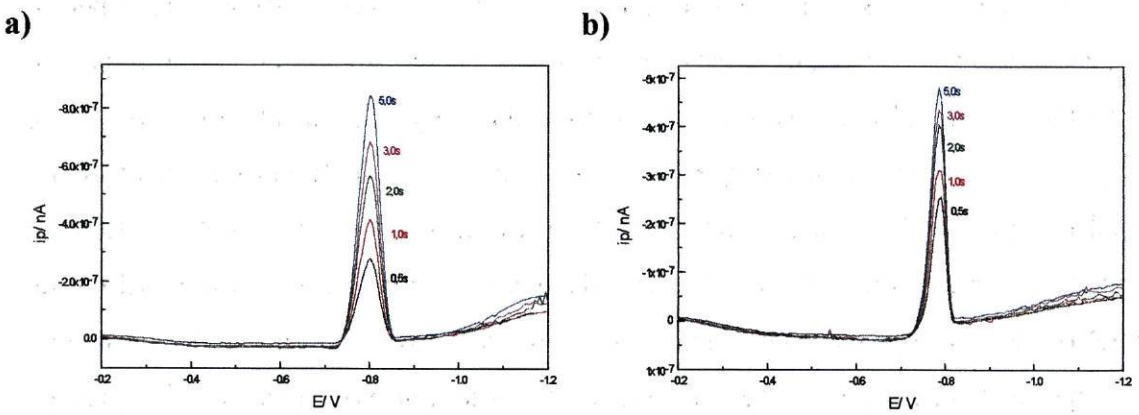


Figura 2.3 - Efeito do tempo gotejamento nos polarogramas normais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M e da **b)** 2-hidroxiquinoxalina $1x10^{-6}$M.
(eléctrodo multimodo na configuração SMDE; tempo de aplicação de impulso de 5ms).

sobrepõe à onda de difusão. Através dos polarogramas normais por impulsos obtidos para a DMQ e para a 2HQ verifica-se que o comportamento desses dois compostos em relação à variação do tempo de aplicação de impulso é distinto. Para a DMQ o pico de adsorção tem uma forma simétrica, verificando-se que o pico cresce de forma exponencial com a diminuição do tempo de aplicação do impulso e que o potencial do pico de adsorção não varia apreciavelmente; para tempos de aplicação de impulso de 20ms e de 50ms, o sinal de adsorção não é detectado. Para a 2HQ o pico de adsorção é ligeiramente assimétrico, verificando-se que o potencial do pico tende a deslocar-se catodicamente e a crescer à medida que se diminui o tempo de aplicação do impulso; para este composto o pico de adsorção é observado para todos os tempos de aplicação

de impulso ensaiados e o crescimento do pico segue uma relação aproximadamente inversamente proporcional ao tempo de aplicação do impulso (directamente proporcional à frequência).

Os resultados dos ensaios em que se variou o tempo de gotejamento demonstram que o fenómeno de adsorção das quinoxalinas na gota de mercúrio é extremamente rápido, ocorrendo em extensão apreciável no curto período de tempo anterior à aplicação do impulso, mesmo com a solução em repouso. Nestes ensaios verifica-se para ambas as quinoxalinas que o aumento do tempo de vida da gota faz aumentar o pico correspondente ao fenómeno de adsorção.

Os resultados obtidos mostram que a adsorção tem uma influência bastante grande na sensibilidade da técnica polarográfica para a análise destas quinoxalinas, particularmente no caso da DMQ. Conforme se verifica através dos comportamentos evidenciados pelas duas quinoxalinas nos ensaios por polarografia normal por impulsos, a contribuição da adsorção na resposta polarográfica depende bastante do intervalo de tempo em que é feita a amostragem da intensidade de corrente após a aplicação do impulso. Para a DMQ quando o intervalo de tempo de aplicação do impulso é de 50ms (que corresponderá à amostragem da intensidade de corrente durante os últimos 20ms do impulso), o sinal é praticamente nulo. Esta situação de diminuição drástica dos picos polarográficos nas técnicas de varrimento de potencial por impulsos foi prevista teoricamente por Lovric[183,184] para as situações em que a velocidade da reacção electroquímica da espécie adsorvida no eléctrodo é muito rápida (processos reversíveis). Para tais processos, em que a espécie reagente adsorve rapidamente no eléctrodo, antes da aplicação do impulso vai ocorrer uma depressão da concentração da espécie reagente na vizinhança do eléctrodo por efeito da adsorção (ver figura 1.1). Esta situação vai ocasionar a diminuição do sinal de difusão devido ao alargamento da camada de difusão por efeito da adsorção e, se a velocidade da reacção electroquímica da espécie reagente no eléctrodo for rápida, pode acontecer que o sinal de adsorção não seja detectado. Os resultados obtidos com a DMQ parecem comprovar experimentalmente a perspectiva de Lovric.

2.3 - ENSAIOS VOLTAMÉTRICOS

Através destes ensaios pretendeu-se demonstrar as características de adsorção das quinoxalinas no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa e explorar algumas das perspectivas analíticas que tal fenómeno propicia. Neste estudo foram utilizadas como exemplos a 2,3-dimetilquinoxalina (DMQ) e a 2-hidroxiquinoxalina (2HQ), as mesmas quinoxalinas que foram utilizadas nos ensaios polarográficos anteriores. Nestes estudos recorreu-se a quatro técnicas electroanalíticas distintas: a voltametria de onda quadrada, a voltametria cíclica, a voltametria normal por impulsos e a cronoamperometria, esta última só para a DMQ.

2.3.1 - ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS COM A 2,3-DIMETILQUINOXALINA (DMQ)

2.3.1.1 - Voltametria normal por impulsos

Tal como para os ensaios polarográficos utilizou-se a voltametria normal por impulsos para avaliar o fenómeno de adsorção da DMQ no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. As condições experimentais utilizadas foram:

- tampão fosfato 0,1M, pH = 7 (ensaios com a DMQ) e tampão acetato 0,1M, pH=5 (ensaios com catião cádmio (II));
- potencial de acumulação, de base e inicial = -200mV e potencial final = -1200mV;
- tempo de acumulação = 30s
- degrau de potencial = 5mV;
- intervalo de tempo entre impulsos (correspondente a t_{gota} nos ensaios polarográficos) =1s;
- intervalo de tempo de aplicação do impulso = variável.

Na figura 2.4 pode observar-se o modo como a amplitude do pico de adsorção varia com o intervalo de tempo de aplicação do impulso. Para comparação apresenta-se o comportamento evidenciado através da mesma técnica voltamétrica por uma solução de catião cádmio (II), como exemplo de um processo controlado por difusão onde não se detecta o fenómeno de adsorção. Nesta figura são claras as diferenças existentes entre um voltamograma normal por impulsos de uma espécie para a qual não se detectam

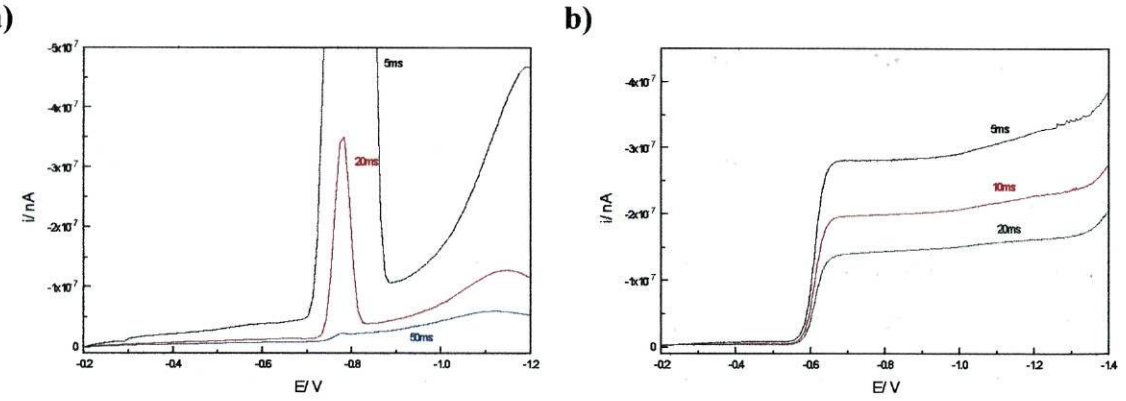


Figura 2.4 - Efeito do tempo de aplicação de impulso nos voltamogramas normais por impulsos da **a)** 2,3-dimetilquinoxalina $1x10^{-6}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 e do **b)** cádmio (II) $1,5x10^{-5}$M em tampão acetato 0,1M, pH=5. (acumulação a -0,2V durante 30s).

sinais de adsorção, neste caso a solução de catião cádmio (II), e um voltamograma normal por impulsos onde é clara a existência de adsorção da espécie reagente, neste caso a solução de DMQ. Note-se, contudo, que para a DMQ, nos ensaios em que o intervalo de aplicação do impulso é de 50ms (o que corresponde a uma integração da intensidade de corrente nos últimos 20ms de aplicação do impulso) o sinal de adsorção deixa de ser detectado. O desaparecimento desse pico de adsorção foi previsto e caracterizado teoricamente por Lovric[184], para sistemas em que quer a espécie reagente quer o produto resultante da redução se encontram confinados ao eléctrodo. Nesta situação, se a reacção electroquímica dos compostos adsorvidos for rápida, quando é feita a amostragem da intensidade de corrente, na fase final da aplicação do impulso, o sinal de adsorção pode já ter decrescido até zero, observando-se apenas o sinal correspondente ao fenómeno de difusão. Apesar dos trabalhos de Lovric caracterizarem perfeitamente a situação experimental de desaparecimento de picos voltamétricos em técnicas por impulsos, não têm surgido na literatura muitos exemplos ilustrando esta teoria. Recentemente Fogg e colaboradores[185] aperceberam-se da ausência de picos voltamétricos na determinação de corantes reactivos antraquinónicos, utilizando a voltametria com adsorção com varrimento de potencial diferencial por impulsos, tendo justificado essa ausência com base na teoria de Lovric.

Estes resultados permitem compreender a razão de não se ter obtido aumento da amplitude do pico para a DMQ, quando se realizaram os ensaios voltamétricos em que se promoveu deliberadamente a adsorção do composto do modo habitualmente utilizado

na voltametria com adsorção[176], no equipamento Metrohm VA Processor 646; neste equipamento quando a amostragem da intensidade de corrente é realizada após a aplicação do impulso, já a componente de adsorção é muito pequena.

2.3.1.2 - Voltametria cíclica

A voltametria cíclica foi utilizada no âmbito destes estudos no sentido de caracterizar a reversibilidade do processo de eléctrodo da DMQ. Através destes ensaios pretendeu-se demonstrar que ambas as formas da DMQ permaneciam adsorvidas no eléctrodo após a reacção de transferência electrónica.

Começou-se por fazer o traçado de vários voltamogramas cíclicos de uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M variando a velocidade do varrimento. As condições experimentais utilizadas nestas experiências foram as seguintes:

- tampão fosfato 0,1M, pH = 7 (1°conjunto de voltamogramas); tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH = 7 (2°conjunto de voltamogramas)
- variação de potencial entre -500mV e -1000mV (3 ciclos consecutivos);
- acumulação a -500mV durante 30s;
- degrau de potencial = 2mV;
- velocidade de varrimento = variável.

De seguida procedeu-se à avaliação da influência do potencial de acumulação no processo de adsorção. Para a realização deste estudo fez-se o traçado de vários voltamogramas em que se variou o potencial de acumulação (potencial de início de voltamograma). Estes ensaios foram realizados em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7; as restantes condições experimentais utilizadas foram idênticas às dos ensaios anteriores, com excepção das seguintes:

- velocidade de varrimento = 1V/s;
- potencial de acumulação = variável;
- tempo de acumulação = 30s.

Os extremos do varrimento cíclico foram mantidos a -500mV e -1000mV. Nos vários ensaios, o potencial de acumulação que era, também, o potencial inicial foi variado de -500mV até -1000mV em incrementos de 100mV. Nos ensaios em que o potencial inicial não correspondeu a um extremo o varrimento cíclico foi completado fazendo o

varrimento no sentido catódico (1° conjunto de voltamogramas) e no sentido anódico (2°conjunto de voltamogramas), por forma a completar 3 ciclos completos.

Na figura 2.5 pode observar-se os voltamogramas cíclicos obtidos nos ensaios em que se variou a velocidade do varrimento do potencial. Na figura 2.6 pode observar-se os voltamogramas cíclicos obtidos nos ensaios em que se variou o potencial de acumulação.

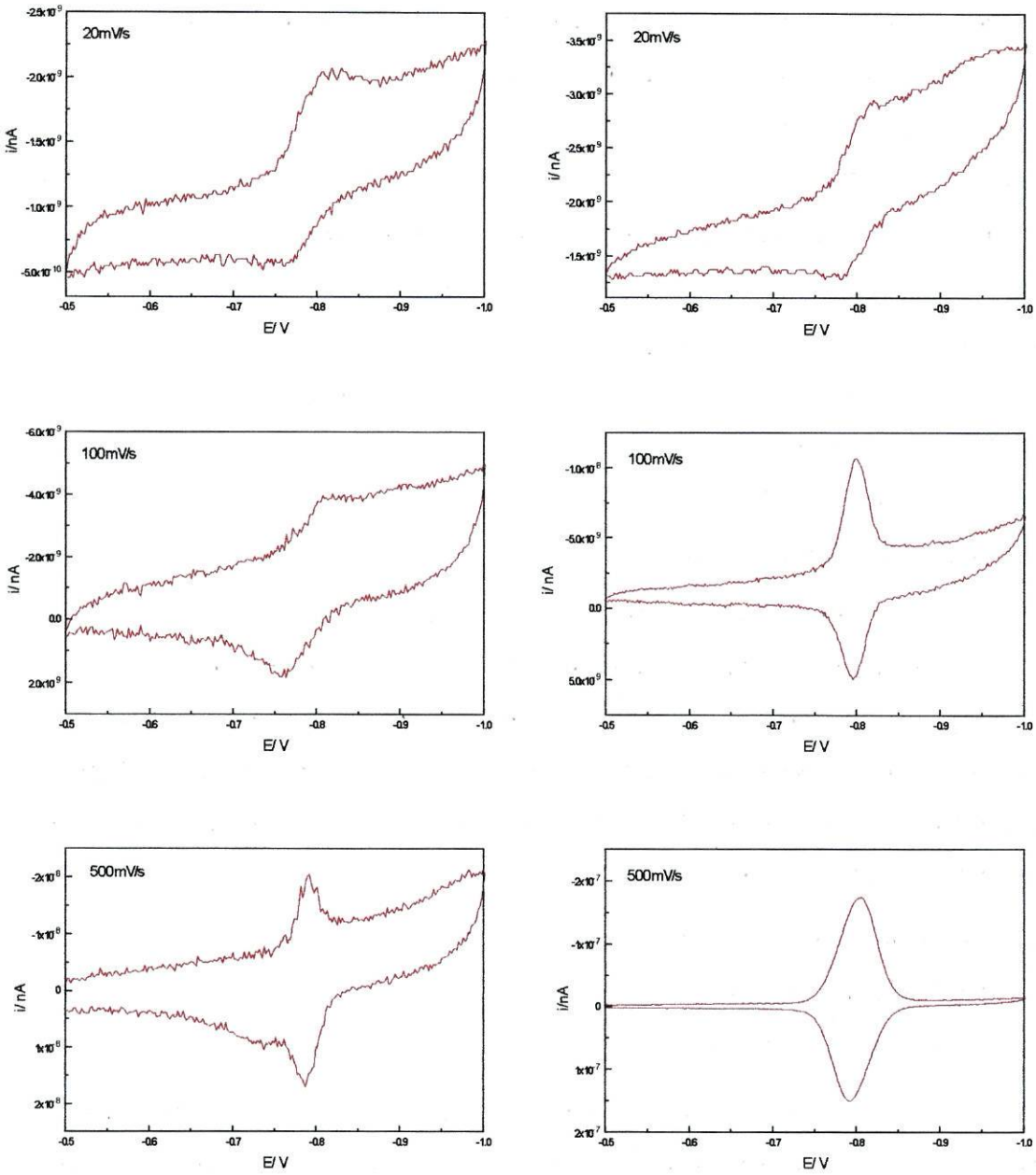


Figura 2.5 - Continua (legenda na página seguinte)

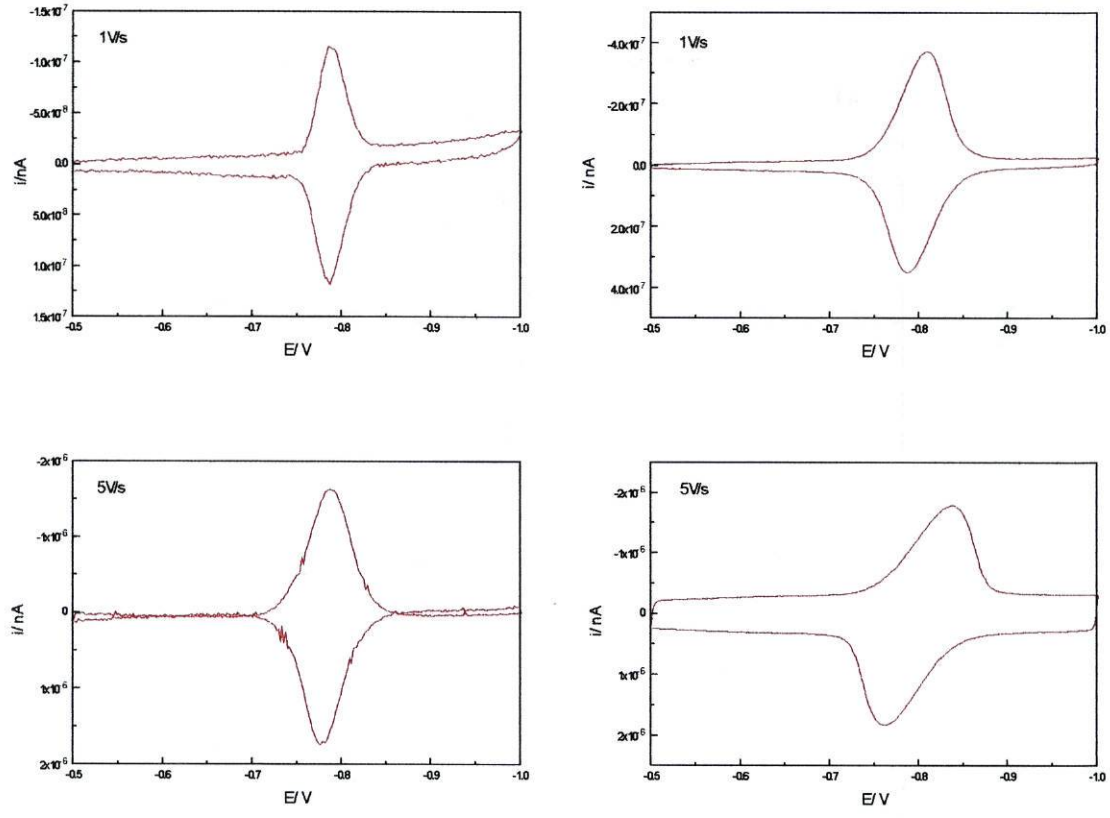


Figura 2.5 - Voltamogramas cíclicos da 2,3-dimetilquinoxalina $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 (à esquerda) e em tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7 (à direita) para diferentes velocidades de varrimento.
(O voltamograma representado corresponde ao terceiro de três ciclos consecutivos).

Estes ensaios mostram que a redução electroquímica da DMQ no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa é bastante rápida e é reversível sob o ponto de vista químico, dentro da gama de velocidades de varrimento que foram ensaiadas. Note-se, contudo, que no voltamograma realizado com a velocidade de varrimento de 5V/s em meio tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7, se denota alguma assimetria nos picos obtidos e um afastamento no potencial dos picos catódico e anódico.

Um dos aspectos mais inesperados observados nestes voltamogramas é o facto de aparentemente não existir uma contribuição importante da intensidade de corrente capacitiva na intensidade de corrente medida, mesmo para velocidades de varrimento elevadas. Esta situação experimental pode ser explicada pelo modo como é implementada a voltametria cíclica no sistema de controlo voltamétrico utilizado. Neste

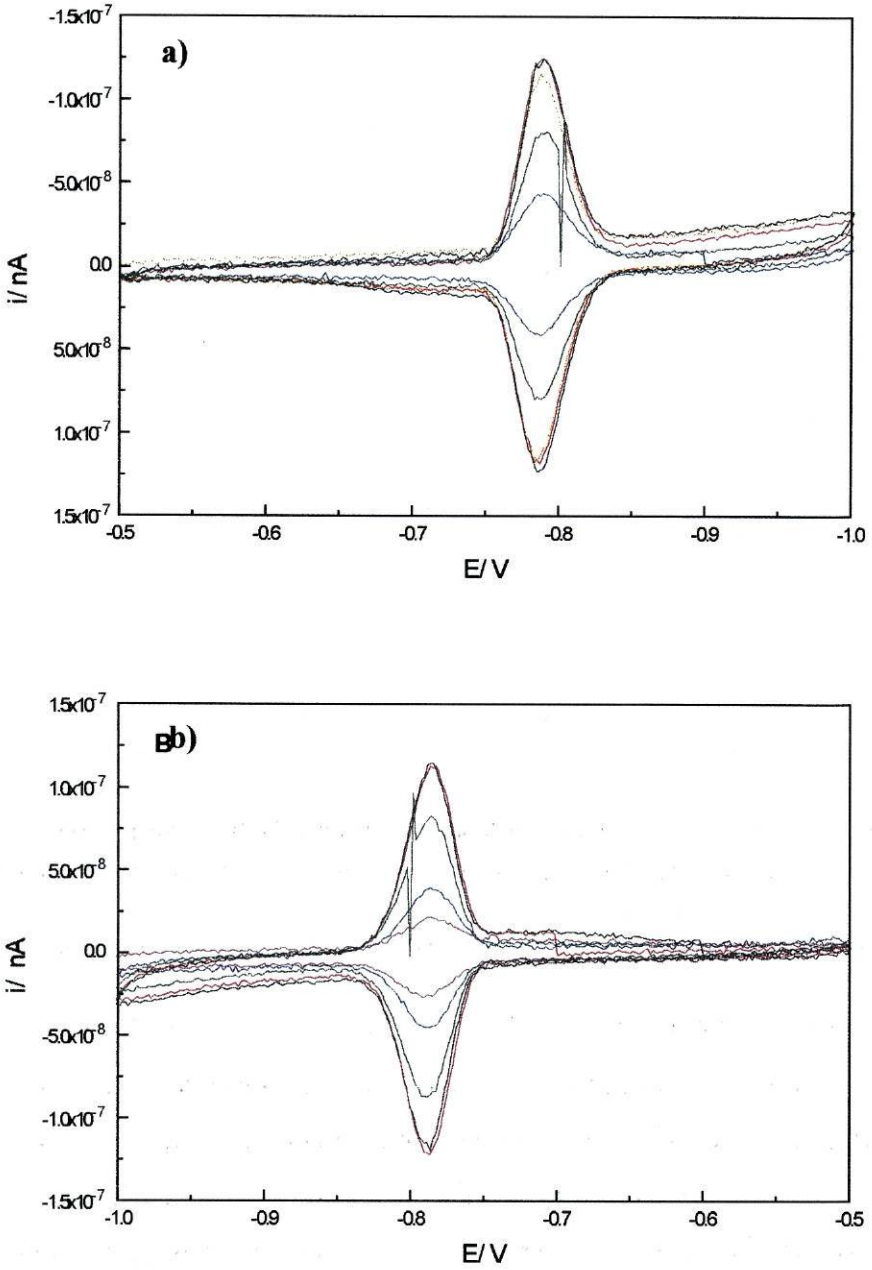


Figura 2.6 - Voltamogramas cíclicos da DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 para diferentes potenciais de acumulação e de início de varrimento de potencial: (——) -500mV; (——) -600mV; (——) -700mV; (——) -800mV; (——) -900mV; (——) -1000mV.

a)- Varrimento inicial no sentido catódico: 1) $E_{acumulação}$ até -1000mV; 2) -1000mV até -500mV; -500mV até $E_{acumulação}$.

b)- Varrimento inicial no sentido anódico: 1) $E_{acumulação}$ até -500mV; 2) -500mV até -1000mV; -1000mV até $E_{acumulação}$.

(O voltamograma representado corresponde ao terceiro de três ciclos consecutivos).

sistema o varrimento de potencial é realizado em escada, através da aplicação de impulsos, ocorrendo a amostragem da intensidade de corrente no último quarto de fracção do impulso[114]. Desta forma pode ocorrer o decréscimo rápido da intensidade de corrente capacitiva logo após a aplicação do impulso, de tal forma que quando a amostragem da intensidade de corrente é realizada a sua contribuição para a intensidade de corrente total é diminuta. É esta a razão, aliás, que pode igualmente explicar o desaparecimento do sinal de adsorção da DMQ quando a velocidade de varrimento é lenta. Conforme se observa na figura 2.5, para velocidades de varrimento menores, só surge a intensidade de corrente correspondente à difusão da espécie, obtendo-se um sinal característico de um processo controlado por difusão. Quando se utiliza a solução de tampão fosfato menos concentrada, o que equivale a dizer que a solução tem maior resistência, observa-se que o pico de adsorção da DMQ é detectado para as velocidades de varrimento mais baixas e que a influência da intensidade de corrente capacitiva na intensidade de corrente medida surge a velocidades de varrimento menores.

Relativamente aos ensaios em que se variou o potencial de acumulação, verifica-se que a DMQ adsorve quer o potencial de acumulação seja anódico ou catódico em relação ao potencial do seu pico de redução. Contudo, o pico torna-se menor para potenciais de acumulação muito catódicos, o que pode corresponder a uma diminuição da capacidade de adsorção da DMQ no eléctrodo de mercúrio para esses potenciais muito catódicos, provavelmente resultante do aumento da carga superficial no eléctrodo. Em geral os compostos orgânicos adsorvem mais fortemente na zona de potencial de carga zero do eléctrodo, se as forças responsáveis pelo fenómeno forem de natureza hidrofóbica. Porém, em certos casos a adsorção pode implicar o estabelecimento de interacções mais fortes, através da partilha de electrões π ou de electrões não compartilhados por parte dos compostos orgânicos, com os átomos do metal constituinte do eléctrodo. Esta situação é bastante frequente quando o composto orgânico contém átomos de azoto e tem como consequência que a espécie pode permanecer adsorvida mesmo quando a carga superficial do eléctrodo é elevada[99,186].

2.3.1.3 - Cronoamperometria

Os ensaios cronoamperométricos com as soluções de DMQ foram realizados com o objectivo de caracterizar o decaimento da intensidade de corrente após a aplicação de um impulso de potencial. Nestes ensaios fez-se o traçado de curvas cronoamperométricas de uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M e da solução utilizada como electrólito de suporte (branco). As condições experimentais utilizadas foram as seguintes:

- potencial de acumulação e de base = -500mV;
- de tempo de acumulação = 30s;
- periodicidade de amostragem da intensidade de corrente =100μs;
- potencial após impulso = variável.

Na figura 2.7 encontram-se registados os cronoamperogramas obtidos com soluções tampão fosfato, 0,1M e $4x10^{-3}$M, com pH=7, na ausência de DMQ (brancos). Na figura 2.8 encontram-se os cronoamperogramas obtidos nas mesmas soluções tampão na presença de $5x10^{-7}$M de DMQ.

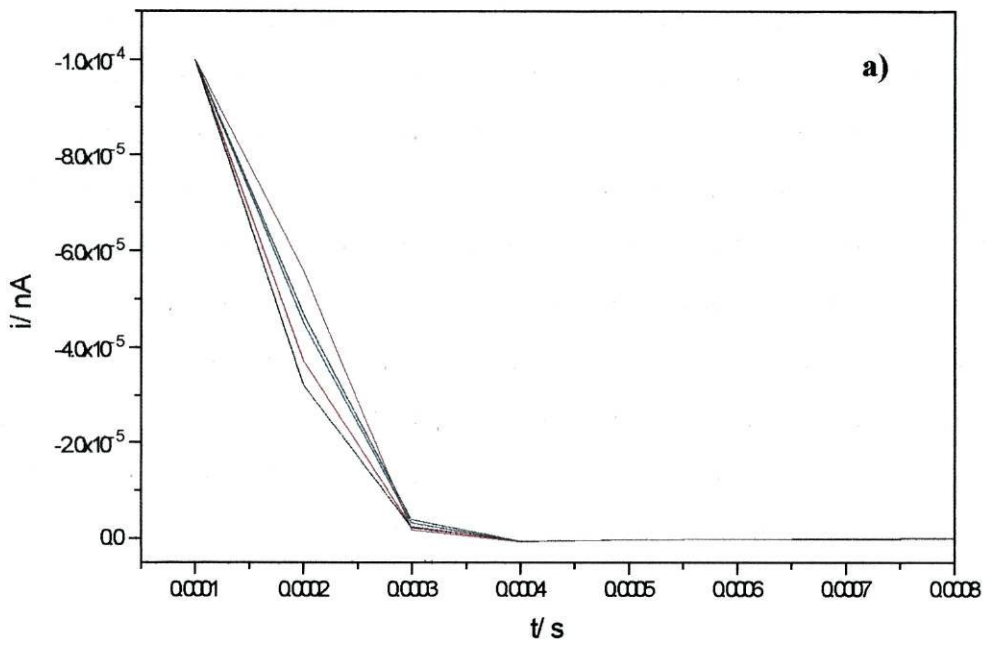


Figura 2.7 - Continua (legenda na página seguinte).

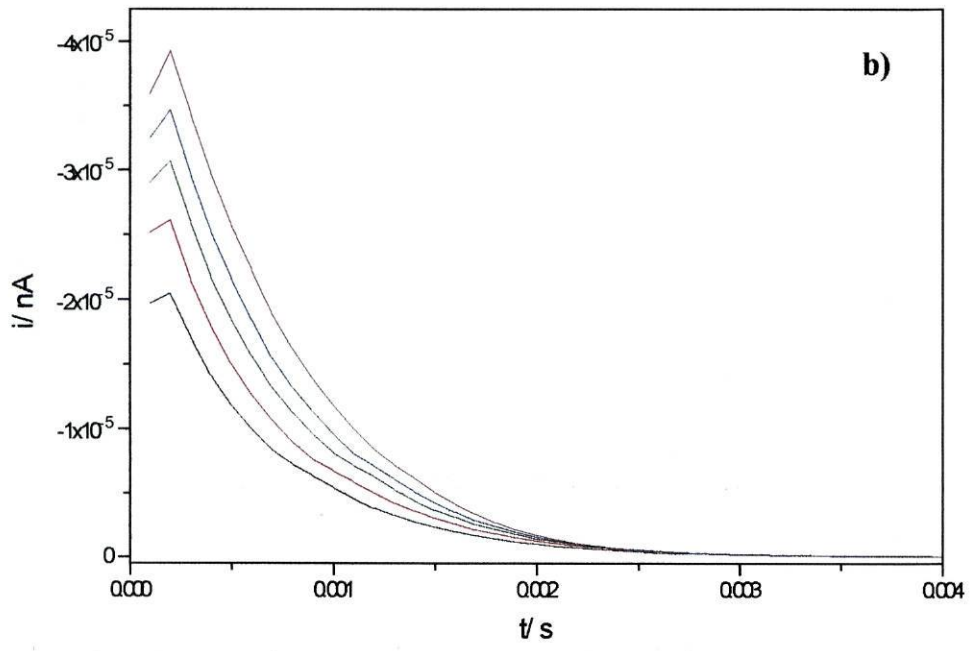


Figura 2.7 - Cronoamperogramas obtidos no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa com a solução: **a)**- tampão fosfato 0,1M, pH=7; **b)**- tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7. Impulsos de potencial desde -500mV até: (—) -700mV; (—) -750mV; (—) -800mV; (—) -850mV; (—) -900mV.

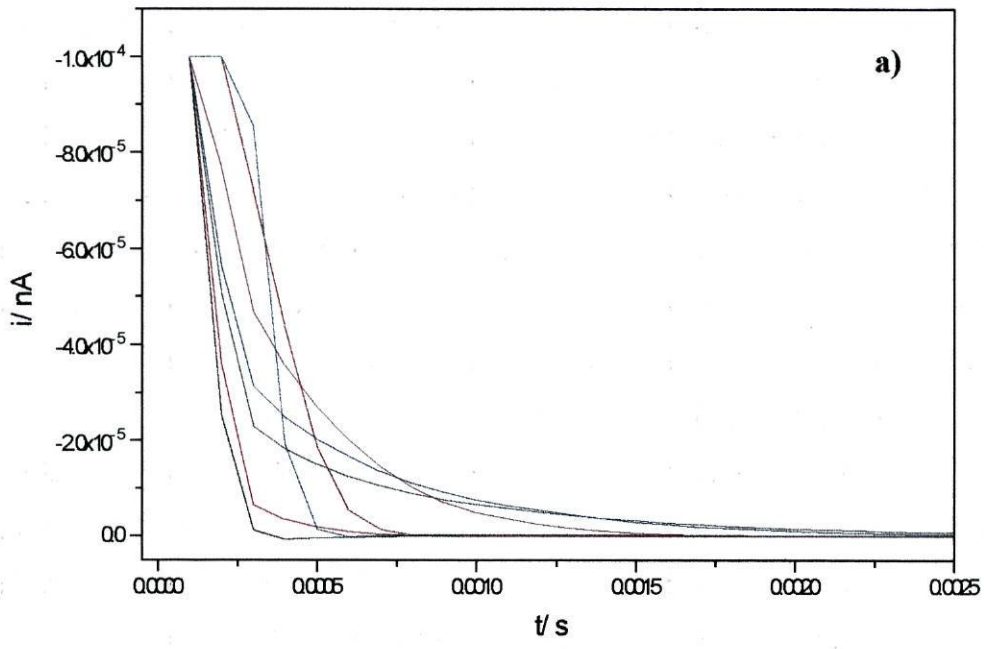


Figura 2.8 - Continua (legenda na página seguinte).

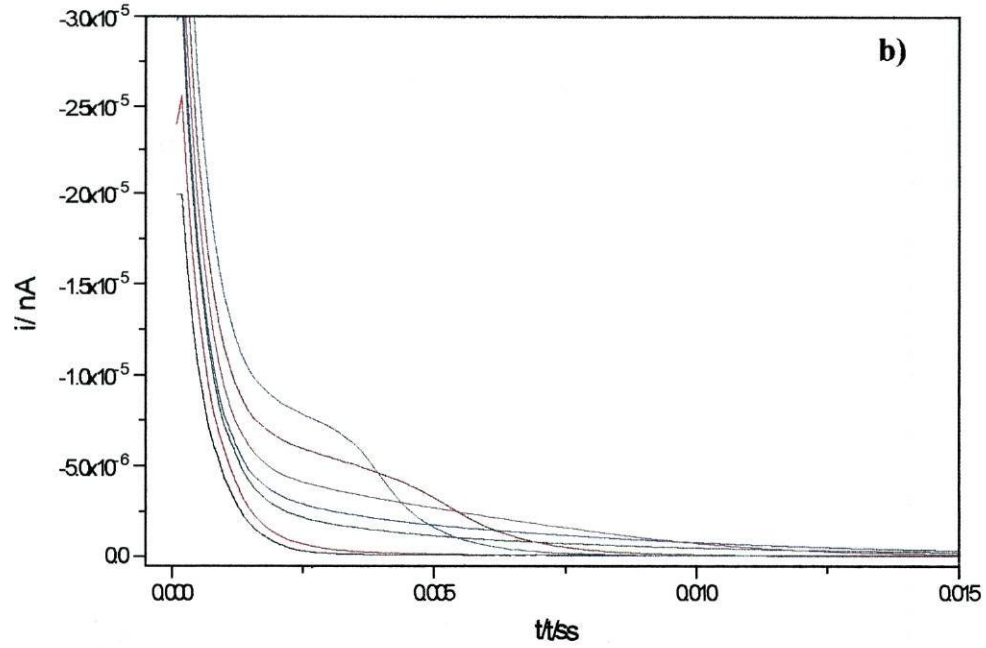


Figura 2.8 - Cronoamperogramas obtidos no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa com DMQ $5x10^{-7}$M em solução: **a)**- tampão fosfato 0,1M, pH=7; **b)**- tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7. Impulsos de potencial desde -500mV até: (—) -700mV; (—) -750mV; (—) -800mV; (—) -820mV; (—) -850mV; (—) -900mV (—) -950mV.

Como se pode observar na figura 2.7, o decréscimo da intensidade de corrente capacitiva no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, após a aplicação do impulso, é bastante rápido. Com base nestes cronoamperogramas pode estimar-se que esse decréscimo ocorre em cerca de 2ms para a solução tampão fosfato $4x10^{-3}$M, pH=7, e em cerca de 0,6ms para a mesma solução com concentração 0,1M. De salientar que os impulsos que são aplicados nestes ensaios têm uma amplitude bastante maior do que aqueles que são aplicados na voltametria cíclica em escada ou mesmo na voltametria de onda quadrada, pelo que será de esperar que nessas técnicas o decréscimo da intensidade de corrente capacitiva ocorra ainda mais rapidamente.

Os cronoamperogramas obtidos com a solução de DMQ revelam a razão pela qual o sinal de adsorção pode não ser detectado nas técnicas por impulsos. Conforme se observa, o decréscimo da intensidade de corrente devida à redução da DMQ adsorvida é bastante rápido, mesmo quando o potencial final do impulso se localiza na vizinhança do potencial do pico da DMQ obtido por voltametria cíclica (cerca de -800mV). Desta forma, verifica-se que é possível definir uma janela de tempo, em que é possível medir a intensidade de corrente correspondente à reacção electroquímica da espécie reagente

adsorvida sem apreciável interferência da intensidade de corrente capacitiva. Contudo, o instante de amostragem da intensidade de corrente, após o início do impulso, tem de ser criteriosamente escolhido, para que a intensidade de corrente de adsorção não tenha igualmente decrescido até zero. Em princípio esta janela de tempo vai depender do sobrepotencial, uma vez que a partir do potencial do pico (obtido por voltametria cíclica) se verifica que quanto maior o sobrepotencial mais rápido é o decréscimo da intensidade de corrente de adsorção. Este facto permite, por exemplo, justificar o desaparecimento do pico de adsorção da DMQ que ocorre nos ensaios por voltametria normal por impulsos para potenciais muito catódicos.

Estes ensaios demonstram igualmente que a concentração do tampão, para além de influenciar o decréscimo da intensidade de corrente capacitiva, influencia também o decréscimo da intensidade de corrente de adsorção, modificando a janela de tempo onde é possível medir a intensidade de corrente de adsorção sem interferência da componente capacitiva. Este aspecto tem reflexos importantes a nível experimental pois constitui uma forma simples de aumentar a sensibilidade de uma determinação através da simples variação da concentração do electrólito, quando se está a operar com equipamentos de electroanálise que não permitam a alteração dos parâmetros da amostragem da intensidade de corrente.

2.3.1.4 - Voltametria de onda quadrada

Das quatro técnicas electroanalíticas utilizadas neste estudo, a voltametria de onda quadrada é a técnica com maiores potencialidades em termos analíticos. Por isso não surpreende que os trabalhos dos grupos de Lovric e de J. Osteryoung, referidos atrás, tenham incidido principalmente sobre esta técnica. A DMQ, como se verificou através dos ensaios realizados por voltametria cíclica, tem características de adsorção que a enquadram na situação de uma espécie quasi-reversível em que, quer a espécie reagente, quer o produto da sua redução electroquímica se mantêm confinados no eléctrodo; por isso é um composto indicado para testar os estudos teóricos nesta área realizados por esses dois grupos.

Os parâmetros experimentais que podem ser controlados pelo operador numa experiência por voltametria de onda quadrada são:

- frequência de onda quadrada;

- amplitude de impulso;
- degrau de potencial.

Para além destes parâmetros característicos desta técnica existem, igualmente, os parâmetros habituais das técnicas de varrimento de potencial e da voltametria com adsorção:

- potencial inicial e final;
- potencial de acumulação e tempo de acumulação.

Nestes ensaios começou-se por estudar a influência dos três parâmetros característicos da voltametria de onda quadrada. Estudou-se, depois, a influência do tempo de acumulação e, por fim, procedeu-se ao estudo do efeito da adição de um tensioactivo (o cloreto de tetrafenilfosfónio) e do efeito da concentração do electrólito de suporte, realçando a importância em termos analíticos destes dois últimos factores experimentais.

2.3.1.4.1 - Efeito da frequência

Nestes ensaios variou-se a frequência de onda quadrada entre 10Hz e 2000Hz. A variação do pico voltamétrico com a frequência para uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, pode ser observada na figura 2.9.

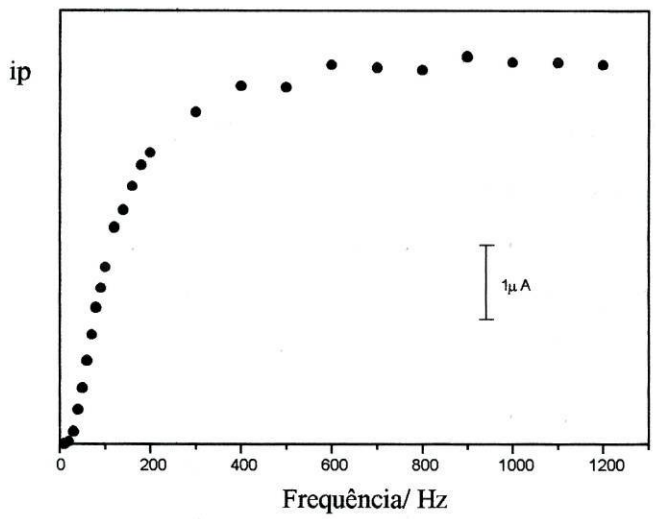


Figura 2.9 - Variação da amplitude do pico de onda quadrada da DMQ $5x10^{-7}$M em função da frequência em tampão fosfato 0,1M, pH=7. Acumulação a -200mV durante 30s; amplitude de onda quadrada= 20mV; degrau de potencial= 2mV.

Na tabela 2.1 encontram-se registados os valores de intensidade de corrente do pico (ip), de potencial do pico (Ep) e de largura a meia altura do pico (b½) que foram obtidos para as diferentes frequências. Indicam-se, também, os valores de intensidade de corrente obtidos em dois valores de potencial afastados do pico correspondente à DMQ, localizadas na linha de base, situando-se um deles num potencial anódico (-650mV) e outro num potencial catódico (-900mV) relativamente ao pico da DMQ. Tal como se pode verificar pelos valores das duas últimas colunas, a intensidade de corrente capacitiva influencia as medições electroquímicas somente para as frequências mais elevadas. Por essa razão, embora a intensidade de corrente do pico aumente até cerca de 1000Hz, é mais adequado fazer as determinações analíticas a frequência mais baixa uma vez que a linha de base para as frequências mais baixas é muito inferior.

Tal como foi previsto teoricamente por Lovric, a intensidade de corrente do pico de adsorção aumenta muito com a frequência de onda quadrada e tende a atingir um máximo, a que Lovric chamou "máximo quasi-reversível", após o qual se verifica um ligeiro decréscimo do pico voltamétrico. Na figura 2.10 representam-se as componentes de intensidade de corrente medidas nos impulsos catódicos (i_c) e nos impulsos anódicos (i_a) e o respectivo voltamograma resultante obtido por voltametria de onda quadrada. Nesta figura é possível verificar a existência do sinal correspondente à redução da DMQ e o sinal correspondente à reoxidação do composto nos impulsos anódicos, de tal forma que durante o varrimento de potencial em onda quadrada ocorrem sucessivas reduções e reoxidações da espécie adsorvida na zona do potencial do pico, contribuindo as intensidades de corrente medidas em ambos os impulsos para o sinal total. Verifica-se, também, que a contribuição dessas duas componentes para o sinal total é quase idêntica para as frequências mais baixas; para as frequências mais elevadas, a contribuição do pico anódico tende a diminuir e o sinal total tende a alargar, embora não se registem variações apreciáveis no potencial de pico.

Tabela 2.1 - Valores de ip, Ep e b½ obtidos por voltametria de onda quadrada a diferentes frequências para uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M. Valores de intensidade de corrente da linha de base a -650mV e -900mV. (solução tampão fosfato 0,1M, pH=7; acumulação a -200mV durante 30s, degrau de potencial = 2mV; amplitude de impulso = 20mV).

frequência / Hz	ip / nA	Ep / mV	b½ / mV	i/ nA	
				-650mV	-900mV
10	3,3	-772	56	-1	-2,7
20	28,2	-782	56	-1,6	-4
30	155	-792	52	-2	-5
40	426	-770	46	-2	-6
50	699	-770	46	-2	-7
60	1046	-770	44	-3	-10
70	1382	-770	44	-3	-8,4
80	1728	-768	44	-3	-9,1
90	1978	-768	48	-3,5	-11
100	2244	-768	48	-4,3	-11
120	2747	-768	50	-4,9	-13
140	2970	-768	54	-6,4	-14
160	3266	-768	54	-7,4	-15
180	3536	-768	56	-6,1	-17
200	3694	-768	58	-2,8	-16
300	4218	-766	63	-6,2	-22
400	4547	-766	69	-12	-30
500	4533	-766	73	-13	-31
600	4822	-766	73	-8	-30
700	4784	-766	77	+12	-10
800	4755	-768	77	+3,2	+21
900	4924	-768	81	+19	+72
1000	4856	-770	81	-150	+92
1100	4847	-768	81	-383	+49
1200	4820	-772	81	-800	-180
1300	4828	-776	83	-1600	-600
1400	5095	-778	85	-3040	-1600
1500	4432	-778	77	-3500	-2050
1600	4558	-776	81	-2500	-1050
1700	4518	-774	81	-3800	-1800
1800	4216	-780	77	-5100	-2900
1900	4239	-786	75	-6600	-4100
2000	4101	-776	65	-9100	-4900

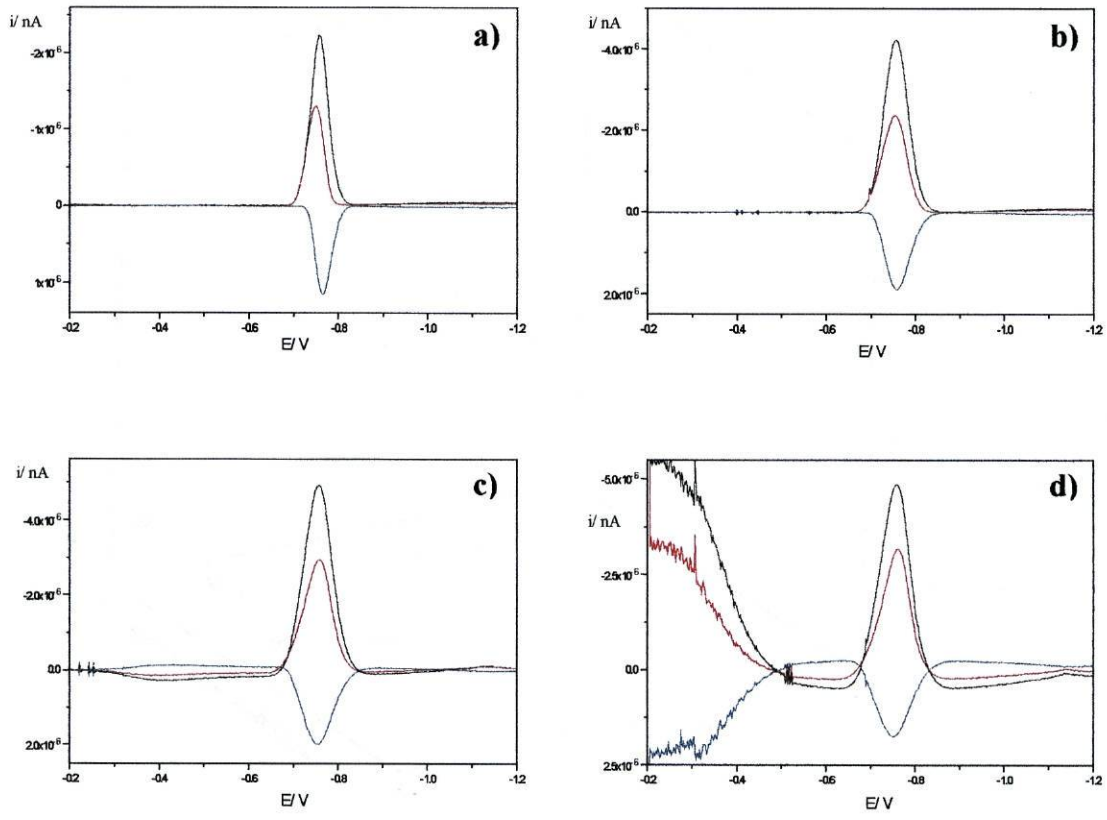


Figura 2.10 - Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7, obtidos por voltametria de onda quadrada (—) e respectivas componentes catódicas (—) e anódicas (—) da intensidade de corrente medida nos impulsos catódicos e anódicos. Frequência de onda quadrada: **a)**- 100Hz; **b)**- 400Hz; **c)**- 800Hz; **d)**- 1200Hz. (degrau de potencial= 2mV; acumulação a -200mV durante 30s; amplitude de onda quadrada= 20mV).

2.3.1.4.2 - Efeito da amplitude do impulso

Nestes ensaios obteve-se voltamogramas de uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M para vários valores de amplitude de impulso. Os voltamogramas obtidos podem ser observados na figura 2.11. Através desses voltamogramas verifica-se que o aumento da amplitude de onda quadrada faz aumentar o pico voltamétrico. Contudo, se o valor de amplitude for muito elevado, pode ocorrer o alargamento e até o desdobramento dos picos, verificando-se que o pico correspondente à intensidade de corrente medida nos impulsos anódicos surge a potenciais mais catódicos que o pico correspondente à intensidade de corrente medida nos impulsos catódicos; naturalmente que tal facto é o

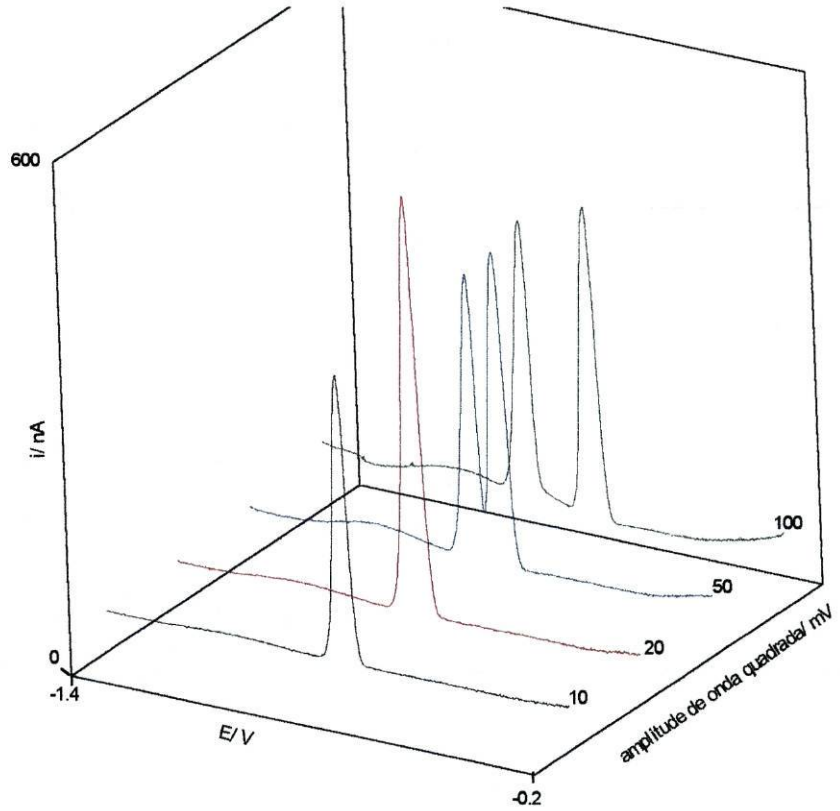


Figura 2.11 - Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 para diferentes amplitudes de onda quadrada.
(Frequência= 100Hz, degrau de potencial= 2mV, sem acumulação).

resultado do modo como são combinadas essas duas componentes na voltametria de onda quadrada e do modo como é definido o potencial de base ao longo do varrimento, conforme se mostra na figura 2.12. No ensaio em que se utilizou uma amplitude de impulso de 250mV (que não se encontra representado) verificou-se a distorção do sinal correspondente ao impulso anódico, que surgiu sob a forma de uma banda e não de um pico. Tal verificação poderá ser o reflexo da dessorção do produto da redução da DMQ para potenciais muito catódicos, tal como se verificou nos ensaios por voltametria cíclica.

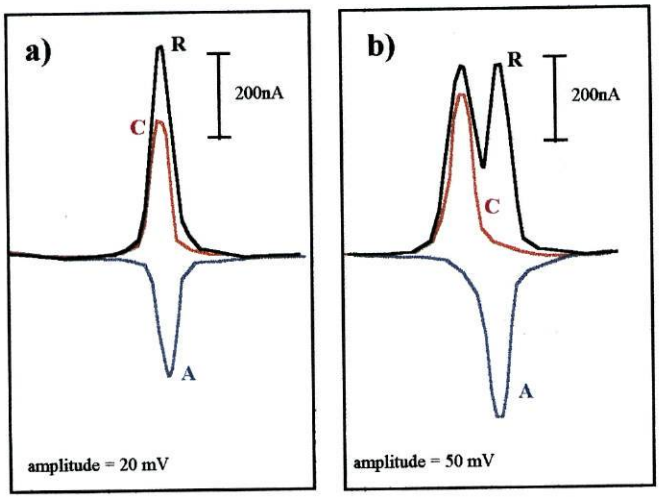


Figura 2.12 - Voltamogramas de DMQ 5x10-7M em tampão fosfato 0,1M, pH=7, obtidos por voltametria de onda quadrada (—) e respectivas componentes catódicas (—) e anódicas (—) da intensidade de corrente medida nos impulsos catódicos e anódicos. Amplitude de onda quadrada: **a)**- 20mV; **b)**- 50mV.
(Frequência= 100Hz, degrau de potencial= 2mV, sem acumulação).

2.3.1.4.3 - Efeito do degrau de potencial

Nestes ensaios registaram-se vários voltamogramas de uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M variando o degrau de potencial. Os voltamogramas obtidos estão representados na figura 2.13. Conforme se pode observar, o aumento do degrau de potencial não afecta apreciavelmente a amplitude do pico obtido, nem a sua forma. Como o degrau de potencial define o número de pontos experimentais obtidos num dado varrimento de potencial, então quanto maior for esse valor, menos pontos serão experimentalmente medidos para definir o voltamograma e menor será o tempo necessário para obter o voltamograma completo. O facto da amplitude do pico não depender do salto de potencial é, muito provavelmente, o reflexo de se atingir uma situação de quasi-equilíbrio ou mesmo equilíbrio no fim da aplicação do impulso, o que ocasiona que para cada potencial a composição superficial das espécies adsorvidas na gota só dependem desse potencial e não do modo como variou o potencial nos impulsos anteriores. Desta forma como a variação de potencial resultante do degrau de potencial é muito inferior à amplitude dos impulsos impostos - que no caso dos impulsos catódicos corresponderá ao dobro da amplitude de impulso de onda quadrada fixado e no caso dos impulsos anódicos corresponderá ao mesmo valor menos o degrau de potencial fixado -, a

amplitude do pico de adsorção obtido não será grandemente afectada pela variação do degrau de potencial.

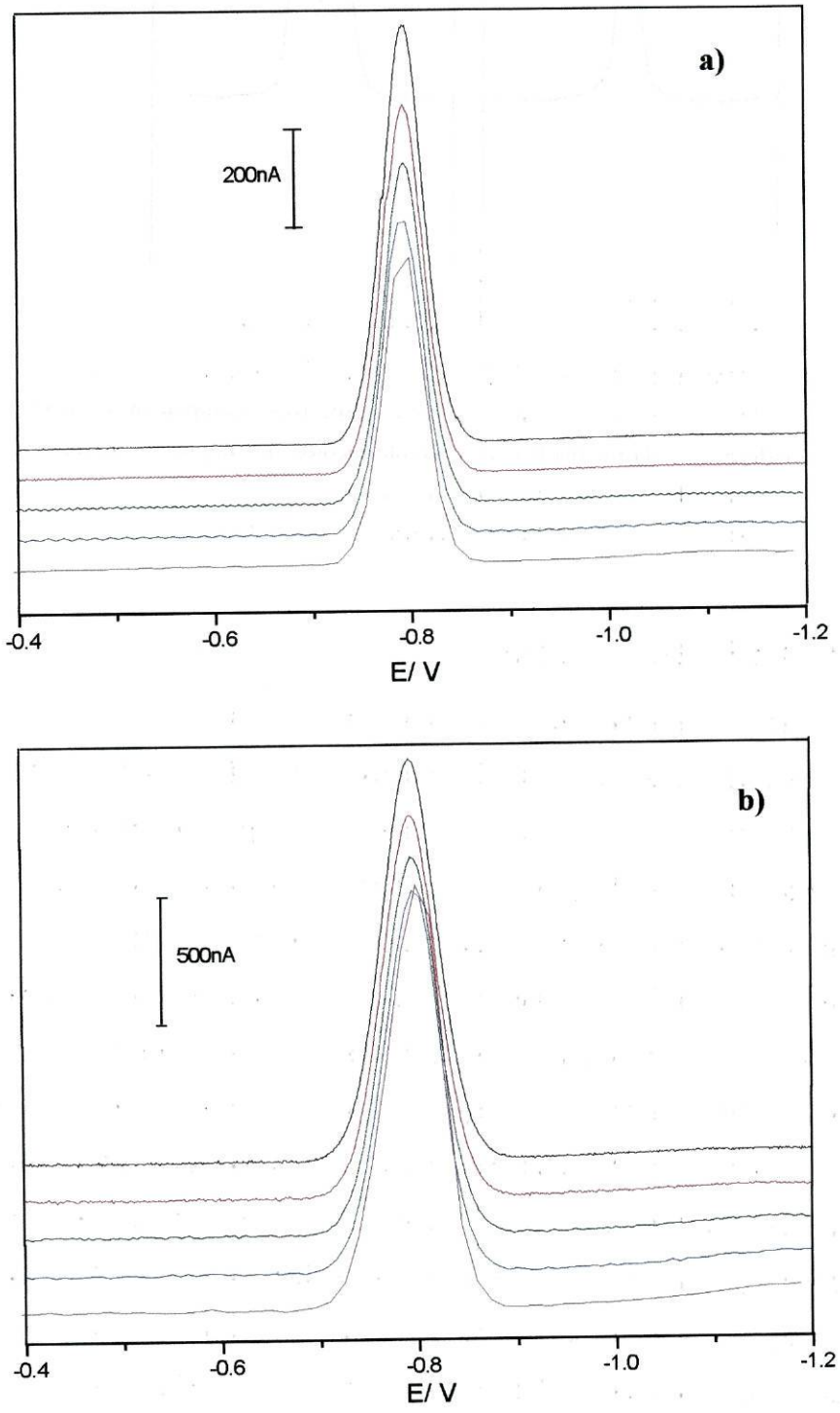


Figura 2.13 - Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M em tampão fosfato 0,1M, pH=7 para diferentes valores de degrau de potencial. **a)**- 100Hz e **b)**- 400Hz.
Degrau de potencial: (—) 1mV; (—) 2mV; (—) 4mV; (—) 8mV; (—) 15mV.
(sem acumulação, amplitude de onda quadrada= 20mV).

2.3.1.4.4 - Efeito do tempo de acumulação

Nestes ensaios fez-se o traçado de vários voltamogramas em que se variou o tempo de acumulação. A evolução da altura dos picos com o tempo de acumulação pode ser observada através do gráfico apresentado na figura 2.14.

A evolução da amplitude do pico com o tempo de acumulação não é a mais comum. Em geral, nos processos envolvendo adsorção o comportamento mais habitual traduz-se na existência de uma proporcionalidade directa entre a amplitude do pico e a raiz quadrada do tempo de acumulação[177]. Contudo, em certas situações, pode ocorrer ao fim de algum tempo o denominado efeito de auto-inibição, que se admite resultar da estabilização das moléculas que se encontram adsorvidas[99] e que tem como resultado o abaixamento da amplitude do pico de adsorção. Atendendo ao comportamento observado, este efeito poderá ser a razão para o abaixamento de sinal que se verificou para os períodos de acumulação mais longos.

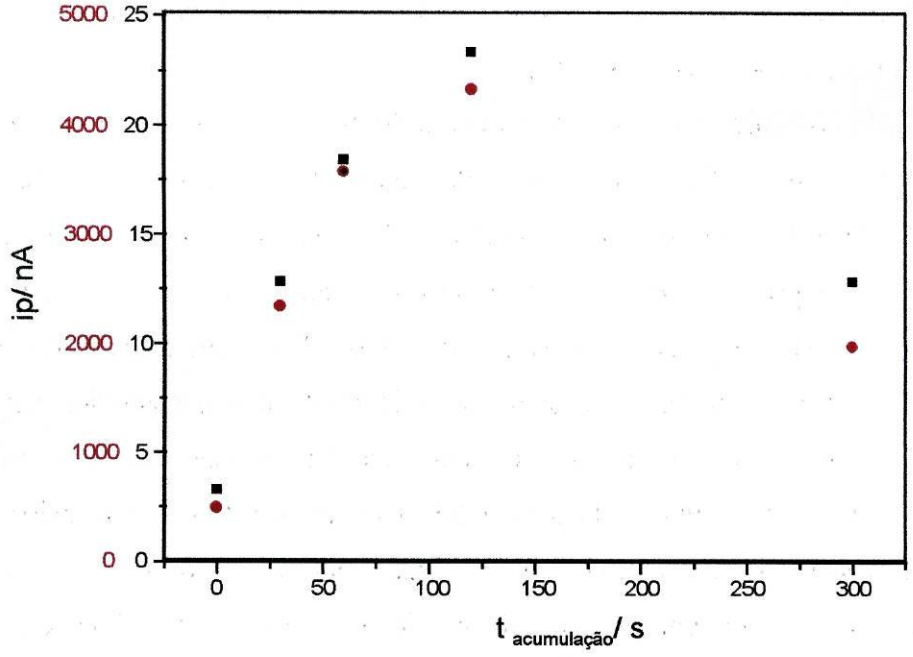


Figura 2.14 - Influência do tempo de acumulação no sinal voltamétrico. Concentração de DMQ: (■) $1x10^{-9}$M, (●) $5x10^{-7}$M.
(amplitude de onda quadrada= 20mV, degrau de potencial= 2mV; frequência= 100Hz, 30s acumulação a -200mV).

2.3.1.4.5 - Efeito da adição de tensioactivos

Os processos de análise por voltametria com adsorção são, frequentemente, afectados pela presença de substâncias com actividade superficial, vulgarmente conhecidas como tensioactivos. Mesmo quando os tensioactivos não participam directamente na reacção electroquímica podem afectar o processo de eléctrodo da espécie reagente. Em geral a interferência destas espécies processa-se por duas vias: competem pelas posições de adsorção e dificultam o processo de transferência electrónica[99].

Neste trabalho fez-se um estudo da influência do cloreto de tetrafenilfosfónio (CTFF) na resposta voltamétrica da DMQ $5x10^{-7}$M, em função da frequência de onda quadrada. A escolha do CTFF resultou do facto de se tratar de um tensioactivo cuja influência na resposta voltamétrica por voltametria com adsorção de vários corantes azoicos se encontra bem caracterizada, verificando-se que a sua presença em solução dava origem ao surgimento de situações aparentemente anómalas, como por exemplo o aumento da amplitude dos picos[187,188].

O estudo consistiu na observação da evolução do sinal de uma solução de DMQ $5x10^{-7}$M para diferentes frequências de onda quadrada, na presença de diferentes concentrações de CTFF; os resultados obtidos podem ser observados na figura 2.15. Verifica-se que na presença de CTFF há uma diminuição considerável na amplitude máxima de pico que se atinge para as frequências maiores. Este comportamento pode ser consequência de uma diminuição da quantidade de DMQ que é adsorvida devido à presença do tensioactivo. No entanto, verifica-se igualmente que, para determinados valores de frequência a amplitude do pico obtido na presença de CTFF é maior que a obtida na ausência do tensioactivo. Este resultado indica que o tensioactivo pode modificar a velocidade do processo de redução electroquímica da DMQ no eléctrodo. De facto, conforme se pode observar na figura 2.15, o modo como a amplitude do pico voltamétrico varia com a frequência altera-se em função da quantidade de CTFF na solução em análise. A presença de CTFF altera o modo como varia a intensidade de corrente do pico com a frequência, deslocando o sinal máximo para frequências mais baixas o que, de acordo com a interpretação de Lovric para esse fenómeno, corresponde a uma diminuição da velocidade do processo de transferência electrónica. Como

resultado verifica-se que, para uma certa gama de frequências, a presença do tensioactivo em solução pode fazer aumentar a amplitude do pico voltamétrico.

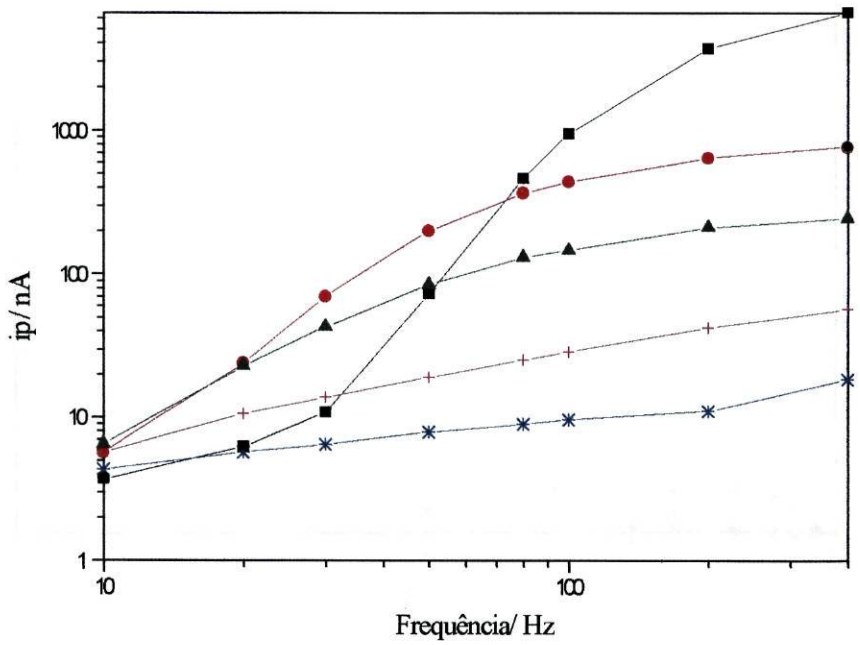


Figura 2.15 - Influência da frequência de onda quadrada na amplitude do pico voltamétrico da DMQ $5x10^{-7}$M, na presença de diferentes concentrações de cloreto de tetrafenilfosfónio. Concentração de CTFF (mg/L): (■)0; (●)1; (▲)2; (+)5; (✱)10.
(Tampão fosfato 0,1M, pH=7, degrau de potencial= 2mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, 30s de acumulação a -200mV).

2.3.1.4.6 - Efeito da variação da concentração do electrólito

Como se havia verificado nos ensaios cronoamperométricos que a concentração de tampão influenciava o modo como se dava o decaimento da intensidade de corrente capacitiva e da intensidade de corrente de adsorção após a aplicação de um impulso, resolveu-se estudar a evolução do comportamento voltamétrico da DMQ $5x10^{-7}$M com a frequência de onda quadrada, utilizando diferentes concentrações de tampão fosfato, pH=7, como electrólito de suporte. A representação gráfica do valor de intensidade de corrente correspondente à amplitude do pico voltamétrico em função da frequência de onda quadrada para diferentes concentrações de solução tampão fosfato, pH=7, pode ser observada na figura 2.16.

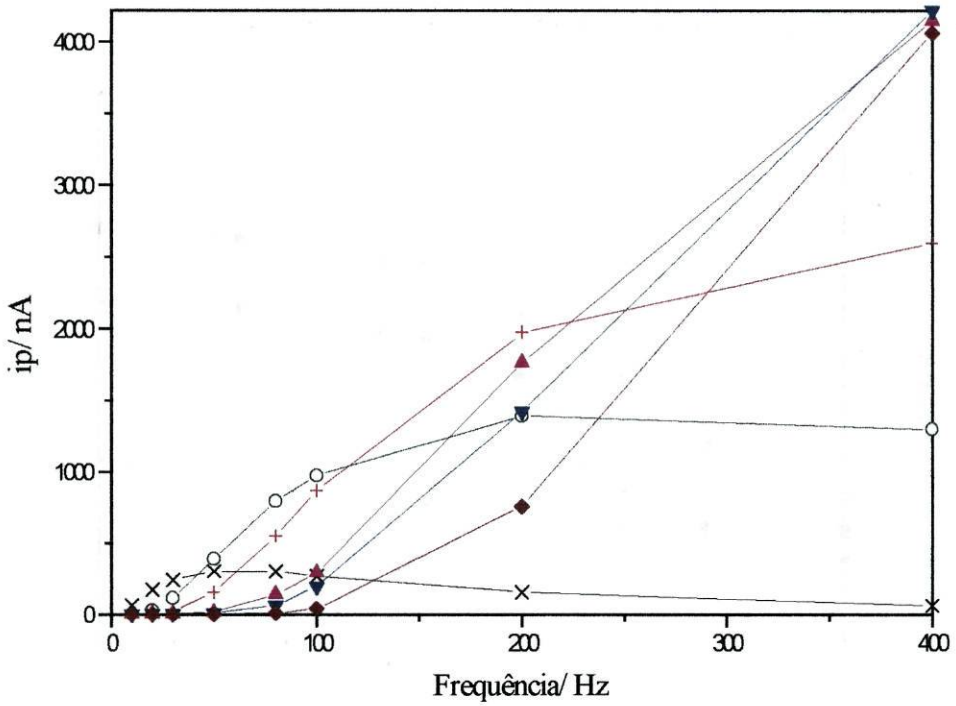


Figura 2.16 - Influência da frequência de onda quadrada na amplitude do pico voltamétrico da DMQ $5x10^{-7}$M, para diferentes concentrações de tampão fosfato com pH= 7. Concentração de tampão fosfato (M): (X)$1x10^{-3}$; (O)$5x10^{-3}$; (+)$1x10^{-2}$; (▲)$5x10^{-2}$; (▼)$1x10^{-1}$; (◆)$5x10^{-1}$. (degrau de potencial= 2mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, 30s de acumulação a -200mV).

Os resultados obtidos mostram que o modo como varia a amplitude do pico voltamétrico com a frequência de onda quadrada depende bastante da concentração da solução tampão utilizada como electrólito de suporte. Tendo em conta a teoria de Lovric relativa ao aparecimento do máximo quasi-reversível, pode inferir-se que a velocidade do processo de transferência electrónica decresce à medida que a concentração da solução tampão também decresce. A diminuição da concentração da solução tampão corresponde, porém, igualmente a um abaixamento da força iónica, facto que nestes ensaios ocasionou o aumento da linha de base, como resultado do decaimento da intensidade de corrente capacitiva ser mais lento, já que esse decaimento depende da resistência da solução e, quanto mais baixa a força iónica, maior essa resistência. À medida que aumenta a concentração da solução tampão verifica-se que os picos ficam melhor definidos e mais estreitos. Esse efeito pode ser apreciado na figura 2.17 ,onde se

representam os voltamogramas obtidos com uma solução DMQ $5x10^{-7}$M a 100Hz, para várias concentrações de solução tampão fosfato.

Estes resultados revelam que é possível obter um aumento considerável de sensibilidade numa determinação voltamétrica utilizando a voltametria de onda quadrada, através da simples variação da concentração da solução tampão. No entanto, estes ensaios não permitem distinguir se o efeito observado é somente resultante da modificação da força iónica do electrólito de suporte ou se a variação da concentração da solução tampão, com o consequente efeito sobre o seu poder tampão, também influencia a resposta voltamétrica. Com o objectivo de esclarecer esta questão, realizaram-se ensaios com solução de DMQ $5x10^{-7}$M em que se estudou a evolução do comportamento voltamétrico em função da frequência para duas concentrações distintas de tampão fosfato ($1x10^{-4}$M e $1x10^{-2}$M), tendo-se adicionado cloreto de potássio por forma a que a força iónica final fosse cerca de 0,1M. A evolução da amplitude do pico voltamétrico com a frequência de onda quadrada para as duas concentrações de solução tampão pode ser observada na figura 2.18.

Os resultados obtidos nestes ensaios mostram que a concentração da solução tampão tem grande influência na velocidade do processo de transferência electrónica da espécie adsorvida no eléctrodo. Na presença de cloreto de potássio 0,1M, observa-se uma acentuada melhoria na linha de base obtida nos ensaios a frequências elevadas, mesmo nos ensaios em que a concentração da solução tampão é de $1x10^{-4}$M. Porém, conforme se observa através dos voltamogramas que são apresentados na figura 2.19, como exemplos, a concentração da solução tampão tem um efeito muito pronunciado na forma do pico da DMQ; enquanto que o pico obtido com a concentração de solução tampão mais diluída é bastante largo, o pico obtido com a mais concentrada é muito mais estreito e bem definido. Estes resultados mostram que a velocidade do processo electroquímico da DMQ para além de depender da concentração do electrólito utilizado como electrólito de suporte, também depende do poder tampão da solução.

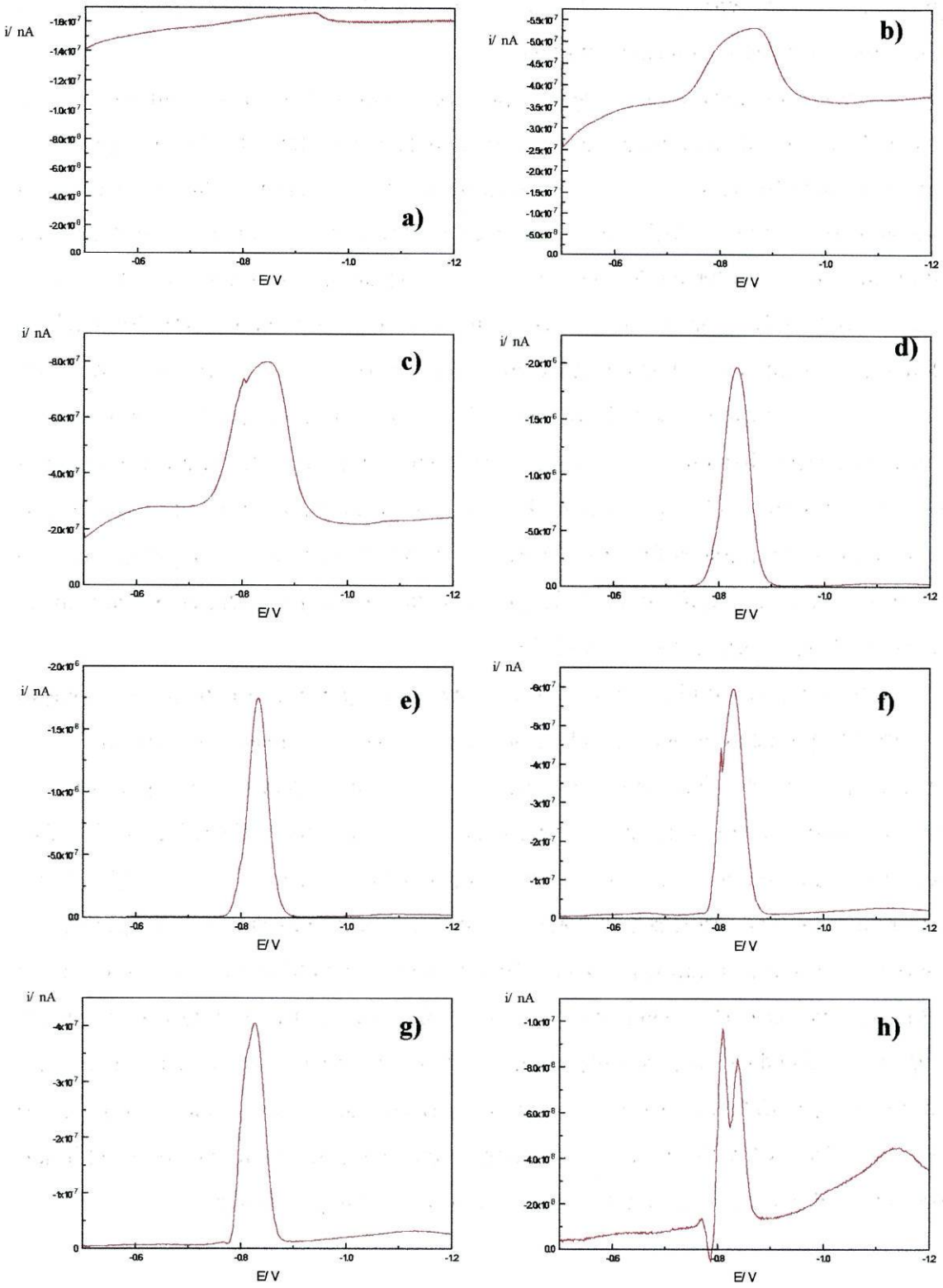


Figura 2.17 - Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M obtidos em diferentes concentrações de tampão fosfato pH=7. Concentração de tampão fosfato (M): **a)**-$1x10^{-4}$; **b)**- $5x10^{-4}$; **c)**- $1x10^{-3}$; **d)**- $5x10^{-3}$; **e)**- $1x10^{-2}$; **f)**- $5x10^{-2}$; **g)**- $1x10^{-1}$; **h)**- $5x10^{-1}$.
(30s acumulação a -200mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, degrau de potencial= 2mV, frequência= 100Hz).

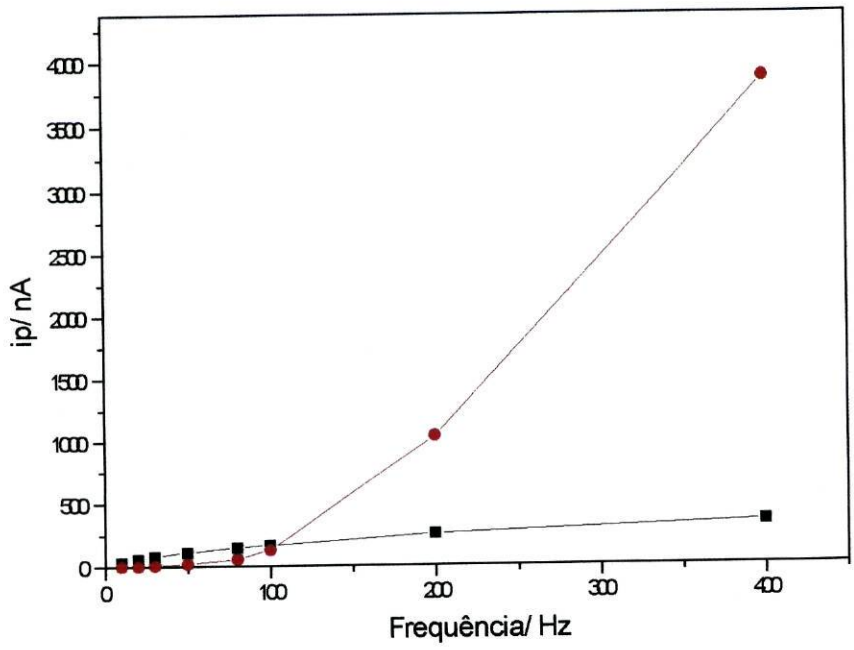


Figura 2.18 - Variação da intensidade de corrente do pico voltamétrico da DMQ $5x10^{-7}$M com a frequência para duas concentrações de tampão distintas contendo 0,1M de KCl para controlo da força iónica. Concentração de tampão fosfato (M): (■)$1x10^{-4}$, (●)$1x10^{-2}$. (Degrau de potencial= 2mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, 30s de acumulação a -200mV).

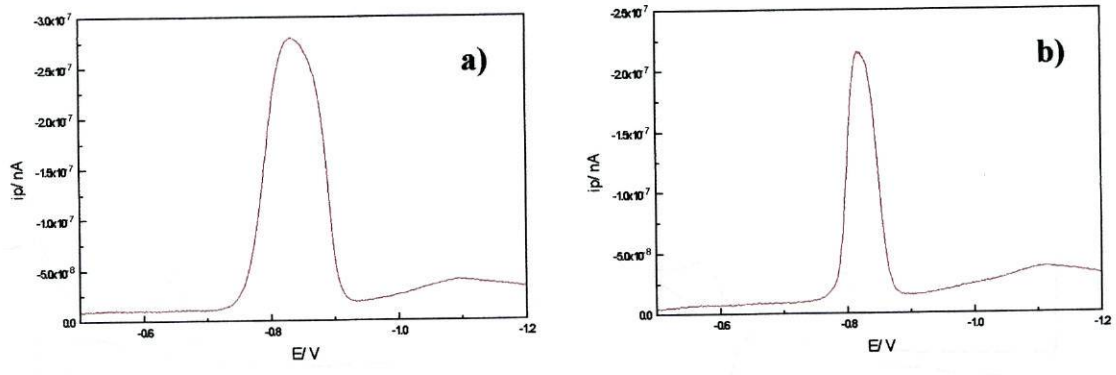


Figura 2.19 - Voltamogramas de DMQ $5x10^{-7}$M obtidos com duas diferentes concentrações de tampão fosfato pH=7, contendo 0,1M de KCl . Concentração de tampão fosfato (M): **a)**-$1x10^{-4}$; **b)**- $1x10^{-2}$.
(30s acumulação a -200mV, amplitude de onda quadrada= 20mV, degrau de potencial= 2mV, frequência= 100Hz).

2.3.2 - ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS COM A 2-HIDROXIQUINOXALINA (2HQ)

2.3.2.1 - Voltametria cíclica

A voltametria cíclica foi utilizada nos estudos voltamétricos com a 2-hidroxiquinoxalina no sentido de caracterizar a reversibilidade do seu processo de redução electroquímica e de comprovar a sua adsorção no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Neste estudo traçaram-se vários voltamogramas cíclicos de uma solução $2{,}5x10^{-6}$M em que se variou a velocidade de varrimento do potencial. As condições experimentais utilizadas nestas experiências foram as seguintes:

- tampão acetato 0,1M, pH=5;
- variação de potencial entre -200mV e -1200mV (2 ciclos);
- acumulação a -200mV durante 30s;
- degrau de potencial = 1mV (1°conjunto de voltamogramas) e 5mV (2°conjunto de voltamogramas);
- velocidade de varrimento: (1) 10mV/s, (2) 50mV/s, (3) 100mV/s, (4) 500mV/s, (5) 1v/s, (6) 5v/s, (7) 10V/s.

Na figura 2.20 apresentam-se alguns exemplos de voltamogramas cíclicos obtidos.

Na tabela 2.2 estão registados os valores do potencial (Ep), da intensidade de corrente (ip) e da largura a meia altura (b½) para o pico de adsorção catódico observado, para as duas situações de degrau de potencial utilizadas.

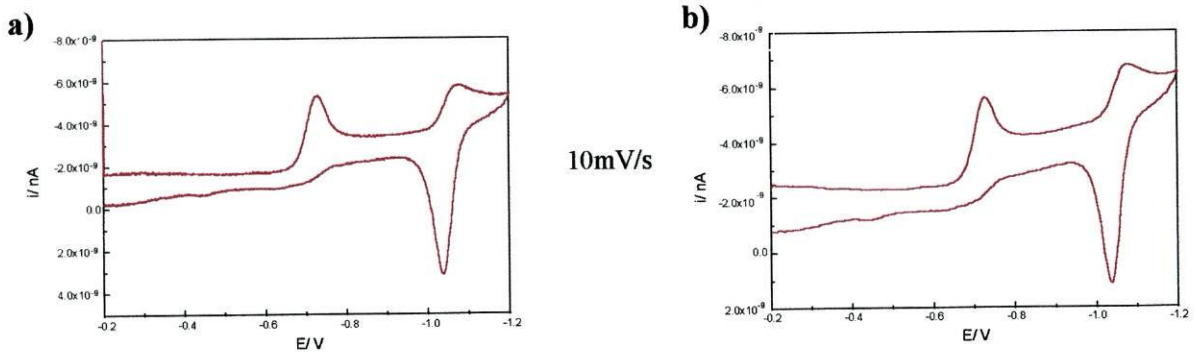


Figura 2.20 - Continua (legenda na página seguinte).

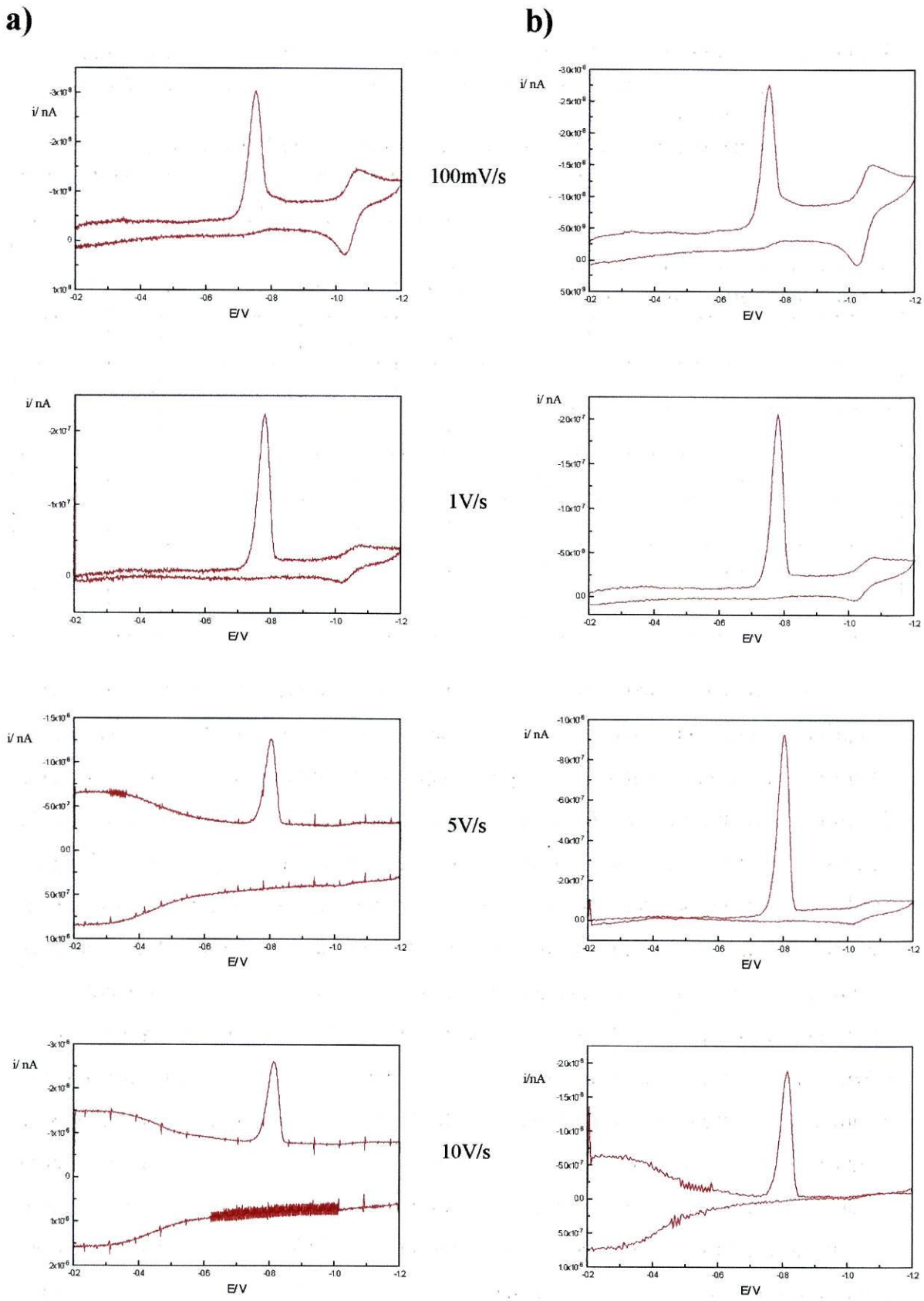


Figura 2.20 - Voltamogramas cíclicos da 2-hidroxiquinoxalina 2,5x10^{-6}M (1ºciclo) obtidos com diferentes velocidades de varrimento e com diferente degrau de potencial:
a) 1mV/ impulso; **b)** 5mV/ impulso.

Tabela 2.2 - Valores de ip, Ep e b½ para o pico de adsorção catódico obtido por voltametria cíclica para uma solução de 2-hidroxiquinoxalina $2{,}5 \times 10^{-6}$M para diferentes velocidades de varrimento.
(solução tampão acetato 0,1M, pH=5, acumulação a -200mV durante 30s).

	degrau de potencial					
	1mV			5mV		
velocidade de varrimento/ mV/s	ip/ nA	Ep/ mV	b½/ mV	ip/ nA	Ep/ mV	b½/ mV
10	2,8	-724	59	3,2	-727	59
50	12	-746	47	10	-742	44
100	22	-752	43	20	-752	44
500	110	-773	40	95	-771	39
1000	215	-783	40	192	-781	39
5000	900	-805	40	940	-806	39
10000	1600	-813	41	1800	-815	39

Nos voltamogramas obtidos existem três aspectos que merecem ser salientados. Em primeiro lugar verifica-se que, tal como se tinha visto para a DMQ, também a 2HQ adsorve no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa; no entanto, neste caso o processo de redução é totalmente irreversível, uma vez que não surge o pico anódico, aquando do varrimento de potencial no sentido anódico. Em segundo lugar, atendendo aos valores da tabela 2.2, verifica-se que o potencial do pico voltamétrico da 2HQ se torna mais catódico à medida que a velocidade do varrimento aumenta. Em terceiro lugar, verifica-se que, muito embora a intensidade de corrente do pico aumente com a velocidade do varrimento, esse aumento não é tão acentuado como se havia verificado para o caso da DMQ; atendendo aos valores de ip referidos na tabela 2.2, verifica-se que esse aumento é aproximadamente à velocidade de varrimento. Verifica-se igualmente que os valores de intensidade de corrente do pico e de potencial do pico são semelhantes para as duas situações de degrau de potencial ensaiadas; contudo, experimentalmente, os dois ensaios são muito distintos uma vez que, para a mesma velocidade de varrimento se aplicam cinco vezes menos impulsos nos ensaios em que o degrau de potencial é de 5mV, relativamente ao ensaio em que esse degrau é de 1mV. Assim, atendendo a que a velocidade do varrimento é a mesma nos dois casos, isso significa que o intervalo de

tempo de duração dos impulsos é cinco vezes mais longo no ensaio com 5mV/impulso relativamente ao ensaio com 1mV/impulso. Essa diferença tem reflexos no modo como é realizada a amostragem da intensidade de corrente e provoca diferenças a nível da influência da intensidade de corrente capacitiva, como aliás é notório nos voltamogramas da figura 2.20. No ensaio com degrau de potencial de 1mV a influência da intensidade de corrente capacitiva é detectada claramente para a velocidade de varrimento de 5mV/s - a que corresponderá um tempo de duração do impulso de 200μs - ao passo que nos ensaios com degrau de potencial de 5mV essa influência é detectada, de forma menos intensa, para a velocidade de varrimento de 10V/s - que corresponde à aplicação de impulsos com duração de 500μs.

O comportamento evidenciado pela 2HQ por voltametria cíclica é claramente distinto daquele que foi evidenciado pela DMQ. A razão principal para esta diferença parece relacionar-se com o facto de neste caso o processo ser totalmente irreversível. Esta situação de irreversibilidade poderá ser devida a uma rápida reacção química do composto resultante da redução electroquímica da 2HQ no eléctrodo, o que inviabiliza a reoxidação no varrimento anódico. A existência de uma reacção electroquímica acompanhada por uma reacção química é, aliás, uma situação frequente na redução de compostos orgânicos[189]. Nestas condições, o sistema adsorvido permanece em situação de desequilíbrio durante a reacção electroquímica e o processo de eléctrodo decorre com um efectivo consumo da espécie reagente adsorvida. Por outro lado, quanto mais catódico for o potencial aplicado ao eléctrodo maior será o sobrepotencial e, consequentemente, maior vai ser a velocidade do processo electroquímico. De acordo com estas considerações, à medida que a velocidade do varrimento aumenta, o tempo de electrólise efectivo em cada degrau de potencial é menor e assim, vai ser possível alongar o processo de redução para valores de potencial mais catódicos, uma vez que o consumo da espécie adsorvida vai ser menor durante o varrimento. Por outro lado, uma vez que se atingem sobrepotenciais maiores, a intensidade de corrente medida será igualmente maior. Como existe consumo de espécie adsorvida ao longo do varrimento, a partir de um dado ponto deixa de existir espécie para ser reduzida e o sinal cairá rapidamente para zero. Este facto é responsável pela assimetria dos picos de adsorção da 2HQ, que contrasta com a simetria dos picos obtidos com a DMQ.

2.3.2.2 - Voltametria normal por impulsos

Estudou-se o comportamento da 2-hidroxiquinoxalina por voltametria normal por impulsos e comparou-se com o observado para a DMQ.

Na sequência dos ensaios realizados por voltametria cíclica, realizaram-se ensaios por voltametria normal por impulsos utilizando as seguintes condições experimentais:

- tampão acetato 0,1M, pH=5;
- potencial de base, inicial e de acumulação = -100mV , potencial final = -1200mV.
- degrau de potencial = 1mV (1°conjunto de voltamogramas) e 5mV (2°conjunto de voltamogramas);
- intervalo de tempo entre impulsos (correspondente a t_{gota} nos ensaios polarográficos) = 100ms;
- intervalo de tempo de aplicação do impulso = variável.

Na figura 2.21 pode observar-se o modo como a amplitude do pico de adsorção varia com o tempo de aplicação do impulso. Nestes ensaios são evidentes as diferenças de comportamento existentes entre a 2HQ e a DMQ por voltametria normal de impulsos. Essas diferenças manifestam-se no mesmo sentido das que foram observadas nos ensaios por voltametria cíclica. Com a 2HQ verifica-se que à medida que o tempo de aplicação do impulso se torna menor, o que corresponde a um intervalo de tempo de electrólise inferior, o potencial do pico obtido vai-se deslocando para valores mais catódicos. Também a amplitude do pico vai-se tornando maior à medida que diminui o tempo de aplicação do impulso, verificando-se que esses dois parâmetros experimentais seguem uma relação inversamente proporcional.

Ao contrário do verificado nos ensaios por voltametria cíclica, neste caso a alteração do degrau de potencial de 1mV para 5mV tem uma acentuada influência na amplitude do pico e no potencial do pico. Este facto está de acordo com o previsto, uma vez que o uso de um degrau de potencial maior na voltametria normal por impulsos corresponde a um varrimento de potencial mais rápido, pelo que há um tempo de electrólise menor durante o varrimento. Desta forma, uma vez que neste processo electroquímico há consumo de espécie adsorvida, a redução electroquímica da espécie adsorvida vai poder ser detectada e apresentar um valor de intensidade de corrente máximo para valores de potencial mais catódicos.

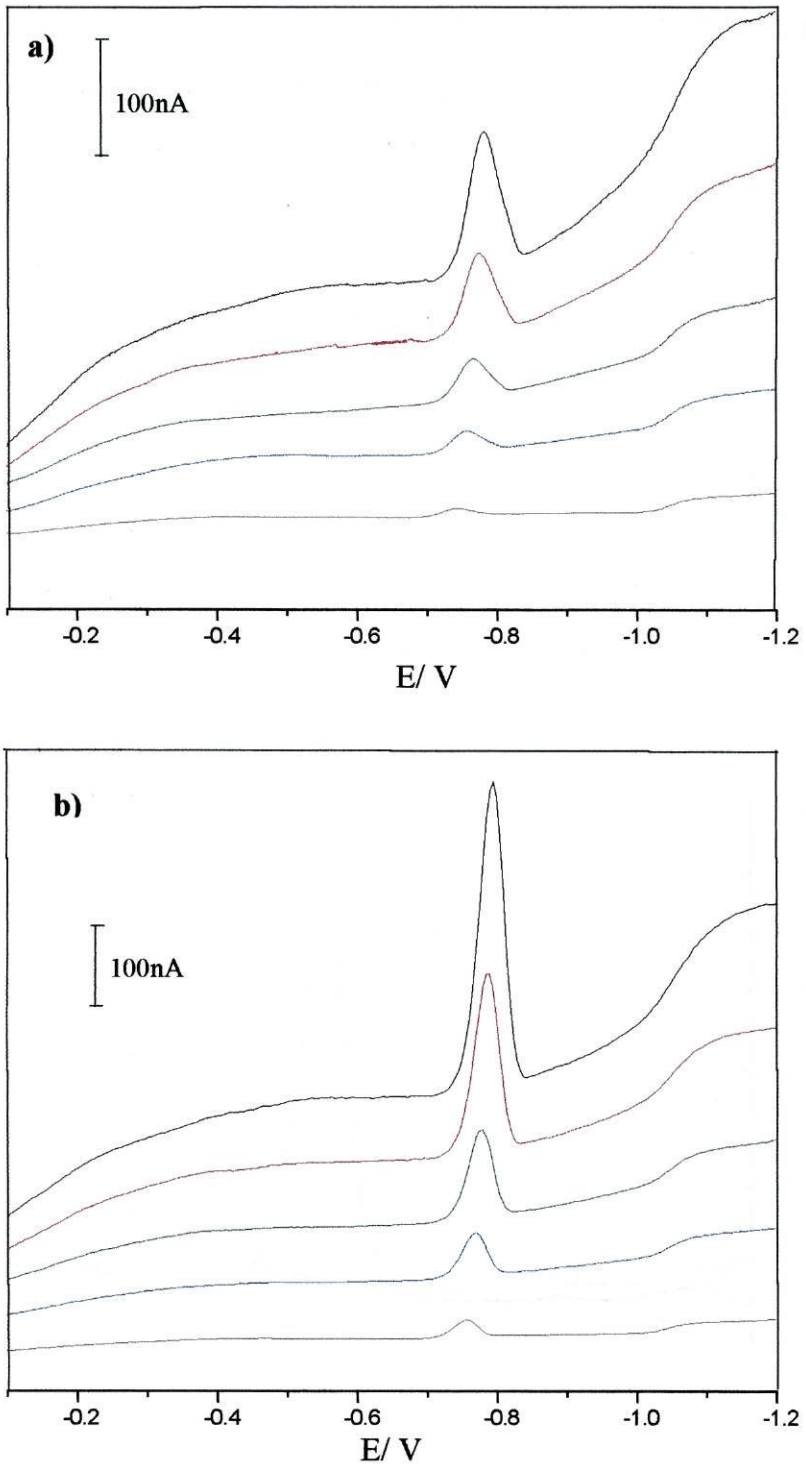


Figura 2.21 - Voltamogramas normais por impulsos da 2-hidroxiquinoxalina $2{,}5 \times 10^{-6}$M em tampão acetato 0,1M, pH=5, obtidos com diferentes intervalos de tempo de aplicação de impulso e com diferente degrau de potencial: **a)**- 1mV/ impulso; **b)**- 5mV/ impulso. Tempo de aplicação de impulso: (—) 3ms; (—) 5ms; (—) 10ms; (—) 20ms; (—) 50ms.

2.3.2.3 - Voltametria de onda quadrada

Em termos analíticos a voltametria de onda quadrada é a técnica electroanalítica mais poderosa para a determinação de compostos adsorvidos, tal como se verificou com a DMQ. No entanto, devido ao facto da redução da 2HQ no eléctrodo de mercúrio decorrer de forma totalmente irreversível, será de prever que ocorram diferenças acentuadas no seu comportamento electroquímico relativamente ao observado com a DMQ, à semelhança do que se verificou no estudo realizado por voltametria cíclica e por voltametria normal por impulsos.

Efectuaram-se estudos sobre a influência da frequência de onda quadrada e do degrau de potencial na amplitude de pico. Na figura 2.22 pode observar-se um voltamograma típico obtido por voltametria de onda quadrada a 50Hz, incluindo as componentes catódica e anódica da resposta.

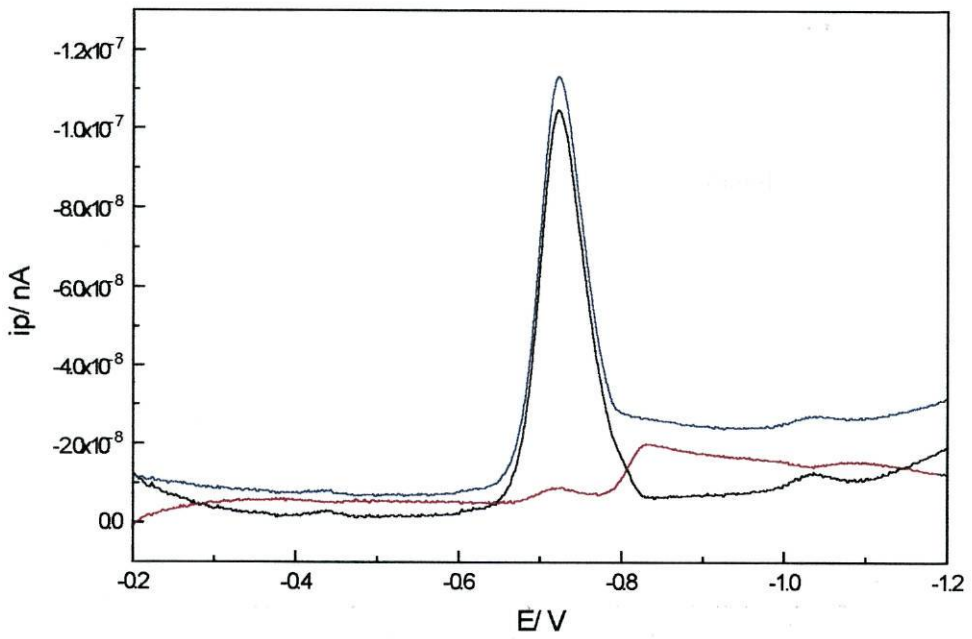


Figura 2.22 - Voltamograma obtido por voltametria de onda quadrada de 2-hidroxiquinoxalina $5x10^{-6}$M em tampão acetato 0,1M, pH=5. (——) intensidade de corrente resultante; (- - - -) intensidade de corrente catódica; (----) intensidade de corrente anódica. (Degrau de potencial= 5mV; amplitude de impulso de onda quadrada= 20mV; frequência = 50Hz; 30s de acumulação a -200mV).

Na tabela 2.3 estão registados os valores de intensidade de corrente de pico (ip), de potencial de pico (Ep) e de largura de pico a meia altura (b½) que foram obtidos em ensaios utilizando diferentes frequências de onda quadrada e quatro condições de degrau de potencial.

O comportamento voltamétrico observado nestes ensaios está de acordo com o que seria previsível, tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios com as duas técnicas anteriores. Conforme se pode observar no voltamograma que se representa na figura 2.22, na componente anódica não se observa a existência do pico correspondente à reoxidação, o que está de acordo com a situação do sistema ser totalmente irreversível devido à provável decomposição imediata do produto formado no eléctrodo. Por outro lado verifica-se que a amplitude do pico voltamétrico aumenta quase linearmente com a frequência e que, quanto maior é a frequência de onda quadrada ou, para a mesma frequência, quanto maior é o degrau de potencial, mais catódico se torna o potencial do pico obtido. Verifica-se, também, que o pico obtido apresenta um acentuada assimetria, tal como já tinha sido verificado para os picos obtidos nos ensaios anteriores realizados através das duas outras técnicas voltamétricas.

No caso da 2HQ verifica-se que a sensibilidade da voltametria de onda quadrada é muito menor do que a obtida na determinação da DMQ. Tal diferença pode ser explicada pelo facto de, no caso da 2HQ, não haver reoxidação do composto adsorvido, já que o processo é totalmente irreversível, ao passo que no caso da DMQ o composto é reutilizado várias vezes durante o varrimento, com a consequente amplificação do sinal obtido.

Tabela 2.3 - Valores de ip, Ep e b½ obtidos por voltametria de onda quadrada para uma solução de 2HQ $2{,}5\times10^{-6}$M, para diferentes frequências e para quatro valores de degrau de potencial (solução tampão acetato 0,1M, pH=5; acumulação a -100mV durante 30s, amplitude do impulso de onda quadrada = 20mV).

Frequência/ Hz	degrau de potencial/ mV	ip/ mV	Ep/ mV	b½/ mV
10	1	6,2	-717	66
	2	10,4	-723	54
	5	21,2	-730	44
	10	31,0	-734	40
20	1	11,6	-723	52
	2	18,9	-729	48
	5	36,0	-740	44
	10	53,9	-744	42
50	1	25,6	-737	45
	2	40,7	-743	42
	5	78,0	-754	39
	10	116	-765	40
100	1	44,9	-745	43
	2	71,4	-751	40
	5	135	-764	39
	10	212	-775	40

2.4 - APLICAÇÕES ANALÍTICAS

Os resultados obtidos vieram confirmar as grandes potencialidades da voltametria de onda quadrada na análise de espécies adsorvidas no eléctrodo de mercúrio. Em particular nas situações em que o processo electroquímico é reversível e a espécie adsorvida dá origem à formação de uma nova espécie que igualmente se mantém confinada no eléctrodo, é possível obter uma amplitude de pico bastante elevada para

concentrações baixas do composto. Decidiu-se, por isso, desenvolver alguns exemplos de aplicações analíticas, no sentido de demonstrar o interesse que o uso da voltametria de onda quadrada pode ter para sistemas do tipo referido.

Os exemplos de aplicação desenvolvidos foram os seguintes:

(1) Efeito da frequência na determinação da DMQ e da 2HQ.

(2) Determinação de diacetilo após derivatização com a o-fenilenodiamina.

(3) Influência da frequência de onda quadrada no sinal do composto resultante da decomposição da o-fenilenodiamina[1].

(4) Efeito da frequência de onda quadrada no grau de interferência do oxigénio na determinação da DMQ.

2.4.1 - Efeito da frequência na determinação da DMQ e da 2HQ

2.4.1.1 - 2,3-dimetilquinoxalina

O objectivo deste estudo foi a demonstração da elevada sensibilidade na determinação da DMQ utilizando a voltametria por onda quadrada, pelo que a zona de concentração testada foi bastante baixa: entre $2x10^{-9}$M e $5x10^{-8}$M. Utilizou-se tampão fosfato 0,1M, pH=7, e duas condições de acumulação distintas: sem acumulação e após 30s de acumulação.

Os resultados obtidos para as diferente frequências testadas, sem acumulação e com 30s de acumulação estão registados na tabela 2.4.

[1] A DMQ forma-se por derivatização do diacetilo com a o-fenilenodiamina, sendo a 2,3-diaminofenazina um composto que resulta da lenta decomposição do derivatizante.

Tabela 2.4 - Valores de ip obtidos por voltametria de onda quadrada com soluções de DMQ com diferentes concentrações para diferentes frequências. Parâmetros da regressão linear entre os valores de ip e a concentração de DMQ para cada frequência testada.
(meio tampão fosfato 0,1M, pH=7; amplitude do impulso = 20mV; degrau de potencial = 2mV).

A- sem acumulação

	|DMQ|/ M							
	$2x10^{-9}$	**$5x10^{-9}$**	**$2x10^{-8}$**	**$5x10^{-8}$**	**Parâmetros da regressão linear**			
frequência / Hz	**Valores de ip/ nA**				**N**	**ord.origem ± Δord.origem**	**coeficiente de correlação**	**declive ± Δdeclive**
10	-	-	-	-				
20	-	-	-	-				
30	-	-	-	-				
50	-	-	1,6	3,6				
80	-	2,6	7,5	17,6	3	0,89±0,08	0,99997	$3,34±0,02x10^{8}$
100	1,8	3,7	13,3	31,8	4	0,6±0,1	0,99996	$6,25±0,04x10^{8}$
150	3,4	8,8	28,0	71,7	4	0,8±0,7	0,99964	$1,41±0,03x10^{9}$
200	4,9	10,4	42,2	95,8	4	2±2	0,99923	$1,90±0,05x10^{9}$
250	6,4	14,5	45,3	115	4	2±1	0,99968	$2,25±0,04x10^{9}$
300	8,2	17,1	52,9	137	4	2±2	0,99944	$2,67±0,06x10^{9}$
400	-	16,5	50,8	130	3	2±3	0,99941	$2,54±0,09x10^{9}$
500	-	20,6	60,2	140	3	7,2±0,2	1	$2,65±0,01x10^{9}$
600	-	-	66,3	164				
700	-	-	77,1	159				
800	-	-	67,3	174				
900	-	-	75,5	152				
1000	-	-	72,9	175				
1100	-	-	70,2	167				
1200	-	-	-	178				
1300	-	-	-	166				
1400	-	-	-	-				
1500	-	-	-	-				
1700	-	-	-	-				
2000	-	-	-	-				

B- 30s de acumulação

	|DMQ|/ M				Parâmetros da regressão linear			
	$2x10^{-9}$	$5x10^{-9}$	$2x10^{-8}$	$5x10^{-8}$				
frequência / Hz	**Valores de ip/ nA**				**N**	**ord.origem ± Δord.origem**	**coeficiente de correlação**	**declive ± Δdeclive**
10	-	-	-	-				
20	-	-	-	-				
30	-	-	-	-				
50	-	-	-	-				
80	-	2,0	6,6	14,4	3	$2,7\pm0,2x10^{8}$	0,8±0,4	0,99911
100	2,4	5,3	18,1	40,8	4	$8,0\pm0,2x10^{8}$	1,3±0,5	0,9994
150	9,3	22,3	78,7	191	4	3,77±0,03x10	2,8±0,7	0,99995
200	20,2	47,2	167	412	4	8,14±0,04x10	5 ±1	0,99998
250	32,3	72,5	256	661	4	1,31±0,02x10	4±6	0,99977
300	46,2	96,6	351	628	4	$1,2\pm0,2x10^{10}$	49±36	0,98791
400	45,6	98,4	336	826	4	1,62±0,01x10	14±2	0,99997
500	57,3	117	400	1018		2,00±0,03x10	13±8	0,9998
600	64,9	135	463	1191		2,35±0,04x10	12±11	0,99973
700	73,5	149	509	1316		2,59±0,05x10	13±13	0,99966
800	81,4	163	556	1319		2,57±0,02x10	34±5	0,99996
900	86,5	181	601	1422		2,77±0,03x10	39±6	0,99994
1000	87,3	203	663	1523		2,97±0,06x10	48±16	0,99961
1100	89,1	186	640	1588		3,12±0,02x10	25±6	0,99996
1200	95,8	198	648	1615		3,16±0,04x10	32±9	0,99989
1300	87,7	-	631	1596				
1400	-	-	650	1636				
1500	-	-	715	1510				
1700	-	-	-	1630				
2000	-	-		-				

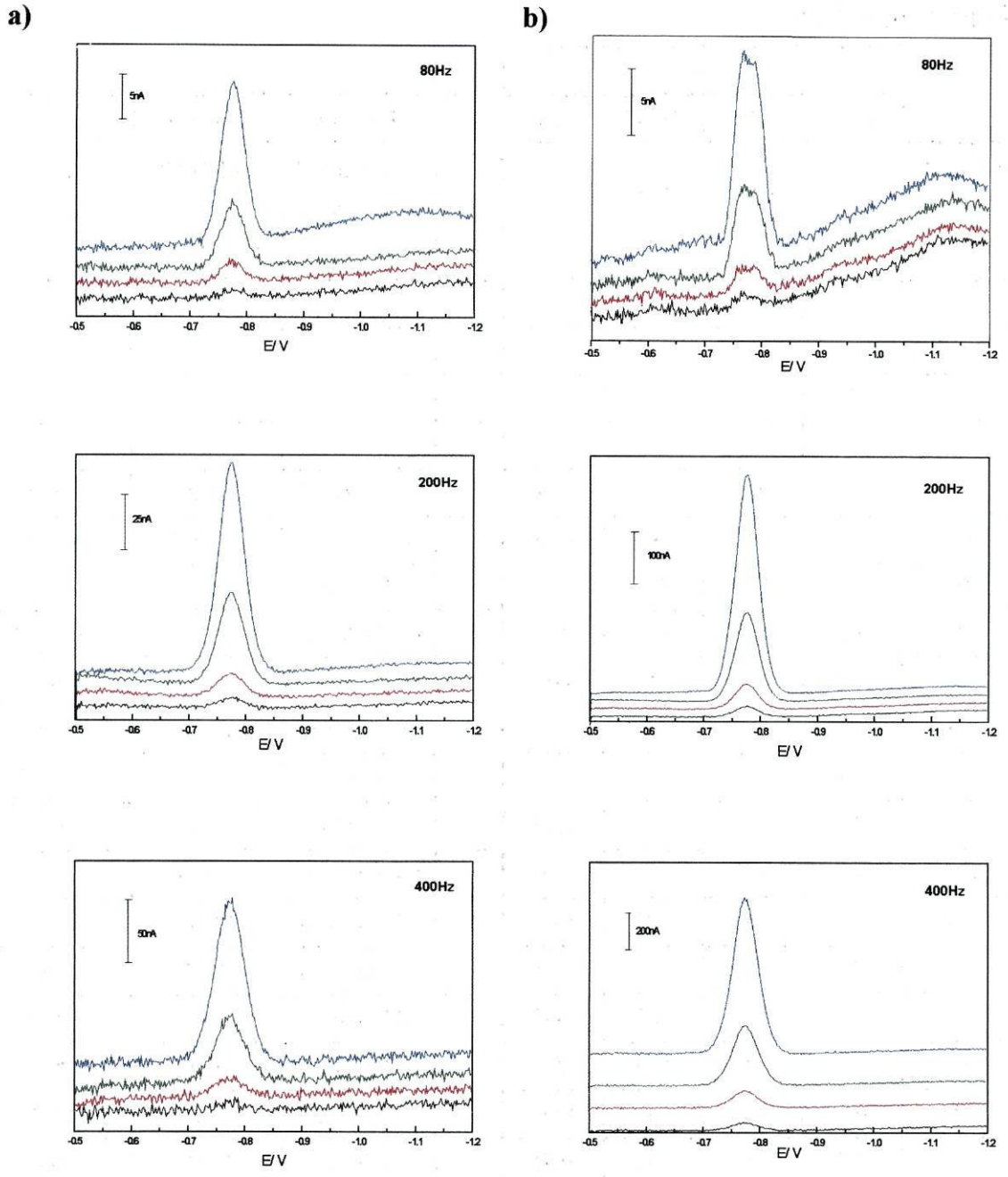


Figura 2.23 - Voltamogramas por onda quadrada obtidos com quatro concentrações distintas de DMQ, a diferentes frequências. Concentração de DMQ: (—) $2x10^{-9}$M; (—) $5x10^{-9}$M; (—) $2x10^{-8}$M; (—) $5x10^{-8}$M. **a)**- sem acumulação; **b)**- 30s de acumulação a -500mV. (Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV).

Na figura 2.23 podem ser observados alguns dos voltamogramas típicos obtidos nestes ensaios. Os resultados obtidos confirmam a grande sensibilidade da voltametria de onda quadrada para a análise da DMQ, mesmo para tempos de acumulação curtos, verificando-se que é possível estabelecer relações lineares entre a amplitude do pico

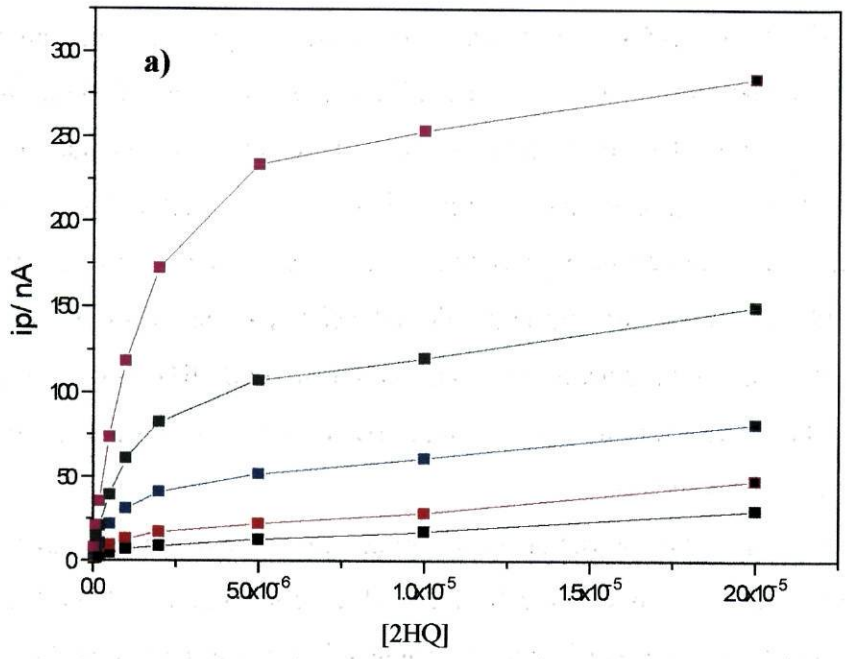
voltamétrico e a concentração de DMQ para níveis de concentrações de DMQ muito baixos e que essas relações lineares se mantêm para uma gama alargada de frequências. A realização de acumulação prévia tem um efeito importante no aumento da sensibilidade. Como se pode observar na figura 2.23, a partir de uma dada frequência de onda quadrada o aumento de frequência pode não trazer benefícios a nível da sensibilidade da determinação, apesar da amplitude do pico ser maior. Tal facto fica-se a dever ao aumento da influência da intensidade de corrente capacitiva, com o consequente aumento do ruído e a degradação do limite de detecção. Esta situação encontra-se bem patente nos ensaios sem acumulação obtidos à frequência de 200Hz e de 400Hz, em que é notório que o limite de detecção é mais baixo nos ensaios a 200Hz apesar dos picos a 400Hz serem de maior amplitude.

De salientar a grande sensibilidade e rapidez de resposta obtida nestes ensaios: por exemplo, nos ensaios em que se efectuou a análise da solução de DMQ $2x10^{-9}$M sem acumulação prévia a 200Hz, o varrimento de potencial demorou menos de 2 segundos.

2.4.1.2 - 2-hidroxiquinoxalina

Nestes ensaios realizaram-se curvas de calibração com a 2HQ para uma zona de concentrações entre $5x10^{-8}$M e $2x10^{-5}$M em três electrólitos de suporte distintos e para cinco frequências de onda quadrada distintas. O objectivo deste estudo foi a verificação da influência do electrólito de suporte e da frequência de onda quadrada na curva de calibração da 2-hidroxiquinoxalina. Na figura 2.24 representam-se as curvas de calibração obtidas.

Tal como se verificou na secção 2.2.2 na Parte III, nas curvas de calibração obtidas por polarografia, também nestas curvas de calibração é notório que existe um encurvamento à medida que a concentração da 2-hidroxiquinoxalina aumenta. Este encurvamento é ainda mais acentuado do que o verificado nos ensaios polarográficos. Tal como para os ensaios polarográficos, verifica-se que em tampão amoniacal 0,1M, pH=9, a relação que se estabelece não é tão curvilínea como nos outros dois electrólitos de suporte utilizados.



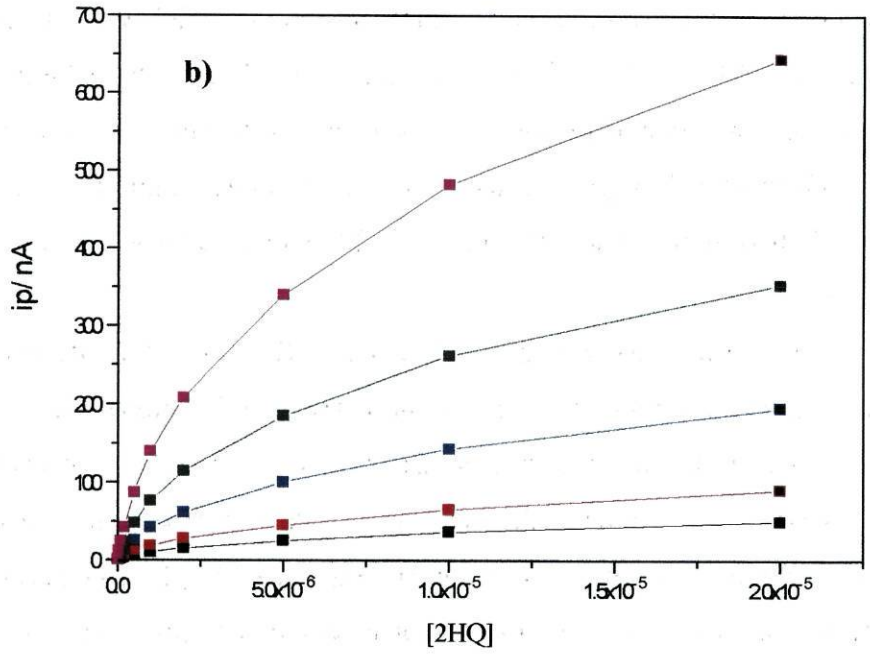


Figura 2.24 - Continua (legenda na página seguinte).

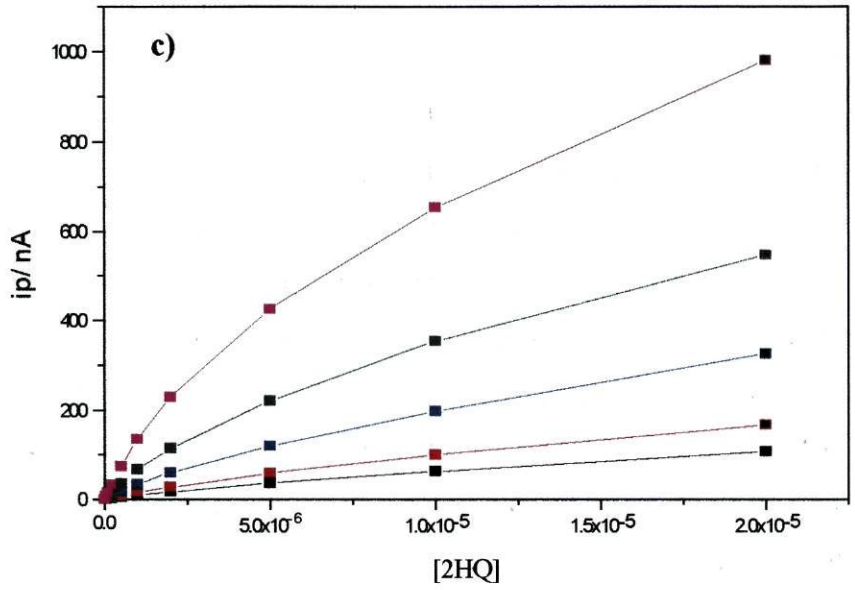


Figura 2.24 - Curvas de calibração da 2-hidroxiquinoxalina obtidas por voltametria de onda quadrada, a diferentes frequências e em diferentes electrólitos de suporte.
Electrólitos de suporte: **A-** solução HCl 0,1M, pH=1; **B-** solução tampão acetato 0,1M, pH=5; **C-** solução tampão amoniacal 0,1M, pH=9.
Frequência de onda quadrada: (■) 10Hz; (■) 20Hz; (■) 50Hz; (■) 100Hz; (■) 200Hz.
(Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; acumulação durante 30s a -200mV).

A razão para a falta de linearidade da relação entre a intensidade de corrente do pico e a concentração da 2HQ não se encontra devidamente determinada, embora se verifique experimentalmente que à medida que a concentração da 2HQ aumenta, o pico resultante tem tendência a alargar e, em HCl 0,1M, pH=1, e em tampão acetato 0,1M, pH=5, é mesmo distinguível o desdobramento do pico para as concentrações mais elevadas. Atendendo a estes resultados e ao facto de se ter verificado que a 2HQ adsorve rapidamente no eléctrodo de mercúrio pode-se admitir que o comportamento não linear observado poderá ser uma consequência das características invulgares de adsorção deste composto.

2.4.2 - DETERMINAÇÃO DE DIACETILO APÓS DERIVATIZAÇÃO COM A O-FENILENODIAMINA

Nesta aplicação pretendeu-se verificar se a elevada sensibilidade obtida na determinação da DMQ podia ser aproveitada para a análise do diacetilo após derivatização com a o-fenilenodiamina para formar a DMQ. A diferença principal entre a

determinação directa de uma solução de DMQ e a determinação da DMQ resultante da reacção de derivatização reside na existência em solução de excesso de o-fenilenodiamina que pode influenciar a determinação.

Na figura 2.25 apresentam-se os voltamogramas por onda quadrada de uma solução de diacetilo $2x10^{-8}$M derivatizado com uma solução de 0,05% de OFDA em tampão fosfato 0,1M, pH=7, obtidos a diferentes frequências. As condições de derivatização utilizadas foram as desenvolvidas na Parte III. Conforme se pode observar, o aumento da frequência faz aumentar a amplitude do pico; contudo, para a frequência mais elevada (200Hz) observa-se uma distorção apreciável no voltamograma, provavelmente ocasionada pela intensidade de corrente capacitiva, pelo que a frequência de 100Hz é mais adequada para a determinação.

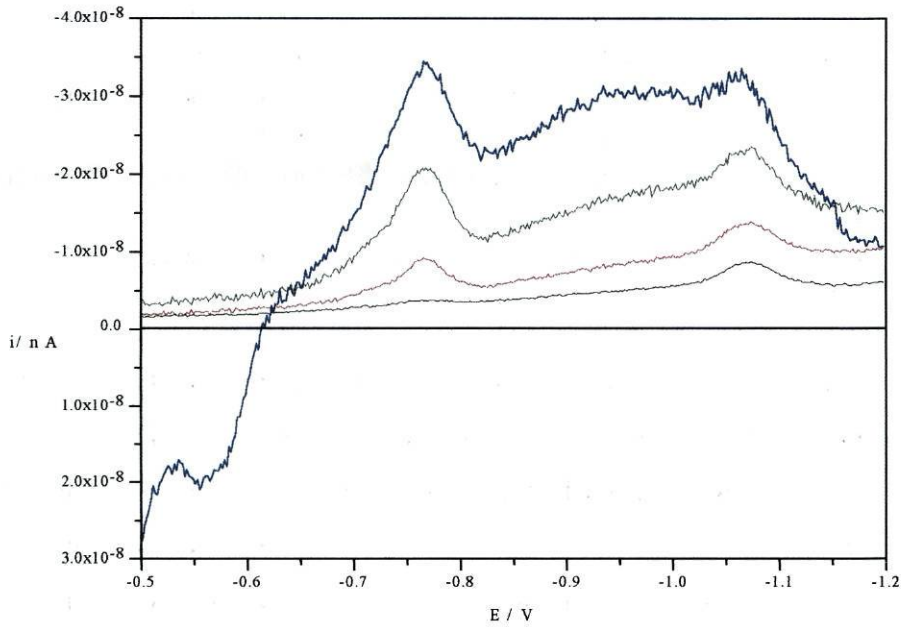


Figura 2.25 - Voltamogramas por onda quadrada de uma solução de diacetilo $2x10^{-8}$M, derivatizada com 0,05% de OFDA, para diferentes frequências de onda quadrada. Frequências de onda quadrada (Hz): (—) 25; (—) 50; (—)100; (—)200.
(Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 0,05% de OFDA; 3 minutos de tempo de derivatização; sem acumulação).

O efeito da acumulação prévia foi também verificado através da realização de voltamogramas a 100Hz de uma solução de diacetilo $2x10^{-8}$M derivatizado com OFDA 0,05% utilizando diferentes intervalos de tempo de acumulação. Como se pode observar na figura 2.26, o efeito da acumulação não faz aumentar consideravelmente a amplitude

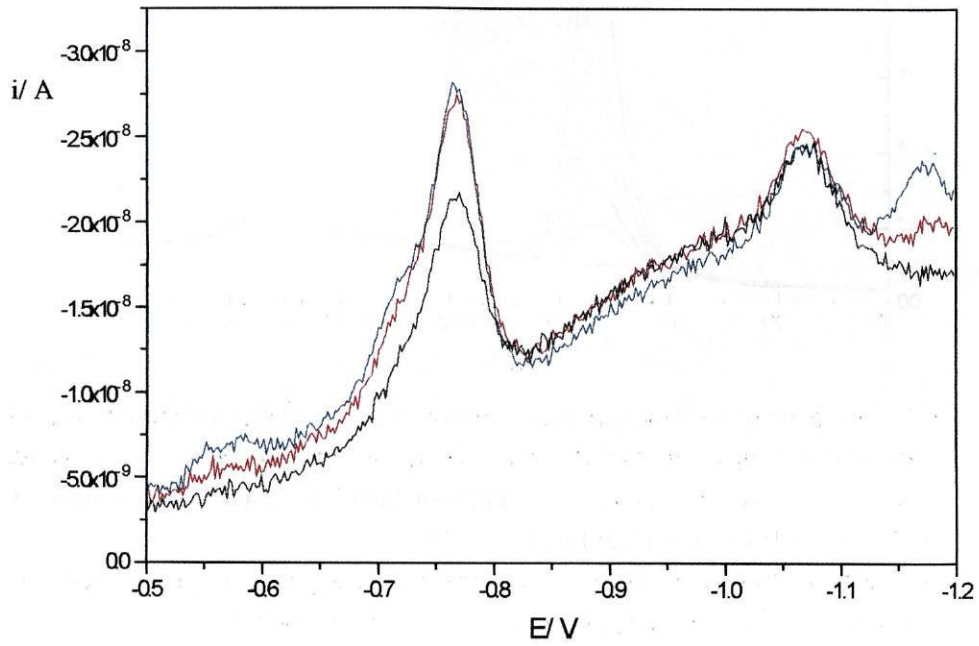


Figura 2.26 - Voltamogramas por onda quadrada de uma solução de diacetilo $2x10^{-8}$M, derivatizada com 0,05% de OFDA, para diferentes tempos de acumulação. Tempo de acumulação (s): (—) 0; (—) 30; (—) 60.
(Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 0,05% de OFDA; 3 minutos de tempo de derivatização; frequência de 100Hz).

do pico voltamétrico, dando origem, por outro lado, ao alargamento do pico. Por esta razão, a acumulação não traz vantagens analíticas para esta determinação.

Procedeu-se de seguida ao estabelecimento de uma curva de calibração através da adição sucessiva de solução de diacetilo a uma solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,05% de OFDA presente na célula polarográfica. Entre cada adição de solução de diacetilo, e antes de proceder ao registo do respectivo voltamograma, deixou-se borbulhar azoto durante 3 minutos para que a derivatização ocorresse. Os voltamogramas, obtidos à frequência de 100Hz e sem acumulação, estão representados na figura 2.27 Na figura 2.28 apresenta-se a recta de calibração e os respectivos parâmetros, obtidos por regressão linear.

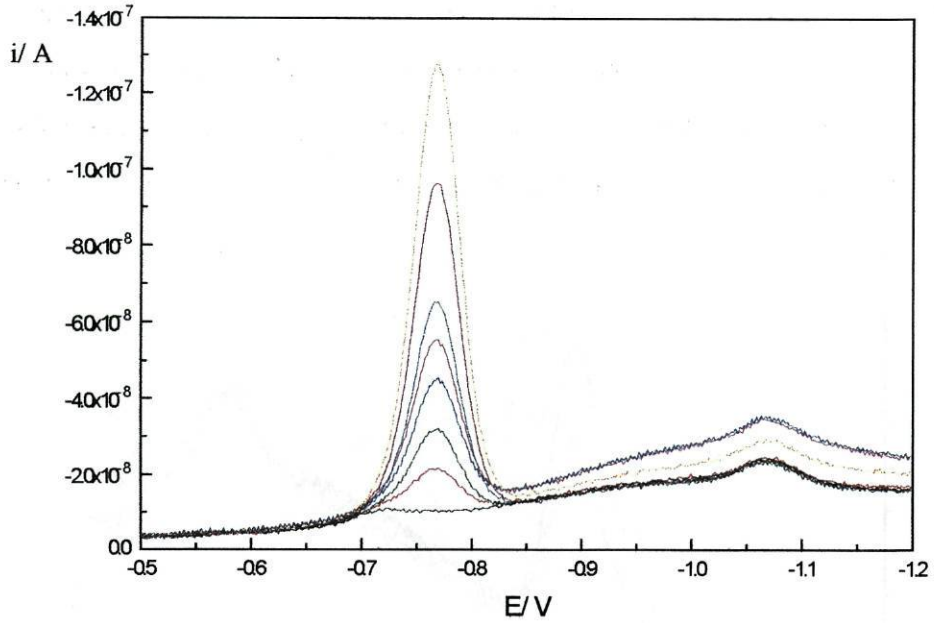


Figura 2.27- Voltamogramas por onda quadrada correspondentes à adição sucessiva de diacetilo a uma solução tampão fosfato 0,1M, pH=7, contendo 0,05% de OFDA.. Concentração de diacetilo resultante na célula (M): (—) 0; (—) $2x10^{-8}$; (—) $4x10^{-8}$; (—) $6x10^{-8}$; (—) $8x10^{-8}$; (—) $1x10^{-7}$; (—) $1,5x10^{-7}$; (—)$2x10^{-7}$.
(frequência= 100Hz; amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 0,05% de OFDA; 3 minutos de tempo de derivatização; sem acumulação).

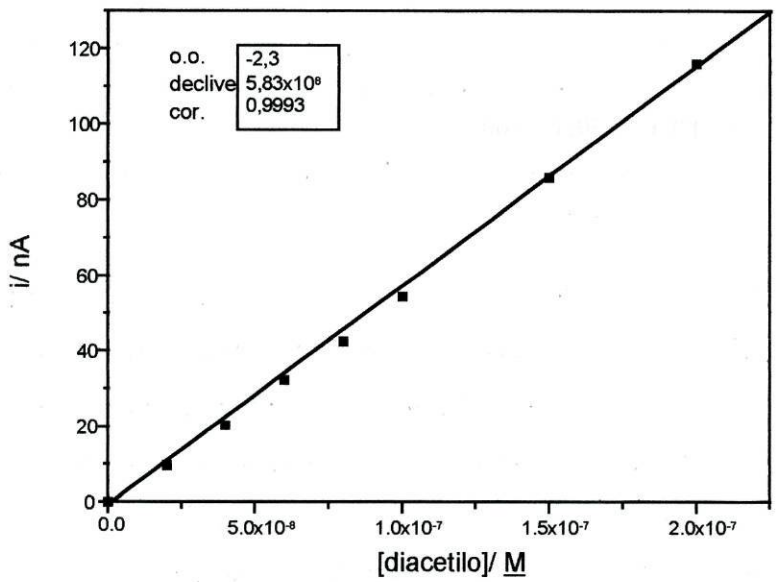
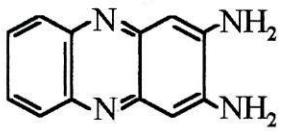


Figura 2.28- Curva de calibração de diacetilo obtida por voltametria de onda quadrada após derivatização em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7, na presença de 0,05% de OFDA.
(frequência= 100Hz; amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 3 minutos de tempo de derivatização; sem acumulação).

Conclui-se assim que é possível utilizar a voltametria de onda quadrada para fazer determinações de diacetilo após derivatização com a OFDA. Embora a presença de OFDA provoque alterações na resposta voltamétrica da DMQ, verifica-se ser possível fazer a determinação deste composto para níveis de concentração bastante baixos. A acumulação não se revelou vantajosa, uma vez que ocasiona um ligeiro aumento do pico mas, simultaneamente, provoca o seu alargamento.

2.4.3 - Influência da frequência no sinal do composto resultante da decomposição da o-fenilenodiamina

As soluções de OFDA são instáveis, amarelecendo lentamente ao longo do tempo. O aparecimento desta coloração reflecte a lenta decomposição da OFDA, cujo principal produto é a 2,3-diaminofenazina[148,149], cuja estrutura é a seguinte:



A decomposição da OFDA é responsável por dificuldades nas determinações espectrofotométricas devido ao facto dos compostos resultantes da decomposição apresentarem bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda das quinoxalinas. Nos ensaios polarográficos não foram detectados os compostos resultantes da decomposição da OFDA e, por isso, assumiu-se sempre ao longo deste trabalho que não eram polarograficamente activos. A estrutura de tais compostos sugeria, no entanto, que pudessem ser reduzidos polarograficamente, já que são compostos heterocíclicos, com um anel heterocíclico semelhante ao das quinoxalinas.

Nestes ensaios procedeu-se à análise de uma solução de diacetilo $5x10^{-7}$M, após derivatização com uma solução de OFDA 0,1% em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7. A análise por voltametria de onda quadrada foi feita utilizando diferentes frequências. Os vários voltamogramas obtidos podem ser observados na figura 2.29.

Os resultados obtidos são bastante inesperados pois mostram que, ao contrário do que se supôs, efectivamente o produto da degradação da OFDA é electroquimicamente activo e, igualmente, adsorve no eléctrodo de mercúrio. Tal como

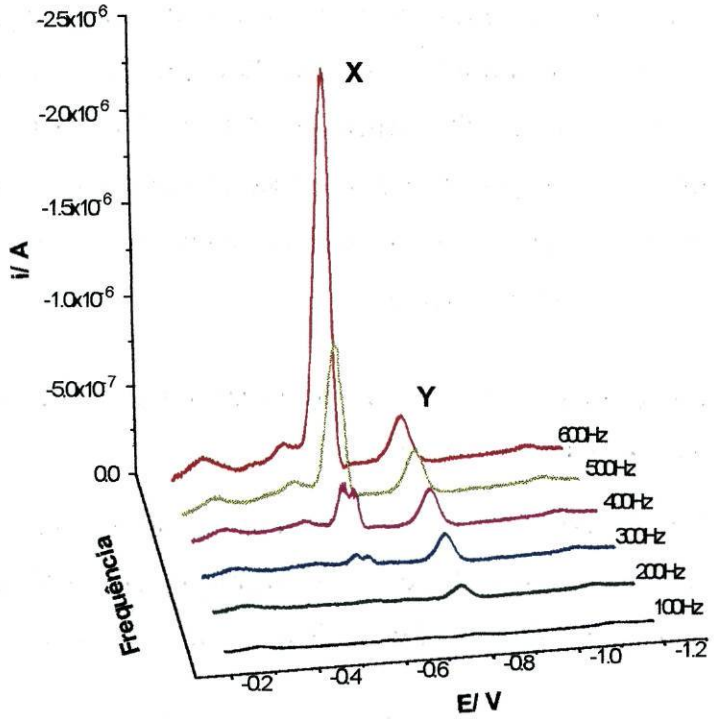


Figura 2.29- Voltamogramas por onda quadrada do produto da derivatização de diacetilo $5x10^{-7}$M (**Y**) com OFDA 0,1% em tampão fosfato 0,1M, pH=7, para várias frequências de onda quadrada. (**X**) representa o pico da 2,3-diaminofenazina.
(Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV; 30s de acumulação a -200mV).

para a DMQ, verifica-se que a sua redução é reversível e que o produto permanece adsorvido no eléctrodo, embora o seu potencial de redução característico seja menos catódico do que o da DMQ. Deste modo, o não aparecimento do sinal da 2,3-diaminofenazina (**X**) nos ensaios realizados até aqui pode encontrar explicação em dois factores: por um lado, não se atingem níveis de concentração para os quais se torne evidente o sinal proveniente da difusão da espécie, uma vez que se utiliza soluções recém-preparadas, que são mantidas ao abrigo da luz e o tempo de realização da análise é relativamente curto; por outro lado, a espécie que se encontra adsorvida reage muito rapidamente e, por isso, só é detectada nas técnicas por impulsos se a amostragem da intensidade de corrente for feita imediatamente após a aplicação do impulso, ou seja, para frequências muito elevadas.

Estes resultados realçam um aspecto de grande interesse analítico, relacionado com o diferente modo como evolui a sensibilidade da determinação de duas espécies com a frequência de onda quadrada. Em princípio parece ser possível ajustar a sensibilidade

para a determinação de um composto, com base na modificação das características temporais do varrimento por impulsos que é efectuado. Deste modo podem-se desenvolver aplicações analíticas interessantes baseadas na resolução de misturas de espécies adsorvidas, pois o modo como varia a sensibilidade está intimamente ligado com a reversibilidade do processo electroquímico e com a velocidade do processo de transferência electrónica dos compostos.

2.4.4 - Efeito da frequência de onda quadrada no grau de interferência do oxigénio na determinação da DMQ.

Nos casos em que quer a espécie reagente, quer o produto da sua redução electroquímica se encontram adsorvidos e confinados no eléctrodo é possível obter um grande aumento de sensibilidade através do ajuste da frequência de onda quadrada utilizada no varrimento voltamétrico. Como o aumento da amplitude do pico voltamétrico com a frequência é muito menor para o caso de espécies reagentes que não adsorvem no eléctrodo de mercúrio e que são reduzidas irreversivelmente, como é o caso do oxigénio, pode-se admitir que o aumento da frequência poderá minimizar a sua interferência nas determinações de espécies que adsorvem e que são reduzidas reversivelmente.

Nestes ensaios pretendeu-se avaliar a interferência do oxigénio nas determinações voltamétricas por onda quadrada da DMQ $2x10^{-8}$M, em meio tampão fosfato 0,1M, pH=7. Fizeram-se determinações a diferentes frequências para duas situações distintas: (1) sem borbulhar azoto pela solução e (2) fazendo borbulhar 10min de azoto pela solução antes de registar os voltamogramas. A comparação entre os voltamogramas obtidos na primeira e na segunda situação pode ser examinada na figura 2.30.

Os resultados obtidos evidenciam a diminuição da interferência da redução do oxigénio existente em solução à medida que aumenta a frequência de onda quadrada, como resultado da grande diferença existente entre os aumentos dos sinais da DMQ e do oxigénio com a frequência. Com base nestes resultados procurou-se verificar se existia a possibilidade de fazer a determinação directa do diacetilo numa amostra de aguardente, sem se recorrer à desoxigenação prévia. Para o efeito adicionou-se 1mL de aguardente

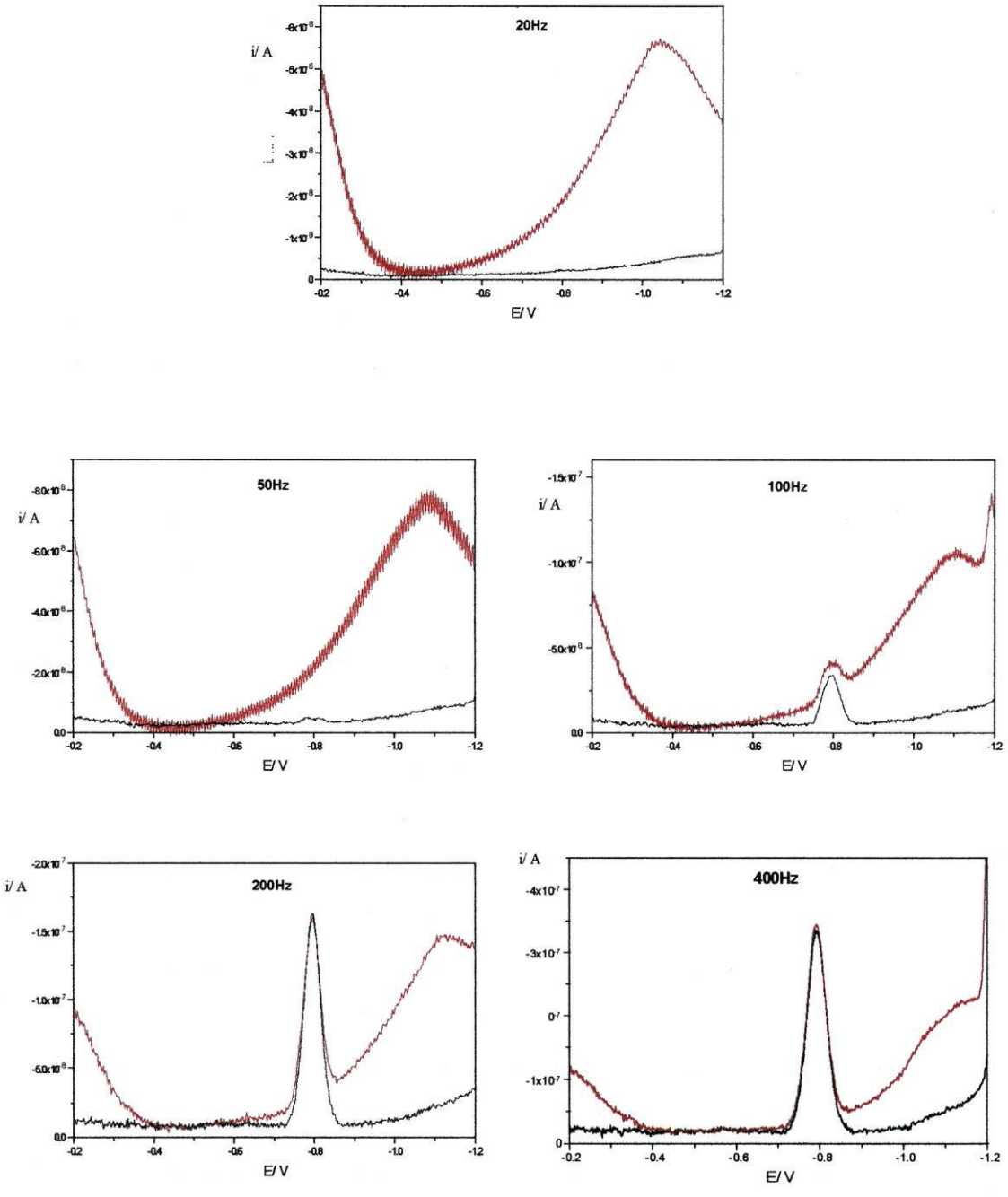


Figura 2.30- Voltamogramas por onda quadrada de DMQ $2x10^{-8}$M para diferentes frequências, sem (—) e com (—) dez minutos de passagem de azoto pela solução.
(acumulação a -200mV durante 30s; degrau de potencial= 2mV; amplitude de impulso= 20mV, tampão fosfato 0,1M, pH=7).

directamente à célula polarográfica, contendo 25mL de tampão fosfato 0,1M, pH=7, com 0,05% de OFDA, e procedeu-se à análise voltamétrica sem remoção e, posteriormente, após remoção do oxigénio. Tal como se pode observar na figura 2.31, para uma frequência de 100Hz mesmo com remoção de oxigénio é praticamente impossível fazer a determinação; no entanto, para a frequência de 400Hz a determinação já pode ser facilmente realizada, obtendo-se voltamogramas praticamente iguais com borbulhamento de azoto durante 10min ou sem qualquer passagem de azoto.

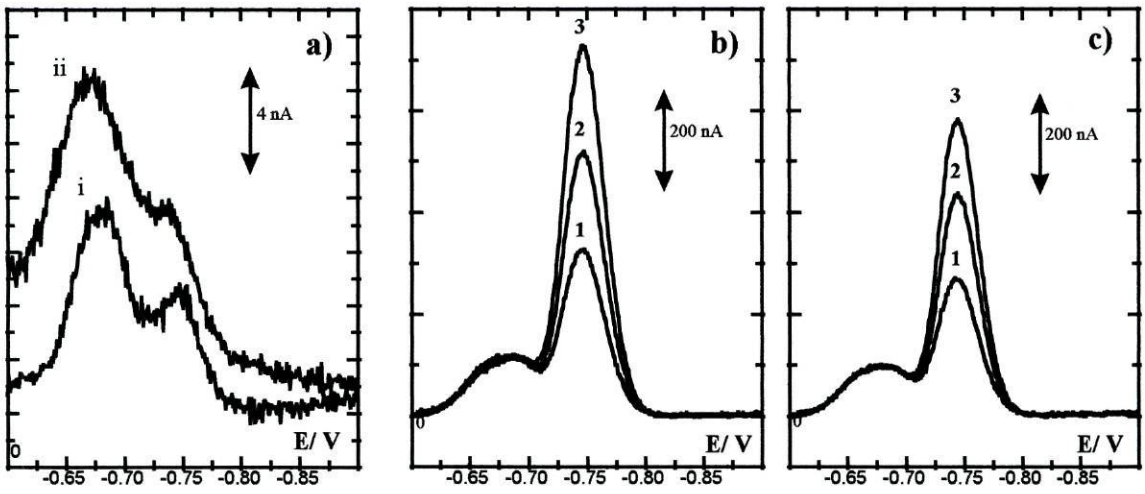


Figura 2.31 - Determinação de diacetilo na aguardente usando voltametria de onda quadrada. **a)**- efeito do tempo de acumulação, para frequência de 100Hz: i- sem acumulação; ii- 30s de acumulação (10 min de desoxigenação). **b), c)**- Adição de padrão de DMQ, para frequência de 400Hz e sem acumulação: **1, 2, 3**- amostra, $5x10^{-7}$M, $10x10^{-7}$M, respectivamente (**b)**- 10 min de desoxigenação; **c)**- sem desoxigenação.
(Amplitude de impulso= 20mV; degrau de potencial= 2mV).

Prova-se, portanto, que é possível em certos casos realizar as análises voltamétricas na presença de oxigénio, o que é um facto extremamente interessante sob o ponto de vista analítico, pois torna as determinações muito mais rápidas, fáceis de preparar e de executar. Por outro lado, essa possibilidade é igualmente interessante para o desenvolvimento de detectores voltamétricos em fluxo baseados no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, já que se consegue contornar um dos problemas tecnológicos que se tem oposto a esse desenvolvimento, que é a necessidade de desoxigenar as soluções que chegam a esses detectores[190,191,192].

CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

O trabalho que se desenvolveu permitiu demonstrar as imensas potencialidades que as técnicas electroanaliticas modernas possuem para a determinação das quinoxalinas resultantes da derivatização de compostos α-dicarbonílicos. Nalgumas das aplicações desenvolvidas ficaram bem patentes as grandes vantagens que os métodos desenvolvidos possuíam sobre os métodos habitualmente utilizados para realizar as mesmas determinações. Neste particular salienta-se as aplicações dos métodos desenvolvidos à análise de α-dicetonas vizinhas na cerveja e a análise de vitamina C em sumos de frutos; em ambos os casos ficou claro que os métodos de análise por polarografia diferencial por impulsos apresentavam características de sensibilidade e selectividade muito superiores aos métodos habitualmente empregues.

Os trabalho a desenvolver futuramente dividir-se-á em três campos que foram abertos pelo trabalho realizado no âmbito desta dissertação: (1) a continuação da aplicação dos métodos de análise desenvolvidos a outro tipo de amostras; (2) a utilização das aplicações desenvolvidas na realização de estudos relacionados com a evolução do teor desses compostos em certos produtos alimentares, como factores caracterizadores da sua qualidade; e (3) a exploração das técnicas de varrimento por impulsos rápidos, como a voltametria de onda quadrada a frequência elevada, para o desenvolvimento de novas aplicações no âmbito da voltametria com adsorção e para o desenvolvimento de detectores voltamétricos baseados no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, devido a, nalguns casos, não ser necessário desoxigenar as soluções.

BIBLIOGRAFIA

1 - Peter Sykes, *"Guia de Mecanismos de Química Orgânica"*, tradução de M. J. O. Batista, A. M. Lobo e M. M. Martins, de "A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry", 5th edition, Longman, London, 1981. Edição da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa,1989.

2 - Thomas H. Lowry, K.S. Richardson, *"Mechanism and Theory in Organic Chemistry"*, 3rd edition, Harper & Row, Publishers, New York, 1987.

3 - R. Morrison, R. Boyd, *"Química Orgânica"*, 13ª edição, tradução de M. Alves da Silva do original "Organic Chemistry", 6th edition, Prentice - Hall, Inc., 1992. Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996.

4 - A. S. Curvelo - Garcia, *"Controlo de Qualidade dos Vinhos - Química Enológica, Métodos Analíticos"*, Instituto da vinha e do vinho, 1988.

5 - J. Ribéreau-Gayon, E. Peynaud, P. Suchaud, P. Ribéreau-Gayon, *"Science et Techinque du Vin. I-Analyse e Contrôle du Vin"*, Dunod, Paris, 1982.

6 - R. O. C. Norman, *"Principles of Organic Synthesis"*, Methuen & Co., Ltd and Science Paperbacks, London, 1968.

7 - *"Chemistry of Carbon Compounds - A Modern Comprehensive Treatise"*, Edited by E.H. Rood, Vol IV - Part B, Heterocyclic compounds, Elsevier Publishing Company, Amesterdam, 1959.

8 - Hinsberg, A., *Ann. Chem.*, **237**, 327, (1887).

9 - M. I. Abasolo, C. H. Gadzza, B. M. Fernández, *J. Heterocyclic Chemistry*, **24**, 1771 (1987).

10 - "Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous solution", edited by International Union of Pure and Applied Chemistry - Analitical Chemistry division, Commission on Electroanalytical Chemistry, Butterworths, London, 1965.

11 - A. Hodgkinson, *Clin. Chem.*, **16,** 547 (1970).

12 - E. Hückel, *Z. Physik*, **70**, 204 (1931).

13 - E. Hückel, *Z. Physik*, **76**, 628 (1932).

14 - E. Hückel, *Z. Electrochem.*, **43**, 752 (1937).

15 - P. J. Thornalley, *Biochem. J.*, **269**, 1 (1990).

16 - A. Szent-György, *"Bioelectronics - A study in celular regulation, defense and cancer"*, Academic Press, London, 1968.

17 - A. Szent-György, L. G. Egyud, J. A. McLaughlin, *Science*, **155**, 529 (1967).

18 - A. C. McLellan, S. A. Phillips, P. J. Thornalley, *Analytical Biochemistry*, **206**, 17 (1992).

19 - S. Ohmori, M. Mori, M. Kawase, S. Tsuboi, *J. Chromatogr.*, **414**, 149 (1987).

20 - Gilles P. Revel, *"Le diacetyle, les composes dicarbonyles et leur produits de reduction dans le vin"*, These pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux II - Mention enologie - Ampelologie, Bordeaux 1992.

21 - G. Del Campo, M. Carmen Lago, *Analyst*, **117**, 1343 (1992).

22 - M. Yamaguchi, J. Ishida, Z. Xuan-Xuan, M. Nakamura, T. Yoshitake, *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 203 (1994).

23 - T. Wainwright, *J. Inst. Brew.*, **79**, 451 (1973).

24 - L. C. Verhagen, R. L. de Jong, J. Strating, European Brewery Convention, Procedings of the 21st Congress, Madrid, 1987, 615.

25 - L. Pasteur, *"Étude sur le bière"*, Vol. 5, Masson, Paris, 1876.

26 - J. L. Shimwell, W. C. Kirkpatrick, *J. Inst. Brew*, **45**, 137 (1937).

27 - N. M. Morrison, D. S. Bendiak, *MBAA Technical Quartely*, **24**, 14 (1987).

28 - M. P. Galvão, *Bol. Soc. Port. Quím*, **65**, 6 (1997).

29 - T. Inoue, Proc. Conv. - Inst. Brew, 22nd, 76 (1992).

30 - N. H. Aschengreen, S. Jepsen, Proc. Conv. - Inst. Brew, 22nd, 80 (1992).

31 - Colin F. Poole, Salwa K. Poole, "Chromatography Today", Elsevier Science Publishers, New York, 1991.

32 - Amarican Society of Brewing Chemists, Inc. (USA), *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **50**, 151 (1992).

33 - R. Alvarez, E. F. Haya, M. A. Delgado, F. J. Ferrete, *J. Inst. Brew*, **95**, 21 (1989).

34 - European Brewery Convention, Analytica EBC, 4th Ed. Drauerei and Getränke - Rundschan, Zarich (1987).

35 - C. Mathis, M. N. Pons, J. M. Enganer, M. Lenoel, *Anal. Chim. Acta*, **279**, 59 (1993).

36 - Thomas M. Devlin (Ed.), *"Textbbok of Biochemistry with Clinical Correlations"*, 2nd Edition. Jonh Willey & Sons, New York, 1986.

37 - Luís S. Campo, *"Entender a Bioquímica - o metabolismo fundamental em animais e plantas"*, Escolar Editora, 1998.

38 - Zi-Jian Wang, Kiyoshi Zaitsu, Yosuke Ohkura, *J. Chromatogr.*, **430**, 223 (1988).

39 - T. Hayashi, H. Tsuchiya, H. Naruse, *J. Chromatogr.*, **273**, 245 (1983).

40 - U. Langenbeck, H. -U. Möhring, K. P. Dieckmann, *J. Chromatogr.*, **115**, 65 (1975).

41 - U. Langenbeck, A. Hoinowski, K. Mantel, H. -U. Möhring, *J. Chromatogr.*, **143**, 39 (1977).

42 - Colin F. Poole, Albert Zlatkis, *J. Chromatogr.*, **184**, 99 (1980).

43 - T. Hayashi, H. Tsuchiya, H. Naruse, *J. Chromatogr.*, **273**, 245 (1983).

44 - J. E. Spikner, J. C. Towne, *Analytical Chemistry*, **34**, 1486 (1962).

45 - Zi-Jian Wang, K. Zaitsu, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **430,** 223 (1988).

46 - P. M. Zarembski, A. Hodgkinson, *Analyst*, **87**, 698 (1962).

47 - A. A. Dias Correia, *Bioquímica nos Solos, nas Pastagens e Forragens*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1980.

48 - A. W. Williams, D. M. Wilson, *Seminars in Nephrology*, **10**, 2 (1990).

49 - C. J. Mahze, M. Menan, *J. Urol.*, **127**, 159 (1982).

50 - M. A. Saka Amini, J. J. Vallon, S. Lartillot, *Anal. Chim. Acta*, **245**, 129 (1991).

51 - C. H. Assolant - Vinet, G. Bardeletti, P. R. Coulet, *Anal. Lett.*, **20**, 513 (1984).

52 - H. E. Archer, A. E. Dormu, E. F. Scowen, R. W. E. Watts, *Clin. Sci.*, **16**, 405 (1957).

53 - H. H. Powers, P. Levantin, *J. Biol. Chem.*, **154**, 207 (1944).

54 - P. M. Zarembski, A. Hodgkinson, *Biochem. J.*, **96**, 717 (1965).

55 - E. F. Dempsey, A. P. Forbes, A. R. Melick, P. H. Henneman, *Metabolism*, **9**, 52, (1950).

56 - M. E. Ribeiro, J. S. Elliot, *Invest. Urol.*, **2**, 78 (1964).

57 - L. G. Mingen, M. M. Madappally, *Clin. Chem.*, **35**, 2330 (1989).

58 - W. G. Koolstra, B. G. Wolthers, M. Hayes, *Clin. Chim. Acta*, **170**, 227 (1987).

59 - R. A. Chalmers, R. W. E. Watts, *Analyst*, **97**, 958 (1972).

60 - H. Hughes, L. Hagen, R. A. L. Sutton, *Anal. Biochem.*, **119**, 1 (1982).

61 - Z. I. Alavi, D. B. West, *J. Am. Soc. Brew. Chwm*, **41**, 24 (1982).

62 - Documento do Centro Tecnológico da Cortiça, "*Processos de Lavagem de Rolhas*", Ed. Centro Tecnológico da Cortiça, Santa Maria de Lamas.

63 - Projecto da Norma Portuguesa, " Cortiça - Rolhas, Determinação de oxalato em rolhas pelo método enzimático", NP?.

64 - C. Hasselmann, P. A. Diop, *Sciences des Aliments*, **3**, 161 (1983).

65 - Wilhelm Friedrich, "*Vitamins*", Walter de Gruyter, New York, 1988

66 - H. -D. Belitz, W. Grosch, "*Food Chemistry*", Tradução para língua inglesa da 2ª edição, Alemã por D. Hadziyev, Springer-Verlag, Londres 1986.

67 - H. Sapper, S. O. Kang, H. H. Paul, W. Lohmann, *Z. Naturforsch*, **37**, 942 (1982).

68 - J. Z. Tillnans, *Z. Untersuch. Lebensm.*, **54**, 33 (1927).

69 - Official Methods of Analysis of the AOAC, 13th ed., W. Horwitz Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, 1980.

70 - I. Stone, "*The Healing Factor Vitamin C Against Disease*", Grosset and Dunlap, New York, 1977.

71 - M. J. Deutsch, C. E. Weeks, *J. A. O. A. C.*, **48**, 1248 (1965).

72 - C. Hasselmann. Ann. Fals. Exp. Chim., **858**, 247 (1987).

73 - R. B. Roy, A. Conetta, J. Salpeter, *J. A. O. A. C.*, **59**, 1244 (1976).

74 - T. Huang, P. T. Kissinger, *Current Separations*, **9**, 20 (1989).

75 - J. T. Vanderslice, D. J. Higgs, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 485 (1984).

76 - T. Wasa, M. Takagi, S. Ono, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **34**, 518 (1961).

77 - T. Wasa, S. Musha, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 1617 (1967).

78 - M. Fedoronko, J. Königstein, K. Linek, *J. Electroanal. Chem.*, **14**, 357 (1967).

79 - T. Wasa, S. Musha, *Bull. Univ. Osaka Pref.*, Ser. A, **17**, 139 (1968).

80 - N. E. Hoffman, T. A. Killinger, *Anal. Chem.*, **41**, 162 (1969).

81 - J. Mowbray, J. H. Ottaway, *Biochem. J.*, **120**, 171 (1970).

82 -T. Wasa, M. Orita, S. Yoshida, S. Musha, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 388 (1970).

83 - J. C. Liao, N. E. Hofffman, J. J. Barboriak, D. A. Roth, *Clin. Chem.*, **23**, 802 (1977).

84 - T. C. Cree, S. M. Hutson, A. E. Harper, *Analytical Biochemistry*, **92**, 156 (1979).

85 - P. Moree-Testa, Y. Saint-Jalm, *J. of Chromatogr.*, **217**, 197 (1981).

86 - L.I. Woolf, C. Hasinoff, A. Perry, *J. of Chromatogr.*, **231**, 237 (1982).

87 - S. Hara, Y. Takemori, T. Iwata, M. Yamaguchi, M. Nakamura, *Analytica Cchimica Acta*, **172**, 167 (1985).

88 - T. Matsuura, K. Yoshino, E. Ooki, S. Saito, E. Ooishi, I. Tomita, *Chem. Pharm. Bull.*, **33(8),** 3567, (1985).

89 - A. J. Maroulis, A. N. Voulgatopoulos, C. P, Hadjantoniou-Maroulis, *Talanta*, **32**, 504 (1985).

90 - S. Ohmori, M. Kawase, M. Mori, T. Hirota, *J. of Chromatogr.*, **415**, 221 (1987).

91 - S. Hara, M. Yamaguchi, Y. Takemori, T. Yoshitake, M. Nakamura, *Analytica Chimica Acta*, **215**, 267 (1988).

92 - P. Damiani, G. Burini, *J. A. O. A. C.*, **71**, 462 (1988).

93 - M. Yamaguchi, S. Hara, M. Nakamura, *Analytica Chimica Acta*, **221**, 163 (1989).

94 - H. K. Chung, J. D. Ingle Jr., *Analytica Chimica Acta*, **243**, 89 (1991).

95 - J. Ishida, M. Yamaguchi, T. Nakahara, M. Nakamura, *Analytica Chimica Acta*, **231**, 1 (1990).

96 - M. Otsuka, S. Ohmori, *J. of Chromatogr.*, **577**, 215 (1992).

97 - J. Ishida, S. Sunezaki, M. Yamaguchi, *J. of Chromatography*, **598**, 203 (1992).

98 - N. Horikawa, K. Hayakawa, Y. Yamada, O. Miyawaki, *Dev. Food Eng.*, Proc. Int. Congr. Eng. Food, 6th, 951 (1994).

99 - S. Musha, T. Wasa, T. Naito, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **39**, 1902 (1966).

100 - P. Zuman, *Analyst*, **117**, 1803 (1992).

101 - A. M. Bond, M. Svestka, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **58**, 2769 (1993).

102 - J. Heyrovsky, M. Shikata, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **44**, 496 (1925).

103 - D. Ilkovic, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **6**, 498 (1934).

104 - D. Ilkovic, *J. Chim. Phys.*, **35**, 129 (1938).

105 - Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, *"Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications"*, John Willey & Sons, Inc. New York, 1980.

106 - A. M. Bond, *"Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry"*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1980.

107 - J. B. Flato, *Anal. Chem.*, **44**, 75A (1972).

108 - G. D. Barker, I. L. Jenkins, *Analyst*, **77**, 685 (1952).

109 - S. A. Borman, *Anal. Chem.*, **54**, 705A (1982).

110 - Metrohm AG, CH-9100 Herisau, Switzerland.

111 - "Manual de Instruções do "Processador VA 646" e "Poste VA 647", Metrohm AG, CH-9100 Herisau, Switzerland.

112 - J. Pedrotti, L. Angnes, I. G. R. Gutz, *Electroanalysis*, **4**, 635 (1992).

113 - Eco Chimie B. V. 3508 AD Utrecht, The Netherlands.

114 - *"Autolab - Electrochemical Instruments"*, Manual de Instruções, Eco Chimie B.V. 3508 AD Utrecht, The Netherlands, 1995.

115 - G. D. Barker, A. W. Gardner, *Analyst*, **117**, 1811 (1992).

116 - J. Osteryoung, *Acc. Chem. Research*, **26**, 77 (1993).

117 - A. M. Bond, G. Heneghan, K. B. Oldham, D. J. Tucker, *J. Electroanal. Chem.*, **370**, 119 (1994).

118 - R. J. Forster, *Analyst*, **121**, 733 (!996).

119 - Louis Meites, *"Polarographic Techiniques"*, 2nd edition, Interscience Publishers, New York, 1965.

120 - M. P. Strier, J. C. Cavagnol, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4331 (!957).

121 - J. Volke, in *"Physical Methods in Heterocyclic Chemistry"*, (A. R. Katritzky, ed.), Vol. I, p. 240-241, Academic Press, New York, 1963.

122 - I. Navarro, F. Prieto, R. Rueda, *J. Electroanal. Chem.*, **366**, 127 (1994).

123 - K. B. Wiberg, T. P. Lewis, *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 7154 (1970).

124 - H. P. Van Leuwen, J. Buffle, M. Lovric, *Pure & Appl. Chem.*, **64**, 1015 (1992).

125 - P. Flegel, G. Wagner, Z. Chem., **8**, 179 (1968).

126 - C. Furlani, *Gazz. Chim. Ital.*, **85**, 1646 (!955).

127 - G. W. H. Cheeseman, *J. Chem. Soc.*, **108** (!958).

128 - G. W. H. Cheeseman, R. F. Cookson, *"The Chemistry of heterocyclic compounds* - vol 35 - *Condensed Pyrazines"*, John Willey & Sons, Inc., New York, 1979.

129 - J. Cobb, M. Haq, M. Kurshid, J. Smith, M. Palmer, *Chemical Physics*, **169**, 65 (1993).

130 - G. W. H. Cheeseman, A. R. Katritzky, S. Øksne, *J. Chem. Soc.*, 3983 (1961).

131 - N. J. Leonard, H. A. Laitinen, E. H. Mottus, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 3300 (!953).

132 - N. J. Leonard, H. A. Laitinen, E. H. Mottus, *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 4737 (!954).

133 - J. M. Rodriguez-Mellado, J. L. Ávila, J. J. Ruiz, *Can. J. Chem.*, **63**, 891 (!985).

134 -J. M. Rodriguez-Mellado, L. Camacho, R. Rodriguez-Amaro, J. J. Ruiz, *J. Electroanal. Chem.*, **177**, 69 (1984).

135 - J. M. Rodriguez.Mellado, L. Camacho, J. J. Ruiz, *J. Electroanal. Chem.*, **177**, 39 (1984).

136 - J. M. Rodriguez-Mellado, J. J. Ruiz, *J. Electroanal. Chem.*, **199**, 177 (1986).

137 - M. Ohmori, M. Takagi, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **50**, 773 (!977).

138 - J. Kozlowski, P. Zuman, *J. Electroanal. Chem.*, **226**, 69 (1987).

139 - M. Takagi, N. Motita, K. Nakata, T. Matsui, S. Sawada, *J. Electroanal. Chem.*, **320**, 121 (1991).

140 - S. Ono, M. Takagi, T. Wasa, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 4369 (1953).

141 - J. J. Ruiz, A. Aldaz, M. Dominguez, *Can. J. Chem.*, **56**, 1533 (1978).

142 -J. J. Ruiz, A. Aldaz, M. Dominguez, *Can. J. Chem.*, **55**, 2799 (1977).

143 - E. B. Whipple, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7183 (1969).

144 - J. K. Palmer, C. O. Jensen, *Anal. Chem.*, **26**, 1049 (1954).

145 - G. Mackinney, O. Temmer, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3586 (1948).

146 - G. Sadler, M. Parish, J. Davis, *J. Food Science*, **55**, 1164 (1990).

147 - P. Gjertsen, S. Undstrup, B. Trolle, *Manatschrift für Brauerei*, **17**, 232 (1964).

148 - P. J. Turcha, V. P. Chu, D. Whittern, *Anal. Biochem.*, **165**, 230 (1987).

149 -J. Mowbray, J. H. Ottaway, *Biochem. J.*, **120**, 171 (1970).

150 - M. Bader, *J. Chem. Educ.*, **57**, 703 (!980).

151 - I. L. Larsen, N. A. Hartmann, J. J. Wagner, *Anal. Chem.*, **46**, 1511 (1973).

152 - J. C. Miller, J. N. Miller, *"Statistics for Analytical Chemistry"*, Ellis Harwood Limited, 2nd ed., London, 1988.

153 - D. C. Harris, *"Quantitative Chemical Analysis"*, 3rd edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1991.

154 - M. A. Phillips, *J. Chem. Soc.*, 2395 (1928).

155 - I. Koshiishi, T. Imanari., *Anal. Chem.*, **69**, 216 (1997).

156 - M. Ohmori, Y. Tsujimoto, M. Takagi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 2033 (1983).

157 - M. Barakat, M. Abdel-Nahale, M. El-Sadr, *Anal. Chem.*, **27**, 536 (1955).

158 - D. E. Hughes, S. Van Densen, *Analyst*, **114**, 169 (1989).

159 - D. E. Hughes, *Anal. Chem.*, **57**, 555 (1985).

160 - P. Daniani, G. Burini, *J.A.O.A.C.*, **71**, 462 (1988).

161 - A. A. Barros, Dissertação para doutoramento - *"Controlo Analítico de Corantes Orgânicos Sintéticos em Medicamentos e cosméticos* - Porto, 1986.

162 - M. A. Delgado, E. F. Haya, R. Alvarez, *J. Inst. Brew.*, **95**, 25 (1989).

163 - M. Mariaud, P. Levillain, *Talanta*, **41**, 75 (!994).

164 - J. Mattessich, J. R. Cooper, A*nal. Biochem.*, **180**, 349 (1989).

165 - D. T. Englis, E. J. Fisch, S. L. Bash, *Anal. Chem.*, **25**, 1373 (1953).

166 - G. Campo, M. C. Lajo, Analyst, **117**, 1343 (1992).

167 - J. R. A. Pollock, "Brewing Science", Vol. 2, Academic Press, New York, 1981

168 - N. Morita, K. Inoue, M. Takagi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3279 (!985).

169 - N. Morita, M. Takagi, *Dev. Food Chemistry*, **13**, 54 (1986).

170 - N. Morita, Y. Daido, M. Takagi, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2753 (!984).

171 - I. Miksik, J. Gabriel, Z. Deyl, *J. Chromatogr.*, **683**, 343 (1993).

172 - B. Libert, V. R. Franceschi, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 926 (1987).

173 - M. F. Laker, A. F. Hofmann, J. D. Merese, *Clin. Chem.*, **26**, 827 (1980).

174 - M. G. Li, M. M. Madappally, *Clin. Chem.*, **35**, 2330 (1989).

175 - J. H. Glick Jr., *Clin. Chem.*, **33**, 419 (1987).

176 - J. Wang, *Amer. Lab.*, 68 (1985).

177 - R. Kalvoda, Fresenius, *J. Anal. Chem.*, **349**, 565 (1994).

178 - J. G. Osteryoung, R. A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **57**, 101A (1985).

179 - E. Laviron, in *"Electroanalytical Chemistry"*, (A. J. Bard, ed.), Vol 12, pág. 53-157, Mercel Dekker, Inc., New York, 1982.

180 - M. Lovric, M. Mlakar, *Electroanalysis*, **7**, 1121 (1995).

181 - S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, *Anal. Chim. Acta*, **305**, 248 (1995).

182 - S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, M. Branica, *J. Electroanl. Chem.*, **335**, 297 (1992).

183 - M. Lovric, *J. Electroanal. Chem.*, **218**, 77 (1987).

184 - S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **335**, 289 (1989).

185 - A. Foog, V. Zanoni, *Anal. Proc. Anal. Commun.*, **31**, 173 (!994).

186 - F. Anson, *Acc. Chem. Research*, **8**, 400 (1975).

187 - A. Foog, A. Barros, J. Cabral, Analyst, **11**, 831 (1986).

188 - A. Barros, J. Rodrigues, *Port. Elect. Acta*, **14**, 233 (1996).

189 - E. Laviron, R. Meunier - Prest, *J. Electroanal. Chem.*, **375**, 79 (1994).

190 - W. Kubiak, *Electroanalysis*, **1**, 379 (1989).

191 - A. Trojánek, K. Holub, Anal. Chim. Acta, **121**, 23 (1980).

192 - L. Taylor, Chemtech, 38 (1984).