

FERNANDA DE MELO PEREIRA

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO
VOLTAMÉTRICA DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO BUTENODIÓICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

FERNANDA DE MELO PEREIRA

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO
VOLTAMÉTRICA DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO BUTENODIÓICO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de dezembro de 2009

Prof. César Reis
(Coorientador)

Prof. Carlos Roberto Bellato

Prof. Reinaldo Francisco Teófilo

Prof. José Fernando de Paiva

Prof. Efraim Lázaro Reis
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Nossa Senhora.

À minha mãe, Ana Maria, que é a grande responsável pelas minhas vitórias, que sempre esteve ao meu lado nos momentos difíceis acreditando em meu potencial, que sempre me deu muito amor.

Ao meu pai, Sebastião Fernandes, às minhas irmãs Cinara e Cibelle e ao meu sobrinho Samuelzinho, que tanto amor e carinho me deram.

À minha irmã Nívea que foi tudo para mim, minha inspiração, minha fortaleza, aquela que em todos os momentos difíceis esteve ao meu lado ajudando e tendo muita paciência comigo, além da amizade e amor incondicional. Obrigada por existir em minha vida e fazer de cada dia um dia mais feliz.

Ao meu noivo Valdemiro que sempre me ajudou a resolver os problemas, que sempre elevou meus ânimos, dando força para alcançar cada objetivo de minha vida. Obrigada por estar ao meu lado trazendo muito carinho, amizade, amor, confiança e paciência.

Ao meu grande amigo José Ricardo que não mediu esforços para me ajudar a começar a parte experimental deste trabalho, obrigada pelos ensinamentos, pelos sábados de orientação e principalmente por ser um dos responsáveis pela realização deste trabalho.

À Julieta que me trouxe paz, tranquilidade e amizade, ajudando a melhorar o meu humor a cada dia com sua simpatia e alegria que foi muito importante na realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Luis Gustavo que mesmo a distância está sempre me ajudando, preocupado com meu bem estar e alegrando o meu dia.

Ao professor José Fernando de Paiva, pela total atenção em Ouro Preto ajudando a finalizar o trabalho, agradeço de coração!

Ao laboratório de Geoquímica (DEGEO/UFOP), pela possibilidade de utilizar as instalações nos momentos finais do trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Efraim Lázaro Reis, por todos os anos que trabalhamos juntos no LINQ, pelo aprendizado, amizade e principalmente pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao Dr. César Reis, pela eterna atenção, sugestões, discussões e por toda paciência que teve comigo e também pela amizade.

À Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz pela atenção e conselhos no preparo das amostras a serem utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Antônio Augusto Neves que sempre me aconselhou e me ensinou muito durante toda esta caminhada, com quem aprendi muito este pouco tempo que trabalhamos juntos, o meu eterno obrigada!

Ao Dr. Reinaldo e ao Dr. Bellato por aceitarem o convite para avaliar este trabalho, contribuindo com a melhoria do mesmo.

Aos demais membros da banca examinadora por aceitarem o convite para avaliar este trabalho, contribuindo para a melhoria do mesmo.

Ao Dr. Sérgio que permitiu a utilização do HPLC, ao Eduardo e ao Ricardo Natalino que me ajudaram nas leituras das amostras.

À Leandra e à Juliana Vanir que se desdobraram para me ajudar nos momentos que eu mais precisei.

À Marisa que resolveu todos os problemas que acreditei não terem solução, facilitando minha vida e me trazendo muita alegria e felicidade.

À Lívia, que sempre me ajudou no laboratório, não medindo esforços para realizar aquilo que fosse necessário para conclusão deste trabalho.

Ao Guilherme (Tupeti) que sempre esteve disposto a me ajudar, ao meu lado nas alegrias e nas tristezas fazendo minha vida mais alegre.

Ao Alex, à Odilaine e à Íris, que estiveram sempre ao meu lado sendo grandes, importantes e eternos amigos.

Ao Carlos Juliano, Angélica, Cyntia e Rose pela amizade e companheirismo.

Às moradoras da república AMEM, a Paola, Raquel e Débora, com quem dividi meus momentos de alegrias e tristezas.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram desta conquista.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Ácido Butenodióico	3
2.2. Ácido Fumárico	3
2.3. Ácido Maleico	5
2.5. Métodos analíticos para a determinação do ácido fumárico e ácido maleico	8
2.5.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ESPECTROSCÓPICOS	8
2.5.2. VOLTAMETRIA	9
2.5.2.1. INFLUÊNCIA DO PH NO POTENCIAL DE MEIA ONDA DOS ÁCIDOS FUMÁRICO E MALEICO	9
2.6. Titulação Potenciométrica	11
2.7. Métodos voltamétricos	12
2.7.1. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	13
2.8. Métodos Quimiométricos	16
2.8.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	17
2.8.2. PLANEJAMENTO FATORIAL	19
2.8.3. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	20
2.9. Validação dos métodos analíticos - conceitos das figuras de mérito	
22	
2.9.1. SENSIBILIDADE	22
2.9.2. SELETIVIDADE	22

2.9.3.	PRECISÃO.....	23
2.9.4.	EXATIDÃO.....	23
2.9.4.1.	Linearidade.....	23
2.9.4.2.	Ensaio de recuperação.....	24
2.9.4.3.	Comparação de métodos.....	24
2.9.4.4.	Limite de detecção e quantificação.....	24
2.10.	Ambiente computacional.....	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1.	Limpeza do material.....	26
3.2.	Aferição de material volumétrico.....	26
3.3.	Reagentes.....	26
3.4.	Preparo de soluções.....	27
3.5.	Instrumentação.....	29
3.5.1.	INSTRUMENTAÇÃO PARA ANÁLISES VOLTAMÉTRICAS.....	29
3.5.2.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC).....	30
3.6.	Aquisição e tratamento de dados.....	31
3.7.	Parâmetros eletroanalíticos.....	31
3.7.1.	VARIAÇÃO DO POTENCIAL EM FUNÇÃO DO PH.....	31
3.7.2.	MÉTODO A.....	32
3.7.2.1.	Aplicação da Técnica Otimizada.....	33
3.7.2.1.1.	Linearidade.....	33
3.7.2.1.2.	Repetitividade.....	34
3.7.2.1.3.	Limite de detecção e quantificação.....	34
3.7.2.1.4.	Precisão intermediária.....	34
3.7.3.	MÉTODO B.....	34
3.7.3.1.	Aplicabilidade da técnica otimizada.....	35
3.7.3.1.2.	Repetitividade.....	35

3.7.3.1.3.	Limite de detecção e quantificação.....	36
3.7.3.1.4.	Precisão intermediária	36
3.7.4.	PRÉ- TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	36
3.7.4.1.	Aplicação da técnica de recuperação	37
3.7.4.1.1.	Método A.....	37
3.7.4.1.2.	Método B.....	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1.	Efeito do pH.....	38
4.2.	Método A.....	40
4.2.1.	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.....	40
4.2.1.1.	Triagem dos fatores.....	40
4.2.2.	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	43
4.2.3.	APLICABILIDADE DA TÉCNICA OTIMIZADA	48
4.2.3.1.	Linearidade.....	48
4.2.3.2.	SENSIBILIDADE.....	50
4.2.3.3.	Limite de detecção e quantificação.....	50
4.2.3.4.	Precisão intermediária.....	50
4.3.	Método B.....	51
4.3.1.	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.....	51
4.3.1.1.	Triagem dos fatores.....	51
4.3.1.2.	Superfície de resposta.....	53
4.3.1.3.	Aplicabilidade da técnica otimizada.....	57
4.3.1.3.1.	Linearidade.....	57
4.3.1.3.2.	SENSIBILIDADE	58
4.3.1.3.3.	Repetitividade	58
4.3.1.3.4.	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	58
4.3.1.3.5.	Limite de detecção e quantificação.....	58
4.3.2.	APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RECUPERAÇÃO	58

4.3.2.1. Método A.....	58
4.3.2.2. Método B.....	60
4.3.3. AMOSTRAS	60
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Conformacional do Ácido Fumárico e do Ácido Maleico.	3
Figura 2. Hidrólise do anidrido maleico a ácido maleico.	5
Figura 3. Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada, sendo ΔE_p é o potencial de pico da onda quadrada e ΔE_s é o potencial da rampa em forma de escada (Souza et al, 2003).	14
Figura 4. Sequência de pulsos (1 – 4) aplicados em determinado período de tempo, a corrente amostrada é sempre $i_2 - i_1$ em voltametria de onda quadrada (CARVALHO, 2008).	15
Figura 5. Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B) (SOUZA et al, 2003).	15
Figura 6. Estratégia Inicial (CALADO & MONTGOMERY, 2003).	18
Figura 7. (A) planejamento composto central para dois fatores ($k=2$ e $\alpha=\sqrt{2}$). (B) Planejamento Composto Central para três fatores ($k=3$ e $\alpha=\sqrt{3}$).	21
Figura 8. (A) Instrumento voltamétrico <i>797 VA Computrace</i> . (B) Montagem completa do sistema (CARVALHO, 2008).	29
Figura 9. Célula voltamétrica do analisador polarográfico <i>797 VA Computrace</i> (CARVALHO, 2008).	30
Figura 10. Medidor de pH acoplado ao aparelho <i>797 VA Computrace</i> (CARVALHO, 2008).	30
Figura 11. Voltamogramas do ácido fumárico e do ácido maleico simultaneamente em diferentes valores de pH.	39
Figura 12. Curvas de titulação do ácido maleico e do ácido fumárico	39
Figura 13. (A) Gráficos de valores observados vs. valores previsto. (B) Gráfico dos resíduos.	45
Figura 14. (A) Superfície de resposta com a variável Incremento de voltagem fixa no nível (1), 20mV. $X_2 = AM$ (94,8 mV), $X_3 = FR$ (99,5 Hz) em termos de	

variáveis codificadas. (B) Projeção da superfície de resposta. A legenda mostra os valores da corrente em nA, obtidos no ensaio.....	46
Figura 15. Voltamograma do ácido maleico e do ácido fumárico utilizando a SWV com os valores da $X_2 = 0$ e $X_3 = 1,682$	47
Figura 16. Voltamogramas do ácido maleico e do ácido fumárico utilizando a SWV com os valores do ponto A, $X_2 = 94,8\text{mV}$ e $X_3 = 99,5\text{Hz}$	47
Figura 17. Voltamograma referente ao estudo do comportamento da corrente para avaliação da faixa de trabalho.	49
Figura 18. Em (A) e (B) observam-se as curvas de adição padrão do comportamento da resposta voltamétrica em função da variação da concentração do ácido maleico e do ácido fumárico por SWV.....	49
Figura 19. (A) Gráficos de valores observados vs. valores previsto. (B) Gráfico dos resíduos.	54
Figura 20. Erro relativo em porcentagem das medidas experimentais.	55
Figura 21. (A) Superfície de resposta com a variável Frequência (FR) fixada no nível (0), 55 Hz. $X_1 = \text{IV}$ (7mV), $X_2 = \text{AM}$ (53,75 mV) em termos de variáveis codificadas. (B) Projeção da superfície de resposta. As legendas mostram os valores da corrente em nA, obtidos em cada ensaio.....	56
Figura 22. Voltamograma do ácido butenodióico utilizando a SWV com os valores do ponto A, $X_1 = 1,0$ (7,00 mV) e $X_2 = 0,5$ (53,75 mV).	56
Figura 23. (A) Voltamograma de onda quadrada referente ao estudo do comportamento da corrente para avaliação da faixa de trabalho. (B) Observe-se a curva de adição padrão do comportamento da resposta voltamétrica em função da variação da concentração do ácido butenodióico.	57
Figura 24. Voltamograma de onda quadrada da amostra referência.	59
Figura 25. Análise por adição padrão com detecção de $8,14 \text{ mgL}^{-1}$ para o ácido fumárico e $4,06 \text{ mgL}^{-1}$ para o ácido maleico.	59
Figura 26. Voltamograma de onda quadrada da amostra referência. Análise por adição padrão com detecção de $12,16 \text{ mgL}^{-1}$ para o ácido butenodióico.	60
Figura 27. Voltamogramas das amostras de suco de maçã analisadas utilizando	

os parâmetros otimizados do Método A.	61
Figura 28. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.	61
Figura 29. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.	61
Figura 30. Voltamogramas das amostras de suco de maçã analisadas utilizando os parâmetros otimizados do Método B.	62
Figura 31. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.	62
Figura 32. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.	63

RESUMO

PEREIRA, Fernanda de Melo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2009. **Otimização da metodologia de determinação dos isômeros do ácido butenodióico por Voltametria de onda quadrada.** Orientador: Efraim Lázaro Reis. Co-orientadores: César Reis e Maria Eliana Ribeiro de Queiroz.

O ácido butenodióico apresenta-se sob a forma de dois isômeros geométricos: o ácido fumárico e o ácido maleico. A ocorrência natural destes ácidos em sucos de maçã em níveis maiores que 3 mg.L^{-1} pode ser devida ao metabolismo de alguns fungos ou bactérias presentes na própria maçã. O ácido fumárico e o ácido maleico são reduzidos eletroquimicamente em soluções ácidas em um mesmo valor de potencial, sendo determinados na forma de ácido butenodióico. Em soluções cujo pH é igual a 8,20, é possível a diferenciação dos dois ácidos pois a redução dos mesmos ocorre em potenciais diferentes. O presente trabalho descreve o processo de otimização da determinação do ácido fumárico e do ácido maleico em amostras de suco de maçã utilizando solução de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 mol.L^{-1} como eletrólito suporte (Método A), e a otimização da determinação do ácido butenodióico (Método B) utilizando como eletrólito suporte solução de HCl 30%(v/v). As varreduras catódicas foram realizadas por voltametria de onda quadrada com o uso do eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE). Em ambos os métodos foram realizados planejamento fatorial fracionário e planejamento fatorial completo. A superfície de resposta de cada método foi determinada utilizando o planejamento composto central. Os resultados obtidos nas condições otimizadas apresentaram resposta linear no intervalo de 4,0 a 50 mg.L^{-1} para o ácido fumárico obtendo limite de detecção e quantificação de $0,0689 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,100 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Para o ácido maleico, a resposta linear obtida foi de 2,5 a 25 mg.L^{-1} obtendo um limite de detecção e quantificação de $0,0108 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,0209 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, pelo Método A. Usando o Método B, a resposta linear foi obtida no intervalo de 2,15 a $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo obtidos limites de detecção e quantificação de $1,04 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,32 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. As amostras de suco de maçã foram previamente tratadas utilizando o processo de extração em fase sólida e na análise voltamétrica elas foram fortificadas com soluções de ácidos fumárico e maleico, sendo obtidos

valores de recuperação dos ácidos, de 99,39% e 98,77%, respectivamente, pelo Método A. Usando o Método B, a porcentagem de recuperação do ácido butenodióico foi de 99,51%. A otimização dos parâmetros voltamétricos para determinação do ácido butenodióico e de seus isômeros foi planejada considerando fatores como tempo de execução do experimento, sensibilidade, seletividade e baixos limites de quantificação.

ABSTRACT

PEREIRA, Fernanda de Melo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2009. **Optimization of the methodology for determining the butanedioic acid isomers by square wave voltammetry.** Adviser: Efraim Lázaro Reis. Co-advisers: César Reis and Maria Eliana Ribeiro de Queiroz.

The butanedioic acid has two geometric isomers: the fumaric and maleic acids. The natural occurrence of these acids in apple juice at levels greater than 3 mg L^{-1} may be due to the metabolism of some fungi or bacteria present in the apple itself. The fumaric and maleic acids are electrochemically reduced in acid solutions in the same potential value, and they are determined in the form of butanedioic acid. In solution whose pH is 8.20, it is possible to differentiate the two acids as the reduction of both acids occurs in different potentials. This present work describes the optimization process of the fumaric and maleic acids determination in samples of apple juice using $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 mol L^{-1} solution as supporting electrolyte (Method A), and the optimization of the butanedioic acid determination (Method B) using HCl 30% (v/v) solution as supporting electrolyte. The cathodic scans were performed by square wave voltammetry with hanging mercury drop electrode (HMDE). In both methods, a fractional factorial design and a complete factorial design were performed; also, the response surface of each method was determined using a central composite design. The results obtained at the optimized conditions showed linear response in the range of 4.0 to 50 mg L^{-1} for fumaric acid, and limits of detection and quantification of 0.0689 mg L^{-1} and 0.100 mg L^{-1} , respectively. For the maleic acid, linear response was obtained in the range of 2.5 to 25 mg L^{-1} , with limits of detection and quantification of 0.0108 mg L^{-1} and 0.0209 mg L^{-1} , respectively, using the Method A. Using the Method B, the linear response was obtained in the range of 2.15 to 15.0 mg L^{-1} , with limits of detection and quantification of 1.04 mg L^{-1} and 1.32 mg L^{-1} , respectively. The samples of apple juice were previously treated using the solid phase extraction process and in the voltammetric analysis they were spiked with solutions of fumaric and maleic acids, obtaining recovery of 99.39% and 98.77%, respectively, using the Method A. Using the Method B, the percentage of recovery of butanedioic acid was 99.51%. The optimization of the voltammetric parameters for the determination of butanedioic acid and its isomers was planned considering

factors such as execution time of the experiment, sensitivity, selectivity and low limits of quantification.

1. INTRODUÇÃO

O ácido butenodióico é um ácido orgânico insaturado com dois grupos carboxílicos e que apresenta isomeria geométrica. O isômero Z é o ácido maleico, já o isômero E é o ácido fumárico. A nomenclatura IUPAC para o ácido fumárico é ácido-E-butenodióico e para o ácido maleico seria o ácido-Z-butenodióico (Gulaboski et al, 2001).

O ácido maleico é usado industrialmente como matéria prima para produção do ácido málico e ácido succínico através de sua bioconversão. O ácido maleico não ocorre naturalmente, sendo portanto metabolizado por algumas bactérias (TOSHIAKI et al,1997).

O ácido fumárico e maleico podem ser reduzidos eletroquimicamente a ácido succínico. Em soluções acidificadas a diferenciação dos dois ácidos não é possível, pois ambos são reduzidos em um mesmo potencial, $E_{1/2} = -0,6$ V. É possível separar os ácidos em pH 8,0; o ácido fumárico é mais dificilmente reduzido que o ácido maleico à baixa concentração de próton (o resultado do isomerismo cis-trans) sendo que o primeiro sofre um deslocamento na onda polarográfica de 0,3V para potencial mais negativo (TARASOVA et al; 2003; METRODAT: 797 VA, 2005).

O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia de determinação do ácido fumárico e maleico separadamente em uma mesma solução, empregando a voltametria de onda quadrada, chamado de método A e otimizar a metodologia de determinação do ácido butenodióico, empregando a voltametria de onda quadrada, chamado método B. Após as otimizações das duas metodologias foram realizadas a determinação destes ácidos em amostras de suco de maçã.

As determinações voltamétricas foram realizadas em um analisador voltamétrico VA Computrace, *modelo 797, da Metrohm*. O eletrodo utilizado foi o eletrodo multi-modo (MME), que combina os eletrodos de mercúrio mais importantes em polarografia e voltametria em uma única construção.

O eletrodo de mercúrio foi utilizado no modo de eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE). Todas as condições experimentais assim como os parâmetros instrumentais para determinação da quantidade de ambos os ácidos foram otimizados utilizando a triagem dos fatores, planejamentos

fatoriais e metodologia de superfície de resposta. Dois métodos de determinação foram otimizados, o método A que utilizou como eletrólito suporte a solução tampão $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ em solução na célula voltamétrica a pH 8,20 e o método B que utilizou como eletrólito suporte o HCl 30% (v/v).

No método A a determinação dos dois ácidos separadamente é possível devido a redução de ambos em valores de potencial diferentes, permitindo a diferenciação destes ácidos em solução com pH 8,20, em amostras de suco de maçã.

No método B a determinação do ácido fumárico e do ácido maleico separadamente não é possível devido ao fato de que em solução contendo HCl 30% (v/v) os dois isômeros são reduzidos em um mesmo valor de potencial na célula eletrolítica, portanto foi feita a otimização do ácido butenodióico e sua quantificação em amostras de suco de maçã previamente tratados.

Após o processo de otimização os dois métodos foram validados, determinados os limites de detecção e de quantificação para ambos os métodos, e a quantificação do ácido butenodióico e de seus isômeros foi comparada com um método de referência, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ácido Butenodióico

O ácido butenodióico é um ácido orgânico insaturado com dois grupos carboxílicos e que apresenta isomeria geométrica. O isômero Z é o ácido maleico, já o isômero E é o ácido fumárico. A nomenclatura IUPAC para o ácido fumárico é ácido-E-butenodióico e para o ácido maleico seria o ácido-Z-butenodióico (Gulaboski et al, 2001).

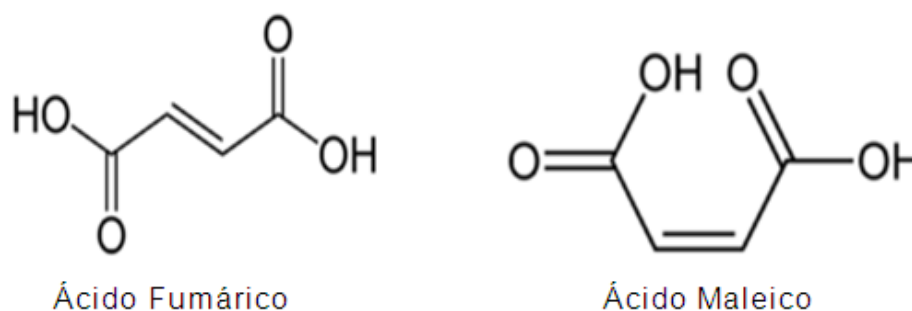


Figura 1. Estrutura Conformacional do Ácido Fumárico e do Ácido Maleico.

As estruturas dos isômeros afetam as propriedades físico-químicas. O ponto de fusão de uma substância depende do tamanho das moléculas e da possibilidade de estabelecerem interações intermoleculares entre si. O ácido fumárico possui um maior número de ligações intermoleculares, sendo mais intensas, apresentando, portanto maior ponto de fusão que o ácido maleico. O ácido maleico possui maior facilidade para realizar ligações de hidrogênio intramolecular por apresentar configuração Z (Lui et al, 2008).

2.2. Ácido Fumárico

O ácido fumárico é usado como aditivo em gêneros alimentícios e como matéria prima para produtos farmacêuticos e resinas sintéticas, e também para aliviar os sintomas da psoríase. O ácido maleico é tóxico tanto para humanos como para animais pois prejudica o sistema respiratório e o trato urinário (Gulaboski et al, 2001).

Estes ácidos orgânicos estão presentes em pequenas proporções no mel (0,5%) e podem ser usados como indicadores de deterioração

durante a estocagem, medida de pureza e autenticidade. A relação entre as formas ácida e seus sais dependem do pH do mel, do conteúdo total dos ácidos, da força iônica e da constante de dissociação dos ácidos (LUQUE et al., 2003).

O ácido fumárico foi isolado pela primeira vez da planta *Fumaria officinalis* da qual origina seu nome. É produzido quimicamente a partir de anidrido maleico, que por sua vez é produzido a partir do butano. Os fungos são conhecidos pela sua capacidade de produzir ácidos orgânicos e têm sido usados em processos de fermentação para produção de ácido fumárico (ENGEL et al, 2008).

Devido a sua estrutura ser composta de ligação dupla entre carbonos e dois grupos carboxílicos o ácido fumárico tem algumas aplicações industriais sendo portanto usado como matéria prima para a polimerização e reações de esterificação; este ácido é uma boa opção para a indústria polimérica devido a sua não toxicidade natural. As estruturas poliméricas apresentam propriedades especiais como maior dureza quando o ácido fumárico é usado como matéria prima (ENGEL et al, 2008).

As uvas utilizadas para produção de vinhos, em muitas regiões do mundo, possuem pouca quantidade de ácido fumárico para produzir vinhos de alta qualidade. Assim torna-se necessário, após a fermentação alcoólica por leveduras, a adição de agentes acidulantes como ácido fumárico, tartárico, cítrico, succínico ou láctico. Seu uso como agente acidulante é de suma importância devido a sua estabilidade biológica, seu baixo custo e devido ao seu efeito inibitório sobre a fermentação malolática.

As águas residuárias industriais produzidas pelo processo de produção do ácido fumárico, apresentam baixo valor de pH, alta concentração de tiuréia, alta demanda química de oxigênio e baixa biodegradabilidade. Para extrair o ácido fumárico destas águas residuárias utiliza-se o processo de extração líquido-líquido usando uma mistura de extrator triálquilamina, querosene e n-octanol na proporção 2:2:1, alcançando uma eficiência de extração de 70,67%. A redissolução do ácido fumárico após extração foi conseguida com solução de NaOH 2% obtendo 100% de remoção (LIS et al, 2007).

2.3. Ácido Maleico

O anidrido maleico é produzido industrialmente através de oxidação catalítica de hidrocarbonetos adequados, como benzeno ou n-butano, em fase gasosa. A catálise é baseada na utilização do vanádio e óxidos fosforosos, neste processo a água formada como bioproduto pode ser diretamente liquefeita por reação do gás de condensação parcial, sendo que mais de 98% do anidrido pode ser absorvido desta forma (ENGEL et al, 2008). A mistura solvente anidrido é submetida a destilação fracionada para separar o anidrido maleico do solvente e este último retorna a coluna de absorção, sendo o anidrido maleico hidrolisado a ácido maleico:

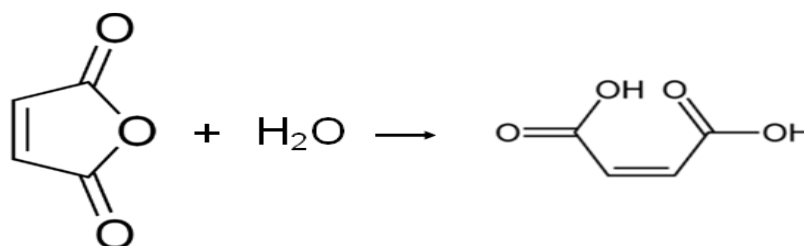


Figura 2. Hidrólise do anidrido maleico a ácido maleico.

O ácido maleico é usado industrialmente como matéria prima para produção do ácido málico e ácido succínico através de sua bioconversão. O ácido maleico não ocorre naturalmente, sendo portanto metabolizado por algumas bactérias (TOSHIKI et al, 1997).

Este ácido é convertido quantitativamente por aquecimento ou isomerização catalítica cis-trans a ácido fumárico, usando como catalisadores os ácidos minerais, peróxidos ou tiuréia. Na isomerização do ácido maleico a ácido fumárico o rendimento da conversão é limitado pelo equilíbrio da reação. Esta conversão química ocorre em altas temperaturas formando bioprodutos dos ácidos fumárico e maleico obtendo portanto menores rendimentos. Para que não houvesse a produção de bioprodutos dos ácidos foi utilizado as *Pseudomonas alcaligenes* XD-1 que proporcionaram altas taxas de conversão do ácido maleico a ácido fumárico (ENGEL et al, 2008).

O ácido maleico foi detectado como intermediário gerado durante a degradação por fotocatalise de poluentes aromáticos, pois a clivagem oxidativa do anel aromático leva a formação de ácidos carboxílicos de cadeia curta, como o ácido maleico. Desta forma, sua degradação fotocatalítica ocorre por

adsorção do Fe(III) na superfície de TiO₂ (FRANCH et al, 2005).

A eletrorredução do ácido maleico foi estudada em eletrodos de metais e misturas de metais em solução aquosa e mistura de água e acetona, acetonitrila, etanol, dimetilformamida e piridina. As medidas foram realizadas usando voltametria cíclica trabalhando com eletrodos de disco rotatório e cronovoltametria sobre eletrodos de Cu, Cd, Pt e Ta, amálgamas de Cu e Liga de Cd com Sn, Cu, In, Hg, Pb, Ni e Ag (CHURIKOV et al, 2002). Os eletrólitos suporte usados foram NaClO₄, NH₄Cl, CsCl, SrCl₂ e KI. O eletrodo de referência usado foi o eletrodo de calomelano saturado (KVRATSKHELIYA, 2000).

Segundo KVRATSKHELIYA, a redução do ácido maleico em diferentes soluções como H₂SO₄, eletrólito suporte neutro ou mistura de água com piridina é possível de ser realizada sob suas três formas: ácido monodissociado, monoânion e diânion. A forte ligação de hidrogênio intramolecular no monoânion do ácido maleico diminui a carga negativa sobre o ânion central do monoânion fazendo com que a diferença entre parâmetros cinéticos do processo sejam insignificantes, e sendo responsável pela igualdade dos coeficientes de difusão em eletrólitos suporte ácidos ou neutro.

2.4. Presença de ácido fumárico em suco de maçã

A maçã é a fruta de clima temperado de maior importância comercializada como fruta fresca no contexto internacional e brasileiro. O cultivo de maçãs é recente no Brasil e ocorreu devido ao incentivo de políticas públicas, as empresas instalaram pomares e montaram toda a infra-estrutura de câmaras frigoríficas, transporte a frio e estrutura de comercialização. A produção brasileira de maçã está concentrada na Região Sul (MELLO, 2004).

O suco de maçã é elaborado a partir de frutas que não alcançam o padrão exigido para o consumo pois apresentam defeitos oriundos de picadas de insetos, injúrias mecânicas, cicatrizes na epiderme, má formação do fruto e problemas fitossanitários (MELO, 2004). A cor e a nitidez são importantes critérios de qualidade em sucos de maçã (TULEK & YILMAZ, 2006).

O ácido fumárico não é considerado um constituinte natural do suco de maçã que tenha sido preparado sem tratamento térmico. Este ácido surge no

suco de maçã devido a desidratação do ácido málico durante as etapas de evaporação e/ou pasteurização. O conteúdo deste ácido no suco de maçã não deve exceder a $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ e sua maior concentração pode ocorrer devido a adulteração por adição de ácido málico sintético que contém o ácido fumárico como menor contaminante, ao aquecimento excessivo do produto, a contaminação do suco por microrganismos e ao processamento de maçãs estragadas ou de má qualidade.

As recentes orientações da Associação da Indústria de Sucos e Néctars de frutas e vegetais da União Européia (AIJN) não fornece o limite do ácido fumárico mas considera $5,0 \text{ mg/Kg}$ de ácido fumárico como uma concentração limite em sucos de maçã (GOKMEN & ACAR, 2004).

A inoculação de maçãs com culturas puras de fungos como *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum* e *Lactobacillus plantarum* que foram utilizados como matéria-prima para a produção de suco de maçã concentrado. O fungo *R.stolonifer* é o agente causal responsável pela presença do ácido fumárico, mas também é produzido pelo *L.plantarum* (ACAR et al, 1999). O ácido fumárico produzido por microrganismos presentes em frutas e sucos de frutas compromete a qualidade do produto final causando problemas na qualidade e perigos a saúde, por isto é aceito como critério de qualidade do produto (TULEK & YILMAZ, 2006).

A patulina é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys nivea* presentes em maçãs de má qualidade utilizadas para produzir o suco de maçã. Estudos em animais tem mostrado que a patulina tem efeito carcinogênico, mutagênico e teratogênico, sendo um importante parâmetro de qualidade de alguns produtos em termos de saúde humana (KADAKAL & NAS, 2002). Análises estatísticas de 70 amostras de sucos de maçã provaram que existe uma correlação linear entre o conteúdo de ácido fumárico e patulina nos suco de maçã obtendo um coeficiente de correlação de 0,71. Portanto a determinação do ácido fumárico está relacionado com a presença da micotoxina patulina (GOKMEN & ACAR, 1998).

O conteúdo de ácido fumárico das amostras de suco de maçã processado industrialmente aumenta após a evaporação devido a aplicação de calor que provoca a desidratação do ácido málico presente naturalmente no suco de maçã. O coeficiente de correlação entre ácido fumárico e patulina pode

ser um indicativo de ácido fumárico devido a atividade microbiana (ACAR et al, 1999).

Segundo ACAR (1999), a presença de ácido fumárico em suco de maçã é devida principalmente a degradação microbiológica das maçãs e não apenas ao uso de condições extremas no processamento e estocagem.

O ácido fumárico é formado como bioproduto na produção do ácido málico sintético e a sua presença em alta quantidade, ou seja, maior que 3 mg.L⁻¹ indica adição de ácido málico sintético, durante o processamento do suco, o conteúdo de ácido fumárico é aumentado devido a desidratação do ácido málico (TULEK & YILMAZ, 2006).

Níveis de ácido fumárico acima de quantidades traço são inconsistentes com o suco de maçã puro; portanto a medida deste ácido orgânico pode ser usado como uma verificação de autenticidade do suco. Sucos de maçã inoculados com *R.stolonifer* apresentaram níveis de ácido fumárico de 3880 mg.L⁻¹ (GOKMEN & ACAR, 1998).

2.5. Métodos analíticos para a determinação do ácido fumárico e ácido maleico

2.5.1. Métodos Cromatográficos e Espectroscópicos

Vários métodos são utilizados para determinação destes ácidos dicarboxílicos em vários tipos de amostras. Em amostras de suco de maçã o ácido fumárico foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (TULEY & YILMAZ, 2006; KADAKAL & NAS, 2002). Para o processo de clarificação do suco, o melhor método utilizado para reduzir o teor de ácido fumárico no suco, segundo TULEY & YILMAZ é a gelatina com bentonita associados a utilização do polivinilpoliprolidona, obtendo uma redução do conteúdo do ácido fumárico de 3,3 mg L⁻¹ para menor que 3,0 mg L⁻¹.

Estes ácidos orgânicos foram extraídos em amostras de mel pelo processo de extração em fase sólida utilizando o cartucho de troca iônica, o eluato foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência obtendo os valores de limites de detecção e quantificação de 0,059 mg Kg⁻¹ e 0,075 mg Kg⁻¹ para o ácido maleico; 0,0064 mg Kg⁻¹ e 0,025mg Kg⁻¹ para o ácido fumárico, respectivamente (LUQUE et al, 2002).

Foram feitos experimentos espectroscópicos no infravermelho para

investigar o comportamento da extração do ácido fumárico com o extrator utilizado amino N₇₃₀₁. Combinando a técnica de osmose reversa com extração complexa e redissolução obteve-se uma taxa de remoção total da Demanda Química de Oxigênio de 99,2%. A água residuária pode portanto ser lançada no meio ambiente (LI et al, 2008).

A técnica de Cromatografia Gasosa foi utilizada para determinação do ácido maleico, ácido fumárico e ácido succínico, afim de determinar suas emissões na atmosfera. Apenas após a aplicação do processo de derivatização envolvendo a metilação com trifluoreto de boro – metanol, pois estes ácidos possuem elevada polaridade e baixa volatilidade. Esta determinação ocorreu em indústria de resina, as amostras de ar foram coletadas da chaminé e submetidas a derivatização e analisadas por cromatografia gasosa. O coeficiente de recuperação do ácido maleico na forma de dimetilmaleato foi de 76% em um tempo de 24 horas de metilação, sendo este o principal componente encontrado nas amostras (WATHNE, 1979).

2.5.2. Voltametria

Amostras de vinho foram utilizadas para determinação de ácido fumárico utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. As amostras foram preparadas pela técnica de extração de fase sólida para posterior análise voltamétrica. O eletrodo de trabalho utilizado foi o HMDE (Eletrodo de Mercúrio de Gota Pendente), e o eletrólito suporte utilizado foi uma solução de 0,1 molL⁻¹ KNO₃ tamponada a pH 2,8 com solução de 0,1 molL⁻¹ ácido cítrico e NaH₂PO₄. Das amostras de vinho analisadas obteve-se uma concentração de ácido fumárico de 15 a 30 mg L⁻¹ (GULABOSKI et al, 2001).

2.5.2.1. Influência do pH no potencial de meia onda dos ácidos fumárico e maleico

WARSHOWSKY et al.(1947) realizaram estudo da separação das ondas polarográficas de sais de ácido fumárico e maleico. Os valores de pH estudados foram 6,8; 8,2 e 8,9 utilizando como eletrólito de suporte o tampão de hidróxido de amônio e cloreto de amônio. No valor de pH 6,8 os autores observaram uma diminuição da corrente de difusão e no valor de pH 8,9 não foi

obtida uma medição constante e estável da corrente. Já no valor de pH 8,20 ocorreu uma melhor medição de corrente de difusão. Os autores concluíram então que trabalhando com o tampão hidróxido de amônio e cloreto de amônio o melhor valor de pH para analisar os dois ácidos obtendo uma onda polarográfica para cada um é o 8,20.

O ácido fumárico e maleico podem ser reduzidos eletroquimicamente a ácido succínico. Em soluções acidificadas a diferenciação dos dois ácidos não é possível, pois ambos são reduzidos em um mesmo potencial, $E_{1/2} = -0,6$ V. Porém é possível separar os ácidos em pH 8,0; o ácido fumárico é mais dificilmente reduzido à baixa concentração de próton (o resultado do isomerismo cis-trans), que o ácido maleico, sendo que o primeiro sofre um deslocamento na onda polarográfica de 0,3V para potencial mais negativo (TARASOVA et al, 2003; METRODAT: 797 VA, 2005).

De acordo com TARASOVA et al,(2003), para determinação separada destes ácidos orgânicos, no eletrodo de grafite, é necessário que o valor de pH da solução seja ajustado para 8,0 para determinar o ácido maleico e para determinar o ácido fumárico o pH deve estar entre 10-11.

A determinação do ácido maleico e do ácido fumárico foi realizada adicionando ácido succínico na cela polarográfica juntamente com ácido clorídrico $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A leitura da onda polarográfica ocorreu usando eletrodo de grafite, não sendo necessário remover o oxigênio da solução, foi obtido um limite de detecção para os dois ácidos de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (TARASOVA et al, 2002).

O ácido maleico submetido ao processo de voltametria cíclica em meio tamponado apresentou um deslocamento catódico em relação ao potencial de pico (E_p) com o aumento do valor de pH. Uma pequena diminuição na corrente de pico (i_p) foi observada com o aumento do pH. Um único pico é dividido em dois em baixas velocidades de varredura (menores que $0,2 \text{ V s}^{-1}$) na faixa de pH de 2,5 a 4,5. A uma determinada velocidade de varredura a i_p foi alta em pH = 0 mas ocorreu uma diminuição da i_p quando o pH foi aumentado (VAGHELA et al, 2002).

Amostras de vinho foram analisadas usando a técnica de voltametria de onda quadrada. Como eletrólito suporte foi utilizada uma solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tamponada com solução tampão de ácido cítrico e NaH_2PO_4 em diferentes valores de pH. Foram obtidas curvas de potencial versus corrente

para o ácido fumárico, mostrando a importante influência do pH no potencial de redução deste ácido, deslocando a posição do pico de acordo com o aumento do valor de pH. O ácido maleico também foi analisado em diferentes valores de pH e as curvas obtidas demonstram o deslocamento do potencial para valores mais negativos enquanto ocorre o aumento do valor de pH da solução (GULABOSKI et al, 2001).

2.6. Titulação Potenciométrica

A potenciometria é o conjunto de métodos quantitativos instrumentais utilizados para determinar as concentrações e atividades de espécies iônicas em solução mediante a medição da diferenças de potenciais entre os eletrodos de referência e o eletrodo indicador, imersos na solução a ser estudada. A medida de potencial fornecida pelo eletrodo indicador combinado com o eletrodo de referência resulta em uma pilha cuja força eletromotriz (E) pode ser medida (KUTSCHENKO et al, 2005).

A titulação potenciométrica possibilita a obtenção de resultados com maior confiabilidade se comparada as titulações que utilizam indicadores químicos, sendo importante ferramenta para determinação de constante de ionização de ácidos fracos.

Na titulação potenciométrica usa-se um eletrólito suporte para manter a força iônica da solução. O ponto de inflexão da curva de titulação é o volume de equivalência. A posição do máximo da curva da primeira derivada corresponde ao ponto de inflexão da curva de titulação original (LINDBERG & KOWALSKI, 1988).

Uma vez conhecido o ponto final, a força eletromotriz da célula correspondente a esse ponto pode ser obtida a partir da curva de titulação original. O ponto final também pode ser localizado a partir da derivada segunda. No ponto final, tem-se o valor da derivada segunda igual a zero, pois o valor da ordenada muda rapidamente de valores positivos para negativos (SKOOG & LEARY, 1992).

A influência do pH sobre o potencial de redução está relacionado com as constantes de ionização dos ácidos fumárico e maleico, sendo de suma importância a determinação destas constantes.

Os valores de pKa para os dois ácidos utilizando a titulação potenciométrica varia da seguinte forma, para o ácido fumárico em meio contendo metanol é de 3,02 e 4,38 já o ácido maleico apresentou valores de pka iguais a 2,00 e 6,26. Em soluções aquosas os valores de pka para o ácido maleico foi de 1,83 e 6,07 já para o ácido fumárico foi de 3,03 e 4,44 (GARRIDO et al, 2006; LUQUE et al, 2003).

2.7. Métodos voltamétricos

A química eletroanalítica é formada por um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de uma solução do analito como corrente, potencial e carga, podendo ser aplicada em monitoramento ambiental, no controle de qualidade industrial e em análises biomédicas (SKOOG et al, 2002).

As técnicas eletroanalíticas descrevem e caracterizam eletroquimicamente determinados sistemas e fornecem limites de detecção muito baixos. Os métodos eletroanalíticos possuem propriedades específicas para um estado de oxidação particular de um elemento e sua instrumentação é relativamente mais barata quando comparada a outros equipamentos como a espectroscopia (SKOOG et al, 2002).

A voltametria é uma técnica eletroanalítica baseada na medição de corrente e potencial em células eletroquímicas de forma a obter informações qualitativas e quantitativas da espécie química em solução. Um sistema potencioestático é utilizado para obter medidas de corrente sendo dotado de três eletrodos de medida posicionados na célula eletroquímica e imersos em um eletrólito de suporte contendo o analito. O potencioestato é constituído de um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar (SOUZA et al, 2003)

A voltametria é composta de métodos em que as medidas de corrente e potencial são realizadas em eletrodos de trabalho estacionários e fixos e podem ser o eletrodo de mercúrio de gota pendente (Hanging Mercury Drop Electrode – HMDE) que apresenta a vantagem de ser um eletrodo de superfície renovável evitando assim os chamados envenenamentos de superfícies, bem como o eletrodo de filme fino de mercúrio (Thin Mercury Film Electrode – TMFE). É empregado também o eletrodo de carbono vítreo (Glassy Carbon

Electrode – GCE) o eletrodo de pasta de carbono (Carbon-Paste Electrode – CPE) e eletrodos de trabalho feitos de metais nobres (BAREK et al, 2001).

O registro do potencial aplicado e da corrente resultante proporciona a obtenção do voltamograma, uma curva da corrente versus potencial. O sinal analítico é a corrente faradáica que flui pela célula durante a reação do analito em um eletrodo de trabalho com uma pequena superfície (SOUZA et al, 2003).

A voltametria ocupa uma importante posição entre os métodos eletroquímicos para a investigação de compostos orgânicos, pois, muitos grupos funcionais podem ser oxidados ou reduzidos no eletrodo de trabalho, tornando possível a determinação de uma grande variedade de compostos (SKOOG et al, 1992).

2.7.1. Voltametria de onda quadrada

A demanda para detecção de substâncias de significância ambiental, clínica e forense em níveis traços está crescendo. As técnicas eletroquímicas, particularmente a técnica de pulso voltamétrico, tem se tornado uma poderosa e barata ferramenta em química analítica (GULABOSKI et al, 2001).

A partir da década de 50 ocorreu o desenvolvimento da voltametria de onda quadrada (SWV) quando Barker aplicou pulsos de potencial em um eletrodo gotejante de mercúrio obtendo assim a polarografia de onda quadrada (Osteryoung & Osteryoung, 1985). Esta técnica desenvolvida por Barker, por trabalhar com um sistema reversível e devido aos ruídos oriundos de fontes captadas pelo capilar de mercúrio e pela coluna, possuía uma sensibilidade limitada e influenciavam as respostas de corrente. Assim, foi realizada uma modificação da frequência de aplicação da onda quadrada, utilizou-se uma variação mais rápida na rampa de potencial afim de obter uma resposta otimizada de corrente-potencial, obtendo um limite de detecção mais amplo. O capilar de mercúrio utilizado ainda intensificava o aparecimento de ruídos externos de forma considerável nas análises (RAMALEY & KRAUSE, 1969; SOUZA et al, 2003).

Com a finalidade de eliminar os ruídos provenientes do capilar de mercúrio o eletrodo gotejante de mercúrio foi substituído por eletrodos estacionários e com a substituição da rampa linear de potencial por uma rampa de potencial na forma de escada, surgiu então a voltametria de onda quadrada

(RAMALEY & KRAUSE,1969; KRAUSE & RAMALEY,1969). Uma onda quadrada simétrica é superposta a uma rampa de potencial em forma de escada, gerando um pico simétrico que poderia ser usado nas determinações analíticas. Assim, a medida de corrente era realizada próxima ao centro do pulso, e as varreduras de potenciais eram limitadas para pequenos valores de amplitude, e portanto baixas velocidades de varredura, provocando uma perda de sensibilidade analítica.

O modelo mais atual da SWV foi desenvolvido em 1977 com o objetivo de corrigir as limitações da técnica. A medida da corrente passou a ser realizada no final do pulso direto e no final do pulso reverso de potencial possibilitando que as varreduras de corrente em função dos pulsos de potenciais aplicados fossem feitas em velocidades maiores que 100 mV s^{-1} (CHRISTIE et al, 1977).

A técnica de SWV apresenta formas de onda, representadas na Figura 3, consiste de uma onda simétrica quadrada que é sobreposta a uma rampa de potencial em forma de degraus e o resultado desta sobreposição é utilizado para leitura das correntes.

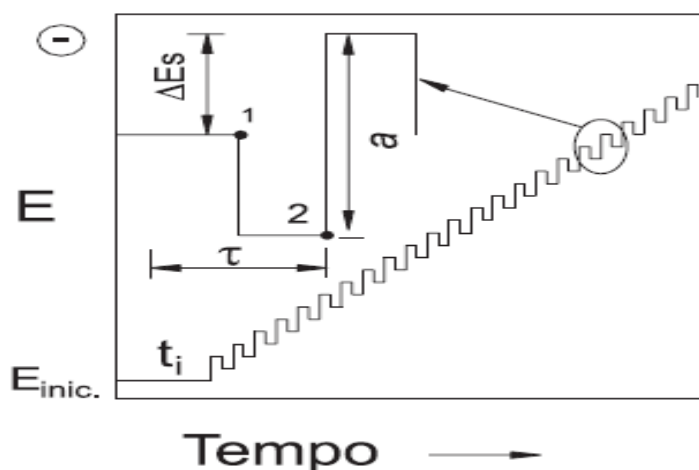


Figura 3. Forma de aplicação de potencial na voltametria de onda quadrada, sendo ΔE_p é o potencial de pico da onda quadrada e ΔE_s é o potencial da rampa em forma de escada (Souza et al, 2003).

Independente do sentido da varredura a corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto e outra ao final do pulso reverso. Isto resulta em corrente determinada a partir da diferença entre valores obtidos nos dois pontos (Figura 4).

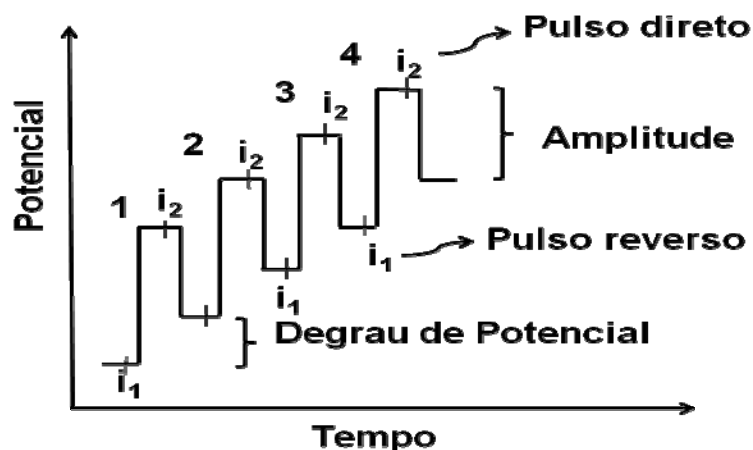


Figura 4. Sequência de pulsos (1 – 4) aplicados em determinado período de tempo, a corrente amostrada é sempre $i_2 - i_1$ em voltametria de onda quadrada (CARVALHO, 2008).

Pode-se observar na Figura 5 voltamogramas teóricos que podem ser obtidos em sistema reversível (A) e sistema irreversível (B). Como as correntes possuem sinais opostos, os picos se sobrepõem gerando um sinal maior de corrente denominada de resultante. A subtração da corrente catódica (-) e corrente anódica (+) é responsável pela maior sensibilidade da técnica quando aplicada a sistemas reversíveis (SOUZA et al, 2003).

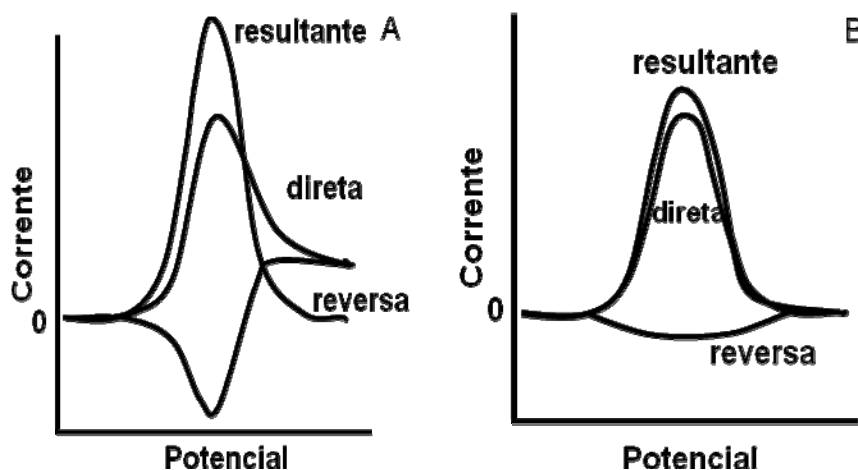


Figura 5. Voltamogramas de onda quadrada esquemáticos para um sistema reversível (A) e para um sistema totalmente irreversível (B) (SOUZA et al, 2003).

A voltametria de onda quadrada é considerada como uma técnica eletroanalítica versátil, dinâmica e sensível. As principais vantagens da técnica em comparação com as demais técnicas analíticas são sua sensibilidade, alta velocidade, pré-tratamento mínimo da amostra, seletividade satisfatória e baixo custo da instrumentação e manutenção. A aplicação de técnicas avançadas de

varredura empregando voltametria pulsada, ou seja medição de corrente no final do pulso direto e reverso, tem diminuído o problema da corrente capacitiva que dificultou as medições volumétricas por muitos anos (ECONOMOU et al, 2002; SOUZA et al, 2003; ALEIXO, 2009).

2.8. Métodos Quimiométricos

Na ciência as idéias surgem bem antes da tecnologia necessária para explorá-la. A quimiometria surgiu formalmente na primeira metade da década de 70 e se firmou realmente com a crescente utilização do computador em laboratórios químicos.

A quimiometria é uma área especificamente destinada a análise de dados químicos de natureza multivariada. Ela se propõe a resolver problemas de interesse e originados na química utilizando ferramentas de trabalho provenientes principalmente da matemática, estatística e computação. Sendo assim, “a quimiometria é uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos” (FERREIRA et al, 1999).

No final da década de 70, o Brasil ainda não dispunha de microcomputadores e os cálculos muito extensos eram feitos em computadores de grande porte que funcionavam em centros de computação. O grande avanço computacional ocorreu em 1985 com o aparecimento de microcomputadores de 16 bits os primeiros PCs. Estes PCs permitiam a execução em um determinado micro de um programa que tinha sido compilado por outro, facilitando a transferência dos programas computacionais de quimiometria de um grupo de pesquisa para outro. Algumas indústrias nacionais mostraram muito interesse pela aplicação de métodos eficientes de otimização.

Nos últimos anos da década de 80, aumentou a demanda das universidades e empresas por cursos de quimiometria. O trabalho com a indústria estimulou o grupo da Unicamp a desenvolver outros programas computacionais para tratar dados gerados por experimentos estatisticamente planejados, como planejamentos fatoriais completos ou fracionários,

planejamentos compostos centrais e planejamento de misturas. Do ponto de vista computacional, fazer cálculos quimiométricos com centenas de amostras e milhares de variáveis hoje é coisa rotineira (NETO et al, 2006).

Devido aos recentes avanços em “hardware” e “software” a aquisição de dados na área de química analítica foi bastante satisfatório devido ao interfaceamento de instrumentos aos computadores produzindo uma enorme quantidade de informação complexa e variada.

Observa-se métodos quimiométricos em química analítica, porém pouco desta literatura tem se dedicado ao campo da eletroquímica e eletroanalítica (CORREIA et al, 2007).

2.8.1. Planejamento experimental

A utilização de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, possibilita aos pesquisadores extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil realizando um número mínimo de experimentos.

A atividade estatística mais importante é o planejamento dos experimentos para a obtenção de dados, para evitar um grande número de informações sem importância para o trabalho realizado. Para realizar um bom planejamento deve-se projetar um experimento de forma a obter informações que sejam úteis (NETO et al, 2002).

Atualmente o planejamento experimental está sendo usada em grande escala para determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo. Sua utilização possibilita a redução da variação do processo e melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos, redução do tempo do processo e do custo operacional e melhoria no rendimento do processo (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

O planejamento de experimentos tem como princípios básicos a replicação, aleatoriedade e blocagem.

Realizar um experimento com réplicas é útil por permitir a obtenção do erro experimental e da estimativa do erro afim de verificar se os erros são estatisticamente diferentes; a replicação permite a obtenção de uma estimativa mais precisa de um determinado fator do experimento.

Os experimentos com suas réplicas devem ser realizados de maneira

aleatória, garantindo a distribuição dos fatores não considerados. Sendo assim, os erros ou as observações devem ser variáveis aleatórias distribuídas independentemente.

A blocagem é utilizada quando uma determinada medida experimental é realizada por duas pessoas diferentes levando a uma possível não homogeneidade nos dados. Controlando e avaliando sistematicamente a variabilidade resultante da presença de fatores conhecidos que perturbam o sistema, mas que não se tem interesse em estudá-lo (CALADO & MONTGOMERY, 2003; NETO et al, 2002).

As experiências devem ser realizadas sequencialmente e a Figura 5 apresenta um resumo desta estratégia inicial de realização de um experimento.

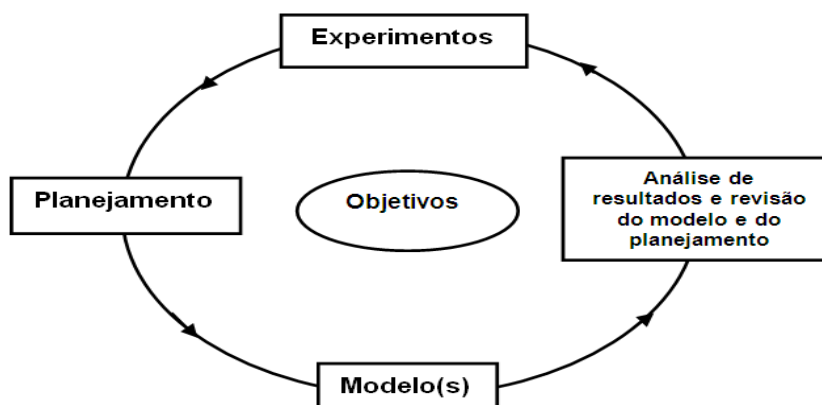


Figura 6. Estratégia Inicial (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Para realização de um planejamento fatorial deve-se primeiramente selecionar o melhor modelo. Todo experimento começa com uma série de experimentos afim de definir as variáveis qualitativas ou/e quantitativas e os níveis que são mais importantes. Os resultados devem ser analisados e se necessário devem ser feitas algumas modificações. Após selecionar as variáveis de maior significância deve-se levar em consideração o tempo e o custo para realização deste experimento, ou seja, avaliar a metodologia experimental. Desta forma, as variáveis não selecionadas devem ser fixadas durante todo o experimento.

A realização da triagem dos fatores, as interações principais e de segunda ordem entre as variáveis obtidas pelos planejamentos fatoriais completos ou fracionários são muito importantes para compreender o

comportamento do sistema.

O planejamento experimental permite eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

2.8.2. Planejamento fatorial

O planejamento fatorial é utilizado quando se tem duas ou mais variáveis independentes, fatores. Esta técnica é bastante útil para medir os efeitos de uma ou mais variáveis na resposta de um processo. Normalmente usa-se um planejamento com dois níveis, no máximo três, pois planejamentos com número maior de níveis torna-se inviável em estudos de variáveis (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

O planejamento fatorial fracionário é utilizado para realizar uma triagem dos fatores em estudo e descartar as variáveis não significativas afim de economizar tempo e dinheiro no laboratório.

O planejamento fatorial completo tem como objetivo avaliar quantitativamente a influência dos fatores sobre a resposta de interesse, assim como as possíveis interações de uns fatores com os outros.

A representação de um planejamento fatorial em dois níveis é 2^k , onde 2 significa o número de níveis e k o número de fatores. É comum codificar as variáveis utilizando os sinais mais (+) e menos (-) aos níveis superiores e inferiores respectivamente, de forma arbitrária sem interferir na realização do experimento ou interpretação dos resultados.

O planejamento fatorial completo é a única maneira de prever a interação entre todos os fatores. O efeito principal é referente aos fatores primários de interesse do experimento. Quando a diferença na resposta entre os níveis de um fator não é igual a todos os níveis de outros fatores ocorre uma possível interação entre estes fatores e é possível calcular o valor do efeito de interação entre estas duas variáveis.

Softwares estatísticos como MINITAB[®] e o STATISTICA[®] podem ser utilizados para realizar a análise de dados e proporcionam a utilização de técnicas de planejamento e análise de experimentos (NETO et al, 2002).

Para realizar a otimização do experimento os fatores significativos

selecionados após experimentos de triagem são utilizados em uma metodologia de superfície de resposta.

2.8.3. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (RSM, de Response Surface Methodology) é uma técnica baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G.E.P.Box nos anos 50 (NETO et al, 2002).

A superfície de resposta deve ser utilizada quando as variáveis de resposta são influenciadas por muitas variáveis independentes com o objetivo de otimizar essas respostas (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

A RSM é composta de duas etapas, a modelagem e o deslocamento, que são repetidas enquanto for necessário para atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem é feita ajustando modelos lineares ou quadráticos a respostas obtidas após planejamentos fatoriais. O deslocamento ocorre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo (NETO et al, 2002).

A superfície de resposta colocada em um gráfico demonstra o comportamento da resposta em função de fatores tomados dois a dois, permitindo analisar os fatores que afetam o sistema.

No processo de otimização é de grande importância a escolha do planejamento fatorial para uma melhor construção da superfície de resposta. Um modelo empírico de primeira ordem (linear) ou de segunda ordem (quadrático) é usado em sistemas cujas respostas são funções de dois ou mais fatores.

A função matemática utilizada é dada pela equação 1 onde x_1, x_2, \dots, x_k são os fatores experimentais e ε é o resíduo ou erro experimental.

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (1)$$

Para iniciar a superfície de resposta é necessário determinar a relação matemática entre a variável de resposta e as variáveis independentes. A primeira relação a ser verificada no ajuste da resposta deve ser o polinômio de menor grau chamado de modelo de primeira ordem, sendo que $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ representam os coeficientes do polinômio; x_1, x_2, \dots, x_k são os fatores experimentais e ε é o erro experimental.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2)$$

Se o sistema apresentar curvatura deve-se usar o modelo quadrático ou

de segunda ordem, pois o modelo linear inicialmente utilizado não foi bem ajustado as respostas experimentais. A função a ser aproximada no conjunto de resultados é um polinômio de ordem maior como um modelo quadrático (Equação 3) sendo que $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ representam os coeficientes do polinômio de 2º grau; x_1, x_2, \dots, x_k são os fatores experimentais e ε é o erro experimental.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Portanto, deve-se utilizar o planejamento composto central (*Central Composite Design - CCD*) que é apropriado para ajustar o modelo polinomial completo de segunda ordem. O CCD deve ser utilizado quando se quiser verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão (MONTGOMERY & RUNGER, 2002).

O CCD, introduzido por Box e Wilson no início da década de 1950, são construções que usam um planejamento fatorial (níveis baixos e altos), superposto à pontos axiais e pontos centrais (Figura 7 A) dando a ele uma forma esférica (Figura 7 B).

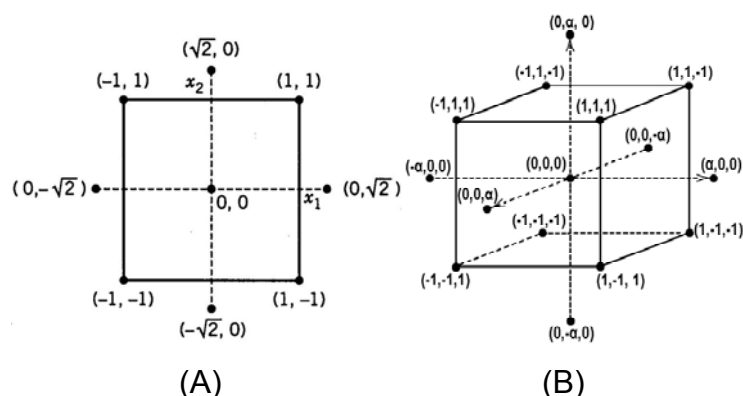


Figura 7. (A) planejamento composto central para dois fatores ($k=2$ e $\alpha=\sqrt{2}$). (B) Planejamento Composto Central para três fatores ($k=3$ e $\alpha=\sqrt{3}$).

O CCD pode ser utilizado para construir modelos de primeira e segunda ordem. Para estimar os coeficientes de uma superfície de segunda ordem deve ser acrescido de alguns pontos experimentais. O CCD para K fatores é formado por três partes: uma parte chamada de **fatorial**, em que normalmente os níveis codificados escolhidos são igualmente espaçados e assumem valores iguais a +1 e -1; uma segunda parte é composta de pontos axiais formado por $n_{ax} = 2k$ pontos com todas as coordenadas nulas exceto as axiais que assumem o valor α ou $-\alpha$; e finalmente os ensaios centrais em que $x_1 = \dots x_k =$

0 (CALADO & MONTGOMERY, 2003; NETO et al, 2002).

O CCD proporciona o teste para a variância da estabilidade e o modelo de segunda ordem pode ser construído com o número de graus de liberdade fornecido pela combinação de tratamentos.

2.9. Validação dos métodos analíticos - conceitos das figuras de mérito

A validação de um método analítico é muito importante para a obtenção de informações confiáveis e para que facilite a interpretação dos dados obtidos da amostra (RIBANI et al.,2004). O método analítico a ser utilizado deve apresentar o valor obtido da concentração do analito dentro do erro experimental.

O processo de validação envolve os parâmetros erro, desvio, desvio padrão, e os resultados da análise por mais de uma técnica analítica ocorrendo também uma comparação entre si dos vários valores obtidos (ALEIXO,2003).

A validação de um método ocorre de forma contínua iniciando pelo planejamento de estratégia analítica e continua durante todo seu desenvolvimento e transferência, sendo feita portanto uma avaliação da precisão e exatidão dos resultados obtidos sobre a concentração da amostra através de parâmetros como a linearidade, seletividade, limite de detecção e a sensibilidade (RIBANI et al, 2004; ALEIXO, 2003).

2.9.1. Sensibilidade

Segundo BRITO et al, 2003, a medida da sensibilidade de um método indica a possibilidade de distinguir duas concentrações próximas, com determinado nível de confiança. Esta medida constitui o coeficiente angular do gráfico analítico, como:

$$S = \frac{d\gamma}{d\chi}$$

2.9.2. Seletividade

A seletividade de um método garante que a resposta obtida como pico de corrente seja exclusivamente do composto de interesse. O estudo do analito na presença de interferentes é utilizado para medir o grau de seletividade do

método.

2.9.3. Precisão

A precisão representa a dispersão dos resultados obtidos em ensaios independente repetidos de uma mesma amostra ou padrão, sendo avaliada pelo desvio padrão relativo. Em métodos de análises traços são aceitos um desvio padrão relativo de até 10% em amostras complexas. A precisão é avaliada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade deve ser avaliada sob as mesmas condições de medições sucessivas utilizando o mesmo método, sendo que a execução da metodologia deve ser realizada pelo mesmo analista sendo utilizado o mesmo procedimento. O instrumento usado para as análises deve ser submetido as mesmas condições, no mesmo local e as medições devem ser repetidas em um curto intervalo de tempo. O resultado dessas medições sucessivas sob as condições citadas representa a repetitividade.

A precisão intermediária irá garantir que em um mesmo laboratório os resultados obtidos irão ser repetidos.

A reprodutibilidade é a concordância dos resultados de medições de uma mesma amostra em condições diferentes, como outro aparelho, outro analista e local diferente. Seria o resultado obtido em colaboração entre laboratórios. Os valores de desvio padrão e de variância obtidos a partir dos dados experimentais são indicadores da precisão (RIBANI, 2004).

2.9.4. Exatidão

A exatidão mede o grau de concordância entre um valor de referência considerado como verdadeiro e os resultados individuais em um determinado ensaio processos como comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão são os mais utilizados para avaliar a exatidão.

2.9.4.1. Linearidade

É a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito, dentro de uma faixa de aplicação.

Deve-se medir a concentração da espécie de interesse utilizando padrões de concentração conhecida através de uma relação matemática chamada de curva analítica utilizando no mínimo cinco pontos sem incluir o zero da curva.

A regressão linear fornece uma estimativa dos coeficientes da curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais, calculando assim os coeficientes de regressão linear e angular e o coeficiente de correlação r . Quanto mais próximo do valor 1,0 estiver o coeficiente de correlação menos dispersos estão os pontos experimentais obtidos e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimado, mas isto não garante um modelo bom para realizar previsões.

2.9.4.2. Ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação avalia a quantidade recuperada de analito adicionada inicialmente na matriz utilizando o método voltamétrico proposto.

2.9.4.3. Comparação de métodos

Consiste em comparar os resultados obtidos pelo uso do método voltamétrico com os resultados obtidos em outro método analítico, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Normalmente usa-se o teste t pareado para fazer as comparações.

2.9.4.4. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a quantidade de analito que pode ser detectado sem ser quantificado utilizando um dado método analítico. O valor da concentração do analito que corresponde ao menor sinal que pode ser detectado com certeza razoável em um dado método analítico. O valor recomendado para o limite de detecção obedece à equação 4.

$$LD = 3 \frac{S_B}{b} \quad (4)$$

sendo S_B a estimativa do desvio padrão da média aritmética e o b o valor do coeficiente angular da reta de calibração obtida da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de um analito que pode ser determinada com exatidão. O valor recomendado para o limite de

quantificação obedece à equação 5

$$LQ = 10 \frac{S_B}{b} \quad (5)$$

2.10. Ambiente computacional

O software Statística® possui uma linguagem computacional composta por variadas metodologias e apresenta ferramentas gráficas de integração e produção de relatórios, facilita a interpretação dos resultados do ponto de vista estatístico .

O software Statística® vem sendo aplicado a variadas atividades científicas e industriais, devido a redução de custo.

É muito útil no processo de análise descritiva de dados pois fornece os intervalos de confiança, desvio-padrão, erro-padrão, testes t para uma e duas amostras e teste t pareado, teste de estimativas e regressão.

Em cada tratamento realizado no Statística® é possível obter gráficos que ajudam na exploração dos dados e visualização dos resultados através de gráficos de probabilidade normal, gráfico de superfície de resposta, e vários outros. O objetivo do sistema é extrair informações úteis sobre problemas em estudo, realçando aspectos importantes até então desconhecidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Limpeza do material

Para a limpeza do material de vidro foi preparada uma solução de HNO_3 $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ onde foram mergulhadas toda a vidraria a ser utilizada, por um período de 72 horas, em seguida foram lavadas com água destilada para retirar os resíduos de ácido nítrico e a lavagem foi completada utilizando-se água deionizada.

As soluções de trabalho foram armazenadas em recipientes de polietileno que foram tratados com solução de HNO_3 20% por 72 horas e em seguida, lavados com água deionizada.

A célula voltamétrica foi lavada com solução de HNO_3 1:1. Entre uma análise e outra a célula era lavada com água deionizada.

As adições de solução padrão foram realizadas utilizando-se micropipetas volumétricas cujas ponteiros eram descartadas após cada análise. Foram utilizadas micropipetas volumétricas de 50 e 100 μL .

3.2. Aferição de material volumétrico

O material volumétrico utilizado foi submetido ao processo de calibração, através da pesagem da quantidade de água neles contida a uma temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

O volume real calculado (V) foi obtido através da multiplicação da massa de água (m) obtida pelo fator de conversão Tabelado (f), correspondente à temperatura de trabalho ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), conforme a expressão da equação 6:

$$V = m \cdot f \quad (6)$$

Foram realizadas a aferição de balões de 50 e 100 mL, pipetas volumétricas de 1, 5, 10 e 20 mL. As variações encontradas foram em média 0,18% e 0,10% para os balões, 1% e 2% para as pipetas volumétricas.

3.3. Reagentes

Os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e não foram previamente submetidos a etapas de purificação. Para preparar todas as

soluções foi utilizada a água deionizada obtida do purificador da BAUMER® (CIRURTEC HOSPITALAR – TKA – DI 800 / 1900).

Para o preparo do eletrólito de suporte para o **Método A** (tampão NH_3 / NH_4Cl), utilizou-se hidróxido de sódio (Vetec®), hidróxido de amônio (Merck®), ácido clorídrico (Merck®) e cloreto de amônio (Merck®).

Para o preparo do eletrólito de suporte para o **Método B** (HCl 30% (v/v)) utilizou-se ácido clorídrico (Merck®).

Em ambos os métodos foram preparadas soluções padrão de ácido fumárico (FLUKA Analytical®) e de ácido maleico (Merck®).

Para o controle da força iônica utilizou-se uma solução de nitrato de potássio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck®).

Para o preparo das amostras de suco de maçã foram utilizados o reagente metanol (Merck®), etanol (Vetec®) e também tubos de 3 mL, tipo seringa, SupelcleanTM Envi C-18, 300mg, para realizar a extração em fase sólida.

O mercúrio utilizado como eletrodo indicador é proveniente da Merck® e o nitrogênio, ultrapuro, utilizado para a desaeração do conteúdo da célula voltamétrica foi obtido da White Martins, com teor de pureza de 99,996%.

3.4. Preparo de soluções

As soluções de HCl 30% (v/v), NH_3 25%(v/v) e o tampão de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ foram preparadas semanalmente.

A solução de HCl 30% (v/v) foi preparada medindo um volume de 162,20 mL de HCl $12,06 \text{ mol L}^{-1}$ e transferido a um balão volumétrico de 200,0 mL contendo 37,20 mL de água deionizada.

Para preparar a solução de amônia 25%(v/v) foram medidos 86,20 mL de solução de NH_3 29%(v/v) e transferido a um balão volumétrico de 100,0 mL completando com água deionizada.

Após a preparação destas soluções preparou-se a solução tampão de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ medindo-se 56,30 mL de solução de amônia 25% e 26,50 mL de HCl 30% (v/v) que foram transferidas para um balão volumétrico de 200,0 mL, esta solução teve seu valor de pH ajustado para 9,60 utilizando HCl 30% (v/v).

O NaOH 30% (m/v) foi preparado pesando-se 30,3000g de NaOH 99% (m/v) que foi dissolvido com água deionizada e transferido a um balão de

100 mL. As soluções utilizadas para ajuste de pH foram obtidas através de diluições da solução de NaOH 30% (m/v).

As soluções de HCl utilizadas para o ajuste de pH de diversas soluções foram preparadas realizando diluições a partir de soluções padrão de ácido fumárico e de ácido maleico (1000 mgL⁻¹).

A solução padrão de ácido fumárico foi preparada pesando 0,1000g de ácido fumárico e 2,0 mL de solução tampão NH₃ / NH₄Cl sendo dissolvido em água deionizada; a dissolução era completada com o ajuste do pH desta solução padrão ao valor 8,0 utilizando soluções de NaOH em diferentes concentrações.

A solução padrão de ácido maleico foi preparada pesando 0,1000g de ácido fumárico e 2,0 mL de solução tampão NH₃ / NH₄Cl sendo dissolvido em água deionizada, o valor de pH desta solução foi ajustado a 8,0.

O sistema de titulação potenciométrica automatizado é baseado no potenciômetro da ORION, modelo 901, e o controle das injeções ocorria através de válvulas solenóides de teflon (GUIMARÃES, 2000).

O programa que controla o sistema e os dados potenciométricos foi desenvolvido em ambiente Windows, na linguagem Visual Basic 5.0 da Microsoft. As curvas de titulação foram preparadas no programa gráfico Microcal Origin 6.01 (MICROCAL, 1999).

Para determinar as constantes de acidez do ácido fumárico e do ácido maleico fez-se necessário a realização da titulação potenciométrica e para isto foram preparadas as seguintes soluções:

Para o preparo da solução de ácido fumárico 5,0x10⁻² molL⁻¹ em KNO₃ 0,100molL⁻¹, pesou-se 1,4510g de ácido fumárico e 2,5275g de nitrato de potássio que juntas foram dissolvidas em um béquer sob agitação constante e transferida para um balão de 250 mL.

Para o preparo da solução de ácido maleico 5,0x10⁻² molL⁻¹ em KNO₃ 0,100 molL⁻¹, pesou-se 1,4510 g de ácido maleico e 2,5275 g de nitrato de potássio que juntas foram dissolvidas em um béquer sob agitação constante e transferida para um balão de 250,0 mL.

Para o preparo da solução de NaOH 0,100molL⁻¹ contendo KNO₃ 0,100 molL⁻¹, foram dissolvidos 4,0000 g de NaOH em aproximadamente 200 mL de água deionizada, acrescentou-se 10,1000 g de KNO₃ (Merck®)

solubilizada em 200 mL de água deionizada e completou-se o volume para 1000 mL em balão volumétrico.

A solução de NaOH foi padronizada com biftalato de potássio. Preparou-se esta solução pesando-se 0,2500 g de $C_8H_5O_4K$ (previamente seco em estufa a 100 °C por uma hora) em balança analítica, a qual foi dissolvida em 25 mL de solução de KNO_3 0,1 mol L⁻¹. Iniciou-se a titulação potenciométrica adicionando a solução de NaOH de 0,2 em 0,2 mL até 25 mL. Registrando 126 valores de pH.

Após a padronização da solução de NaOH, a titulação potenciométrica foi iniciada, adicionando-se a solução de NaOH, de 0,5 em 0,5 mL até 50 mL a 25 mL de solução de ácido fumárico. Registrando 100 valores de pH.

A mesma titulação potenciométrica foi realizada para o ácido maleico, de forma idêntica ao ácido fumárico.

3.5. Instrumentação

3.5.1. Instrumentação para análises voltamétricas

O analisador voltamétrico modelo 797 VA Computrace da Metrohm® foi utilizado para a realização das medidas voltamétricas (Figura 8).



(A)

(B)

Figura 8. (A) Instrumento voltamétrico 797 VA *Computrace*. (B) Montagem completa do sistema (CARVALHO, 2008).

O eletrodo de referência utilizado foi o eletrodo de prata/cloreto de prata Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) e o eletrodo auxiliar de platina, como mostrado na Figura 9.

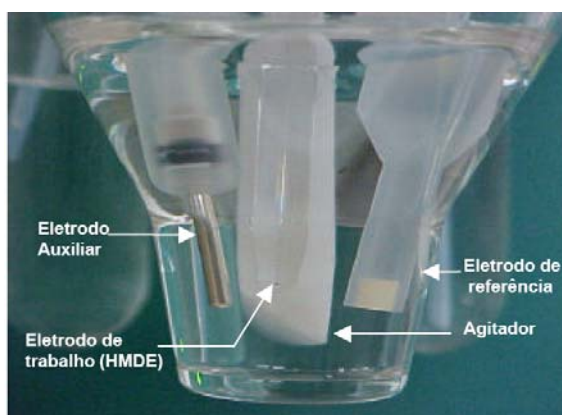


Figura 9. Célula voltamétrica do analisador polarográfico 797 VA *Computrace* (CARVALHO, 2008).

Para o controle do pH da solução na célula voltamétrica foi utilizado um pHmetro Orion-Jundilab, modelo 720 A (Figura 10), com eletrodo de vidro de dupla junção que foi adaptado ao polarógrafo da Metrohm®.



Figura 10. Medidor de pH acoplado ao aparelho 797 VA *Computrace* (CARVALHO, 2008).

3.5.2. Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

A identificação e quantificação do ácido fumárico e do ácido maleico foi realizada por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho. A análise foi realizada em um HPLC da marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VA acoplado ao Detector Ultravioleta utilizando-se comprimento de onda de 210 nm. A coluna utilizada foi a SCR-101H de 30 cm x 7,9 mm de diâmetro, utilizando um

fluxo da fase móvel na coluna de 0,6 mL/minuto, a pressão utilizada na coluna foi 24 Kgf e a fase móvel foi água em 1% de ácido orto fosfórico. O volume de amostra injetado foi de 20 μ L.

3.6. Aquisição e tratamento de dados

A manipulação dos dados, o armazenamento e a saída para visualização dos resultados são controlados através do “software” VA Computrace 1.2 (METRODATA, 2005).

Os dados voltamétricos adquiridos foram processados por programas comerciais que operam dentro do ambiente Windows, como o OriginPro 7.5[®] e o Statistica 7.0[®].

3.7. Parâmetros eletroanalíticos

O trabalho foi dividido em duas partes, utilizando-se dois eletrólitos de suporte diferentes tendo em vista as determinações individuais e total dos ácidos.

O eletrólito de suporte utilizado em análises voltamétricas deve apresentar alta solubilidade, alto grau de ionização, estabilidade química e eletroquímica tendo, portanto, ampla aplicação em processos de eletrodo.

O eletrólito dissolvido em um dado solvente produz uma solução com condutividade elétrica maior que a condutividade do solvente, sua concentração deve ser de 10 a 100 vezes maior que a concentração das espécies a serem estudadas, devendo ser eletroinativo na faixa de potencial do eletrodo onde os estudos com o analito de interesse são realizados.

Dentre as inúmeras importâncias do uso do eletrólito destaca-se a diminuição da espessura da dupla camada elétrica, sua capacidade de manter os coeficientes de atividade praticamente constantes e tornar o número de transporte da espécie eletroativa praticamente nula. Também permite incrementar a condutividade em meios de solventes polares orgânicos e inorgânicos (AGOSTINHO et al, 2004).

3.7.1. Variação do potencial em função do pH

O valor do pH da solução a sofrer o processo de varredura catódica tem

grande influência sobre o potencial de pico do ácido fumárico e do ácido maleico. Os voltamogramas de onda quadrada podem ser obtidos em diferentes tipos de eletrólito em diferentes valores de pH e neste caso os picos dos dois ácidos podem se sobrepor parcialmente ou totalmente de forma a prejudicar a determinação separada dos dois ácidos (GULABOSKI et al, 2001; WARSHOWSKY et al, 1947).

Para as visualizações do deslocamento do potencial de pico em função da variação do pH foram adicionados 100 μL de ácido fumárico $1,0 \times 10^3 \text{ mgL}^{-1}$ e 50 μL de ácido maleico 1000 mgL^{-1} na célula voltamétrica contendo 11,0 mL de água e 1,0 mL de KNO_3 2 molL^{-1} , adicionando-se 10 μL de HCl 30% (v/v) ou 10 μL de NaOH 30%. Após a adição de HCl 30% (v/v) ou NaOH 30% o valor encontrado de pH na solução foi registrado e realizada a varredura catódica.

3.7.2. Método A

No método A o eletrólito de suporte utilizado foi o tampão $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ na concentração de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, seguindo a literatura que recomenda a utilização deste eletrólito na determinação dos dois ácidos em valor de pH 8,20. Desta forma, era possível a identificação e quantificação do ácido maleico e fumárico em potenciais diferentes sem que um interfira na onda voltamétrica do outro (WARSHOWSKY et al, 1947).

O processo de otimização da metodologia de determinação do ácido fumárico e maleico separadamente em pH 8,20 foi iniciado realizando uma análise univariada de fatores que possivelmente influenciariam na resposta voltamétrica como Amplitude (mV), Frequência (Hz), Incremento de Voltagem (mV), a Concentração do eletrólito (mol L^{-1}) e o Tamanho da gota de mercúrio (mm^2).

A triagem dos fatores é de grande importância para verificar os possíveis fatores que apresentam importância relativa no experimento. Foram determinados valores para dois níveis de cada fator, um mínimo (-) e o máximo (+) através de uma análise univariada, pois a voltametria de onda quadrada é uma técnica de rápida execução. Foi então realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}_v realizando um total de dezesseis ensaios, obtendo assim informações importantes sobre os fatores realizando um menor

número de ensaios e em menor tempo do que utilizando o planejamento fatorial completo 2⁵.

O procedimento para otimização foi realizado adicionando-se em um béquer 11,0 mL de água deionizada e 1,0 mL de solução tampão NH₃/NH₄Cl a pH 9,60. O valor de pH foi ajustado sob constante agitação a 8,20 adicionando-se algumas gotas de NaOH; regulado o pH o conteúdo do béquer foi transferido para a célula voltamétrica.

Esta solução foi submetida ao processo de desaeração com N₂ ultrapuro durante 5 minutos, uma varredura no sentido catódico de -1,00 a -1,85 V foi realizada para a leitura do branco. Em seguida foram adicionados 100 µL de solução padrão de ácido fumárico 1000 mgL⁻¹ e 50 µL de solução padrão de ácido maleico 1000 mgL⁻¹, uma nova desaeração de 3 minutos foi realizada antes da nova varredura catódica. Entre uma adição e outra foram realizadas desaerações de 30 segundos cada.

O aparelho voltamétrico foi programado para realizar três varreduras em cada ensaio, a média das correntes de pico no potencial de redução de cada ácido foi registrada.

Cada ensaio no planejamento fatorial completo foi realizado em duplicata e os resultados foram registrados para o estudo dos níveis dos fatores a serem empregados posteriormente na superfície de resposta.

3.7.2.1. Aplicação da Técnica Otimizada

3.7.2.1.1. Linearidade

As curvas analíticas foram obtidas através da adição de soluções padrão de ácido fumárico e de ácido maleico. A célula polarográfica contendo o branco foi desaerada por 5 minutos e em seguida foram adicionadas alíquotas de 25 µL de solução padrão de ácido fumárico 1000 mgL⁻¹ e 20 µL de solução padrão de ácido maleico 1000 mgL⁻¹, que foram desaeradas por 3 minutos e submetidas a varredura catódica. Foram realizadas mais 6 adições de cada ácido e entre uma adição e outra, a desaeração foi de 30 segundos.

3.7.2.1.2. Repetitividade

A repetitividade do método de determinação do ácido fumárico e do ácido maleico foi avaliada realizando-se sete leituras em um mesmo dia, para amostras de 200 μL de água deionizada fortificadas com adições de 100 μL de solução padrão de ácido fumárico 1000 mgL^{-1} e 50 μL de solução padrão de ácido maleico 1000 mgL^{-1} . Os cálculos da estimativa do desvio padrão relativo obedeceram às recomendações do INMETRO 2003 (RIBANI, 2004).

3.7.2.1.3. Limite de detecção e quantificação

O desvio padrão do branco do método A para determinação dos ácidos foi avaliado realizando-se dez leituras em um mesmo dia do branco, trocando o conteúdo da célula voltamétrica nas dez leituras realizadas, sob as mesmas condições de análise, para amostras livres de qualquer resíduo de ácido fumárico e de ácido maleico.

3.7.2.1.4. Precisão intermediária

Para avaliação da precisão intermediária foram utilizadas 3 amostras de suco de maçã que foram fortificadas com solução padrão de ácido fumárico e de ácido maleico. A concentração do ácido fumárico na célula voltamétrica foi de $8,26 \text{ mgL}^{-1}$, $16,40 \text{ mgL}^{-1}$ e $24,40 \text{ mgL}^{-1}$ e a concentração do ácido maleico foi de $4,15 \text{ mgL}^{-1}$, $8,26 \text{ mgL}^{-1}$ e $12,35 \text{ mgL}^{-1}$. Estas amostras foram submetidas a técnica voltamétrica em três dias diferentes.

3.7.3. Método B

No método B o eletrólito suporte utilizado foi HCl 30% (v/v), nesta solução contida na célula voltamétrica, os isômeros ácido fumárico e o ácido maleico são determinados como ácido butenodióico por sofrerem redução em um mesmo valor de potencial, impedindo a diferenciação dos ácidos.

O processo de otimização da metodologia de determinação do ácido fumárico e maleico juntos foi iniciado realizando uma análise univariada de fatores afim de determinar seus possíveis valores. Os fatores que possivelmente influenciariam na resposta voltamétrica como Amplitude (mV),

Frequência (Hz), Incremento de Voltagem (mV) e o Tamanho da gota de mercúrio (mm²).

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} realizando um total de dezesseis experimentos, obtendo assim informações importantes sobre os fatores com um menor número de experimentos e em menor tempo do que utilizando o planejamento fatorial completo 2^4 .

O procedimento para otimização foi realizado adicionando 11,0 mL de água deionizada e 1,0 mL de HCl 30% (v/v) diretamente na célula voltamétrica. Esta solução foi submetida ao processo de desaeração com N₂ ultrapuro durante 5 minutos, uma varredura no sentido catódico de -0,30 a -0,75 V foi realizada para a leitura do branco. Em seguida foram adicionados 100 µL de solução padrão de ácido fumárico 1000 mgL⁻¹ e 50 µL de solução padrão de ácido maleico 1000 mgL⁻¹, uma nova desaeração de 3 minutos foi realizada antes da varredura catódica.

O aparelho voltamétrico também foi programado para realizar três varreduras em cada experimento, a média das correntes de pico no potencial de determinação do ácido butenodióico era registrada. Cada ensaio no planejamento fatorial completo foi realizado em duplicata e os resultados foram registrados para o estudo dos valores dos níveis dos fatores a serem empregados posteriormente na superfície de resposta.

3.7.3.1. Aplicabilidade da técnica otimizada

3.7.3.1.1. Linearidade

A curva analítica foi construída adicionando-se alíquotas de 25 µL de uma mistura equimolar de solução padrão de ácido fumárico 1000 mgL⁻¹ e de solução padrão de ácido maleico 1000 mgL⁻¹ em 11,0 mL de água deionizada e 1,0mL de solução HCl 30%(v/v).

3.7.3.1.2. Repetitividade

A repetitividade do método de determinação do ácido butenodióico foi avaliada realizando-se sete leituras em um mesmo dia, para amostras de suco de maçã, 200 µL, fortificadas com 150 µL de uma mistura equimolar de solução padrão

de ácido fumárico 1000 mgL^{-1} e solução padrão de ácido maleico 1000 mgL^{-1} .

3.7.3.1.3. Limite de detecção e quantificação

O desvio padrão do branco do método voltamétrico de determinação do ácido butenodióico foi avaliado realizando-se dez leituras em um mesmo dia, sob as mesmas condições de análise, para amostras livres de qualquer resíduo deste ácido. Os cálculos da estimativa do desvio padrão relativo obedeceram às recomendações do INMETRO 2003 (RIBANI, 2004).

3.7.3.1.4. Precisão intermediária

Foram preparadas três amostras de suco de maçã fortificadas, nos respectivos dias de avaliação, com $25 \mu\text{L}$ de solução equimolar de ácido fumárico e ácido maleico nas concentrações de $1,0 \times 10^3 \text{ mgL}^{-1}$, apresentando a concentração de ácido butenodióico, na célula voltamétrica, de $4,15 \text{ mgL}^{-1}$, $6,21 \text{ mgL}^{-1}$ e $8,26 \text{ mgL}^{-1}$. Estas amostras foram submetidas à técnica voltamétrica, em três dias diferentes.

3.7.4. Pré- tratamento das amostras

As seis amostras de suco de maçã industrializado foram centrifugadas a uma velocidade de 10000 rpm por 15 minutos e posteriormente filtradas em filtro milipore $0,45 \mu\text{m}$ e submetidas ao processo de extração em fase sólida (EFS) utilizando cartuchos de C18.

No processo de EFS o cartucho foi condicionado com sucessivas passagens de 10 mL de metanol e 10 mL de água seguido de 10 mL de etanol 10% . Após o condicionamento do cartucho C18 as amostras foram eluídas, recolhidas e armazenadas em frascos de polietileno em congelador, para posteriormente serem analisadas por voltametria de onda quadrada e por HPLC.

Neste trabalho foi adicionado um volume de $50 \mu\text{L}$ de amostra na célula voltamétrica contendo o respectivo eletrólito de suporte em água dependendo do método trabalhado: Método A ou Método B (3.7.2. e 3.7.3.).

3.7.4.1. Aplicação da técnica de recuperação

3.7.4.1.1. Método A

O aparelho voltamétrico foi ajustado sob as condições descritas na Tabela 9. Uma solução contendo 11,0 mL de água deionizada e 1 mL de tampão $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ 1molL^{-1} teve seu pH ajustado para 8,20 e em seguida foi adicionada na célula polarográfica para leitura do branco durante um tempo de 300s. Em seguida foram adicionados juntamente com 100 μL de amostra de suco de maçã fortificada com 100 μL de solução padrão de ácido fumárico 1000mgL^{-1} e 50 μL de solução padrão de ácido maleico 1000mgL^{-1} para obtenção dos voltamogramas de onda quadrada que foram submetidas a varredura catódica por 180s. Foram feitas 5 adições de 100 μL de solução padrão de ácido fumárico e 50 μL de solução padrão de ácido maleico, entre uma adição e outra a desaeração foi de 30s.

3.7.4.1.2. Método B

Os dados do aparelho voltamétrico foram ajustados sob as condições descritas na Tabela 19. Foi adicionado na célula voltamétrica 11,0 mL de água deionizada e 1 mL de HCl 30%(v/v) para leitura do branco durante um tempo de 300s. Em seguida foram adicionados 100 μL de amostra de suco de maçã (amostra referência) fortificada com 150 μL de uma mistura equimolar de solução padrão de ácido fumárico 1000mgL^{-1} e de solução padrão de ácido maleico 1000mgL^{-1} . Foi realizada uma desaeração por 180s desta solução. Em seguida foram feitas 5 adições de 150 μL da mistura de ácido fumárico e de ácido maleico, entre uma adição e outra a desaeração foi de 30s.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do pH

Os deslocamentos do potencial em função do pH pode ser observado na Figura 10 em diferentes valores de pH. O eletrólito suporte utilizado foi o KNO_3 2 molL^{-1} e o HCl 30 % ou o NaOH 30 % foram utilizados para regular o valor do pH. Os parâmetros voltamétricos foram Incremento de voltagem (IV) 20,00 mV, amplitude (AM) 94,80 mV e Frequência (FR) 99,5 Hz e tamanho da gota $0,07 \text{ mm}^2$.

Um único pico referente a redução do ácido fumárico e do ácido maleico a ácido succínico em pH 1,30. Neste valor de pH os dois ácidos encontram-se protonados, como pode ser previsto pelos valores de pK_1 e pK_2 de cada ácido na Tabela 1. Os ácidos são reduzidos em um mesmo valor de potencial, em torno de $-0,45\text{V}$, podendo ser determinados simultaneamente como ácido butenodióico em pH 1,30.

A medida que o valor de pH aumenta ocorre uma ligeira diminuição na intensidade da corrente de pico. Em pH 3,15 ocorre a formação de um monoânion do ácido fumárico e um monoânion do ácido maleico, que devido a sua carga difunde-se mais lentamente que um ácido não ionizado (Warshowsky et al.,1947). A curva obtida é a fusão das duas ondas polarográficas, com um maior alargamento da base da onda.

No pH 5,20 o ácido fumárico encontra-se totalmente desprotonado formando um diânion que devido a sua carga apresenta menor velocidade de difusão. Isto provoca o aparecimento de um pico menor e o pico de maior intensidade é devido ao ácido maleico que ainda apresenta-se em solução como monoânion. A fusão das duas curvas permite a visualização de dois picos, o primeiro do ácido maleico de maior intensidade e o segundo do diânion do ácido fumárico.

No pH 8,15 os dois ácidos encontram-se totalmente desprotonados, ondas polarográficas mais negativas aparecem e sua altura aumenta juntamente com o pH até que ondas permaneçam sozinhas e possibilitem a visualização do pico do ácido maleico a potencial $-1,40 \text{ V}$ e do ácido fumárico em potencial $-1,75\text{V}$ aproximadamente.

O pH em torno de 8,15 é o mais indicado para determinação dos ácidos

separadamente.

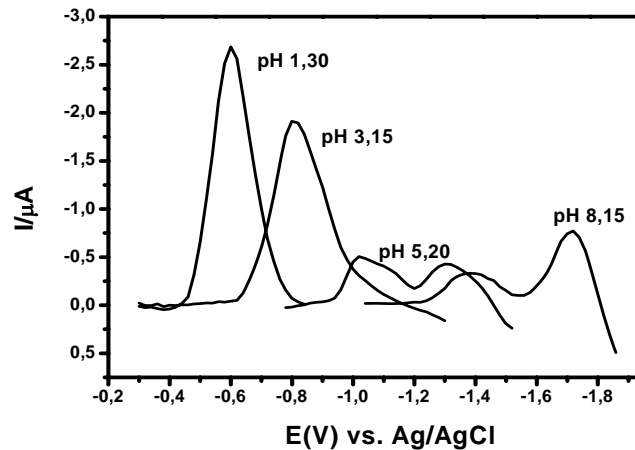


Figura 11. Voltamogramas do ácido fumárico e do ácido maleico simultaneamente em diferentes valores de pH.

A Figura 12 apresenta a curva de titulação do ácido maleico e do ácido fumárico, podendo observar a presença de dois pontos de inflexão na titulação do ácido maleico e apenas uma no ácido fumárico. Isto ocorre provavelmente a configuração em *Z* do ácido maleico e em *E* do ácido fumárico.

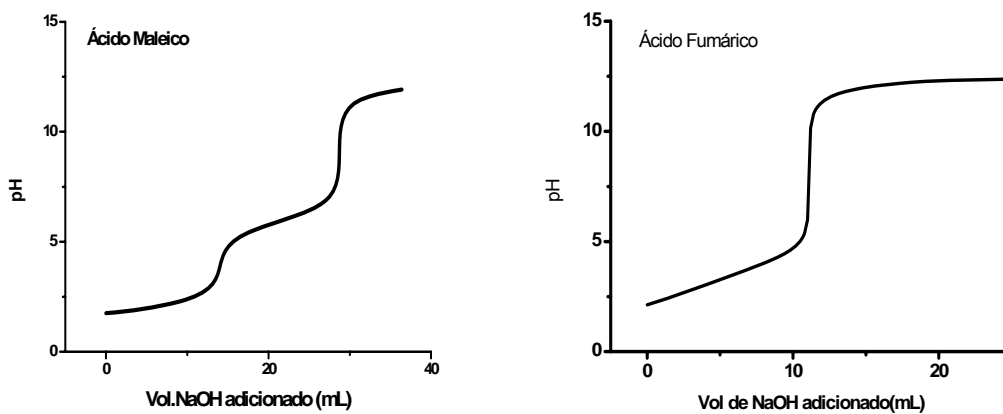


Figura 12. Curvas de titulação do ácido maleico e do ácido fumárico

Tabela 1. Valores obtidos da titulação potenciométrica.

	pK ₁	pK ₂
ÁCIDO FUMÁRICO	2,96	4,02
ÁCIDO MALEICO	1,52	5,94

Os valores da Tabela 1 concordam com os valores de pK₁ e pK₂ encontrados na literatura (GULABOSKI et al, 2001).

4.2. Método A

4.2.1. Métodos Quimiométricos

4.2.1.1. Triagem dos fatores

Um planejamento fatorial fracionário 2_{V}^{5-1} foi elaborado para investigar a importância relativa dos fatores, incremento de voltagem (IV), amplitude (AM), frequência (FR), concentração do eletrólito suporte (C) e tamanho da gota (TG), na resposta voltamétrica.

Os níveis escolhidos para cada fator são listados na Tabela 2 e a matriz de planejamento com as respostas em cada ensaio na Tabela 3.

Tabela 2. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial fracionário 2_{V}^{5-1} .

Símbolo	Fatores	Níveis	
		-	+
IV	Incremento de voltagem (mV)	10	20
AM	Amplitude (mV)	18	70
FR	Frequência (Hz)	20	90
C	Concentração do Eletrólito (molL ⁻¹)	1,0	2,0
TG	Tamanho da gota (mm ²)	0,2	0,7

Tabela 3. Planejamento fatorial fracionário e respectivas respostas instrumentais para a SWV, a relação geradora é $5 = 1234$.

Experimento	Fatores					Resp.(nA)
	IV	AM	FR	C	TG	
01	-1	-1	-1	-1	+1	67,40
02	+1	-1	-1	-1	-1	40,08
03	-1	+1	-1	-1	-1	120,7
04	+1	+1	-1	-1	+1	663,8
05	-1	-1	+1	-1	-1	79,15
06	+1	-1	+1	-1	+1	293,7
07	-1	+1	+1	-1	+1	605,8
08	+1	+1	+1	-1	-1	621,3
09	-1	-1	-1	+1	-1	28,94
10	+1	-1	-1	+1	+1	147,6
11	-1	+1	-1	+1	+1	181,7
12	+1	+1	-1	+1	-1	198,3
13	-1	-1	+1	+1	+1	257,4
14	+1	-1	+1	+1	-1	106,6
15	-1	+1	+1	+1	-1	185,7
16	+1	+1	+1	+1	+1	686,9

Na Tabela 4 pode-se observar que os valores dos contrastes variam de 9,86 nA a 257,77 nA, portanto é razoável que se possa considerar aqueles contrastes com valores acima de 100 nA como sendo os que tem maior importância relativa.

No planejamento fatorial 2_{V}^{5-1} os contrastes de primeira ordem ficam confundidos com os de quarta ordem e os contrastes de segunda ordem com os de terceira ordem. Conseqüentemente os contrastes de 1ª e 4ª ordem são estimativas das somas dos efeitos principais com os efeitos de interação de 4ª ordem no fatorial completo 2^5 , já os contrastes de 2ª e 3ª ordens são estimativas das somas dos efeitos de 2ª ordem com os efeitos de 3ª ordem.

De acordo com estas considerações observa-se que os contrastes l_1 , l_2 , l_3 e l_5 são os contrastes de maior importância e devem ser analisados.

Tabela 4. Estimativas dos contrastes do fatorial fracionário 2_{IV}^{5-1} e suas relações com os efeitos do fatorial completo.

Relação entre as colunas	Contrastes		Estimativa dos efeitos (nA)
1 = 2345	$l_1 = l_{2345}$	$l_1 = 1 + 2345$	131,28
2 = 1345	$l_2 = l_{1345}$	$l_2 = 2 + 1345$	257,77
3 = 1245	$l_3 = l_{1245}$	$l_3 = 3 + 1245$	150,87
4 = 1235	$l_4 = l_{1235}$	$l_4 = 4 + 1235$	-64,70
5 = 1234	$l_5 = l_{1234}$	$l_5 = 5 + 1234$	213,10
12 = 345	$l_{12} = l_{345}$	$l_{12} = 12 + 345$	92,52
13 = 245	$l_{13} = l_{245}$	$l_{13} = 13 + 245$	-31,46
14 = 235	$l_{14} = l_{235}$	$l_{14} = 14 + 235$	-9,86
15 = 234	$l_{15} = l_{234}$	$l_{15} = 15 + 234$	38,63
23 = 145	$l_{23} = l_{145}$	$l_{23} = 23 + 145$	37,66
24 = 135	$l_{24} = l_{135}$	$l_{24} = 24 + 135$	-79,75
25 = 134	$l_{25} = l_{134}$	$l_{25} = 25 + 134$	85,25
34 = 125	$l_{34} = l_{125}$	$l_{34} = 34 + 125$	19,15
35 = 124	$l_{35} = l_{124}$	$l_{35} = 35 + 124$	45,00
45 = 123	$l_{45} = l_{123}$	$l_{45} = 45 + 123$	-24,55
I = 12345		$l_I = \text{média} + 1/2(12345)$	256,49

O contraste l_1 representa o incremento de voltagem (IV), l_2 a amplitude (AM), l_3 a frequência (FR) e l_5 o tamanho da gota (TG), todos estes contrastes possuem importância relativa devido aos valores de corrente apresentados.

O valor do contraste l_5 sugere que um aumento no tamanho da gota produz melhores respostas. Porém o aumento do tamanho da gota de mercúrio produz voltamogramas irregulares, provavelmente porque a grande área superficial formada prejudica a polarização da gota, causando um aumento no valor da corrente capacitiva. Portanto o valor do tamanho da gota foi fixado em $0,7 \text{ mm}^2$.

Como o contraste l_4 , que representa a concentração do eletrólito, possui valor de corrente baixo, não apresenta importância relativa e portanto pode ser usado qualquer valor de concentração dentro da faixa de concentração estudada. Assim, optou-se por trabalhar com a menor concentração do eletrólito suporte a ser adicionado na célula voltamétrica que foi 1 molL^{-1} .

Portanto, após a análise do planejamento fatorial fracionário foi realizado o planejamento composto central.

4.2.2. Superfície de Resposta

Para estudar os três fatores de maior significância: incremento de voltagem (IV), amplitude (AM) e frequência (FR), foi utilizado o planejamento composto central (CCD).

No processo de elaboração do planejamento CCD, os níveis -1 e +1 foram os mesmos utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 , já os demais níveis (Tabela 13) foram calculados a partir da equação 7:

$$Z = \frac{X_i - \bar{X}}{\frac{\Delta X}{2}} \quad (7)$$

Onde Z representa a variável codificada do CCD, X_i é a variável não codificada, \bar{X} o valor médio entre os níveis +1 e -1 e ΔX é o valor da diferença entre o nível +1 e -1.

A Tabela 6 mostra o planejamento composto central (com $\alpha = 1,682$) construído para os três fatores nas condições descrita.

Após a verificação da importância relativa dos fatores IV, AM e FR foi realizado um planejamento composto central (CCD) para estabelecer os valores a serem trabalhados destes fatores na otimização; já que foram fixados os valores da C e do TG.

Tabela 5. Resultado do Planejamento CCD com $k = 3$.

Ensaio	IV (Z_1)	AM(Z_2)	FR(Z_3)	IV(mV)	AM(mV)	FR(Hz)	I(nA)
01	-1	-1	-1	10,00	30,00	35,00	290,40
02	1	-1	-1	20,00	30,00	35,00	449,95
03	-1	1	-1	10,00	110,0	35,00	349,41
04	1	1	-1	20,00	110,0	35,00	469,16
05	-1	-1	1	10,00	30,00	110,0	412,26
06	1	-1	1	20,00	30,00	110,0	436,34
07	-1	1	1	10,00	110,0	110,0	816,48
08	1	1	1	20,00	110,0	110,0	866,43
09	-1,682	0	0	6,590	70,00	72,50	465,89
10	1,682	0	0	23,41	70,00	72,50	581,78
11	0	-1,682	0	15,00	2,720	72,50	20,110
12	0	1,682	0	15,00	137,3	72,50	448,34
13	0	0	-1,682	15,00	70,00	9,430	864,41
14	0	0	1,682	15,00	70,00	135,6	778,13
15	0	0	0	15,00	70,00	72,50	703,44
16	0	0	0	15,00	70,00	72,50	604,33
17	0	0	0	15,00	70,00	72,50	693,14
18	0	0	0	15,00	70,00	72,50	663,30

Tabela 6. Coeficientes e erro para o modelo da superfície de resposta.

Símbolo	Coeficientes \pm Erro	Relação $t(3)$	$^{**}t^{tab}$
b_0	$666,37 \pm 22,23$	29,97	3,18
IV	$40,14 \pm 12,05$	3,33	
AM	$-51,72 \pm 12,05$	-4,13	
FR	$119,55 \pm 12,05$	9,92	
IV^2	$-154,09 \pm 12,52$	-12,31	
AM^2	$60,58 \pm 12,52$	5,03	
FR^2	$53,41 \pm 12,52$	4,27	
IVxAM	$-1,74 \pm 15,74$	-0,11	
IVxFR	$-25,66 \pm 15,74$	-1,63	
AMxFR	$94,51 \pm 15,74$	6,00	

** Os coeficientes em destaque foram significativos pelo teste t.

$^{*}t^{tab}$ com 3 graus de liberdade e $\alpha = 0,05$.

Os cálculos referentes aos valores dos coeficientes e do erro de cada fator estudado na superfície de resposta estão listados na Tabela 6 e foram calculados pelo programa Statistica7.0.

Tabela 7. ANOVA do planejamento CCD.

	SQ	GL	QM	Fcalc.
Regressão*	70.9178,0	9	78797,5	7,45*
Resíduos	84.648,3	8	10581,0	
Falta de ajuste	78.699,5	5	11241,8	5,67n.s
Erro puro	5.948,80	3	1982,93	
Total	793.826	17		
% da variância explicada			89,88	
% Máxima da variância explicável			99,25	

*Coeficientes significativos.

n.s - não significativo

A Tabela 8 mostra que a regressão foi significativa e a falta de ajuste foi não significativa o que garante um modelo de segunda ordem bem ajustado para o planejamento proposto.

Nas Figuras 13(A) e 13(B) observa-se uma indicação gráfica da qualidade do modelo sendo que na Figura 13(B) os pontos encontram-se bem distribuídos em torno do zero, confirmando o bom ajuste do modelo.

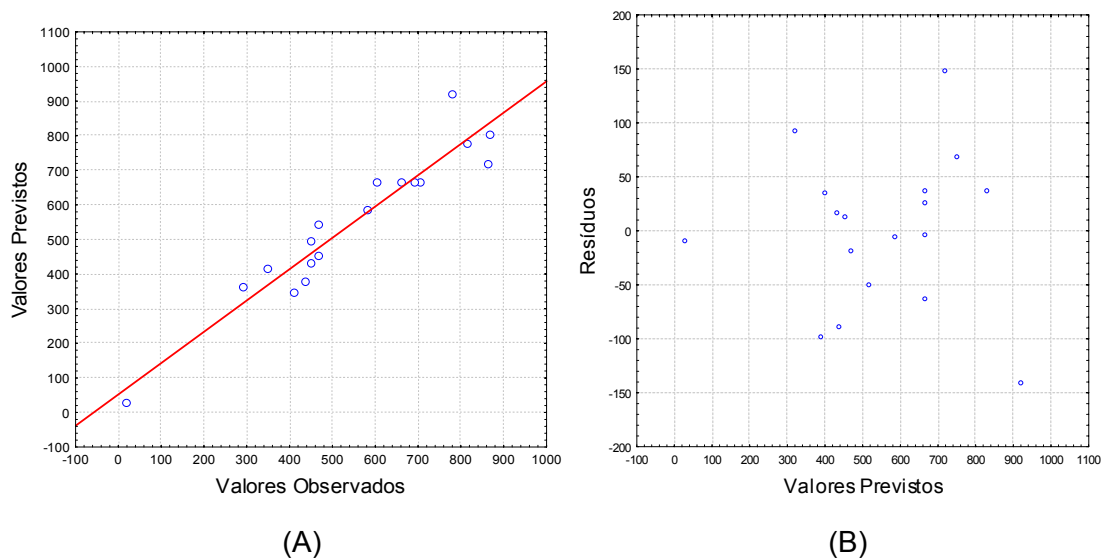


Figura 13. (A) Gráficos de valores observados vs. valores previsto. (B) Gráfico dos resíduos.

Para obter a superfície de resposta os valores do IV (Incremento de voltagem) foram variados de -1,682 a 1,682 e a melhor resposta de corrente obtida foi no nível (+) que tem o valor de variável codificada igual a 1,0 e o valor da variável decodificada igual a 20 mV. Desta forma o valor de IV foi fixado em 20 mV e a superfície foi obtida entre os fatores principais AM e FR.

A Figura 14 apresenta a superfície de resposta obtida ao fixar o IV em 20 mV. Pode-se observar uma superfície que apresenta duas regiões de máximo representadas pela cor vermelho intenso que apresenta um valor de corrente próximo de 1000 nA, isto pode ser melhor visualizado na Figura 14 (B) que apresenta apenas duas dimensões.

O modelo construído para determinação voltamétrica do ácido fumárico e do ácido maleico é representado pela equação i_p .

$$i_p = 666,37 \pm 22,23 + 40,14 \pm 12,05 (IV) - 51,72 \pm 12,05 (AM) + 119,55 \pm 12,05 (FR) - 154,09 \pm 12,52 (IV)^2 + 60,58 \pm 12,52 (AM)^2 + 53,41 \pm 12,52 (FR)^2 + 94,51 \pm 15,74 (AM \times FR)$$

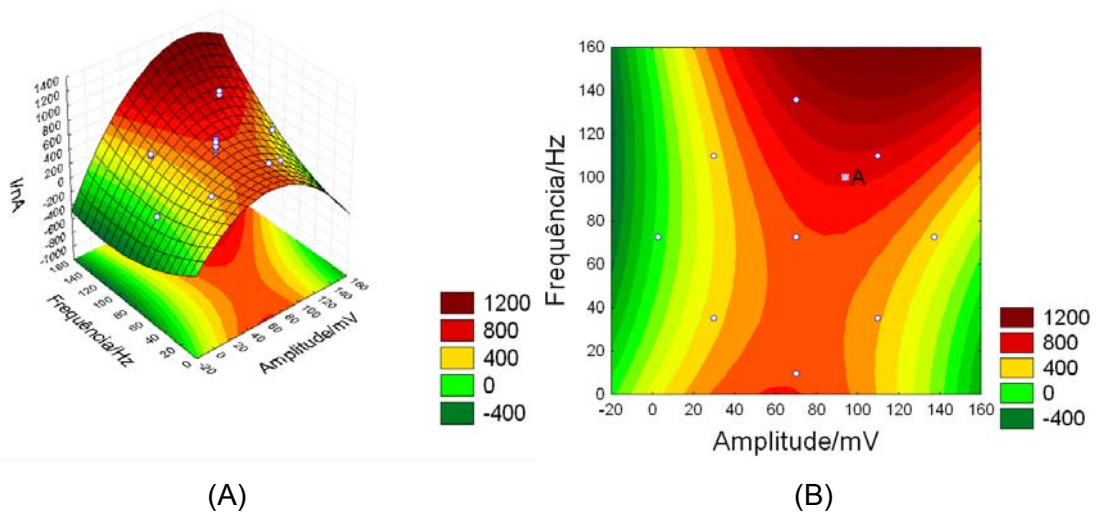


Figura 14. (A) Superfície de resposta com a variável Incremento de voltagem fixa no nível (1), 20mV. $X_2 = AM$ (94,8 mV), $X_3 = FR$ (99,5 Hz) em termos de variáveis codificadas. (B) Projeção da superfície de resposta. A legenda mostra os valores da corrente em nA, obtidos no ensaio.

Observando a Figura 14(B) pode-se constatar que o ponto de máximo seria no ponto representado pelas variáveis codificadas $X_2 = 0$ e $X_3 = 1,682$, porém a onda polarográfica obtida apresentou-se distorcida, ocorrendo uma perda de simetria como pode ser observado pela Figura 15.

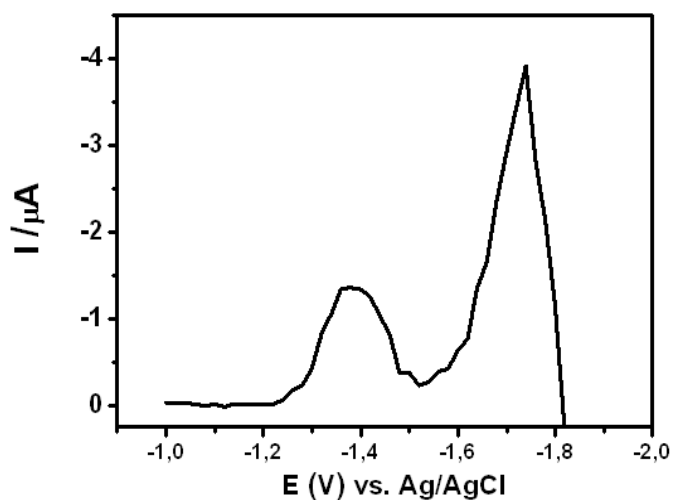


Figura 15. Voltamograma do ácido maleico e do ácido fumárico utilizando a SWV com os valores da $X_2 = 0$ e $X_3 = 1,682$.

Devido a distorção da onda polarográfica no ponto máximo foi escolhido o ponto A cujos valores de $X_2 = 0,62$ (94,8mV) e $X_3 = 0,72$ (99,5Hz) foram utilizados para a construção do voltamograma apresentado na Figura 15.

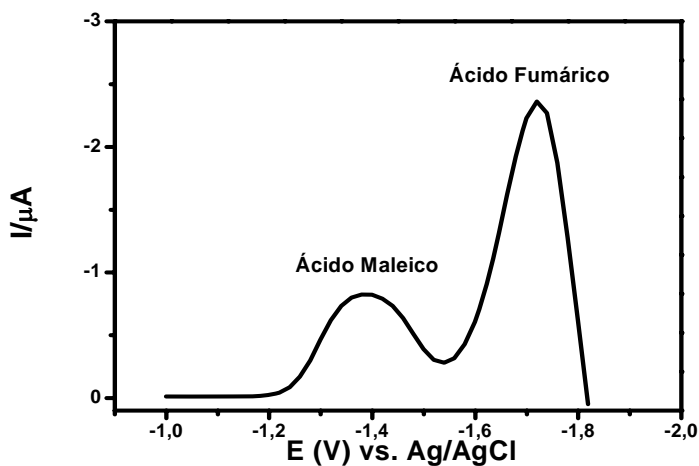


Figura 16. Voltamogramas do ácido maleico e do ácido fumárico utilizando a SWV com os valores do ponto A, $X_2 = 94,8\text{mV}$ e $X_3 = 99,5\text{Hz}$.

Os resultados obtidos na superfície de resposta indicam que aumentando os valores da amplitude e da freqüência a resposta da corrente aumenta proporcionalmente. Porém o aumento da freqüência causa um deslocamento no potencial de redução para valores mais negativos nos picos polarográficos

do ácido fumárico e do ácido maleico, prejudicando também a resolução e dificultando a separação dos dois picos.

O valor da amplitude provoca uma distorção do pico que prejudica a determinação dos dois ácidos pois provoca uma pequena fusão dos dois picos sendo impossível aumentar o valor deste parâmetro.

A Tabela 8 apresenta os valores ótimos dos parâmetros otimizados e as correntes estimada e observada para o ácido fumárico. O erro relativo representa a contribuição deste modelo para o aumento da corrente em uma mesma concentração do ácido fumárico e do ácido maleico na célula voltamétrica.

Tabela 8. Parâmetros otimizados para a análise do ácido fumárico e do ácido maleico com onda quadrada.

Parâmetros	Valores Ótimos	Corrente Estimada*
Potencial Inicial	-1,20 V	783,18 nA
Potencial Final	-1,90 V	
Incremento de voltagem	20,00 mV	
Amplitude	94,8mV	Corrente observada*
Frequência	99,5 Hz	786,19 nA
Velocidade de varredura	1,989 mVs ⁻¹	
Tamanho da gota	0,70 mm ²	*Erro relativo: +0,38 %

4.2.3. Aplicabilidade da técnica otimizada

4.2.3.1. Linearidade

Pode-se observar na Figura 17 os voltamogramas de onda quadrada do ácido maleico e do ácido fumárico e suas respectivas curvas de adição padrão estão dispostas na Figura 18. A equação de reta obtida para o ácido maleico $\Delta i_1(A) = 6,60 \times 10^{-8} + 1,21 \times 10^{-8} [\text{Ácido Maleico}]$, apresentando um coeficiente de determinação de 0,999. O potencial de meia onda para o ácido maleico utilizando os parâmetros otimizados para a SWV (Tabela 9) foi de - 1,38 Volts. A equação de reta obtida para o ácido fumárico $\Delta i_2(A) = 1,91 \times 10^{-7} + 1,83 \times 10^{-8} [\text{Ácido Fumárico}]$, apresentando um coeficiente de determinação de 0,999. O potencial de meia onda para o ácido maleico utilizando os parâmetros otimizados para a SWV (Figura 18) foi de - 1,72Volts.

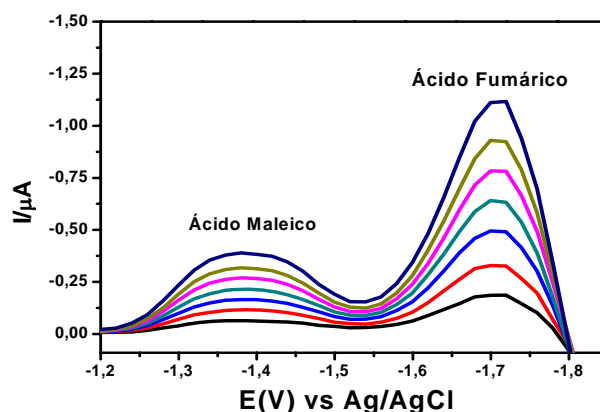


Figura 17. Voltamograma referente ao estudo do comportamento da corrente para avaliação da faixa de trabalho.

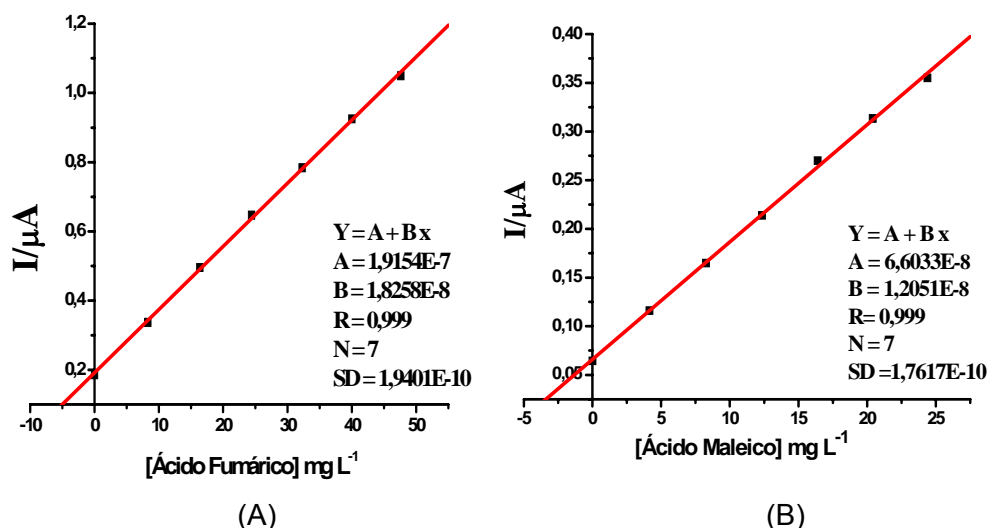


Figura 18. Em (A) e (B) observam-se as curvas de adição padrão do comportamento da resposta voltamétrica em função da variação da concentração do ácido maleico e do ácido fumárico por SWV.

Verificou-se nestas condições a repetitividade do sinal analítico na concentração de 8,23 mg L⁻¹ para o ácido fumárico e na concentração de 4,12 mg L⁻¹ para o ácido maleico na célula polarográfica.

Efetuuou-se sete determinações para os dois ácidos, obtendo-se como resultado a seguinte média: 8,223 ± 0,005 mg L⁻¹, com um desvio padrão relativo, RSD de 0,061% para o ácido fumárico, e 4,112 ± 0,010 mg L⁻¹ e um RSD de 0,24 %. Estes resultados indicaram uma boa repetibilidade e um baixo desvio padrão relativo entre uma determinação e outra, sendo portando, confiáveis.

4.2.3.2. Sensibilidade

Tabela 9. Valores de sensibilidade do método A.

	Sensibilidade (nA/mg.L ⁻¹)
Ácido Fumárico	18,3
Ácido Maleico	12,1

4.2.3.3. Limite de detecção e quantificação

Os cálculos da estimativa do desvio padrão relativo obedeceram às recomendações do INMETRO 2003 (RIBANI, 2004).

Estimou-se para o ácido fumárico o limite de detecção utilizando o critério $LD=3S_B/b$ encontrando um valor de 0,0689 mgL⁻¹ e um limite de quantificação utilizando o critério $LQ=10S_B/b$ igual a 0,340 mgL⁻¹.

Para o ácido maleico o limite de detecção foi de 0,0108 mgL⁻¹ e o limite de quantificação foi de 0,0209 mgL⁻¹.

Estes resultados mostraram que o método proposto provou ter um baixo limite de detecção e quantificação, semelhante a outros métodos voltamétricos, podendo, portanto, ser empregado em análises de rotina na determinação dos dois ácidos.

4.2.3.4. Precisão intermediária

Foram preparadas três amostras de água deionizada fortificadas, nos respectivos dias de avaliação, com solução padrão de ácido fumárico apresentando a concentração na célula voltamétrica de 8,26 mgL⁻¹, 16,40 mgL⁻¹ e 24,40 mgL⁻¹. Estas amostras foram submetidas à técnica voltamétrica, em três dias diferentes. Foram realizados 5 ensaios para cada amostra fortificada apresentando o RSD 0,45%, 0,78% e 0,32% para cada uma das concentrações.

O ácido maleico foi utilizado para fortificar três amostras de água deionizada apresentando a concentração na célula voltamétrica de 4,15 mgL⁻¹, 8,26 mgL⁻¹ e 12,35 mgL⁻¹. Estas amostras foram submetidas à técnica voltamétrica, em três dias diferentes. Foram realizados 5 ensaios para cada amostra fortificada apresentando o RSD 0,25%, 0,45% e 0,15% para cada uma

das concentrações.

4.3. Método B

4.3.1. Métodos Quimiométricos

4.3.1.1. Triagem dos fatores

Um planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} foi elaborado para investigar a importância relativa dos fatores, incremento de voltagem (IV), amplitude (AM), frequência (FR) e tamanho da gota (TG), na resposta voltamétrica. Os níveis escolhidos para cada fator são listados na Tabela 12 e a matriz de planejamento com as respostas em cada ensaio na Tabela 13.

Tabela 10. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} .

Símbolo	Fatores	Níveis	
		-	+
IV	Incremento de voltagem (mV)	6	18
AM	Amplitude (mV)	15	55
FR	Frequência (Hz)	20	80
TG	Tamanho da gota (mm ²)	0,2	0,7

Tabela 11. Planejamento fatorial fracionário e respectivas respostas instrumentais para a SWV. A relação geradora é I = 1234.

Experimento	Fatores				Resp(nA)
	IV	AM	FR	TG	
01	-1	-1	-1	-1	161,45
02	+1	-1	-1	+1	359,71
03	-1	+1	-1	+1	505,01
04	+1	+1	-1	-1	417,86
05	-1	-1	+1	+1	553,54
06	+1	-1	+1	-1	444,67
07	-1	+1	+1	-1	535,02
08	+1	+1	+1	+1	1799,0

Na Tabela 11 pode-se observar que os valores dos contrastes variam de 233,52 nA a 472,05 nA, portanto é razoável que se possa considerar aqueles

contrastes com valores acima de 300 nA como sendo os que tem maior importância relativa.

No planejamento fatorial 2_{IV}^{4-1} os contrastes de primeira ordem ficam confundidos com os de terceira ordem e os contrastes de segunda ordem com os demais contrastes de segunda ordem, como pode ser observado pela Tabela 14. Conseqüentemente, os contrastes de 1ª e 3ª ordens são estimativas das somas dos efeitos principais com os efeitos de interação de 3ª ordem no planejamento fatorial completo 2^4 .

De acordo com estas considerações observa-se que os contrastes l_1 , l_2 , l_3 e l_4 são os contrastes de maior importância relativa e devem ser analisados.

Tabela 12. Estimativas dos contrastes do fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1} e suas relações com os efeitos do fatorial completo.

Relação entre as colunas	Contrastes		Resposta (nA)
1 = 234	$l_1 = l_{234}$	$l_1 = 1 + 234$	316,56
2 = 134	$l_2 = l_{134}$	$l_2 = 2 + 134$	434,38
3 = 124	$l_3 = l_{124}$	$l_3 = 3 + 124$	472,05
4 = 123	$l_4 = l_{123}$	$l_4 = 4 + 123$	414,57
12 = 34	$l_{12} = l_{34}$	$l_{12} = 12 + 34$	271,86
13 = 24	$l_{13} = l_{24}$	$l_{13} = 13 + 24$	261,00
14 = 23	$l_{14} = l_{23}$	$l_{14} = 14 + 23$	233,52
I = 1234	$l_I = \text{média} + 1/2(1234)$		597,03

O contraste l_1 representa o incremento de voltagem, o contraste l_2 a amplitude, o contraste l_3 a frequência e o contraste l_4 representa o tamanho da gota, todos estes contrastes possuem importância relativa devido aos valores de corrente apresentados.

O valor do contraste l_4 sugere a utilização do nível (+) da variável TG, ou seja $0,07 \text{ mm}^2$, portanto a gota foi fixada neste valor.

Na análise das voltamogramas obtidos em cada ensaio observou-se uma perda de simetria e deslocamento da onda voltamétrica, provavelmente por causa do alto valor dos fatores nos níveis (+). Desta forma resolveu-se diminuir a faixa estudada, reduzindo os valores para a frequência e incremento

de varredura realizando o planejamento composto central, sendo que o tamanho da gota foi fixado em $0,07 \text{ mm}^2$.

4.3.1.2. Superfície de resposta

Após a triagem dos fatores os três fatores de maior significância: incremento de voltagem (IV), amplitude (AM) e frequência (FR), foi utilizado o planejamento composto central (CCD).

O planejamento CCD foi elaborado como descrito em 4.2.2. os níveis -1 e +1 foram os mesmos utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 , já os demais níveis (Tabela 16) foram previamente calculados usando a equação 7.

Tabela 13. Resultado do Planejamento CCD com $k = 3$.

Ensaio	IV (X_1)	AM (X_2)	FR(X_3)	IV(mV)	AM(mV)	FR(Hz)	I(nA)
01	-1	-1	-1	3,00	35,0	45,0	610,27
02	1	-1	-1	7,00	35,0	45,0	779,53
03	-1	1	-1	3,00	60,0	45,0	693,77
04	1	1	-1	7,00	60,0	45,0	923,04
05	-1	-1	1	3,00	35,0	65,0	682,09
06	1	-1	1	7,00	35,0	65,0	940,27
07	-1	1	1	3,00	60,0	65,0	923,04
08	1	1	1	7,00	60,0	65,0	1023,0
09	-1,682	0	0	1,64	47,5	55,0	581,11
10	1,682	0	0	8,36	47,5	55,0	1027,0
11	0	-1,682	0	5,00	26,5	55,0	653,03
12	0	1,682	0	5,00	68,5	55,0	963,67
13	0	0	-1,682	5,00	47,5	38,2	728,07
14	0	0	1,682	5,00	47,5	71,8	972,61
15	0	0	0	5,00	47,5	55,0	856,94
16	0	0	0	5,00	47,5	55,0	840,72
17	0	0	0	5,00	47,5	55,0	849,15
18	0	0	0	5,00	47,5	55,0	848,89

Os coeficientes de cada fator e seus respectivos valores de erro puro

são encontrados na Tabela 19, onde observa-se que os três fatores principais e a média b_0 são significativos pelo teste t. Na Tabela 20 foram levados em consideração apenas os fatores que apresentaram significância na Tabela 19 para obtenção da soma de quadrados da regressão.

Tabela 14. Coeficientes e erro puro para o modelo da superfície de resposta.

Símbolo	Coeficientes \pm Erro	Relação t(3)	** t^{tab}
b_0	848,80 \pm 3,31	256,4	3,18
IV	110,31 \pm 1,79	61,63	
AM	78,57 \pm 1,79	43,89	
FR	71,25 \pm 1,79	39,80	
IVxIV	-15,29 \pm 1,86	8,22	
AMxAM	-13,77 \pm 1,86	7,40	
FRxFR	1,07 \pm 1,86	0,57	
IVxAM	-12,28 \pm 2,34	5,25	
IVxFR	-5,05 \pm 2,34	2,16	
AMxFR	12,08 \pm 2,34	5,16	

** Os coeficientes em destaque foram significativos pelo teste t.

t^{tab} com 3 graus de liberdade e $\alpha = 0,05$.

A equação obtida da regressão está representada por Z levando em consideração apenas os fatores e as interações que foram significativas.

$$Z = 848,80 + 110,31(\text{IV}) - 78,57(\text{AM}) + 71,25(\text{FR}) - 15,29(\text{IV})^2 - 13,77(\text{AM})^2 + 12,08(\text{AMxFR})$$

$\pm 3,31$ $\pm 1,79$ $\pm 1,79$ $\pm 1,79$ $\pm 1,86$ $\pm 1,86$ $\pm 2,34$

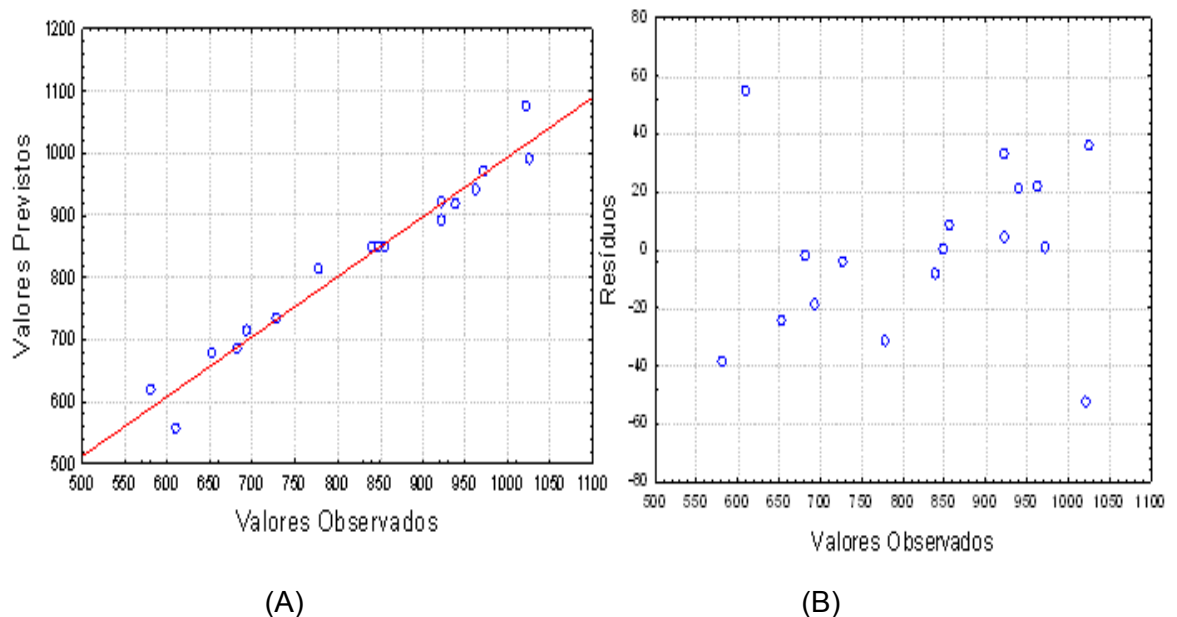


Figura 19. (A) Gráficos de valores observados vs. valores previsto. (B) Gráfico dos

resíduos.

Nas Figuras 19(A) e 19(B) observa-se uma indicação gráfica da qualidade do modelo sendo que na Figura 19(B) os pontos encontram-se bem distribuídos em torno do zero.

A Figura 20 apresenta os valores do erro relativo em porcentagem de cada medida experimental, estes valores demonstram um bom ajuste do modelo de segunda ordem aos dados experimentais e os valores dos erros relativos de cada medida experimental estão abaixo de 10% sendo que o valor mais próximo de 10% é referente aos baixos valores de cada variável avaliada na superfície devida ao nível mínimo (-).

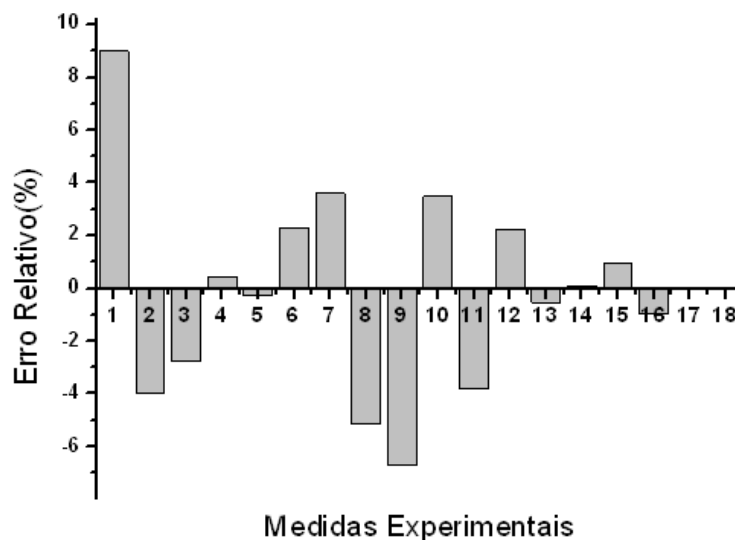


Figura 20. Erro relativo em porcentagem das medidas experimentais.

Para obter a superfície de resposta os valores da FR (frequência) foram variados de -1,682 a 1,682 e a melhor resposta de corrente obtida foi no nível (0) cujo valor de variável decodificada representou 55 Hz. Assim, o valor desta variável foi fixado neste valor e a superfície obtida entre os fatores principais IV e AM.

A Figura 21 (A) apresenta a superfície de resposta obtida, com os pontos distribuídos sobre esta superfície. Não foi possível deslocar mais os valores das variáveis, pois a medida que aumentavam-se os valores de IV e AM ocorria perda de simetria. Uma melhor visualização desta superfície pode ser observada na Figura 21 (B) que apresenta uma projeção desta superfície, o voltamograma obtido pelos dados do máximo matemático apresentou-se

distorcido e um deslocamento de potencial para potencial mais negativo. Portanto, o ponto B foi escolhido por apresentar uma melhor simetria resultante da redução do ácido butenodióico e pode ser observado na Figura 22, utilizando os parâmetros presentes na Tabela 17.

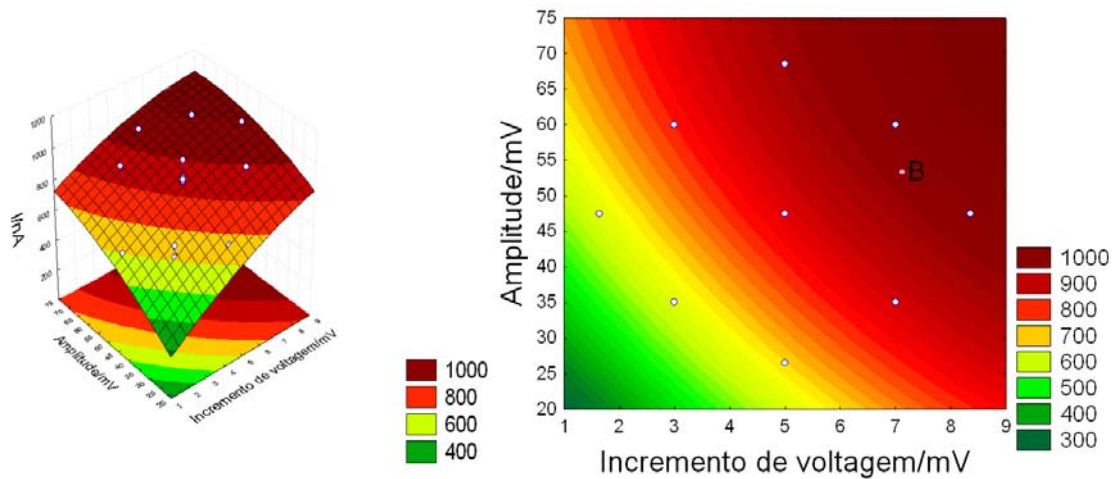


Figura 21. (A) Superfície de resposta com a variável Frequência (FR) fixada no nível (0), 55 Hz. $X_1 = IV$ (7mV), $X_2 = AM$ (53,75 mV) em termos de variáveis codificadas. (B) Projeção da superfície de resposta. As legendas mostram os valores da corrente em nA, obtidos em cada ensaio.

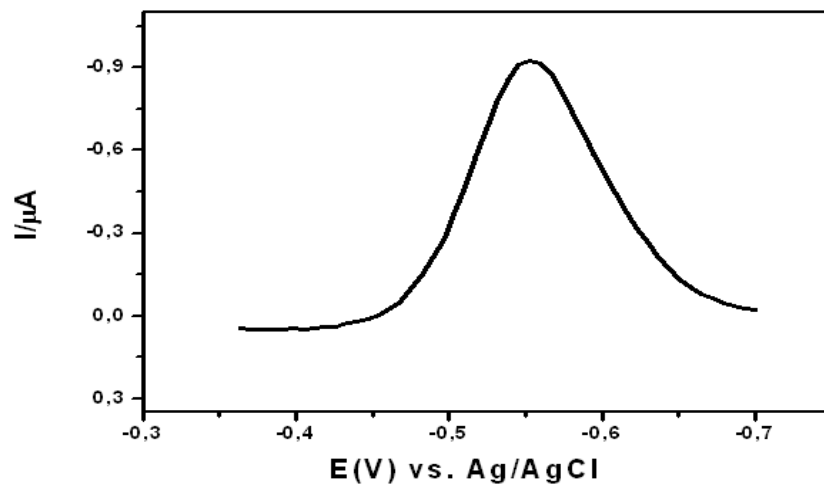


Figura 22. Voltamograma do ácido butenodióico utilizando a SWV com os valores do ponto A, $X_1 = 1,0$ (7,00 mV) e $X_2 = 0,5$ (53,75 mV).

Após a realização da superfície de resposta, os valores dos parâmetros otimizados para analisar o ácido butenodióico estão na Tabela 15.

Tabela 15. Parâmetros otimizados para a análise do ácido butenodióico utilizando a voltametria de onda quadrada.

Parâmetros otimizados	Valores ótimos	Corrente estimada*
Potencial Inicial	-0,30 V	998,40 nA
Potencial Final	-0,75 V	
Incremento de voltagem	7,00 mV	
Amplitude	53,75 mV	Corrente observada*
Frequência	55,00 Hz	937,85 nA
Velocidade de varredura	0,386 mV s ⁻¹	
Tamanho da gota	0,700 mm ²	*Erro relativo: -6,07%

4.3.1.3. Aplicabilidade da técnica otimizada

4.3.1.3.1. Linearidade

A Figura 23 mostra os voltamogramas de onda quadrada do ácido butenodióico e sua curva analítica.

A equação de reta encontrada para o ácido butenodióico utilizando os parâmetros da Tabela 17 foi $\Delta i(A) = 1,3478 \times 10^{-7} + 6,6231 \times 10^{-8}[\text{ácido butenodióico}]$, obtendo um coeficiente de correlação igual a 0,996. O potencial de meia onda para redução do ácido butenodióico foi de -0,55V.

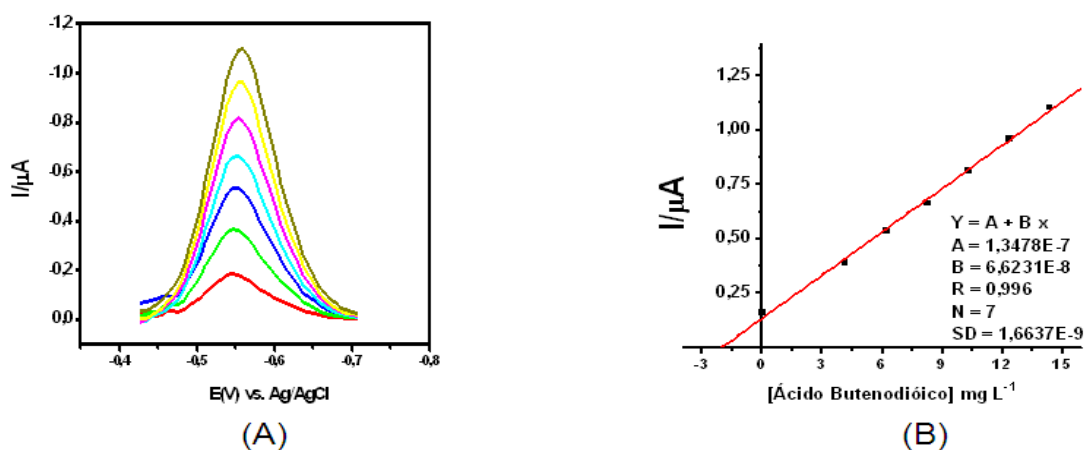


Figura 23. (A) Voltamograma de onda quadrada referente ao estudo do comportamento da corrente para avaliação da faixa de trabalho. (B) Observa-se a curva de adição padrão do comportamento da resposta voltamétrica em função da variação da concentração do ácido butenodióico.

4.3.1.3.2. Sensibilidade

A sensibilidade obtida pelo método B foi de 6,62 nA/mg.L⁻¹.

4.3.1.3.3. Repetitividade

Os cálculos da estimativa do desvio padrão relativo obedeceram às recomendações do INMETRO 2003 (RIBANI, 2004). Verificou-se a repetitividade do sinal analítico na concentração de 12,34 mg L⁻¹ para o ácido butenodióico na célula polarográfica.

Efetuuou-se sete determinações obtendo-se como resultado, a seguinte média: 12,331 ± 0,012 mg L⁻¹, com um desvio padrão relativo, RSD, de 0,097%. Estes resultados indicaram uma boa repetibilidade e um baixo desvio padrão relativo entre uma determinação e outra, sendo portanto, confiáveis.

4.3.1.3.4. Precisão intermediária

Foram realizados 5 ensaios para cada amostra fortificada apresentando o RSD 0,24%, 0,45% e 0,66% para cada uma das concentrações.

4.3.1.3.5. Limite de detecção e quantificação

Estimou-se para o ácido butenodióico um valor de limite de detecção igual a 1,04 mg L⁻¹ e o valor do limite de quantificação igual a 1,32 mg L⁻¹. Estes resultados mostraram que o método proposto possui um baixo limite de detecção e quantificação, semelhante a outros métodos voltamétricos, podendo portanto ser empregado em análises de rotina na determinação dos dois ácidos em mistura usando o HCl 30% (v/v) como eletrólito suporte.

4.3.2. Aplicação da técnica de recuperação

4.3.2.1. Método A

Os voltamogramas e as curvas de adição padrão obtidas para a amostra referência podem ser observadas nas Figuras 24 e 25 respectivamente.

Foram realizadas três ensaios da amostra referência e os resultados obtidos para o ácido fumárico foram 8,08 mgL⁻¹, 8,14 mgL⁻¹ e 8,10 mgL⁻¹, já

para o ácido maleico os resultados obtidos foram $4,03 \text{ mgL}^{-1}$, $4,01 \text{ mgL}^{-1}$ e $4,06 \text{ mgL}^{-1}$.

O valor esperado para a concentração do ácido fumárico na amostra de água deionizada fortificada é de $8,16 \text{ mgL}^{-1}$ e para o ácido maleico é de $4,08 \text{ mgL}^{-1}$. Portanto, a concentração média encontrada para o ácido fumárico foi de $8,11 \pm 0,036 \text{ mgL}^{-1}$, uma recuperação de 99,39 % e o erro relativo obtido foi de -0,61%. Para o ácido maleico a concentração média encontrada foi $4,03 \pm 0,02 \text{ mgL}^{-1}$, uma porcentagem de recuperação de 98,77 % e o erro relativo obtido foi -1,23 %.

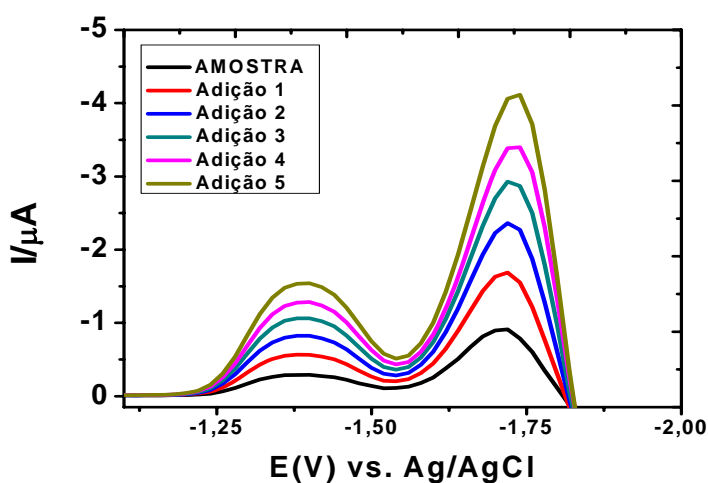


Figura 24. Voltamograma de onda quadrada da amostra referência.

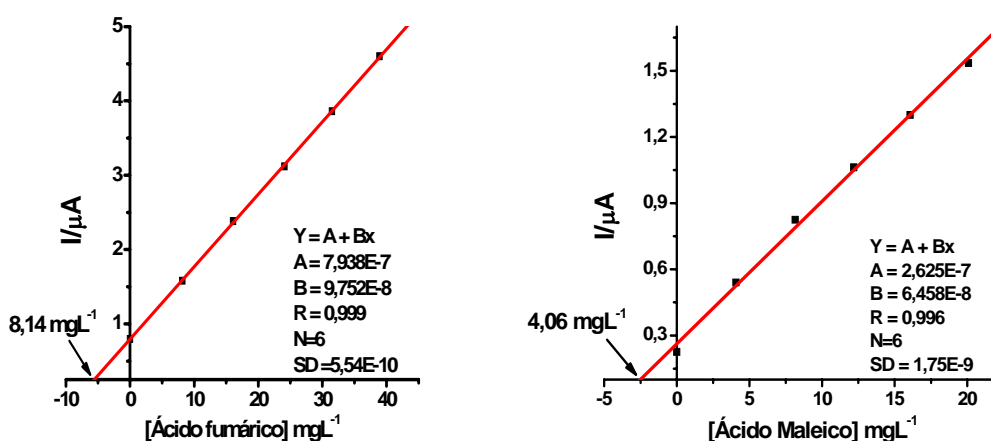


Figura 25. Análise por adição padrão com detecção de $8,14 \text{ mgL}^{-1}$ para o ácido fumárico e $4,06 \text{ mgL}^{-1}$ para o ácido maleico.

4.3.2.2. Método B

Os voltamogramas e as curvas analíticas obtidas para a amostra referência podem ser observadas na Figura 26.

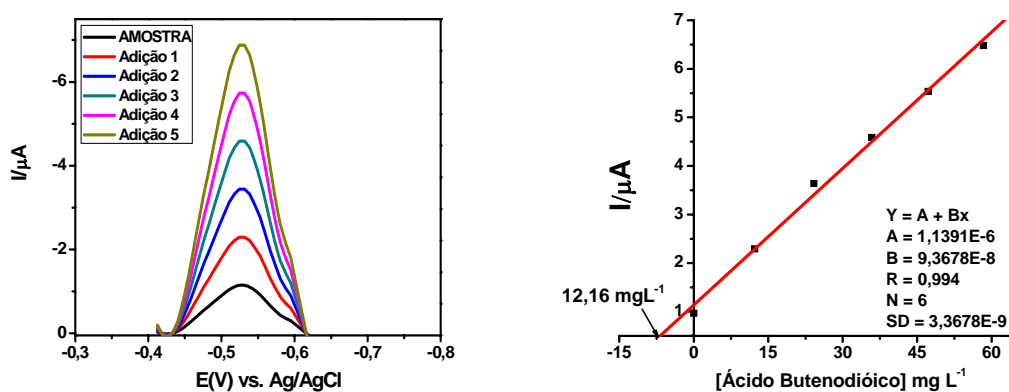


Figura 26. Voltamograma de onda quadrada da amostra referência. Análise por adição padrão com detecção de $12,16 \text{ mgL}^{-1}$ para o ácido butenodíico.

Foram realizadas três ensaios da amostra referência e os resultados obtidos foram $12,16 \text{ mgL}^{-1}$, $12,23 \text{ mgL}^{-1}$ e $12,18 \text{ mgL}^{-1}$. O valor esperado para a concentração do ácido butenodíico na amostra de suco de maçã fortificado é $12,25 \text{ mgL}^{-1}$, portanto, a concentração média encontrada foi de $12,19 \pm 0,040 \text{ mgL}^{-1}$, uma recuperação de 99,51 % e o erro relativo obtido foi -0,49%.

4.3.3. Amostras

As amostras de suco de maçã previamente preparadas foram submetidas a análise por voltametria de onda quadrada.

As 6 amostras foram analisadas pelo método A utilizando os parâmetros otimizados para determinação do ácido fumárico e do ácido maleico separadamente. As Figuras 27, 28 e 29 apresentam os voltamogramas obtidos utilizando a voltametria de onda quadrada para cada uma das amostras de suco de maçã.

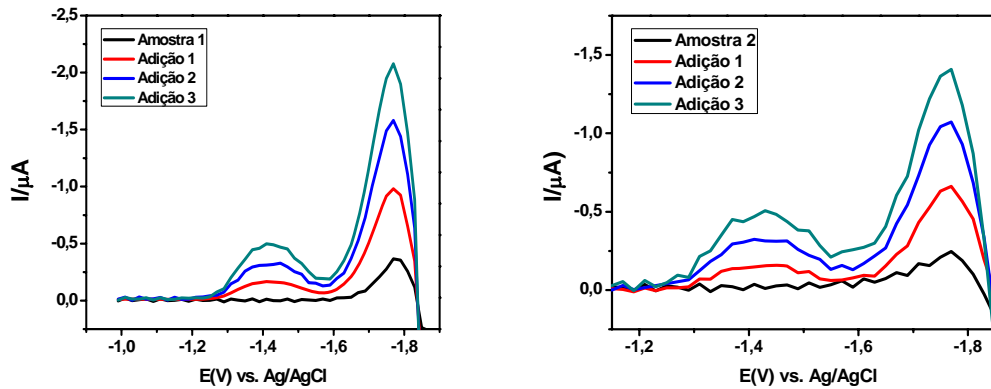


Figura 27. Voltamogramas das amostras de suco de maçã analisadas utilizando os parâmetros otimizados do Método A.

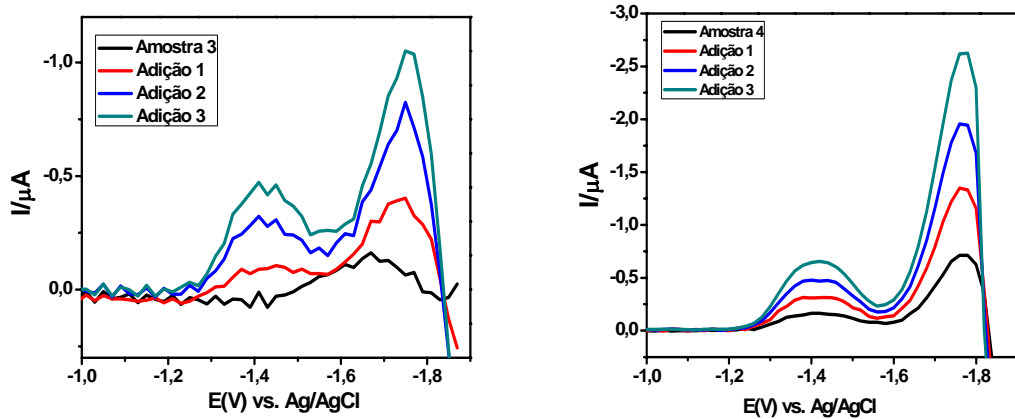


Figura 28. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.

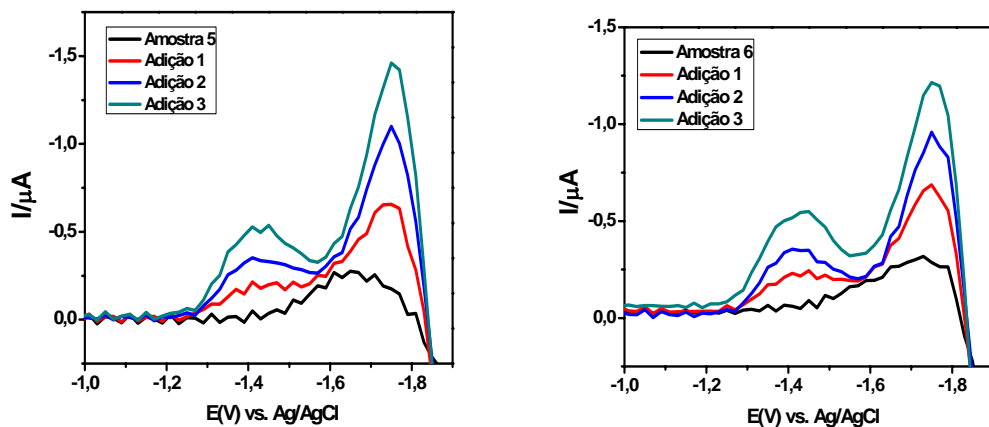


Figura 29. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.

As amostras também foram analisadas pelo método B para determinação de ácido butenodióico utilizando os parâmetros otimizados. Os voltamogramas obtidos da voltametria de onda quadrada para cada uma das

amostras de suco de maçã está presente nas Figuras 30, 31 e 32.

Nos dois métodos trabalhados foram realizadas 3 ensaios para cada amostra. No método A, os voltamogramas obtidos pela técnica de adição padrão foram utilizados para obtenção das curvas analíticas do ácido fumárico e do ácido maleico e os resultados da regressão linear estão apresentados nas Tabelas 18 e 19 sendo a sigla Conc. a representação da Concentração encontrada.

No método B, os voltamogramas obtidos pela técnica de adição padrão foram utilizados para obter a curva analítica do ácido butenodióico, visto que nas condições deste método, o ácido fumárico e o ácido maleico encontram-se totalmente protonados e por sofrerem redução em um mesmo valor de potencial, não é possível a distinção entre os dois ácidos. Assim, observa-se na Tabela 20 os resultados da regressão linear obtidos desta curva de adição padrão.

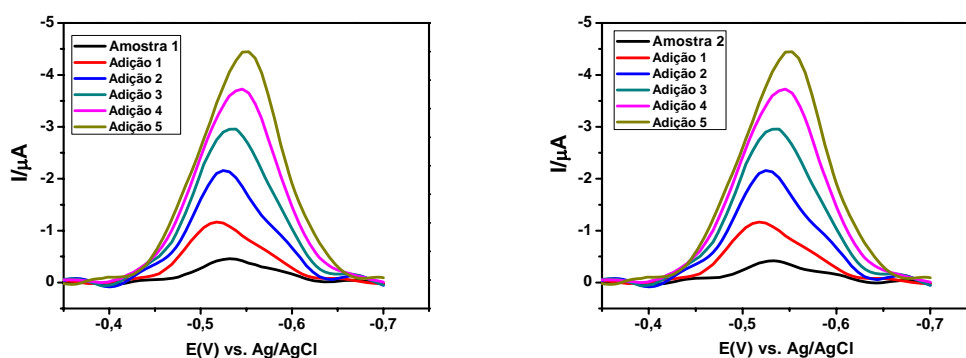


Figura 30. Voltamogramas das amostras de suco de maçã analisadas utilizando os parâmetros otimizados do Método B.

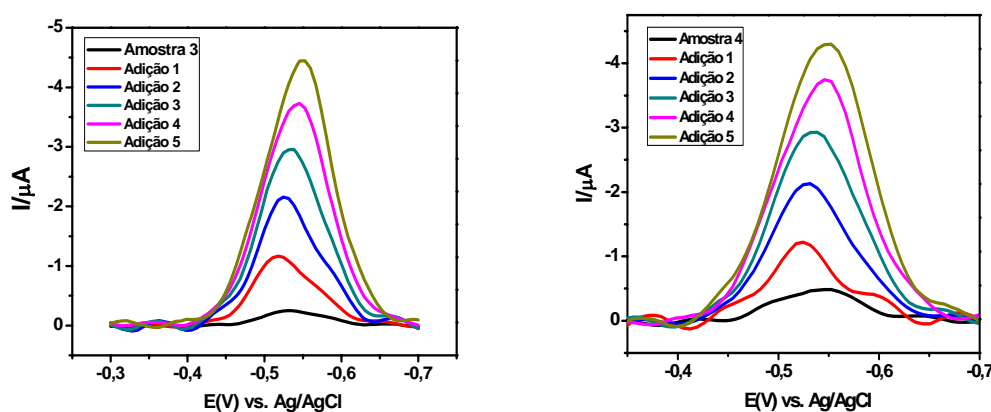


Figura 31. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.

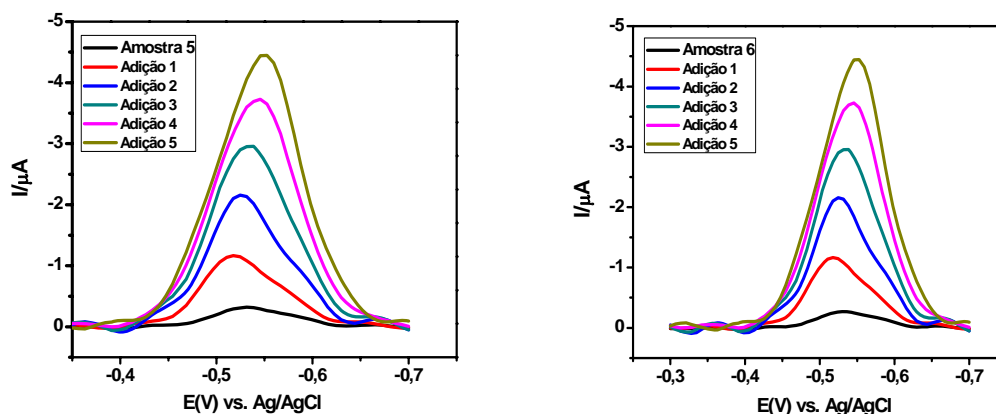


Figura 32. Voltamogramas das amostras de suco de maçã.

Tabela 16. Características da regressão linear da equação da curva analítica do ácido fumárico (método A).

AMOSTRA	Coef.Linear	Coef. Angular	R ²	Conc. (mg.L ⁻¹)
01	1,7497x10 ⁻⁷	3,7611x10 ⁻⁸	0,997	4,65
02	2,6617x10 ⁻⁷	4,5556x10 ⁻⁸	0,997	5,84
03	1,2513x10 ⁻⁷	3,6937x10 ⁻⁸	0,991	3,39
04	2,9841x10 ⁻⁷	3,5545x10 ⁻⁸	0,997	8,40
05	2,4131x10 ⁻⁷	4,7948x10 ⁻⁸	0,996	5,03
06	2,348x10 ⁻⁷	4,9276x10 ⁻⁸	0,994	4,76

Tabela 17. Características da regressão linear da equação da curva analítica do ácido maleico (método A).

AMOSTRA	Coef.Linear	Coef.Angular	R ²	Conc.(mg.L ⁻¹)
01	4,1974x10 ⁻⁸	3,4088x10 ⁻⁸	0,995	1,23
02	1,0617x10 ⁻⁸	3,8299x10 ⁻⁸	0,997	0,28
03	6,6771x10 ⁻⁹	3,5223x10 ⁻⁸	0,998	0,19
04	5,3079x10 ⁻⁸	3,7850x10 ⁻⁸	0,999	1,40
05	4,2168x10 ⁻⁸	3,7069x10 ⁻⁸	0,999	1,14
06	2,1183x10 ⁻⁸	3,3241x10 ⁻⁸	0,998	0,64

Observando-se as Tabelas 18 e 19, pode-se verificar que em todas as 6 amostras, os valores do coeficiente de determinação (R²) aproxima-se do valor 1, tanto para o ácido fumárico quanto para o ácido maleico, demonstrando um bom ajuste dos dados obtidos para cada amostra no método A.

Tabela 18. Características da regressão linear da equação da curva analítica do ácido butenodióico.

AMOSTRA	Coef.Linear	Coef.Angular	R ²	Conc.(mg.L ⁻¹)
01	3,9067x10 ⁻⁷	6,7690x10 ⁻⁸	0,995	5,77
02	4,1240x10 ⁻⁷	6,7230x10 ⁻⁸	0,994	6,13
03	2,4578x10 ⁻⁷	6,7351x10 ⁻⁸	0,999	3,65
04	5,7907x10 ⁻⁷	5,9523x10 ⁻⁸	0,994	9,73
05	4,1734x10 ⁻⁷	6,7271x10 ⁻⁸	0,996	6,20
06	3,7235x10 ⁻⁷	6,8537x10 ⁻⁸	0,996	5,43

Na análise do ácido butenodióico, pode-se observar pela Tabela 20 os valores obtidos através da análise da regressão linear da curva analítica, para determinar a concentração deste ácido nas amostras de suco de maçã.

O método de comparação utilizado na validação das duas metodologias foi o HPLC, a curva analítica forneceu a equação de regressão para o ácido maleico, $Y = -16826,47 + 135307,25 [\text{Ácido Maleico}]$, sendo Y o valor da área do pico do ácido maleico, apresentando um R² igual a 0,995; para o ácido fumárico a equação de regressão obtida foi $Y = -12580,40 + 122940,34 [\text{Ácido Fumárico}]$ onde Y é o valor da área referente ao pico do ácido fumárico, apresentando um R² igual a 0,997.

As curvas analíticas obtidas no método A, proporcionou a determinação das concentrações dos isômeros do ácido butenodióico e estes valores foram comparados com o método HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), como pode ser observado na Tabela 21, já na Tabela 22 encontram-se os valores de concentração do ácido butenodióico pelo método B comparados ao HPLC.

Tabela 19. Comparação entre os valores das concentrações do ácido fumárico e do ácido maleico.

AMOSTRA	Método A		HPLC	
	Ácido Fumárico mgL ⁻¹	Ácido Maleico mgL ⁻¹	Ácido Fumárico mgL ⁻¹	Ácido Maleico mgL ⁻¹
01	4,68 ± 0,03	1,22 ± 0,01	4,66 ± 0,04	1,24 ± 0,02
02	5,83 ± 0,02	0,27 ± 0,02	5,92 ± 0,01	0,28 ± 0,04
03	3,40 ± 0,02	0,19 ± 0,01	3,37 ± 0,03	0,20 ± 0,02
04	8,27 ± 0,11	1,40 ± 0,01	8,31 ± 0,15	1,41 ± 0,02
05	5,01 ± 0,02	1,13 ± 0,01	5,10 ± 0,03	1,14 ± 0,01
06	4,76 ± 0,03	0,62 ± 0,02	4,80 ± 0,04	0,64 ± 0,01

Tabela 20. Comparação entre as concentrações do ácido fumárico e do ácido maleico em amostras de suco de maçã.

AMOSTRA	Método B (mgL ⁻¹)	HPLC (mgL ⁻¹)
01	5,77 ± 0,01	5,90 ± 0,01
02	6,13 ± 0,02	6,20 ± 0,01
03	3,65 ± 0,01	3,57 ± 0,03
04	9,73 ± 0,13	9,72 ± 0,02
05	6,20 ± 0,03	6,24 ± 0,02
06	5,43 ± 0,01	5,44 ± 0,03

Os valores do erro relativo das concentrações de cada amostra pelo método A comparados ao método de referência, HPLC, estão presentes na Tabela 23. Pode-se observar que os valores do erro relativo para cada amostra varia em módulo entre 0,43 a 5,0% para o método A, e para o método B esta variação foi de 0,64 a 2,24%.

Tabela 21. Erro relativo das concentrações no método A para o ácido fumárico e maleico e no método B para o ácido butenodiólico.

Amostra	Erro Relativo (%)		
	Método A	Método B	
	Ácido Fumárico	Ácido Maleico	Ácido Butenodiólico
01	0,43	-1,61	-2,20
02	-1,52	3,57	-1,13
03	0,89	-5,00	2,24
04	-0,48	-0,71	0,40
05	-1,76	-0,88	-0,64
06	-0,83	-3,13	-0,18

Pode-se observar pela Tabela 23, que o método A e o método B apresentam pequenos valores de erro relativo, permitindo a utilização destes métodos na determinação da concentração de ácido fumárico e do ácido maleico separadamente e a determinação do ácido butenodiólico.

As amostras de suco analisadas que apresentaram concentração de ácido fumárico e maleico acima de 3,00 mgL⁻¹ podem ter sido fabricados com maçãs de má qualidade que devido a presença de fungos e bactérias proporcionam o aparecimento destes ácidos.

5. CONCLUSÕES

O processo de otimização da metodologia de determinação do ácido butenodióico (método B) e da determinação dos seus isômeros, o ácido fumárico e o ácido maleico (método A), utilizando a técnica da voltametria de onda quadrada, mostrou-se simples, rápida e de fácil execução. Os métodos utilizados mostraram-se precisos e reprodutíveis, não necessitando da etapa de pré concentração das amostras, a etapa de extração em fase sólida é simples e necessária devida a utilização de amostras complexas, como o suco de maçã.

A otimização das duas técnicas foi possível devido ao planejamento fatorial utilizando a voltametria de onda quadrada trabalhando com o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE). Os parâmetros de maior significância foram o incremento de voltagem, a amplitude e frequência, utilizando eletrólito suporte adequado para cada método analisado. Após a otimização, os métodos foram devidamente validados e os resultados obtidos para cada amostra demonstra a compatibilidade dos dois métodos, pois os teores encontrados do ácido butenodióico nas amostras equivalem a soma do teor de ácido fumárico e ácido maleico. Portanto pode-se utilizar o método A para determinar a concentração de cada ácido separadamente em pH 8,20 e utilizar o método B para determinar a concentração do ácido butenodióico em soluções ácidas, de forma a um método complementar o outro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, J.; GOKMEN,V.; TUYDAS,E.E.; Na investigation into the formation of fumaric acid in Apple juice concentrates. *European Food Research and Technology*, V.209, p.308-312,1999.

AGOSTINHO, S.M.L.; VILLAMIL,R.F.V.; NETO,A.A.; ARANHA,H.; O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. *Química Nova*, V.27, n.5, p.813-817, 2004.

ALEIXO L. M.; Voltametria: conceitos e técnicas. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 40 p. [on-line]. Disponível em: www.chemkeys.com. Acessado em: 20/01/2009.

BAREK, J.; FOGG,A.G.; MUCK,A.;ZIMA,J.; Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*,V.31,n.4, p.291-309, 2001.

BRITTO,N.M.;JUNIOR,O.P.A.;POLESE,L.;RIBEIRO,M.L; Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão.Pesticidas:R.Ecotoxicol.e Meio Ambiente, Curitiba,v.13,p129-146,2003.

CALADO,V.; MONTGOMERY,D.C.; Planejamento de Experimentos usando o Estatística. ©E-papers Serviços Editoriais Ltda, 260p, 2003.

CARVALHO,J.R.; Otimização da metodologia de determinação de molibdênio em solos e plantas por voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva. Viçosa, 2008. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa.

CHURIKOV, A.V.; VOLGIN, M.A.; PRIDATKO, K.I.; On the determination of kinetic characteristics of lithium intercalation into carbon. *Electrochimica Acta*, n.47, p. 2857-2865, 2002.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C.; Reconhecimento de padrões por

métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova*. V. 30, n. 2. p. 481-487, 2007.

ECONOMOU, A.; BOLIS, S.D.; EFSTATHIOU, C.E.; VOLIKAKIS, G.J.; A "Virtual" electroanalytical instrument for square wave voltammetry. *Analytical Chimica Acta*, V.467, p. 179-188, 2002.

ELVING, P.J., MARTIN A.J., ROSENTHAL, I.; Polarographic determination of mixtures of maleic and fumaric acid and their dithylesters. *Anal Chem* 25, p.1082 – 1084, 1953.

ELVING, P.J.; ROSENTHAL, I.; Maleic and Fumaric Acids Origin of Split Polarographic Waves and Analytical Significance. *Analytical Chemistry*, V.26, n.9, 1954.

ENGEL, C.A.R.; STRAATHOF, A.J.J.; ZIJLMANS, T.W.; GULIK, W.M.; WIELEN, L.A.M.W.; Fumaric acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, V.78, p.379-389, 2008.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES A. M.; MELGO M. S.; VOLPE P. L. O.; Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. *Química Nova*, V. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FRANCH, M.I.; AYLLÓN, J.A.; PERAL, J.; DOMENECH, X.; Enhanced photocatalytic degradation of maleic acid by Fe(III) adsorption onto the TiO₂ surface. *Catalysis Today*. V.101, p.245-252, 2005.

GOKMEN, V.; ACAR, J.; Fumaric acid in Apple juice: a potential indicator of microbial spoilage of apples used as raw material. *Food Additives and Contaminants*, V.21, n.7, p.626-631, 2004.

GUIMARÃES, C. R.; Avaliação das características físico-químicas de ácidos húmicos em diferentes etapas da vermicompostagem, através de técnicas

quimiométricas de reconhecimento de padrões. Viçosa, MG, 163p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agroquímica - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

GULABOSKI, R.; SPIREVSKA,I.; SOPTRAJANOVA,L.; SLAVEVSKA.R.; Square-wave voltammetric method for determination of fumaric and maleic acid – determination of fumaric acid in wine. *Analytical Letters*, V.34, n.10, p. 1719-1731, 2001.

KAMBE, T.N.; NOZUE,T.; MUKOUYAMA,M.;NAKAHARA,T.; Bioconversion of Maleic Acid to Fumaric Acid by *Pseudomonas alcaligenes* Strain XD-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, V.84, n.2, p.165-168,1997.

KADAKAL,Ç.; NAS,S.; Effect of Apple juice proportion on the patulin, fumaric acid , HMF and other Apple juice properties. *Journal of Food Safety*,V.22 p.17-25, 2002.

KRAUSE,M.S.Jr.; RAMALEY,L.; Analytical application of square-wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, V.41, n.11, p.1365-1369, 1969.

KVARATSKHELIYA,R.K.;KVARATSKHELIYA,E.R.; Voltammetry of Maleic Acid in Aqueous and Mixed Environments. *Russian Journal of Electrochemistry*, V.36, n.8, p.909-912, 2000.

KUTSCHENKO, F.; GONÇALVES,J.E.; OLIVEIRA,A.J.B.;GONÇALVES,R.A.C.; Análise potenciométrica - um levantamento histórico, princípios e aplicações. *Iniciação Científica CESUMAR*, V.07, n.01, p.49-56, 2005.

LI,S.; CHEN,H.L.; XU,J.Y.; ZHANG,L.; Recovery of Fumaric Acid from Industrial Wastewater by Chemical Extraction and Stripping. *Separation Science and Technology*,V.42, n.10, p.2347-2360,2007.

LI,S.; ZHUANG, J.; ZHI,T.; CHEN,H.; ZHANG,L.; Combination of complex extration with reverse osmosis for the treatment of fumaric acid industrial

wastewater. *Desalination*, V.234, p. 362-369, 2008.

LINDBERG,W.; KOWALSKI,B.;Evaluation of potentiometric acid-base titration by partial-least-squares calibration. *Analytica Chimica Acta*, V.206, p.125-135,1988.

LUQUE,S.S.; MATO,I.; HUIDOBRO,J.F.; LOZANO,J.S.; SANCHO,M.; Rapid determination of minority organic acid in honey by high-performance liquid chromatography. *Jornal of Chromatography A*, n.955, p. 207-214, 2002.

LUQUE,S.S.;MATO,I.; HUIDOBRO,J.F.; LOZANO,J.S.; MONTEAGUDO,J.C.G.; Different forms of maleic acid and fumaric acids (cis and trans of 2-butenodioic acid) in honey. *Food Chemistry*, V.80, p.215-219, 2003.

MELLO, L.M.R.; Produção e Mercado Brasileiro de Maçã.Comunicado técnico N^o 50, EMBRAPA,Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. 4 p. [on line] Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot050.pdf>. Acessado dia 01/05/08.

METRODAT: 797 VA; Computrace Software Manual, Metrohm Ltda, 280p. Suíça, 2005.

MICROCAL, Origin 6.01, Microcal, Northampton, MA, 1999.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C.; Applied statistics and probability for engineers. John Wiley & Sons,Inc., 3^a edição, 2003.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E.; Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2^a ed. Editora da UNICAMP, Campinas-SP, 401 p, 2002.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E.; 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, V. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

OSTERYOUNG, J.G.; OSTERYONG, R.A.; Square Wave Voltammetry. Analytical Chemistry, V.57, n.1, 1985.

PILONE, D.A.; PILONE, G.J.; RANKINE, B.C.; Influence of yeast strain, pH and temperature on degradation of fumaric acid in grape juice fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, V.24, n.3, 1973.

RAMALEY, L.; KRAUSE, M.S.; Teory of Square Wave Voltammetry. Analytical Chemistry, V.41, n.11, p. 1362-1365, 1969.

RIBANI, M.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, V. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D.M. e HOLLER, J.F.; "Fundamentals of Analytical Chemistry", 6th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1992.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J.; Principles of Instrumental analysis, 4 ed., Sauders College Publishing, 848 p, 1992.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. Química Nova, V. 26, n. 1, 2003.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S., AVACA, L. A.; PEDROSA, V. A.; CODOGNATO, L.; MALAGUTTI, A. R. ; TOLEDO, R. A. , PEDROSA, V. A. O., ROBSON, T. S.; MAZO, L. H.; Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. Química Nova, V. 27, nº. 5, p. 790-797, 2004.

SOUZA, D.; GALLI, A.; CALEGARO, M. L.; MACHADO, S. A. S., PIRES, R. C.; Utilização da múltipla voltametria de onda quadrada na determinação eletroanalítica de compostos orgânicos e inorgânicos. Química Nova, V. 30, nº. 2, p.458-463, 2007.

TARASOVA, V.A.; KIRYUSHOV, V.N.; BEK, R.Y.; Voltammetric Determination of Maleic and Fumaric Acids at an In Situ Renewed Graphite Electrode. Journal of

Analytical Chemistry, V.58, n.58, p.565-568, 2003.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M., Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. Quimica Nova, V.29, nº 2, p.338-350, 2006.

VAGELA, S.S.; JETHVA, A.D.; GOHIL, M.S.; RAMACHANDRAIAH, G.; GHOSH, P. K.; VASUDEVAN, D.; Cyclic Voltammetric and Galvanostatic Electrolysis Studies on the reduction of maleic acid in buffered and unbuffered solutions. Bulletin of Electrochemistry, V.18, n.5, p.237-240, 2002.

WOJNÁROVITS, L.; TAKÁCS, E.; EMMI, S.S.; Reaction of 2-hydroxy-2-propyl radical with maleic and fumaric acids in aqueous solution: pH dependence. Chemical Physical Letters, V.438, p.224-228, 2007.

WOJNÁROVITS, L.; TAKÁCS, E.; EMMI, S.S.; Nucleophilic and electrophilic radical attack on maleic and fumaric acids in aqueous solution. Chemical Physics Letters, V.460, p. 451-456, 2008.

WARSHOWSKY, B.; ELVING, P.J.; MANDEL, J.; Polarographic Analysis of Mixtures of Maleic and Fumaric acids. Analytical Chemistry, V.19, n.3, 1947.