

CLEIDE GARCIA DE PAULA

Determinação Voltamétrica de Ácido Fólico em superfície de Eletrodo
Sólido com Filme Intermetálico $\text{Ag}_2\text{Hg}_{3,02}$: Aplicação em Sucos de Frutas
in natura e industrializados

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos Requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Fertonani

Co-Orientador: Prof. Dr. José Paschoal Batistuti

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

P324d Paula, Cleide Garcia de
Determinação voltamétrica de ácido fólico em superfície de eletrodo sólido com filme intermetálico $\text{Ag}_2\text{Hg}_{3,02}$: aplicação em sucos de frutas *in natura* e industrializados / Cleide Garcia de Paula. – Araraquara : [s.n], 2014
127 f. : il.

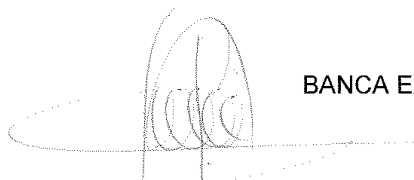
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Fernando Luis Fertonani
Coorientador: José Paschoal Batistuti

1. Química analítica. 2. Ácido fólico. 3. Suco de frutas. 4. Voltametria. 5. Eletrodos. I. Título.

CLEIDE GARCIA DE PAULA

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em
Química.

Araraquara, 07 de maio de 2014.



BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. FERNANDO LUIS FERTONANI (Orientador)
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas / UNESP / São José do Rio
Preto



Prof. Dr. CECILIO SADAÓ FUGIVARA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. ELAINE GOMES MATHEUS FURLAN
Centro de Ciências Agrárias / UFSCar / São Carlos



Prof. Dr. WAGNER LUIZ POLITO
Instituto de Química / USP / São Carlos



Prof. Dr. JOÃO ROBERTO FERNANDES
Faculdade de Ciências / UNESP / Bauru

Dados Curriculares

Cleide Garcia de Paula

1 Dados Pessoais

Nascimento: 26/07/1959

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: Gastão Vidigal -SP

Filiação: Francisco Garcia Sanches

Emília Pacheco Garcia

Documento de Identidade: 11.082.583-4 SSP/SP

Cadastro de pessoa Física: 029.467.808-56

E-mail: clgpaula@hotmail.com

2 Formação Acadêmica

2.1 Graduação

2.1.1 Ciências Físicas e Biológicas – FEV-Fundação Educacional de Votuporanga, Votuporanga-SP, concluído: dezembro (1979)

2.1.2 Biologia (Licenciatura Plena) – FEV-Fundação Educacional de Votuporanga, Votuporanga-SP, concluído: dezembro de (1980)

2.1.3 Química (Licenciatura Plena) – Faculdade “Auxilium” de Filosofia, Ciências e Letras , Lins-SP, concluído: dezembro de 1981

2.2 Pós-Graduação

2.2.1 Especialização (566 h): Química Industrial – Fundação de Santo André, Santo André-SP, concluído: dezembro de 1998.

2.2.2 Mestrado em Ciências – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo-IQSC-USP, São Carlos-SP, concluído: dezembro de 2001.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

Área de concentração: Química Analítica

Título: Degradação do Herbicida Ácido 2,4 diclorofenoxiacético por meio da luz solar e artificial em diferentes meios.

3 Experiência Profissional

3.1 Auxiliar de Escritório – Centro Social de Votuporanga (1978 -1980).

3.2 Professora - Ensino Médio na rede pública estadual nas disciplinas de Biologia e Química (1981 - 1993) e (1996 - 2011).

3.3 Assistente Administrativo e Pedagógico

Diretoria de Ensino de Votuporanga – Votuporanga-SP (1994-1995).

3.4 Professora Universitária - Curso de Biologia, Centro Universitário de Jales (UniJales), Jales-SP, (2003 - 2005).

3.5 Orientação de Iniciação Científica – Participação (28/09/2004) na VI Semana da Biologia - UniJales, abordando o tema: “Quantificação do Cromo em Águas do Córrego do Marimbondinho no Município de Jales-SP”.

3.6 Participação no Programa de Formação Continuada – Teia do Saber, parceria entre Secretaria Estadual de Educação do Estado de São Paulo e Centro Universitário de Jales (UniJales), ministrei aulas laboratoriais para professores atuantes na rede estadual do ensino médio, no período de (21/05/2005 a 08/10/2005).

4 Experiência Científica

4.1 Artigos completos publicados e/ou submetidos a periódicos

C.G. de Paula; F.L. Fertoni; J. P. Batistuti; R. A. de Toledo; C. M. Pedro Vaz.

“A solid film electrode of intermetallic $\text{Ag}_2\text{Hg}_{3,02}$ for folic acid determination in fresh and processed fruit juice”. Encaminhado para revista.

4.2 Trabalhos completos publicados em anais de congressos

4.2.1 Paula, C. G. de; Toledo, R. A. de; Vaz, C. M. P.

“Determinação eletroanalítica do ácido fólico utilizando eletrodo sólido de amálgama de prata” In: Encontro Nacional de Química Analítica, v. 14, **2007**, João Pessoa, PB. Resumos...[Rio de Janeiro: ENQA, 2007].

4.2.2 Paula CG1, Batistuti JP2, Fertonani LF3 -1IQAr - Unesp, 2FCFAR - Unesp, 3 IBILCE / UNESP - Química e Ciências Ambientais.

“Determinação Eletroanalítica do Ácido Fólico em Fármaco e Suco de Fruta *in natura* e industrializado com a aplicação de AgSIE/VOQ”

“XVII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos - ENAAL”, São Paulo-SP. [15 a 18 de setembro de **2013**].

FQ. 54 - página 9 – *documento eletrônico*

<http://www.enaal.com.br/index.php/informacoes.html>

4.2.3 “Determinação de Ácido Fólico em Suco de Fruta *in natura* com Aplicação da SWAdSV sobre eletrodo AgSIE”

PAULA, C. G. de; SANTOS, C. C. M; Batistuti, J. P.; Pastre, I. A.; Fertonani, F.L.

XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica-SIBAE-2014

La Serena-Chile.

4.2.4 “Preparação de eletrodos sólidos de intermetálicos de $\text{Ag}_2\text{Hg}_{3,02}$: Estudo da Reprodutibilidade e Repetibilidade”

Fertonani, F. L.; Paula, C. G. de; Polini, C.; Turquetti, J. R.; Martins, L. A.

XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica-SIBAE-2014

La Serena-Chile.

4.3 Outros

C. G. de Paula; J. P. Batistuti ; I. A. Pastre , F. L. Fertoni

“Determinação Eletroanalítica do Ácido Fólico em Fármaco e Suco de Fruta”

II Simpósio de Pós-Graduação em Química e I Simpósio Integrado de Graduação e Pós-Graduação: Ética na Pesquisa e Energia Sustentável, (20 e 21 de novembro de **2012**), no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP - São José do Rio Preto-SP.

Dedico ...

*Ao nosso Senhor Jesus Cristo, pela
proteção em todos os momentos de minha vida.*

*Aos meus pais Emília e Francisco,
mesmo em outra plenitude, minha imensa
gratidão pelo amor, carinho e educação.*

*Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos,
agradeço pela compreensão, de não ter
compartilhado momentos em suas vidas.*

*Ao meu companheiro Lair, pelo amor,
companheirismo, apoio e incentivo
durante todos estes anos.*

*Ao Marcius Vinícius, meu filho, que
reflete sobre mim a felicidade,
quando seus sonhos se tornarem
realidade, agradeço pelo carinho,
compreensão e paciência.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Luis Fertonani, pela amizade, compreensão, ensinamentos, competência e sabedoria na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Paschoal Batistuti, da FCFAR-UNESP de Araraquara, pela orientação, incentivo e apoio.

A Embrapa Instrumentação Agropecuária de São Carlos, pelo apoio referente ao uso do Laboratório de Nanotecnologia para a preparação de amostras e utilização de equipamentos.

A Dra. Renata Alves de Toledo da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, pela atenção e dedicação nos ensinamentos laboratoriais relacionados com a eletroanalítica.

A Profa. Dra. Eny Maria Vieira do IQSC-USP de São Carlos, pelo apoio e imenso incentivo de seguir em frente no decorrer destes anos.

Ao Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, pela idéia e incentivo à pesquisa relacionada ao ácido fólico.

Ao Dr. Paulo Jorge Marques Cordeiro do CAQI-IQSC-USP de São Carlos, pela motivação, imensa colaboração e participação nas análises por HPLC.

Ao Dr. Márcio de Paula do IQSC-USP de São Carlos, pela colaboração em participar das análises por EDX, Imagens SEM e “Mapping”.

Ao Dr. Celso Valentim Santilli do IQAR-UNESP de Araraquara, pela colaboração e participação nas análises de XRD.

Ao técnico João Tiengo do IQSC-USP de São Carlos, pelo apoio na elaboração dos eletrodos.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo do IQSC-USP de São Carlos, pela motivação e força de continuar a caminhada para a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Iêda Pastre Fertoni, IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto, pelo apoio e compreensão.

A Dra. Luiza Nunes, IQSC-USP de São Carlos, pela amizade e incentivo durante todos estes anos.

A todos os funcionários da seção de Pós-Graduação do IQ-UNESP de Araraquara, especialmente a Célia, Wennia, Cíntia, Franklin, Weverton e Paula, pela atenção e serviços prestados.

Aos funcionários da biblioteca do IQ-UNESP, Isabel, Kátia, Valéria, Cristina e Ana Carolina, do IQ-UNESP de Araraquara, pelo apoio e atenção.

A todos os colegas do Instituto de Química de Araraquara - IQ-UNESP, do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto e da Embrapa Instrumentação de São Carlos, que compartilharam direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“ Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças
a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

Resumo

Neste trabalho desenvolveu-se um método eletroanalítico em superfície de eletrodo sólido com filme intermetálico **Ag₂Hg_{3,02} (AgSIE)**, para a determinação do ácido fólico (**FA**). O AgSIE foi utilizado em substituição ao eletrodo de Hg líquido de modo a atender ao conceito da “química verde”. Aplicou-se a técnica de Voltametria de Onda Quadrada Adsorptiva de Redissolução (**SWAdSV** - do inglês: Square Wave Adsorptive Stripping Voltammetry), considerando-se a frequência analítica, seletividade e sensibilidade do método. O **FA** apresentou um pico de redução em **-0,6 V** $v_{s. E_{sce}}$, com características de processo adsorptivo. Otimizou-se os parâmetros experimentais e as curvas analíticas ($n=5$) foram construídas por diluição da solução padrão, no intervalo de $0,2 \times 10^{-7}$ a $10,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Os limites de detecção e de quantificação obtidos para o FA foram **LD**= $6,79 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e **LQ**= 2×10^{-8} mol L⁻¹, respectivamente. O método de adição de padrão foi aplicado para a determinação do **FA** em fármacos de ácido fólico contendo 5,0 mg/tablete, resultando numa recuperação de **R%**= $98,4 \pm 2,7$ %, ($m=4,9 \pm 0,1$) mg (**FAFI**), **R%**= $99,9 \pm 2,9$ %, ($m=4,9 \pm 0,15$) mg (**FAFII**) e para o multivitamínico de 0,25 mg/tablete: **R%**= $99,4 \pm 1,54$ % ($m=0,24 \pm 0,03$) mg (**FAFIII**) e nas amostras de sucos de frutas *in natura* e industrializados, foram obtidas as concentrações de 0,3 a $84,4 \mu\text{g L}^{-1}$. A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**HPLC** - do inglês: High Performance Liquid Chromatography), foi utilizada na determinação de FA em fármacos e sucos de frutas para comparação dos resultados, assim, foi conduzida em coluna ODS-C₁₈, de 150 x 4,6 mm (5 μm), fase móvel de ACN/HAC-KOH, eluição por gradiente (10:90, v/v), **pH** 2,88, **fluxo** 0,5 mL min⁻¹ e detector **UV-vis** $\lambda_{\text{máx}}$. 280 nm. A curva analítica ($n=3$) do ácido fólico, foi construída no intervalo de $1,41 \times 10^{-6}$ a $4,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e calculou-se, **LD**= $8,38 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e **LQ**= $2,49 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A exatidão foi avaliada em fármacos (5,0 mg/tablete), para duas diluições 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo-se em **FAFI** os valores de **R%**=113,41 e 109,00 respectivamente, solução de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em **FAFII** **R%**= 89,00 e multivitamínico **FAFIII** **R%**= 84,57. As amostras de sucos de frutas *in natura* e industrializados, foram fortificadas com solução padrão de **C_{FA}**= 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e resultou-se os valores na faixa de **R%**= 91,90 -119,12. Após a caracterização da superfície do eletrodo **AgSIE** por **EDX**, “**Mapping**”, Imagem **SEM** e **XRD**, conclui-se que, é um filme sólido de intermetálico **Ag₂Hg_{3,02}**. O método analítico foi desenvolvido, validado e aplicado com sucesso em amostras de fármacos de ácido fólico e sucos de frutas *in natura* e industrializados, evidenciando a aplicação do método às análises de rotina. A comparação entre os eletrodos sólidos **AgSIE** e o amálgama dentário (**AD**), permitiu demonstrar que, com a utilização do AgSIE, há uma melhor seletividade e sensibilidade nas análises. Com a aplicação das técnicas **SWAdSV/AgSIE** e **HPLC**, a recuperação para as amostras de fármacos, mostrou uma boa exatidão (**R%**= 80-120), e em amostras de sucos de frutas, foi possível quantificar a concentração de FA **sem a fortificação** da amostra ($C=3,35 \times 10^{-4}$ a 0,08) $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**SWAdSV**), em amostras **fortificadas** ($C=9,19$ a 11,91) $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**HPLC**), não demonstrando a concentração do analito em sucos de frutas, comparado aos resultados esclarecidos em **SWAdSV/AgSIE**, sendo o método eletroquímico, mais sensível.

Palavras-chave: Ácido fólico, suco de frutas, AgSIE / SWAdSV

Abstract

In this work we developed an electroanalytical method on the surface of solid intermetallic electrode film **Ag₂Hg_{3.02} (AgSIE)** for the determination of folic acid (FA). The AgSIE was used instead of liquid Hg electrode in order to attend to the concept of "green chemistry". We applied the technique of square wave voltammetry to Adsorptive Stripping Voltammetry (**SWAdSV**), considering the analytical frequency selectivity and sensitivity of the method. The FA showed a peak reduction in -0,6 vs. E_{sce} , with characteristics of adsorptive process. Optimized the experimental parameters and the analytical curves ($n = 5$) were constructed by diluting the standard solution in the range from 0.2×10^{-7} to $10.6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The limits of detection and quantification were obtained for the **FA** $LD = 6.79 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ and $LQ = 2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. The standard addition method was used for determination of FA in folate pharmaceutical containing 5.0 mg / tablet, resulting in recovery of $R \% = 98.4 \pm 2.7\%$ (mean = 4.9 ± 0.1) mg (FAFI), $R = 99.9 \% \pm 2.9\%$ (mean = 4.9 ± 0.15) mg (FAFII) and the multivitamin 0.25 mg / tablet: $R \% = 99.4 \pm 1.54 \%$ ($m = 0.24 \pm 0.03$) mg (FAFIII) and in samples of fruit juices in natura and processed, the concentrations from 0.3 to 84.4 mg L^{-1} were obtained. The technique of High Efficiency Liquid Chromatography (**HPLC**), was utilized in the determination of FA in pharmaceutical and fruit juices for comparison, so the results was conducted in ODS - C₁₈ column, 150 x 4.6 mm (5 μm) mobile phase ACN / HAC-KOH, elution gradient (10:90, v / v), pH 2.88, flow of 0.5 mL min^{-1} and UV-vis detector λ_{max} 280 nm. The analytical curve ($n = 3$) of folic acid was built in the range from 1.41×10^{-6} to $4.53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and calculated, $LD = 8.38 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and $LQ = 2.49 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Accuracy was assessed pharmaceutical (5.0 mg / tablet) for two dilutions $5:10 \mu\text{g mL}^{-1}$, **FAFI** in obtaining the values of $R = 113.41$ and 109.00% respectively, a solution of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in **FAFII**, $R = 89.00 \%$ and multivitamin **FAFIII**, $R = 84.57 \%$. Samples of fruit juices in natura and processed were spiked with standard solution $C_{FA} = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ and resulted values were in the range of $R = 91.90$ to 119.12% . After the characterization of the electrode surface by EDX AgSIE, "Mapping", XRD and SEM image, it is concluded that it is a solid film intermetallic **Ag₂Hg_{3.02}**. The analytical method was developed, validated and successfully applied to pharmaceutical samples of folic acid and fruit juices in natura and processed, showing the application of the method to routine analysis. The comparison between the solid electrodes and the amalgam AgSIE, AD allowed to show that, with the use of AgSIE there is a better sensitivity and selectivity in the analysis. By applying the techniques SWAdSV / AgSIE and HPLC, the recovery for samples of pharmaceutical, showed good accuracy ($R = 80-120 \%$). For fruit juices, it was possible to quantify the concentration of FA without the fortification of the sample ($C = 3.35 \times 10^{-4}$ to 0.08) $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**SWAdSV**) in spiked samples ($C = 9.19$ to 11.91) $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HPLC), not showing the analyte concentration in fruit juice, compared to clarified in SWAdSV / AgSIE, being more sensitive electrochemical method results.

Keywords: Folic acid, juice fruits, AgSIE/SWAdSV

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura química do ácido fólico	28
Figura 2	Processo de redução do ácido fólico	30
Figura 3	Caminho do ácido fólico no organismo	32
Figura 4	A posição N^5 e N^{10} do tetrahidrofolato	33
Figura 5	Metabolismo e aproveitamento do ácido fólico na célula	36
Figura 6	Forma de aplicação do potencial em voltametria de onda quadrada	44
Figura 7	Voltamogramas de Onda Quadrada, sistemas reversível e irreversível	45
Figura 8	Representação da célula eletroquímica	53
Figura 9	Preparação do eletrodo de AgSIE	55
Figura 10	Procedimento de preparo de amostras de fármaco e suco de fruta para análise voltamétrica	59
Figura 11	Procedimento de preparo de amostras de fármaco e suco de fruta para análise cromatográfica	63
Figura 12	Espectro de energia dispersiva e os picos de radiação de Ag/Hg	65
Figura 13	Imagem SEM, Mapping, XRD da superfície do filme intermetálico (Ag_2Hg_3)	66
Figura 14	Voltamogramas cíclicos (CV) de um processo adsorptivo, solução de ácido fólico	68
Figura 15	Voltamogramas cíclicos (CV) de velocidade de varredura, solução de ácido fólico	70
Figura 16	Voltamogramas SWAdSV - concentração de ácido fólico em função do pH	73
Figura 17	Voltamogramas SWAdSV - Potencial de acumulação	74

Figura 18	Voltamogramas SWAdSV - Tempo de acumulação	76
Figura 19	Voltamogramas SWAdSV - Variação de frequência	78
Figura 20	Voltamogramas SWAdSV - Variação da amplitude	80
Figura 21	Voltamogramas SWAdSV - Variação do incremento	81
Figura 22	Voltamogramas SWAdSV , avaliação do processo reversível	83
Figura 23	Voltamogramas SWAdSV - curva analítica do ácido fólico	85
Figura 24	Voltamogramas SWAdSV para o fármaco FAF I	89
Figura 25	Voltamogramas SWAdSV para o fármaco FAF II	90
Figura 26	Voltamogramas SWAdSV para o fármaco multivitamínico FAF III	91
Figura 27	Voltamogramas SWAdSV do suco de pêssego industrializado	94
Figura 28	Voltamogramas SWAdSV do suco de pêssego <i>in natura</i>	94
Figura 29	Voltamogramas SWAdSV do suco de lima pérsia <i>in natura</i>	95
Figura 30	Voltamogramas SWAdSV do suco de abacaxi hawaí <i>in natura</i>	95
Figura 31	Voltamogramas SWAdSV do suco de maça <i>in natura</i>	96
Figura 32	Voltamogramas SWAdSV do suco de maracujá industrializado	96
Figura 33	Voltamogramas SWAdSV do suco de morango industrializado	97
Figura 34	Voltamogramas SWAdSV do suco de caju industrializado	97
Figura 35	Voltamogramas SWAdSV do suco de acerola <i>in natura</i>	98
Figura 36	Voltamogramas SWAdSV do suco de abacaxi pérola <i>in natura</i>	98
Figura 37	Voltamogramas SWAdSV do suco de abacaxi pérola <i>in natura</i> , sobre eletrodos de AMALGAMA DENTÁRIO e AgSIE	99
Figura 38	Espectro UV-Vis e Cromatograma do ácido fólico	104
Figura 39	Curva Analítica do ácido fólico - HPLC	105

Figura 40	Cromatograma de fármaco FAFI ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	106
Figura 41	Cromatograma de fármaco FAFI ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)	107
Figura 42	Cromatograma de fármaco FAFII ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)	108
Figura 43	Cromatograma Multivitamínico de fármaco FAF III ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$)	109
Figura 44	Cromatograma do ácido fólico em suco de pêssego industrializado	112
Figura 45	Cromatograma do ácido fólico em suco de pêssego <i>in natura</i>	113
Figura 46	Cromatograma do ácido fólico em suco de acerola <i>in natura</i>	113
Figura 47	Cromatograma do ácido fólico em suco de abacaxi hawai <i>in natura</i>	114
Figura 48	Cromatograma do ácido fólico em suco de maracujá industrializado	114

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características do Ácido Fólico	29
Tabela 2	Parâmetros de reversibilidade na voltametria cíclica	43
Tabela 3	Características nos sistemas de reversibilidade na SWV	46
Tabela 4	Parâmetros otimizados e os resultados obtidos por SWAdSV	85
Tabela 5	Comparação de métodos eletroanalíticos e eletrodos quimicamente modificados, na determinação de ácido fólico	86
Tabela 6	Resultados de recuperação do ácido fólico em fármacos, por SWAdSV	92
Tabela 7	Concentrações de ácido fólico em sucos de frutas <i>in natura</i> e industrializados, por SWAdSV	100
Tabela 8	Comparação da eficiência de eletrodos metálicos modificados ou não, na determinação de ácido fólico	102
Tabela 9	Teste de recuperação de ácido fólico em fármacos por HPLC	110
Tabela 10	Comparação de resultados de ácido fólico em fármacos por SWAdSV e HPLC	111
Tabela 11	Concentrações de ácido fólico em amostras de sucos de frutas <i>in natura</i> e Industrializadas por HPLC	115
Tabela 12	Resultados de ácido fólico em sucos de frutas, por SWAdSV e HPLC	116

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN Acetonitrila

ANVISA Agência nacional de vigilância sanitária

AICARFT 5-amino-imidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase

AICAR 5-amino-imidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo

AgSAE Eletrodo sólido de amálgama de prata

AgSIE Eletrodo sólido intermetálico de prata e mercúrio

AuNPs/CPE eletrodo de pasta de carbono modificado de nanopartículas de ouro;

BQTMCPCEPE CPE modificado de 2,2-[1,2 buthanediylbis(nitriloethylidyne)]-bis-

C_{FA} Concentração de ácido fólico

CV Voltametria cíclica

CPE eletrodo de pasta de carbono

DPV Voltametria de Pulso Diferencial

DPAdSV Voltametria de pulso diferencial adsortiva de redissolução

DPCSV Voltametria de pulso diferencial catódica de redissolução

DNA Ácido desoxirribonucléico

DHF dihidrofolato

DHFR Dihidrofolato redutase

dTMP Desoxitimidilato

dUMP Desoxiuridilato

EDX Energia dispersiva de raios X

ETFMCNTPE eletrodo de nanotubo de pasta de grafite modificado de ethynylferrocene.

E_{SCE} Eletrodo calomelano

FA Ácido fólico

FAF I Fármaco de ácido fólico I

FAF II Fármaco de ácido fólico II

FAF III Fármaco multivitamínico de ácido fólico

FDCCNTE: eletrodo de nanotubo de carbono modificado de Ferrocenedicarboxílico

GART Glicinamida ribonucleotídeo transformilase

GAR glicinamida ribonucleotídeo

HAC Ácido acético

HMDE Eletrodo de gota pendente de mercúrio

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

KOH Hidróxido de potássio

Mapping Mapeamento de elemento químico

MEV Microscopia eletrônica de varredura

MS Metionina sintetase

MT Metil transferase

MTHFR Metileno-tetrahidrofolato redutase

MIP-Carbono eletrodo compósito de carbono modificado de polímero
2,4,6-trisacrilamido-1,3,5-triazina;

m-AgSAE Eletrodo sólido de amálgama de prata com menisco de mercúrio

NADH₂ Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenado

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenado

ODS-(C₁₈) coluna cromatográfica Octadecil

PBDCNPE eletrodo de pasta de carbono modificado de 2,2'-[1,2-fenilenediyl-
bis(nitrilomethylidene)]bis(4-hydroxyphenol)

p-AgSAE Eletrodo sólido de amálgama de prata polido

r Coeficiente de correlação

R^2 Adesão do modelo aos pontos

RP Coluna fase reversa

RSD (S_{relativo}) Desvio padrão relativo

SAH S-adenosil-homocisteína

SAM S-adenosil-metionina

SEM Microscopia eletrônica de varredura

SMDE Eletrodo de gota estática de mercúrio

SWV Voltametria de onda quadrada

SWAdSV Voltametria de onda quadrada adsortiva de redissolução

THF tetrahydrofolato

TS Timidato sintetase

UV-vis Ultravioleta visível

XRD Difractometria de raios X

ZONMCPE: CPE modificado / nanopartículas de ZrO_2

Lista de Símbolos

a – amplitude

Ag – prata metálica

E – potencial

E_p – potencial de pico

E_{pa} – potencial de pico anódico

E_{pc} – potencial de pico catódico

E_{acc} – potencial de acumulação

$E_{aplicado}$ – potencial aplicado

$E_{inversão}$ – potencial de inversão

f – frequência

Hg – mercúrio metálico

I – corrente

I_1 – corrente reversa

I_2 – corrente direta

I_p – corrente de pico

K_f – constante da frequência

$kf^{1/2}$ – constante da raiz quadrada da frequência

KeV – milelétons/volts

l – comprimento

mV – milivolts

n_e – número de elétrons

n_H – número de prótons

nm – nanômetro

N⁵ – posição 5 do nitrogênio na cadeia carbônica

N¹⁰ – posição 10 do nitrogênio na cadeia carbônica

Pt – platina metálica

pKa – constante de ionização

rpm – rotação por minuto

t_{acc} – tempo de acumulação

T_R – tempo de retenção

V – volts

v – velocidade de varredura

$w_{1/2}$ – meia altura da corrente de pico

$\lambda_{m\acute{a}x.}$ – comprimento de onda máximo

λ – comprimento de onda

ΔE_i – incremento

$\Delta E_{p/2}$ – largura de pico em meia onda

ΔE_a – Variação de potencial de pico anódico

ΔI – corrente resultante

ΔE_p – variação de potencial de pico

ΔpH – variação de prótons de hidrogênio

θ – coeficiente angular do gráfico

α – coeficiente de transferência de carga

$\Theta_{interno}$ – diâmetro interno

Φ_{poro} – diâmetro do poro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 Ácido Fólico	27
1.1.1 Características do Ácido Fólico	28
1.1.2 Processo de Redução do Ácido Fólico	30
1.1.3 Interação do Ácido Fólico no Organismo	31
1.1.4 Ácido Fólico e Folato Ativo	33
1.1.5 Metabolismo do Ácido Fólico	34
1.2 Eletroanalítica	37
1.2.1 Eletrodo de Trabalho Modificado	39
1.2.2 Voltametria Cíclica	42
1.2.3 Voltametria de Onda Quadrada	43
1.3 Cromatografia	46
1.4 Química Verde	48
2 Objetivos	50
2.1 Objetivo Geral	51
2.2 Objetivo Específico	51

3 Parte Experimental	52
3.1 Aplicação Eletroanalítica	53
3.1.1 Célula Eletroquímica	53
3.1.2 Eletrólito de Suporte	54
3.1.3 Preparação do Eletrodo AgSIE	54
3.1.4 Ativação e Regeneração da Superfície do Eletrodo	55
3.1.5 Caracterização da Superfície do Eletrodo AgSIE	56
3.1.6 Instrumentação e Reagentes	56
3.1.7 Variação do pH do Ácido Fólico	57
3.1.8 Componente de Corrente do Ácido Fólico	57
3.1.9 Curva Analítica do Ácido Fólico Padrão	57
3.1.10 Curva Analítica do Ácido Fólico em Fármaco	57
3.1.11 Curva Analítica do Ácido Fólico em Suco de Fruta	58
3.1.12 Preparo de amostra para análise voltamétrica	59
3.2 Aplicação Cromatográfica	60
3.2.1 Instrumentação e Reagentes	60
3.2.2 Determinação do Ácido Fólico Padrão	60
3.2.3 Determinação do Ácido Fólico em Fármaco	61
3.2.4 Determinação do Ácido Fólico em Suco de Fruta	61
3.2.5 Preparo de amostra para análise cromatográfica	63

4 Resultados e Discussão	64
4.1 Caracterização da superfície do eletrodo por meio de técnicas de análise de superfície (EDX, Imagens SEM, Mapping e XRD)	65
4.2 Aplicação Eletroanalítica na Determinação de Ácido Fólico	67
4.2.1 Voltametria Cíclica	68
4.2.1.1 Processo de adsorção do ácido fólico	68
4.2.1.2 Variação da Velocidade de Varredura	69
4.2.2 Voltametria de Onda Quadrada	71
4.2.2.1 Otimização dos Parâmetros da SWAdSV/AgSIE	71
4.2.2.1.1 Estudo da Variação do pH do Eletrólito	71
4.2.2.1.2 Potencial de Acumulação	74
4.2.2.1.3 Tempo de Acumulação	76
4.2.2.1.4 Variação de Frequência	77
4.2.2.1.5 Variação da Amplitude	79
4.2.2.1.6 Variação do Incremento	79
4.2.2.2 Componente de Corrente do Ácido Fólico	82
4.2.2.3 Curva Analítica de Ácido Fólico em SWAdSV	83
4.2.2.4 Determinação de Ácido Fólico em Fármaco	87
4.2.2.5 Determinação de Ácido Fólico em Suco de Fruta	92
4.3 Aplicação Cromatográfica na Determinação de Ácido Fólico	103
4.3.1 Espectro de Absorbância e Cromatograma de Ácido Fólico	104
4.3.2 Curva Analítica de Ácido Fólico por HPLC	104

4.3.3	Determinação de Ácido Fólico em Fármaco	105
4.3.4	Determinação de Ácido Fólico em Suco de Fruta	112
5	Conclusão	117
	Referências	120
	Perspectivas de Trabalhos Futuros	127

1 Introdução

1.1 Ácido Fólico

O ácido fólico (FA) é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B conhecida como vitamina B9, folacina ou ácido pteroilglutâmico, e pertence ao grupo dos folatos [1]. Esta vitamina tem como fonte os alimentos como, brócolis, cenoura, levedura, espinafre, feijão, aspargos, vegetais de folhas verdes, gema de ovo, leite, tomate, frutas, cereais, fígado e carnes em geral [2-5].

A vitamina B9 auxilia na prevenção de malformações no cérebro e na medula óssea, metaboliza a homocisteína e a produção de glóbulos vermelhos, na síntese de DNA e serotonina no organismo. Para a melhoria ou prevenção de doenças congênitas, Czeizel e Dudas (1992, p.1832), conseguiram provar a eficácia do ácido fólico na prevenção de defeitos do tubo neural, sendo que, a deficiência de ácido fólico pode causar a espinha bífida (formação incompleta da coluna vertebral) causando a meningocele, os defeitos no fechamento do tubo neural (anencefalia ou comprometimento das funções neurológicas) [6], diminuição do crescimento, anemia megaloblástica, glossites, distúrbios no trato gastrointestinal, doenças cardiovasculares, infertilidade humana, Alzheimer, síndrome de Down e câncer [7-11].

A complementação da dieta diária com o ácido fólico é necessária uma vez que, o seu consumo diário deve ser da ordem de 0,2 mg, sendo 0,4 mg o recomendado para gestantes [12]. No Brasil, a obrigatoriedade do enriquecimento é aplicada a farinhas de trigo e de milho, diante da Resolução 344, ANVISA, publicada em 13 de dezembro de 2002, que regulamentou a adição de ácido fólico nestes alimentos com fortificação de 150 μg de ácido fólico para cada 100g de farinha [12].

O ácido fólico é a forma mais estável dentre os folatos, portanto, esta vitamina foi escolhida para o enriquecimento de alimentos [5,13]. A estrutura química do ácido fólico está representada na **Figura 1**, trata-se de um composto obtido a partir do ácido pteróico e ácido L-glutâmico, formando assim, o ácido pteroilglutâmico [1, 13], e nas condições ambientais, apresenta-se na forma cristalina de cor amarela, massa molar 441,4 g mol^{-1} [14]. Esta vitamina possui

cristalina de cor amarela, massa molar $441,4 \text{ g mol}^{-1}$ [14]. Esta vitamina possui solubilidade limitada em água ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$ a 25°C), porém, solúvel em soluções ácidas ou alcalinas [15, 16].

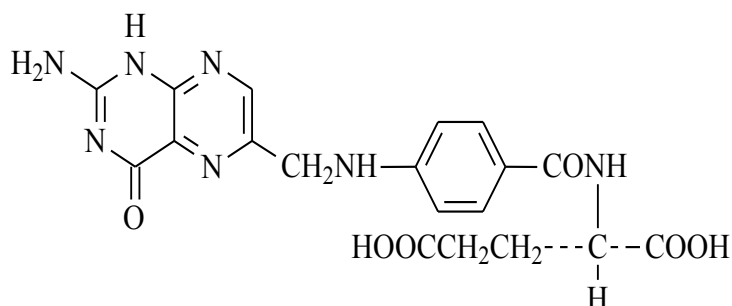


Figura 1. Estrutura química do ácido fólico [1, 14]
(ácido 2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzoil-L-glutâmico)

1.1.1 Características do Ácido Fólico

Na **Tabela 1** encontra-se as características do ácido fólico como: o aspecto, massa molar, valor de pH, toxicidade, ponto de fusão, solubilidade e pKa.

Tabela 1. Características do Ácido Fólico ($C_{19}H_{19}N_7O_6$)

Aspecto	Pó microcristalino de cor amarelo-alaranjado, quase inodoro.
Massa molar	441,40 g mol ⁻¹
Valor de pH	4,0 - 4,8 (1g / 10 mL H ₂ O, 20°C).
Toxicidade	Irritante: olhos, pele e vias respiratórias. >350 µg / dia pode prejudicar a absorção do Zn. LD-50 intravenosa, rato: 500 mg/Kg. LD-50 intravenosa, ratazana: 239 mg/Kg. LD-50 intravenosa, coelho: 4100 mg/Kg. LD-50 intravenosa, coelhinho da Índia: 120 mg/Kg.
Ponto de fusão	250 °C (decomposição).
Solubilidade em água/Outras substâncias	H₂O: 1,6 mg L⁻¹ (25 ° C). Ligeiramente solúvel em metanol; Insolúvel em acetona, clorofórmio, éter e benzeno; Solúvel em HCl diluído e quente e em H₂SO₄.
pKa	2,3 e 8,3

Fonte: Kindukern do Brasil Química (2012), <<http://Indukern.com>>. Acesso em: 20 maio 2014 [17].

1.1.2 Processo de Redução do Ácido Fólico

Van Den Berg e Le Gall (1993, p. 459), estudaram a determinação do ácido fólico e exploraram aspectos de reação de redução. A **Figura 2** mostra a redução do ácido fólico representada por várias etapas com seus respectivos produtos. Na primeira etapa mostra uma reação de redução envolvendo dois elétrons formando o ácido 5,8-dihidrofólico, na segunda etapa ocorre uma tautomerização com a formação do ácido 7,8-dihidrofólico, na terceira e quarta etapas ocorre processos de redução com a formação de 7,8-dihidro-6-metil-pterina e 5,6,7,8-tetrahidro-6-metil-pterina, respectivamente [18].

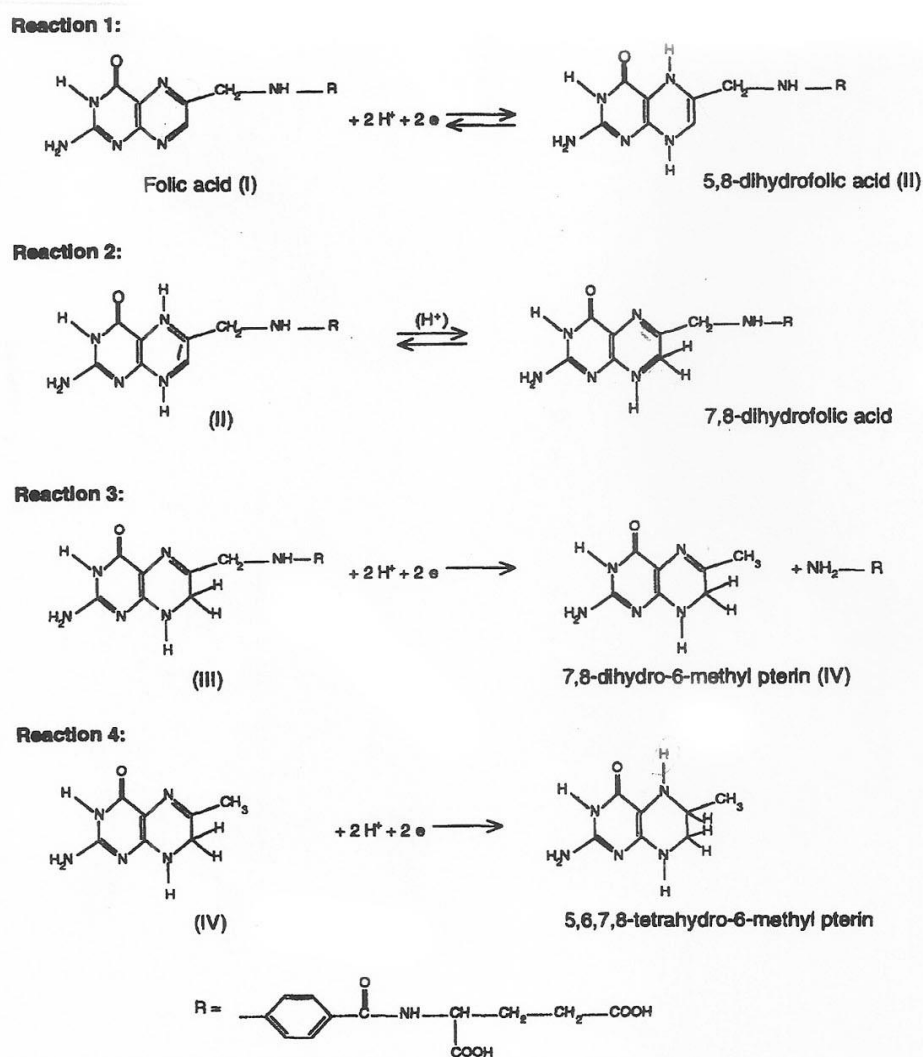


Figura 2. Processo de redução do ácido fólico. Fonte: Van Den Berg e Le Gall [18]

1.1.3 Interação do Ácido Fólico no Organismo

O ácido fólico quando ingerido apresenta-se na forma de poliglutamato, o que facilita a sua absorção pela mucosa intestinal, parte dos resíduos de glutamato é removida pela conjugase lisossomal, tornando a molécula menos hidrofílica, facilitando assim, o seu transporte pelas células epiteliais intestinal para atingir a corrente sanguínea. Após a absorção, no interior das células, principalmente no fígado, onde é armazenado, o ácido fólico é reduzido a dihidrofolato (DHF) e em tetrahydrofolato (THF) pela adição e H nas posições 7,8 (DHF) e 5,6,7,8 (THF), diante da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), uma desidrogenase que requer a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenado (NADPH) como cofator de reação enzimática. Os cofatores são imprescindíveis para que as enzimas exerçam seu papel catalítico, podendo ser íons metálicos (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Cu^+ , Ni^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Se^- , etc.) ou moléculas orgânicas não protéicas (coenzimas) [19].

O THF é transformado em outros folatos como: 5-metil-THF, 5-formimino-THF, 10-formil-THF, 5,10-metileno-THF, 5,10-metenil-THF. Nas células, os folatos monoglutamatos convertem-se em poliglutamatos pela ação da enzima pteroilpoliglutamato sintase. Os poliglutamatos são principalmente armazenados no fígado e secretados na bile, onde a circulação enterohepática reabsorverá e reutilizará esses folatos, e parte dos folatos são excretados através da bile e dos rins [19]. A **Figura 3** representa o caminho do ácido fólico no organismo.

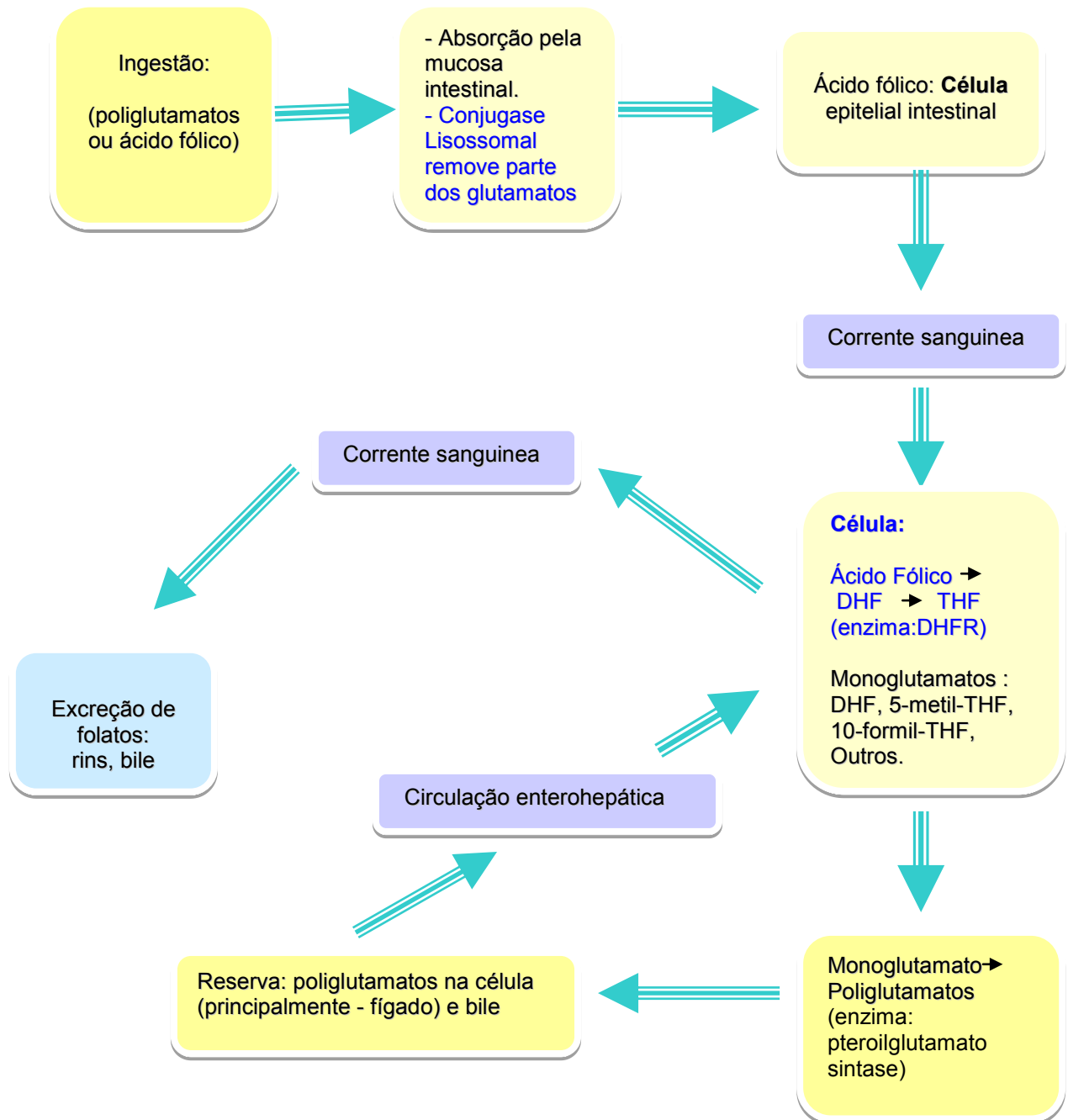


Figura 3. Caminho do ácido fólico no organismo

1.1.4 Ácido Fólico e Folato Ativo

O ácido fólico é absorvido pelo organismo, e se transforma em folato ativo tetrahydrofolato (THF) por processo de redução, o qual funciona como transportador de unidades de um carbono como: metil ($-\text{CH}_3$), metileno ($-\text{CH}_2-$), formil ($-\text{CHO}$) e formimino ($-\text{CHNH}-$), formando coenzimas em sistemas enzimáticos, que participam de reações biossintéticas necessárias ao nosso organismo. Estas reações de transferência de unidades de um carbono ocorrem na biossíntese de serina, metionina, glicina, colina, nucleotídeos purínicos e desoxitimidina monofosfato [14,19,20]. A **Figura 4** mostra os radicais químicos associados às posições N^5 e N^{10} do ácido fólico e os respectivos nomes das coenzimas produzidas.

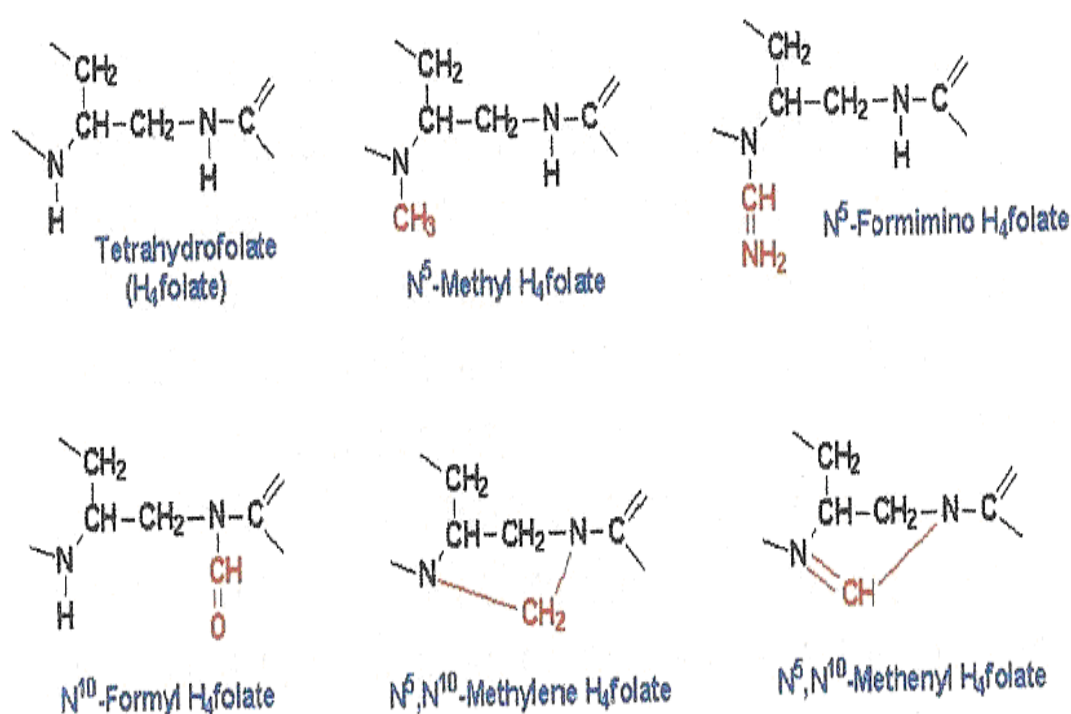


Figura 4. A posição N^5 é o sítio de ligação de grupos metil e formimino, o N^{10} para formil, e ambos N^5 e N^{10} para os grupos bivalentes metileno e metenil

Fonte: Lucock, M. D. *et al.* (1995); King, M. W. (2011), [14, 19].

1.1.5 Metabolismo do Ácido Fólico

Atualmente o metabolismo do ácido fólico tem sido alvo de várias pesquisas. A enzima 5,10-metileno-tetrahidrofolato redutase (MTHFR) é responsável pela redução da metileno-tetrahidrofolato (5,10-metileno-THF) a metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF), que apresenta importante papel na metilação da homocisteína em metionina, com a participação da vitamina B12. A homocisteína é formada pela desmetilação da metionina com S-adenosil-homocisteína, e é metabolizada por remetilação à metionina por meio do composto intermediário S-adenosil-metionina. A 5,10-metileno-THF e seus derivados, são importantes na síntese da timina e purinas para a replicação do DNA [10].

A homocisteína é um aminoácido derivado do metabolismo do aminoácido metionina constituído de enxofre, e faz parte das proteínas encontradas em carnes, produtos lácteos, ovos e peixe. A metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM), a mesma participa de inúmeras reações de metilação de um carbono, na célula, inclusive aquelas que produzem o fosfolípido essencial (fosfatidilcolina) e os neurotransmissores (serotonina, melatonina, epinefrina, dopamina). Após a doação de seu grupo metila, a SAM torna-se em S-adenosilhomocisteína, produzindo assim, a homocisteína, e quando metabolizada, forma a cisteína, taurina e glutathione, processo dependente da vitamina B6 ou da re-metilação, tornando-se novamente a metionina [21].

O processo de re-metilação é feito por meio de uma das duas reações: sintetase metionina, que facilita a doação de um grupo metila a partir de metilcobalamina (vitamina B12, e recebe o seu grupo metila a partir de 5-MTHF) ou betaína-homocisteína metil-transferase, facilitando a doação de um grupo metila de betaína (trimetilglicina) [21].

Quando ocorre a absorção intracelular do ácido fólico ingerido pela alimentação, o folato é convertido a dihidrofolato (DHF) e em seguida, a tetrahidrofolato (THF), duas etapas dependentes da enzima dihidrofolato-redutase

(DHFR). O THF pode seguir dois caminhos como: se transformar a 10-formil-tetraidrofolato, co-fator para a síntese de purinas, na presença das enzimas glicinamida ribonucleotídeo transformilase (GART) e 5-amino-imidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase (AICARFT) associada a glicinamida ribonucleotídeo (GAR) e 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR), o outro caminho na presença da vitamina B6, é a formação de 5,10-metileno-tetraidrofolato que, na presença de desoxiuridilato (dUMP), desoxitimidilato (dTMP) e da enzima timidilato sintetase (TS), pode doar o grupamento metila para uracila na formação do nucleotídeo timina, utilizado na síntese e reparo do DNA, ou participar da reação envolvendo a enzima metileno-tetraidrofolato-redutase (MTHFR), na obtenção do 5-metil-tetraidrofolato, que é predominante na circulação sanguínea e atua como doador de grupamento metila (CH_3), para a remetilação da homocisteína a metionina, com a vitamina B12 e a enzima metionina sintetase (MS) que, em reação catalisada pela enzima metionina adenosil transferase (MAT), reage com ATP para formar a S-adenosil-metionina (SAM), doador universal de grupamento metila para a maioria das reações biológicas de metilação do DNA, mas a SAM forma também o S-adenosil-homocisteína (SAH) por demetilação com a enzima metil transferase (MT), constituindo a homocisteína, reiniciando assim, o ciclo da metionina [22]. O esquema delineado na **Figura 5** demonstra o metabolismo e aproveitamento do ácido fólico na célula.

A deficiência de ácido fólico, acarreta complicações quase idênticas às observadas nas deficiências de vitamina B12. O papel da vitamina B12 e do 5-metil-THF na conversão de homocisteína para metionina, também podem ter impacto significativo na capacidade das células em regenerar o THF, necessário às demais reações biossintéticas. O efeito mais pronunciado da deficiência de folatos nos processos celulares é sobre a síntese de DNA, causado pela síntese inadequada de desoxitimidilato (dTMP), que interrompe o ciclo celular, acarretando consequências ao organismo [19].

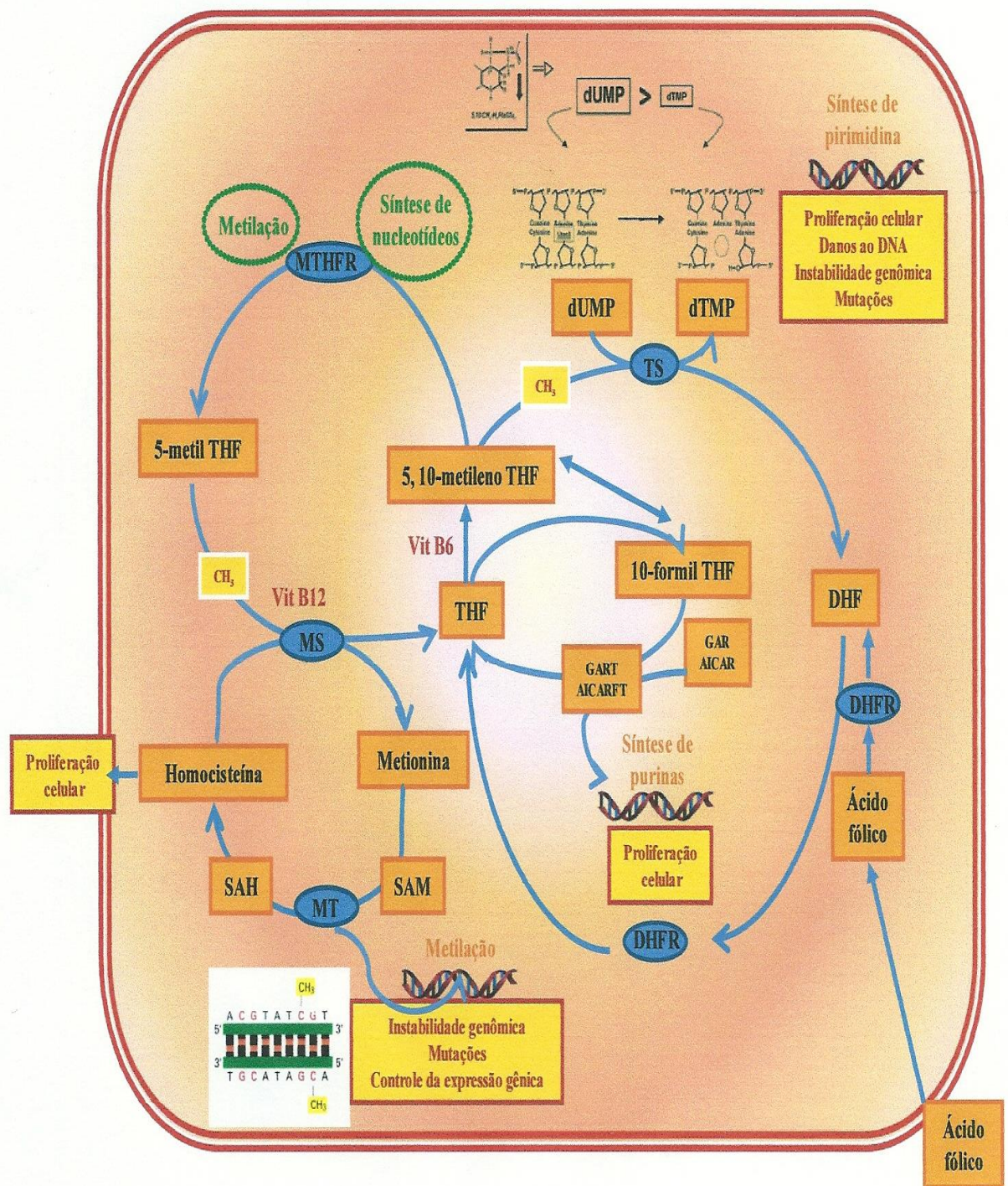


Figura 5. metabolismo e aproveitamento do ácido fólico na célula

Fonte: Ulrich, C. M. (2005), [22]

1.2 Eletroanalítica

A popularidade dos métodos eletroanalíticos vem crescendo nos últimos anos devido às várias vantagens frente a outros métodos analíticos, tais como: a rapidez, a sensibilidade, o baixo custo e a possibilidade, em muitos casos, de se analisar um determinado analito sem a necessidade de pré-tratamento da amostra.

O primeiro trabalho onde se abordou o desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a análise de ácido fólico, foi publicado por Jacobsen e Bjornsen (1978, p. 345). Os autores utilizaram a técnica de polarografia e os experimentos foram realizados em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,5). As curvas analíticas foram construídas no intervalo de $(0,02 \leq C_{\text{FA}} \leq 2,0) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e o método foi aplicado na determinação de ácido fólico em fármacos com boa exatidão e rapidez [23].

Posteriormente, Den-Bai Luo (1986, p. 277), fez um estudo a respeito da determinação de FA pela aplicação das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial adsorptiva de redissolução (DPAdSV), utilizando-se um eletrodo de gota estática de mercúrio (SMDE) em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nestas condições, o ácido fólico apresentou dois picos de redução ($-0,55 \text{ V}$ e $-0,83 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl) com características de processos irreversíveis. O limite de detecção (LD) alcançado foi de $1,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, após 5 minutos de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo. O método foi aplicado na determinação de ácido fólico em fármacos, com boa exatidão minimizando a interferência dos excipientes presentes na amostra [24].

Os pesquisadores Han, Chen e Gao (1991), desenvolveram um método de análise em fluxo para a determinação de ultra-traços de ácido fólico. Foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial adsorptiva de redissolução (DPAdSV), associada a eletrodo de gota estática de mercúrio (SMDE). As curvas analíticas foram construídas, em tampão Robinson Britton (BR) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) no intervalo de $(0,0010 \leq C_{\text{FA}} \leq 1,0) \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, com linearidade ($r = 0,998$) e $\text{LD} \leq 2,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$, após 10 min de tempo de acumulação [25].

O'Shea, Garcia e Blanco (1991), determinaram o FA empregando um microeletrodo de fibra de carbono com um considerável aumento de sensibilidade e reprodutibilidade. As curvas analíticas foram construídas no intervalo de $(0,02 \leq C_{FA} \leq 1,0) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com linearidade $r = 0,999$ e $LD = 1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ [26].

No trabalho de Villamil *et al.* (1993), aplicaram um método eletroanalítico para a determinação simultânea de riboflavina e de ácido fólico em fármacos multivitamínicos. Os experimentos foram realizados empregando-se a técnica voltamétrica de pulso diferencial adsorptiva de redissolução (DPAdSV) associada ao eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0), com precisão, $RSD = 2,1\%$ e $2,6\%$ para a riboflavina e FA, respectivamente [27].

O desenvolvimento do método para a análise quantitativa do ácido fólico em matrizes ambientais foi abordado por Van Den Berg e Le Gall (1993, p. 459). Os autores estudaram a determinação do FA em águas de estuário e exploraram aspectos mecanísticos de reação de redução. No método analítico aplicou-se a técnica de voltametria de onda quadrada adsorptiva com redissolução catódica em eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE). Os resultados apresentaram-se em torno de $(0,1 \leq C_{FA} \leq 3,2) \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ [16].

Korolczuk e Tyszczyk (2007, p. 1959) investigaram a redução do ácido fólico com a aplicação do método para a determinação do FA em amostras de fármacos. Os autores empregaram a técnica de SWAdSV com a utilização de eletrodo de carbono modificado com filme de Pb em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6, apresentando $LD = 7 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ [28].

Ojani, Raoof e Zamani (2009), desenvolveram um método para a determinação de FA em amostras de fármacos, aplicando a técnica de voltametria cíclica (CV). O processo investigado utilizando-se a CV, foi para a oxidação do FA sobre eletrodo de carbono modificado por íons de níquel (II) dispersos em poly (o-anisidina), em solução de hidróxido de sódio ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), tendo obtido um limite de detecção (LD) de $9,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ [29].

1.2.1 Eletrodo de Trabalho Modificado

Na década de 70, pesquisadores iniciaram a aplicação de eletrodo quimicamente modificado, com espécie quimicamente ativa convenientemente imobilizada na superfície desse dispositivo [30]. Atualmente, observa-se na literatura um aumento expressivo de eletrodos modificados, com o objetivo de melhorar a estabilidade, a sensibilidade e a seletividade nos estudos relacionados com a eletroanalítica.

A aplicação de eletrodo modificado de amálgama metálico em substituição ao eletrodo de Hg, é uma alternativa bastante interessante na área de eletroanalítica, uma vez que, o monitoramento de traços de íons metálicos e a eletroatividade de algumas moléculas podem ser dependentes da utilização deste tipo de eletrodo. Assim, a crescente necessidade de se substituir o eletrodo de Hg, deve-se principalmente à minimização de resíduos tóxicos de mercúrio [31]. Os eletrodos modificados de amálgama, foram utilizados com sucesso na determinação de pesticidas triazínicos [32], de íons metálicos de zinco, níquel, ferro, cádmio, chumbo [33] e cisteína [34].

Os eletrodos de trabalho modificados associados a várias técnicas voltamétricas, estão sendo utilizados com frequência em análises quantitativas para a determinação e quantificação de ácido fólico, dentre outros compostos orgânicos, principalmente, na área farmacêutica e alimentícia, com excelente seletividade e sensibilidade analítica. Com a utilização das técnicas de voltametria cíclica e pulso diferencial, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, eletrodo ZONMCPE, de pasta de carbono modificado de nanopartículas de óxido de zircônio (ZrO₂), possibilitou mostrar excelente seletividade em relação ao ácido fólico associado a outros compostos orgânicos como os fármacos norepinefrina e acetaminofen, com limite de detecção (LD) de 9,86 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ para o ácido fólico no processo de oxidação [35].

A determinação simultânea de ácido fólico, dopamina e ácido úrico foi estudada por Ardakani *et al.* (2011), utilizando-se a voltametria de pulso diferencial. A reação investigada foi a oxidação do ácido fólico sobre eletrodo, de pasta de carbono modificado com nanopartículas de 2,2-[1,2 buthanediylbis(nitriloethyldiyne)]-bis de óxido de titânio (TiO_2) (BQTMCPCEPE), em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0. O LD encontrado foi de $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, para o ácido fólico e o método analítico mostrou boa seletividade dos compostos em solução [36].

O comportamento eletroquímico de 6-tioguanina (6-TG) e ácido fólico (FA), aplicando-se as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e cronoamperometria, associadas a eletrodo quimicamente modificado de nanotubos de pasta de carbono e ácido ferrocenedicarboxílico, solução tampão universal pH 9,0 (ácidos: bórico, fosfórico, acético e adição de hidróxido de sódio, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) mostrou uma eficiência na atividade electrocatalítica de oxidação de 6-TG e FA, e o limite de detecção foi $0,0085 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), respectivamente. O método de adição de padrão foi aplicado em amostras de fármacos e urina [37].

Prasad *et al.* (2010), construíram um sensor eletroquímico de compósito de grafite modificado de polímero 2,4,6-trisacrylamido-1,3,5-triazine (MIP-carbono), respondendo ao sinal voltamétrico cíclico e pulso diferencial com corrente catódica, eletrólito de suporte tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,5, limite de detecção de $0,002 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,53 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$). O ácido fólico foi determinado em amostras de soro de sangue humano e fármacos multivitamínicos, com valores de $R\% = 98,1$ a $102,4$, e $R\% = 98,3$ a $102,1$, respectivamente. O mesmo método foi aplicado utilizando também o eletrólito tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ mas, pH 7,8 e determinou-se limite de detecção de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ ($4,53 \times 10^{-10} \text{ mL}^{-1}$). A recuperação $R\% = 99,4$ a $100,3$ para multivitamínico e $R\% = 99,4$ a $100,5$, para amostras de soro de sangue humano [38, 39].

As técnicas de voltametria cíclica para a otimização dos parâmetros e onda quadrada na aplicação quantitativa, eletrodo de pasta de carbono modificado de

nanopartículas de ouro (AuNPs/CPE), solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), apresentando corrente de pico anódica, foi investigada a determinação do ácido fólico no soro de sangue humano, por Arvand e Dehsaraei (2013, p. 3474). O limite de detecção do ácido fólico foi 2,7 x 10⁻⁸ mol L⁻¹ [40].

Kazemi e Maleh (2013, p. 933), com a utilização da voltametria de onda quadrada, mostraram a seletividade e sensibilidade do método com a aplicação de eletrodo nanotubo de pasta de carbono modificado de etinilferroceno (ETFMCPPE), em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), na determinação da cisteína na presença de ácido fólico, os limites de detecção foram: LD= 0,076 µmol L⁻¹ e LD= 0,6 µmol L⁻¹ (6 x 10⁻⁷ mol L⁻¹), respectivamente [41].

No estudo da oxidação eletrocatalítica da dopamina, na presença de ácido úrico e ácido fólico, mostrou uma excelente seletividade e sensibilidade dos analitos, com os respectivos limites de detecção: (1,0, 1,2) µmol L⁻¹ e 2,7 µmol L⁻¹ (2,7 x 10⁻⁶ mol L⁻¹), para o ácido fólico. Aplicando-se as técnicas voltamétricas cíclica, cronoamperometria e pulso diferencial com nanotubo de pasta de carbono quimicamente modificado de 2,2'-[1,2-fenilenodiyl-bis(nitrilometilideno)]bis(4-hidroxifenol) (PBDCNPE), solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) [42].

Bandzuchová *et al.* (2011), estudaram o comportamento eletroquímico do FA utilizando-se as técnicas de Polarografia e voltametria de pulso diferencial adsortiva com eletrodos de gota pendente de mercúrio (**HMDE**) e sólidos de amálgama de prata, com menisco de mercúrio (**m**), e sem menisco (**p**) (**m-AgSAE** e **p-AgSAE**), respectivamente. O método desenvolvido foi aplicado na determinação do FA em três diferentes tipos de fármacos (suplementos nutricionais) e em dois tipos de sucos industrializados, sobre eletrodo **m-AgSAE** em eletrólito de suporte tampão acetato 0,05 mol L⁻¹/metanol (9:1), pH 5,0, obtendo um valor para **LD**= 0,5 x 10⁻⁹ mol L⁻¹ [43] e o eletrodo **p-AgSAE** em eletrólito de suporte tampão acetato 0,05 mol L⁻¹; pH 5,0; com **LD**= 5,88 x 10⁻¹⁰ mol L⁻¹ [44].

1.2.2 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV-do inglês: Cyclic Voltammetry) é a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta da característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos [45]

Os potenciais e as correntes de pico catódico e anódico, são parâmetros eletroquímicos importantes para a caracterização de um sistema quanto à reversibilidade e a análise da ocorrência de reações homogêneas acopladas ao processo de eletrodo. Deve-se enfatizar que, a técnica CV gera em muitas situações, somente resultados qualitativos de diagnósticos das reações eletroquímicas. Medidas quantitativas mais precisas são comumente obtidas com o emprego de técnicas de pulso [46].

Os voltamogramas cíclicos são caracterizados por apresentarem picos na varredura direta e reversa de potencial, no sistema reversível, pois, as espécies oxidadas e reduzidas são estáveis e a cinética do processo de transferência de elétrons é rápida. Os parâmetros para diagnosticar a reversibilidade eletroquímica na voltametria cíclica, estão descritos na **Tabela 2** [45, 47, 48].

Tabela 2. Parâmetros de Reversibilidade na Voltametria Cíclica

Sistema Reversível	Sistema quasi-reversível	Sistema irreversível
E_{pa} e E_{pc} independem da v	ΔE aumenta com o aumento da velocidade de varredura	pico ausente na varredura reversa de potencial
$E^0 = (E_{pa} + E_{pc})/2$	$\Delta E_p > E_{pa} - E_{pc} > 0,059/n$	I_p é proporcional a raiz quadrada da velocidade de varredura
$E_{1/2} = (E_{pc} + E_{pa})/2$		E_p desloca-se $30/n\alpha$ (mV) para cada 10 x aumento na v
$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0,059/n$ V		$E_p - E_{p/2} = 48/n\alpha$ mV.
I_p é proporcional a $v^{1/2}$		ΔE valor elevado (constante de transferência eletrônica padrão = ou $< 2 \times 10^{-5} v^{1/2}$).
$I_{pc} = I_{pa}$		

n = número de elétrons envolvidos na semi-reação; v = velocidade de varredura, V= volts;

E^0 = potencial padrão da semi-reação; α = coeficiente de transferência de carga

Fonte: Wang (2006); Brett (1993) e Monk (2001), [45, 47, 48]

1.2.3 Voltametria de Onda Quadrada

A técnica voltamétrica de onda quadrada foi desenvolvida em 1952 por Baker, e no decorrer dos anos apresentou modificações instrumentais aliadas ao desenvolvimento de novas teorias que, foram responsáveis pelo estabelecimento da técnica para a análise de traços e na obtenção de dados relacionados à cinética e mecanismos de reações químicas sob as mais variadas condições [49]. Dentre suas vantagens, pode-se citar a rapidez de aplicação frente a outras técnicas de pulso

como a voltametria de pulso diferencial, excelente sensibilidade, diminuição da corrente capacitiva, menor consumo da espécie eletroativa e diminuição dos problemas associados ao bloqueio da superfície do eletrodo por produtos de reações [50].

A forma de aplicação do potencial de altura a (amplitude), como mostra a **Figura 6**, varia de acordo com uma escada de potencial com largura ΔE_1 (incremento de varredura) e duração $2t$. As correntes são medidas no final dos pulsos diretos **(a)** e reversos **(b)** e a diferença entre elas, resulta-se na corrente resultante (ΔI) [50]. A **Figura 7**, representa os voltamogramas de onda quadrada típicos de sistemas reversíveis e irreversíveis com as correntes direta, reversa e resultante. A separação das correntes é uma ferramenta muito utilizada para diagnosticar o grau de reversibilidade de um sistema eletroquímico [50]. Para sistemas reversíveis (**Figura 7-a**), quanto maior for a contribuição da corrente reversa, maior será a corrente resultante, pois, ela é a diferença entre as correntes direta e reversa. Já nos sistemas irreversíveis (**Figura 7-b**), a corrente reversa é mínima e, conseqüentemente, é desprezível a sua contribuição para a intensidade da corrente resultante.

Programação – aplicação do potencial

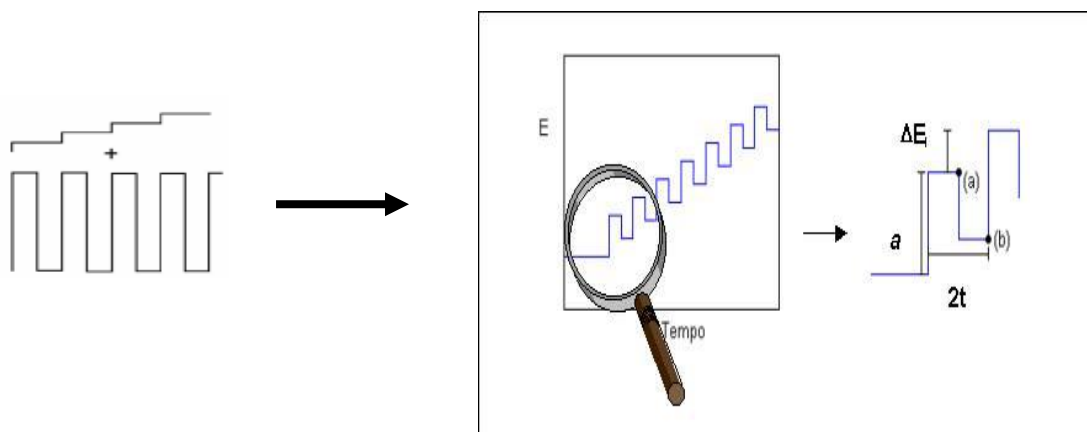


Figura 6. Forma de aplicação do potencial em voltametria de onda quadrada

Fonte: Ramaley, L.; Krause, M.S. (1969), [50].

Resposta obtida- corrente x potencial

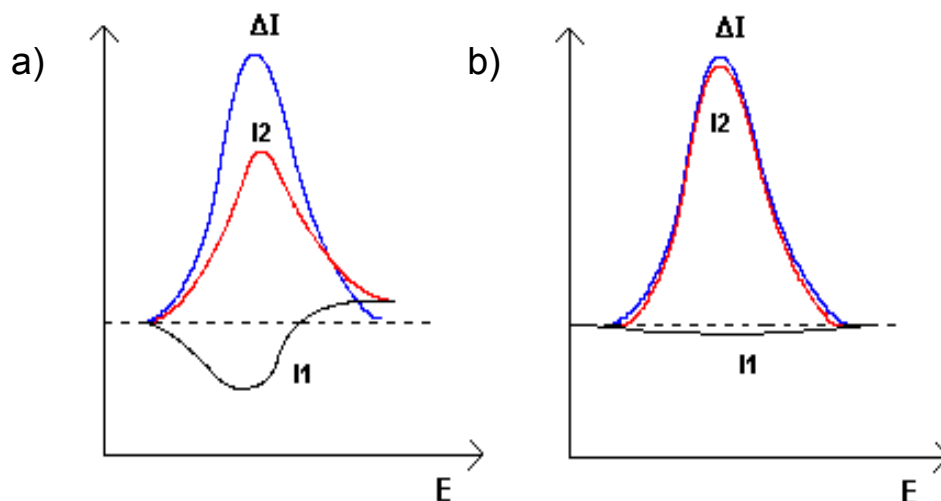


Figura 7. Voltamogramas de Onda Quadrada: **(a)** Sistema Reversível; **(b)** Sistema Irreversível; **I_1** (corrente reversa); **I_2** (corrente direta); **ΔI** (corrente resultante)

Obs.: $\Delta I = I_2 - I_1$

Fonte: Ramaley, L.; Krause, M.S. (1969), [50].

Os parâmetros eletroquímicos, corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p), fornecem informações importantes quando relacionados com a frequência de aplicação de pulsos de potencial [51]. Para sistemas reversíveis, I_p varia linearmente com a raiz quadrada da frequência, por outro lado, varia linearmente com a frequência para sistemas irreversíveis. Para sistemas quase-reversíveis, a relação entre I_p e a frequência não é linear. O coeficiente angular (θ) dos gráficos de E_p vs. o logaritmo da frequência, para sistemas reversíveis sem adsorção do produto, tem um valor de $-29/n \text{ mV}$ e com adsorção do produto e do reagente não há relação linear. Para sistemas irreversíveis, o coeficiente angular tem o valor de $-59/n\alpha \text{ mV}$ [43]. As principais características dos sistemas eletroquímicos quanto ao grau de reversibilidade ao se relacionar I_p e E_p com a frequência de aplicação de pulsos, estão representadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Características dos sistemas eletroquímicos, para a técnica de voltametria de onda quadrada, relação de reversibilidade entre I_p e E_p com a frequência de pulsos

Sistema	Relação de f e I_p	Relação de $\log f$ vs. E_p
Irreversível	$I_p = kf$	$\theta = -59/n\alpha \text{ mV}$
Reversível	$I_p = kf^{1/2}$	Sem adsorção do produto: $\theta = -29/n \text{ mV}$
Quasi-reversível	Não linear	Com adsorção do produto e do reagente: relação não linear

Fonte: Lovric, M. (1988), [51].

Outro parâmetro utilizado para avaliar o grau de reversibilidade de um sistema eletroquímico é a largura de meia onda ($\Delta E_{p/2}$). Para os sistemas irreversíveis com adsorção do produto, $\Delta E_{p/2}$ é independente da amplitude dos pulsos, se a variação de potencial anódico (ΔE_a) for maior que 20 mV. Para sistemas irreversíveis com adsorção do produto e do reagente, a independência da largura de meia-onda com a amplitude dos pulsos ocorre se ΔE_a for maior que 40 mV, assim, considera-se a largura de meia-onda como sendo igual a $(63,5 \pm 0,5)/n\alpha$, podendo-se consequentemente avaliar o valor de $n\alpha$ [51].

1.3 Cromatografia

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**HPLC**), dentre várias técnicas, é uma das mais populares para análise de inúmeros compostos como: fármacos, alimentos, pesticidas, principalmente devido à sua versatilidade e sensibilidade. Esta técnica permite desenvolver separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos em minutos, com alta eficiência; não considerando a etapa de preparação das amostras e a geração de grandes quantidades de resíduos

químicos tóxicos, necessitando assim, de tratamento dos solventes utilizados nas análises.

Catharino, Visentainer e Godoy (2003), investigaram as condições experimentais na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos aplicando a técnica **HPLC**, coluna fase reversa (**C₁₈**). As melhores condições de análise foram com eluição por gradiente e vazão de 0,5 mL min⁻¹, 10% de acetonitrila e 90% de fase aquosa tamponada (ácido acético 0,166 mol L⁻¹; hidróxido de potássio 0,01 mol L⁻¹; pH 2,8). Os pesquisadores encontraram para o ácido fólico, LD de 1,3 x 10⁻⁴ µg mL⁻¹ (1,3 x 10⁻⁷ mol L⁻¹) [52].

Os autores Catharino, Godoy e Lima-Pallone (2006), propuseram um método para a determinação de FA utilizando a técnica de **HPLC**. Neste trabalho, empregaram diferentes materiais de referência (fígado de porco, leite em pó e misturas de vegetais). A separação dos folatos foi conduzida por um sistema de eluição por gradiente, com vazão de 0,5 mL min⁻¹, 100% de solução acidificada, pH 2,8 e o valor do LD obtido para as matrizes biológicas, animais e vegetais, foi de 5 ng mL⁻¹ (1,13 x 10⁻⁸ mol L⁻¹) e a recuperação do FA ficou no intervalo 97 ≤ R% ≤ 102 [53].

Lima, Catharino e Godoy (2004, 2006), aplicaram a técnica **HPLC** para a separação e quantificação do ácido fólico empregando o sistema de eluição por gradiente, em coluna C₁₈, eluente composto de 90% de solução tamponada de acetato, pH 2,8 e 10% de acetonitrila, com vazão de 0,5 mL min⁻¹, a detecção UV foi realizada por detector de arranjo de diodos (290 nm). Os autores avaliaram a estabilidade do ácido fólico no processamento industrial e em matrizes disponibilizadas em prateleiras. As amostras avaliadas foram: leite em pó, leite esterilizado e bebida láctea achocolatada [54, 55].

O desenvolvimento e validação do método, na determinação de fármacos com nanopartículas de polímero em ácido salicílico e ácido fólico, com a utilização da técnica RP-HPLC, coluna C₁₈, detector UV fotodiodo a 233 nm (ácido salicílico), 277 nm (ácido fólico), foram feitas por eluição de gradiente programada por

30 minutos em fase móvel de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoroacético e fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O método demonstrou valores de detecção e linearidade de 0,03 µmol mL⁻¹ e ($R^2 = 0,9996$); 0,01 µmol mL⁻¹ ($2,26 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e ($R^2 = 0,9998$) e valores de recuperação de $R\% = 99,67 \pm 3,47$ e $R\% = 100,9 \pm 2,4$, para o ácido salicílico e ácido fólico, respectivamente [56].

A determinação de ácido fólico em vegetal hortelã foi desenvolvida por Rahimi e Goodarzi (2011, p. 31), a vitamina foi extraída com 50 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e 0,1 % (v/v) de 2-mercaptoetanol empregando o método de extração em fase sólida (SPE). A concentração de ácido fólico encontrada no hortelã foi $2,31 \pm 0,08$ mg L⁻¹. As amostras foram analisadas por HPLC, detector UV diodo a 282 nm. coluna C₁₈ (150 x 4,6) mm, fase móvel: 0,1 mol L⁻¹ KH₂PO₄ (pH 7,0), metanol, 90:10 (v/v) e fluxo de 0,7 mL min⁻¹, apresentando limite de detecção 0,015 mg L⁻¹ ($3,39 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e linearidade 0,9996 [57].

De acordo com a literatura verificou-se que, no preparo da amostra, o ácido fólico deve ser extraído com solução aquosa básica e posterior clarificação do extrato, com a adição do ácido tricloroacético concentrado, seguido de filtração. Para a etapa de determinação do ácido fólico por **HPLC**, empregou-se coluna fase reversa (**C₁₈**), sistema de eluição por gradiente em fase móvel: solução de acetato/acetonitrila, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e detecção na região do ultravioleta, intervalo de ($280 \leq \lambda \leq 290$) nm, e a quantificação foi determinada por padronização externa.

1.4 Química Verde

Tecnologia limpa, prevenção primária, redução na fonte, química ambientalmente benigna, ou ainda, “green chemistry”, são termos que surgiram para definir a idéia ética representando a suposição de que processos químicos que geram problemas ambientais, possam ser substituídos por alternativas menos poluentes ou não-poluentes. O termo mais utilizado atualmente “green chemistry”, foi

adotado pela IUPAC, talvez por ser o mais forte entre os demais, pois, associa ao desenvolvimento na química, com o objetivo centrado ao homem moderno: o desenvolvimento auto-sustentável [58].

Algumas instituições de ensino e pesquisa, têm programas bem estruturados para o gerenciamento de seus resíduos químicos, provenientes da pesquisa. No presente trabalho, a determinação voltamétrica do ácido fólico está associada à aplicação do método eletroanalítico (**AgSIE/SWAdSV**), seguro e econômico, aliado à “**química verde**”, onde, utilizou-se um consumo mínimo de solvente (eletrólito: $v = 10$ mL por análise de solução tamponante de fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6). O eletrodo de trabalho sólido de Ag e Hg (**AgSIE**), é um **intermetálico**, material de estabilidade química, o qual foi utilizado em substituição ao eletrodo de mercúrio, não gerando resíduos, estando assim, atendendo ao conceito “química verde”, enquanto que, o eletrodo de Hg, pode levar a formação de organometálicos, causando impacto ambiental.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver o eletrodo sólido de filme intermetálico **Ag₂Hg_{3.02} (AgSIE)** e sua aplicação na determinação direta do ácido fólico, em nível de traços, em fármacos e matrizes de sucos de frutas *in natura* e industrializados.

2.2 Objetivo Específico

- Desenvolver método analítico para a determinação do ácido fólico, sobre eletrodo de trabalho constituído de filme intermetálico de prata e mercúrio Ag/Hg (**AgSIE**) em substituição ao eletrodo de mercúrio líquido, de modo a atender o conceito da “química analítica verde”, evitando sua inserção no ambiente gerando substâncias organometálicas de alta toxicidade.
- Caracterizar a superfície do eletrodo para elucidar a sua efetiva composição: amálgama de prata ou intermetálico.
- Aplicar a técnica de **SWAdSV**, em associação com o eletrodo **AgSIE**, de modo a utilizar suas características e da técnica (custo instrumental menor frente a outras técnicas; minimização das etapas de preparação e o uso de pequenos volumes das amostras; velocidade analítica; sensibilidade e seletividade) para o desenvolvimento do método analítico de nível comparável à literatura.
- Avaliar a potencialidade do método validado, frente à aplicação direta em amostras de fármacos e de sucos de frutas *in natura* e industrializados, visando a aplicação em análises de rotina.
- Comparar resultados entre o método de análise proposto, com os obtidos utilizando-se a técnica **HPLC**.

3 Parte Experimental

3.1 Aplicação Eletroanalítica

A técnica de Voltametria de Onda Quadrada Adsorviva de Redissolução (**SWAdSV**), associada ao eletrodo de trabalho **AgSIE** (eletrodo sólido intermetálico de prata e mercúrio), foi empregada para a determinação e quantificação do ácido fólico. Após a otimização dos parâmetros experimentais: eletrólito de suporte, pH, frequência, amplitude, incremento, tempo de acumulação e potencial de acumulação, o método analítico desenvolvido foi aplicado em fármacos e sucos de frutas industrializados e *in natura*. Paralelamente, foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**HPLC**), como técnica comparativa, aplicando as mesmas matrizes.

3.1.1 Célula Eletroquímica

Os experimentos voltamétricos foram conduzidos em uma célula convencional de vidro Pirex[®], com capacidade para 10 mL, equipada com uma tampa em Teflon[®], contendo orifícios para o posicionamento dos eletrodos de referência, auxiliar e de trabalho. A **Figura 8** representa a célula eletroquímica.

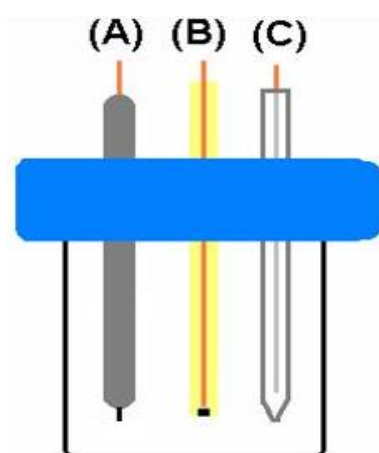


Figura 8. Representação da célula eletroquímica:

(A) Eletrodo auxiliar, (B) Eletrodo de trabalho e (C) Eletrodo de referência

Os tipos de eletrodos utilizados neste trabalho são:

- (A) auxiliar (fio de Pt de 1 cm² de área).
- (B) trabalho (Intermetálico de Ag/Hg - **AgSIE**),
- (C) referência (calomelano – **Hg/Hg₂Cl₂/KCl** 3 mol L⁻¹).

3.1.2 Eletrólito de Suporte

Os ensaios analíticos foram realizados com a utilização de diferentes eletrólitos de suporte que seguem:

- Tampão acetato 0,1 mol L⁻¹;
- Ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹;
- Tampão Britton Robinson 0,1 mol L⁻¹;
- Solução tamponante de fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹;

Os **eletrólitos** foram avaliados na **faixa de $1,3 \leq \text{pH} \leq 8,5$** , e o eletrólito solução tamponante de **fosfato de sódio** 0,1 mol L⁻¹, apresentou o melhor perfil voltamétrico e maior sensibilidade analítica em **pH 5,6**.

3.1.3 Preparação do Eletrodo AgSIE

Os eletrodos sólidos intermetálicos de prata-mercúrio (**AgSIE**), foram confeccionados a partir de reagentes de pureza analítica (Sigma) [31]. O AgSIE foi preparado pela inserção de prata em pó, sob pressão, em capilar de vidro de diâmetro interno, $\Theta_{\text{interno}} = 3$ mm, e comprimento $l = 10$ mm, e o contato elétrico foi feito pela inserção de um fio de cobre no pó de prata. A formação do filme intermetálico foi obtido durante 20 dias, pelo contato físico da prata com o mercúrio metálico. A **Figura 9** mostra o eletrodo com prata inserido no líquido de mercúrio durante a sua preparação.

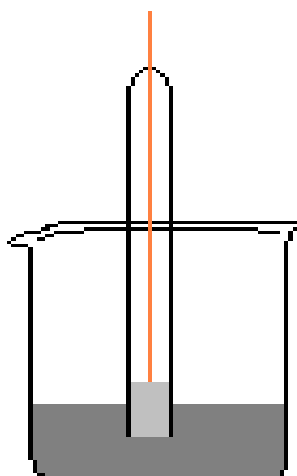


Figura 9. Preparação do eletrodo de AgSIE

O eletrodo **AgSIE** possui vantagens como: facilidade de construir; alta estabilidade; longa durabilidade; baixo custo; sensibilidade; reprodutibilidade e minimização de resíduos tóxicos de Hg.

3.1.4 Ativação e Regeneração da Superfície do Eletrodo

A ativação e regeneração da superfície do eletrodo intermetálico de **AgSIE**, foi feita anteriormente a cada ensaio, o eletrodo foi submetido a um processo eletroquímico para a ativação da superfície do eletrodo: a) $E_{\text{aplicado}} = -1,9 \text{ V}$ por 60 segundos, contra o eletrodo de referência de calomelano saturado; b) voltametria cíclica: $E_{\text{inicia I}} = E_{\text{final}} = -0,1 \text{ V}$ e $E_{\text{inversão}} = -1,5 \text{ V}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $n = 50$ ciclos em solução de cloreto de potássio ($\text{KCl } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$), com o objetivo de obter maior sensibilidade e repetibilidade das medidas eletroquímicas e reprodutibilidade no preparo da superfície dos eletrodos. A ativação e regeneração da superfície do eletrodo é necessária, porque forma óxidos metálicos na superfície do mesmo. A aplicação do potencial $-1,9 \text{ V}$ por 60 segundos, gera a formação de hidrogênio (H_2) e este gás, agita o sistema provocando a limpeza eletroquímica.

3.1.5 Caracterização da Superfície do Eletrodo AgSIE

As superfícies dos eletrodos **AgSIE** foram caracterizadas empregando-se as técnicas para análise de superfícies: espectroscopia de energia dispersiva de raio X (**EDX**) (avalia as proporções atômicas), imagens microscopia eletrônica de varredura (**SEM**) (avalia a superfície do substrato), "**Mapping**" (apresenta a distribuição dos átomos alvo sobre o substrato) e difratometria de raios X (**XRD**) (determina as fases), com o objetivo de avaliar a formação de composto intermetálico e, ou mistura destes, de modo a garantir a reprodutibilidade da superfície para cada eletrodo preparado.

3.1.6 Instrumentação e Reagentes

O equipamento potenciostato/galvanostato da AUTOLAB PGSTAT 30[®], foi utilizado para realizar as análises voltamétricas. As imagens **SEM**, o **Mapping** e o **EDX** foram obtidos em um equipamento marca EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detector de SiLi Pentafet, acoplado ao Microscópio Eletrônico. Para a obtenção dos **XRD** foi utilizado um equipamento D-5000 SIEMENS (X-ray diffractometer (Siemens D5000, Karlsruhe, Germany)).

O ácido fólico padrão com 99,47% de pureza, foi cedido pela empresa M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda., Santo Amaro, SP, Brasil. Os demais reagentes utilizados: fosfato ácido de sódio (Na_2HPO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4), hidróxido de potássio (KOH), todos de qualidade analítica (Merck). As soluções e as amostras foram preparadas com água deionizada (Millipore[®]).

O ensaio de precisão do método foi calculado do desvio padrão relativo (RSD) de repetibilidade ($n = 10$) e precisão intermediária ($n = 10$). A exatidão do método foi calculada por meio de recuperação do FA em fármaco comercial.

A determinação quantitativa do ácido fólico em termos de exatidão para a determinação do cálculo do erro relativo nos experimentos de recuperação do ácido fólico em fármaco comercial, utilizou-se a seguinte equação: $R\% = \frac{V_{lab} - V_v}{V_v} \times 100\%$,

onde, $R\%$ = recuperação em porcentagem, V_{lab} = valor encontrado nos experimentos em laboratório e V_v = valor da amostra real.

3.1.7 Variação do pH do Ácido Fólico

Os eletrólitos de suporte para o FA foram preparados na $C_{FA} = 1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tamponada fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) nos valores de $1,3 \leq \text{pH} \leq 8,5$, para se definir o pH a partir da avaliação do perfil voltamétrico.

3.1.8 Componente de Corrente do Ácido Fólico

Para a determinação da reversibilidade do FA, utilizou-se uma solução de ácido fólico na concentração de $C_{FA} = 1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tamponante de fosfato de sódio, $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6.

3.1.9 Curva Analítica do Ácido Fólico Padrão

A curva analítica foi construída em triplicata, com a diluição da solução padrão nas concentrações de $(0,2 \leq C_{AF} \leq 10,6) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, e para avaliar a sensibilidade da metodologia analítica, foram estabelecidos o limite de detecção ($LD = 3 \times S/\theta$) e o limite de quantificação ($LQ = 10 \times S/\theta$); sendo S o desvio padrão da média dos brancos e θ , o coeficiente angular da curva analítica.

O eletrólito de suporte utilizado nos experimentos foi a solução tamponante fosfato de sódio (Na_2HPO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / H_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 5,6.

3.1.10 Curva Analítica do Ácido Fólico em Fármaco

O produto comercial fármaco contendo o ácido fólico (FAF) obtido no comércio local, de conteúdo nominal de 5,0 mg de FA/tablete, foi homogeneizado em 50,00 mL de água deionizada, após filtrado em papel de filtro quantitativo ($\Phi_{\text{poro}} =$

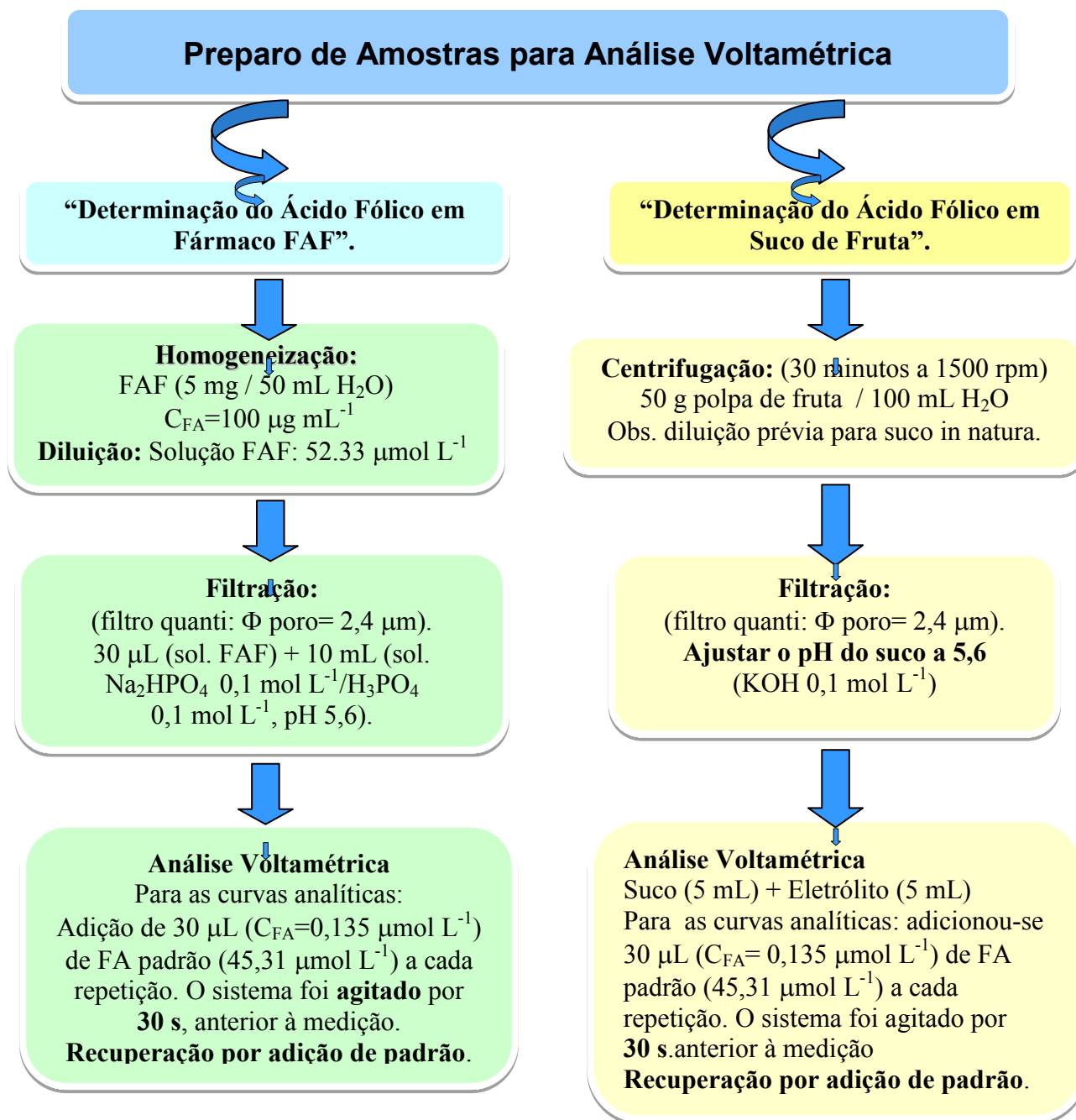
2,4 μm). Para o ensaio de recuperação por adição de padrão a amostra de fármaco, a solução de FA foi diluída a $C_{\text{FAF}} = 52,33 \mu\text{mol L}^{-1}$; 30 μL desta solução foi utilizada na obtenção do voltamograma SWAdSV para volume final da célula eletroquímica de 10,00 mL, contendo solução tamponante de fosfato de sódio 0,10 mol L^{-1} , pH 5,6. Os demais voltamogramas foram obtidos por adições sucessivas de alíquotas de 30 μL ($0,135 \mu\text{mol L}^{-1}$) de solução padrão de FA ($45,31 \mu\text{mol L}^{-1}$). O sistema foi agitado durante 30 segundos e para a recuperação do analito em estudo, foi desenvolvido o método de adição de padrão. Para a determinação quantitativa do ácido fólico utilizou-se a equação da reta ($Y = A + BX$), sendo que, os valores de A e B foram determinados a partir da regressão linear dos pontos da curva analítica, Y é o valor da média da corrente de pico (I_p) do FA, e o valor de X, a concentração do analito determinada para cada amostra analisada.

3.1.11 Curva Analítica de Ácido Fólico em Suco de Fruta

As amostras de sucos de frutas *in natura* (50,00 g de polpa /100,00 mL de água), foram centrifugadas por 40 min a 1500 rpm, filtradas por papel de filtro quantitativo ($\Phi_{\text{poro}} = 2,4 \mu\text{m}$), e seu pH ajustado a 5,6 (adição de KOH 0,1 mol L^{-1}). As amostras de sucos de frutas industrializadas (embalagem *tetra-pac*) foram centrifugadas sem prévia diluição.

Para a obtenção dos voltamogramas **SWAdSV**, os filtrados das frutas (5,00 mL) foram diluídos a 1:1 (v/v) pela adição à célula contendo 5,00 mL de eletrólito de suporte, pH 5,6. Para o ensaio de recuperação por adição de padrão foram, sistematicamente, adicionados volumes de 30 μL ($0,135 \mu\text{mol L}^{-1}$) de solução de ácido fólico padrão ($45,31 \mu\text{mol L}^{-1}$). A amostra foi agitada durante 30 segundos e a recuperação foi calculada por adição de padrão, utilizou-se a equação da reta ($Y = A + BX$) para se determinar a concentração do analito (X), observando-se que o valor de Y é a média da I_p , como descrito anteriormente em fármacos. O diagrama a seguir (**Figura 10**) representa o procedimento de preparo de amostras de fármaco e suco de fruta para análise voltamétrica.

3.1.12

**Tempo de preparo:**

Fármaco de ácido fólico (25 min);

Fármaco de ácido fólico multivitamínico (35 min);

Suco de fruta (50 min).

Figura 10. Procedimento de preparo de amostras de fármaco e suco de fruta para análise voltamétrica

3.2 Aplicação Cromatográfica

3.2.1 Instrumentação e Reagentes

As análises por **HPLC** foram feitas em um cromatógrafo modular Shimadzu, bomba modelo LC 10ADvp, injetor manual com “loop” de 20 μL e detector Diode-Array modelo SPD-MAvp, UV-Vis e λ 280 nm, coluna cromatográfica RP-18 (fase reversa: ODS- C_{18}), de 150 mm de comprimento e diâmetro interno 4,6 mm, com fase Zorbax de 5 micra, modelo Agilent. Para o processamento de dados foi utilizado um software LC Solution / Shimadzu que, além de monitorizar todos os componentes, permitiu o melhor tratamento para os dados.

O padrão de ácido fólico (Merck), e os reagentes utilizados como: fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4), fosfato monoácido de sódio Na_2HPO_4 , ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido tricloroacético ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) e o hidróxido de potássio (KOH), ácido acético (H_3CCOOH) e acetonitrila (ACN), são de qualidade analítica (Merck). As soluções e as amostras foram preparadas com água deionizada (Millipore®). Para o processo de filtração, utilizou-se papel de filtro quantitativo ($\Phi_{\text{poro}} = 2,4 \mu\text{m}$) e filtros Millipore ($\Phi_{\text{poro}} = 0,45 \mu\text{m}$).

3.2.2 Determinação do Ácido Fólico Padrão

O método aplicado na determinação de ácido fólico, foi comparado aos trabalhos de GODOY *et al* [52-55], desenvolvidos para análise de leites e bebidas lácteas enriquecidos com ácido fólico, onde, foi utilizado um sistema de eluição por gradiente, com velocidade de fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume injetado 20 μL , detecção UV-Vis e λ 280 nm, temperatura de 25°C . No início da eluição, a fase móvel foi composta por 10% de acetonitrila e 90% de solução acidificada (v/v), contendo ácido acético: $0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOOH} / 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$ (pH 2,88), após 15 min de corrida, 24% de acetonitrila (ACN), e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais.

A identificação do pico foi feita por comparação dos tempos de retenção do FA, obtidos para o padrão, amostras de fármaco e sucos de frutas, nas mesmas condições estabelecidas para o método utilizando a técnica HPLC, e pela comparação dos espectros de absorção para o padrão e das amostras. Para a determinação do pico de ácido fólico utilizou-se o software LC Solution/Shimadzu e a quantificação foi feita por padronização externa. A curva analítica foi construída com seis níveis de $C_{FA} = 1,41 \times 10^{-6}$, $2,83 \times 10^{-6}$, $5,66 \times 10^{-6}$, $1,13 \times 10^{-5}$, $2,26 \times 10^{-5}$, $4,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (0,625; 1,25; 2,50; 5,00; 10,0 e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$); e cada ponto para $n = 3$. A sensibilidade do método foi determinada pelo limite de detecção ($LD = 3 \times S/\theta$) e o limite de quantificação ($LQ = 10 \times S/\theta$); sendo S, o desvio padrão e θ , o coeficiente angular da curva analítica.

3.2.3 Determinação do Ácido Fólico em Fármaco

O fármaco de ácido fólico 5,0 mg de FA/tablete foi dissolvido em 50,00 mL em água deionizada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), após a homogeneização, o comprimido dissolvido foi filtrado em papel de filtro quantitativo ($\Phi_{\text{poro}} = 2,4 \mu\text{m}$). Para a diluição da amostra de fármaco, alíquota de $1000 \mu\text{L}$ foi adicionada em balão, o volume de 10,00 mL foi completado com solução tamponante de fosfato ($0,25 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 / 0,37 \text{ mol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$), constituindo uma solução de FA de concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, o pH foi ajustado a 6,5, utilizando-se a solução de KOH a $1,00 \text{ mol L}^{-1}$. Antes da injeção cromatográfica ($20 \mu\text{L}$), a amostra foi filtrada em membrana Millipore ($\Phi_{\text{poro}} = 0,45 \mu\text{m}$).

3.2.4 Determinação do Ácido Fólico em Suco de Fruta

Na preparação das amostras de sucos de frutas *in natura* (50,00 g de polpa / 100,00 mL de água) foram liquefeitas e centrifugadas durante 40 min a 1500 rpm. Para os sucos de frutas industrializados, as amostras foram centrifugadas sem prévia diluição.

A amostra de suco de fruta de 1,00 mL foi “fortificada” adicionando-se 10,00 mL de solução padrão de FA (20,0 $\mu\text{g/mL}$). No processo de extração de ácido fólico, adicionou-se à amostra, 3,00 mL de solução de KOH, 0,1 mol L^{-1} , permanecendo em banho ultra-sônico por 10 min. A clarificação da amostra foi realizada com a posterior adição de 3,00 mL de solução de H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} , 350 μL de ácido tricloroacético e ajuste de volume em balão volumétrico de 20,00 mL contendo solução tamponante: 0,25 mol L^{-1} Na_2HPO_4 / 0,37 mol L^{-1} KH_2PO_4 , pH 6,5 com KOH, 0,100 mol L^{-1} KOH. A amostra de concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido fólico foi homogeneizada, filtrada em papel de filtro quantitativo ($\Phi_{\text{poro}} = 2,4 \mu\text{m}$) e em membrana Millipore ($\Phi_{\text{poro}} = 0,45 \mu\text{m}$), e após a filtração, as amostras foram mantidas em geladeira por 15-18 h para posterior análise. O volume de 20 μL de cada amostra, foi injetado no cromatógrafo para análises. A **Figura 11** representa o diagrama do procedimento de preparo de amostras de fármaco e suco de fruta para análise cromatográfica.

3.2.5

Preparo de Amostras para Análise Cromatográfica

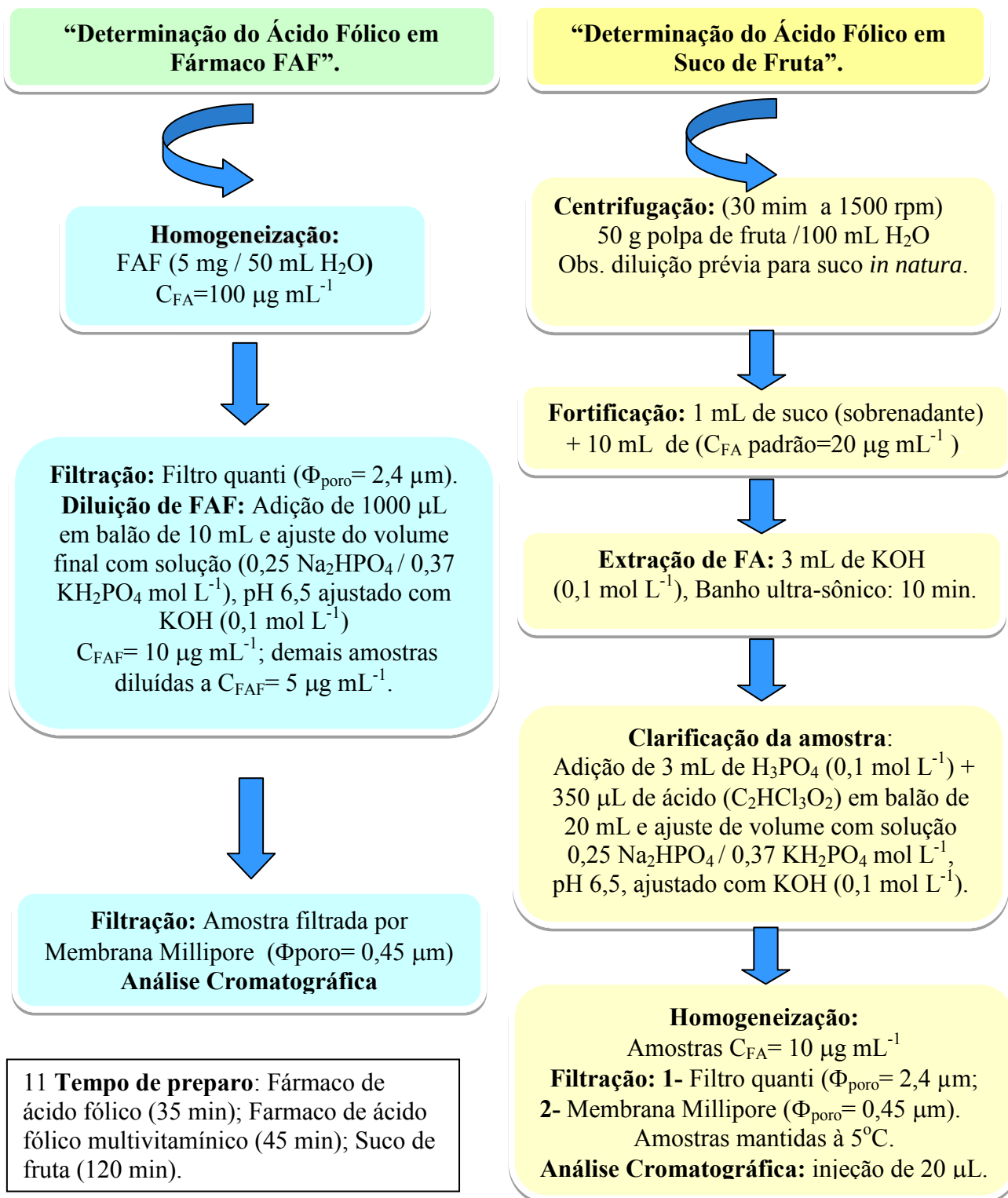


Figura 11. Procedimento de preparo de amostras de fármaco e suco de fruta para análise cromatográfica

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização da superfície do eletrodo por meio de técnicas de análise de superfície (EDX, Imagens SEM, Mapping e XRD)

O espectro de energia dispersiva de raios-X (EDX) é construído ao plotar valores de intensidades de raios-X (cintilações/segundo) contra energia (KeV-mil elétrons/volts). Os picos correspondem aos diferentes elementos presentes na amostra, podendo ocorrer sobreposição de picos de energia, relativos a raios-X de diferentes níveis de energia (k, L, M) de diferentes elementos.

Com a utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), acoplado a um detector SiLi de energia dispersiva de raios-X (EDX), determinou-se as concentrações em porcentagem (%) atômica e em massa de prata e de mercúrio presentes na superfície do eletrodo AgSIE utilizado na determinação e quantificação de ácido fólico padrão e nas diferentes amostras desta vitamina.

O resultado da microanálise por EDX da superfície do eletrodo está representado na **Figura 12**. As análises de superfície do eletrodo metálico, demonstraram uma concentração média de: 26% de Ag e 74% de Hg (**Figura 12**), o que equivale para a fórmula mínima a proporção de **2Ag:3Hg**. Os resultados das análises de imagens SEM, Mapping e o XRD estão representados na **Figura 13**.

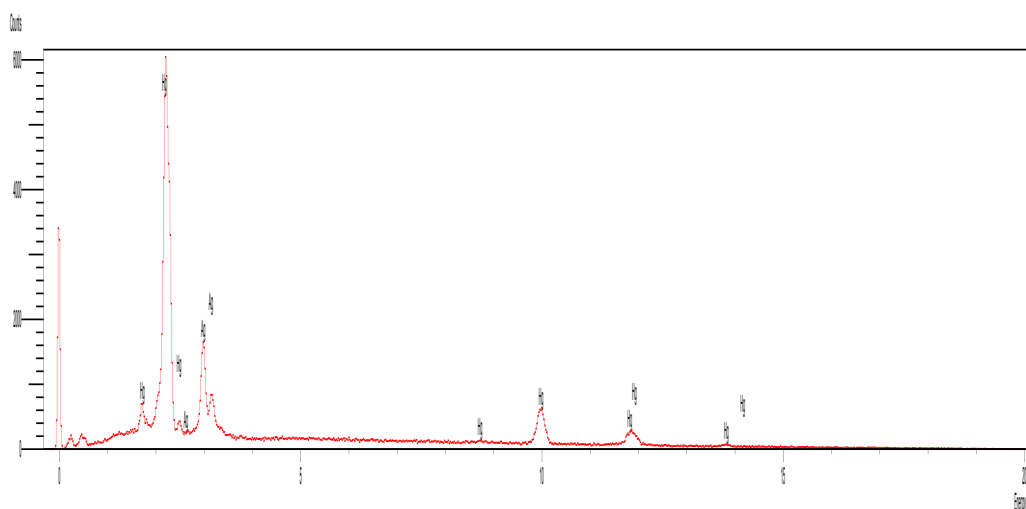


Figura 12. Espectro de energia dispersiva mostrando os picos de radiação de **Ag/Hg**, componentes do eletrodo sólido intermetálico de prata e mercúrio **AgSIE**

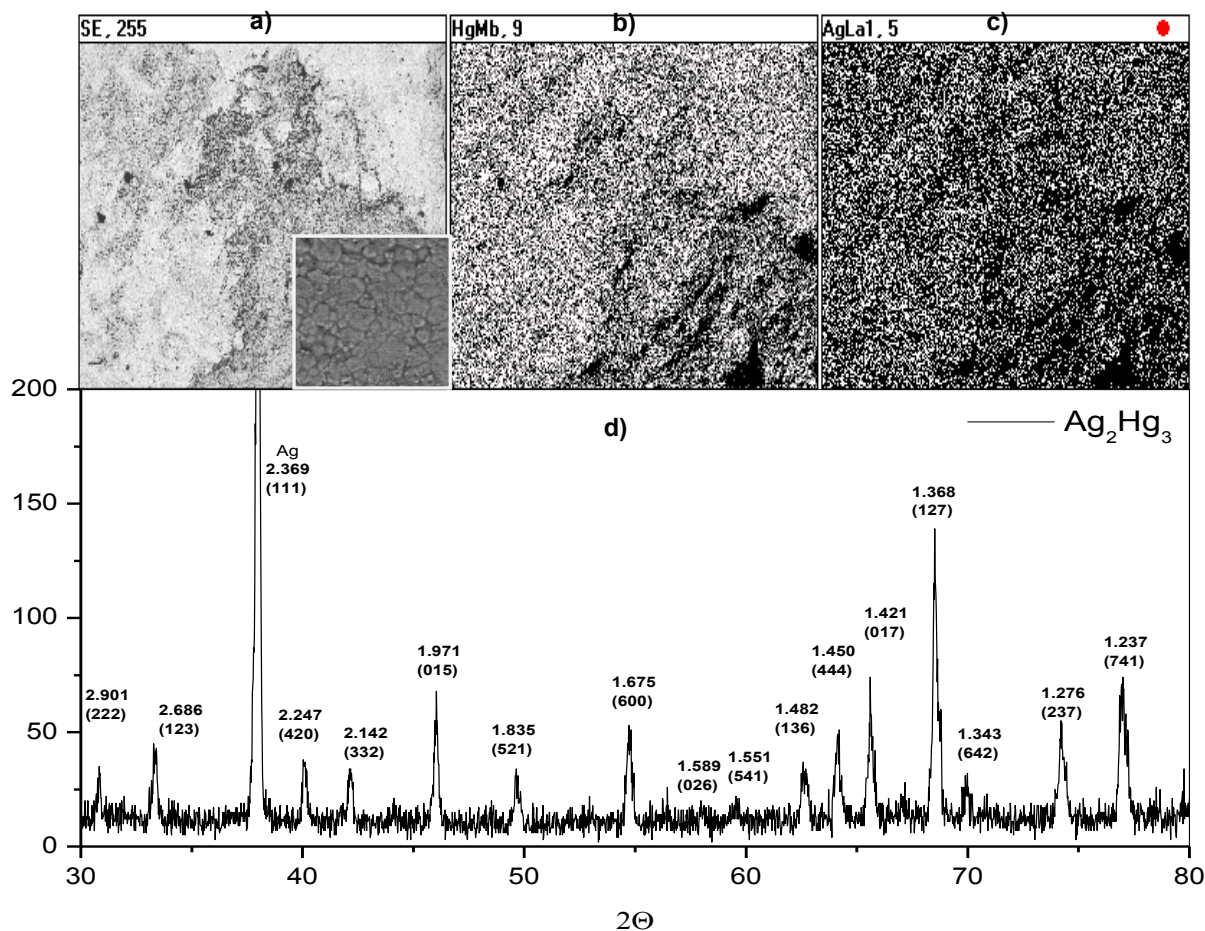


Figura 13 - a) Imagem **SEM** da superfície do eletrodo (ampliação: 500X); **Mapping** dos elementos químicos: **b)** Hg e **c)** Ag. **d)** **XRD** superfície do filme intermetálico (**Ag₂Hg_{3.02}**). **d)** Detalhe: imagem **SEM** da superfície do filme (ampliação: 5000X). Valores das reflexões apresentadas e foram obtidas do: **ICDD - PDF Data File N^o. 01- 072- 8408**

Os resultados das análises de superfície, imagem **SEM**, **Mapping** e **XRD**, (**Figura 13**), permitiram a caracterização da superfície como sendo constituída de um filme intermetálico. A **Figura 13a-c** mostra a imagem SEM da superfície do eletrodo e os Mapping obtidos para os elementos Hg e Ag. A imagem SEM, **Figura 13-a**, mostra um substrato rugoso composto de cristais do intermetálico **Ag₂Hg_{3.02}** [59], de dimensões relativamente homogêneas (detalhe da figura). A

homogeneidade das partículas e a homogeneidade na distribuição dos elementos Hg e Ag sobre a superfície foram confirmadas com os resultados do mapeamento, **Figura 13b-c**, respectivamente.

A **Figura 13-b** representa a distribuição dos átomos de Hg (pontos brancos) sobre o substrato para o qual se observou uma quantidade consideravelmente maior dos átomos de Hg em comparação aos de Ag, **Figura 13-c** (pontos brancos).

A observação da superfície com o auxílio de microscópio ótico (aumento de 200X e luz branca, figura não apresentada no texto) permitiu a visualização de uma superfície de coloração acizentada, característico de superfícies rugosas.

O cristal é constituído por um plano de átomos que se encontram separados a uma certa distância **d**, e está ilustrado na **Figura 13-d**

A **Figura 13-d** o difratograma de raios X (intensidades dos feixes difratados em função dos ângulos de difração 2Θ de amostra), obtidos do filme formado sobre a superfície do eletrodo. Na figura observa-se um conjunto considerável de reflexões (valores de *d* e *hkl*: inseridos na figura) para o intervalo de $30 \leq 2\Theta \leq 70^\circ$. O conjunto das reflexões permitiu a identificação da fase: **Ag₂Hg_{3.02}**, fase esta que constitui o filme presente na superfície do eletrodo. Reflexões características do Hg líquido não foram observadas.

4.2 Aplicação Eletroanalítica na Determinação de Ácido Fólico

A técnica de Voltametria de Onda Quadrada Adsorptiva de Redissolução (SWAdSV), foi utilizada no desenvolvimento eletroanalítico para a determinação de ácido fólico em fármaco, suco de fruta *in natura* e industrializado, pela rapidez, sensibilidade e seletividade nas análises. O eletrodo de trabalho foi o eletrodo intermetálico de prata e mercúrio (AgSIE) que tem por finalidade, substituir o eletrodo de mercúrio líquido utilizado em alguns trabalhos relacionados com a análise da vitamina ácido fólico, de modo a atender ao conceito da “química verde”.

Neste trabalho, a aplicação da **SWAdSV**, permitiu explorar a acumulação adsorptiva de ácido fólico na superfície do eletrodo **AgSIE** para a determinação do

a superfície do eletrodo foi preliminarmente avaliada a partir de estudos de voltametria cíclica no eletrólito de suporte. A voltametria cíclica foi aplicada para avaliar a possibilidade de adsorção do FA, sua dependência com a velocidade de varredura de potenciais e a reversibilidade do sistema.

4.2.1 Voltametria Cíclica

4.2.1.1 Processo de Adsorção do Ácido Fólico

A voltametria cíclica (**CV**) foi aplicada para avaliar o perfil voltamétrico do ácido fólico, como a reversibilidade e a presença de processos adsorptivos na superfície do eletrodo. O processo de adsorção do FA é representado por três ciclos ($I_p / \mu A$ vs E / mV) consecutivos (**Figura 14**).

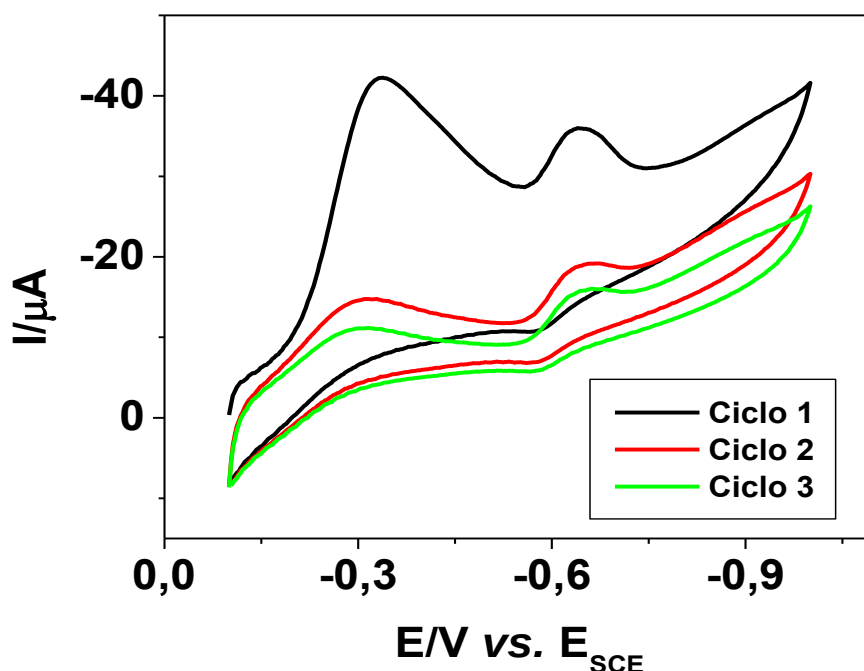


Figura 14 - Voltamogramas cíclicos (**VC**) de um processo de adsorção, solução de ácido fólico $9,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (**pH** 5,6), eletrodo de trabalho **AgSIE**; $t_{acc} = 30 \text{ s}$; $E_{acc} = -100 \text{ mV}$ ($-0,1 \text{ V}$) vs. E_{sce} e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$

O primeiro ciclo da **Figura 14** do voltamograma cíclico para o ácido fólico, revelou uma maior intensidade da corrente de pico, mas, no segundo e terceiro ciclos, foi possível observar o decaimento da corrente de pico referente à redução do ácido fólico. O potencial de pico de adsorção do ácido fólico é aproximadamente -0,6 V (segundo pico no voltamograma). A diminuição nas intensidades dos sinais dos picos, deve-se ao processo difusional do material para o meio da solução, com o aumento do número de ciclos.

4.2.1.2 Variação da Velocidade de Varredura

Com o objetivo de avaliar o grau de reversibilidade e a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo, realizou-se o experimento de variação de velocidade de varredura no intervalo de 50 a 1000 mV s^{-1} , como mostra os voltamogramas cíclicos na **Figura 15-a**.

Na **Figura 15-b**, foi empregado o diagnóstico da variação da corrente de pico (I_p) como função da variação da velocidade de varredura (v) e as respostas voltamétricas foram bem definidas, com a utilização da técnica de voltametria cíclica, pois, diante do aumento da velocidade de varredura, observa-se que houve uma adsorção do analito na superfície do eletrodo conforme ilustrado na **Figura 15-b**, demonstrando uma excelente linearidade ($r= 0,999$) para a relação $I_p \times v$ (mV s^{-1}). A velocidade que apresenta o melhor perfil voltamétrico é **200 mV s^{-1}** . A dependência linear entre a corrente de pico anódica e a velocidade de varredura, caracteriza um processo adsortivo do ácido fólico. Comparado ao estudo aplicando-se a técnica de voltametria de onda quadrada e eletrodo AgSIE, o processo é **reversível e adsortivo**, pois, a corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da frequência ($I_p = K.f^{1/2}$), **sem adsorção do produto** [51], conforme mostra a **Figura 19**, e na **Figura 22**, a contribuição da corrente reversa, contribui para uma maior intensidade da corrente resultante de pico (ΔI) [50], caracterizando processo reversível para o ácido fólico.

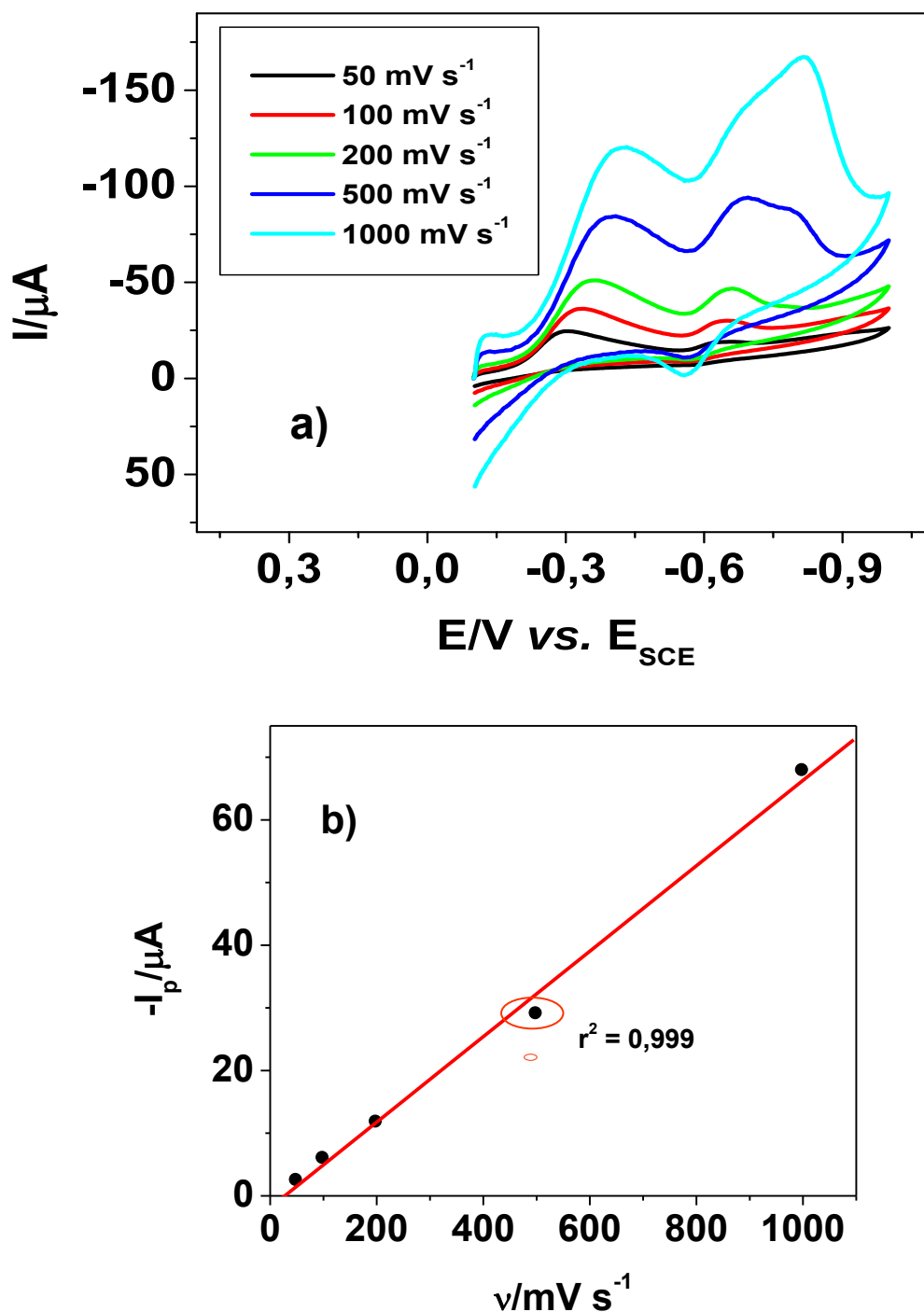


Figura 15 - a) Voltamogramas cíclicos (VC) de velocidade de varredura, solução de ácido fólico; $C_{\text{FA}} = 9,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, solução tamponante fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,6; curvas: 50; 100; 200; 500; 1000 mV s^{-1} ; eletrodo de trabalho **AgSIE**; $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$; $E_{\text{acc}} = -100 \text{ mV}$ ($-0,1 \text{ V}$) vs. E_{sce} . Insert: $I_p / \mu\text{A}$ vs. V . **b)** : $I_p / \mu\text{A}$ vs. $v / \text{mV s}^{-1}$, para $E_{\text{pico}} = -630 \text{ mV}$, $r = 0,999$

4.2.2 Voltametria de Onda Quadrada

4.2.2.1 Otimização dos Parâmetros para a Aplicação da SWAdSV/AgSIE

Os parâmetros abaixo foram investigados e avaliados de modo a encontrar as melhores condições para sensibilidade e seletividade do método. Para a aplicação da **SWAdSV/AgSIE** foram otimizados os seguintes parâmetros experimentais: eletrólito de suporte, pH, potencial de acumulação, tempo de acumulação, frequência, amplitude e incremento.

4.2.2.1.1 Estudo da Variação do pH do Eletrólito

A variação do pH foi realizada com o objetivo de avaliar o número de prótons envolvidos na reação de redução do ácido fólico, e também permitiu verificar em que valor ocorre maior resposta de corrente para fins analíticos.

A **Figura 16-a** representa os voltamogramas de **SWAdSV** obtidos para o FA ($C_{FA} = 1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) no intervalo de $1,3 \leq \text{pH} \leq 8,5$, em solução tamponante de fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. A variação do pH do eletrólito (fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$), influenciou na posição do potencial de pico e no desdobramento do sinal (**Figura 16-a**). Foi avaliado o perfil das curvas e a intensidade de corrente, conforme descrito anteriormente e constatou-se que, para o eletrólito de **pH 5,6** ocorreu a melhor resposta de corrente de pico para a reação de redução do ácido fólico. Na faixa de $1,3 \leq \text{pH} \leq 8,5$ verificou-se que para o eletrólito com pH 1,3 a 5,6, houve um aumento gradativo da corrente de pico, e em pH acima de 5,6, nota-se uma diminuição acentuada na corrente de pico (**Figura 16-b**). Na **Figura 16-b** estão representados os valores de $I_p^c \times \text{pH}$ para todo o intervalo de pH investigado. Esta figura evidencia que o **pH 5,6** possui um maior valor para a I_p^c .

A correlação $\Delta E \times \Delta \text{pH}$, observada na **Figura 16-c**, forneceu uma relação linear $R^2 = 0,9993$, $y = -63,008 x - 279,36$. O valor da pendente da equação da reta,

$b = 63,008$, forneceu para a equação, $\Delta E/\Delta pH = n_H/n_e = 1,08$, onde n_H e n_e são o número de prótons e de elétrons respectivamente. Este valor, aproximadamente unitário permitiu sugerir a igualdade entre o número de H^+ e o de elétrons trocados no processo de redução do FA. A avaliação dos voltamogramas SWAdSV permitiu estimar o valor de n_e a partir do $W_{1/2} = 43,4$ mV ($W_{1/2} = 3,52 RT/(n_e F) = 90/n$ mV) $n_e = 2,07$. Os valores obtidos para o $n_H = 2$ e $n_e = 2$ estão em concordância com os apresentados por Van Den Berg e Le Gall (1993, p. 459) [18].

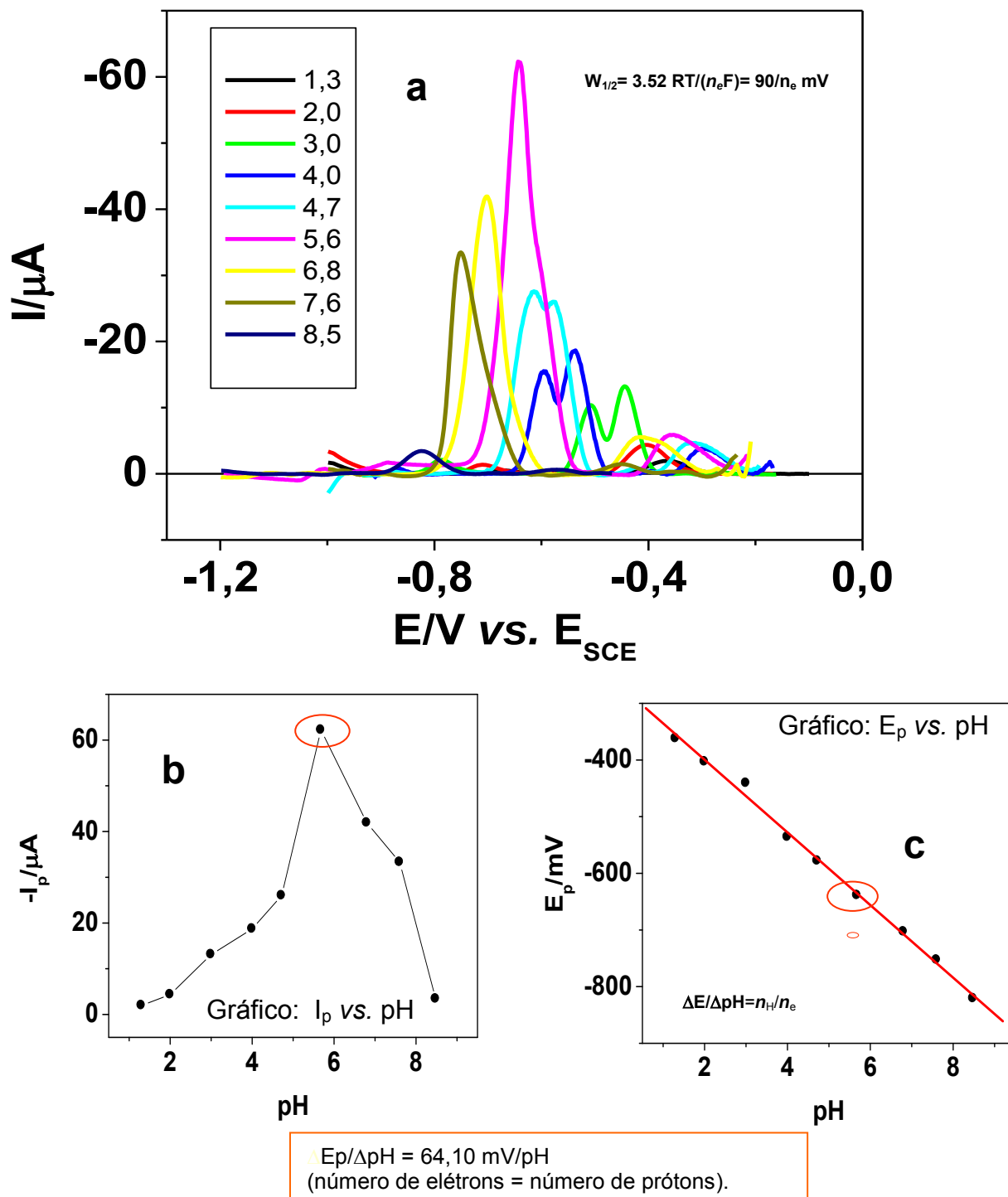


Figura 16 - a) Voltamogramas SWAdSV para o $C_{FA} = 1,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em função do pH; eletrólito solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: AgSIE, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$ e $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, vs. E_{SCE} , **b)** $I_p / \mu\text{A}$ vs. pH, **c)** E_p / mV vs. pH. $R^2 = 0,9993$, $y = -63,008 x - 279,36$

4.2.2.1.2 Potencial de Acumulação

O potencial de acumulação (E_{acc}) é o potencial em que ocorre melhor adsorção do analito na superfície do eletrodo, então, podendo ser observado que o E_{acc} corresponde a **-0,1 V** e apresenta como função uma maior intensidade da corrente de pico. Na **Figura 17** são representados os voltamogramas **SWAdSV/AgSIE** e a variação de potencial de acumulação.

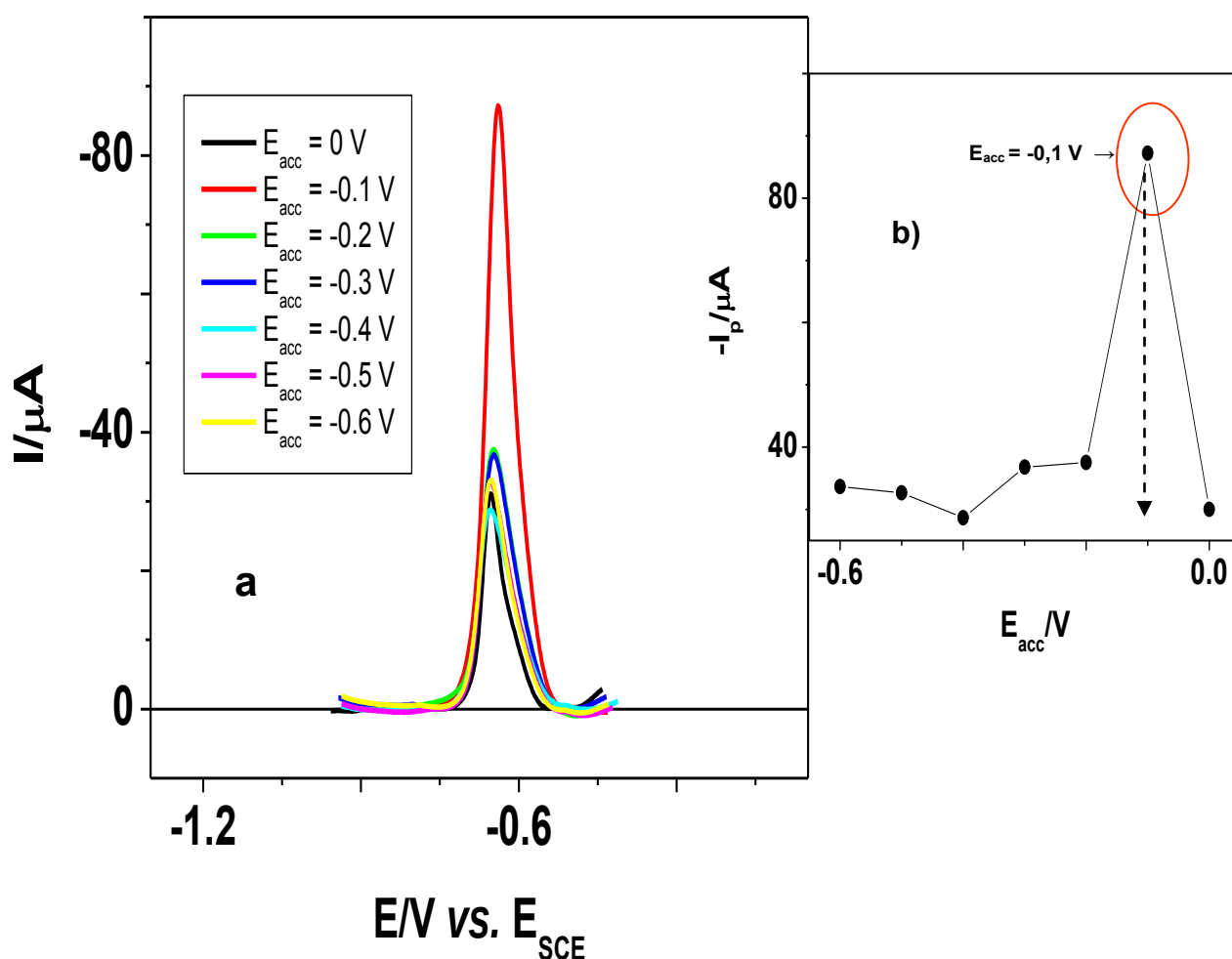


Figura 17 - a) Voltamogramas **SWAdSV** - Potencial de acumulação, $C_{FA} = 1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tamponante de fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6. Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$, vs. E_{sce} . b) $I_p / \mu A \times E_{acc} / V$

Para se determinar o melhor valor de potencial de acumulação, construiu-se para o intervalo de $(0 \leq E_{acc} \leq -0,6)$ V a relação $I_p \times E_{acc} / V$ vs. E_{sce} , ficando evidenciado que $E_{acc} = -0,1$ V traduz a maior intensidade de corrente de pico, com $I_p^c = 90 \mu A$, para $E_{acc} = -0,1$ V. No entanto, para valores de E_{acc} inferiores e, ou superiores a $-0,1$ V, os valores de I_p^c diminuem significativamente.

4.2.2.1.3 Tempo de Acumulação

O tempo de acumulação (t_{acc}) é o tempo para que ocorre a adsorção do analito na superfície do eletrodo. Este t_{acc} foi acompanhado de agitação magnética lenta (numa escala de rotação: lenta, média e alta). Na **Figura 18** estão representados os resultados para a variação do tempo de acumulação sobre o perfil dos voltamogramas.

Foi avaliado o tempo de acumulação (t_{acc}) no intervalo de $(0 \leq t_{acc} \leq 90)$ s sendo que a correlação $I_p^c \times t_{acc} / s$ vs. E_{sce} (**Figura 18-b**) apresentou a maior intensidade para a corrente de pico de $t_{acc} = 30$ s, e para $t_{acc} \geq 30$ s constatou-se a diminuição dos valores das correntes de pico catódica I_p^c .

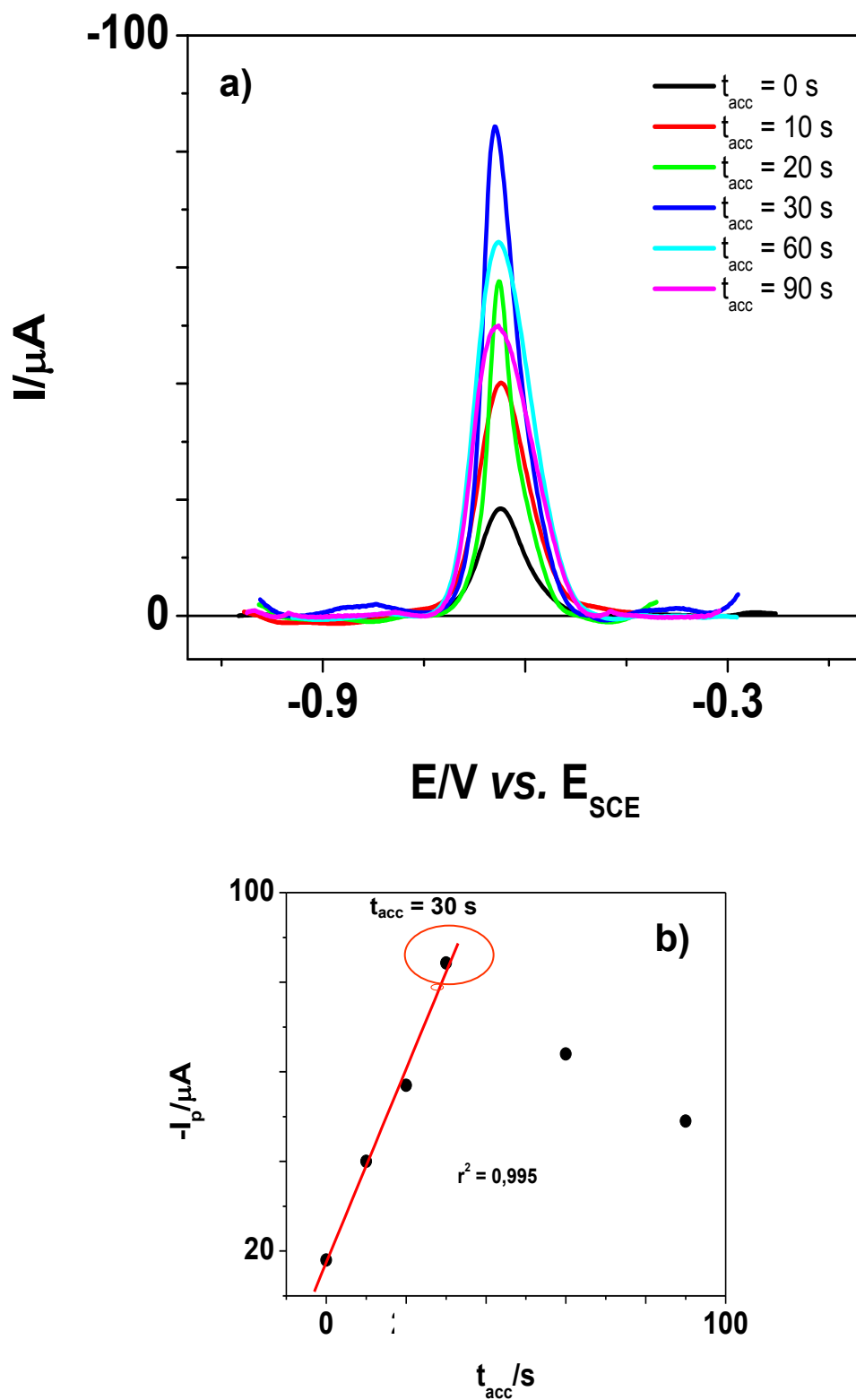


Figura 18 - a) Voltamogramas **SWAdSV** - Tempo de acumulação, $C_{FA} = 1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tamponante de fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6. Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$ $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, vs. E_{sce} . **b)** $I_p / \mu A \times t_{acc} / s$

4.2.2.1.4 Variação de Freqüência

A freqüência é uma das variáveis mais importante na voltametria de onda quadrada, pois, mantendo-se constante a concentração, é ela quem determina a intensidade do sinal analítico.

O aumento na intensidade da corrente de pico em função da variação de freqüência de aplicação dos pulsos de potenciais é de grande importância em aplicações analíticas, como descrito anteriormente, a sensibilidade analítica é melhorada quando se trabalha com freqüência de valores elevados, como 100 s^{-1} . Para as aplicações analíticas, são importantes a investigação de outros parâmetros, dentre eles, a amplitude de pulso (a) e o incremento de varredura (ΔE_i), com o objetivo de aperfeiçoá-los para a obtenção de maior sensibilidade nas análises.

As relações existentes entre a corrente de pico e a freqüência, fornecem informações quanto ao grau de reversibilidade e a existência ou não de processos de adsorção na superfície do eletrodo.

A **Figura 19-a** ilustra os voltamogramas $I_p \times E_p$, e analisando a variação da freqüência (f) no intervalo de $(40 \leq f \leq 200) \text{ s}^{-1}$, a correlação $I_p^c \times f^{1/2}/\text{s}^{-1/2} \text{ V}_s$. E_{sce} forneceu uma relação linear ($R^2 = 0,9970$) como mostra a **Figura 19-b**, observando-se o comportamento reversível para o sistema. O valor de $f = 200 \text{ s}^{-1}$ foi, então, adotado por fornecer a maior intensidade de corrente de pico, sem causar deformações no perfil do voltamograma.

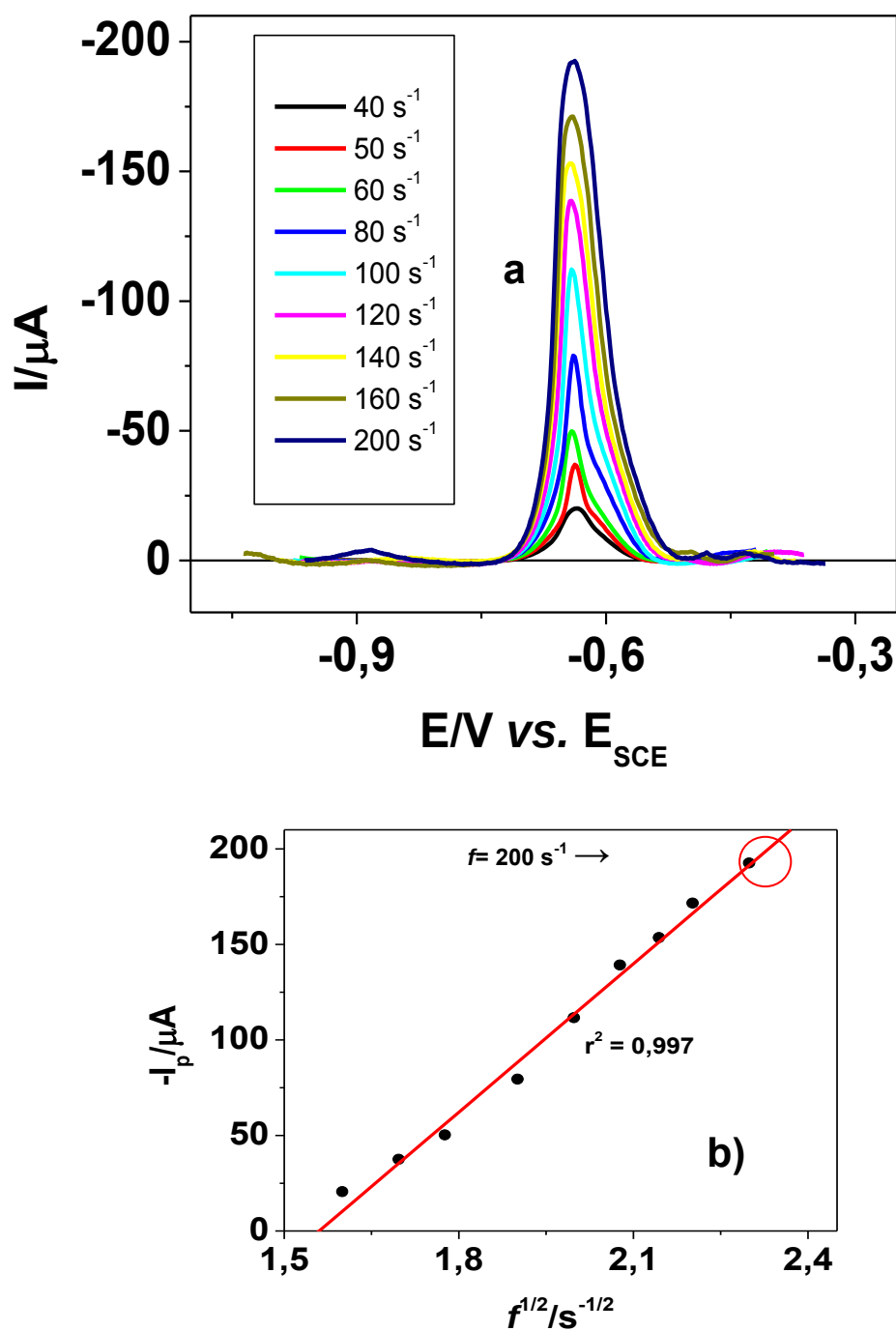


Figura 19 - a) Voltamogramas **SWAdSV** -Variação de frequência, $C_{\text{FA}} = 1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tamponante de fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6. Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, vs. E_{sce} . **b)** $I_p / \mu\text{A} \times f^{1/2} / \text{s}^{-1/2}$

4.2.2.1.5 Variação da Amplitude

A amplitude corresponde à altura do pulso e quanto maior a amplitude, de modo geral, maior será o sinal voltamétrico, caracterizando-se uma maior corrente de pico do analito em estudo. No entanto, verificou-se que, para amplitudes maiores como 200 mV, há uma melhoria na sensibilidade analítica, porém ocorre um alargamento dos picos que resulta na perda de seletividade. A **Figura 20-a** representa os voltamogramas de variação da amplitude do ácido fólico.

Foi avaliada a amplitude do pulso (**a**) para o intervalo de ($10 \leq a \leq 80$) mV e a correlação $I_p^c \times a / \text{mV}$ vs. E_{sce} , $R^2 = 0,9986$ (**Figura 20-b**), evidenciou que **a = 50 mV** apresentou uma maior intensidade de corrente.

4.2.2.1.6 Variação do Incremento

O incremento é a diferença de um pulso ao outro, sendo um fator multiplicador da frequência. Para o incremento de varredura (ΔE_i) foi avaliado o intervalo de ($1 \leq \Delta E_i \leq 10$) mV, como mostra a **Figura 21-a**.

A correlação $I_p^c \times \Delta E_i / \text{mV}$ vs. E_{sce} (**Figura 21-b**) representa uma relação linear ($R^2 = 0,9991$) e a intensidade da I_p^c para os valores de ($4 \leq \Delta E_i \leq 8$) mV, corresponde a $\Delta I_p = 20 \mu\text{A}$. No entanto, os valores de ΔE_i superiores a 4 mV, não foram utilizados pelo fato de que estes promovem uma considerável distorção nos voltamogramas **SWAdSV**. Tal distorção se deve ao fato do aumento da velocidade de varredura, $v = \Delta E_i \times f / \text{s}^{-1}$, com o aumento de ΔE_i . Desta forma, o valor de $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$ foi empregado uma vez que os valores de ($1 \leq \Delta E_i \leq 3$) mV não apresentam considerável variação na intensidade da I_p^c .

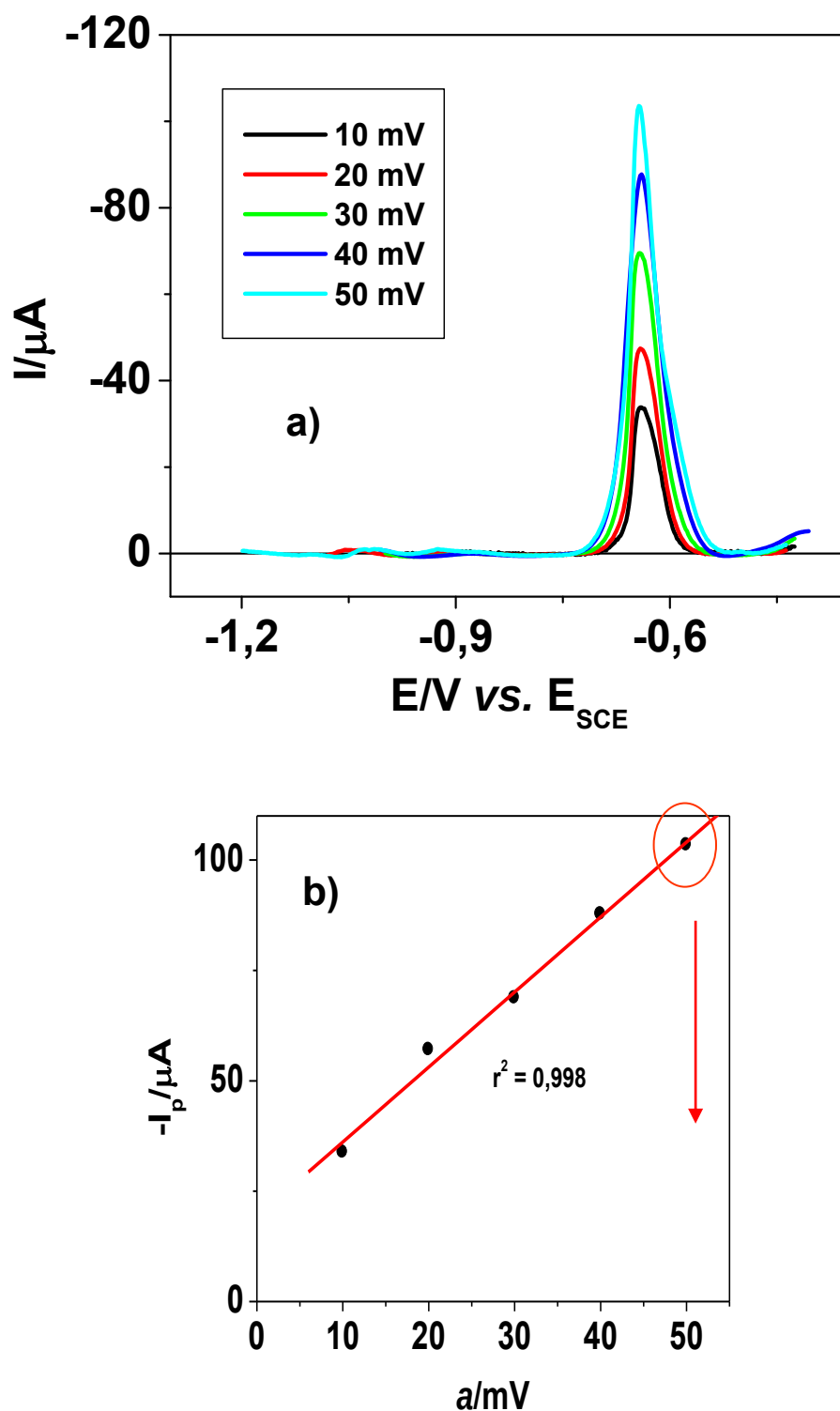


Figura 20 - a) Voltamogramas SWAdSV - Variação da amplitude, $C_{\text{FA}} = 1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tamponante de fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6. Eletrodo de trabalho: AgSIE, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, vs. E_{sce} . b) $I_p / \mu\text{A} \times a / \text{mV}$

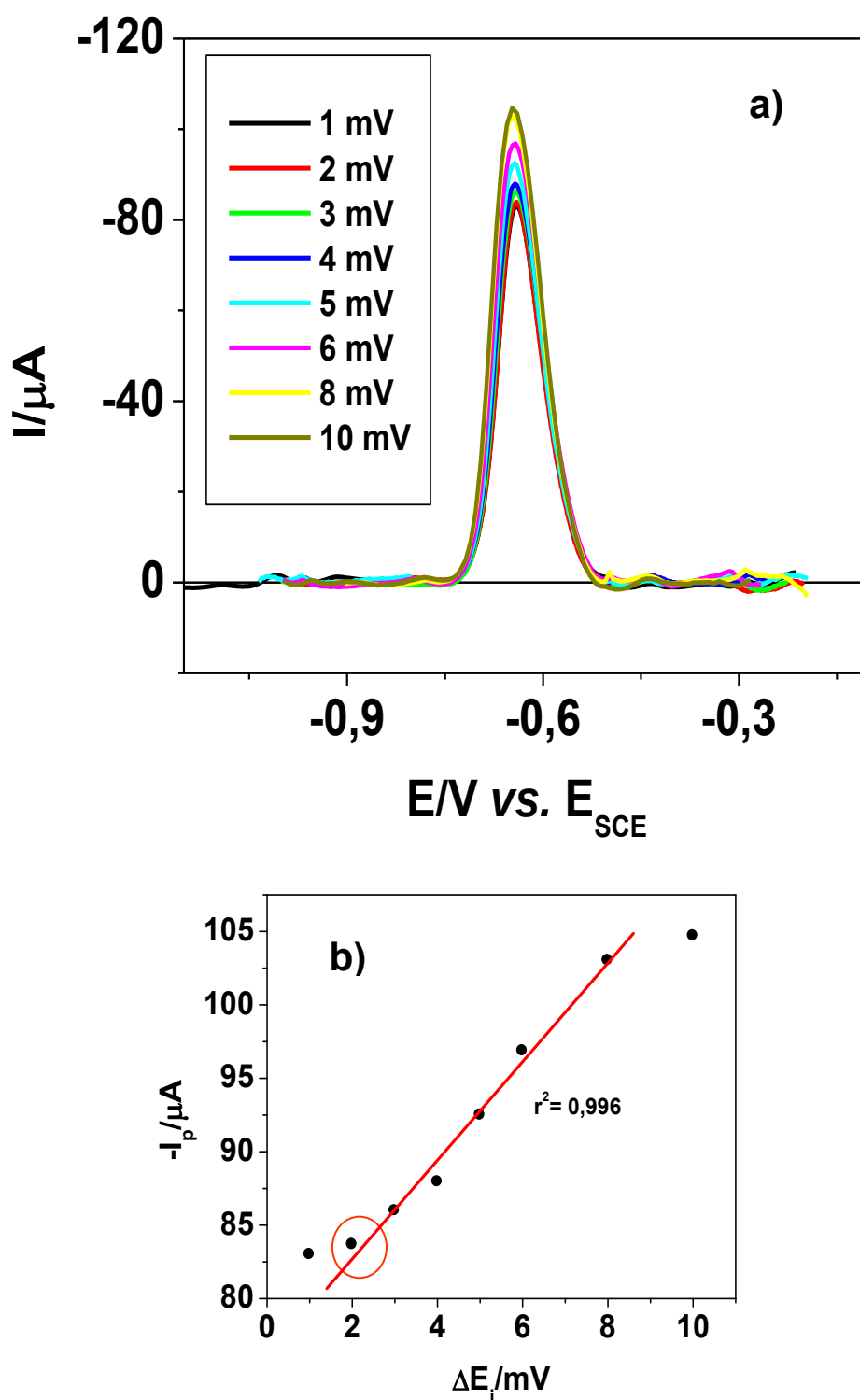


Figura 21 - a) Voltamogramas **SWAdSV** - Variação do incremento, $C_{\text{FA}} = 1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tamponante de fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6. Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, vs. E_{sce} . **b)** $I_p / \mu\text{A} \times \Delta E_i / \text{mV}$

4.2.2.2 Componente de Corrente do Ácido Fólico

A técnica voltamétrica **SWAdSV** foi aplicada para fornecer evidências da ocorrência de acumulação adsorptiva de ácido fólico na superfície do eletrodo de trabalho por redução no eletrólito de suporte. A separação das correntes é uma ferramenta utilizada para diagnosticar o tipo de reação do sistema, então, o critério para analisar inicialmente o grau de reversibilidade é a separação da corrente resultante.

O ácido fólico apresentou um pico de redução em torno de **-0,6 V** v_s . E_{sce} , em concordância com os resultados da **VC**, com características de processo reversível controlado pela adsorção do reagente na superfície do eletrodo. O potencial de pico do FA em **AgSIE** é bastante similar ao registrado na literatura com a utilização do eletrodo de mercúrio [18].

A reversibilidade do sistema para o ácido fólico (**Figura 22**) é representada no voltamograma de onda quadrada de uma solução de concentração $C_{FA} = 1,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e **pH** 5,6, podendo assim, ser constatada a partir da intensidade dos sinais observados para as correntes direta, reversa e a resultante no processo reversível do ácido fólico, ocorrendo assim, uma maior intensidade da corrente reversa comparada à corrente direta, então, há uma maior contribuição para a corrente resultante.

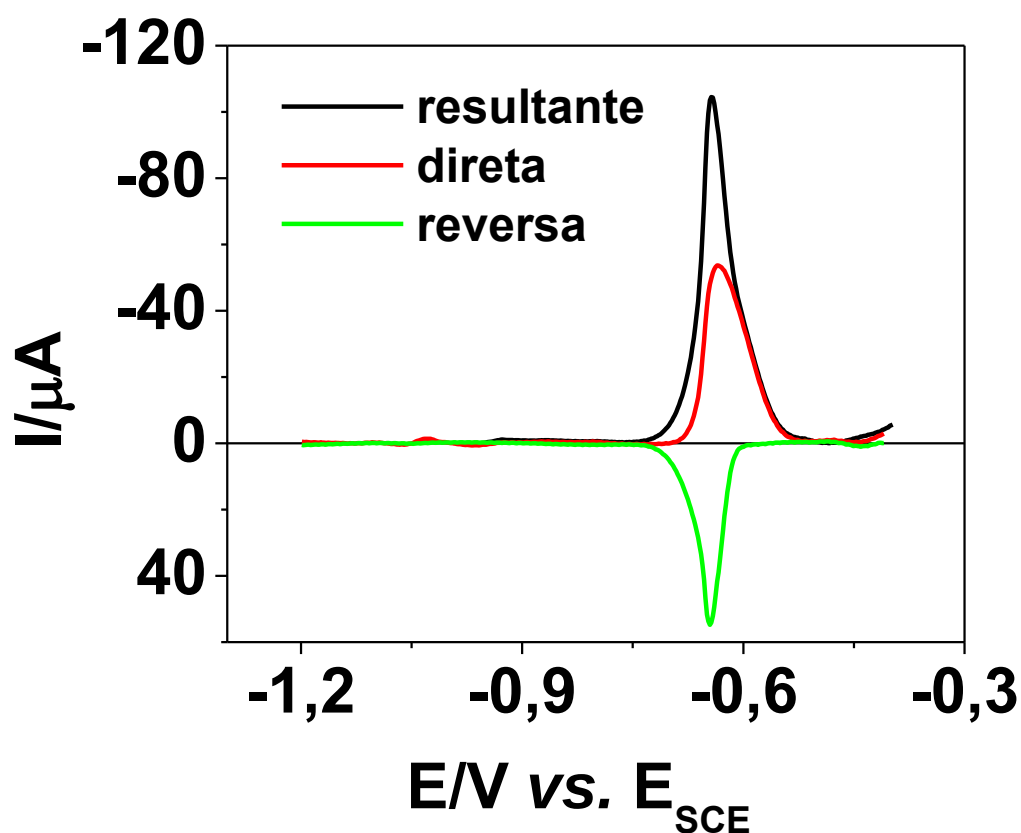


Figura 22. Voltamograma **SWAdSV** avaliação do processo reversível para o ácido fólico de $C_{FA \text{ padrão}} = 1,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,6. Eletrodo de trabalho: AgSIE, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V vs. } E_{\text{SCE}}$

4.2.2.3 Curva Analítica de Ácido Fólico em SWAdSV

As curvas analíticas foram construídas a partir dos parâmetros otimizados, já mencionados como: ($E_{\text{acc}} = -100 \text{ mV}$; $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$; $f = 200 \text{ s}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$ e pH 5,6), amostras independentes para $n = 5$, por meio de diluição da solução padrão de FA $45,31 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($4,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), nas concentrações de $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) a $1,06 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($10,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), com linearidade ($R^2 = 0,998$), como mostra a **Figura 23**. Os limites de detecção (**LD**) e

($R^2 = 0,998$), como mostra a **Figura 23**. Os limites de detecção (**LD**) e quantificação (**LQ**) calculados foram: $6,79 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,3 \mu\text{g L}^{-1}$) e $2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($10,1 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. A **Figura 23-a** representa os voltamogramas da curva analítica, e a **Figura 23-b** mostra a relação $I_p \times C_{FA}$, com linearidade $R^2 = 0,9989$.

A precisão do método em estudo foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária, por meio de dez medidas sucessivas de uma solução de ácido fólico padrão de concentração: **FA** = $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$). Para a **repetibilidade** (precisão intra-day), calculou-se a partir dos resultados das análises sucessivas durante um dia ($n=10$), e o resultado do desvio padrão relativo foi **RSD** = 2,8%, e para a **precisão intermediária** (precisão inter-day) calculada por meio de análises ($n=10$) em dias diferentes, o resultado obtido foi **RSD** = 4,7%.

Os parâmetros otimizados e os resultados obtidos com a aplicação do método eletroanalítico, utilizando a técnica de Voltametria de Onda Quadrada Adsorptiva de Redissolução (**SWAdSV**) e o eletrodo sólido intermetálico de prata e mercúrio (**AgSIE**), na determinação e quantificação de ácido fólico, estão representados na **Tabela 4**, e na **Tabela 5** mostra uma comparação de diferentes eletrodos quimicamente modificados, com a aplicação de métodos eletroanalíticos para a determinação de ácido fólico.

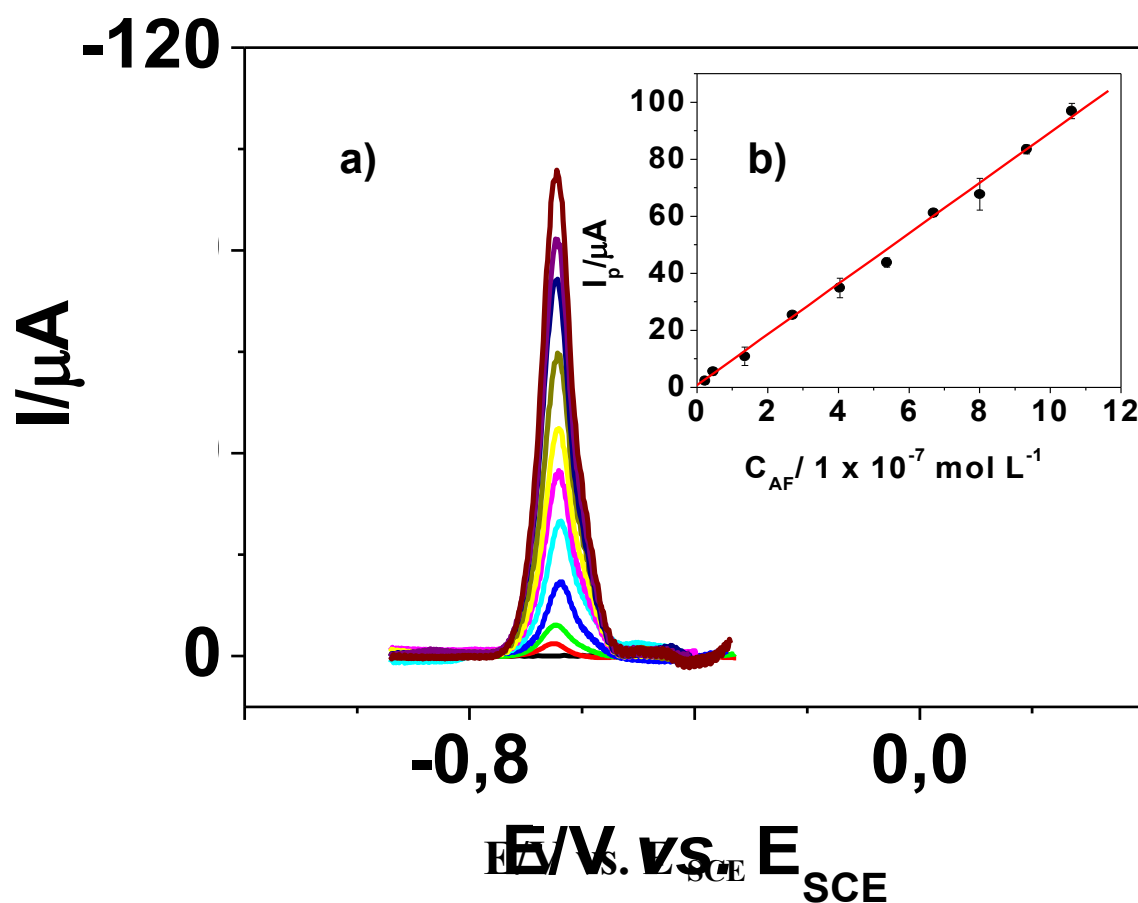


Figura 23 - a) Voltamogramas de **SWAdSV** a C_{FA} em eletrólito de suporte de solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6. C_{FA} : (-) branco, (-) 0,2, (-) 0,4, (-) 1,3, (-) 2,7, (-) 4,0, (-) 5,3, (-) 6,6, (-) 8,0, (-) 9,3 e (-) $10,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (0,02, 0,04, 0,13, 0,27, 0,40, 0,53, 0,66, 0,80, 0,93 e 1,06) $\mu\text{mol L}^{-1}$. **b)** relação $I_p \times C_{\text{FA}}$. Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V vs. } E_{\text{sce}}$. $Y = 8,30253 \times 10^{-7} + 88,61765 X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99885$)

Tabela 4. Parâmetros otimizados e os resultados com a aplicação da **SWAdSV/AgSIE**

Parâmetros avaliados:

pH = 5,6; $f = 200 \text{ s}^{-1}$; $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$; $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$; $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$

Curva analítica

R	0,998
LD	$0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ($6,79 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$)
LQ	$10,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ($2,28 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$)

Repetibilidade* 2,8%

Precisão intermediária* 4,7%

*[FA] = $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (n=10)

Tabela 5. Comparação de métodos eletroanalíticos associados a eletrodos quimicamente modificados e recentemente aplicados, na determinação de ácido fólico

Técnica	Eletródo	Eletrólito	pH	LD (mol L ⁻¹)	Referência (2010-2014)
CV DPV	ZONMCPE (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	7,0	9,86 x 10 ⁻⁶	[35] ²⁰¹⁰
CV Cron. DPV	BQTMCECPE (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	8,0	3,0 x 10 ⁻⁷	[36] ²⁰¹¹
CV Cron. DPV	FDCCNTE (oxidação)	Tampão univesal (0,1 mol L ⁻¹)	9,0	1,1 x 10 ⁻⁶	[37] ²⁰¹⁰
DPCSV CV	MIP-carbono (redução)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	2,5	4,53 x 10 ⁻⁹	[38] ²⁰¹⁰
DPCSV CV	MIP-carbono (redução)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	7,8	4,53 x 10 ⁻¹⁰	[39] ²⁰¹⁰
CV Cron. SWV	AuNPs/CPE (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	6,5	2,7 x 10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	[40] ²⁰¹³
CV SWV	ETFMCNTPE (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	7,0	6,0 x 10 ⁻⁷	[41] ²⁰¹³
CV Cron. DPV	PBDCNPE (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	7,0	2,7 x 10 ⁻⁶	[42] ²⁰¹⁴
CV DPV	<i>m</i> -AgSAE (redução)	Tampão: Acetato (0,05 mol L ⁻¹ + metanol (9:1))	5,0	0,5 x 10 ⁻⁹	[43] ²⁰¹¹
CV DPV	<i>p</i> -AgSAE (redução)	Tampão acetato (0,05 mol L ⁻¹)	5,0	5,88 x 10 ⁻¹⁰	[44] ²⁰¹¹
SWAdSV (Ag ₂ Hg _{3,02})	AgSIE	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	5,6	6,79x10 ⁻¹⁰	This work

CV: Voltametria cíclica; DPV: Voltametria de Pulso Diferencial; Cron.: Cronoamperometria;
DPCSV: Voltametria de pulso diferencial catódica de redissolução;
SWV: Voltametria de onda quadrada;
SWAdSV: Voltametria de onda quadrada adsortiva de redissolução

Recentemente os métodos eletroanalíticos empregando eletrodos quimicamente modificados, estão sendo aplicados na determinação de ácido fólico com sucesso, com limites de detecção baixos, conforme mostra a **Tabela 5**. Dentre os eletrodos modificados em comparação aos limites de detecções (**Tabela 5**), o *m*-AgSAE (LD= $0,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹); *p*-AgSAE (LD= $5,88 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) e MIP-carbono (LD= $4,53 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) são mais sensíveis, destacando-se assim, o eletrodo sólido intermetálico de prata-mercúrio Ag₂Hg_{3,02} (**AgSIE**), LD= $6,79 \times 10^{-10}$, utilizado na determinação de ácido fólico em sucos de frutas *in natura* e industrializados, no desenvolvimento deste trabalho.

4.2.2.4 Determinação de Ácido Fólico em Fármaco

Os resultados obtidos de amostras de fármacos de ácido fólico (FA) de 5,0 mg / tablete diluído em água deionizada, foram analisadas após a adição de 30 µL da solução de fármaco ($52,33 \mu\text{mol L}^{-1}$) e posterior adição sucessiva de 30 µL de solução do padrão de ácido fólico para cada curva analítica, no eletrólito de suporte de pH controlado, como mencionado anteriormente.

Os voltamogramas de **SWAdSV/AgSIE** das análises de amostras de fármacos de ácido fólico estão representados nas **Figuras (24-a; Fig.25-a e Fig.26-a)** e as curvas de recuperação por adição de padrão ($I_p \times C_{FA}$), estão representadas nas **Figuras (24-b; 25-b e 26-b)**. Para as análises de todos os fármacos, utilizou-se o mesmo procedimento.

A recuperação dos fármacos para a concentração de $C_{FA \text{ padrão}} = 0,155 \mu\text{mol L}^{-1}$ forneceu os resultados dos ensaios de recuperação (**R%**) do FA das amostras, $I_p^c \times C_{FA}$ e estão representados nas **Figuras 24 a 26**. A correlação $I_p^c \times C_{FA}$ apresentou-se linear para todas as amostras de fármacos analisadas. O fármaco **FAFI**, forneceu como resultado uma concentração de ácido fólico em massa de $(4,90 \pm 0,10)$ mg e uma recuperação no valor de **R%**= $98,40 \pm 2,70$. Para o fármaco **FAFI** obteve uma recuperação de **R%**= $99,95 \pm 2,99$, $(4,99 \pm 0,15)$ mg e

para o multivitamínico **FAFIII**, apresentou $R\% = 99,47 \pm 1,54$, $(0,24 \pm 0,03)$ mg, em cinco determinações, conforme a **Tabela 6**. O critério de aceitação empregado foi de $95 \leq R\% \leq 105$ conforme estabelecido na literatura [60], o que evidenciou a exatidão do método.

O valor determinado para a concentração do FA apresenta uma diferença absoluta de 0,1 mg, estando muito próximo do valor nominal apresentado pelo fabricante do fármaco (5,0 mg / tablet) e assim, considera-se uma variação aceitável de 5% nas formulações desta natureza, o critério para aceitação será de: $(5,00 \pm 0,25)$ mg; intervalo que contempla o resultado experimental obtido.

A determinação do FA em fármacos foi realizada para avaliar a potencialidade do método para fins de utilizá-lo em matrizes mais complexas com interferentes, como no caso dos sucos de frutas *in natura* e sucos industrializados.

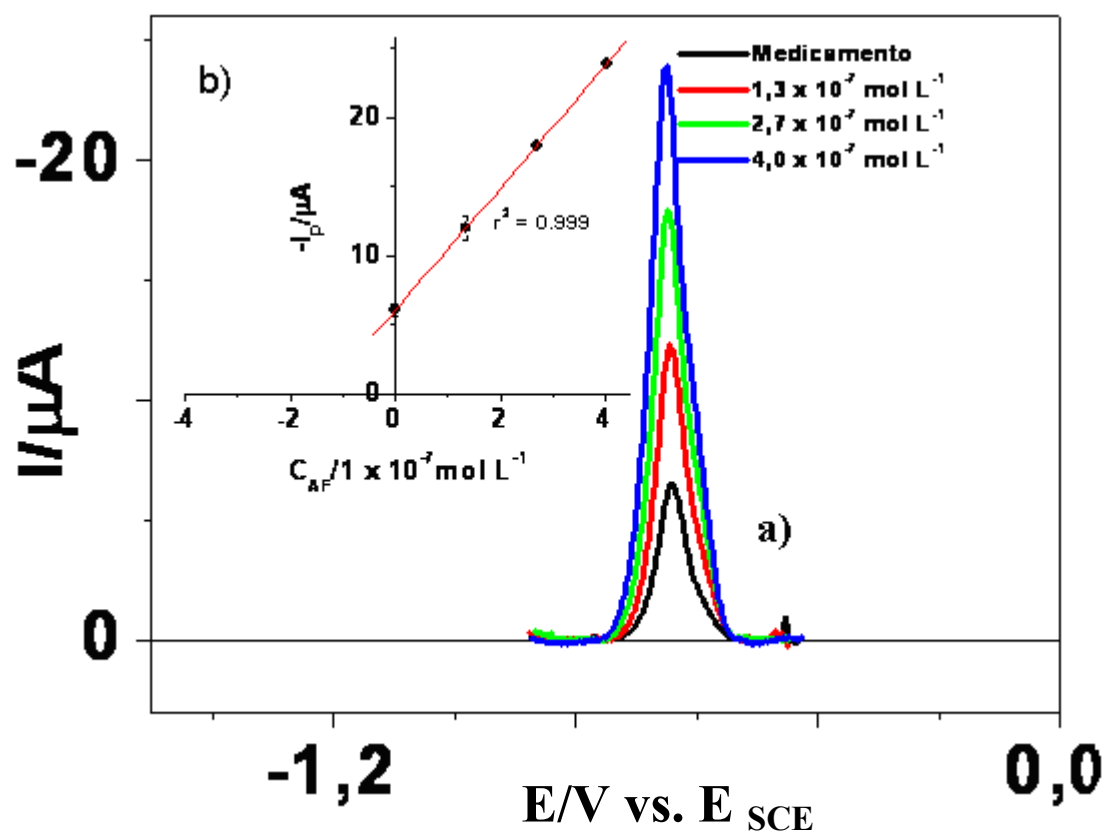


Figura 24 - a) Voltamogramas **SWAdSV** para o fármaco **FAF I**, variando-se a C_{FA} ($1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$, $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), , solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6. **b)** Curva de adição de padrão, relação $I_p \times C_{\text{FA}}$. Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V vs. } E_{\text{sce}}$. $Y = 5,88738 \times 10^{-6} + 36,51067X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,9991$)

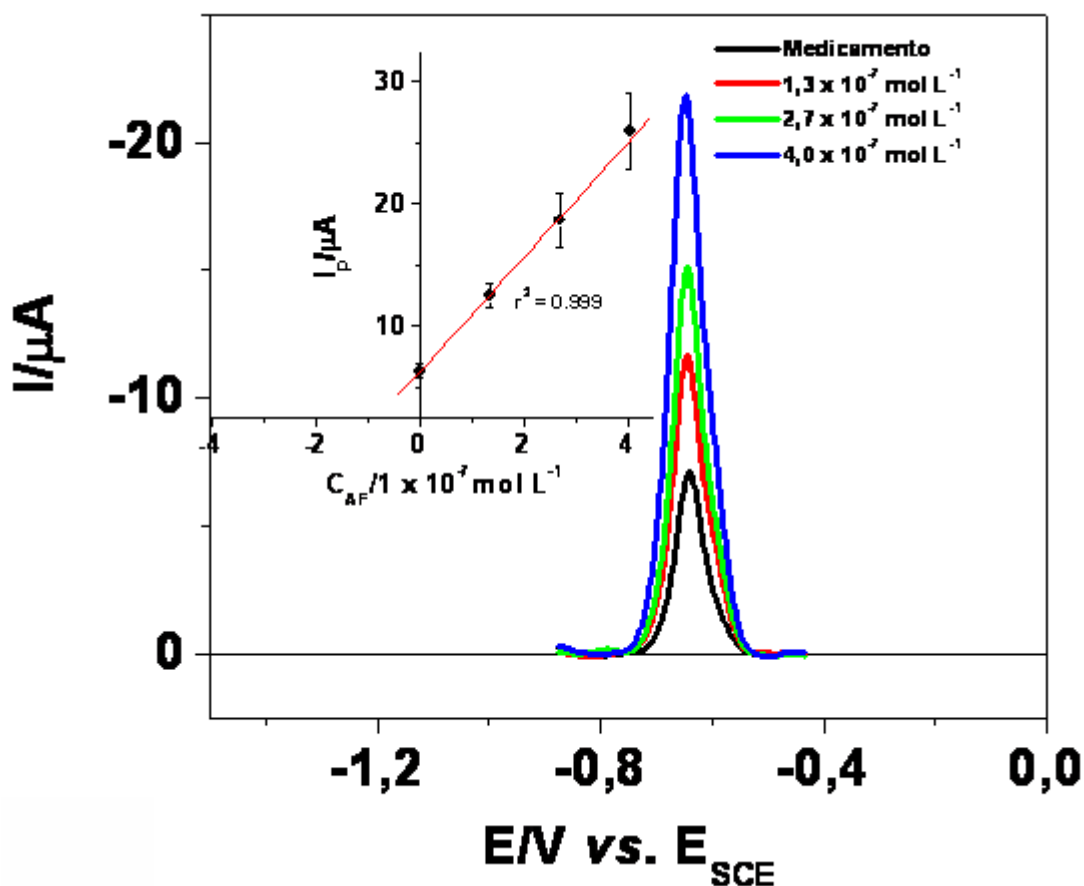


Figura 25 - a) Voltamogramas SWAdSV para o fármaco FAF II, variando-se a C_{FA} ($1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$, $4,07 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹), solução tamponante fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹, pH 5,6. **b)** Curva de adição de padrão, relação $I_p \times C_{FA}$. Eletrodo de trabalho: AgSIE, $f = 200$ s⁻¹, $a = 50$ mV, $\Delta E_i = 2$ mV, $t_{acc} = 30$ s e $E_{acc} = -0,1$ V, vs. E_{sce}. $Y = 6,08261 \times 10^{-6} + 48,68342X$; $n=5$ ($R^2=0,9989$)

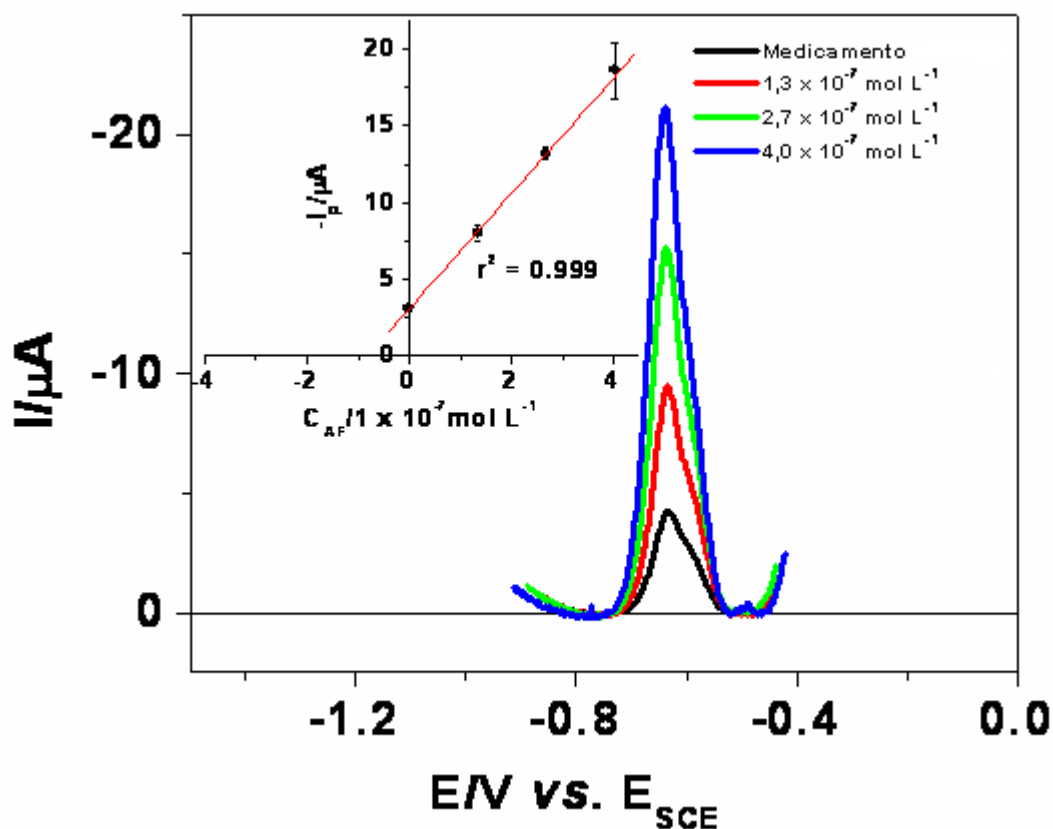


Figura 26 - a) Voltamogramas SWAdSV para o fármaco multivitamínico **FAF III**, variando-se a C_{FA} ($1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$, $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6. **b)** Curva de adição de padrão, relação $I_p \times C_{\text{FA}}$. Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}$, vs. E_{sce} . Inserido curva de recuperação: $Y = 2,946 \times 10^{-6} + 38,65796X$; $n=5$ ($R^2 = 0,9947$)

Tabela 6. Teste de recuperação do ácido fólico em fármacos por SWAdSV/AgSIE

Fármaco (tablete)	C_{FA} orig. (mg)	C_{FA} det. (mg)	R (%) ± S_{relativo}****
FAF I *	5,0	4,90 ± 0,10	98,40 ± 2,70
FAF II **	5,0	4,99 ± 0,15	99,95 ± 2,99
FAF III***	0,25	0,24 ± 0,03	99,47 ± 1,54

*fármaco 1 de ácido fólico; ** fármaco 2 de ácido fólico;

***fármaco multivitamínico de ácido fólico, n= 5; S_{relativo} = desvio padrão relativo.

C_{FA} orig. (concentração de ácido fólico original; C_{FA} det. (concentração de ácido fólico determinado).

4.2.2.5 Determinação de Ácido Fólico em Suco de Fruta

O ácido fólico presente em sucos de frutas *in natura* e industrializados foi determinado empregando-se o método de adição de padrão previamente validado para o **FA** padrão e a aplicação do método a fármacos.

Para a obtenção dos voltamogramas de **SWAdSV**, 5,00 mL do filtrado de suco de fruta foi diluído pela adição à célula contendo 5,00 mL de eletrólito de suporte (pH 5,6), e procedeu-se a adição de volumes de 30 µL de uma solução de **FA** padrão de concentração C_{FA} padrão= 45,31 µmol L⁻¹ para cada análise voltamétrica, já mencionado anteriormente.

Os voltamogramas de **SWAdSV** obtidos sob eletrodo **AgSIE** e suas respectivas curvas analíticas de algumas amostras de sucos de frutas investigados tais como: pêssigo, lima pérsia, abacaxi, maçã, maracujá, caju e morango, estão representados nas **Figuras: 27-a à 34-a**. As curvas de adição de padrão I_p x C_{FA} estão sendo representadas pelas **Figuras: 27-b à 34-b**.

Nas **Figuras 36 e 37** podemos observar os voltamogramas e as respectivas curvas de adição de padrão para a quantificação do **FA** nas amostras *in natura*, de

acerola e abacaxi pérola, respectivamente. Os voltamogramas das **Figuras 35 e 36** foram obtidos empregando-se eletrodo de amálgama dentário (**AD**), para a comparação com os voltamogramas obtidos empregando o eletrodo **AgSIE** uma vez que, se poderia esperar diferenças no perfil voltamétrico.

Na **Figura 37** ficou evidenciado a presença de perfis diferenciados, obtidos para a amostra de suco de abacaxi *in natura* empregando os eletrodos **AgSIE** e de amálgama dentário (**AD**). O eletrodo de amálgama dentário é constituído da seguinte composição química em percentual: 54% de mercúrio, 33% de prata, 10% de cobre, 2% de zinco e 1% de estanho.

Observa-se a partir da comparação que o pico referente ao **FA** obtido sobre eletrodo de **AD** encontra-se deslocado para potenciais mais anódicos, com máximo de corrente em $E_p = -0,390$ V em comparação com o mesmo sinal obtido sobre eletrodo **AgSIE** ($E_{m\acute{a}x.} = -0,574$ V).

Da mesma forma, os valores de corrente de pico apresentam-se diferentes, sendo a corrente de pico observada para o **FA**, em **AgSIE**, 15 % superior a determinada a partir do eletrodo de **AD**. Por outro lado, a desconvolução do voltamograma obtido para o **FA** sobre eletrodo de **AD** apresentou a existência de um segundo pico ($E_{pico} = -0,290$) superposto ao pico principal do **FA**, não observado para o sistema em estudo empregando-se o eletrodo **AgSIE**.

Uma observação mais detalhada dos voltamogramas permite evidenciar as diferenças no perfil das curvas para a região catódica de potenciais, acima de $E_p = -0,700$ V. Para esta região o voltamograma obtido em eletrodo **AgSIE** apresenta um pico de baixa intensidade com $E_p = -0,860$ V, com intensidade de corrente de pico aproximadamente igual à observada para o sinal, evidenciado pela desconvolução, posicionado em $-0,290$ V.

A presença dos sinais para os picos de baixa intensidade, presentes em $E_p = -0,290$ e $E_p = -0,860$ V, permitem sugerir que, o eletrodo **AgSIE** demonstrou uma melhor separação destes picos, os quais podem estar relacionados ao processo de adsorção de alguma substância constituinte da amostra.

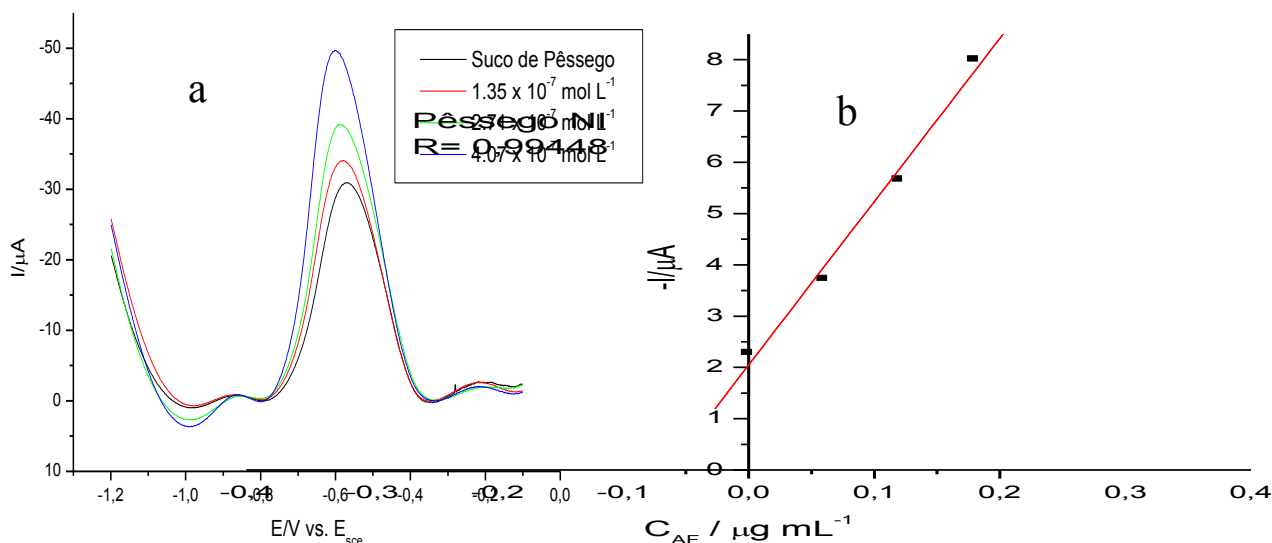


Figura 27 - a) Voltamogramas de **SWAdSV** do suco de **pêssego industrializado**, solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$ e $E_{acc} = -0,1 \text{ V vs. } E_{sce}$. Inserido curva de recuperação: $Y = 1,02500 + 15,91667X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99448$)

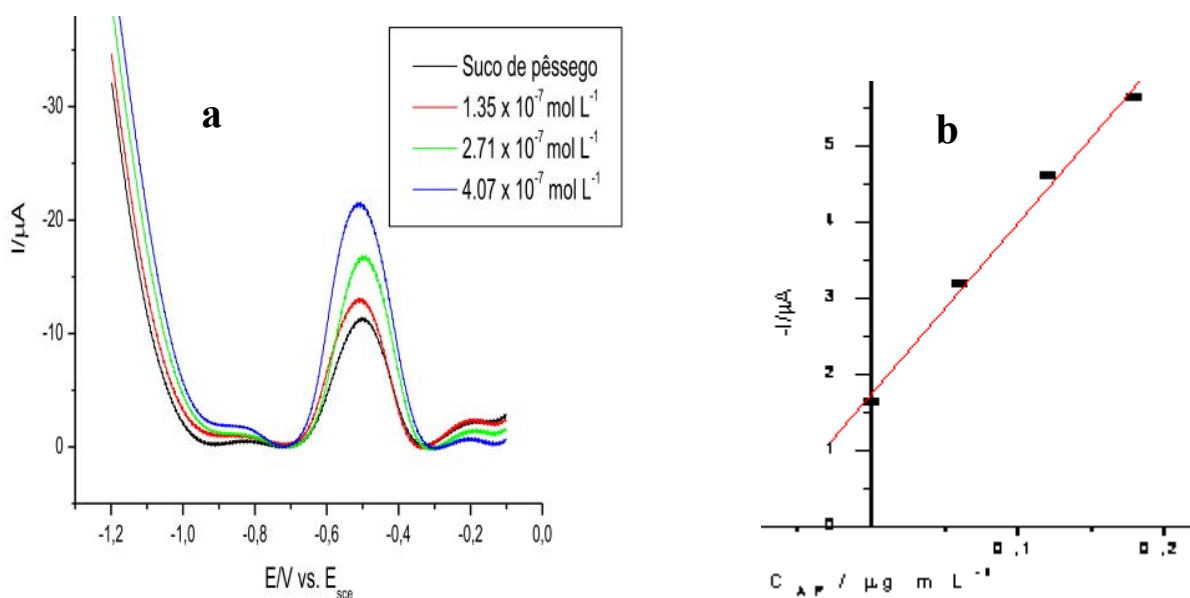


Figura 28 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **pêssego in natura**, solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$ e $E_{acc} = -0,1 \text{ V vs. } E_{sce}$. Inserido curva de recuperação: $Y = 0,86984 + 11,18852X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99581$)

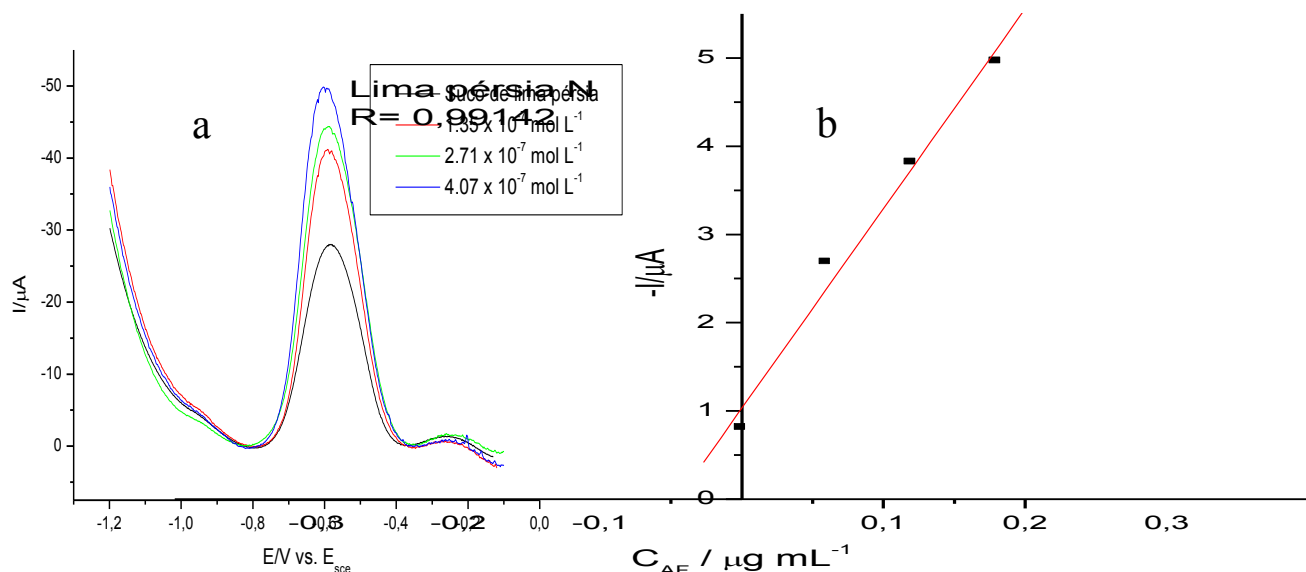


Figura 29 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **lima pérsia in natura**, solução tamponante fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,135; 0,271 e 0,407 μ mol L⁻¹). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200$ s⁻¹, $a = 50$ mV, $\Delta E_i = 2$ mV, $t_{acc} = 30$ s e $E_{acc} = -0,1$ V vs. E_{sce} . Inserido curva de recuperação: $Y = 1,02832 + 22,65827X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99142$)

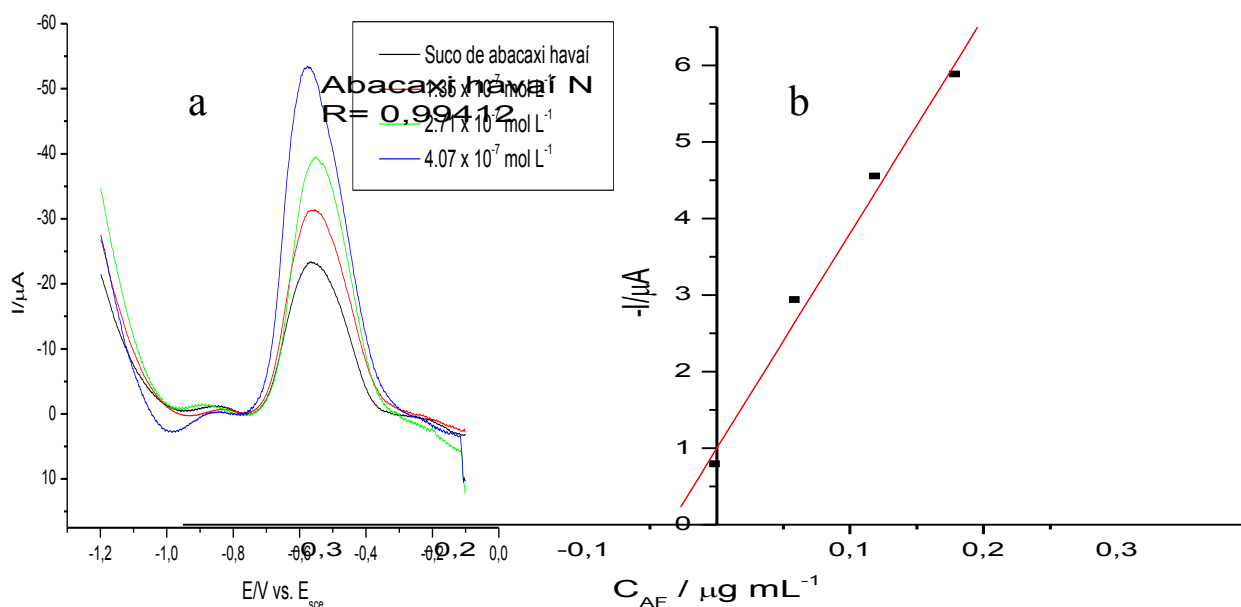


Figura 30 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **abacaxi havaí in natura**, solução tamponante fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,135; 0,271 e 0,407 μ mol L⁻¹). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200$ s⁻¹, $a = 50$ mV, $\Delta E_i = 2$ mV, $t_{acc} = 30$ s e $E_{acc} = -0,1$ V vs. E_{sce} . Inserido curva de recuperação $Y = 1,13185 + 17,10085X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99412$)

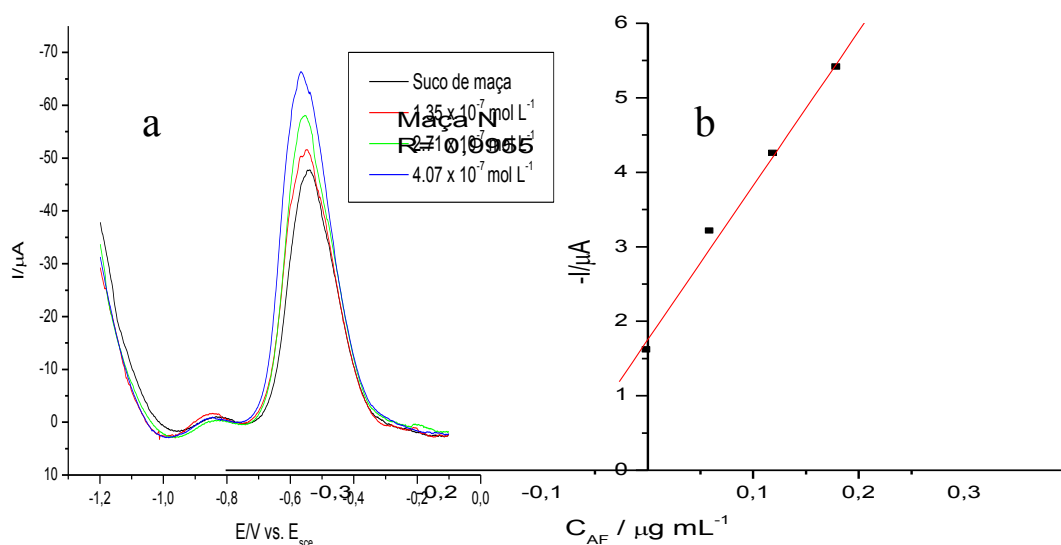


Figura 31 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **maçã in natura**, solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH 5,6**; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{\text{FA}}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V vs. } E_{\text{sce}}$. Inserido curva de recuperação: $Y = 0,87458 + 10,36293X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99550$)

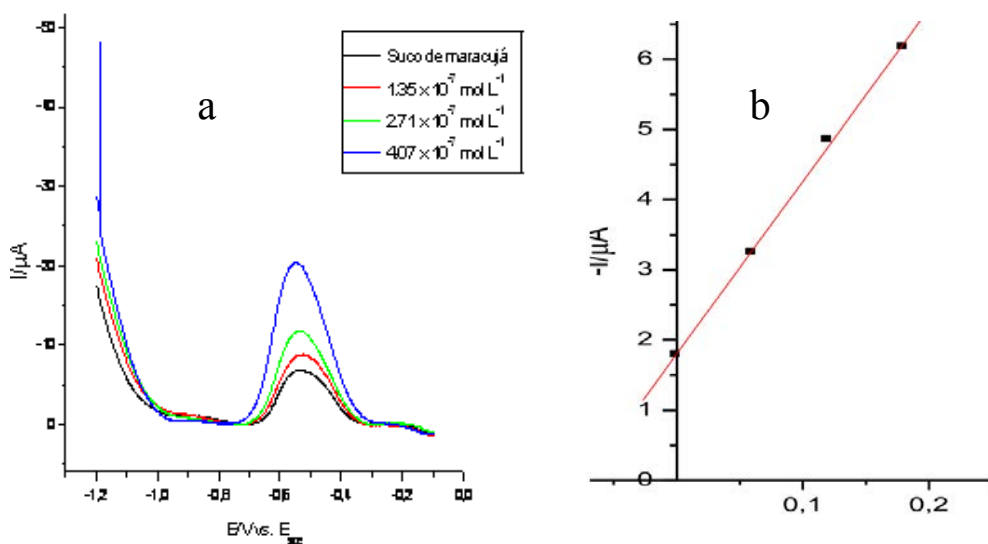


Figura 32 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **maracujá industrializado**, solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH 5,6**; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{\text{FA}}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V vs. } E_{\text{sce}}$. Inserido curva de recuperação: $Y = 0,90053 + 12,30217X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99938$)

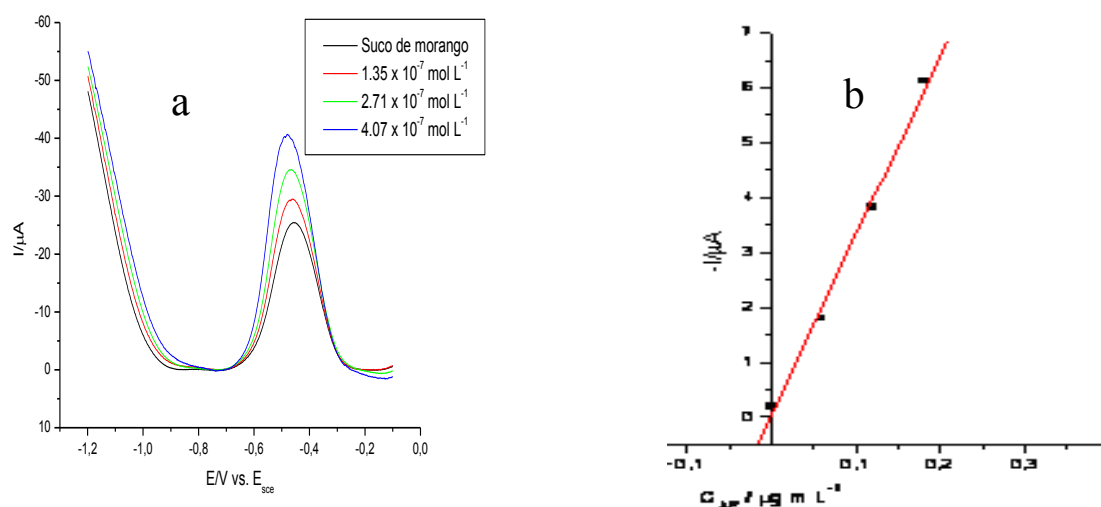


Figura 33 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **morango industrializado**, solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$ e $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, v_s . E_{sce} . Inserido curva de recuperação: $Y = 0,00557 + 16,52259X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99698$)

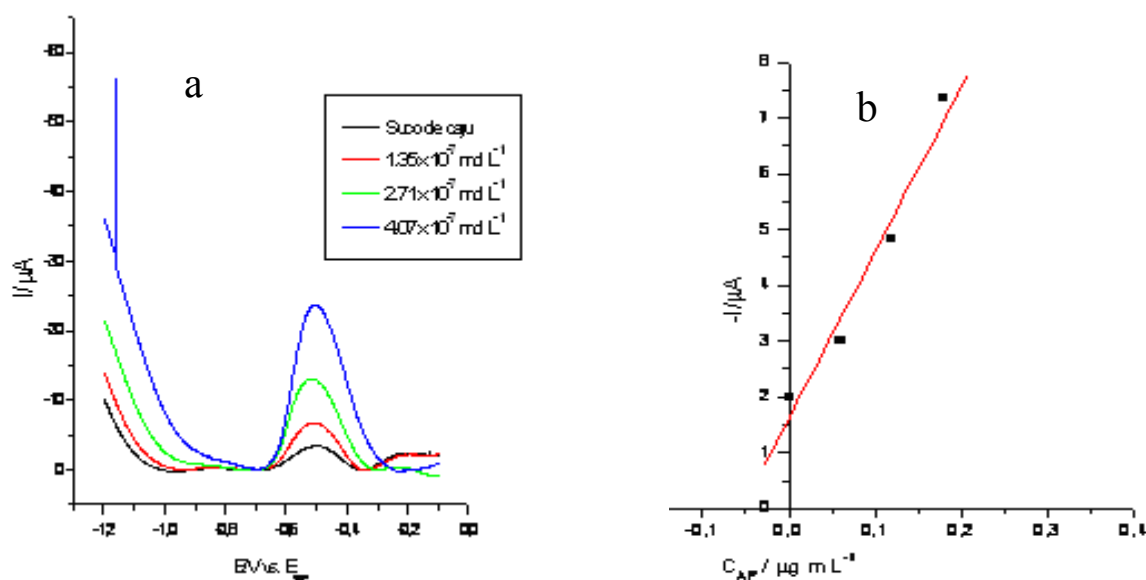


Figura 34 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **caju industrializado**, solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AgSIE**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$ e $E_{acc} = -0,1 \text{ V}$, v_s . E_{sce} . Inserido curva de recuperação: $Y = 0,16211 + 2,97926X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,98279$)

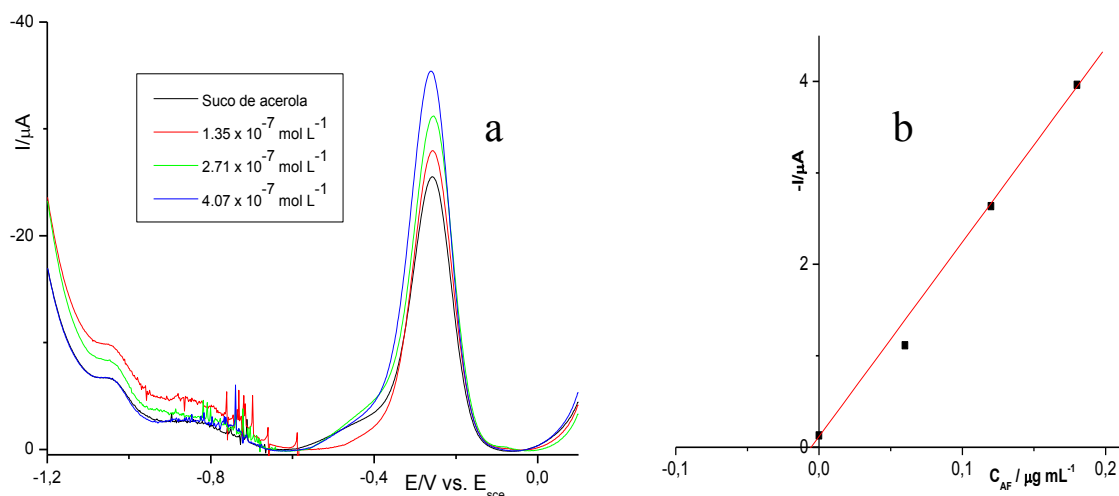


Figura 35 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **acerola *in natura***, obtidos sobre eletrodo de AMÁLGAMA DENTÁRIO (**AD**), solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AD**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$ e $E_{acc} = -0,1 \text{ V vs. } E_{sce}$. Inserido curva de recuperação: $Y = 0,00325 + 10,85409X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99674$)

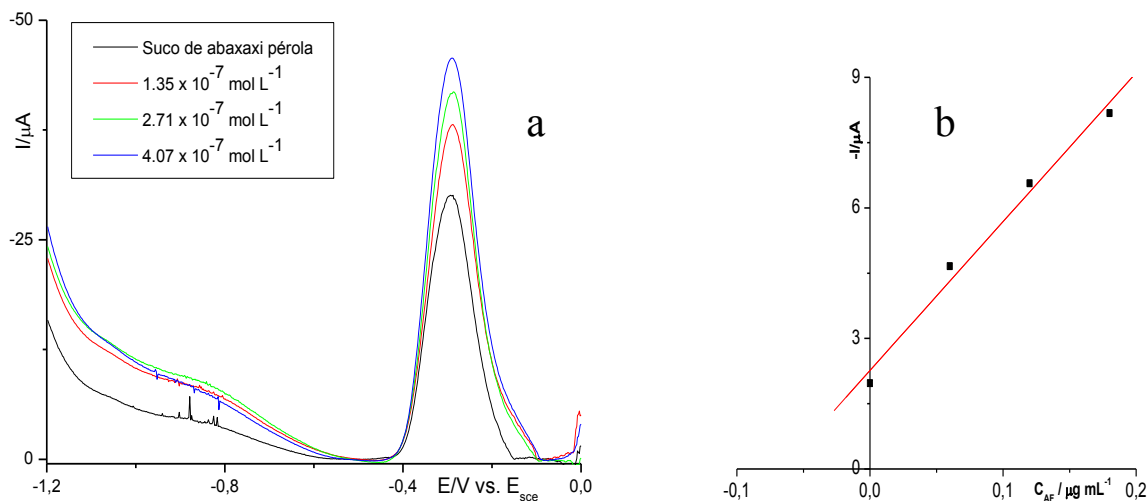


Figura 36 - a) Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **abacaxi pérola *in natura***, obtidos sobre eletrodo de AMÁLGAMA DENTÁRIO (**AD**), solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6; **b)** Curva de adição de padrão $I_p \times C_{FA}$ $1,35 \times 10^{-7}$, $2,71 \times 10^{-7}$ e $4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,135$; $0,271$ e $0,407 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrodo de trabalho: **AD**, $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{acc} = 30 \text{ s}$ e $E_{acc} = -0,1 \text{ V vs. } E_{sce}$. Inserido curva de recuperação: $Y = 0,49686 + 14,07548X$; $n = 5$ ($R^2 = 0,99284$)

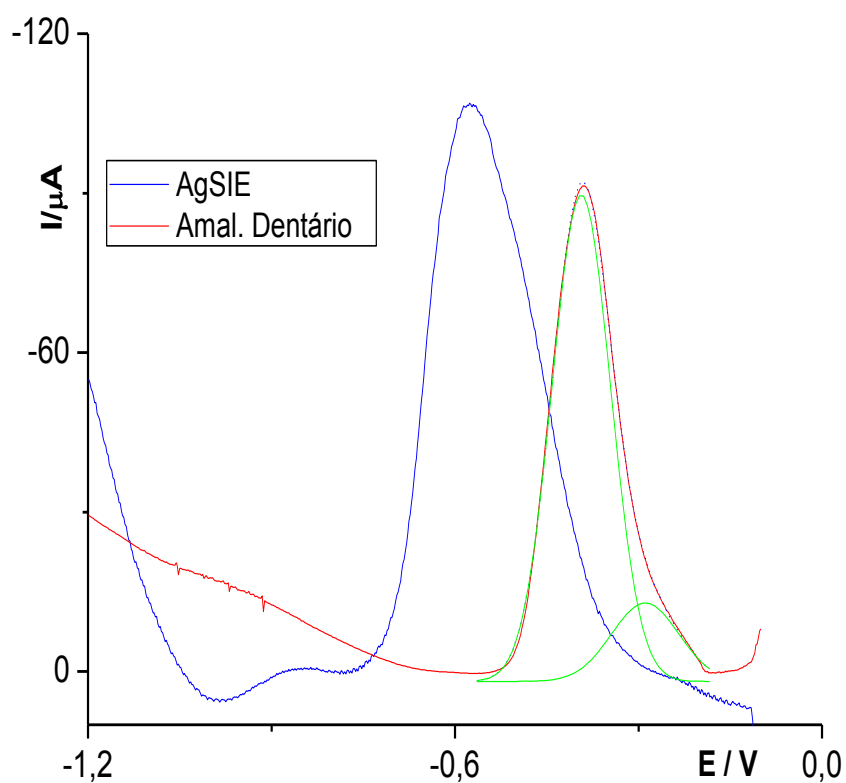


Figura 37 - Voltamogramas **SWAdSV** do suco de **abacaxi pérola *in natura*** obtidos sobre eletrodo de **a) AMALGAMA DENTÁRIO (AD)** (curva vermelha); **b) AgSIE** (curva azul); e **c)** curvas resultantes da desconvolução (curvas verdes). Eletrólito: solução tamponante fosfato de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, **pH** 5,6, $C_{\text{FA}} = 4,07 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,407 \mu\text{mol L}^{-1}$), $f = 200 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_i = 2 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} = 30 \text{ s}$ e $E_{\text{acc}} = -0,1 \text{ V}_{\text{vs. } E_{\text{sce}}}$.

Uma comparação dos voltamogramas obtidos para as diferentes amostras de sucos de frutas analisados empregando-se a SWAdSV/AgSIE, permitiu observar que os perfis voltamétricos não são exatamente iguais. Este comportamento, possivelmente, deve-se às características originais de cada fruta, dando origem a diferentes espécies químicas presentes na solução, constituindo assim, uma matriz complexa em comparação à matriz do fármaco. A **Tabela 7** mostra as concentrações e o desvio padrão relativo de ácido fólico obtidos para diversos sucos de frutas *in natura* e industrializados, aplicando-se o método em estudo.

Tabela 7. Concentrações de ácido fólico em sucos de frutas *in natura* e industrializados, obtidas com a metodologia SWAdSV/AgSIE

Sucos de Frutas	r^2 (Y= A + B X)	$[C_{FA}=\mu\text{g L}^{-1}]^* s_{\text{relativo}}^*$
Pêssego NI	0,9945 (Y= 1,02500 + 15,91667X)	64,4 ± 0,5
Pêssego N	0,9958 (Y= 0,86984 + 11,18852X)	77,7 ± 0,4
Lima Pérsia N	0,9914 (Y= 1,02832 + 22,65827X)	45,4 ± 0,7
Abacaxi Hawai N	0,9941 (Y= 1,13185 + 17,10085X)	66,2 ± 0,4
Maça N	0,9955 (Y= 0,87458 + 10,36293X)	84,4 ± 0,5
Maracujá NI	0,9994 (Y= 0,90053 + 12,30217X)	73,2 ± 0,3
Morango NI	0,9970 (Y= 0,00557 + 16,52259X)	≤ LD
Cajú NI	0,9828 (Y= 0,16211 + 2,97926X)	54,4 ± 0,5
Acerola N **	0,9967 (Y= 0,00325 + 10,85409X)	≤ LD
Abacaxi Pérola N **	0,9928 (Y= 0,49686 + 14,07548X)	35,3 ± 0,6

N : suco de fruta *in natura*; NI: suco de fruta industrializado; * n= 5 repetições;
 Sucos de frutas **: aplicação de Eletrodo Dentário (AD).

Analisando os resultados da **Tabela 7**, as concentrações (35,3 a 84,4) $\mu\text{g L}^{-1}$ e menores concentrações (0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$) de ácido fólico dos sucos de acerola e morango, por serem sucos de frutas mais sensíveis comparada às demais analisadas, podem ter perdido parte da vitamina, durante o preparo da amostra.

Os resultados estes, mostrados na **Tabela 7** são comparáveis aos apresentados por Bandzuchová *et al.*, 2011 [43, 44] para suco Hello Viva, $1,046 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \pm 4,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($10,46 \pm 0,47$) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (RSD: 3,6%; R%: 99,9 -109,3) e suco multivitamínico TOMA, $1,076 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \pm 8,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($10,76 \pm 0,81$) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (RSD: 6,1%; R%: 99,5 -117), ambos fortificados. Xiao *et al.* (2008) [61], determinaram o FA utilizando eletrodo de nanotubo iônico de carbono. A concentração de ácido fólico obtida por determinação direta foi de ($3,25 \pm 0,01$) nM, o que corresponde a ($3,25 \times 10^{-9} \pm 1,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$) para n= 6 replicatas. As determinações realizadas por fortificação, C_{FA} = 5, 10 e 20 nM (5×10^{-9} , $1,0 \times 10^{-8}$ e $2,0 \times 10^{-8}$) mol L^{-1}) apresentaram valores de R%= 108,4, 98,9 e 101,7 e valores de RSD= 0,20; 0,23 e 0,30 %, respectivamente.

Vaze e Srivastava (2007, p. 1713) [62] investigaram a presença de FA em matriz de suco de laranja *in natura* utilizando o eletrodo de quimicamente modificado de calixarene preparado em pasta de carbono. A concentração do FA determinada foi de ($28,2 \pm 1,3$) $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$, RSD= 1,3 %, para n= 5 replicatas.

Os valores apresentados por Xiao *et al.* (2008) [61] e Vaze Srivastava (2007, p. 1713) [62] não foram apresentados na **Tabela 8** por não tratarem de trabalhos com eletrodos metálicos. No entanto, os valores e respectivas variações estão em concordância com os resultados apresentados neste trabalho.

Com base na literatura, pode-se observar na **Tabela 8**, a aplicação de técnicas voltamétricas com eletrodos sólidos metálicos modificados ou não, utilizados na determinação de ácido fólico, onde podemos comparar os limites de detecção calculados das respectivas pesquisas.

Tabela 8. Comparação de **eletrodos metálicos modificados ou não**, na determinação de ácido fólico

Técnica	Eletrodo	Eletrólito	pH	Amostra	LD (mol L⁻¹)	Referência
CV	Au/2-mercaptobenzo-thiazole (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	7,4	FA Fármaco	4,0 x 10 ⁻⁹	[63] ²⁰⁰²
CV	C/Au (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	2,5	FA Fármaco	1,0 x 10 ⁻⁸	[64] ²⁰⁰⁶
SWV / AdSV	C/filme de Pb (redução)	Tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹)	5,6	FA Fármaco	7,0 x 10 ⁻¹⁰	[28] ²⁰⁰⁷
CV Cron.	C/ions de Ni II/ Poly(o-anisidine) (oxidação)	Ácido sulfúrico (0,1 mol L ⁻¹)	-	FA Fármaco	9,1 x 10 ⁻⁵	[29] ²⁰⁰⁹
CV / DPV	ZONMCPE (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	7,0	FA Fármaco	9,86 x 10 ⁻⁶	[35] ²⁰¹⁰
CV DPV / AdSV	<i>m</i> -AgSAE (redução)	Tampão: Acetato (0,05 mol L ⁻¹) e metanol (9:1).	5,0	FA Fármaco Suco de fruta	0,5 x 10 ⁻⁹	[43] ²⁰¹¹
CV DPV / AdSV	<i>p</i> -AgSAE (redução)	Tampão acetato (0,05 mol L ⁻¹)	5,0	FA Fármaco Suco de fruta	5,88 x 10 ⁻¹⁰	[44] ²⁰¹¹
CV Cron. DPV	BQTMCECPE (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	8,0	FA Fármaco	3,0 x 10 ⁻⁷	[36] ²⁰¹¹
CV DPV /AdSV AdSV	HMDE (redução)	Tampão fosfato (0,2 mol L ⁻¹)	7,1	FA Fármaco	1,4 x 10 ⁻⁸	[65] ²⁰¹²
CV Cron. SWV	(AuNPs/CPE) (oxidação)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	6,5	FA	2,7 x 10 ⁻⁸	[40] ²⁰¹³
SWAdSV	(Ag ₂ Hg _{3,02} (AgSIE) (redução)	Tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹)	5,6	FA Fármaco Suco de fruta	6,79 x 10 ⁻¹⁰	This work

CV – Voltametria Cíclica; DPV – Voltametria de Pulso Diferencial; Cron.: Cronoamperometria
 SWV – Voltametria de Onda Quadrada; AdSV – Voltametria Adsorbtiva de Redissolução.
 SWAdSV : Voltametria de onda quadrada adsorbtiva de redissolução;

Diante da literatura, os métodos eletroanalíticos associados a eletrodos modificados para a determinação de ácido fólico, têm mostrado que, a maioria dos mesmos são processos de oxidação. Os eletrodos metálicos modificados ou não, têm demonstrado eficiência na sensibilidade para determinar a vitamina, mediante a **Tabela 8**, onde, os limites de detecções estão na faixa de $9,1 \times 10^{-5}$ a 7×10^{-10} mol L⁻¹, ressaltando que, o método aplicado neste trabalho **SWAdSV / AgSIE** (LD= $6,79 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹), respondeu a excelente sensibilidade.

4.3 Aplicação Cromatográfica na Determinação do Ácido Fólico

A determinação cromatográfica do ácido fólico foi realizada após os experimentos desenvolvidos para avaliar os parâmetros de otimização do sistema. Foram otimizados: coluna RP-18 (octadecil –ODS-C₁₈), fluxo 0,5 mL min⁻¹, volume injetado (20 µL), detecção (UV-Vis) a λ 280 nm, fase móvel (10% de acetonitrila e 90% de solução acidificada (0,166 mol L⁻¹ H₃CCOH + 0,01 mol L⁻¹ KOH, pH 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos, foram mantidas às mesmas condições iniciais.

4.3.1 Espectro de Absorbância e Cromatograma do Ácido Fólico

O espectro de absorbância na região UV-vis (280 nm) do ácido fólico está representado na **Figura 38-a** e o cromatograma do ácido fólico padrão na **Figura 38-b**. Estes resultados foram determinados numa concentração de C_{FA}= 20 µg mL⁻¹ ($4,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), sendo o tempo de retenção do ácido fólico observado a partir do cromatograma, de aproximadamente 8 minutos.

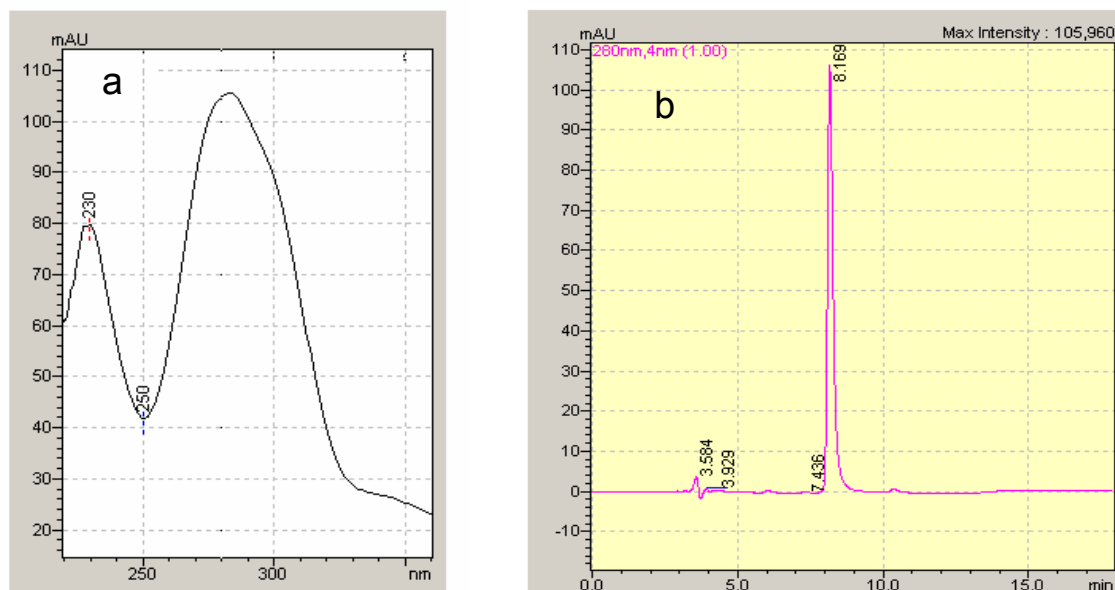


Figura 38 - (a) Espectro UV-Vis de FA, $\lambda_{\text{máx.}}$ 280 nm, $[C_{\text{FA}}] = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$; **(b)** Cromatograma do FA_{padrão}, ($C_{\text{FA}} = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $t_{\text{R}} = 8 \text{ min}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado 20 μL , fluxo 0,5 mL min^{-1} . Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada (0,166 mol L^{-1} H_3CCOH + 0,01 mol L^{-1} KOH, pH 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

4.3.2 Curva Analítica de Ácido Fólico em HPLC

O limite de detecção foi calculado pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, de acordo com a equação ($\text{LD} = 3 \times S/\theta$) e para o limite de quantificação aplicou-se ($\text{LQ} = 10 \times S/\theta$), sendo S o desvio padrão e θ , o coeficiente angular da curva analítica.

A curva analítica do ácido fólico foi obtida com as concentrações de C_{AF} : $1,41 \times 10^{-6}$; $2,83 \times 10^{-6}$; $5,66 \times 10^{-6}$; $1,13 \times 10^{-5}$; $2,26 \times 10^{-5}$ e $4,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (0,625; 1,25; 2,50; 5,00; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), $n = 3$, como mostra a **Figura 39**. A curva analítica apresentou linearidade ($R^2 = 0,99967$) e determinou-se

LD= $8,38 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($3,7 \times 10^{-2} \mu\text{g mL}^{-1}$) e **LQ**= $2,49 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,10 \times 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$).

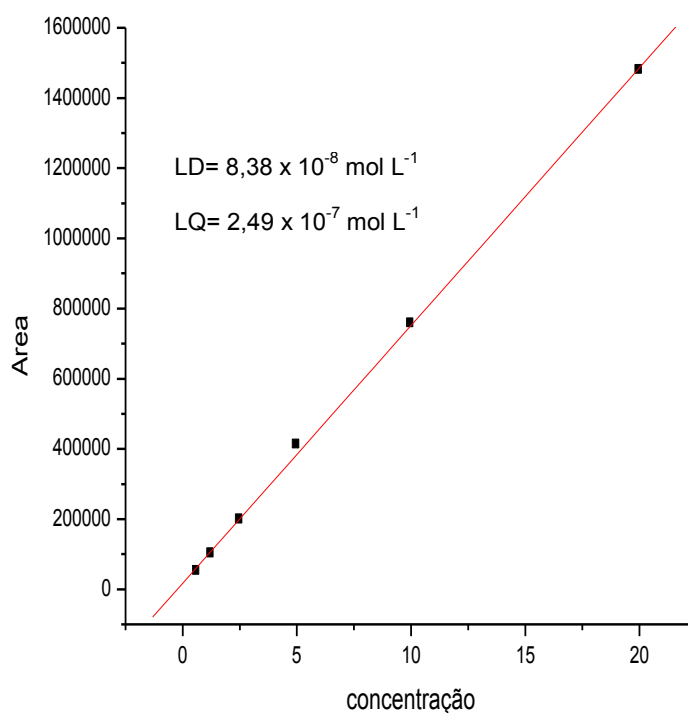


Figura 39 - Curva Analítica do FA padrão, nas concentrações de: (0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$), $t_R = 8 \text{ min}$, coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a $\lambda_{\text{máx}}$ 280 nm, volume injetado $20 \mu\text{L}$, fluxo $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, **pH** 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais. $Y = 16920,58209 + 73477,32082 X$ ($R^2 = 0,99967$)

4.3.3 Determinação de Ácido Fólico em Fármaco

A determinação quantitativa do FA em fármacos e em sucos de frutas foi baseada no método do padrão externo, construindo-se um gráfico a partir da correlação da área geométrica do pico (A_g) vs. C_{FA} , utilizando-se a equação da reta

($Y = A + BX$), sendo que, os valores de A e B foram determinados a partir da regressão linear dos pontos da curva analítica, sendo Y o valor da média da área de pico do analito, e o valor de X, a concentração do analito determinada para cada amostra analisada.

Os cromatogramas de ácido fólico provenientes das amostras de fármacos **FAFI** de $C_{FA} = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e **FAFI**, **FAFII** e **FAFIII** de $C_{FA} = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ estão representados nas **Figuras 40 a 43**.

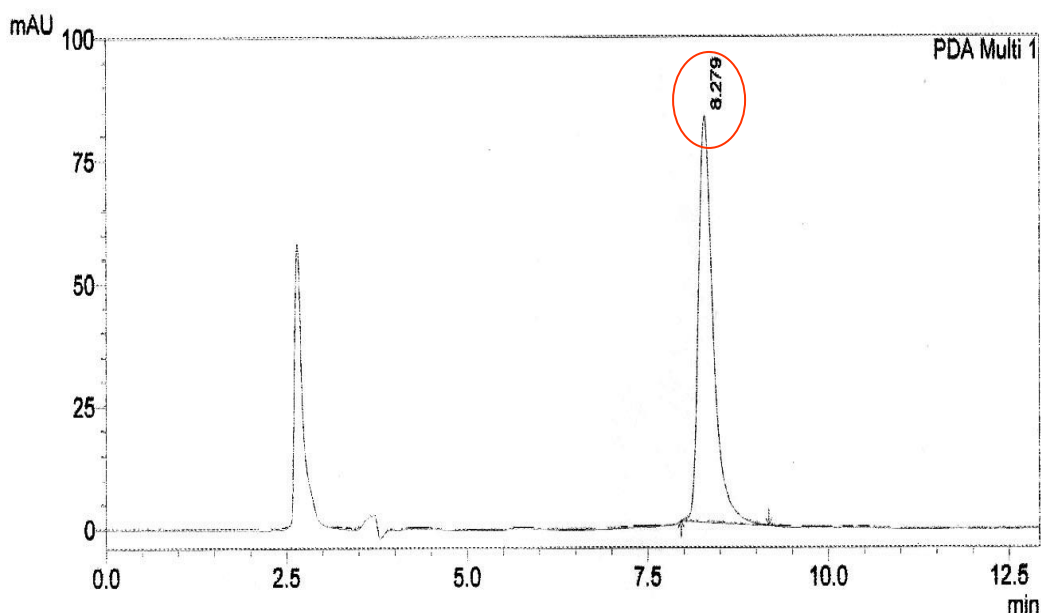


Figura 40 - Cromatograma: **FAFI** de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($t_R = 8 \text{ min}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6 mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado 20 μL , fluxo 0,5 mL min^{-1} . Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada (0,166 mol L^{-1} H_3CCOH + 0,01 mol L^{-1} KOH, **pH** 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

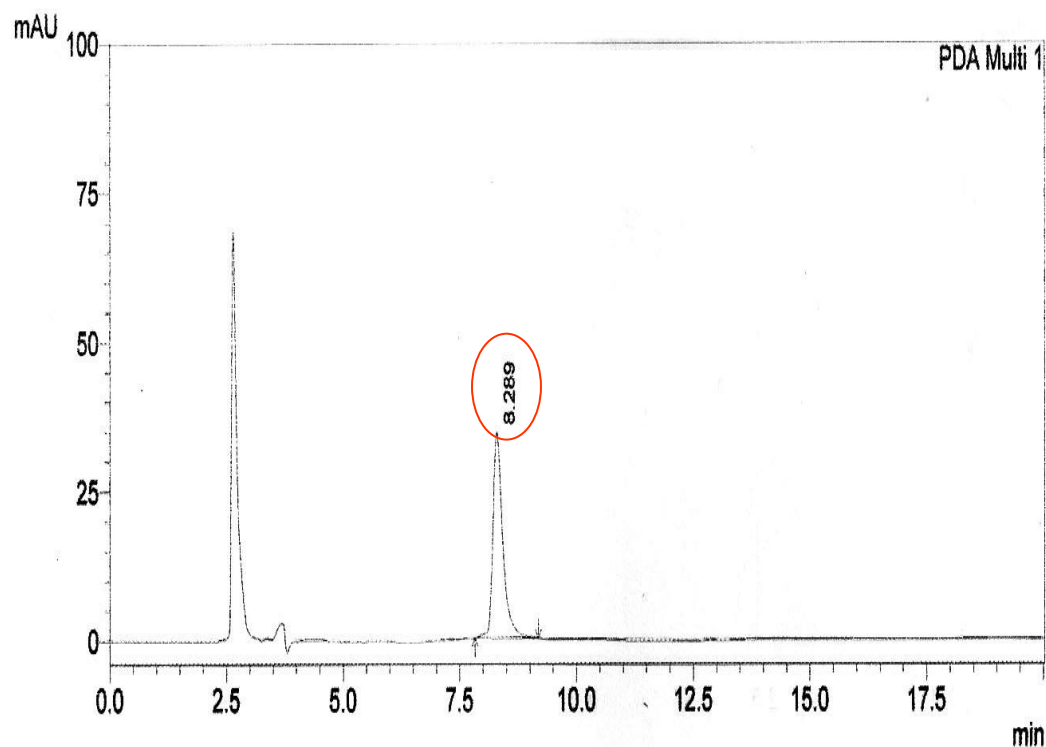


Figura 41 - Cromatograma: **FAFI** de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($t_R = 8 \text{ min}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado $20 \mu\text{L}$, fluxo $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, **pH** 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

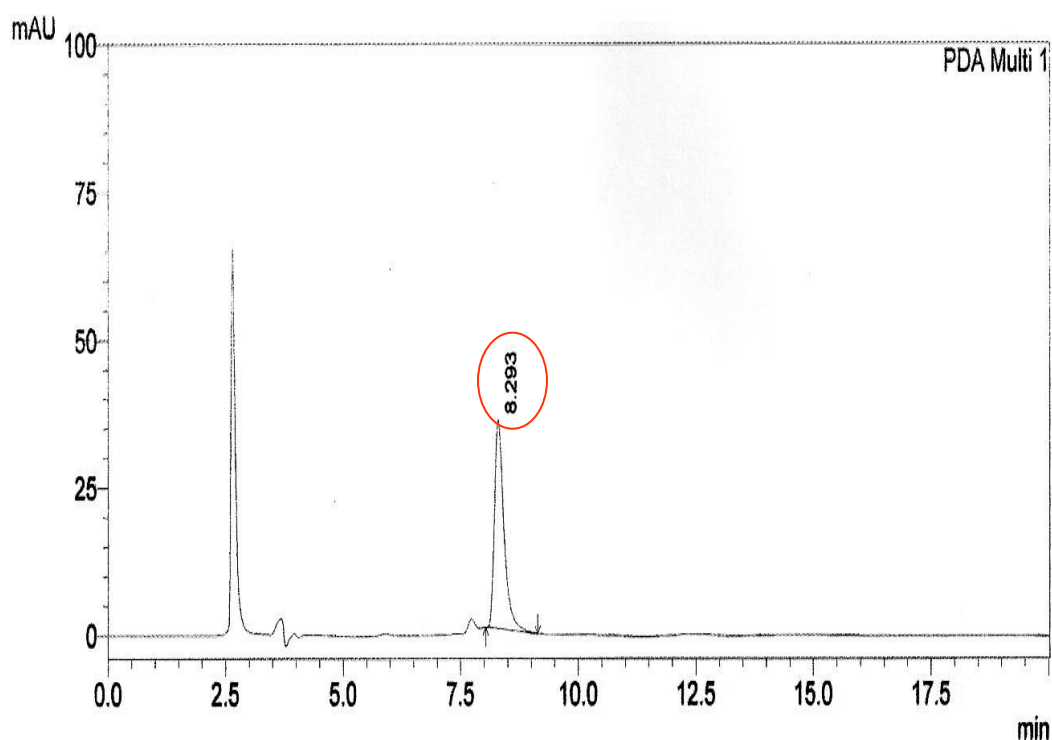


Figura 42 - Cromatograma: **FAFII** de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($t_R = 8 \text{ min}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado $20 \mu\text{L}$, fluxo $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, pH 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

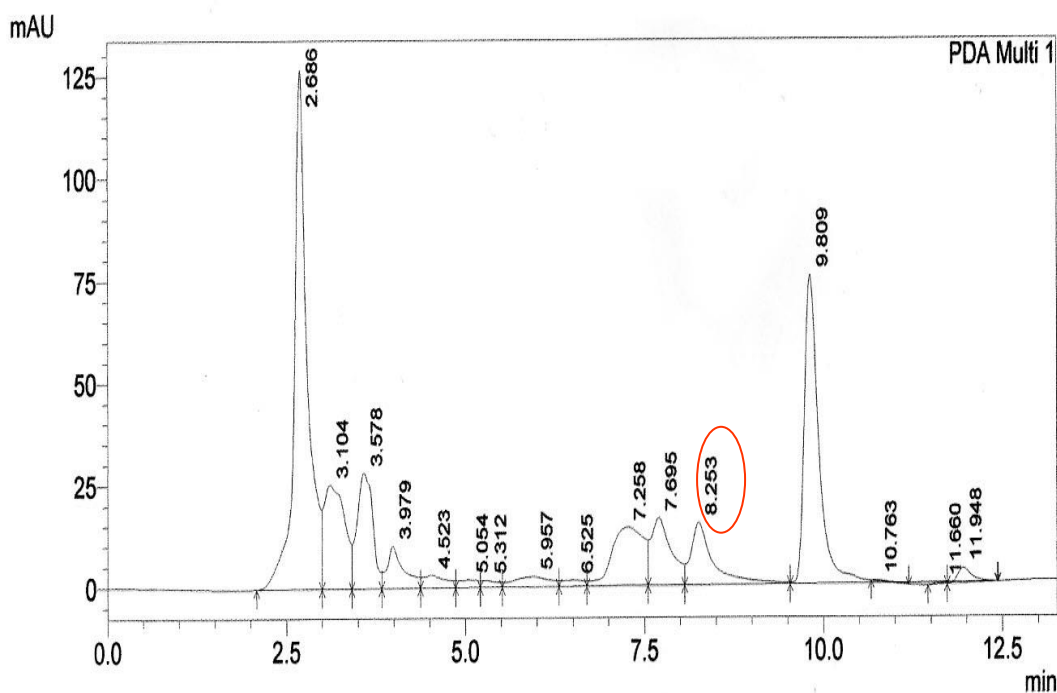


Figura 43 - Cromatograma: Multivitamínico **FAF III** de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($t_R = 8 \text{ min}$), coluna ODS-**C₁₈**, (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado 20 μL , fluxo 0,5 mL min^{-1} . Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada (0,166 mol L^{-1} H_3CCOH + 0,01 mol L^{-1} KOH, **pH** 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

Os resultados dos cálculos para a recuperação (%) do ácido fólico para o fármaco **FAFI**, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; para **FAFII** e **FAFIII** nas concentrações de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estão representados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Teste de recuperação aparente de ácido fólico em fármacos com a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC.

Fármaco	[C _{FA adic.}] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A _{Pico} FA	[C _{FA calc.}] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R (%) $\pm$ S _{relativo} ****
FAF I *	10	817658	10,89	109,00 $\pm$ 0,10
FAF I	05	433578	5,67	113,41 $\pm$ 0,19
FAF II **	05	343846	4,44	89,00 $\pm$ 0,23
FAF III***	05	327636	4,22	84,57 $\pm$ 0,25

* (fármaco 1 de ácido fólico); ** (fármaco 2 de ácido fólico); ****; n= 3 repetições.

fármaco multivitamínico de ácido fólico. *; C_{FA calc.} = concentração de FA calculada;

A_{Pico}: área de pico (média) do FA; C_{FA adic.} = concentração de FA adicionada.

R% = recuperação em porcentagem; S_{relativo} = Desvio padrão relativo.

O método utilizado com a aplicação da técnica cromatográfica de **HPLC** para determinação quantitativa de ácido fólico em fármacos, demonstrou-se satisfatória quando aplicada em solução de fármaco contendo dois níveis de concentração (5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fornecendo os valores de **R%_{FAFI}** = 113,4 $\pm$ 0,19 e **R%_{FAFI}** = 109,0 $\pm$ 0,1 respectivamente, **R%_{FAFII}** = 89,0 $\pm$ 0,23 e para **R%_{FAFIII}** = 84,5 $\pm$ 0,25 (**Tabela 9**). Para todas as amostras os valores de R% obtidos atendem ao critério aplicado $80 \leq \text{R\%} \leq 120$. **A Tabela 10** ilustra uma comparação de resultados das análises de amostras de fármacos por **SWAdSV / AgSIE e HPLC**.

Na **Tabela 10** estão representados os resultados das análises de ácido fólico em fármacos, empregando as técnicas voltamétrica (SWAdSV) e cromatográfica (HPLC), para comparação.

Tabela 10. Comparação de resultados de C_{FA} em fármaco para **SWAdSV e HPLC**

FA		SWAdSV / AgSIE		HPLC	
Fármaco (tablete)	$C_{FA\text{ orig.}}$ (mg)	$C_{FA\text{ det}}$ (mg)	$R(\%) \pm S_{\text{relativo}}$	$C_{FA\text{ det}}$ (mg)	$R(\%) \pm S_{\text{relativo}}$
FAF I *	5,0	$4,90 \pm 0,10$	$98,4 \pm 2,70$	$5,45 \pm 0,45$	$109,0 \pm 0,10$
FAF II **	5,0	$4,99 \pm 0,15$	$99,9 \pm 2,99$	$4,45 \pm 0,55$	$89,0 \pm 0,23$
FAF III***	0,25	$0,24 \pm 0,03$	$99,4 \pm 1,54$	$0,21 \pm 0,04$	$84,5 \pm 0,25$

* fármaco 1 de ácido fólico; ** fármaco 2 de ácido fólico e ***fármaco multivitamínico de ácido fólico, $n=3$
 C_{FA} Concentração de ácido fólico; $C_{FA\text{ orig.}}$ (concentração de ácido fólico original; $C_{FA\text{ det.}}$ (concentração de ácido fólico determinado); S_{relativo} = desvio padrão relativo.

Uma avaliação dos resultados representados na **Tabela 10**, permitiu que, do ponto de vista do critério de aceitação para os resultados de recuperação ($80 < R\% < 120$), os métodos apresentaram-se valores de recuperação na faixa de (98,4 - 99,9) % para eletroanalítica e para o método cromatográfico os resultados demonstraram-se na faixa de (84,5 -109,0) %. Logo, os resultados obtidos estão adequados ao critério de aceitação.

4.3.4 Determinação de Ácido Fólico em Suco de Fruta

A aplicação da do método cromatográfico para os sucos de frutas de pêsego, acerola, abacaxi e maracujá, previamente fortificados com a solução padrão de ácido fólico ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), forneceu os cromatogramas representados nas **Figuras 44 a 48**. Para a determinação quantitativa do FA em sucos de frutas utilizou-se a equação da reta ($Y = A + BX$), já mencionado em fármacos.

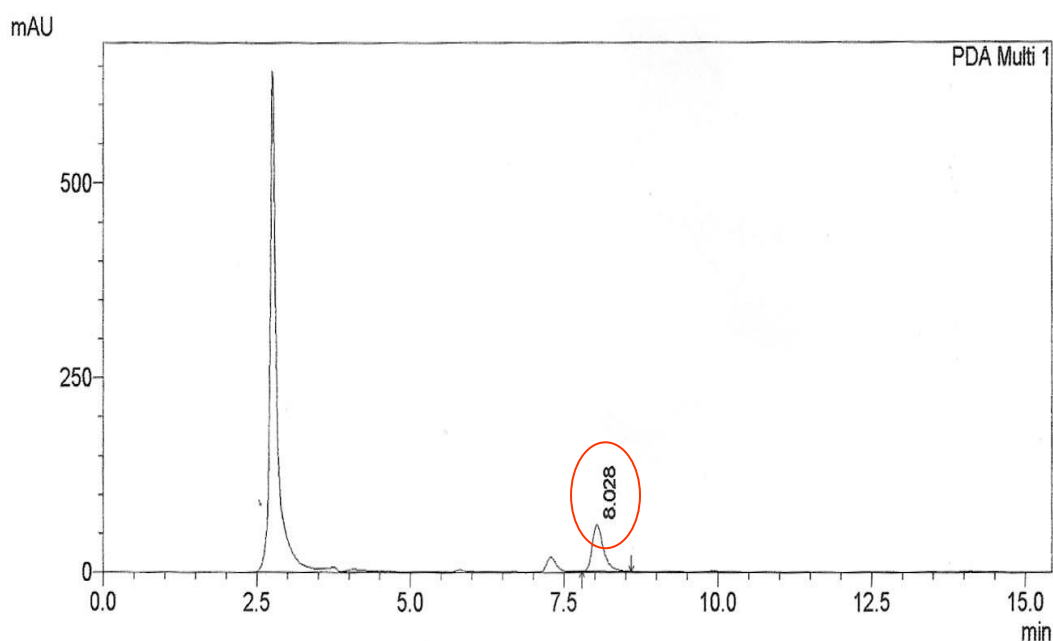


Figura 44 - Cromatograma do ácido fólico em suco de **pêssego industrializado** e fortificado ($t_R = 8 \text{ min}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado $20 \mu\text{L}$, **fluxo** $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, **pH** 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

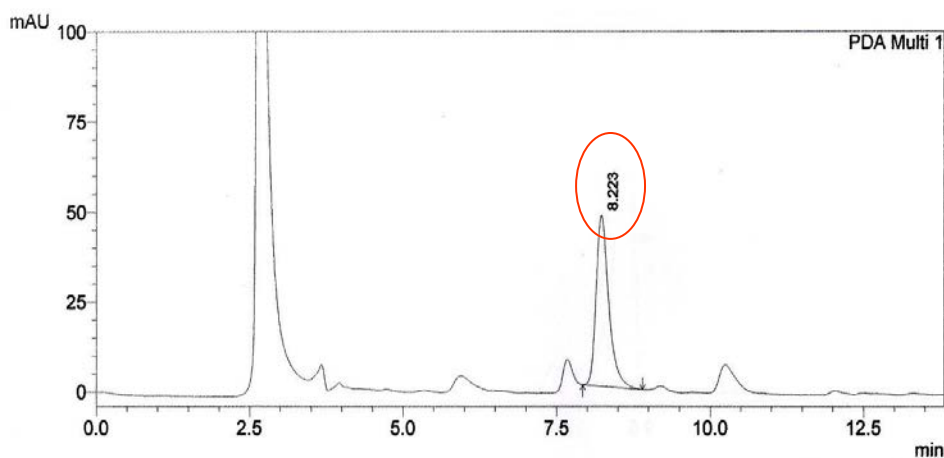


Figura 45 - Cromatograma do ácido fólico em suco de **pêssego *in natura*** e fortificado ($t_R = 8$ min, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado $20 \mu\text{L}$, fluxo $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, pH 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

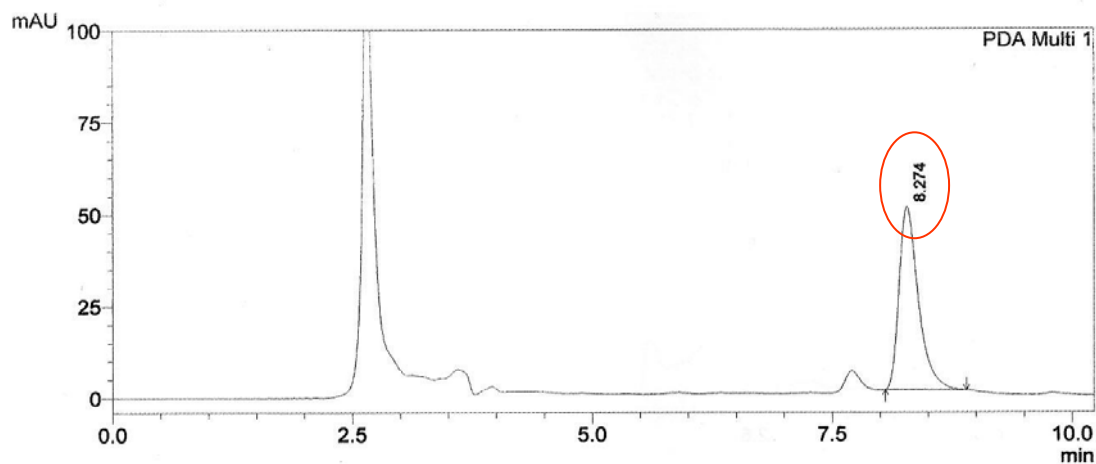


Figura 46 - Cromatograma do ácido fólico em suco de **acerola *in natura*** e fortificado, ($t_R = 8$ min, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado $20 \mu\text{L}$, fluxo $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, pH 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

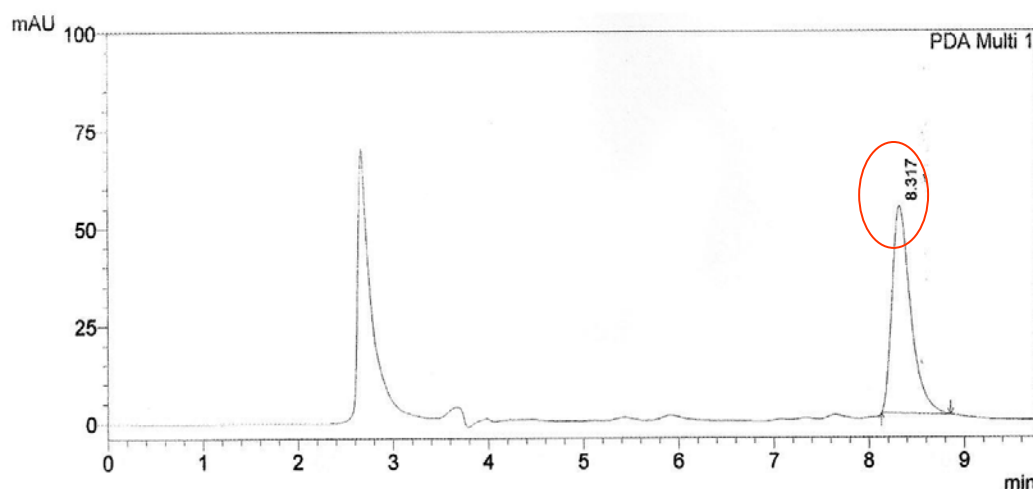


Figura 47 - Cromatograma do ácido fólico em suco de **abacaxi hawai** *in natura* e fortificado, ($t_R = 8$ min, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), , coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado 20 μL , fluxo $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, **pH** 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

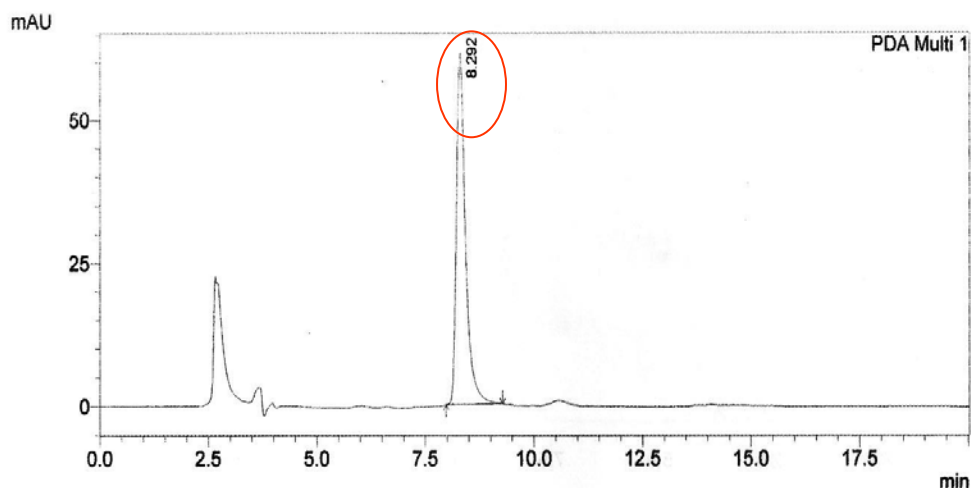


Figura 48 - Cromatograma do ácido fólico em suco de **maracujá industrializado**, fortificado, ($t_R = 8$ min, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), coluna ODS- C_{18} , (150 x 4,6) mm, detector de arranjos de diodos (UV-Vis) a λ 280 nm, volume injetado 20 μL , fluxo $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Fase móvel: 10% ACN e 90% de solução acidificada ($0,166 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{CCOH} + 0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KOH}$, **pH** 2,88), após 15 min de corrida, 24% ACN e 76% de solução acidificada (v/v) e em 5 minutos foi mantida às mesmas condições iniciais

Os resultados das amostras de sucos de frutas fortificadas e analisadas por HPLC, estão ilustrados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Concentrações de ácido fólico em sucos de frutas *in natura* e industrializados, fortificados com solução padrão ($C_{FA} = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em HPLC

Suco de Fruta	$C_{FA \text{ adic.}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$A_{\text{Pico FA}}$	$C_{FA \text{ calc.}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R (%) $\pm$ RSD
Pêssego NI	10	751658	9,99	99,9 $\pm$ 0,10
Pêssego N	10	692043	9,19	91,9 $\pm$ 0,12
Acerola N	10	694195	9,22	92,2 $\pm$ 0,12
Abacaxi Hawai N	10	727984	9,68	96,8 $\pm$ 0,11
Maracujá NI	10	892205	11,91	119,1 $\pm$ 0,09

N : suco de fruta *in natura*; NI: suco de fruta industrializado; *n= 3 repetições

$A_{\text{pico FA}}$: Média da Área de pico do ácido fólico; $C_{FA \text{ adic.}}$: Concentração de FA adicionado.

$C_{FA \text{ calc.}}$: Concentração de FA calculado

O procedimento para o preparo das amostras de acordo com a literatura já descrito na parte experimental, envolveu várias etapas: centrifugação, extração do ácido fólico (meio básico utilizando-se *ultra-som*), clarificação da amostra (adição de ácido tricloroacético para a precipitação de proteínas), filtração em filtro quantitativo e filtração em membrana Millipore (etapa lenta), anterior à injeção no cromatógrafo. Todo este processo é demorado e trabalhoso em comparação com o método proposto por **SWAdSV/AgSIE**.

Os resultados referentes a **Tabela 11**, sobre a determinação de ácido fólico em sucos de frutas, não foram satisfatórios, comparado aos resultados das amostras de fármacos utilizando o método aplicado HPLC, pois, as amostras de sucos de frutas foram fortificadas com ácido fólico padrão ($C_{FA} = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$), e as concentrações de FA encontradas em sucos *in natura* foram: pêssego (9,19), acerola (9,22), abacaxi hawai (9,68) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e sucos industrializados: pêssego (9,99) e maracujá (11,91) $\mu\text{g mL}^{-1}$, não detectando a concentração de FA nos sucos de frutas.

Na **Tabela 12** estão os resultados das análises de amostras de alguns sucos de frutas *in natura* e industrializados, conduzidos à técnicas SWAdSV/AgSIE e HPLC na determinação de FA em sucos de frutas *in natura* e industrializados.

Tabela 12. Resultados obtidos por SWAdSV/AgSIE e HPLC, na determinação de ácido fólico em amostras de suco de pêssogo *in natura* e industrializado

Suco de Fruta	SWAdSV/AgSIE	HPLC		
	$C_{FA \text{ det.}} / \text{RSD}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) / %	$C_{FA \text{ adic.}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$C_{FA \text{ det.}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($C_{FA \text{ det.}} / \text{RSD}$) %
Pêssego NI	$6,44 \times 10^{-2} \pm 0,5 / (64,4)^*$	10	9,99	$99,99 \pm 0,10$
Pêssego N	$7,77 \times 10^{-2} \pm 0,4 (77,7)^*$	10	9,19	$91,90 \pm 0,12$
Acerola N	$3,00 \times 10^{-4} \pm 0,5 (00,3)^*$	10	9,22	$92,20 \pm 0,12$
Abacaxi Hawai N	$6,62 \times 10^{-2} \pm 0,4 (66,2)^*$	10	9,68	$96,77 \pm 0,11$
Maracujá NI	$7,32 \times 10^{-2} \pm 0,3 (73,2)^*$	10	11,91	$119,12 \pm 0,09$

N : suco de fruta *in natura*; NI: suco de fruta industrializado; *n= 3 repetições;

$C_{FA \text{ det.}}$ (concentração de ácido fólico determinado);

$C_{FA \text{ adic.}}$ (concentração de ácido fólico adicionado).

* concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Diante dos resultados comparativos (**Tabela 12**), para a determinação de ácido fólico em algumas amostras de sucos de frutas *in natura* e industrializados, aplicando-se a SWAdSV/AgSIE e HPLC, pode-se observar que, as amostras fortificadas com ácido fólico padrão ($C_{FA \text{ padrão}} = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) após analisadas, forneceram valores de (9,19 a 11,91) $\mu\text{g L}^{-1}$ (91,90 a 119,12 %), conduziram boa exatidão, estando os valores no intervalo de aceitação (80 – 120 %). As amostras de sucos de frutas analisadas por voltametria, não foram fortificadas e os resultados (**Tabela 7**), ilustra as concentrações de ácido fólico de (0,3 a 73,2) $\mu\text{g L}^{-1}$, encontradas em amostras de sucos de frutas de pêssogo, lima pérsia, morango, cajú, acerola, abacaxi, maçã e maracujá, então, os dados obtidos por **SWAdSV/AgSIE** são mais precisos, comparados aos resultados obtidos por **HPLC**.

5 Conclusões

O eletrodo de trabalho **AgSIE** foi preparado, sua superfície caracterizada como um filme sólido intermetálico **Ag₂Hg_{3,02}**, na ausência de Hg (líquido). Assim:

I- O método analítico foi desenvolvido, validado e aplicado com sucesso em determinações do conteúdo do FA em amostras de: 1- fármacos, disponibilizados em farmácias locais; e 2- de sucos de frutas *in natura* e industrializados, disponibilizado no mercado local; evidenciando a aplicação do método às análises de rotina na área farmacêutica e alimentícia.

II- A aplicação do método em análises de rotina conforme apresentado no parágrafo anterior atendeu a:

- Minimização do tempo de preparação das amostras quando comparado ao método cromatográfico e outros;
- Rapidez na execução das análises (frequência de análises);
- Sensibilidade e a seletividade;
- Minimização do custo das análises;
- Minimização das quantidades de produtos químicos, tóxicos, quando comparado ao método cromatográfico, atendendo aos preceitos da “química verde”, utilizando um consumo mínimo de solvente no preparo do eletrólito de suporte (volume de 10 mL de solução tamponante de fosfato de sódio 0,10 mol L⁻¹, pH 5,6). Eletrodo de trabalho sólido intermetálico (AgSIE) estável, utilizado em substituição ao eletrodo de mercúrio, metal que leva a formação de substâncias com toxicidade ambiental como os organometálicos.

III- A comparação entre o método com a técnica instrumental **SWAdSV** sobre o eletrodo **AgSIE** e sobre o eletrodo de amalgama dentário (**AD**) permitiu demonstrar que, com a utilização do eletrodo **AgSIE**, há uma melhor efetividade na resposta eletroquímica dos sistemas investigados em termos de seletividade e sensibilidade.

IV- Nas determinações do ácido fólico por **HPLC**, para a validação parcial do método eletroquímico quando aplicado aos:

- Fármacos requereram para a preparação das amostras um tempo maior quando comparada ao método eletroquímico devido à etapa de filtração por membrana de 0,45 μm (Mililipore).
- Sucos de frutas *in natura* e industrializados exigiram uma etapa longa referente ao processo de preparação da amostra para a análise: extração do FA, clarificação e filtração por membrana 0,45 μm (Mililipore).

V- A comparação entre resultados para as mesmas amostras, aplicando as técnicas Eletroquímica (**SWAdSV/AgSIE**) e **HPLC**, permitiu evidenciar que em termos de:

1- Limite de detecção para a determinação do FA, o método eletroquímico ($\text{LD}_{\text{SWAdSV/AgSIE}} = 6,79 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) é mais sensível, menor custo, mais rápido, quando comparado ao método cromatográfico ($\text{LD}_{\text{HPLC}} = 8,38 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$).

Tempo de preparo para **SWAdSV/AgSIE**: Fármaco de ácido fólico (25 min);

Fármaco de ácido fólico multivitamínico (35 min) e Suco de fruta (50 min).

Tempo de preparo para **HPLC**: Fármaco de ácido fólico (35 min);

Fármaco de ácido fólico multivitamínico (45 min) e Suco de fruta (120 min).

2- Recuperação (avaliação da exatidão) para as amostras de fármacos o método eletroquímico ($R\% = 98,4 - 99,9$) e cromatógrafo ($R\% = 84,5 - 109,0$) aplicados em amostras de fármacos, conduziram a uma boa exatidão, estando os valores de recuperação dentro do intervalo de aceitação (80 - 120) %. Para os sucos de frutas, aplicando-se a SWAdSV/AgSIE, os resultados foram satisfatórios, onde foi possível quantificar a concentração de FA, **sem a fortificação** da amostra ($C_{\text{calculada}} = 3,35 \times 10^{-4} - 0,08$) $\mu\text{g mL}^{-1}$, já os resultados em amostras **fortificadas com ácido fólico padrão** ($C_{\text{FA}} = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e analisadas em HPLC ($C_{\text{calculada}} = 9,19 - 11,91$) $\mu\text{g mL}^{-1}$, não atingiram os resultados esperados, pois, não demonstraram as concentrações do analito em sucos de frutas, comparados aos resultados esclarecidos em SWAdSV/AgSIE.

Referências

Referências

- 1 DONG, M. W.; LEPORE, J.; TARUMOTO, T. Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins. **Journal of Chromatography**, v. 442, p. 81-95, 1988.
- 2 FERRINE, M. T.; BORGES, V. C.; MARCO, D.; AGUIAR, J. E.; BOTTONI, A.; WAITZBERG, D. L. Vitaminas. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. Cap. 1, p. 95-115.
- 3 WOUTERS, J. T. M.; AYAD, H. E. E.; HUGHENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk to fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 3, p. 91-109, Jan. 2002.
- 4 KONINGS, E. J. M.; ROOMANS, H. H. S.; DORANT, E.; GOLDBOHUM, R. A.; SARIS, W. H. M.; BRANDT, P. A. Folate intake of the dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 765-776, Apr. 2001.
- 5 DANG, J.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 295-298, Jan. 2000.
- 6 CZEIZEL, A. E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 26, p. 1832-1835, Dec. 1992.
- 7 PAZ, R. de; HERNANDEZ-NAVARRO, F. Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, n. 1, p. 113-119, 2006.
- 8 SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos efeitos do tubo neural. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 1, p. 17-24, jan. 2007.
- 9 TYAGI, N.; KANDEL, M.; MUNJAL, C.; VACEK, J. C.; QIPSHIDZE, N.; PUSHPAKUMAR, S. B.; METREVELI, N.; TYAGI, S. C. Homocysteine mediated decrease in bone blood flow and remodeling: role of folic acid. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 10, p. 1511-1516, Oct. 2011.
- 10 ZANROSSO, C. W.; EMERENCIANO, M.; FIGUEIREDO, A.; REIS, M.; CORDEIRO, S. N. S.; SPENDORE, A.; OLIVEIRA, M. P. Influência da metileno-tetraidrofolato redutase na patogênese das leucemias agudas infantis. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 289-295, set. 2005.
- 11 FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C. A.; MATTHEWS, R. G.; BOERS, G. J. H.; HEIJER, M. D.; KLUIJTMANS, L. A. J.; HEUVEL, L. P.; ROSEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v. 10, p. 111-113, May 1995.

12 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 344, de 13 de dezembro de 2002. Regulamenta a adição de ácido fólico e ferro em farinhas de trigo e milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 6 out. 2010.

13 HAWKES, J. G.; VILLOTA, R. Folates in foods: reactivity, stability during processing and nutritional implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 439-539, Nov. 1989.

14 LUCOCK, M. D.; GREEN, M.; PRIESTNALL, M.; DASKALAKIS, I.; HARTLEY, R. Optimisation of chromatographic conditions for the determination of folates in foods and biological tissues for nutritional and clinical work. **Food Chemistry**, v. 53, p. 329-338, Jan. 1995

15 DICK, M.; HARRISON, I. T.; FARREER, K. T. H. The thermal stability of folic acid. **Australian Journal of Experimental Biology Medicinal Science**, v. 26, p. 239-244, Dec. 1948.

16 LUND, W. Principles and practice of pharmaceuticals. **Chemical Society**, v. 21, p. 1526-1528, 1994.

17 KINDUKERN DO BRASIL QUÍMICA. Sistema de Gestão de Certificação NBR ISO 9001: 2008. **Informações sobre produtos químicos**. 2007. Disponível em: <<http://indukem.com>>. Acesso em: 20 maio 2014.

18 VAN DEN BERG, C. M. G.; LE GALL, A. C. Determination of folic acid in sea water using adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytical Chimica Acta**, v. 282, p. 459-470, June 1993.

19 KING, M. W. **Vitaminas hidrossolúveis**. 2011. Disponível em: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.php>>. Acesso em: 12 maio 2014.

20 BALUZ, K.; CARMO, M. G. T.; ROSAS, G. O. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 597-607, set. 2002.

21 MILLER, A. L. The methylation, neurotransmitter and antioxidant connections between folate and depression. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 13, n. 3, p. 216-226, Jan. 2008.

22 ULRICH, C. M. Nutrigenetics in cancer research-folate metabolism and colorectal cancer. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2698-2702, Nov. 2005.

23 JACOBSEN, E.; BJORSEN, M. W. Polarographic determination of folic acid in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**, v. 96, p. 345-351, Oct. 1978.

24 LUO, D-B. Determination of folic acid by adsorptive stripping voltammetry at the static mercury drop electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 189, p. 277-283, Oct. 1986.

- 25 HAN, J.; CHEN, H.; GAO, H. Alternating current adsorptive stripping voltammetry in a flow system for the determination of ultratrace amounts of folic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 252, p. 47-52, May 1991.
- 26 O'SHEA, T. J.; GARCIA, A. C.; BLANCO, P. T. Electrochemical pretreatment of carbono fibre microelectrodes for the determination of folic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 307, p. 63-71, Jan. 1991.
- 27 VILLAMIL, M. J. F.; ORDIERES, A. J. M.; GARCIA, A. C.; BLANCO, P. T. Simultaneous adsorptive stripping voltammetric determination of riboflavina and folic acid in multivitamin preparations. **Analytica Chimica Acta**, v. 273, n. 2, p. 377-382, Feb. 1993.
- 28 KOROLCZUK, M.; TYSZCZUK, K. Determination of folic acid by adsorptive stripping voltammetry at a lead film electrode. **Electroanalysis**, v. 19, n. 18, p. 1959-1962, July 2007.
- 29 OJANI, R.; RAOOF, J. B.; ZAMANI, S. Electrocatalytic oxidation of folic acid on carbon paste electrode modified by nickel ions dispersed into poly (o-ansidine) film. **Electroanalysis**, v. 21, n. 24, p. 2634-2639, June 2009.
- 30 MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n.12, p. 1882-1886, Out. 1975.
- 31 MIKKELSEN, O.; SCHRODER, K. M. Amalgam electrodes for electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 15, n. 8, p. 679-687, June 2003.
- 32 SOUZA, D. de; TOLEDO, R. A. de; SUFFREDINI, H. B.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Characterization and use of copper solid amalgam electrode for electroanalytical determination of triazines-based herbicides. **Electroanalysis**, v. 18, n. 6, p. 605-612, Mar. 2006.
- 33 YOSYPCHUK, B.; NOVOTNY, L. Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. **Electroanalysis**, v. 14, n. 24, p. 1733-1738, Dec. 2002.
- 34 NOVOTNY, L.; YOSYPCHUK, B. Cathodic stripping voltammetry of cysteine using silver and copper solic amalgam electrodes. **Talanta**, v. 56, n. 5, p. 971-976, Oct. 2002.
- 35 ARDAKANI, M. M.; BEITOLLAHI, H.; AMINI, M. K.; MIRKHALAF, F.; ALIBEK, M. A. New strategy for simultaneous and selective voltammetric determination of norepinephrine, acetaminophen and folic acid using ZrO₂ nanoparticles-modified carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 151, p. 243-249, Sept. 2010.
- 36 ARDAKANI, M. M.; MOHSENI, M. A. S.; BEITOLLAHI, H.; BENVIDI, A.; NAEIMI, H. Simultaneous determination of dopamine, uric acid, and folic acid by a modified TiO₂ nanoparticles carbon paste electrode. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 35, p. 573-585, July 2011.

- 37 ENSAFI, A. A.; KARIMI-MALEH, H. Modified multiwall carbon nanotubes paste electrode as a sensor for simultaneous determination of 6-thioguanine and folic acid using ferrocenedicarboxylic acid as a mediator. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 640, p. 75-83, Jan. 2010.
- 38 PRASAD, B. B.; MADHURI, R.; TIWARI, M. P.; SHARMA, P. S. Electrochemical sensor for folic acid based on a hyperbranched molecularly imprinted polymer-immobilized sol-gel-modified pencil graphite electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, p. 321-330, Feb. 2010.
- 39 PRASAD, B. B.; MADHURI, R.; TIWARI, M. P.; SHARMA, P. S. Imprinted polymer-carbon consolidated composite fiber sensor for substrate-selective electrochemical sensing of folic acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2140-2148, Feb. 2010.
- 40 ARVAND, M.; DEHSARAEI, M. A simple and efficient electrochemical sensor for folic acid determination in human blood plasma based on gold nanoparticles-modified carbon paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 3474-3480, Apr. 2013.
- 41 KAZEMI, S.; KARIMI-MALEH, H.; HOSSEINZADEH, R.; FARAJI, F. Selective and sensitive voltammetric sensor based on modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous determination of L-cysteine and folic acid. **Ionics**, v. 19, p. 933-940, Oct. 2012.
- 42 MAZLOUM-ARDAKANI, M.; ABOLHASANI, M.; MIRJALILI, B. F.; SHEIKH-MOHSENI, M. A.; DEHGHANI-FIROUZABADI, A.; KHOSHROO, A. Electrocatalysis of dopamine in the presence of uric acid and folic acid on modified carbon nanotube paste electrode. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, p. 201-209, Feb. 2014.
- 43 BANDZUCHOVÁ, L.; SELESOVSKÁ, R.; NAVRÁTIL, T.; CHYLKOVÁ, J. Electrochemical behavior of folic acid on mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 2411-2419, Nov. 2011.
- 44 BANDZUCHOVÁ, L.; SELESOVSKÁ, R. Voltammetric determination of folic acid using liquid mercury free silver amalgam electrode. **Acta Chimica**, v. 58, p. 776-784, Jan. 2011.
- 45 WANG, J. Study of electrode reactions and interfacial properties. In: _____. **Analytical electrochemistry**. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, 2006. Cap. 2, p. 32-35.
- 46 CROW, D. R. Electrochemical sensors. In: _____. **Principles and applications of electrochemistry**. 4th ed. London: Blackie Academic & Professional, 1994. Cap. 2, p. 216-221.
- 47 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Voltametria cíclica. In: _____. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. 2. ed. Coimbra: Oxford University Press, 1993. Cap. 2, p. 102-104.
- 48 MONK, P. M. S. Analysis by dynamic measurement: a systems under diffusion control. In: _____. **Electroanalytical chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2001. Cap. 6, p.156-159.

49 SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, fev. 2003.

50 RAMALEY, L.; KRAUSE, M. S. Theory of square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1362-1365, Sept. 1969.

51 LOVRIC, M. Square wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 248, n. 2, p. 239-253, July 1988.

52 CATHARINO, R. R.; VISENTAINER, J. V.; GODOY, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 389-395, dez. 2003.

53 CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.; LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 972-976, jun. 2006.

54 LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Avaliação do comportamento do ácido fólico no processamento de leites enriquecidos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 1, p. 57-62, mar. 2006.

55 LIMA, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos: estudo da vida-de-prateleira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 82-87, mar. 2004.

56 CHAUDHARY, A.; WANG, J.; PRABHU, S. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspirin and folic acid from nano-particulate systems. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 919-925, Dec. 2009.

57 RAHIMI, R.; GOODARZI, N. Determination of folic acid in mint vegetable, by high-performance liquid chromatography. **Organic Chemistry Journal**, v. 1, p. 31-35, June 2011.

58 LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F. "Green Chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, jun. 2003.

59 NOWAKOWSKI, R.; PIELASZEK, J.; DUS, R. Surface mediated Ag-Hg alloy formation under ambient and vacuum conditions-AFM and XRD investigations. **Applied Surface Science**, v. 199, p. 40-51, Apr. 2002.

60 ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Peer Verified Methods Policies and Procedures. **Manual on policies and procedures**. Arlinton, 1998. Cap. 3, p. 9-11.

61 XIAO, F.; RUAN, C.; LIU, L.; YAN, R.; ZHAO, F.; ZENG, B. Single-walled carbon nanotube-ionic liquid paste electrode for the sensitive voltammetric determination of folic acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, p. 895-901, July 2008.

62 VAZE, V. D.; SRIVASTAVA, A. K. Electrochemical behavior of folic acid at calixarene based chemically modified electrodes and its determination by adsorptive stripping voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 1713-1721, Aug. 2007.

63 WAN, Q.; YANG, N. The direct electrochemistry of folic acid at a 2-mercaptobenzothiazole self-assembled gold electrode. **Electroanalytical Chemistry**, v. 527, p. 131-136, Mar. 2002.

64 WEI, S.; ZHAO, F. XU, Z.; ZENG, B. Voltammetric determination of folic acid with a multi-walled carbon nanotube-modified gold electrode. **Microchimica Acta**, v. 152, p. 285-290, Jan. 2006.

65 FARIAS, P. A. M.; REZENDE, M. C.; MOREIRA, J. C. Folic acid determination in neutral pH electrolyte by adsorptive stripping voltammetry at the mercury film electrode. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 302-311, Apr. 2012.

Perspectivas de Trabalhos Futuros

- Aplicação do método **SWAdSV / AgSIE** na determinação de outras vitaminas, dentre compostos orgânicos com características químicas similares ao ácido fólico, contribuindo assim, na área farmacêutica e alimentícia nas análises de rotina.
- Estudo detalhado, aplicando-se a técnica de voltametria cíclica (**CV**), sobre adsorção e reversibilidade do ácido fólico frente à superfície do eletrodo AgSIE utilizado no desenvolvimento deste trabalho.